

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0657

文章编号 1671-8852(2026)05-0608-08

松果菊苷通过调节 TGF- β 1/Smad 信号通路 改善代谢相关脂肪性肝病

杨柠溪¹ 闫一鸣¹ 梁传财² 廖 敏¹ 郝亚荣¹

武汉大学人民医院 ¹老年病科, ²急诊科 湖北 武汉 430060

摘要 目的:探究管花肉苁蓉来源的松果菊苷(ECH)对代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)模型小鼠肝损伤的保护作用及分子机制。方法:MAFLD 模型小鼠用 ECH(300 mg·kg⁻¹)灌胃给药,处理 14 周。血糖试纸测空腹血糖,ELISA 法测空腹胰岛素,生化分析仪检测肝功能及脂代谢指标 ALT、AST、TC、TG、HDL-C、LDL-C 的变化;HE 染色观察形态结构,油红 O 染色检测脂质蓄积程度,Masson 染色检测胶原沉积程度;RT-qPCR 检测 I/III 型胶原(Collagen I/III)及炎症因子 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平;Western Blot 检测 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平。结果:ECH 能够显著改善 MAFLD 模型小鼠胰岛素抵抗、肝功能障碍及脂代谢紊乱($P < 0.05$),减轻肝脏脂肪变性、炎症浸润及胶原沉积($P < 0.01$),下调肝组织 TGF- β 1、Collagen I/III、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 与蛋白表达($P < 0.05$),抑制 TGF- β 1/Smad 通路活化。结论:本研究表明 ECH 通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路,显著抑制肝脏炎症反应与纤维化进程,从而有效缓解 MAFLD 模型小鼠的肝脏损伤。

关键词 代谢相关脂肪性肝病;松果菊苷;纤维化;转化生长因子- β 1;胰岛素抵抗

中图分类号 R575

文献标志码 A

Echinacoside ameliorates metabolic-associated fatty liver disease by regulating the TGF- β 1/Smad signaling pathway

YANG Ningxi¹, YAN Yiming¹, LIANG chuancail², LIAO Min¹, HAO Yarong¹

¹Department of Geriatrics, ²Department of Emergency, Renmin Hospital of Wuhan University,
Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the protective effect and molecular mechanism of echinacoside (ECH), derived from Cistanche tubulosa, against liver injury in a mouse model of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD). **Methods:** MAFLD model mice were treated with ECH (300 mg·kg⁻¹) for 14 weeks. Fasting blood glucose was measured using glucose test strips, and fasting insulin was measured by ELISA. Liver function indicators (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) and blood lipid parameters (i. e., total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol) were measured using a biochemical analyzer. The morphological structure, lipid accumulation, and collagen deposition of the liver tissues were discerned by pathological staining. The mRNA expression patterns of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Collagen I/III, and the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α

课题来源:湖北省自然科学基金资助项目(编号:2016CFB673)。

作者简介:杨柠溪,女,2000—,医学硕士生,主要从事代谢综合征相关疾病及器官损伤机制研究,E-mail: cxlgohigher@163.com。

通信作者:郝亚荣,E-mail: hyrtg2023@163.com。

(TNF- α) were examined using real-time polymerase chain reaction. The protein expression profiles of TGF- β 1, phospho-Smad2 (p-Smad2), phospho-Smad3 (p-Smad3), IL-1 β , and TNF- α were obtained by Western Blot. **Results:** ECH improved insulin resistance, liver dysfunction, and lipid metabolism disorders. ECH attenuated the changes in tissue morphology and deposition of lipid and collagen. ECH downregulated the mRNA expression of TGF- β 1, Collagen I, Collagen III, IL-1 β , and TNF- α . Furthermore, ECH downregulated the protein expression of TGF- β 1, p-Smad2, p-Smad3, IL-1 β , and TNF- α . **Conclusion:** This study demonstrates that ECH effectively ameliorates liver injury in MAFLD model mice by suppressing the TGF- β 1/Smad signaling pathway, thereby significantly inhibiting hepatic inflammation and fibrosis progression.

