

# 银杏黄酮对非酒精性脂肪肝模型小鼠的作用及 NF- $\kappa$ B 在其机制中的相关性分析

梁志清, 白纪红\*, 赵日红, 刘艳华, 李丽梅, 林秋香

桂林医学院附属医院, 桂林 541001

**摘要:** 本文观察银杏黄酮对非酒精性脂肪性肝 (NAFLD) 模型小鼠的作用, 并分析 NF- $\kappa$ B 与小鼠肝脏脂肪变性及其血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的相关性。170 只昆明小鼠随机分为正常对照组、模型组、银杏黄酮高 [300 mg/(kg·d)]、中 [150 mg/(kg·d)]、低 [75 mg/(kg·d)] 剂量组。采用高脂饲料构建非酒精性脂肪肝小鼠动物模型, 分别于给药后 4 周、8 周和 12 周末处死, 观察肝脏病理变化, 计算肝指数, 检测血清总胆固醇 (TC)、ALT、TNF- $\alpha$  以及肝组织 NF- $\kappa$ B 的表达。各剂量银杏黄酮组小鼠肝指数, 血清 TC、ALT 和 TNF- $\alpha$  水平, 肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 的表达量比模型组显著降低, 肝脏脂肪变性明显减轻 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量与肝脏脂肪变性程度及血清 ALT 含量呈正相关 ( $r > 0$ ,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。实验结果表明: 银杏黄酮可降低 NAFLD 小鼠血脂、减轻肝脏脂肪变性、改善肝功能指标及肝脏大体形态, 且有一定的剂量和时间依赖性; NF- $\kappa$ B 上游炎症通路可能是其作用的主要机制。

**关键词:** 银杏黄酮; 非酒精性脂肪性肝病; 核因子- $\kappa$ B

中图分类号: R96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.020

## Effect of Ginkgo Flavone on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice and the Correlation Analysis on NF- $\kappa$ B in the Action Mechanism

LIANG Zhi-qing, BAI Ji-hong\*, ZHAO Ri-hong, LIU Yan-hua, LI Li-mei, LIN Qiu-xiang

Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541001, China

**Abstract:** In this study, the effect of Ginkgo Flavone on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice was investigated, and the correlation between NF- $\kappa$ B and the level of hepatic steatosis or serum ALT was analyzed. 170 KM mice were randomly divided into 5 groups: control group, model group, high [300 mg/(kg·d)], medium [150 mg/(kg·d)] and low [75 mg/(kg·d)] dosage of Ginkgo Flavone groups. High fat diet was used to establish the animal model. The pathological changes of liver, liver index, the serum TC, ALT, TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in hepatic tissue were observed after 4, 8 and 12 weeks of administration. Compared with the model group; the level of liver index, serum TC, ALT, TNF- $\alpha$  and the expression of NF- $\kappa$ Bp65 in the Ginkgo Flavone groups were dramatically decreased. The hepatic steatosis was milder ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The correlation analysis showed that the NF- $\kappa$ Bp65 in hepatic tissue was positively correlated with the hepatic steatosis and the serum ALT ( $r > 0$ ,  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). These results showed that Ginkgo Flavone can decrease the serum lipid and hepatic steatosis, improve the index of liver function and liver histomorph in the time and dosage dependent manner. NF- $\kappa$ B related pathway might be the main mechanism of the effect.

**Key words:** Ginkgo Flavone; non-alcoholic fatty liver disease; nuclear factor- $\kappa$ B

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是无过量饮酒史, 以肝细胞脂肪变性、损伤及炎症细胞浸润为病理特征的临床综合征。已明确为隐源性肝硬化和肝癌的重要前期病变, 为肝

功能衰竭的可能原因。但 NAFLD 的发病机制尚不完全明确, 也无特殊的治疗方法, 探讨其发病机制、寻找积极有效的防治方法具有深远的意义。炎症因子失衡是 NAFLD 发病过程中致肝细胞损伤的重要病理生理基础。银杏黄酮是银杏叶的提取物, 具有抗炎、抗氧化和清除自由基的作用。

