◆实验研究◆

基于PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路探讨银杏内酯B治疗代谢性脂肪性肝病的作用

柳巧燕[1]，姚政[1,2]，武俊紫[1,2]，仝森[1]，杨秋琼[1]，熊光轶[1]，宋波[1]

1. 云南中医药大学基础医学院，云南 昆明 650500
2. 云南省高校中医证候微观辨证重点实验室，云南 昆明 650500

［摘要］**目的：**通过动物实验验证银杏内酯B（GB）治疗代谢性脂肪性肝病（MAFLD）的作用是否与调控PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路，抑制内质网应激，减少肝细胞凋亡及炎症反应相关。**方法：**72只雄性SD大鼠随机分为正常组，模型组，辛伐他汀组，GB低、中、高剂量（GB-L、GB-M、GB-H）组（n=12），高脂高糖饲料喂养12周构建MAFLD模型（正常组除外）。治疗8周后，收集血清和肝组织。生化试剂盒检测血脂和肝脂［总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）］及肝功能［天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）］；酶联免疫吸附法（ELISA）法检测血清和肝脏中的炎性因子［白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-1（IL-1）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）］水平；HE染色、油红O染色观察肝组织病理学；Western blot法检测肝脏组织中GRP78、PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、Bcl-2和Bax的蛋白表达。**结果：**肝脏组织病理学显示，与正常组相比，模型组大鼠肝脏脂肪变性显著，与模型组相比，各治疗组脂肪变性情况有明显改善；生化指标和蛋白表达显示，与正常组相比，模型组大鼠肝脏及血清TC、TG、LDL-C、IL-1、IL-6、TNF-α，血清AST、ALT及肝脏GRP78、PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、Bax水平显著升高（$P<0.05$），血清、肝脏HDL-C及肝脏Bcl-2水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组相比，各治疗组大鼠血清和肝脏TC、TG、LDL-C、IL-1、IL-6、TNF-α，血清ALT、AST及肝脏GRP78、PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、Bax水平显著降低（$P<0.05$），肝脏Bcl-2水平显著升高（$P<0.05$），与模型组相比，GB-H组大鼠血清和肝脏HDL-C水平明显升高（$P<0.05$），GB-L组和GB-M组HDL-C水平呈上调趋势，但这2组相较于模型组，差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论：**GB对MAFLD具有治疗作用，其作用机制可能与调节PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路抑制内质网应激，缓解肝细胞凋亡及炎症反应有关。

［关键词］代谢性脂肪性肝病；银杏内酯B；内质网应激；PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路
［中图分类号］R575.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）07-0001-08
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.07.001

Exploration of the Effect of Ginkgolide B for Metabolic Associated Fatty Liver Disease Based on PERK/eIF2α/ATF4/CHOP Signaling Pathway

LIU Qiaoyan, YAO Zheng, WU Junzi, TONG Sen, YANG Qiuqiong, XIONG Guangyi, SONG Bo

Abstract：Objective： The purpose of this study is to verify whether the mechanism of ginkgolide B (GB)

［收稿日期］2022-11-14
［修回日期］2023-01-27
［基金项目］国家自然科学基金项目（81860812）；云南省应用基础研究计划项目（2019FF002-055）；云南省教育厅科学研究基金（2022Y344）
［作者简介］柳巧燕（1993-），女，在读硕士研究生，E-mail：1131835307@qq.com。
［通信作者］宋波（1972-），男，教授，E-mail：ynkmsongbo6@126.com；熊光轶（1972-），男，副教授，E-mail：307924002@qq.com。

in the treatment of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) is related to the regulation of the PERK/eIF2α/ATF4/CHOP signaling pathway to inhibit endoplasmic reticulum stress and alleviate hepatocyte apoptosis and inflammation through animal experiments. **Methods**: A total of 72 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, Simvastatin group and GB low-, middle- and high-dose (GB-L, GB-M and GB-H) groups (n=12). Except for the normal group, the other groups were fed a high-fat high-sugar diet to establish animal models for 12 weeks. After 8 weeks, serum and liver tissue were collected. Biochemical kit was used to detect blood lipids, liver lipids, [total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C)] and liver function [aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)]. Detect serum and liver inflammatory factors [interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor-α(TNF-α)] levels by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Observation of liver histopathology by HE and Oil red O staining. Detect protein expressions of GRP78, PERK, p-eIF2 α, ATF4, CHOP, Bcl-2 and Bax in liver tissue by Western blot. **Results**: Liver histopathology showed that hepatic steatosis in the model group were significantly higher than those in the normal group, and the condition were especially improved in all treatment groups. Biochemical indexes and protein expression showed that compared with the normal group, the levels of TC, TG, LDL-C, IL-1, IL-6 and TNF-α in liver and serum, AST and ALT in serum and GRP78, PERK, p-eIF2α, ATF4, CHOP and Bax in liver in model group were remarkably increased (P<0.05), the levels of HDL-C in liver and serum and liver Bcl-2 were significantly decreased (P<0.05). Compared with the model group, the levels of TC, TG, LDL-C, IL-1, IL-6 and TNF-α in serum and liver, ALT and AST in serum and GRP78, PERK, p-eIF2α, ATF4, CHOP and Bax in the liver in each treatment group were significantly decreased (P<0.05), while the level of Bcl-2 in liver was significantly increased (P<0.05). Compared with the model group, HDL-C levels in serum and liver of GB-H group were significantly increased (P<0.05). HDL-C levels in GB-L and GB-M groups showed an up-regulated trend, but there was no statistical difference between the two groups and model group (P>0.05). **Conclusions**: GB has a therapeutic effect on MAFLD. Its mechanism may be related to the regulation of the PERK/eIF2α/ ATF4/CHOP signaling pathway to inhibit endoplasmic reticulum stress and alleviate hepatocyte apoptosis and inflammation.