Key Words Metabolic-Associated Fatty Liver Disease; Echinacoside; Fibrosis; Transforming Growth Factor- β 1; Insulin Resistance

代谢相关脂肪肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) 表现为一系列进行性脂肪性肝病, 疾病谱涵盖单纯性脂肪变性、代谢功能障碍相关性脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)、肝纤维化及肝硬化^[1]。现有权威荟萃分析^[2-3]报道, MAFLD 已成为全球最常见的慢性肝病, 累及全球超过 30% 的成年人口。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是该病的主要致病原因之一, 常合并一系列代谢综合征的特征, 包括脂代谢异常 (高甘油三酯血症), 糖代谢紊乱 (如 2 型糖尿病, T2DM), 肥胖 (腰围增加) 以及高血压等^[4]。T2DM 患者中 MAFLD 患病率高达 55.5%, 超普通人群两倍。合并 MAFLD 和 T2DM 的患者肝活检结果显示, 17% 的病例存在进展期肝纤维化^[5]。目前, 缺乏可靠和有效的针对 MAFLD 的疗法, 因此, 探究 MAFLD 的关键发病机制和核心分子, 对靶向药物的开发与研究有重要意义。

MAFLD 的发病机制涉及全身性代谢紊乱与肝脏局部介质的复杂互作^[6], 主要由 IR、脂肪堆积和炎症因子共同促进其发生和发展^[7-9]。其中, 肝纤维化是评估 MAFLD 预后的关键指标^[7], 可预测患者死亡风险及终末期肝病进展^[10]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 活化是肝纤维化的核心事件, 肝脏损伤时, HSCs 从静息态转化为活化态, 大量分泌胶原等细胞外基质蛋白, 并导致其在肝脏中的异常沉积^[11]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 作为驱动 HSCs 活化的关键因子, 通过诱导 Smad2/3 蛋白磷酸化后发生核转位, 进而激活促纤维化基因的转录, 最终推动肝纤维化的进程^[12]。以上研究提示, 靶向 TGF- β 1/Smad 通路是一种干预肝纤维化的潜在治疗策略。

肉苁蓉 (*Cistanche deserticola*, CD) 作为传统中

药, 常用于治疗肾虚证候 (如老年便秘、不孕、阳痿等), 现代药理学研究揭示其具有多种生物活性, 包括抗糖尿病、抗氧化、抗肿瘤增殖、炎症抑制、免疫调节以及肝、神经、心脏多器官组织保护特性^[13]。其中, 松果菊苷 (echinacoside, ECH) 是其核心活性成分之一^[14]。现有研究^[15]证实松果菊苷通过 miR-503-3p/TGF- β 1/Smad 轴抑制肝癌进展, 为靶向 TGF- β 1 通路治疗策略提供了实验依据。在急性肝损伤动物模型中, 松果菊苷被证实通过其抗炎、抗凋亡与抗氧化作用发挥保肝功效^[16-17]。

db/db 小鼠作为 2 型糖尿病模型动物, 因瘦素受体 (leptin receptor) 基因突变导致受体活性降低, 呈现典型代谢紊乱表型, 即高血糖、高胰岛素血症、IR、肥胖伴脂肪肝^[18-19]。该模型高度模拟 MAFLD 患者的血脂异常这一核心病理特征^[20]。基于上述病理共性, 本研究选用 db/db 小鼠构建 MAFLD 动物模型, 通过给予松果菊苷干预, 系统性评价肝功能指标、肝脏组织形态学、肝脂质含量及肝纤维化程度的动态变化, 并进一步探究其下游分子机制。

1 材料与方法

1.1 小鼠模型 实验小鼠 (SPF 级, 雄性) 由常州卡文斯实验动物有限公司提供, 饲养在武汉大学人民医院动物中心, 每笼 5 只。室温保持在 18~24℃, 相对湿度保持在 60%, 光相为 12 h 光照/12 h 黑暗。在实验期间, 允许动物自由获得食物和水, 普通饲料喂养。实验方案经武汉大学人民医院实验动物伦理委员会批准 (批准号: WDRM20190517)。

db 基因为隐性突变基因, db/m 小鼠为杂合子 (db/+), 代谢正常; 而 db/db 小鼠为纯合子 (db/db), 会自发肥胖、IR 和 T2DM。适应性饲养 2 周

