

银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响

主余华, 王京, 梁斌, 任万华, 张春清

■背景资料

研究表明, 在肝病早期, 仅有轻度纤维化时就有肝微循环的改变, 当肝纤维化向肝硬化进展时, 微循环障碍更明显。慢性乙型肝炎时存在肝脏微循环障碍已成为大家的共识。有些学者提出可用改善微循环制剂如复方丹参、肝素等, 干扰或阻抑肝纤维化发展。银杏叶提取物EGb具有降低血栓程度、改善血液流变学特性等作用。目前有研究表明, EGb在慢性肝损伤、肝纤维化过程中具有保护预防作用。但临床缺少系统的临床对照研究。

主余华, 王京, 梁斌, 任万华, 张春清, 山东大学山东省立医院消化内科 山东省济南市 250021
山东省科委优秀中青年科学家基金, No. 03BS016
通讯作者: 张春清, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院消化内科. zhchqing@medmail.com.cn
电话: 0531-85186350
收稿日期: 2006-12-07 接受日期: 2007-01-04

Effect of Ginkgo biloba extract on liver microcirculatory dysfunction in patients with chronic hepatitis B

Yu-Hua Zhu, Jing Wang, Bin Liang, Wan-Hua Ren, Chun-Qing Zhang

Yu-Hua Zhu, Jing Wang, Bin Liang, Wan-Hua Ren, Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China
Supported by the Foundation of Shandong Provincial Science and Technology Commission for Excellent Young and Middle-Aged Scientists, No. 03BS016
Correspondence to: Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China. zhchqing@medmail.com.cn
Received: 2006-12-07 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To evaluate the effect of Ginkgo biloba extract (EGb761) on the microcirculatory dysfunction of hepatic sinusoid in patients with chronic hepatitis B.

METHODS: Forty-seven chronic hepatitis B patients were randomly divided into EGb761 treatment group ($n = 26$) and control group ($n = 21$). All the cases underwent liver biopsy before and after treatment. The pathological changes of liver tissues were detected by HE staining. At the same time, 10 samples were selected from each group, and the changes of hepatic sinusoidal microcirculation were analyzed by electron microscopy before and after treatments.

RESULTS: After treatment, liver cirrhosis and tissue damages were improved significantly ($P < 0.05$) in EGb761 treatment group (inflammation score: 10.7 ± 4.8 ; fibrosis score: 8.3 ± 4.2) as com-

pared with those in patients before treatment (inflammation score: 15.7 ± 6.3 ; fibrosis score: 11.9 ± 6.2) and the controls (inflammation score: 14.2 ± 6.6 ; fibrosis score: 11.5 ± 5.6). Meanwhile, electron microscopy showed that liver microcirculatory dysfunction was improved obviously in EGb761 group after treatment in comparison with that before treatment, and the congregation of red cells in liver sinus (32 vs 56 , $P < 0.01$), the sedimentation of collagen in hepatic sinusoid and Disse space (23 vs 38 , $P < 0.05$), the damage of hepatic sinusoidal endothelial cells (41 vs 59 , $P < 0.05$), and the hepatic sinusoidal capillarization (17 vs 32 , $P < 0.05$) were markedly alleviated. But no difference was found before and after treatment in control group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: EGb761 can improve hepatic microcirculation possibly through protecting hepatic sinusoidal endothelial cells from injury, inhibiting aggregation of blood cells, collagenous proliferation in sinusoid or Disse space and hepatic sinusoidal capillarization.