本研究通过观察不同时间、不同剂量银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝指数、血脂、血清 ALT、肝脏脂

收稿日期: 2015-08-27 接受日期: 2015-10-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81260078); 广西自然科学基金 (2012GXNSFAA276038, 2014GXNSFAA118152); 广西医药卫生自筹经费计划 (Z2015367)

\* 通讯作者 Tel: 86-013558030184; E-mail: bjhemail@163.com

肪变性程度、以及炎症通路的 NF- $\kappa$ Bp65 和 TNF- $\alpha$  的影响,研究银杏黄酮对 NAFLD 的干预作用;同时分析 NF- $\kappa$ Bp65 与肝脏脂肪变性程度及血清 ALT 水平的相关性,探讨其作用机制。期望为 NAFLD 的治疗提供新的思路,为推广银杏黄酮临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

4~6 周龄 SPF 级雄性昆明小鼠 170 只,体重 17~22 g,由桂林医学院实验动物中心提供(许可证号 SCXK 桂 2007-0001)。分笼饲养于相对湿度 50%~60%,室温 22~25  $^{\circ}$ C,自由饮水进食。

#### 1.1.2 主要药物和试剂

银杏黄酮(汉中天然谷生物科技有限公司);胆固醇(深圳市石金谷科技有限公司);蛋黄粉(亳州市红日蛋制品有限责任公司);丙硫氧嘧啶(南通净化制药股份有限公司);NF- $\kappa$ Bp65 RT-PCR 试剂(北京艾德莱生物科技有限公司),TNF- $\alpha$  ELISA 试剂(深圳达科为生物技术有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 模型制备及分组

170 只雄性昆明小鼠适应性喂养一周后按体重完全随机分为对照组 40 只和高脂组 130 只。对照组喂以符合饲料卫生标准的实验动物配合饲料,高脂组喂以高脂饲料(配合饲料 72.8%+猪油 10%+蛋黄粉 10%+蔗糖 5%+胆固醇 2%+丙硫氧嘧啶 0.2%)。每周称重 1 次。4 周末处死正常对照组 10 只,模型组 10 只,通过肝脏的病理变化确定造模成功与否。判断造模成功后,剩余对照组 30 只,余下 120 只高脂组随机分为模型组、银杏黄酮高[300 mg/(kg·d)]、中[150 mg/(kg·d)]、低[75 mg/(kg·d)]剂量组,每组各 30 只。

#### 1.2.2 药物干预

银杏黄酮高、中、低剂量组分别按照 300 mg/(kg·d)、150 mg/(kg·d)、75 mg/(kg·d) 剂量灌胃,正常对照组和高脂模型组予等体积生理盐水 1 次/d 灌胃。实验动物自由进食和饮水,每周称重 1 次。

#### 1.2.3 标本采集

每组 10 只小鼠分别于喂养 4、8 和 12 周末用 10% 水合氯醛麻醉后开腹,腹主动脉取血,以 3000

rpm、15 min 离心,取上清,-80  $^{\circ}$ C 保存备用。所有血清标本同批测定。同时游离肝脏并去除包膜,迅速称肝湿重,计算肝指数[肝指数=肝湿重(g)/体重(g) $\times$ 100%]。另取小块肝左叶,4% 多聚甲醛(内含 1 mL/L DEPC)固定,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋后连续切片,每张厚度 4~6  $\mu$ m,HE 染色后镜下观察肝脏脂肪变性程度。

#### 1.2.4 肝组织病理检查

蜡块切片后 HE 染色,由同一桂林医学院附属医院病理科医生单盲阅片,每个样本随机选取五个肝小叶计算平均肝小叶内脂肪变细胞百分比,分级判断标准为:肝小叶内未见含有脂滴的细胞为(-),脂肪变细胞占细胞总数的 1/3 以下为(+),1/3-2/3 为(++),大于 2/3 为(+++),几乎全部是脂肪变细胞为(++++)。见图 1。

