DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.033

银杏黄酮苷元对大鼠非酒精性脂肪性肝病的防治作用

陈星懿[1,2],唐娟[2,3],廖美娟[1,2],李琴[2,4],陈际宇[1,2],陆苑[1],何艳[1,2]
(1.贵州医科大学药学院,贵州 贵阳 550000;2.贵州医科大学附属医院,贵州 贵阳 550000;
3.贵州省药品监督管理局,贵州 贵阳 550000;4.遵义医科大学基础药理教育部重点实验室,贵州 遵义 563006)

摘要:目的 阐明银杏黄酮苷元(Ginkgo flavone aglycone,GA)对非酒精性脂肪肝病(Non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)大鼠肝脏的保护作用及其作用机制。方法 采用高脂饲料喂养SD大鼠,建立NAFLD动物模型,同时每天灌胃1次GA(50 mg/kg或200 mg/kg),持续8周。通过HE染色、Western blot、脂质氧化以及内皮损伤检测等方法,评价GA对NAFLD大鼠的作用。体外采用500 μmol/L油酸钠诱导HepG2细胞,建立NAFLD细胞模型,同时给予GA(1.5 μg/mL或3 μg/mL)处理48 h。通过油红O染色、Western blot和甘油三酯含量测定等方法,分析GA对肝细胞的影响。结果 在动物体内水平,GA能降低大鼠体质量和脏器指数,减少甘油三酯(Triglyceride,TG)、总胆固醇(Total cholesterol,TC)和低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein,LDL)含量,提升高密度脂蛋白(High-density lipoprotein,HDL)含量,改善肝脏脂质代谢紊乱;同时,GA可降低血清丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、氧化低密度脂蛋白(Oxidized low-density lipoprotein,ox-LDL)和可溶性凝集素样氧化低密度脂蛋白受体1抗体(Soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1,sLOX-1)含量,减少诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase,iNOS)活性,抑制氧化应激,改善血管内皮细胞损伤。HE染色表明GA可减轻肝脏脂肪变性,抑制主动脉脂质沉积和血栓形成,恢复脂质代谢紊乱导致的主动脉病变。在体外细胞水平,GA能够降低肝细胞TG含量,改善油酸钠诱导的脂质蓄积。提取大鼠肝脏和油酸钠诱导HepG2细胞的蛋白进行检测,发现GA可通过下调肝脏脂质合成蛋白(SREBP-1C、FAS),上调脂肪酸氧化蛋白(PPARα、CPT1A)表达,改善脂质代谢紊乱,减轻肝损伤。结论 在高脂诱导的肝细胞中,GA可能通过下调SREBP-1C和FAS的表达,上调PPARα和CPT1A的表达,抑制脂肪合成及促进脂肪酸氧化,改善脂质代谢紊乱,发挥抗氧化作用,保护肝脏及血管脂肪变性损伤,具有治疗NAFLD的潜在作用。

关键词:银杏黄酮苷元;非酒精性脂肪肝病;脂质沉积;脂肪合成;脂肪酸氧化
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)02-0196-09

Prevention and Treatment Effect of Ginkgo Flavone Aglycone on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats

CHEN Xingyi[1,2],TANG Juan[2,3],LIAO Meijuan[1,2],LI Qin[2,4],CHEN Jiyu[1,2],LU Yuan[1],HE Yan[1,2]
(1. School of Pharmacy,Guizhou Medical University,Guiyang 550000,Guizhou,China;
2. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University,Guiyang 550000,Guizhou,China;
3. Guizhou Provincial Drug Administration,Guiyang 550000,Guizhou,China;
4. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education,Zunyi Medical University,Zunyi 563006,Guizhou,China)

Abstract:*Objective* To clarify the liver protective effect of Ginkgo flavone aglycone(GA) on rats with non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) and its mechanism of action. *Methods* SD rats were fed with high-fat diet to establish an animal model of NAFLD. At the same time,GA(50 mg/kg or 200 mg/kg) was gavaged once a day for 8 weeks. The effect of GA on NAFLD rats was evaluated by methods such as HE staining,Western blot,lipid oxidation and endothelial injury detection. *In vitro*,HepG2 cells were induced by 500 μmol/L sodium oleate to establish an NAFLD cell model,and at the same time,GA(1.5 μg/mL or 3 μg/mL) was given for 48 hours. The effect of GA on hepatocytes was analyzed by methods such as oil red O staining,Western blot and triglyceride content determination. *Results* At the animal *in vivo* level,GA can reduce the body weight and organ index of rats,reduce the contents of triglyceride(TG),total cholesterol(TC) and low-density lipoprotein(LDL),increase the content of high-density lipoprotein(HDL),and improve the disorder of liver lipid metabolism. At the same time,GA can reduce the contents of serum malondialdehyde(MDA),oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL) and soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1(sLOX-1),reduce the activity of inducible nitric oxide synthase(iNOS),inhibit the oxidative stress,and improve the