Key Words: Ginkgo biloba extract; Chronic hepatitis B; Hepatic sinusoid; Hepatic microcirculation

Zhu YH, Wang J, Liang B, Ren WH, Zhang CQ. Effect of Ginkgo biloba extract on liver microcirculation dysfunction in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(7):750-754

摘要

目的: 探讨银杏叶提取物(EGb761)对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响。

方法: 将47例慢性乙型肝炎患者分为EGb761治疗组26例及对照组21例, 治疗前后分别进行肝组织活检术, 肝组织行HE染色, 并各取10例电镜观察治疗前后的肝窦微循环变化。

结果: 治疗后肝活检证实, 与治疗前(炎症计分: 15.7 ± 6.3 ; 纤维化计分: 11.9 ± 6.2)和对照组治疗后(炎症计分: 14.2 ± 6.6 ; 纤维化计分: 11.5 ± 5.6)相比, EGb761治疗组肝组织损伤程度及纤维化程度明显改善(炎症计分: $10.7 \pm$

4.8; 纤维化计分: 8.3 ± 4.2) ($P < 0.05$); 与治疗前相比, EGb761治疗组电镜下肝窦内血细胞聚集或微血栓形成(32 vs 56, $P < 0.01$)、窦腔及Disse隙胶原沉积(23 vs 38, $P < 0.05$)、窦内皮损伤(41 vs 59, $P < 0.05$)、毛细血管化(17 vs 32, $P < 0.05$)等肝脏微循环障碍明显改善; 而对照组治疗前后均无明显变化($P > 0.05$)。

结论: 银杏叶提取物能保护慢性乙肝患者肝窦内皮细胞, 抑制肝窦内血细胞聚集及微血栓形成, 抑制肝窦及Disse隙内胶原沉积及肝窦毛细血管化, 改善肝脏微循环。

关键词: 银杏叶提取物; 慢性乙型肝炎; 肝窦; 肝脏微循环

主余华, 王京, 梁斌, 任万华, 张春清. 银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):750-754

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/750.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎患者存在肝脏微循环障碍, 肝脏微循环障碍是乙型肝炎的重要病理特征, 是导致肝炎慢性化的重要环节, 并且微循环障碍与肝纤维化相互促进、相互因果, 形成恶性循环, 是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段. 因此慢性乙型肝炎时改善微循环及抗肝纤维化治疗极有必要^[1-2]. 作为传统的微循环改善剂及细胞保护剂, 银杏叶提取物在心脑血管疾病应用广泛, 能明显改善心脑血管等缺血性疾病的微循环障碍及组织损伤^[3-4]. 我们前期动物实验研究表明, 银杏叶提取物可用抑制肝纤维化, 改善肝纤维化大鼠肝窦微循环障碍, 缓解肝细胞损伤, 未见明显副反应^[5]. 我们以慢性乙型肝炎患者为研究对象, 观察银杏叶提取物标准品(EGb761)对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-05/2006-06的慢性乙型肝炎患者47例, 诊断符合2000年病毒性肝炎防治方案的标准^[6], 肝炎病史半年以上, HBsAg阳性, HBV DNA阳性, 但半年内ALT水平在正常值3倍以下; 治疗前均行肝穿刺活检及静脉抽血备检; 肝功能Child A级, 无腹水或下肢水肿; 超声检查无明显肝硬化征象; 无消化道出血病史; 无合并其他器质性疾病; 年龄 < 65 岁, 其中男51例, 女23例, 年龄17-63(平均41)岁. 分为银杏叶组($n = 26$)

表1 两组患者的一般情况

分组	n	年龄(岁)	病程(年)	谷丙转氨酶(nkat/L)
EGb组	26	44.7 \pm 10.8	3.4 \pm 1.8	1261.9 \pm 308.4
对照组	21	42.9 \pm 11.3	3.3 \pm 1.7	1388.6 \pm 190.0

例)和对照组($n = 21$ 例); 试验前3-6 mo内未使用过或合并使用糖皮质激素、免疫调节剂、抗病毒药物及抗肝纤维化药物. 对照组静脉滴注易善复930 mg每日一次, 共4 wk, 银杏叶组除易善复外加用银杏叶提取物标准品(德国舒培大药厂提供, 商品名金纳多)70 mg, 静滴, 每日一次, 共4 wk. 两组患者的平均年龄、性别比例、平均病程及肝功能水平等差异均无显著性(表1)。