#### 1.2.5 生化指标检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA 法)测定血清中 TNF- $\alpha$  的含量;小鼠血清 ALT、TC 采用酶法,由桂林医学院附属医院的全自动生化检测仪(日立全自动生化分析仪 7600 型)测定。

#### 1.2.6 肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 的检测

采用 RT-PCR 法测定小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对水平,严格按试剂盒步骤操作提取肝组织总 RNA,逆转录成 cDNA,PCR 扩增。扩增 NF- $\kappa$ Bp65 引物序列:上游 5'-ACT GCC GGG ATG GCT ACT AT-3',下游 5'-TCT GGA TTC GCT GGC TAA TGG-3',产物长度 126 bp,退火温度 55  $^{\circ}$ C,35 个循环。内参  $\beta$ -actin 引物序列:上游 5'-GAG GGA AAT CGT GCC TGA C-3',下游 5'-CTG GAA GGT GGA CAG TGA G-3',产物长度 445 bp,退火温度 55  $^{\circ}$ C,30 个循环。电泳,JS-780 全自动凝胶成像分析仪凝胶成像(上海培清科技公司),通过 SensiAnsys 凝胶脱胶图像分析软件(上海培清科技公司)读取产物电泳条带的光密度扫描值,将 NF- $\kappa$ Bp65 条带与内参照  $\beta$ -actin 条带光密度扫描值的比值作为 NF- $\kappa$ Bp65 表达的相对水平,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 1.3 统计学分析

用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用单因素方差分析,等级资料采用秩和检验(Kruskal-Wallis  $H$ ),相关分析采用 Pearson 分析和 Spearman 分析。以  $\alpha=0.05$  作为检验水准, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝指数的影响

与对照组比较,模型组肝指数与其有统计学差异( $P < 0.01$ )。与模型组比较,银杏黄酮低剂量组

无明显变化( $P > 0.05$ ),中、高剂量组分别在第 8、12 周末有统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。银杏黄酮不同剂量组之间比较,从第 8 周开始高剂量银杏黄酮组降低明显,与低剂量组之间有统计学差异( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝指数的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Ginkgo Flavone on the liver index in the mice with NAFLD ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	肝指数 Liver index		
		4 W	8 W	12 W
对照组 Control	-	5.22 ± 0.68	5.26 ± 0.75	5.27 ± 0.36
模型组 Model	-	6.09 ± 0.75**	6.72 ± 0.33**	6.89 ± 0.60**
银杏黄酮低剂量 Ginkgo Flavone-L	70	6.22 ± 0.54**	6.48 ± 0.70**	6.57 ± 0.75**
银杏黄酮中剂量 Ginkgo Flavone-M	150	6.06 ± 0.69**	6.02 ± 0.64**#	6.21 ± 0.63**#
银杏黄酮高剂量 Ginkgo Flavone-H	300	6.18 ± 0.62**	5.61 ± 0.43### $\Delta$	5.70 ± 0.55### $\Delta$

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;与银杏黄酮低剂量组之间比较, $\Delta P < 0.05$ 。  
Note:Compared with control group,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;Compared with model,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;Compared with Ginkgo Flavone-L, $\Delta P < 0.05$ .

### 2.2 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠总胆固醇的影响

与对照组比较,模型组 TC 含量与其有统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组比较,银杏黄酮低剂量组无明显变化( $P > 0.05$ ),中剂量组在

第 12 周末、高剂量组在第 8 和 12 周末与其有统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。银杏黄酮不同剂量组之间比较,高剂量银杏黄酮组在 12 周末与低剂量组之间有统计学差异( $P < 0.05$ )。详见表 2。

