车叶草苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝纤维化的影响及机制Δ

梁　金*，许　丹#，杜进军（武汉市中医医院脾胃肝胆病科，武汉　430010）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）17-2102-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.17.08

摘　要　目的　探究车叶草苷调节鞘氨醇激酶1（SphK1）/1-磷酸鞘氨醇（S1P）信号通路对非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）大鼠肝纤维化的影响及机制。**方法**　以高脂饲料饲养的方法建立大鼠NAFLD模型，将造模成功的大鼠随机分为模型组、车叶草苷低剂量组（14 mg/kg，灌胃，下同）、车叶草苷高剂量组（28 mg/kg）、车叶草苷高剂量（28 mg/kg）+pc-NC（空载质粒，50 μg，尾静脉注射，下同）组、车叶草苷高剂量（28 mg/kg）+pc-SphK1（SphK1过表达质粒，50 μg）组，每组12只。另取12只大鼠以正常饲料饲养作为对照组。各组大鼠灌胃或尾静脉注射相应药物或质粒，灌胃处理每天1次，尾静脉注射处理每周2次，均连续3周。末次给药后，检测各组大鼠血脂指标[总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、游离脂肪酸（FFA）]与肝功能指标[天冬氨酸转氨酶（AST）和丙氨酸转氨酶（ALT）]水平；观察大鼠肝组织病理变化以及肝纤维化情况；检测大鼠血清纤维化相关因子[Ⅲ型前胶原（PCⅢ）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-Col）、层粘连蛋白（LN）]、促纤维化因子[转化生长因子β_1（TGF-β_1）]与促炎因子[白细胞介素1β（IL-1β）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、IL-6]水平；检测大鼠肝组织胶原形成相关蛋白（Ⅰ-Col、Ⅳ-Col）与SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达。**结果**　与对照组比较，模型组大鼠肝组织呈现明显病理损伤症状；NAFLD活动度评分、肝组织胶原容积分数（CVF）和血清中TC、TG、FFA、AST、ALT、PCⅢ、Ⅳ-Col、LN、TGF-β_1、IL-1β、iNOS、IL-6水平以及肝组织中Ⅰ-Col、Ⅳ-Col、SphK1、S1P蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠肝组织病理损伤症状均减轻，上述指标水平均显著降低（$P<0.05$），且高剂量组降低效果更好（$P<0.05$）。与车叶草苷高剂量组和车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠肝组织病理损伤症状加重，上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　车叶草苷可通过抑制SphK1/S1P信号通路活性，降低促纤维化因子、促炎因子以及胶原形成蛋白表达，从而减轻NAFLD大鼠肝纤维化。

关键词　车叶草苷；非酒精性脂肪性肝病；肝纤维化；SphK1/S1P信号通路

Effect and mechanism of asperuloside on liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver rats

LIANG Jin, XU Dan, DU Jinjun (Dept. of Spleen, Stomach and Hepatobiliary Diseases, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430010, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of asperuloside on liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats by regulating the sphingosine kinase 1 (SphK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway. **METHODS** SD rats were fed with a high-fat diet to establish a NAFLD model. They were randomly separated into model group, asperuloside low-dose group (14 mg/kg, i.g., similarly hereinafter), asperuloside high-dose group (28 mg/kg), high dose of asperuloside (28 mg/kg)+pc-NC (empty plasmid, 50 μg, via tail vein, similarly hereinafter) group, and high dose of asperuloside (28 mg/kg)+pc-SphK1 (SphK1 overexpression plasmid, 50 μg) group, with 12 rats in each group. Another 12 rats were fed with a normal diet as control group. Each group was given relevant medicine or plasmid intragastrically once a day or via tail vein twice a week, for 3 consecutive weeks. After the last medication, the levels of blood lipid indexes [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and free fatty acid (FFA)] and liver function indexes [aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT)] were detected in each group. The pathological changes of liver tissue and liver fibrosis in rats were also observed in each group. The levels of serum fibrosis-related factors [procollagen type Ⅲ (PCⅢ), collagen type Ⅳ (Ⅳ-Col), laminin (LN)], pro-fibrotic factor [transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1)], and pro-inflammatory factors [interleukin-1β (IL-1β), inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-6] of rats were determined in each group. The expressions of collagen formation-related proteins (Ⅰ-Col, Ⅳ-Col) and SphK1/S1P pathway-related proteins in the liver tissues of rats were detected in each group. **RESULTS** Compared with control group, the liver tissue of rats in model group showed significant pathological damage; the NAFLD activity score, liver tissue collagen volume fraction, serum levels of TC,