1.2 方法 于治疗前后行两次肝穿刺活检; 肝穿组织40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 备光镜观察; 两组各有10例留取约1 cm的穿刺组织用25 g/L戊二醛固定, 常规电镜制样。

1.2.1 光镜观察 26例银杏叶组和21例对照组治疗前后的肝穿刺组织, 石蜡包埋, 4 μ m切片, 常规HE染色; 肝组织损伤程度采用Knodell计数法(HAI), 并按“HAI炎症积分”“HAI纤维化积分”分别进行统计。

1.2.2 电镜标本制作及观察 两组各有10例患者治疗前后的肝活检组织行电镜观察. 肝组织组织25 g/L戊二醛溶液中前固定, 4 $^{\circ}$ C条件下保存, 再依次经PBS冲洗, 10 g/L饿酸后固定(4 $^{\circ}$ C, 1 h), PBS冲洗, 50%-70%-80%-90%-95%-100%梯度酒精脱水各10 min, EPON812环氧树脂渗透聚合, 平板包埋36 h, 切成50-70 nm的切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, H-600透射电镜观察, 每例患者治疗前后的切片各随机读取10个肝窦, 观察肝窦是否通畅、有无血栓形成及胶原纤维沉积; 内皮细胞有无破坏损伤; Disse隙有无细胞外基质沉积及有无肝窦的毛细血管化; 肝实质细胞的损伤情况. 每组治疗前后均统计100个肝窦, 进行定量比较。

统计学处理 计量资料的各项指标均采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD), 使用SPSS11.5软件包进行单因素方差分析及 t 检验、 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜观察应用EGb761治疗前后肝脏的组织学变化 治疗组治疗后较治疗前炎症及纤维化计分均明显下降, 与对照组比较有显著性差异(表

■ 相关报道

近几年关于中药对肝纤维化治疗研究较为热烈, 银杏叶提取物研究也较多, 本课题组及其他研究者既往动物实验表明, EGb761可用于治疗肝纤维化, 主要从病理、生理、细胞水平和分子生物水平, 研究其对肝纤维化生成和发展各个环节, 包括对星形细胞、细胞外基质代谢、胶原酶表达等的影响, 取得较好的疗效。

■创新点

本课题组及其他研究者既往动物实验表明, EGb761可用于治疗肝纤维化, 并能取得较好的疗效, 但相关的临床应用研究报道尤其是对肝脏微循环障碍方面的研究较少。本研究即以慢性乙型肝炎患者为对象, 观察银杏叶提取物对其肝脏微循环的改善, 以进一步探讨银杏叶提取物抗肝纤维化的机制。

表 2 两组患者治疗前后病理半定量计分变化(mean ± SD)

分组	n	炎症计分	纤维化计分
EGb761组			
治疗前	26	15.7 ± 6.3	11.9 ± 6.2
治疗后	26	10.7 ± 4.8 ^a	8.3 ± 4.2 ^a
对照组			
治疗前	21	15.6 ± 5.9	11.7 ± 5.4
治疗后	21	14.2 ± 6.6 ^b	11.5 ± 5.6 ^b