表 2 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠总胆固醇的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Ginkgo Flavone on the TC in the mice with NAFLD ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	总胆固醇 TC (mmol/L)		
		4 W	8 W	12 W
对照组 Control	-	1.70 ± 0.65	1.83 ± 0.59	1.79 ± 0.56
模型组 Model	-	2.36 ± 0.39*	2.95 ± 0.54**	3.55 ± 0.42**
银杏黄酮低剂量 Ginkgo Flavone-L	70	2.27 ± 0.56*	2.77 ± 0.58**	3.30 ± 0.52**
银杏黄酮中剂量 Ginkgo Flavone-M	150	2.15 ± 0.53	2.56 ± 0.54**	2.87 ± 0.74**#
银杏黄酮高剂量 Ginkgo Flavone-H	300	1.88 ± 0.60	2.38 ± 0.40**#	2.59 ± 0.66**### $\Delta$

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;与银杏黄酮低剂量组之间比较, $\Delta P < 0.05$ 。  
Note:Compared with control,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;Compared with model,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;Compared with Ginkgo Flavone-L, $\Delta P < 0.05$ .

表 3 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠丙氨酸氨基转移酶的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of Ginkgo Flavone on the ALT in the mice with NAFLD ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	丙氨酸氨基转移酶 ALT(U/L)		
		4 W	8 W	12 W
对照组 Control	-	37.01 ± 3.98	37.82 ± 6.73	35.79 ± 8.50
模型组 Model	-	37.77 ± 6.40	50.33 ± 3.97**	54.34 ± 6.12**
银杏黄酮低剂量 Ginkgo Flavone-L	70	37.06 ± 5.63	47.67 ± 8.90	54.28 ± 8.92**
银杏黄酮中剂量 Ginkgo Flavone-M	150	38.04 ± 5.58	42.54 ± 7.91	51.03 ± 5.12**
银杏黄酮高剂量 Ginkgo Flavone-H	300	37.89 ± 5.42	41.31 ± 6.14#	44.01 ± 7.25**# $\Delta$ $\blacktriangle$

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;与银杏黄酮低剂量组之间比较, $\Delta P < 0.05$ ;与银杏黄酮中剂量组之间比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。  
Note:Compared with control,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;Compared with model,#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;Compared with Ginkgo Flavone-L, $\Delta P < 0.05$ ,Compared with Ginkgo Flavone-M, $\blacktriangle P < 0.05$ .

### 2.3 银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠丙氨酸氨基转移酶的影响

与对照组比较,模型组从第8周开始与其有统计学差异( $P < 0.01$ )。与模型组比较,银杏黄酮低、中剂量组均无明显变化( $P > 0.05$ ),高剂量组从第8周末开始有统计学差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );银杏黄酮不同剂量组之间比较,高剂量组12周末分别

与4、8周末有统计学学差异( $P < 0.05$ )。详见表3。

### 2.4 给药后4周末银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝组织脂肪变性的影响

各组小鼠肝组织脂肪变性改变有统计学差异( $\chi^2 = 28.163, P = 0.000$ ),根据各组平均秩次分析,脂肪变性程度由重到轻的顺序为:模型组、银杏黄酮低剂量组、中剂量组、高剂量组。见表4。

表4 给药后4周末银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝组织脂肪变性的影响( $n = 10$ )

Table 4 Effect of Ginkgo Flavone on the hepatic steatosis in the mice with NAFLD after 4 weeks administration ( $n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	脂肪变结果分级 Grade of hepatic steatosis					$\bar{R}$
		-	+	++	+++	++++	
对照组 Control	-	10	0	0	0	0	5.50
模型组 Model	-	0	3	6	1	0	33.90
银杏黄酮低剂量 Ginkgo Flavone-L	70	0	4	5	1	0	32.00
银杏黄酮中剂量 Ginkgo Flavone-M	150	0	5	5	0	0	29.00
银杏黄酮高剂量 Ginkgo Flavone-H	300	0	6	4	0	0	27.10