Keywords: Metabolic associated fatty liver disease; Ginkgolide B; Endoplasmic reticulum stress; PERK/eIF2α/ATF4/CHOP signaling pathway

代谢性脂肪性肝病(MAFLD)是一种系统性代谢紊乱的肝脏表现，实际上是一种代谢性疾病，以肝细胞内脂质蓄积为其本质特征[1-2]。流行病学显示，MAFLD 全球发病率极高[3-4]，严重威胁人们的健康。但是在 MAFLD 治疗方面，目前缺乏特效药，因此，寻找新的有效的药物治疗本病对患者的健康具有重要的意义。银杏最早见于数亿年前，是最古老的孑遗植物，《中华人民共和国药典》记载银杏叶“具有活血化瘀、通络止痛、化浊降脂、敛肺平喘等许多功效。可用于胸痹心痛、瘀血阻络、中风偏瘫、高脂血症及肺虚咳喘等症”[5]。银杏内酯 B(GB)是从银杏叶中提炼出来的一种二萜内酯类化合物，具有很强的药理活性，是目前被证明最强的血小板活化因子拮抗剂[6]。现代药理学研究发现，GB 还具有抑制内质网应激(ERS)、抗炎、抗细胞凋亡、抗氧化、调节脂代谢等生物活性，可用于治疗冠心病、动脉硬化、脑中风及高血脂等疾病[7-12]。基于 GB 具有的抑制 MAFLD 涉及的脂质堆积、ERS 炎症反应、细胞凋

亡等多种病理过程，笔者推测GB具有一定的治疗MAFLD的作用，其机制可能与抑制ERS、抗炎及抗凋亡有关。为此本研究以PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路抑制ERS为靶点，观察GB对MAFLD的干预作用，以期从抑制ERS、抗炎和抗细胞凋亡方面初步阐明GB防治MAFLD的分子机制，从而为MAFLD的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验药物 辛伐他汀购买于厦门福满药业有限公司(批号20180807)；GB单体由成都德思特生物技术有限公司提供，其纯度≥98%(货号170315)；高脂高糖饲料购于江苏美迪生物医药有限公司；红糖购买于云南古训有机黑糖红糖厂。

1.2 实验动物 72只6周龄的雄性SD大鼠，SPF级，体质量150～160 g，实验动物购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号SCXK(湘)2019-0004]，饲养于云南中医药大学动物实验中心[SYXK(滇)K2017-0005]，温度为(20±3)℃，湿度为50%±20%，光照明/暗(12/12)h。实验严格遵循3R原则。本研究经云南中医药大学实验动物伦理委员会批准(R-062021029)。

1.3 主要试剂 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供(批号分别为20210713、20210625、20210625、20210713、20210628、20210810)；白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫试剂盒购买于江苏酶免实业有限公司(批号分别为MM-0190R1、MM-0046R1、MM-0180R1)；B淋巴瘤-2(Bcl-2)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、真核翻译起始因子2α(eIF2α)、活性转录因子4(ATF4)和双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网类激酶(PERK)抗体由美国Affinity公司提供(货号分别为AF6139、DF6025、AF0120、AF5366、AF3087、DF6008、AF5304)。

1.4 主要仪器 Gemini AS型自动染色机(赛默飞世尔科技公司)；DK-S11型恒温电热水浴锅(上海森信)；TGL-16.5M型冷冻高速离心机(云南迈永瑞科技有限公司)；RT-6100型酶标仪Rayto(深圳雷杜生命科学股份有限公司)；Bio-Rad型蛋白电泳仪(美国BIO-RAD公司)。