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(82460782);贵州省中医药管理局项目(QZYY-2018-130);贵州省科技厅项目(黔科合基础〔2022〕一般374,黔科合基础-ZK〔2023〕一般371);贵州省教育厅基础药理教育部重点实验室项目(黔教合KY字〔2022〕395号);贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(21NSFCP13);贵州医科大学附属医院NFSC培育计划项目(GYFYNSFC-2021-56)
作者简介:陈星懿(2000-),女(土家族),贵州铜仁人,硕士在读,研究方向:心血管药理。
通讯作者:何艳(1972-),女,贵州贵阳人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:心血管药理。E-mail:yanhe_submission@163.com。

vascular endothelial cell injury. HE staining showed that GA can reduce liver steatosis, inhibit aortic lipid deposition and thrombosis, and restore aortic lesions caused by lipid metabolism disorders. At the *in vitro* cellular level, GA can reduce the TG content in hepatocytes and improve the lipid accumulation induced by sodium oleate. Proteins extracted from the livers of rats and HepG2 cells induced by sodium oleate were detected. It is found that GA can improve the lipid metabolism disorders and reduce liver injury by down - regulating liver lipogenic proteins (SREBP - 1C, FAS) and up - regulating the expressions of fatty acid oxidation proteins (PPARα, CPT1A). *Conclusion* In high - fat - induced hepatocytes, GA may inhibit fat synthesis and promote fatty acid oxidation by down - regulating the expressions of SREBP - 1C and FAS and up - regulating the expressions of PPARα and CPT1A, improve the lipid metabolism disorders, exert the antioxidant effects, protect the liver and vascular fatty degeneration damage, and has a potential role in treating NAFLD.

Keywords: Ginkgo flavone aglycone; non - alcoholic fatty liver disease; lipid deposition; fat synthesis; fatty acid oxidation

非酒精性脂肪性肝病(Non - alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征,其疾病谱主要包括非酒精性肝脂肪变、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化以及肝癌[1-4]。最新的研究表明,NAFLD是一种多系统疾病,除了造成相关的肝脏疾病以外,还会引发心血管疾病,对人体健康造成了严重危害[5-7]。《代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)》披露,过去20年我国成人NAFLD总患病率为29.6%,NAFLD已成为我国第一大慢性肝病。NAFLD还是心血管疾病的预警指标,NAFLD患者颈动脉硬化、缺血性和出血性卒中总患病率分别为35.0%、6.1%和2.2%[8]。

迄今对NAFLD的发病机制还了解甚少,广泛接受的一个理论是:NAFLD由脂质合成过多导致肝细胞内脂肪堆积,脂肪酸氧化不足,促进氧化应激及炎症因子的增加,加重肝细胞损伤和凋亡,破坏肝脏正常结构和功能,最终导致NAFLD发生与进展[9-11]。更有研究表明,NAFLD的发生会造成血管脂肪变性损伤,最终导致动脉硬化性心血管病等并发症[12-13]。NAFLD可导致肝脏慢性炎症,促使肝脏释放大量炎症细胞因子进入血液循环,从而损伤血管内皮细胞;此外,还会引发脂质代谢异常,使异常脂质在血管壁内堆积,逐渐形成动脉粥样硬化斑块[14-15]。长期以来,NAFLD的治疗主要依赖于生活方式的调整,如饮食控制和增加体育活动[16-17]。然而,这些方法对于部分患者而言难以持续实施,且效果有限。因此,寻找用于治疗NAFLD,预防NAFLD及其所致并发症的药物成为当前医学研究的重要方向。

银杏黄酮苷元(Ginkgo flavone aglycone, GA)是将银杏科银杏属乔木银杏(*Ginkgo biloba L.*)中的黄酮苷通过酶水解法去除糖基后获得的新型提取物,主要由槲皮素(46.61%)、山柰酚(44.23%)和异鼠李素(4.77)组成[18]。已有研究表明,GA具有抗炎、抗氧化、改善脂质代谢紊乱和抗动脉粥样硬化等多种活性,这使得GA具有成为治疗NAFLD药物的潜力,但其潜在机制有待进一步研究[19-20]。LI X L等[21]发现,槲皮素在NAFLD细胞模型中,通过抑制固醇调节元件结合蛋白-1C(SREBP-1C)和脂肪酸合酶(FAS)两种脂质合成基因的表达水平,改善肝脂质积累,从而预防或治疗NAFLD。WANG W等[22]发现,槲皮素显著抑制了NAFLD大鼠肝脏中过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPARα)的下调,以及脂质合成相关基因SREBP-1c和FAS的上调,同时降低了活性氧和白细胞介素-1β的水平,这有助于减少NAFLD引起的肝脏炎症和脂质积累。鉴于槲皮素是GA中含量最丰富的成分,我们由此进行合理推测:GA可能通过抑制脂质合成,促进脂肪酸氧化,调节脂质代谢紊乱。与此同时,GA可能还通过抗炎、抗氧化等机制共同发挥药理作用,从而治疗NAFLD。