后,将db/m小鼠分配到对照组(db/m组, $n=15$)。将db/db小鼠随机分为MAFLD模型组(db/db组, $n=15$)和ECH组(ECH组, $n=15$)。db/m和db/db组每天灌胃给予生理盐水(每10 g体质量0.05 mL),ECH组每天灌胃给予松果菊苷(300 mg·kg⁻¹),持续14周。

1.2 主要试剂和化学品 松果菊苷(97%纯度,融禾医药科技发展有限公司,上海),TGF-β1、IL-1β抗体(Abcam,美国),p-Smad2抗体(CST,美国),p-Smad3抗体(Bioss,北京),TNF-α、Smad2/3抗体(谷歌生物科技有限公司,武汉)、β-actin以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体(ABclonal,武汉)、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,盐城)和TRIzol试剂盒(罗氏,加拿大)。

1.3 样本采集 给药14周后,麻醉后从小鼠眼内眦静脉采血,用葡萄糖试纸测定小鼠空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)水平。心脏灌注后分离肝脏,将部分新鲜组织冷冻切片,并进行油红O染色。部分肝组织用4%多聚甲醛固定并包埋在石蜡中,用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)和Masson的病理染色,其余组织则储存在-80℃的冰箱中用于后续实验验证。

1.4 ELISA及血清生化指标检测 将收集的血液样品室温静置,随后离心分离血清。使用ELISA试剂盒检测空腹胰岛素(fasting insulin,FINS),在

450 nm波长下检测吸光度。胰岛素抵抗的稳态模型评估(homeostatic model assessment of insulin resistance,HOMA-IR)使用以下公式计算:HOMA-IR= $\ln[(\text{FBG} \times \text{FINS})/22.5]$,胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index,ISI)使用以下公式计算:ISI= $\ln[1/(\text{FBG} \times \text{FINS})]$ ^[21]。生化分析仪(ADV-ID2400)检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)。

1.5 组织病理学分析 洗涤固定的肝组织,在梯度乙醇中进行脱水处理,用石蜡浸泡、包埋,随后切片。HE染色、油红O染色和Masson染色按常规操作进行,样品在自动显微镜下拍照(奥林巴斯,日本)。Masson染色检测胶原蛋白的含量,并使用以下公式评估纤维化程度:胶原纤维面积百分比=胶原纤维面积/肝组织总面积×100%。

1.6 实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR) 根据TRIzol试剂盒说明从肝组织中分离总RNA。使用逆转录试剂盒通过PCR扩增合成互补DNA。使用基于SYBR-Green的定量逆转录PCR检测TGF-β1、I型胶原(Collagen I)、Ⅲ型胶原(Collagen Ⅲ)、IL-1β和TNF-α的mRNA水平,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

引物名称	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')	长度/bp
β-actin	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	287
TGF-β1	GCTGAACCAAGGAGACGGAATA	GGCTGATCCCCTTGATTTC	101
Collagen I	AAGAAGCACGTCTGGTTTGGAG	GGTCCATGTAGGCTACGCTGTT	175
Collagen Ⅲ	GTGGCAATGTAAAGAAGTCTCTGAAG	GGGTGCGATATCTATGATGGGTAG	191
IL-1β	AAATACCTGTGGCCTTGGGC	CTTGGGATCCACACTCTCCAG	101
TNF-α	GTCTCAGCCTCTTCTCATTC	CATAGAAGTATGAGAGGGA	128

1.7 蛋白免疫印迹(Western Blot) 用组织研磨机(Verder Scientific,上海)和超声波细胞研磨机(Fisher Scientific,美国)研磨肝组织并匀浆以提取总蛋白。然后,将50 μg蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳,然后转移到固相载体PVDF膜(0.45 μm,Millipore,美国)上。用5%牛血清白蛋白(碧云天,上海)对膜进行封闭,然后分别孵育一抗和二抗。使用化学发光仪(BIO-RAD,美国)以及ECL显影剂对膜进行曝光显色。