Δ**基金项目**　武汉市医学科研项目（No.WZ20C02）

＊**第一作者**　主治医师，硕士。研究方向：中医内科临床。电话：027-84476811。E-mail：712102382@qq.com

＃**通信作者**　副主任医师，硕士。研究方向：脾胃病和胃肠道疾病。电话：027-84476811。E-mail：49553327@qq.com

TG, FFA, AST, ALT, PCⅢ, Ⅳ-Col, LN, TGF-β1, IL-1β, iNOS and IL-6, and protein expressions of Ⅰ-Col, Ⅳ-Col, SphK1 and S1P in liver tissue were greatly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the liver tissue pathological damage symptoms of rats in asperuloside low-dose and high-dose groups were improved, and the above indexes were all reduced significantly ($P<0.05$); moreover, the high-dose group had a better effect ($P<0.05$). Compared to asperuloside high-dose group, high dose of asperuloside+pc-NC group, the pathological damage of liver tissue symptoms in rats were aggravated in high dose of asperuloside+pc-SphK1 group, and the above indexes were all increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Asperuloside can reduce the expressions of pro-fibrotic factor, pro-inflammatory factors and collagen formation-related proteins by inhibiting the activity of SphK1/S1P signaling pathway, thus alleviating liver fibrosis in NAFLD rats.

KEYWORDS asperuloside; non-alcoholic fatty liver disease; liver fibrosis; SphK1/S1P signaling pathway

非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease，NAFLD）是一类非酒精因素引起的慢性肝病综合征，以脂质代谢异常、肝实质细胞脂肪过多沉积、肝小叶内炎症和纤维化为主要病理特征，若治疗不及时会逐渐发展为脂肪肝炎、肝纤维化、肝硬化，甚至是肝癌，是肝脏相关代谢性疾病死亡率增加的主要原因之一[1-3]。脂质在肝细胞中的大量沉积触发细胞毒性，引发肝脏炎症，并导致肝脏纤维化与严重的功能损伤，是NAFLD发生和发展的主要病理因素，因此改善NAFLD临床症状的关键是抑制肝脏炎症与纤维化[4-5]。

鞘氨醇激酶1（sphingosine kinase 1，SphK1）及其产物1-磷酸鞘氨醇（sphingosine-1-phosphate，S1P）在器官发育、炎症、纤维化等生理病理过程中起到重要调控作用，其异常激活与肝脏疾病的发生关系密切。研究显示，抑制SphK1信号通路激活可抑制脂多糖诱导的肾小球系膜细胞增殖与纤维化[6]；抑制SphK1诱导的内质网应激可阻止肝星状细胞活化，进而减轻乙醇诱导的小鼠肝损伤和纤维化[7]；降低SphK1、S1P的表达可减轻NAFLD大鼠肝组织的脂肪沉积、氧化应激和炎症损伤症状[8]。由此可知，SphK1/S1P信号通路可能是防治NAFLD的潜在作用靶点。

车叶草苷是一种环烯醚萜类化合物，在杜仲科、茜草科等多种药用植物中广泛存在，具有减轻炎症、抑制氧化应激、抗衰老等多种生物学活性，能通过降低促炎因子表达水平来改善毛果芸香碱诱导的癫痫发作症状[9]，还可通过减少脂质积聚和改善线粒体功能而减轻肌肉衰老[10]。Shen等[11]研究显示，车叶草苷可减轻高脂饮食诱导的NAFLD小鼠肝细胞脂质沉积和炎症反应，进而缓解其肝损伤症状，但车叶草苷是否可通过调节SphK1/S1P信号通路来干预NAFLD，目前尚未明确。基于此，本文通过制备NAFLD大鼠模型，并基于SphK1/S1P信号通路探究车叶草苷对其肝纤维化的影响机制，以期为车叶草苷在NAFLD临床治疗中的应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

