

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.30.005

银杏叶提取物对大鼠非酒精性脂肪肝炎肝脏保护作用的研究*

龚毅¹, 范伟^{2△}, 张莹³, 侯炬¹, 郭江福², 柳杨²

(1. 遵义医学院研究生院, 贵州遵义 563003; 2. 贵州省人民医院急诊外科, 贵阳 550002;
3. 贵州省人民医院肝胆外科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 观察银杏叶提取物对非酒精性脂肪肝炎大鼠 Toll 样受体 4(TLR4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等表达的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠分为 3 组。对照组正常饮食, 模型组、治疗组给予高脂饲料喂养 16 周诱发脂肪性肝炎后分别以生理盐水、银杏叶提取物液 10 mL/kg 灌胃, 每日 1 次, 共 8 周。处死大鼠, 分别进行如下检测: (1) 观察肝脏病理变化; (2) 检测 TLR4 表达水平; (3) 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST) 水平及血清 TNF- α 水平。**结果** (1) 治疗组和模型组均有不同程度的肝细胞脂肪变性, 且治疗组轻于模型组。(2) 模型组、治疗组 TLR4 mRNA 及蛋白、TNF- α 表达高于对照组, 模型组又高于治疗组, 差异有统计学意义。对照组血清 ALT、AST 明显低于模型组及治疗组, 治疗组又低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 银杏叶提取物对非酒精性脂肪肝炎大鼠有较好的肝脏保护作用, 其可能机制与降低 TLR4 的表达、抑制炎症反应有关。

[关键词] 银杏叶提取物; 脂肪肝; Toll 样受体; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)30-4190-03

Protective effect of ginkgo biloba extract on liver nonalcoholic steatohepatitis rats*

Gong Yi¹, Fan Wei^{2△}, Zhang Ying³, Hou Ju¹, Guo Jiangfu², Liu Yang²

(1. Graduate School, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Department of Emergency Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, GuiYang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of ginkgo biloba extract on the expression of TLR4 and TNF- α in rat nonalcoholic steatohepatitis. **Methods** SD rats were randomly divided into three groups: control group (normal diet), rats in the model group and the treatment group was given high fat diet to induce steatohepatitis for 16 weeks, respectively. Rats in model group were treated with normal saline, rats in treatment group was fed ginkgo biloba extract (10 mL/kg per day, for eight weeks). Then rats were sacrificed, the following tests were performed: (1) The pathological changes in liver; (2) the expression level of TLR4; (3) serum ALT, AST levels and serum TNF- α levels. **Results** (1) Both treatment group and model group have different levels of hepatic steatosis, and it was lighter in the treatment group. (2) TLR4 mRNA and its protein and TNF- α expression in model group and treatment group were higher than that of the control group, and the model group was higher than the treatment group, the difference was statistically significant. Serum ALT and AST was significantly lower in control group than the model group and the treatment group, the treatment group was lower than model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgo biloba extract has good protection effect on nonalcoholic steatohepatitis in rats, and the possible mechanism may be the reduction of the expression of TLR4 and the inhibition of inflammatory reaction.

[Key words] ginkgo biloba extract; fatty liver; Toll-like receptor 4; TNF- α

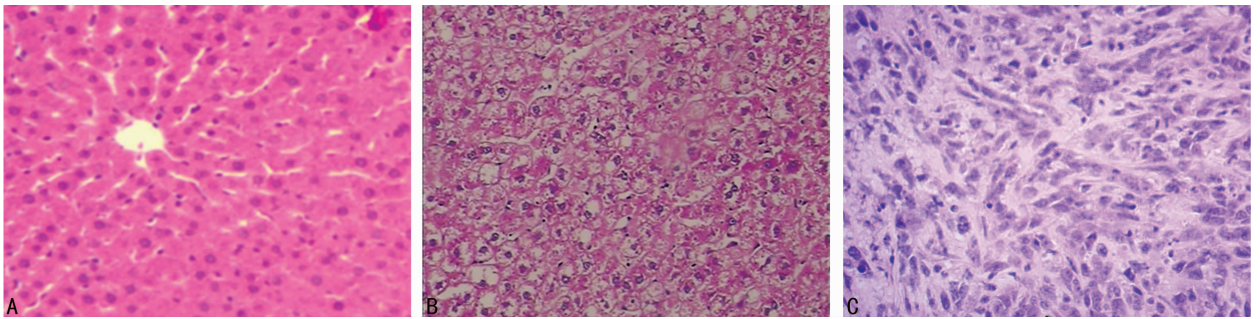
非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是代谢综合征累及肝脏的表现。随着现代生活水平的提高, 非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的发病率增高, 由其引起的肝纤维化和肝硬化发病率也有上升趋势^[1-3], 探讨其发病机制是当前研究的热点问题。黄酮类化合物和银杏内酯是银杏叶提取物^[4] (EGb) 的主要成分, 药理作用非常广泛, 具有调节脂肪代谢及抗氧化等相关作用, 且其主要成分黄酮化合物还有清除自由基等作用^[5-6]。本研究通过探讨银杏叶提取物对 Toll 样受体 4 (TLR4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等在非酒精性脂肪肝炎大