1.8 统计学分析 数据采用SPSS 23.0软件进行

处理和统计分析。使用GraphPad Prism 8.0软件进行绘图。采用单因素方差分析进行组间比较,根据方差的同质性选择LSD检验或Dunnett检验。数据表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 松果菊苷有效改善MAFLD模型小鼠高血糖状态及胰岛素抵抗 为评估松果菊苷对糖代谢的影响,本研究采用FBG测定、FINS检测,并对

HOMA-IR、ISI 计算结果进行分析。如图1所示,与对照组(db/m)相比,模型组(db/db)FBG、FINS及HOMA-IR显著升高($P<0.01$),ISI显著降低($P<0.01$);ECH干预组(db/db+ECH)较db/db模

型组 FBG、FINS 及 HOMA-IR 明显下降($P<0.05$),ISI显著提升($P<0.05$)。以上结果表明,松果菊苷可有效改善MAFLD模型小鼠的高血糖状态及胰岛素抵抗。

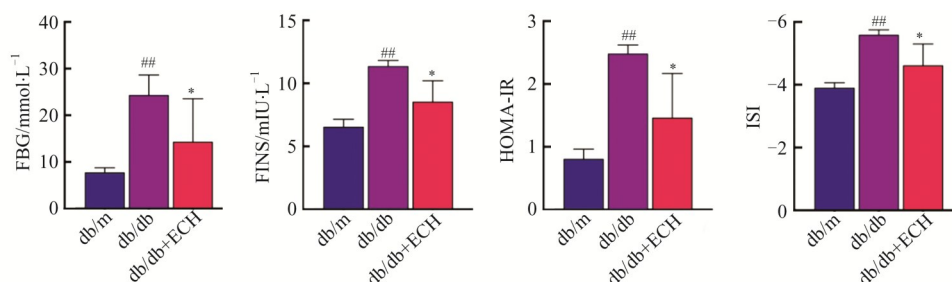


图1 各组小鼠血糖水平与胰岛素敏感性比较

注:FBG为空腹血糖;FINS为空腹胰岛素;HOMA-IR为胰岛素抵抗的稳态模型评估指数;ISI为胰岛素敏感指数。与db/m组相比,^{##} $P<0.01$;与db/db组相比,^{*} $P<0.05$ 。

2.2 松果菊苷有效缓解MAFLD模型小鼠脂代谢紊乱及肝功能损伤 采用全自动生化分析仪测定血清总TC、TG、LDL-C及HDL-C。如图2所示,结果显示,与db/m组相比,db/db组中TC、TG、LDL-C显著升高($P<0.05$),HDL-C显著降低($P<0.01$),提示模型小鼠存在高脂血症及脂代谢紊乱。与db/db组相比,ECH干预组中TC、TG、LDL-C水平显著下降($P<0.05$),同时,HDL-C显著升高($P<0.01$)。当肝细胞受损或坏死时,ALT、AST等转氨酶会释放入血,因此其血清水平是评估肝损伤程度与类型的重要指标^[22]。此外,ALT/AST比值的升高与肝病患者的死亡率增加显著相关,具有重要的预后判断价值^[23]。本研究结果显示,与db/m组小鼠相比,db/db组小鼠血清中ALT和AST水平显著升高($P<0.01$),提示db/db组小鼠肝脏肝功能明显受损;而ECH干预组小鼠血清中ALT、AST水平较db/db模型组显著降低($P<0.01$)。以上结果证明,松果菊苷可有效缓解MAFLD模型小鼠脂代谢紊乱,并能够减轻MAFLD小鼠的肝功能损伤。