基于此,本研究以高脂饮食诱导的SD大鼠和油酸钠诱导的HepG2细胞分别建立NAFLD体内及体外模型,研究GA对NAFLD的治疗作用及其潜在机制,旨在推动对NAFLD治疗的探索,促进GA治疗NAFLD的研究与发展。

1 材料

1.1 实验动物

40只160~180 g的健康雄性SD大鼠,购自长沙天勤生物技术有限公司,许可证号为:SCXK(湘)2014-0011。每笼6只,喂养基础饲料或者高脂饲料,每日更换饮用水。动物房室温保持在(22±2)℃,相对湿度在40%~70%,处于12 h昼夜循环的环境之中。所有动物程序均由贵州医科大学动物实验伦理检查批准。

1.2 药物与试剂

银杏黄酮苷元(由贵州省生化工程中心何珺副教授赠予)通过0.5%羧甲基纤维素钠溶液进行配制。羧甲基纤维素钠购自成都金山化学试剂有限公司(CMC-Na,批号:20151123)。油酸钠和溶剂对照(批号:KC005)购自西安鲲创科技发展有限公司。总胆固醇(Total cholesterol, TC)测定试剂盒(批号:BC1985),甘油三酯(Triglyceride, TG)测定试剂盒(批号:BC0625),低密度脂蛋白胆固醇(Low - density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(批号:BC5335),高密度脂蛋白胆固醇(High - density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒(批号:BC5325),一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)测定试剂盒(批号:BC5695),丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:BC0025),均购自北京索莱宝生物科技有限公司。氧化低密度脂蛋白(Oxidized low - density lipoprotein, ox-LDL)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:20200917)。可溶性凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1(Soluble lectin - like oxidized LDL receptor - 1, sLOX-1)测定试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司(批号:X17014176)。

2 方法

2.1 大鼠NAFLD模型的建立

取健康雄性SD大鼠10只,每只大鼠采用高脂饲料(基础饲料67.8%、胆固醇1.5%、猪油10%、白糖5%、胆酸钠0.5%、甲硫氧嘧啶0.2%、蛋黄粉15%)饲养8周。

2.2 动物分组与给药

40只健康的雄性SD大鼠,被随机分成4组,每组10只,即正常组、模型组、银杏黄酮苷元低剂量组(GA-L组,50 mg/kg)、银杏黄酮苷元高剂量组(GA-H组,200 mg/kg)。正常组以基础饲料饲养;模型组以高脂饲料饲养;GA-L组和GA-

H 组在模型组的基础之上,分别灌胃低剂量和高剂量的 GA,持续 8 周。

2.3 细胞 NAFLD 模型的建立及分组给药

人肝癌细胞系 HepG2,使用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO_2 培养箱中培养,培养温度为 37 ℃。正常组给予同体积的对照溶剂,模型组给予 500 μmol/L 的油酸钠,GA 低剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 1.5 μg/mL 的 GA,GA 高剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 3 μg/mL 的 GA,放置培养箱内培养 48 h。

2.4 脏器系数的测定

第 8 周测定体质量,经麻醉后,对心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、主动脉、胸腺进行分离,称重,根据以下公式计算对应的脏器系数:脏器系数 = 脏器重量(mg)/体质量(g)。

2.5 血清指标检测

SD 大鼠饲养第 8 周,经麻醉后,股动脉取血,3000 r/min,4 ℃离心 20 min,搜集血清并保存于 -80 ℃中。检测血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、iNOS、MDA、ox-LDL 和 sLOX-1 的含量。

2.6 组织病理学检测

收集主动脉和肝脏组织并立即在 4% 的多聚甲醛中固定,进行脱水、石蜡包埋和切片。按照生产商的说明,对石蜡包埋的组织切片进行 HE 染色(批号:G1120,北京索莱宝生物科技有限公司)。