1.5 模型制备、分组及给药 大鼠按随机数字法分为正常组，模型组，辛伐他汀组，GB低(GB-L)、中(GB-M)、高(GB-H)剂量组，每组12只。正常组给予普通饲料及普通饮用水喂养，其余各组给予高脂高糖饲料+5%红糖水进行喂养。饲养12周后每组各取2只大鼠验证模型，大鼠肝脏显示肝细胞脂肪变性，大量脂肪空泡和橘色脂滴，证明造模成功。造模成功后给予相关治疗，其中辛伐他汀组给予2.0 mg/(kg·d)辛伐他汀灌胃治疗；GB-L、GB-M、GB-H组分别给予0.5、1.0、2.0 mg/(kg·d)GB灌胃治疗，正常组和模型组均给予等体积的0.9%氯化钠溶液灌胃治疗，治疗8周。

1.6 标本采集 灌胃治疗结束后，所有大鼠禁食不禁水12 h，第2天按照批次麻醉后取材。麻醉后将其固定于解剖板，采用腹主动脉取血法抽取血液于血液采集管中，立即放入高速低温离心机，收集血清后置于-80 ℃低温冰箱中冷藏备用。肝脏取出后对其进行分离，将肝大叶置入多聚甲醛组织固定液用于肝脏病理学检测；剩余的肝小叶分成4份，保存在-80 ℃低温冰箱中冷藏备用。

1.7 检测方法 ①体质量及肝指数检测。实验期间记录每只大鼠的体质量及肝脏质量，根据公式肝指数(%)=肝脏质量(g)/体质量(g)×100%，从而计算出每只大鼠肝指数。②肝脏组织病理学检测。肝脏组织洗涤完成后对其进行梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片、捞片、烘片、苏木精-伊红(HE)溶液染色，透明后中性树脂封片即可，完成后采用电子显微镜观察肝脏组织病理学情况(每张切片选取4个不同的视野)。③生化指标检测。-80 ℃低温冰箱取出血清和肝脏，按照试剂盒操作说明书，检测血清中ALT和AST水平、肝脏和血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C，以及IL-1、IL-6和TNF-α水平。④蛋白指标检测。用Western blot法检测肝组织中PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、GRP78、Bax和Bcl-2蛋白表达水平。称取100 g肝脏组织，加入500 μL的RIPA裂解液裂解后离心收集上清液，按照总蛋白试剂盒提取总蛋白后，采取BCA法对蛋白进行定量并调平，然后每组各取80 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳，之后依次采用半干转移

法进行转膜、脱脂牛奶封闭、一抗过夜、二抗封闭、曝光、收集图像。所测蛋白的相对表达量为所测蛋白的灰度值/GAPDH 的灰度值的比值。

1.8　统计学方法　使用 SPSS23.0 软件对所有数据进行统计学处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计数据符合正态分布，则各组间比较使用单因素方差(One way ANOVA)进行分析，$P<0.05$ 认为有统计学差异。

2　结果

2.1　各组大鼠体质量及肝指数比较　见表 1。与正常组大鼠相比，模型组大鼠体质量、肝质量和肝指数显著升高($P<0.05$)，表明高脂高糖饲料喂养致使肝脏体积增大；各 GB 组和辛伐他汀组进行干预后，相较于模型组，各治疗组大鼠体质量、肝质量和肝指数显著降低($P<0.05$)；表明 GB 可以明显降低 MAFLD 大鼠体质量及肝脏肥大情况。

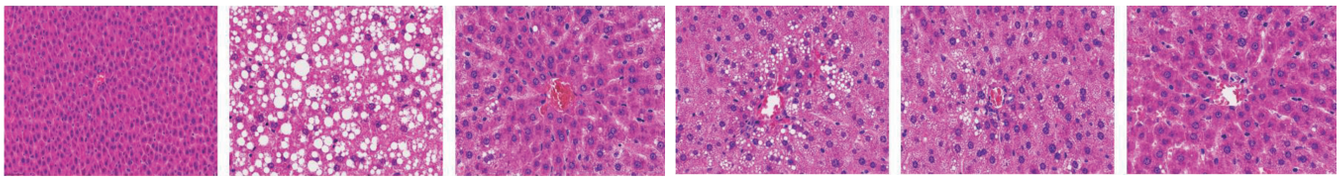
2.2　各组大鼠肝脏 HE 染色结果　见图 1。HE 染色结果可观察到，正常组大鼠肝索完整且清晰，肝细胞排列规则，细胞核均匀分布在肝细胞中央，几乎无脂肪空泡出现；而模型组大鼠肝索结构不完整，细胞核形态、大小不均，且受到一定挤压紧贴于细胞膜表面，同时出现大量脂肪空泡及炎症浸润，肝组织脂肪变性面积较大；与模型组相比较，GB 治疗组及辛伐他汀组均可以明显改善肝脏组织内的脂肪沉积，GB-L 组和 GB-M 组大鼠肝索排列稍有改善，但仍有散在分布的脂肪空泡以及炎症浸润，GB-H 组肝细胞内可见少量体积较小的脂肪空泡，未见明显炎细胞浸润。