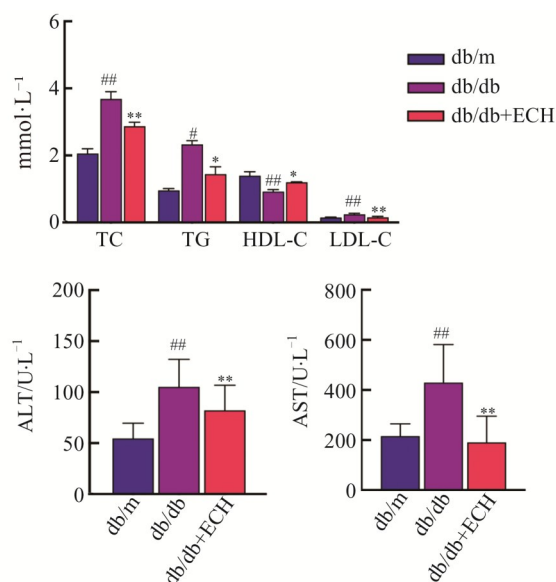


图2 各组小鼠脂代谢与肝功能指标比较

注:血清生化检测结果,TC为总胆固醇,TG为甘油三酯,HDL-C为高密度脂蛋白胆固醇,LDL-C为低密度脂蛋白胆固醇,ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天门冬氨酸氨基转移酶。与db/m组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与db/db组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

2.3 松果菊苷减轻MAFLD模型小鼠肝脏病理损伤和脂质异常蓄积 接着,本研究采用HE染色观察肝组织病理特征的变化,采用油红O染色评估肝细胞内脂滴沉积情况。如图3所示,在db/m组中,HE染色显示肝细胞形态正常,肝小叶结构清晰,窦间隙分明,油红O染色结果仅见少量胞质脂滴。而在db/db组中,HE染色结果呈现广泛的肝细胞变性伴气球样变(细胞体积增大),门管区炎性细胞浸润。油红O染色结果显示,db/db组肝细胞内呈现

大量大小不一的橘红色脂滴,脂滴沉积量明显增加。而在ECH干预组中,与db/db组相比,气球样变性细胞及炎性细胞浸润显著减少,脂滴沉积量明显降低。研究^[23]表明,重度肝脂肪变性是肝病不良预后的重要危险因素,与肝病相关死亡率显著相关。因此,综合以上结果表明,松果菊苷能够有效减轻MAFLD模型小鼠肝脏的组织病理学损伤和脂质异常蓄积。

2.4 松果菊苷干预抑制肝纤维化进程 随后,为

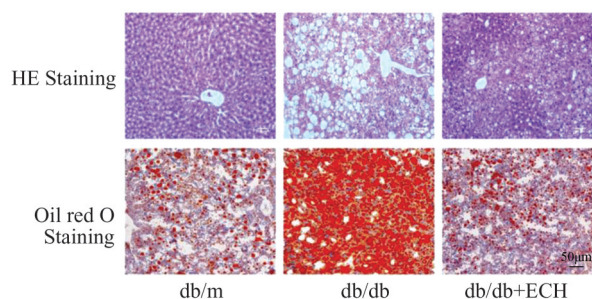
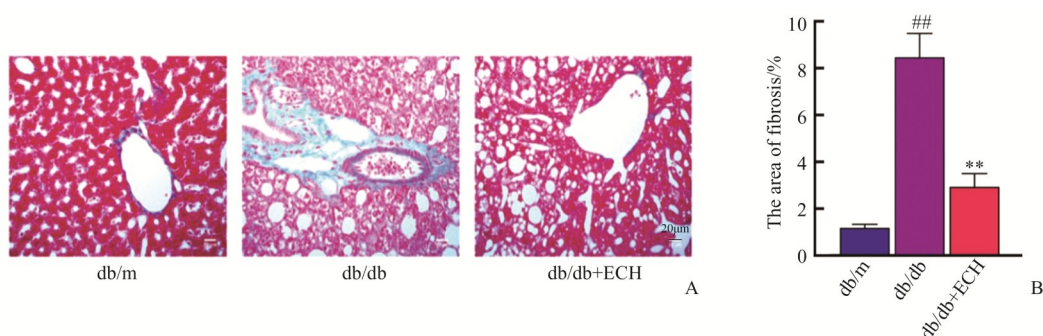


图3 肝脏组织形态与脂质沉积程度比较

注:各组小鼠肝组织HE染色和油红O染色结果。放大倍数为200×,比例尺=50 µm。

了评估 ECH 对肝纤维化的影响,本研究采用 Masson 染色观察胶原蛋白(胶原纤维呈蓝色显色)在肝组织中的分布。结果如图 4A 所示,db/m 组肝小叶结构清晰完整,未见纤维化征象。db/db 组肝小叶正常结构破坏,肝索排列紊乱。此外,在 db/db 组肝组织中也观察到肝细胞变性、炎症细胞浸润伴显著纤维组织增生的现象。而使用 ECH 干预后,损坏的肝小叶结构部分恢复,肝细胞变性和炎症细胞浸润明显减少,统计结果显示胶原组织增生显著减少($P<0.01$),如图 4B 所示。以上结果提示松果菊苷干预能够有效抑制肝纤维化进程。