2.7 脂质合成和脂肪酸氧化的蛋白表达检测

利用 RIPA 裂解缓冲液(批号:R0010,北京索莱宝生物科技有限公司)从各组大鼠肝脏和 HepG2 细胞中提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒(批号:PC0020,北京索莱宝生物科技有限公司)测定蛋白浓度。等量的蛋白质(30 μg)通过 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶在室温下持续摇动封闭 1.5 h。随后,PVDF 膜与一抗(SREBP-1C、FAS、CPT1A、pPARα 和 GAPDH)在 4 ℃孵育过夜,PVDF 膜经 TBST 清洗后,在室温下持续摇动与二抗孵育 2 h。采用 ECL 进行化学发光检测。

2.8 CCK8 法检测细胞存活率

在 96 孔板中设置每孔 5000 个细胞,于培养箱中培养 24 h。向培养板中加入不同浓度的 GA 1、1.5、3、6、12、25、50、100、200 μg/mL。每个浓度均设 5 个复孔,同时设空白孔以及对照孔,之后在培养箱中继续孵育 24 h。每孔加入 10 μL 的 CCK8 工作液。培养箱孵育 2 h 后,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度。

2.9 细胞油红 O 染色

将 HepG2 细胞以 1×10^5 个接种于 24 孔板中,按如下方式分组并处理细胞:①正常组给予同体积的对照溶剂;②模型组给予 500 μmol/L 的油酸钠;③GA 低剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 1.5 μg/mL 的 GA;④GA 高剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 3 μg/mL 的 GA,放置培养箱内培养 48 h。弃去细胞培养基,PBS 洗两次,4% 多聚甲醛固定 25 min。弃去多聚甲醛,蒸馏水洗 2 次,加入 60% 异丙醇浸洗 20 ~ 30 s。弃去 60% 异丙醇,加入油红 O 染色液浸染 15 min。弃去染色液,60% 异丙醇漂洗 20 ~ 30 s。蒸馏水洗 2 ~ 5 次,直至无多余染液。加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察。

2.10 细胞脂质含量的检测

将 HepG2 细胞以 1×10^5 个接种于 6 孔板中,按如下方式分组并处理细胞:①正常组给予同体积的溶剂对照;②模型组给予 500 μmol/L 的油酸钠;③GA 低剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 1.5 μg/mL 的 GA;④GA 高剂量组给予 500 μmol/L 的油酸钠和 3 μg/mL 的 GA,放置培养箱内培养 48 h。用胰酶消化并收集细胞,离心去掉上清液,添加 100 μL PBS 重悬细胞,置于冰上进行超声裂解细胞,收集细胞上清液检测 TG 的含量。

2.11 统计学方法

对于每个实验,数据显示为至少 3 个生物重复的平均值 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)。使用 GraphPad Prism 6.0 对数据进行统计分析,当 $P<0.05$ 时,差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 银杏黄酮苷元对造模大鼠体质量的影响

各组大鼠体质量动态图见插页ⅩⅩⅩⅢ图 1,在整个实验周期内,正常组的大鼠体质量整体呈现上升态势,然而过程中均存在一定程度的波动。经高脂饲料喂养的模型组大鼠的体质量呈现稳步上升趋势,并明显高于正常组和给药组。GA 低剂量组体质量稳步增加,但增加幅度明显小于模型组。GA 高剂量组体重在第 3 周出现小幅下降,而后第 4 周开始增加,总体体质量是明显低于模型组和 GA 低剂量组。上述数据说明,GA 能明显降低高脂饮食引起的体重增加。

3.2 银杏黄酮苷元对造模大鼠脏器指数的影响

如表 1 所示,与正常组相比,模型组大鼠的主动脉和肝脏脏器指数显著升高($P<0.05$),心脏及脾脏脏器指数较正常组低,肾脏、胸腺和肺脏脏器指数较正常组高,但差异没有统计学意义;与模型组相比,给予 GA(50、200 mg/kg)后显著降低了大鼠主动脉脏器指数($P<0.05$),心脏、肝脏、胸腺和肺脏脏器指数较模型组低,但差异没有统计学意义。以上数据说明,高脂饮食会导致大鼠肝脏功能异常或受到损伤,同时间接证明了 NAFLD 模型的造模成功。而 GA 治疗后,可明显缓解高脂饮食导致的肝脏损伤。

3.3 血清相关指标检测结果

3.3.1 银杏黄酮苷元对造模大鼠血脂水平的影响 如插页ⅩⅩⅩⅢ图 2 所示,模型组大鼠血清中的甘油三酯、总胆固醇以及低密度脂蛋白含量显著升高($P<0.001$),高密度脂蛋白含量显著降低($P<0.05$);给予 GA(50、200 mg/kg)治疗后,大鼠血清中的甘油三酯含量明显降低($P<0.01$),高剂量组中的总胆固醇和低密度脂蛋白含量显著降低($P<0.05$),并且高密度脂蛋白含量显著升高($P<0.05$)。由此可见,GA 能明显改善高