鼠肝脏表达的影响, 探讨其对非酒精性脂肪肝炎的肝保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 30 只雄性 SD 大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供, 体质量 (150 ± 10) g。分为对照组、模型组、治疗组 3 组, 每组 10 只, 大鼠自由进水进食, 分笼 (每笼 5 只) 饲养于温度 (20 ± 2) °C, 明暗各 12 h 的动物实验室内。对照组为正常饮食组 (饲料中碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占 65.5%、10.3%、24.2%)、模型组和治疗组为高脂饮食组^[7-9] (饲料中

* 基金项目: 贵州省省长基金 [黔科教办 (2007) 04]; 贵州省科技厅基金 [黔科合 J (2008) 2301]; 贵州省科技厅专项基金 [黔科合 J (2008) 2302 号]; 贵州省优秀青年科技人才基金 [黔科合人字 (2011) 29 号]。作者简介: 龚毅 (1989-), 硕士, 住院医师, 主要从事肝胆方向的研究。△ 通讯作者, Tel: 13985409773; E-mail: guodongliu777@sina.com。



A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。

图 3 小鼠肝脏 HE 染色 (×200)

表 1 各组大鼠 ALT、AST、TNF-α、TLR4 水平 (x̄±s)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TNF-α(μg/L)	TLR4(ng/mL)
对照组	10	37.2±8.9	123.0±41.0	1.29±0.62	9.23±1.02
模型组	10	109.8±18.3*	258.0±56.3*	3.64±0.95*	43.48±6.54*
治疗组	10	69.3±19.8*#	178.0±52.6*#	2.71±0.83*#	29.45±4.21*#

*: P<0.05, 与对照组比较; #: P<0.05, 与模型组比较。

88%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇,碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占总热量的 53%、27.4%、19.6%)。模型组、治疗组给予高脂饲料喂养 16 周诱发脂肪性肝炎后分别以生理盐水、银杏叶提取物液(其中含黄酮 24.8%,广西桂林思特新技术公司)10 mL/kg 灌胃,每日 1 次,共 8 周。给大鼠腹腔注射水合氯醛 3 mL/kg,采集肝组织标本及下腔静脉采血后处死。

1.2 方法

1.2.1 肝组织标本的制备和观察 用多聚甲醛固定肝组织后,制备石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察各组肝细胞脂肪变性程度、炎症活动度。

1.2.2 TLR4 mRNA 表达情况 Taq 酶、DNaseI(RNase free)购自宝生物公司(TaKaRa),M-Mulv Reverse Transcriptase 购自普洛麦格生物技术有限公司(Promega),RNA 提取试剂 Tripure reagent 为罗氏公司(ROCHE)产品,其余均为国产分析纯试剂。所用 PCR 引物均由威斯腾生物技术公司合成。取材:分别快速取每组样品的组织约 25 mg,按说明书操作提取 RNA 后。所用引物,TLR4:5'-TCT GCC CTG CCA CCA TTT ACA CAG GTC TAA AGA GAG ATT GAC-3',697 bp,PCR 反应条件 94 °C 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 50 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。Actin:5'-CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC;CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC PCR-3',207 bp 反应条件 94 °C 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。Marker 是 TaKaRa 的 DL2000 取 PCR 扩增产物 8 μL,在 1.0%的琼脂糖上进行凝胶电泳。采用凝胶成像系统获取各样品电泳图。

1.2.3 肝脏组织 TLR4 检测 按 ELISA 试剂盒说明检测大鼠肝脏组织 TLR4 水平。

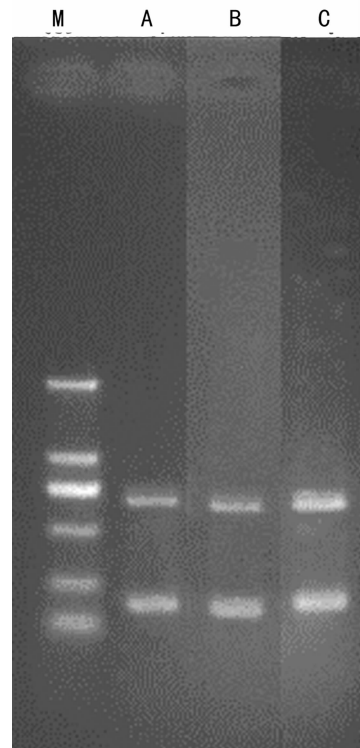
1.2.4 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、TNF-α 水平检测 采用全自动生物化学分析仪检测血清 ALT、AST 水平,采用放射免疫分析法检测血清 TNF-α 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,计量

资料以 x̄±s 表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),SNK(q 检验)进行两两比较 Spearman 相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组大鼠造模均成功,对照组肝脏颜色红润,质软。模型组和治疗组肝脏肿胀,色泽偏黄,质脆。镜下对照组可见肝小叶结构清晰,肝细胞呈放射状排列。模型组和治疗组肝小叶结构模糊,肝细胞排列紊乱,均有不同程度的肝细胞空泡脂肪变性,治疗组肝细胞脂肪变性明显轻于模型组,见图 1。