A. 各组小鼠肝组织 Masson 染色代表性图片; B. 各组纤维化面积统计结果;与 db/m 组相比,^{##} $P<0.01$;与 db/db 组相比,^{**} $P<0.01$ 。放大倍数为 400×,比例尺=20 µm。

图4 Masson 染色检测肝组织中胶原蛋白沉积程度

2.5 松果菊苷显著降低肝组织纤维化及炎症相关基因表达水平 肝脏发生损伤时,坏死的肝细胞释放的 TGF- β 1 可激活 HSCs 向肌成纤维细胞样表型转化,并通过抑制 HSCs 凋亡促进 Collagen I、Collagen III 等基质蛋白过度合成,最终导致细胞外基质沉积,从而破坏肝脏正常结构^[24]。为探究松果菊苷干预肝损伤的分子机制,本研究采用 RT-qPCR 检测肝组织中 TGF- β 1、Collagen I、Collagen III、IL-

1 β 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平。如图 5 所示,与 db/m 组相比,db/db 组中上述基因 mRNA 表达量均显著升高($P<0.01$);而与 db/db 组相比,ECH 干预组较模型组中以上基因表达量均显著降低($P<0.01$)。以上结果表明,松果菊苷可显著降低 MAFLD 模型小鼠肝组织中纤维化相关分子(TGF- β 1、Collagen I、Collagen III)及炎症因子(IL-1 β 、TNF- α)的表达水平。

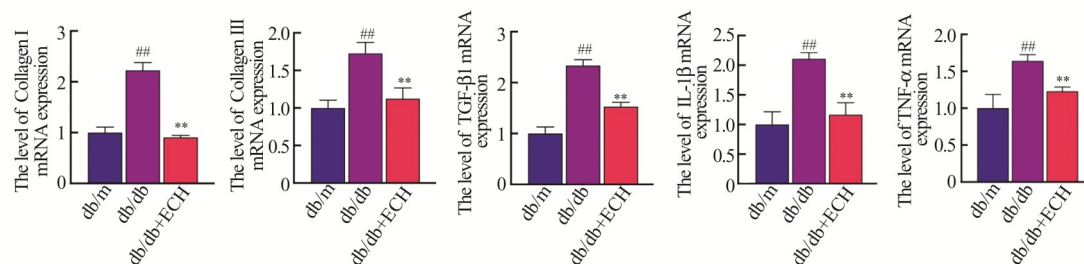


图5 ECH 对肝组织中纤维化和炎症相关基因表达水平的影响

注:各组小鼠肝组织中 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 基因的表达水平检测。与 db/m 相比,^{##} $P<0.01$;与 db/db 组相比,^{**} $P<0.01$ 。

2.6 松果菊苷下调 TGF- β 1/Smad 通路及炎症相关蛋白表达 接着,本研究进一步采用 Western Blot 检测 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、IL-1 β 和

TNF- α 的蛋白表达。实验结果显示(图 6),与 db/m 组相比,db/db 组目标蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。同时,与 db/db 组相比,ECH 干预组中

各目标蛋白表达量均显著下降($P<0.05$)。以上结果表明,松果菊苷通过抑制 TGF- β 1 表达及 Smad2/3 磷酸化,阻断 TGF- β 1/Smad 信号通路激活,并显著降低 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的蛋白表达水平,从而减轻肝脏炎症。