BA-88A型生化分析仪购自上海聚慕医疗器械有限公司；XSP-2CA型生物光学显微镜购自上海豫光仪器有限公司；LD-4080型病理冷冻切片机购自山东海卓尔光电科技有限公司；165-8033型垂直电泳及蛋白印迹套装购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

车叶草苷标准品（纯度≥95%，货号B24028）购自上海源叶生物科技有限公司；SphK1过表达质粒（pc-SphK1）与空载质粒（pc-NC）购自江苏赛索飞生物科技有限公司；兔源Ⅳ型胶原（collagen type Ⅳ，Ⅳ-Col）一抗、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒、辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白G（IgG）二抗、兔源Ⅰ型胶原（collagen type Ⅰ，Ⅰ-Col）一抗、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）一抗、兔源SphK1一抗、兔源S1P一抗、Masson染色试剂盒以及大鼠透明质酸（hyaluronic acid，HA）、转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）、层粘连蛋白（laminin，LN）、白细胞介素1β（interlenkin-1β，IL-1β）、Ⅲ型前胶原（procollagen type Ⅲ，PCⅢ）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、IL-6、Ⅳ-Col的酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级健康雄性SD大鼠，共75只，体重210～245 g，鼠龄6～7周，购自武汉云克隆动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（鄂）2023-0021。所有大鼠于屏障环境下单笼饲养，相对湿度为50%～60%，温度为23～25 ℃，光照为明12 h/暗12 h。本研究方案已获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会审批（批件号为HLK-202325603）。

2 方法

2.1 NAFLD模型大鼠制备与分组、给药

取63只大鼠参考文献[12]方法以高脂饲料饲养的方法制备NAFLD模型。饲养8周后随机处死3只大鼠以HE染色进行肝组织病理检测，若肝组织呈现出脂肪变性、肝细胞变性坏死、炎症细胞浸润，且内有脂滴分布并发生气球样病变等病理损伤症状时，则表明NAFLD大鼠模型制备成功。将造模成功的60只大鼠随机分为模型组、车叶草苷低剂量组（14 mg/kg，灌胃，剂量参考文献[11]设置）、车叶草苷高剂量组（28 mg/kg，灌胃，剂量参考文献[11]设置）、车叶草苷高剂量+pc-NC组（灌胃车叶草苷28 mg/kg+尾静脉注射pc-NC 50 μg，pc-NC剂量根据质粒说明书设置）、车叶草苷高剂量+pc-SphK1组（灌胃车叶草苷28 mg/kg+尾静脉注射pc-SphK1 50 μg，pc-SphK1剂量根据质粒说明书设置），每组12只；另选12只大鼠作为对照组（以正常饲料饲养8周）。对照组、模型组以生理盐水代替进行灌胃与尾静脉注射，其余各组大鼠灌胃或尾静脉注射相应药物或质粒，灌胃处理每天1次，尾静脉注射处理每周2次，均连续3周。

2.2 大鼠血脂、肝功能指标检测及标本采集

末次给药后24 h，以吸入乙醚的方式麻醉大鼠，断尾取血，离心（4 ℃，10 min，500×g），取部分上层血清（剩余部分置于−20 ℃保存备用）采用全自动生化分析仪检测其中血脂指标[游离脂肪酸（free fat acid，FFA）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglyceride，TG）]和肝功能指标[天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）、丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）]水平。

上述实验结束后，脱颈处死大鼠，开腹取出肝脏，剪下约0.4 g肝组织保存在液氮中备用，自剩余肝组织上剪下约1 cm×1 cm×0.5 cm大小的组织块，在生理盐水中漂洗后以包埋剂包埋，于液氮中迅速冷冻后在冷冻切片机中连续切片，即得4～6 μm的切片备用。

2.3 大鼠肝组织病理变化观察

取“2.2”项下肝组织切片，于室温下静置复温，5 min后放入预冷丙酮中固定；12 min后取出采用HE染色试剂盒行HE染色，具体步骤按试剂盒说明书方法操作。采用显微镜观察肝组织病理形态，选任意视野拍照，分析肝组织病理图像并对NAFLD活动度进行评分[13]，具体评分标准见表1（评分由3个部分评分加和得到，总分为0～8分）。