2.3　各组大鼠肝脏油红 O 染色结果　见图 2。油红 O 染色结果可见：正常组大鼠肝细胞结构正常，肝脏内不存在橘色脂滴；模型组大鼠肝细胞形态结构异常，肝脏内可见大量橘色脂滴聚集，并伴有炎细胞浸润；相较于模型组，GB 用药组及辛伐他汀组大鼠肝脏内的脂滴明显减少，炎症细胞浸润减轻，且随着 GB 剂量的增加，脂质沉积改善的效果越明显，GB-H 组仅可见小范围脂肪颗粒。以上 HE 及油红 O 染色结果提示，GB 可明显减轻 MAFLD 大鼠肝脏脂肪变性程度及炎细胞浸润情况。

表 1　各组大鼠体质量及肝指数比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	鼠数	体质量(g)	肝质量(g)	肝指数(%)
正常组	10	514.81±42.24	10.28±0.81	2.08±0.11
模型组	10	617.24±51.35①	23.72±2.21①	3.53±0.54①
辛伐他汀组	10	547.63±40.18②	14.38±1.34②	2.72±0.33②
GB-L 组	10	544.11±44.74②	14.70±1.45②	2.77±0.14②
GB-M 组	10	530.27±51.31②	13.51±1.24②	2.62±0.13②
GB-H 组	10	505.60±39.27②	11.28±1.13②	2.39±0.14②

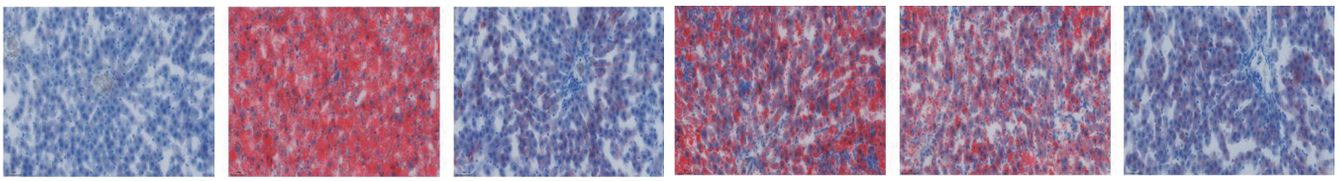
注：①与正常组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$



A　B　C　D　E　F

注：A. 正常组；B. 模型组；C. 辛伐他汀组；D. GB-L 组；E. GB-M 组；F. GB-H 组

图 1　各组大鼠肝脏 HE 染色（×400）



A　B　C　D　E　F

注：A. 正常组；B. 模型组；C. 辛伐他汀组；D. GB-L 组；E. GB-M 组；F. GB-H 组

图 2　各组大鼠肝脏油红 O 染色（×400）

2.4　各组大鼠血脂、肝脂指标比较　见表 2。与正常组大鼠比较，模型组大鼠血清和肝脏中 TC、TG 和 LDL-C 水平均显著升高($P<0.05$)，HDL-C 水平显著降低($P<0.05$)；与模型组大鼠相比，辛伐他汀、GB

3个剂量组大鼠血清和肝脏中TC、TG和LDL-C水平均显著降低($P<0.05$)；与模型组大鼠相比，GB-H组大鼠血清和肝脏中HDL-C水平呈明显升高趋势($P<0.05$)，GB-L和GB-M组HDL-C水平具有上调趋势，但2组与模型组相比，差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5　各组大鼠炎性因子指标比较　见表3。与正常组相比，模型组大鼠血清和肝脏中IL-1、IL-6和TNF-α水平均显著升高($P<0.05$)；与模型组相比，辛伐他汀和GB各治疗组上述指标均显著降低($P<0.05$)；且随着GB剂量的增加，大鼠血清和肝脏中IL-1、IL-6和TNF-α水平也降低越显著。以上检测结果表明，GB能明显改善MAFLD大鼠肝脏炎症反应。

2.6　各组大鼠肝功能指标比较　见表4。与正常组相比，模型组大鼠血清ALT和AST水平均明显升高($P<0.05$)；与模型组相比，辛伐他汀和GB 3个剂量组肝功能指标均明显降低($P<0.05$)；且随着GB剂量的增加，大鼠血清中ALT和AST水平降低越明显。这一结果提示GB能够有效改善MAFLD大鼠的肝功能损伤情况。