^aP<0.05 vs 治疗前; ^bP<0.05 vs 治疗组治疗后。

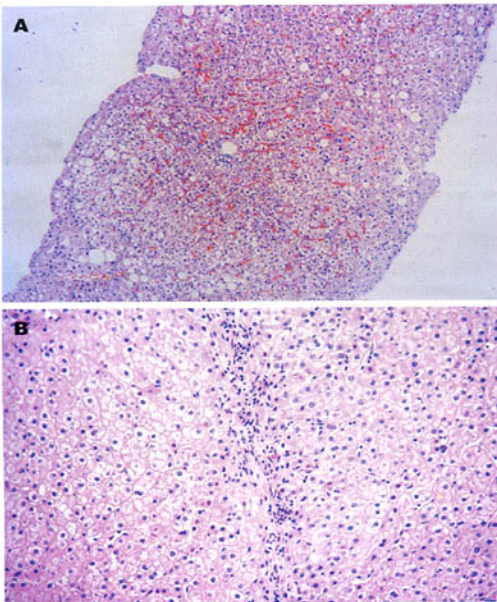


图 1 EGb761治疗前后肝组织(HE染色)。A: 治疗前肝细胞显著肿胀, 呈气球样变, 可见点、片状嗜酸性小体, 间质中有炎细胞浸润, 肝窦腔内红细胞显著聚集; B: 治疗后肝细胞肿胀减轻, 偶见嗜酸性小体, 肝窦腔通畅。

2). 治疗前肝细胞显著肿胀, 呈气球样变, 可见点、片状嗜酸性小体, 间质中有炎细胞浸润, 肝窦腔内红细胞显著聚集。治疗后肝细胞肿胀减轻, 偶见嗜酸性小体, 肝窦腔通畅(图1)。

2.2 电镜观察EGb治疗前后肝窦微循环改变 电镜观察: 治疗前两组肝细胞均显示不同程度损伤, 线粒体肿胀、嵴突断裂, 有的胞核固缩, 可见肝细胞溶解坏死, 代之以胶原组织(图2A); 治疗前56%的肝窦呈现微血栓形成(图2B); 38%的肝窦或Disse隙有不同程度的细胞外基质沉积(图2C); 59%的肝窦呈现窦内皮损伤或破坏, 32%的肝窦表现为窦内皮窗孔减少或消失, 基底膜形成或肝窦毛细血管化。银杏叶治疗后, 肝

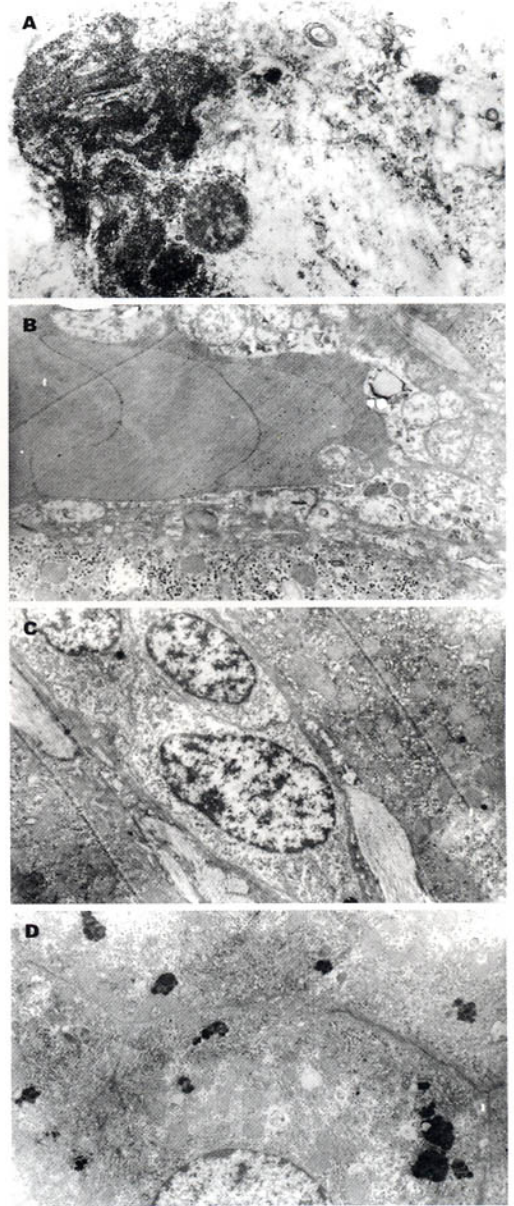


图 2 肝组织电镜下观察。A: EGb761治疗前肝细胞可见溶解坏死; B: EGb761治疗前肝窦微血栓形成, Disse隙胶原纤维沉积; C: EGb761治疗前肝窦内皮窗孔消失, Disse隙见胶原纤维沉积; D: EGb761治疗后肝细胞器有变性, 但细胞形态、结构及细胞间连接基本正常。