A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。

图 2 各组肝脏 TLR4 mRNA 的表达情况

2.2 各组 TLR4 mRNA 的表达 模型组的 TLR4 mRNA 的表达明显高于对照组, 治疗组又低于模型组, 见图 2。

2.3 各组大鼠 ALT、AST、TNF- α 、TLR4 水平比较 对照组 ALT、AST、TNF- α 水平、TLR4 表达明显低于模型组和治疗组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

3 讨 论

TLR 是近年来发现的一种脂多糖受体, 其家族成员目前已确认的有 10 个 (TLR 1~10)。其中, TLR2 和 TLR4 为主要成员, TLR2 主要介导细菌外毒素所致的炎症反应, TLR4 主要介导细菌内毒素所致的炎症反应。当脂多糖经级联活化反应激活 TLR4 后, 其胞内 Toll/IL-1R(TIR) 结构域招募一系列信号分子, 活化核因子 (NF)- κ B, 引起以 TNF- α 等为核心的促炎因子的炎症因子级联反应, 形成第二次打击力量, 导致机体损伤^[10-12]。在其信号传导通路中 TNF- α 起着极为重要的作用, TNF- α 可抑制脂蛋白的脂质活性, 目前的研究表明高浓度的 TNF- α 可降低外周组织的脂肪分解, 促进肝细胞对三酰甘油的合成与聚集, 而富余脂质特别是三酰甘油在肝脏中的沉积是 NAFLD 形成和发展的前提条件。既往的研究表明, 血清内毒素水平升高与 TNF- α 水平呈显著正相关^[13-15]。

本研究结果显示, 经过持续 16 周的高脂饮食喂养, 大鼠体重、肝指数明显升高, 病理形态形成 NASH。治疗组和模型组均有不同程度的肝细胞脂肪变性, 治疗组肝细胞脂肪变性轻于模型组。模型组、治疗组 TLR4 mRNA 及蛋白表达、TNF- α 表达高于对照组, 模型组又高于治疗组。对照组血清 ALT、AST 明显低于模型组及治疗组, 治疗组又低于模型组。表明银杏叶提取物对非酒精性脂肪肝炎大鼠有较好的肝脏保护作用, 其可能机制与降低 TLR4 的表达、抑制炎症反应有关。

综上所述, TLR4 介导的炎症反应可能是导致非酒精性脂肪肝炎大鼠肝脏炎症、肝功能损伤的原因之一。银杏叶提取物对肝脏的保护作用可能与其降低 TLR4 的表达、抑制炎症反应有关。

参考文献

- [1] 周汝霞, 陈瑛, 李莉. 脂肪肝治疗研究进展[J]. 医药导报, 2003, 22(9): 609.
- [2] 钟岚, 范建高, 王国良, 等. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立[J]. 实验动物科学与管理, 2000(2): 16-20.
- [3] Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis; selected practical is-

sues in their evaluation and management [J]. Hepatology, 2009, 49(1): 306-317.

- [4] 黄强. 银杏叶提取物对大鼠纤维化肝脏 NF-KB 活性的抑制作用[J]. 中国中医急症, 2010, 12(19): 2102-2103.
- [5] 吕平, 林明涛. 银杏内酯对活性氧自由基和过氧化氢清除作用的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 151-154.
- [6] 杨瑾. 银杏叶提取物对实验性肝纤维化大鼠 COX-2、TNF- α 等表达的影响[J]. 东莞理工学院学报, 2010, 17(1): 76-79.
- [7] 魏香兰, 方如塘, 冀爱云, 等. 高脂饲料中胆固醇含量对大鼠非酒精性脂肪肝病动物模型建立的影响[J]. 西北药学杂志, 2012(3): 233-236.
- [8] 要鹏, 齐安龙, 张宇, 等. 小鼠非酒精性脂肪肝实验模型建立的最佳饲料配比方案[J]. 中国医学创新, 2011(18): 11-14.
- [9] 苏琳, 刘玉兰. 高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的比较[J]. 实验动物科学, 2009, 26(3): 14-23.
- [10] Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Am J Transplant, 2005, 5(8): 1793-1800.
- [11] 陈妍, 邓存良. TLR4 在肝脏损伤中的作用研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(19): 2897-2899.
- [12] 周丽红, 赵彩彦. Toll 样受体与慢性肝脏疾病的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2009(7): 412-416.
- [13] Wigg AJ, Roberts Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Gut, 2001, 48(2): 206-211.
- [14] 孙惠, 赵彩彦. 肿瘤坏死因子- α 在非酒精性脂肪性肝病中的作用机制及其综合治疗[J]. 河北医药, 2009, 31(15): 1978-1981.
- [15] Jokelainen K, Reinke LA, Nanji AA. Nf-kappab activation is asso-ciated with free radical generation and endotoxemia and precedes pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease [J]. Cytokine, 2008, 16(1): 36-39.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-05-16)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体, 包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本, 样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平, 随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测, 则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值, 样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值, 样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则, 即需要采用随机的抽样方法, 保证总体中每个个体被选取的机会相同。