2.4 大鼠肝纤维化情况观察

取“2.2”项下肝组织切片，按“2.3”项下方法固定，采用Masson染色试剂盒行Masson染色，具体步骤按试剂盒说明书方法操作。采用显微镜观察肝组织中胶原纤维着色情况，选任意视野拍照，以Image J软件分析肝组织病理图像，定量其中呈蓝色的胶原纤维面积（记为S1）与视野切片总面积（记为S2），计算肝组织胶原容积分数（collagen volume fraction，CVF），CVF＝S1/S2×100%。

表1 NAFLD活动度评分标准

评分/分	肝组织脂肪变性比例	肝小叶炎症细胞浸润灶/个	肝细胞气球样变性
0	<5%	0	无
1	5%～33%	<2	少部分
2	>33%～66%	2～4	很多
3	>66%	>4	−

2.5 大鼠血清中纤维化相关因子、促纤维化因子与促炎因子水平检测

取“2.2”项下血清样品，于冰水浴中解冻，取600 μL采用ELISA法检测其中纤维化相关因子（PCⅢ、Ⅳ-Col、LN）、促纤维化因子（TGF-β_1）与促炎因子（IL-1β、iNOS、IL-6）水平，具体步骤按相应试剂盒说明书方法操作。

2.6 大鼠肝组织中胶原形成与SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达检测

取“2.2”项下大鼠肝组织，放入含有适量RIPA裂解液的玻璃匀浆管中，冰水浴中高速研磨后离心（4 ℃，20 min，1 500×g），取上清液；采用BCA法检测上清液中蛋白含量，然后沸水浴中煮沸变性蛋白。配制浓缩胶与分离胶，取变性蛋白样品（25 μg）上样，恒定电压（120 V）下进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后稳定电流（40 mA）下转印至聚偏二氟乙烯膜上；以5%脱脂牛奶封闭，加入Ⅰ-Col、Ⅳ-Col、SphK1、S1P、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶2 000）于4 ℃下孵育12 h；加入相应二抗（稀释比例为1∶1 000）于室温下孵育2 h；以ECL显影后成像，并用Image J软件定量蛋白灰度值，以内参GAPDH蛋白灰度值为基准量化Ⅰ-Col、Ⅳ-Col、SphK1、S1P蛋白表达水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准α＝0.05。

3 结果

3.1 车叶草苷对大鼠血脂和肝功能指标的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中TC、TG、FFA、AST、ALT水平显著升高（P<0.05）。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（P<0.05）。与车叶草苷低剂量组比较，车叶草苷高剂量组大鼠上述指标水平均显著降低（P<0.05）。与车叶草苷高剂量组、车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠血清中上述指标水平均显著升高（P<0.05）。结果见表2。