表2　各组大鼠血脂、肝脂指标比较($\bar{x}\pm s$)　mmol/L

组　别	鼠数	TC		TG		LDL-C		HDL-C	
		血清	肝脏	血清	肝脏	血清	肝脏	血清	肝脏
正常组	10	0.29±0.08	0.25±0.05	1.60±0.11	1.78±0.15	0.25±0.03	0.21±0.02	1.18±0.07	0.91±0.06
模型组	10	0.69±0.06①	0.57±0.02①	2.85±0.38①	2.69±0.29①	0.89±0.05①	0.44±0.07①	0.81±0.05①	0.73±0.03①
辛伐他汀组	10	0.36±0.07②	0.27±0.06②	1.66±0.18②	1.74±0.12②	0.41±0.07②	0.25±0.03②	0.98±0.09②	0.86±0.10②
GB-L组	10	0.41±0.06②	0.32±0.07②	1.75±0.15②	1.83±0.11②	0.39±0.09②	0.29±0.05②	0.89±0.12	0.78±0.11
GB-M组	10	0.39±0.08②	0.29±0.05②	1.68±0.14②	1.76±0.10②	0.42±0.06②	0.31±0.03②	0.91±0.10	0.85±0.12
GB-H组	10	0.37±0.08②	0.27±0.06②	1.65±0.13②	1.75±0.09②	0.41±0.07②	0.30±0.04②	1.01±0.10②	0.88±0.08②

注：①与正常组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

表3　各组大鼠炎性因子指标比较($\bar{x}\pm s$)　ng/mL

组　别	鼠数	IL-1		IL-6		TNF-α	
		血清	肝脏	血清	肝脏	血清	肝脏
正常组	10	0.41 ± 0.06	1.38 ± 0.08	107.75 ± 19.36	47.26 ± 6.71	0.63 ± 0.13	1.98 ± 0.46
模型组	10	1.19 ± 0.17①	3.51 ± 0.09①	333.61 ± 20.21①	108.35 ± 14.27①	1.56 ± 0.29①	4.16 ± 0.33①
辛伐他汀组	10	0.70 ± 0.11②	2.12 ± 0.12②	174.25 ± 27.14②	63.35 ± 9.13②	0.92 ± 0.17②	2.61 ± 0.14②
GB-L组	10	0.64 ± 0.11②	1.80 ± 0.22②	142.35 ± 25.54②	50.57 ± 8.34②	0.80 ± 0.29②	2.42 ± 0.41②
GB-M组	10	0.58 ± 0.09②	1.74 ± 0.19②	149.71 ± 18.45②	52.16 ± 8.15②	0.85 ± 0.15②	2.44 ± 0.36②
GB-H组	10	0.54 ± 0.10②	1.59 ± 0.28②	140.56 ± 22.82②	52.25 ± 8.23②	0.84 ± 0.14②	2.38 ± 0.37②