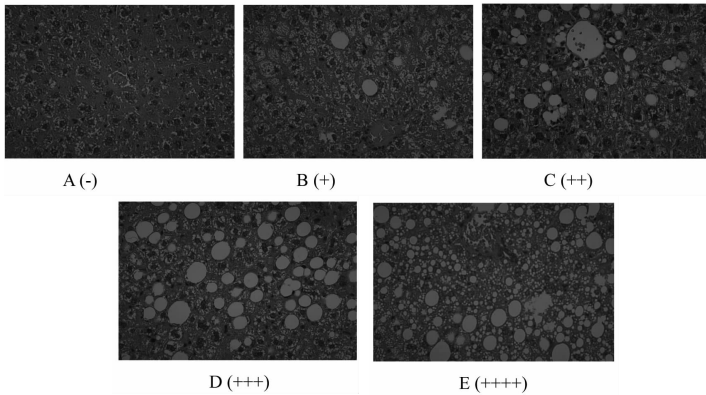


图1 小鼠肝组织病理学改变(HE × 200)

Fig. 1 Histopathological observation of liver of mice (HE × 200)

表5 给药后4周末银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 及血清 TNF- $\alpha$  的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of Ginkgo Flavone on NF- $\kappa$ Bp65 in hepatic tissue and serum TNF- $\alpha$  in the mice with NAFLD after 4 weeks administration ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

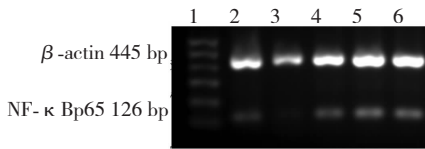
组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	NF- $\kappa$ Bp65	TNF ( $\mu$ g/L)
对照组 Control	-	0.24 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.09
模型组 Model	-	0.45 $\pm$ 0.09 **	1.09 $\pm$ 0.05 **
银杏黄酮低剂量 Ginkgo Flavone-L	70	0.51 $\pm$ 0.07 **	0.99 $\pm$ 0.18 **
银杏黄酮中剂量 Ginkgo Flavone-M	150	0.41 $\pm$ 0.08 ** $\Delta$	0.89 $\pm$ 0.22 **
银杏黄酮高剂量 Ginkgo Flavone-H	300	0.38 $\pm$ 0.11 ** $\Delta$	0.84 $\pm$ 0.09 ** $\Delta$

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ;与银杏黄酮低剂量组之间比较, $\Delta P < 0.05$ 。

Note:Compared with control,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with model,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ;Compared with Ginkgo Flavone-L, $\Delta P < 0.05$ .

## 2.5 给药后 4 周末银杏黄酮对 NAFLD 模型小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 及血清 TNF- $\alpha$ 的影响

与正常对照组比较,模型组 NF- $\kappa$ Bp65 及 TNF- $\alpha$  水平增高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,银杏黄酮



1: Mark, 2: 银杏黄酮高剂量组 (High dosage of Ginkgo Flavone group), 3: 对照组 (Control group), 4: 银杏黄酮中剂量组 (Medium dosage of Ginkgo Flavone group), 5: 模型组 (Model group); 6: 银杏黄酮低剂量组 (Low dosage of Ginkgo Flavone group)

图 2 肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 的表达

Fig. 2 Expression of NF- $\kappa$ Bp65 in hepatic tissue of mice

表 6 小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 与脂肪变性程度及血清 ALT 含量的相关性分析 ( $n = 30$ )

Table 6 Correlation analysis between NF- $\kappa$ B p65 in hepatic tissue and the hepatic steatosis or serum ALT ( $n = 30$ )

检测指标 Detection index	NF- $\kappa$ Bp65 (Correlation coefficient, $r$ )				
	正常组 Control	模型组 Model	低剂量组 Ginkgo Flavone-L	中剂量组 Ginkgo Flavone-M	高剂量组 Ginkgo Flavone-H
肝脂肪变性 Hepatic steatosis	0.93 *	0.94 *	0.86 *	0.89 *	0.91 *
ALT	0.70 *	0.69 *	0.45 *	0.52 *	0.72 *

注:相关系数 \*  $r > 0$ ,  $P < 0.01$  或 0.05。

Note: Correlation coefficient \*  $r > 0$ ,  $P < 0.01$  or 0.05.