表 1 各组大鼠脏器系数变化($\bar{x}\pm s$) 单位:mg/g

组别	n	心脏系数	肝脏系数	肾脏系数	脾脏系数	胸腺系数	肺脏系数	主动脉系数
正常组	10	3.391 ± 0.247	29.289 ± 1.902	7.881 ± 0.329	2.488 ± 0.599	0.205 ± 0.054	5.301 ± 0.843	0.662 ± 0.122
模型组	10	2.783 ± 0.186	54.855 ± 5.454#	9.178 ± 0.941	1.887 ± 0.286	0.258 ± 0.046	5.812 ± 0.688	0.862 ± 0.160#
GA 低剂量组	10	2.211 ± 0.162	42.220 ± 3.568	6.565 ± 0.267 *	1.259 ± 0.131	0.238 ± 0.064	5.315 ± 0.475	0.380 ± 0.066 * * *
GA 高剂量组	10	2.342 ± 0.197	43.525 ± 2.662	7.371 ± 0.903	1.577 ± 0.214	0.186 ± 0.064	4.553 ± 0.613	0.351 ± 0.011 * * *

注:#与空白组比较,$P<0.05$;* 与模型组比较,$P<0.05$;* * * 与模型组比较,$P<0.001$。

脂饮食引起的脂质代谢紊乱。

3.3.2 银杏黄酮苷元对造模大鼠脂质氧化的影响 如插页XXXⅢ图 3 所呈现,模型组大鼠血清中的 MDA 值显著上升($P<0.01$);GA 高剂量组能够让大鼠血清中 MDA 的含量显著下降($P<0.05$)。这表明 GA 可以改善氧化应激,缓解肝损伤。

3.3.3 银杏黄酮苷元对造模大鼠血清 ox-LDL 和 sLOX-1 的影响 如插页XXXⅣ图 4 所示,模型组大鼠血清中 ox-LDL 和 sLOX-1 的含量显著高于正常组($P<0.01$)。与模型组相较,GA 能显著减少大鼠血清中 ox-LDL 和 sLOX-1 的含量($P<0.01$)。而 ox-LDL 和 sLOX-1 均为血管内皮细胞损伤的标志物。以上这些数据说明,高脂饮食不但会让大鼠的肝损伤加重,还会对血管内皮形成损伤,而在 GA 治疗后能够改善由高脂饮食引发的血管内皮损伤。

3.3.4 银杏黄酮苷元对大鼠内皮功能的影响 如插页XXXⅤ图 5 所示,模型组大鼠血清中 iNOS 活性明显升高($P<0.001$);和模型组相比较,GA 低、高两个剂量组的 iNOS 活性都存在不同程度的下降,其中 GA 高剂量组能显著降低 iNOS 活性($P<0.05$)。提示 GA 对大鼠的内皮功能起到保护作用。

3.4 HE 染色结果

3.4.1 大鼠肝脏组织 HE 染色 大鼠肝脏组织的 HE 染色如插页XXXⅥ图 6 所示。正常组大鼠的肝细胞中无脂肪空泡,不存在脂肪变性。而模型组大鼠的肝细胞索排列较为杂乱,胞浆内具有众多的脂肪空泡,肝脏组织存在脂肪变性。与模型组相比,GA 组大鼠的肝小叶周边仅有较少的脂肪空泡,呈现为轻度的脂肪变性。以上结果说明成功建立了 SD 大鼠的 NAFLD 模型,且 GA 对 NAFLD 肝脂肪变性损伤有保护作用。

3.4.2 大鼠主动脉组织病理学观察 主动脉 HE 染色如插页XXXⅤ图 7 所示。正常组大鼠的主动脉表面平滑,厚度均匀,内膜没有脂肪粒沉积。模型组大鼠的主动脉内膜有脂质沉着和血栓形成,中层弹力组织网断裂、平滑肌玻璃样变性,外膜纤维化以及炎性细胞浸润。相较于模型组,GA 组大鼠的泡沫细胞数量减少,主动脉内膜结构较为完整,存在少量脂质沉积。以上数据说明,高脂饮食建立的 NAFLD 大鼠模型,脂质代谢紊乱会造成血管内皮细胞损伤,影响大鼠的主动脉组织形态,而 GA 可部分改善高脂饮食诱导的主动脉血管病变。