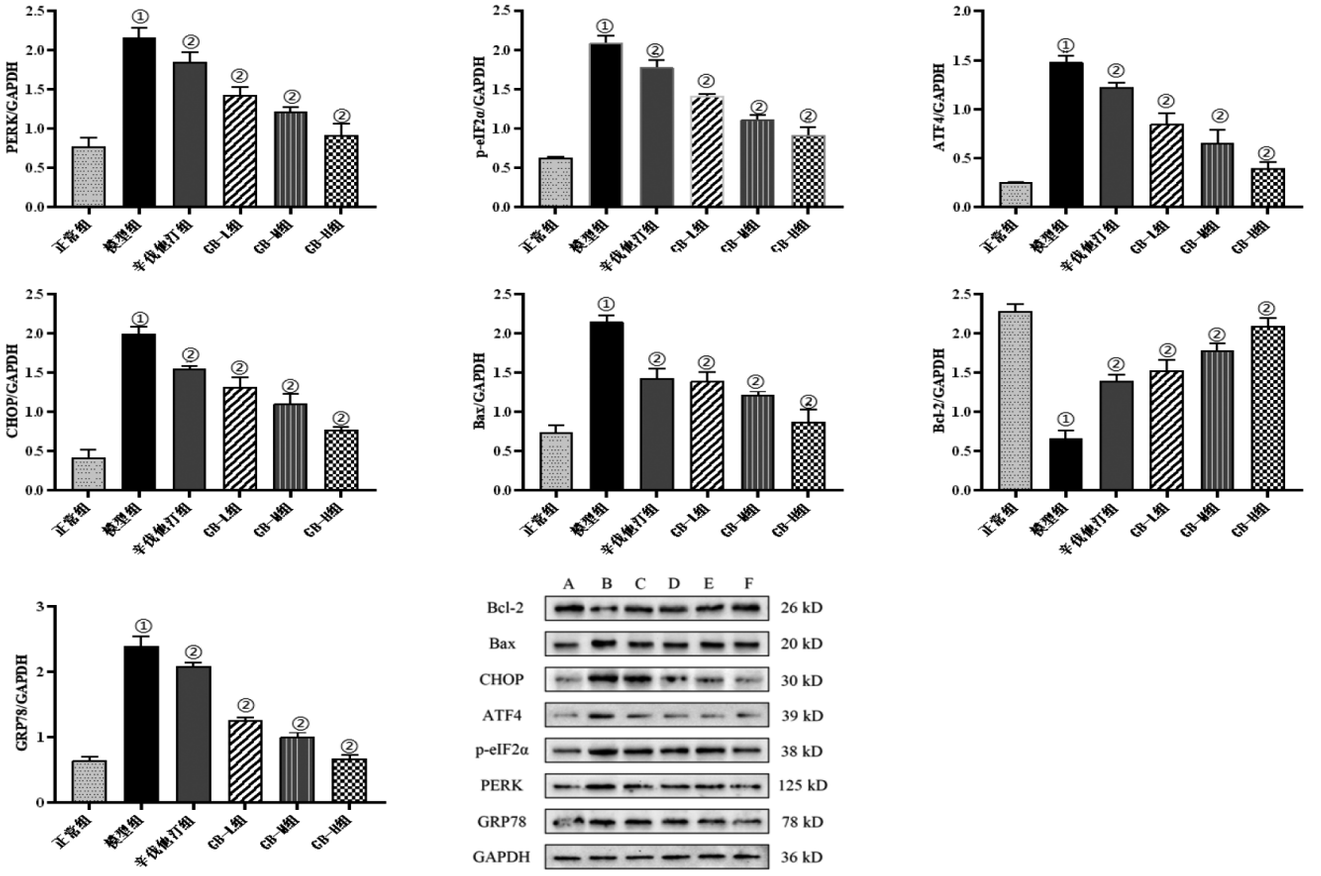
注：①与正常组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

表4　各组大鼠肝功能指标比较($\bar{x}\pm s$)　U/L

组　别	鼠数	ALT	AST
正常组	10	36.23 ± 5.10	70.17 ± 9.03
模型组	10	72.15 ± 8.22①	149.15 ± 10.08①
辛伐他汀组	10	52.50 ± 3.21②	87.05 ± 9.17②
GB-L组	10	59.12 ± 5.36②	98.12 ± 8.23②
GB-M组	10	44.27 ± 4.55②	75.24 ± 7.16②
GB-H组	10	43.15 ± 5.30②	73.85 ± 8.06②

注：①与正常组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

2.7　各组大鼠蛋白表达指标比较　见图3。与正常组比较，模型组大鼠肝脏GRP78、PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP和Bax表达明显升高($P<0.05$)，Bcl-2表达明显降低($P<0.05$)；与模型组比较，辛伐他汀组、GB-L、GB-M和GB-H组大鼠肝脏GRP78、PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP和Bax表达明显降低($P<0.05$)，Bcl-2表达明显升高($P<0.05$)。以上结果表明，GB能抑制MAFLD大鼠PERK/eIF2α/ATF4信号通路的表达。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 辛伐他汀组；D. GB-L 组；E. GB-M 组；F. GB-H 组。①与正常组比较，$P<0.05$；②与模型组比较，$P<0.05$

图 3　各组大鼠肝脏蛋白表达比较

3　讨论

MAFLD 发病机制极为复杂，涉及多种代谢过程，一个更贴近 MAFLD 发病机制的动物模型是开展该疾病研究和药效评价的关键。目前对成功构建 MAFLD 最佳模型的方法还没有达成共识。很多文献的造模方法主要是基于该病发病机制的食物因素来进行模型制备。其中高脂高糖饮食诱导的 MAFLD 模型虽然造模时间比较长，但因其显示出与人类 MAFLD 最相似的表型等特征，且方法简单易懂、价格普遍容易接受、复制的成功性较高，成为当前国内外普遍接受的建立 MAFLD 模型最常用的造模方法[13]。基于前期研究基础，本研究采用每天高脂高糖饲料 + 5%红糖水喂养 12 周建立 MAFLD 大鼠模型，12 周末收集大鼠肝脏进行 HE 及油红 O 染色，验证模型是否成功。HE 及油红 O 染色结果表明，模型组较正常组肝脏组织显示出大量脂肪空泡及橘色脂滴，证明成功复制了 MAFLD 大鼠模型。