## 3 讨论与结论

银杏黄酮是银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba extract*, GBE) 黄酮类制剂的主要成分,具有多种生物学功能活性。具有降血脂、降糖、抗炎、抗氧化清除自由基能力等作用<sup>[1-4]</sup>。课题组前期实验发现<sup>[5,6]</sup> TLR4/NF- $\kappa$ B 炎症通路参与 NAFLD 发病。银杏黄酮可减少 NAFLD 小鼠的 NF- $\kappa$ Bp65、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TG 的产生,改善肝组织病理变化,起到抗炎降脂作用。但银杏黄酮对 TLR4 影响并不明显,其确切机制仍有待于进一步研究。NAFLD 的发病机制至今尚未阐明,目前最成熟的解释是“二次打击”学说<sup>[7]</sup>:胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 进行初次打击;氧化应激和脂质过氧化,对肝细胞进行二次打击导致肝脏炎症、坏死和纤维化。TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的过多分泌可能通过直接参与并诱发 IR<sup>[8]</sup>,参与初次打击;还可促进氧化应激对肝脏进行第二次打击。可见,在 NAFLD 的发展过程中,炎症因子失衡是导致肝损伤的重要环节。在肝脏的肝实质细胞、内皮细胞、胆管上皮细胞和枯否氏细胞中均可以

高剂量组 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量及 TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );银杏黄酮各剂量组之间比较,低剂量组 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量与中、高剂量组有统计学差异( $P < 0.05$ )。结果参见表 5,小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 的 PCR 结果见图 2。

## 2.6 小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 与肝脏脂肪变性程度及血清 ALT 含量的相关性分析

银杏黄酮低剂量组小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量与血清 ALT 含量成正相关,但相关关系不密切( $r < 0.5$ ),其余各组均呈高度正相关。从该结果中可看出,肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量升高的同时,脂肪变性严重程度及血清 ALT 含量同时也相应的提高。详见表 6。

检测到 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一种前炎症基因的转录调控因子,在炎症和免疫反应及细胞凋亡路径中起着重要的作用,活化的 NF- $\kappa$ B 调控多种炎症相关细胞因子表达,参与炎症反应<sup>[10-13]</sup>。

分析 NF- $\kappa$ B 是否为银杏黄酮干预 NAFLD 作用机制的核心因素,以便进一步研究上游通路。ALT 是迄今为止国内外应用最为广泛的反映肝细胞损害的指标,ALT 只存在于细胞浆内。当肝细胞变性,细胞膜通透性增高时,从细胞内逸出的主要是 ALT。ALT 在各种肝病患者中均有不同程度的升高,其升高常与肝内炎症活动关系密切<sup>[14]</sup>。肝组织病理变化直接反应肝脏损伤情况。因此课题组进一步实验研究给药后 4、8、12 周末连续时间内,银杏黄酮对 NAFLD 小鼠肝指数、肝组织病理变化、NF- $\kappa$ Bp65 水平以及血清 TNF- $\alpha$ 、ALT、TG、TC 含量变化,分析肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 水平与肝脏病理变化和血清 ALT 含量的相关性,进一步探讨银杏黄酮干预 NAFLD 的机制。

实验过程中,血清 TG 含量变化,给药后 8 周和 12 周末病理结果、小鼠肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 及血清

TNF- $\alpha$  的变化结果与之前发表文章结果相似<sup>[5,6]</sup>, 因此未列出。综合研究发现:模型组与对照组比较,随着时间的延长,小鼠肝指数,血清 TC、ALT 和 TNF- $\alpha$  水平,肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 表达量均随之升高、肝脏病理损害逐渐加重 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但 ALT 升高较晚(从 8 周末开始);不同剂量银杏黄酮干预后,上述各项指标与模型组比较降低或改善 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );各剂量组之间比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ );肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量与肝脏脂肪变性程度及血清 ALT 含量呈正相关。结果表明:银杏黄酮可以降低 NAFLD 小鼠血脂、减轻肝脏脂肪变性、改善肝功能指标及肝脏大体形态,且剂量越高效果越显著。银杏黄酮调节肝组织 NF- $\kappa$ Bp65 相对表达量,其与肝脏病理变化及肝功能指标密切相关。