3.5 大鼠肝脏脂质合成和脂肪酸氧化的蛋白表达检测

Western blot 结果显示,模型组大鼠的 SREBP－1C 和 FAS 蛋白水平明显高于正常组大鼠,而给予 GA 进行干预后,可以抑制模型组 SREBP－1C 和 FAS 的蛋白表达。模型组大鼠的 PPARα 和 CPT1A 蛋白水平明显降低,而给予 GA 干预后,PPARα 和 CPT1A 蛋白水平有所恢复。上述结果表明,GA 可通过下调脂质合成蛋白(SREBP－1C,FAS),上调脂肪酸氧化蛋白(PPARα,CPT1A)的表达,改善肝脏脂质蓄积的情况,减轻 NAFLD 模型肝损伤。见图 8。

3.6 银杏黄酮苷元体外模型细胞毒性检测

通过 CCK8 法检测细胞存活率,GA 治疗浓度的结果如插页XXXⅦ图 9 所示,采用不同浓度的 GA(1、1.5、3、6、12、25、50、100、200 μg/mL)处理 HepG2 细胞 24 h 后,发现 GA 浓度一旦超过 3 μg/mL,细胞存活率就会显著降低。因此,在 HepG2 体外实验中选取 1.5、3 μg/mL 这两个浓度作为 GA 的给药浓度。

3.7 银杏黄酮苷元对油酸钠诱导的肝细胞脂质蓄积的影响

如插页XXXⅤ图 10 所示的油红 O 染色结果,在模型组细胞内有大量红色脂滴呈现,说明油酸钠可导致 HepG2 细胞脂质蓄积。而经过 GA 治疗后,细胞内红色脂滴呈剂量依赖性降低。如插页XXXⅦ图 11 的 TG 含量结果所示,模型组细胞内 TG 含量显著高于正常组。不同剂量的 GA 与油酸钠同时干预 48 h 后,细胞内 TG 含量呈剂量依赖性降低。上述结果表明,GA 能够改善肝细胞的脂质蓄积。

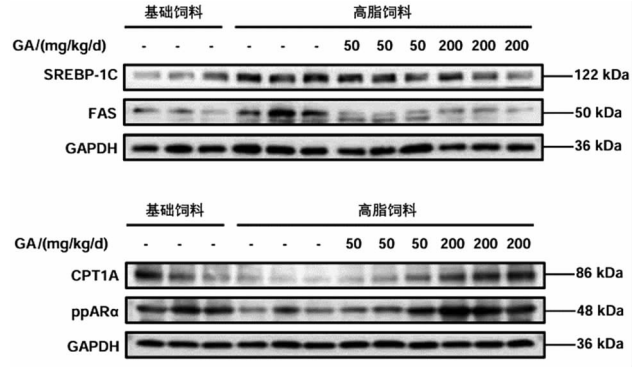


图 8 Western blot 检测脂质相关蛋白表达水平($n=6$)

3.8 肝细胞脂质合成和脂肪酸氧化的蛋白表达检测

Western blot 结果显示,模型组细胞的 SREBP－1C 和 FAS 蛋白水平明显高于正常组细胞,而给予 GA 进行干预后,可以抑制模型组 SREBP－1C 和 FAS 的蛋白表达。模型组细胞的 CPT1A 蛋白水平明显降低,而给予 GA 干预后,CPT1A 蛋白水平有所恢复。在细胞水平,验证了 GA 可通过下调脂质合成蛋白(SREBP－1C,FAS),上调脂肪酸氧化蛋白(CPT1A)的表达,改善脂质代谢紊乱。见图 12。

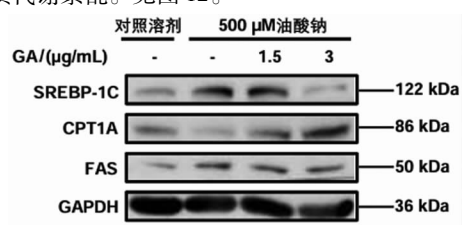


图 12 Western blot 检测脂质相关蛋白表达水平($n=3$)