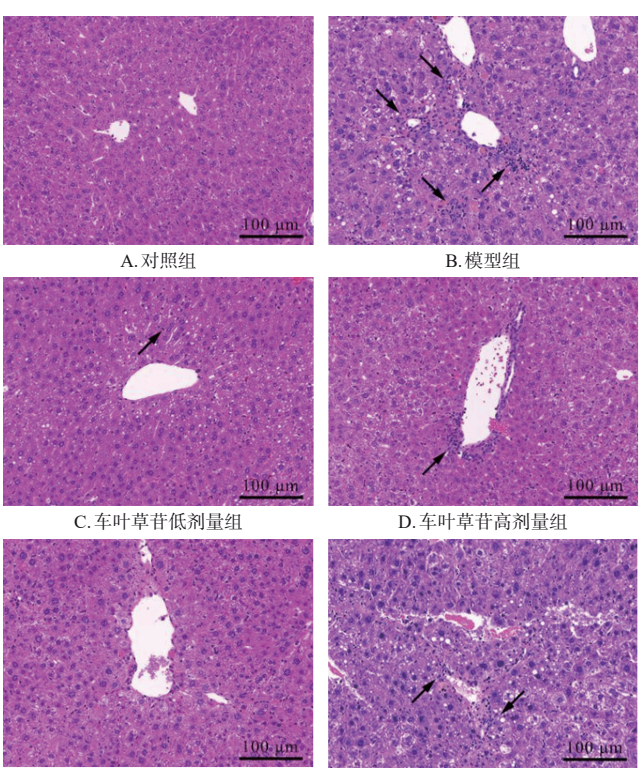
表2　各组大鼠血清中TC、TG、FFA、AST、ALT水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	TC/（mmol/L）	TG/（mmol/L）	FFA/（mmol/L）	AST/（U/L）	ALT/（U/L）
对照组	1.28±0.09	0.87±0.05	0.11±0.02	89.64±17.86	31.42±5.23
模型组	2.76±0.16[a]	2.21±0.13[a]	0.74±0.08[a]	256.73±29.12[a]	84.75±9.64[a]
车叶草苷低剂量组	2.01±0.12[b]	1.52±0.08[b]	0.41±0.06[b]	178.15±23.25[b]	56.94±7.20[b]
车叶草苷高剂量组	1.32±0.10[bc]	0.94±0.06[bc]	0.12±0.03[bc]	97.86±18.34[bc]	35.16±6.15[bc]
车叶草苷高剂量+pc-NC组	1.30±0.08	0.92±0.05	0.13±0.02	96.12±17.63	34.81±5.46
车叶草苷高剂量+pc-SphK1组	2.71±0.15[de]	2.16±0.11[de]	0.70±0.09[de]	245.31±30.51[de]	78.63±8.79[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与车叶草苷低剂量组比较，$P<0.05$；d：与车叶草苷高剂量组比较，$P<0.05$；e：与车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，$P<0.05$。

3.2　车叶草苷对大鼠肝脏病理变化的影响

对照组大鼠肝脏结构完好、形态正常，无病理变化[NAFLD活动度评分为0分]。模型组大鼠肝细胞内产生脂滴，细胞发生变性坏死并呈气球样改变，肝小叶内出现较多炎症细胞浸润[NAFLD活动度评分为（7.08±0.93）分]。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠肝组织病理损伤症状减轻，NAFLD活动度评分[分别为（3.83±0.74）、（0.75±0.61）分]均显著降低（$P<0.05$）。与车叶草苷高剂量组和车叶草苷高剂量+pc-NC组[（0.83±0.58）分]比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠肝组织病理损伤症状加重，NAFLD活动度评分[（6.75±0.90）分]显著升高（$P<0.05$）。结果见图1。



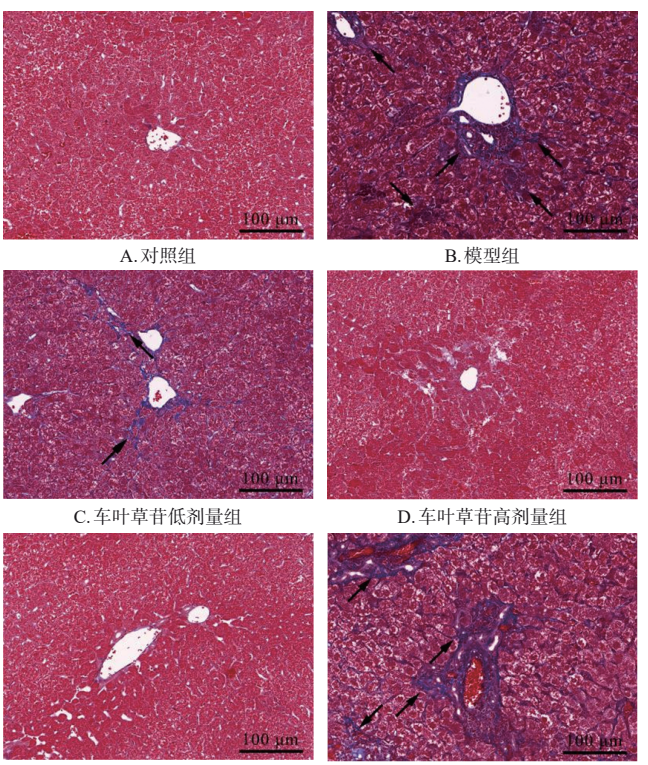
A. 对照组　B. 模型组　C. 车叶草苷低剂量组　D. 车叶草苷高剂量组　E. 车叶草苷高剂量+pc-NC组　F. 车叶草苷高剂量+pc-SphK1组