GB 具有抗 ERS、抗炎、抗氧化及维持脂代谢稳态等功效[14-16]，在改善 MAFLD 中起着重要的作用。关于 GB 在脂质代谢异常中的治疗已有相关文献报道，如 Luo L 等[17]研究揭示 GB 可减轻肥胖小鼠的血清 TG 水平，改善小鼠肝脏脂肪变性。Yang Y 等[18]发现 GB 对高脂高糖饮食诱导的 MAFLD 小鼠的脂质沉积有明显的抑制作用，服用 GB 可显著降低小鼠肝脏 ALT、AST、TG 和 TC 水平，通过改善肝功能，降低血脂来改善 MAFLD 小鼠的脂质积累。本研究中 HE 染色结果发现，正常组大鼠肝索结构完整，且无脂肪空泡；而模型组大鼠肝索结构不清晰，且有大量脂肪空泡。油红 O 染色结果发现，正常组大鼠肝细胞结构正常，且肝脏内无橘色脂滴出现；而模型组大鼠肝细胞结构异常，且肝脏内可见大量橘色脂质沉积。经 GB 治疗后，各治疗组大鼠肝脏脂肪变性及

脂质沉积程度呈显著降低趋势。此外，脂代谢和肝功能指标显示，GB 3个剂量组TG、TC、LDL-C、ALT及AST水平较模型组均有明显的降低。这些结果提示，GB可有效改善MAFLD大鼠肝脂肪变性、肝功能及血脂水平异常。这与其他研究观察到的结果相一致[18-19]。

有研究证实PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路作为ERS的关键调节通路之一，参与MAFLD的病理过程[10]。ER是调节机体内蛋白质合成和脂肪代谢的关键部位。研究证实，ER稳态的持续被扰动(如低氧、营养缺乏、未折叠的蛋白质增多、病原体感染、钙稳态紊乱、炎症或者氧化应激等)可诱导ERS[20]。ERS时，细胞为应对内质网腔内错误折叠与未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱等状况而激活未折叠蛋白反应(UPR)，可促进蛋白质降解、减少蛋白质合成，从而缓解ERS[21]。生理情况下，PERK在肝细胞中主要与ER腔内GRP78结合，不发挥作用。当UPR不足以应对长期ERS诱导的刺激时，ER内将会出现大量未折叠蛋白聚积，ER膜上PERK蛋白将与GRP78解离[22]。解离后的PERK蛋白可激活其下游相关信号通路，使eIF2α发生磷酸化，促进CHOP的转录和表达。

CHOP的过表达可调节相关基因启动细胞凋亡机制[23]，促使细胞凋亡，进一步激活炎症相关信号通路，使炎性因子IL-1、IL-6和TNF-α水平升高[24]，最终导致MAFLD病程的进展。本实验采用高脂高糖饲料成功建立MAFLD大鼠模型，模型组大鼠肝组织中GRP78、PERK、p-eIF2α和ATF4的表达水平均显著高于正常组，这与国内外的研究结果相一致[25-26]，这一结果提示ERS参与了MAFLD的形成。通过GB治疗干预8周后，治疗组大鼠肝组织中上述相关蛋白的表达水平较模型组均有不同程度的降低，结果显示，GB一定程度上改善了ERS。本实验中模型组CHOP和Bax蛋白表达水平较正常组明显升高，Bcl-2水平较正常组明显降低，这与国内外研究结果一致[11,27-28]。同时，实验结果提示MAFLD发病过程中存在细胞凋亡现象，这可能是ERS激活了CHOP介导的细胞凋亡通路参与了MAFLD的发生发展[12]。经GB治疗后CHOP、Bax和Bcl-2蛋白表达水平较模型组明显改善，提示GB可以改善MAFLD的细胞凋亡。此外，模型组大鼠血清和肝脏组织中炎性细胞因子IL-1、IL-6和TNF-α水平较正常组均明显上调，这与Nita I等[24]的研究结果一致，这一结果提示MAFLD病理过程中存在炎症反应，这可能与ERS进一步激活PERK介导的下游炎症相关信号通路相关。经GB治疗8周后，GB各治疗组大鼠肝脏组织和血清中炎性细胞因子IL-1、IL-6和TNF-α水平均低于模型组，表明GB可以改善MAFLD中的炎症反应。

综上所述，GB对高脂高糖诱导的MAFLD大鼠肝脏脂肪变性及肝功能损伤具有显著的保护作用，其保护作用可能与GB调控PERK/eIF2α/ATF4/CHOP信号通路进而抑制ERS，缓解肝细胞凋亡和炎性反应相关。

[参考文献]

[1] SANYAL A J. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(6): 377-386.

[2] RODRIGUES G, MOREIRA A J, BONA S, et al. Simvastatin Reduces Hepatic Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Nonalcoholic Steatohepatitis Experimental Model[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 15(4): 320-331.

[3] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.