4 讨论与结论

NAFLD 正在急速演变为全球健康范畴内的一项重大挑战,全球 NAFLD 患病率估算为 32.4%,现已成为我国第一大慢性肝病[23]。NAFLD 是一种脂肪在肝脏中堆积的疾病,其特征是肝脏肿胀、肝脏中脂质代谢紊乱、并伴随着炎症和肝细胞损伤[24]。有研究指出,NAFLD 多数与脂质代谢失衡、氧化应激和炎症反应有关。脂质代谢失衡是 NAFLD 的始动环节,过多的甘油三酯容易被氧化修饰,被巨噬细胞摄取后形成泡沫细胞,堆积在血管壁内,逐渐形成动脉粥样硬化斑块。此外,NAFLD 还会引发肝脏的慢性炎症,释放多种炎症因子进入血液循环,损伤血管内皮细胞,而内皮细胞受损是动脉粥样硬化形成的起始环节,它使得血液中的脂质更容易沉积在血管壁,导致心血管并发症的发生[14]。因此,急需寻找通过抗炎、抗氧化及调节脂质代谢紊乱的药物来治疗 NAFLD 及其并发症。

近年来,水飞蓟素、小檗碱、姜黄素、白藜芦醇等具有抗氧化、抗炎、降血糖、脂质代谢调节作用的天然产物,展现出了治疗 NAFLD 的积极作用,天然产物已成为治疗 NAFLD 药物及其相关先导化合物的宝贵来源[25]。GA 是从中药银杏叶中提取的混合物,其主要由槲皮素、山柰酚和异鼠李素组成,具有抗炎、抗氧化和调节脂质代谢等作用[19－20]。尽管 GA 的药理作用已有不少报道,但 GA 对 NAFLD 大鼠的保护作用及其作用机制尚未见文献报道。

基于此，为了促进 GA 创新药物研制和资源深层次开发，本研究通过高脂饮食和油酸钠成功建立了 NAFLD 大鼠模型和 HepG2 细胞模型，为研究 GA 对 NAFLD 的治疗作用提供了可靠的实验基础。GA 在动物实验中表现出了多方面的有益作用，包括降低体重、改善脏器指数、调节血脂水平、减轻氧化应激和血管内皮细胞损伤等。这些结果表明 GA 对 NAFLD 具有综合的治疗效果。在细胞实验中，GA 能够显著改善油酸钠诱导的 HepG2 细胞脂质蓄积，减少细胞内红色脂滴和 TG 含量，进一步证实了其对肝细胞脂质代谢的调节作用。

SREBP－1C 通过控制 FAS 的基因表达，在控制脂质合成中起主要作用[26]。PPARα 是脂质代谢的主要调节剂，它可控制 CPT1A 基因的转录，主要参与 β－氧化和脂肪酸转运来调节脂质平衡[27]。当 NAFLD 形成时，会促进脂质合成，致使 SREBP－1C 和 FAS 的表达水平上升，同时会抑制脂肪酸氧化，造成 PPARα，CPT1A 的表达减少。进一步的机制研究发现，GA 能够下调脂质合成蛋白（SREBP－ 1C，FAS），上调脂肪酸氧化蛋白（PPARα，CPT1A）的表达，这可能是其改善肝脏脂质蓄积和减轻 NAFLD 损伤的重要机制之一。然而，本研究仍存在一些局限性。例如，对于 GA 在体内的具体代谢途径和作用靶点还需要进一步深入研究；此外，长期使用 GA 的安全性和有效性也需要在未来的研究中进行评估。未来的研究可以考虑结合多组学技术，如转录组学、蛋白质组学和代谢组学等，全面揭示 GA 治疗 NAFLD 的分子机制。

总之，本研究明确表明，GA 在改善高脂诱导的脂质代谢紊乱、保护肝脏及血管脂肪变性损伤方面具有显著效果，充分展现出其治疗 NAFLD 的潜在作用。GA 凭借其抗炎、抗氧化和调节脂质代谢等多种生物活性，为 NAFLD 的治疗带来了新的希望。未来的研究应进一步深入探究 GA 的作用机制，从而为其临床应用提供更为坚实的理论基础。