注：箭头所指为炎症细胞浸润。

图1　各大鼠肝组织病理变化显微图（HE染色）

3.3　车叶草苷对各组大鼠肝纤维化的影响

对照组大鼠肝组织无纤维化病变[CVF为（0.91±0.29）%]。模型组大鼠肝组织内有大量胶原纤维沉积，表现出明显的纤维化病变[CVF为（32.57±2.83）%]。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠肝组织纤维化病变均减轻，CVF均显著降低[分别为（16.04±1.45）%、（2.18±0.72）%，$P<0.05$]。与车叶草苷高剂量组和车叶草苷高剂量+pc-NC组[CVF为（2.52±0.64）%]比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠肝组织纤维化病变加重，CVF显著升高[（29.83±2.68）%，$P<0.05$]。结果见图2。



A. 对照组　B. 模型组　C. 车叶草苷低剂量组　D. 车叶草苷高剂量组　E. 车叶草苷高剂量+pc-NC组　F. 车叶草苷高剂量+pc-SphK1组

注：箭头所指为纤维化病变。

图2　各组大鼠肝组织纤维化情况显微图（Masson染色）

3.4　车叶草苷对大鼠纤维化相关因子、促纤维化因子与促炎因子的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中PCⅢ、Ⅳ-Col、LN、TGF-β_1、IL-1β、iNOS、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。与车叶草苷低剂量组比较，车叶草苷高剂量组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。与车叶草苷高剂量组和车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠血清中上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

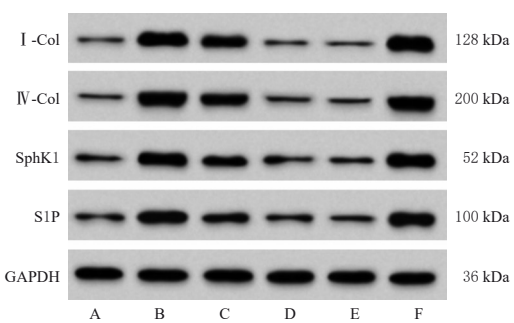
表3　各组大鼠血清中PCⅢ、Ⅳ-Col、LN、TGF-β_1、iNOS、IL-6和IL-1β水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	PCⅢ/（μg/L）	Ⅳ-Col/（μg/L）	LN/（μg/L）	TGF-β_1/（pg/mL）	IL-1β/（pg/mL）	iNOS/（pg/mL）	IL-6/（pg/mL）
对照组	78.36±28.81	37.93±8.51	95.43±16.54	4.83±1.53	52.69±15.73	42.96±10.83	60.12±12.65
模型组	396.42±41.35[a]	156.42±20.13[a]	251.62±30.78[a]	49.57±4.21[a]	387.23±23.02[a]	269.23±18.94[a]	317.35±23.10[a]
车叶草苷低剂量组	243.58±32.72[b]	98.54±13.76[b]	178.57±23.42[b]	28.14±3.15[b]	223.42±18.35[b]	157.42±14.76[b]	184.96±18.23[b]
车叶草苷高剂量组	85.93±27.63[bc]	42.36±7.85[bc]	102.76±15.89[bc]	6.02±1.92[bc]	59.86±14.64[bc]	47.80±9.61[bc]	65.98±12.46[bc]
车叶草苷高剂量+pc-NC组	87.25±20.26	43.15±6.42	101.45±13.60	6.17±1.61	61.01±12.15	46.57±10.11	67.02±11.84
车叶草苷高剂量+pc-SphK1组	382.14±38.54[de]	149.20±18.27[de]	240.31±27.25[de]	46.65±4.02[de]	375.85±21.58[de]	258.97±18.30[de]	305.12±20.59[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与车叶草苷低剂量组比较，$P<0.05$；d：与车叶草苷高剂量组比较，$P<0.05$；e：与车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，$P<0.05$。

3.5　车叶草苷对大鼠肝组织中胶原形成与SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肝组织中Ⅰ-Col、Ⅳ-Col、SphK1、S1P蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠肝组织中上述蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与车叶草苷低剂量组比较，车叶草苷高剂量组大鼠肝组织中上述蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与车叶草苷高剂量组和车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，车叶草苷高剂量+pc-SphK1组大鼠肝组织中上述蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图3、表4。