综上所述,银杏黄酮可减少 NAFLD 小鼠的 NF- $\kappa$ Bp65、TNF- $\alpha$ 、ALT 和 TC 的产生,降低血脂及肝指数、改善肝功能及肝组织病理变化,从而对 NAFLD 起到一定的治疗作用,且有一定的剂量和时间依赖性。其主要作用为抗炎降脂作用,NF- $\kappa$ B 上游炎症通路可能是其作用的主要机制。

#### 参考文献

- 1 Brinkley TE, Lovato JF, Arnold AM, *et al.* Effect of *Ginkgo biloba* on blood pressure and incidence of hypertension in elderly men and women. *Am J Hypertens*, 2010, 23:528-533.
- 2 Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, 11:162-175.
- 3 Xiao ZP, Penq ZY, Penq MJ, *et al.* Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11:169-177.
- 4 Kim HP, Park H, Son KH, *et al.* Biochemical pharmacology of

bioflavonoids; implications for anti-inflammatory action. *Arch Pharm Res*, 2008, 31:265-273.

- 5 Bai JH (白纪红), Liang ZQ (梁志清), Zhao RH (赵日红), *et al.* The effects of Ginkgo Flavone on the expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *J Prac Med* (实用医学杂志), 2015, 31:1091-1095.
- 6 Lin QX (林秋香), Zhou DS (周冬生), Bai JH (白纪红), *et al.* The effects of ginkgo flavonoid on the expression of NF- $\kappa$ Bp65 in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *J Chongqing Med Univ* (重庆医学), 2014, 43:6409-3411.
- 7 Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hit"? *Gastroenterology*, 1998, 114:842-845.
- 8 Zhang H, Chu X, Huang Y, *et al.* Maternal vitamin D deficiency during pregnancy results in insulin resistance in rat offspring, which is associated with inflammation and Ikb $\alpha$  methylation. *Diabetologia*. 2014, 57:2165-2172.
- 9 Li Y (李勇), Zhang PJ (张培建), Jin C (金成). Research progress on NF- $\kappa$ B and ischemical reperfusion injury in liver. *Chin J Curr Adv Gen Surg* (中国现代普通外科进展), 2008, 2(11):48-50.
- 10 Oh H, Ghosh S. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Immunol Rev*, 2013, 252(1):41-51.
- 11 Napetschniq J, Wu H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42:443-468.
- 12 Glauert HP. Role of NF- $\kappa$ B in hepatocarcinogenesis and its potential inhibition by dietary antioxidants. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12:1160-1172.
- 13 Siomek A. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59:323-331.
- 14 Peng WF (彭文锋), Zhong ZY (钟政永). Clinic value of the serum adenosine deaminase with ALT, AST, GGT joint detection in various liver diseases diagnoses. *Contemporary Medicine* (当代医学), 2011, 17(9):4-6.

(上接第 325 页)

- 15 Guo N (郭宁), *et al.* Application status of immunosuppressive drugs in liver transplantation. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究), 2012, 16:3375-3379.
- 16 Costantino V, *et al.* Glycolipids from Sponges. VII. Simplexides, novel immunosuppressive glycolipids from the caribbean sponge Plakortis simplex. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9:271-276.
- 17 Costantino V, *et al.* Glycolipids from Sponges. 6. Plakoside A and B, Two unique prenylated glycosphingolipids with immu-

nosuppressive activity from the marine sponge Plakortis simplex. *J Am Chem Soc*, 1997, 119:12465-12470.

- 18 Liu XF (刘香芳). Chemical constituents and bioactivities of the marine sponge Plakortis simplex from Xisha islands. Shanghai: The Second Military Medical University (第二军医大学), MSc. 2011.
- 19 Lv GK (吕国凯). Synthesis and biological evaluation of glycolipids simplexides and glycosphingolipid derivatives. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), MSc. 2009.