细胞损伤明显减轻(图2D), 肝窦内胶原纤维沉积及微血栓形成、Disse隙纤维沉积, 肝窦内皮细胞损伤及肝窦内皮毛细血管化等的阳性率明显减少(表3), 而对照组治疗前后变化不明显。

3 讨论

肝窦是肝脏微循环的重要组成部分。肝窦壁主

要由肝窦内皮细胞(SEC)组成, 正常SEC不同于一般的血管内皮细胞, 他在结构上的显著特点是有大量筛状排列的窗孔, 直径约0.1-1.0 μm , SEC下几乎没有基底膜。SEC的上述特点, 使肝窦具有极好的通透性便于肝细胞与血液之间进行活跃的物质交换。慢性肝病时存在明显的肝脏微循环障碍, Wanless *et al*^[7]对61例硬化肝的中等大小的肝静脉(直径0.2-3 mm)进行研究发现, 70%的肝静脉出现内膜纤维化, 且管腔至少减少了10%。他们认为, 一些肝脏血管内膜存在的多层纤维化, 提示有反复发生的血栓形成。也就是说, 血栓形成与血管壁纤维化, 乃至管腔闭塞之间存在着一定的因果关系。研究表明, 在肝病早期, 仅有轻度纤维化时就有肝微循环的改变, 当肝纤维化向肝硬化进展时, 微循环障碍更明显^[8]。我们及其他作者研究均表明^[1-2], 慢性乙型肝炎存在明显的肝窦微循环障碍, 其表现为肝窦内红细胞或血小板聚集, 微血栓形成, 堵塞管腔; 或内皮细胞受损破裂, 血细胞渗入Disse隙; 或肝细胞肿胀, 肝窦内众多淋巴细胞、单核细胞阻塞窦腔, 以至肝窦狭窄或阻塞、窦内皮损伤、血液及肝脏微循环障碍, 影响肝细胞的血液供应及物质交换, 肝细胞缺血、缺氧、变性或坏死。其结果不仅导致肝窦压升高、引起肝细胞缺血缺氧及炎症反应, 还通过多种细胞因子激活HSC, 使之产生大量细胞外基质沉积于肝窦或Disse隙形成基膜样物质, 从而进一步加重肝窦微循环障碍、加重肝实质缺氧或缺血状态、加重纤维组织增生。所以肝窦微循环障碍与肝组织损伤及肝纤维化关系密切, 并相互因果、相互影响, 共同促进肝病发展^[1]。改善肝脏微循环是慢性肝病治疗的重要环节。目前, 国际上标准的银杏提取物EGb761主要可分为两大类: 24%黄酮类和6%萜内酯类。现代药理学研究银杏提取物的中萜内酯类主要作用为: 改善微循环和解痉、拮抗血小板活化因子、降血脂、抗动脉硬化, 其黄酮类有调节免疫、清除自由基、抗氧化的作用^[9-10]。在心脑血管缺血性疾病中应用广泛, 对改善心脑血管微循环障碍及组织损伤已取得肯定疗效^[3-4]。目前有研究表明, EGB在慢性肝损伤、肝纤维化过程中具有保护预防作用^[11-12]。

我们发现, 银杏叶治疗组, 治疗后患者病理组织学得到了明显的改善, 炎症计分及纤维化计分均明显减轻。电镜观察, 肝窦内血细胞聚集及微血栓形成消失或明显减少, 肝窦及Disse隙

表3 EGb761治疗前后肝脏微循环变化(每组各统计100个肝窦)