A：对照组；B：模型组；C：车叶草苷低剂量组；D：车叶草苷高剂量组；E：车叶草苷高剂量+pc-NC组；F：车叶草苷高剂量+pc-SphK1组。

图3　各组大鼠肝组织中胶原形成与SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠肝组织中胶原形成与SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	Ⅰ-Col/GAPDH	Ⅳ-Col/GAPDH	SphK1/GAPDH	S1P/GAPDH
对照组	0.23±0.05	0.19±0.03	0.36±0.06	0.41±0.09
模型组	1.13±0.13[a]	1.06±0.11[a]	1.27±0.15[a]	1.34±0.18[a]
车叶草苷低剂量组	0.68±0.08[b]	0.61±0.06[b]	0.82±0.10[b]	0.89±0.14[b]
车叶草苷高剂量组	0.25±0.06[bc]	0.21±0.04[bc]	0.38±0.07[bc]	0.43±0.11[bc]
车叶草苷高剂量+pc-NC组	0.26±0.05	0.22±0.03	0.37±0.06	0.45±0.10
车叶草苷高剂量+pc-SphK1组	1.10±0.14[de]	1.03±0.10[de]	1.24±0.13[de]	1.31±0.15[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与车叶草苷低剂量组比较，$P<0.05$；d：与车叶草苷高剂量组比较，$P<0.05$；e：与车叶草苷高剂量+pc-NC组比较，$P<0.05$。

4　讨论

现有研究认为，NAFLD的发生和发展与脂质沉积、炎症、纤维化变性等因素密切相关，因此，改善脂质代谢、抑制炎症反应并减轻肝脏纤维化可有效改善NAFLD临床症状[14]。车叶草苷是一种具有明显抗炎作用的环烯醚萜类化合物，可通过抑制炎症而减轻脂多糖诱导的人牙周膜细胞损伤[15]；减轻镉诱导的大鼠心肾细胞凋亡、组织炎症及纤维化[16]；还可改善NAFLD小鼠肝损伤[10]。本研究结果显示，与模型组比较，车叶草苷低、高剂量组大鼠血清中TC、TG、FFA、AST、ALT、PCⅢ、Ⅳ-Col、LN、TGF-β_1、IL-1β、iNOS、IL-6水平以及肝组织中Ⅰ-Col、Ⅳ-Col蛋白表达水平均降低；肝组织病理损伤减轻，NAFLD活动度评分、CVF均降低；且高剂量车叶草苷效果更好。这提示车叶草苷可通过降低纤维化相关因子、促纤维化因子、促炎因子以及胶原形成相关蛋白表达，减轻炎症反应，抑制胶原形成，从而减轻肝组织损伤与纤维化，进而改善大鼠NAFLD。

SphK1/S1P信号通路可通过介导细胞增殖、活化与炎症因子表达等调控组织纤维化过程，刺激其信号激活可促进心肌肥大[17]；特异性敲除SphK1可保护小鼠免于高脂饮食诱导的脂肪变性、炎症或纤维化导致的肝损伤[18]；下调SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达可抑制脂肪沉积、减轻炎症反应，从而改善NAFLD大鼠肝损伤[7]。本研究结果显示，模型组大鼠肝组织中SphK1、S1P蛋白表达水平相比对照组升高，以车叶草苷干预后，可逆转上述蛋白变化趋势。这提示SphK1/S1P信号通路可能参与介导车叶草苷对NAFLD大鼠肝纤维化的抑制作用。为了验证这一推测，本研究在车叶草苷处理的同时，以SphK1过表达质粒进行干预。结果显示，SphK1过表达质粒可减弱车叶草苷对NAFLD大鼠胶原形成与炎症反应的抑制作用，削弱其对NAFLD大鼠肝组织损伤与纤维化的减轻作用，拮抗其对NAFLD大鼠肝功能的改善作用，最终逆转车叶草苷改善NAFLD大鼠相关症状的功效。这表明车叶草苷减轻NAFLD大鼠肝纤维化是通过抑制SphK1/S1P信号通路活性实现的。

综上所述，车叶草苷可通过降低促纤维化因子、促炎因子以及胶原形成蛋白表达，减轻NAFLD大鼠肝纤维化，其作用机制与抑制SphK1/S1P信号通路活性有关。

参考文献

[1] TINCOPA M A, LOOMBA R. Non-invasive diagnosis and monitoring of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(7): 660-670.