[4] LIU C, ZhOU B, MENG M, et al. FOXA3 induction under endoplasmic reticulum stress contributes to non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatol, 2021, 75(1): 150-162.

[5] 陈称，陈莉，孙建博. 银杏内酯类化合物的来源、结构修饰与新剂型研究进展[J]. 南京中医药大学学报，2019，35(3)：344-350.

[6] 任佳伟，宋玉. 银杏叶有效成分抗血小板聚集和清除DPPH自由基的量效关系和协同作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2015，17(11)：2367-2372.

[7] 刘佳，陈少壮，马骏，等. 银杏内酯B治疗缺血性脑中风的神经保护作用及机制的研究[J]. 中国医药指南，2019，17(17)：1-2.

[8] TIAN J, LIU Y, HEN K. Ginkgo biloba Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15(6): 532-548.

[9] YANG Y, LI Y, WANG J, et al. Systematic Investigation of Ginkgo Biloba Leaves for Treating Cardio-cerebrovascular Diseases in an Animal Model[J]. ACS Chem Biol, 2017, 12(5): 1363-1372.

[10] WANG L, CHEN J, NING C, et al. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Current Drug Targets, 2018, 19(9): 1087-1094.

[11] FLSTER K F T, PINTO B A S, FRANCA L M, et al. Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice[J]. J Nutr Biochem, 2018, 62(4): 155-166.

[12] CAO J, DAI D L, YAO L, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 115-129.

[13] IM Y R, HUNTER H, GRACIA HAHN D, et al. A Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD[J]. Hepatology, 2021, 74(4): 1884-1901.

[14] GANG W, ZHENBIN L, MENGHU L, et al. Ginkgolide B Mediated Alleviation of Inflammatory Cascades and Altered Lipid Metabolism in HUVECs via Targeting PCSK-9 Expression and Functionality[J]. BioMed Research International, 2018, 67(2): 201-218.

[15] 张艳艳, 柴丽娜. 银杏内酯B对心肌缺血再灌注损伤大鼠炎性因子、血管新生和认知功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(21): 3567-3571.

[16] 杨雨微, 陈璟, 汪洁, 等. 银杏内酯B对ApoE~(-/-)小鼠动脉粥样硬化的抗氧化和抗炎作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(9): 19-21.

[17] LUO L, LI Y, WANG D, et al. Ginkgolide B lowers body weight and arneliorates hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice correlated with pregnane X receptor activation[J]. Rsc Adv, 2017, 7(4): 37858-37866.

[18] YANG Y, CHEN J, GAO Q, et al. Study on the attenuated effect of Ginkgolide B on ferroptosis in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Toxicology, 2020, 445: 152599.

[19] 龙思琴, 喻秀峰, 葛宇黎, 等. 银杏内酯B改善高脂饮食诱导的小鼠肝脏脂肪变性和炎症[J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(13): 519-525.

[20] LI Y, ZALZALA M, JADHAV K, et al. Carboxylesterase 2 prevents liver steatosis by modulating lipolysis, ER stress and lipogenesis and is regulated by HNF4α[J]. Hepatology, 2016, 63(6): 1860-1874.

[21] LACHKAR F, PAPAIOANNOU A, FERRE P, et al. Stress du réticulum endoplasmique et stéatopathies métaboliques ER stress and NAFLD[J]. Biol Aujourdhui, 2020, 214(1-2): 15-23.

[22] IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: A cell's response to stress[J]. Life Sci, 2019, 62(6): 156-163.

[23] ENDO M, OYADOMARI S, SUGA M, et al. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice[J]. J Biochem, 2005, 138: 501-507.

[24] NITA I, HOSTETTLER K, TAMO L, et al. Hepatocyte growth factor secreted by bone marrow stem cell reduce ER stress and improves repair in alveolar epithelial II cells[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41901.

[25] AO N, YANG J, WANG X, et al. Glucagon-like peptide-1 preserves non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of the endoplasmic reticulum stress-associated pathway[J]. Hepatol Res, 2016, 46(4): 343-353.

[26] GUO H L, HASSAN H M, DING P P, et al. Pyrazinamide-induced hepatotoxicity is alleviated by 4-PBA via inhibition of the PERK-eIF2α-ATF4-CHOP pathway[J]. Toxicology, 2017, 13(8): 65-75.

[27] 李军汉, 李恩, 张仲阳, 等. 运动对非酒精性脂肪肝形成中内质网应激PERK/eIF-2α、IRE-1/XBP-1通路的影响[J]. 首都体育学院学报, 2016, 28(5): 459-462.

[28] 杨方万, 穆茂媛, 肖娟娟, 等. 内质网应激诱导细胞凋亡机制的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(10): 176-180.

(责任编辑: 吴凌, 李海霞)