分组	n	红细胞聚集或微血栓形成	肝窦或Disse隙胶原沉积	肝窦内皮损伤	毛细血管化
EGb组					
治疗前	100	56	38	59	32
治疗后	100	32 ^{bc}	23 ^{bc}	41 ^{bc}	17 ^{bc}
对照组					
治疗前	100	55	37	61	31
治疗后	100	53	34	57	29

^a $P < 0.05$ vs 治疗前; ^b $P < 0.01$ vs 治疗前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组治疗后。

胶原沉积减轻, 肝窦内皮细胞损伤缓解, 肝窦腔通畅, 肝窦毛细血管化亦显著低于治疗前。与我们动物实验结果相似^[7,13]。该结果进一步证实银杏叶提取物不仅能有效改善心脑血管供血不足, 还可有效改善慢性乙型肝炎患者的肝脏微循环障碍, 改善肝组织的血液灌注, 减轻肝纤维化及肝组织损伤。

银杏叶提取物改善肝窦微循环的机制可能与拮抗血小板活化因子、抑制血细胞聚集、保护肝窦内皮细胞损伤、抑制微血栓形成有关; 同时抑制肝星状细胞活化及细胞外基质沉积、减少肝窦及Disse间隙胶原形成^[13-14], 也是EGb761改善肝窦微循环障碍的重要原因。银杏叶提取物对肝窦微循环障碍的改善对慢性肝病的辅助治疗具有重要意义。

4 参考文献

- 1 严家春, 马勇, 陈文笔, 孙新华, 裴波. 乙型肝炎肝窦病变的免疫组织化学及电镜观察. 世界华人消化杂志 1999; 7: 943-947
- 2 Hao J, Shi J, Ren W, Han G, Zhu J, Wang S, Xie Y. Hepatic microcirculatory disturbances in patients with chronic hepatitis B. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 65-68
- 3 Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, Horr R. Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 1996; 29: 47-56
- 4 Smith PF, Maclennan K, Darlington CL. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* 1996; 50: 131-139
- 5 张春清, 朱菊人, 石恒美, 吕晓霞. 银杏叶提取物对大鼠肝组织TGF- β_1 mRNA表达及胶原沉积的影响. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 284-286
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分

■应用要点

本研究表明银杏叶提取物能保护慢性乙型肝炎患者肝窦内皮细胞, 抑制肝窦内血细胞聚集及微血栓形成, 抑制肝窦及Disse隙内胶原沉积及肝窦毛细血管化, 改善肝脏微循环。研究结果可以指导临床应用。

■同行评价

本文研究了银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响, 实验思路清晰, 方法可信, 有较高的科学价值.

- 7 Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995; 21: 1238-1247
- 8 Sherman IA, Pappas SC, Fisher MM. Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis. *Am J Physiol* 1990; 258: H460-465
- 9 潘宇政. 银杏黄酮甙对人体免疫机能的影响. 广西医科大学学报 1998; 15: 27-28
- 10 何美霞, 刘方洲, 赵一, 牛志英. 银杏果袋泡茶抗自由基及改善微循环作用的实验研究. 中国中医药科技 1997; 4: 91-92
- 11 He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3924-3928
- 12 Luo YJ, Yu JP, Shi ZH, Wang L. Ginkgo biloba extract reverses CCl4-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1037-1042
- 13 Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl4 rats. *Am J Chin Med* 2004; 32: 21-31
- 14 Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Canadian Digestive Diseases
Week (CDDW)
16-20 February 2007
Banff - AB
cagoffice@cag-acg.org
www.cag-acg.org/cddw/cddw2007.htm

Meeting Falk Symposium 158: Intestinal
Inflammation and Colorectal Cancer
23-24 March 2007
Sevilla
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 159: IBD 2007 - Achievements
in Research and Clinical Practice
4-5 May 2007
Istanbul
symposia@falkfoundation.de

Digestive Disease Week
19-24 May 2007
Washington Convention Center, Washington DC

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and
Postgraduate Course
12-15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and
Clinical Practice in Gastroenterology
15-16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20-23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilts.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal
Cancer
27-30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com