[2] HAN S K, BAIK S K, KIM M Y. Non-alcoholic fatty liver disease: definition and subtypes[J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(Suppl.): S5-S16.

[3] RINELLA M E, NEUSCHWANDER-TETRI B A, SIDDIQUI M S, et al. AASLD practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2023, 77(5): 1797-1835.

[4] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(10): 633-646.

[5] TAKESHITA Y, HONDA M, HARADA K, et al. Comparison of tofogliflozin and glimepiride effects on nonalcoholic fatty liver disease in participants with type 2 diabetes: a randomized, 48-week, open-label, active-controlled trial[J]. Diabetes Care, 2022, 45(9): 2064-2075.

[6] FENG F Z, GONG W Y, LI S Y, et al. Inhibitory effect of resveratrol on LPS-induced glomerular mesangial cells proliferation and TGF-β_1 expression via sphingosine kinase 1 pathway[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(6): 500-507.

[7] ZHOU Z S, KONG C F, SUN J R, et al. Fisetin ameliorates alcohol-induced liver injury through regulating SIRT1 and SphK1 pathway[J]. 2022, 50(8): 2171-2184.

[8] ABDELRAHEEM K M, YOUNIS N N, SHAHEEN M A, et al. Raspberry ketone improves non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by modulating sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate and toll-like receptor 4 pathways [J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(7): 985-994.

[9] UCZAY M, PFLÜGER P, PICADA J N, et al. Geniposide and asperuloside alter the COX-2 and GluN2B receptor expression after pilocarpine-induced seizures in mice[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(5): 951-962.

[10] CHEN Q, ZHANG Q J, AMROUCHE A T, et al. Asperuloside, the bioactive compound in the edible *Eucommia ulmoides* male flower, delays muscle aging by daf-16 mediated improvement in mitochondrial dysfunction[J]. Food Funct, 2023, 14(12): 5562-5575.

[11] SHEN Q, CHEN Y E, SHI J X, et al. Asperuloside alleviates lipid accumulation and inflammation in HFD-induced NAFLD via AMPK signaling pathway and NLRP3 inflammasome[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 942: 175504.

[12] 李芳, 陈华伟, 钟军华, 等. 槲皮苷对非酒精性脂肪肝大鼠肝纤维化和炎症作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(12): 1753-1757.
LI F, CHEN H W, ZHONG J H, et al. Effect of quercitrin on liver fibrosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(12): 1753-1757.

[13] 丁静, 张斌, 魏冬梅, 等. 盐酸小檗碱对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏氧化应激水平及Nrf2表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(3): 201-207.
DING J, ZHANG B, WEI D M, et al. Effects of berberine hydrochloride on liver oxidative stress and nuclear Nrf2 expression in rats with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Immunol J, 2020, 36(3): 201-207.

[14] LEE K C, WU P S, LIN H C. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis[J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(1): 77-98.

[15] FAN X D, ZHOU C, HUANG C, et al. Asperuloside ameliorates lipopolysaccharide-induced primary human periodontal ligament cell injury by decreasing TLR4 expression and NF-κB activation[J]. Arch Oral Biol, 2021, 129: 105199.

[16] KONG Z Y, LIU C H, OLATUNJI O J. Asperuloside attenuates cadmium-induced toxicity by inhibiting oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis in rats[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5698.

[17] JOZEFCZUK E, SZCZEPANIAK P, GUZIK T J, et al. Silencing of Sphingosine kinase 1 affects maturation pathways in mouse neonatal cardiomyocytes[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3616.

[18] MONTEFUSCO D, JAMIL M, MACZIS M A, et al. Sphingosine kinase 1 mediates sexual dimorphism in fibrosis in a mouse model of NASH[J]. Mol Metab, 2022, 62: 101523.

（收稿日期：2024-03-18　修回日期：2024-08-01）
（编辑：唐晓莲）