参考文献

[1] RINELLA M E. Nonalcoholic fatty liver disease：a systematic review [J]. JAMA，2015，313(22)：2263－2273.
[2] ZHOU Y C，LI Z W，XU M X，et al. O－GlycNacylation remission retards the progression of non－alcoholic fatty liver disease [J]. Cells，2022，11(22)：3637.
[3] JIN W J，CHO S，LAXI N，et al. Hepatoprotective effects of *Ixeris chinensis* on nonalcoholic fatty liver disease induced by high－fat diet in mice：an integrated gut microbiota and metabolomic analysis[J]. Molecules，2022，27(10)：3148.
[4] HUANG Y S，WANG X D，ZHANG L，et al. Effect of probiotics therapy on nonalcoholic fatty liver disease[J]. Comput Math Methods Med，2022，2022：7888076.
[5] KAYA E D，YILMAZ Y. Metabolic－associated fatty liver disease (MAFLD)：a multi－systemic disease beyond the liver[J]. J Clin Transl Hepatol，2022，10(2)：329－338.
[6] TANG A S P，CHAN K E，QUEK J，et al. Non－alcoholic fatty liver disease increases risk of carotid atherosclerosis and ischemic stroke：an updated meta－analysis with 135，602 individuals[J]. Clin Mol Hepatol，2022，28(3)：483－496.
[7] BALI A D，ROSENZVEIG A，FRISHMAN W H，et al. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease：causation or association[J]. Cardiol Rev，2024，32(5)：453－462.
[8] 中华医学会肝病学分会. 代谢相关（非酒精性）脂肪性肝病防治指南（2024 年版）[J]. 中华肝脏病杂志，2024，32（5）：418－434.
[9] 高鑫. 非酒精性脂肪性肝病与代谢综合征[J]. 国际内分泌代谢杂志，2006(2)：73－79.
[10] KIM S Q，MOHALLEM R，FRANCO J，et al. Multi－omics approach reveals dysregulation of protein phosphorylation correlated with lipid metabolism in mouse non－alcoholic fatty liver [J]. Cells，2022，11(7)：1172.
[11] LIOU C J，WU S J，SHEN S C，et al. Acacetin protects against non－alcoholic fatty liver disease by regulating lipid accumulation and inflammation in mice[J]. Int J Mol Sci，2022，23(9)：4687.
[12] NIRIELLA M A，KASTURIRATNE A，BEDDAGE T U，et al. Metabolic syndrome，but not non－alcoholic fatty liver disease，increases 10－year mortality：a prospective，community－cohort study [J]. Liver Int，2020，40(1)：101－106.
[13] TARIQ R，AXLEY P，SINGAL A K. Extra－hepatic manifestations of nonalcoholic fatty liver disease：a review[J]. J Clin Exp Hepatol，2020，10(1)：81－87.
[14] 张森，洪芬芳，杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗[J]. 中国比较医学杂志，2021，31(8)：122－127.
[15] WU C，BIAN Y Q，LU B J，et al. Rhubarb free anthraquinones improved mice nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. J Transl Med，2022，20(1)：294.
[16] CHAUDHRY A，NOOR J，BATOOL S，et al. Advancements in diagnostic and therapeutic interventions of non－alcoholic fatty liver disease：a literature review[J]. Cureus，2023，15(9)：e44924.
[17] NASERI K，SAADATI S，YARI Z，et al. Curcumin offers No additional benefit to lifestyle intervention on cardiometabolic status in patients with non－alcoholic fatty liver disease[J]. Nutrients，2022，14(15)：3224.
[18] CHEN X Y，YANG Z，LIAO M J，et al. *Ginkgo* flavone aglycone ameliorates atherosclerosis *via* inhibiting endothelial pyroptosis by activating the Nrf2 pathway[J]. Phytother Res，2024，38(11)：5458－5473.
[19] 冯静，何艳，吴立荣，等. 银杏黄酮苷元对兔颈动脉粥样硬化及 NOX2、NOX4 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理，2012，23(3)：274－278.
[20] 易琼，李欣，李圆方，等. 银杏黄酮苷元对小鼠脑缺血模型和鹌鹑动脉粥样硬化模型的影响[J]. 中药新药与临床药理，2015，26(6)：804－808.
[21] LI X L，WANG R，ZHOU N，et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation *in vitro* in a NAFLD cell model[J]. Biomed Rep，2013，1(1)：71－76.
[22] WANG W，WANG C，DING X Q，et al. Quercetin and allopurinol reduce liver thioredoxin－interacting protein to alleviate inflammation and lipid accumulation in diabetic rats[J]. Br J Pharmacol，2013，169(6)：1352－1371.
[23] LOU T W，YANG R X，FAN J G. The global burden of fatty liver disease：the major impact of China[J]. Hepatobiliary Surg Nutr，2024，13(1)：119－123.
[24] 周雪，宋怡，邓波，et al. 我国非酒精性脂肪肝病流行现状及相关膳食营养因素探讨[C]//第十二届全国营养科学大会论文汇编，2015.
[25] YAN T T，YAN N N，WANG P，et al. Herbal drug discovery for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Acta Pharm Sin B，2020，10(1)：3－18.
[26] MOHAMUD 法拉 F A. FAS 及 SREBP－－1c 在结直肠癌组织与血清中的表达及其与临床分期的关系 [D]. 扬州：扬州大学，2019.
[27] LAMICHANE S，DAHAL LAMICHANE B，KWON S M. Pivotal roles of peroxisome proliferator－activated receptors (PPARs) and their signal cascade for cellular and whole－body energy homeostasis [J]. Int J Mol Sci，2018，19(4)：949.