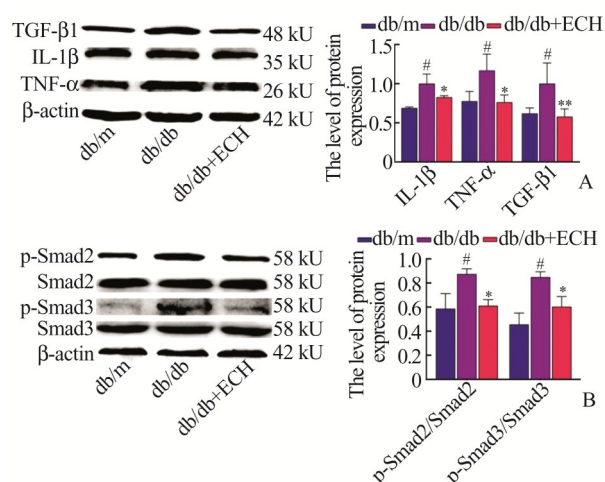


图6 ECH对肝组织 TGF- β 1/Smad 通路及炎症相关蛋白表达的影响

注:各组肝组织中 IL-1 β 、TNF- α 及 TGF- β 1 蛋白表达水平的变化(A);各组肝组织中 p-Smad2、Smad2、p-Smad3、Smad3 蛋白表达水平的变化(B)。与 db/m 组相比, # $P<0.05$;与 db/db 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

MAFLD 是多种慢性肝病的共同病理过程,其主要由 IR、脂代谢紊乱(高 TG 血症、低 HDL-C)、肥胖及 T2DM 等代谢异常驱动。若未及时干预,长期持续的 MAFLD 可触发“脂肪变性-炎症-纤维化”级联反应,显著增加肝纤维化、肝硬化及肝细胞癌的发生风险^[25]。而 T2DM 是 MAFLD 发生与进展的核心危险因素,二者通过 IR 和慢性炎症形成双向促进机制——T2DM 驱动 MAFLD 发展,而 MAFLD 反之加重糖代谢失衡^[26]。鉴于全球肥胖与 T2DM 患病率持续上升,MAFLD 已成为重大公共卫生问题。目前临床尚缺乏安全有效的治疗药物,因此,开发针对 MAFLD 病理核心的靶向疗法是当前研究重点。

松果菊苷是从肉苁蓉的肉质茎中分离的苯乙醇苷类化合物(Phenylethanoid glycoside, PhGs),具有保肝、神经保护、抗炎、抗糖尿病、抗氧化及抗肿瘤等多种药理活性^[27-29]。在急性肝损伤动物模型中,松果菊苷的保肝作用已被证实与其抗炎、抗凋亡及抗氧化效应相关^[16-17]。本研究旨在探究松果菊

苷是否对 MAFLD 模型小鼠同样具有肝保护作用及其潜在机制。

胰岛素抵抗与 MAFLD 的发病机制密切相关,且驱动疾病从单纯脂肪变性进展至非酒精性脂肪性肝炎^[30]。此外,脂肪组织 IR 是决定 MAFLD 患者肝纤维化存在及程度的关键代谢因素^[6]。因此,调控 IR 可能是 MAFLD 的潜在干预策略。早期 MAFLD 发病遵循“二次打击”理论:IR 与肝脏脂质堆积构成“第一次打击”,炎症因子释放和氧化应激形成“第二次打击”^[26]。目前学界广泛接受“多重打击”模型,涵盖脂质蓄积、IR、炎症通路、肠-肝轴、饮食及遗传因素,但肥胖及 IR 触发的肝脏脂质堆积仍是核心的“第一次打击”^[31]。在 MAFLD 中,由于脂肪酸转运蛋白及脂肪酸转位酶等表达增加,甘油三酯优先分布至肝脏而非脂肪组织^[30]。肝脏过度脂质堆积促进巨噬细胞活化,进而加剧 IR、肝脏炎症及纤维化^[8]。本研究发现,松果菊苷给药可减轻 MAFLD 模型小鼠的 IR 及血脂异常,从一定程度上削弱了“第一次打击”阶段。

作为肝脏定居巨噬细胞的库普弗细胞(Kupffer cells),可被肝损伤诱导的肝细胞凋亡与坏死激活。该激活过程触发核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的级联活化,进而启动促炎因子转录。随后,在 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子刺激下,HSCs 从静息状态转化为具有分泌功能的激活状态,进而大量释放促纤维化因子(如 TGF- β 1、PDGF)及促增殖因子。上述病理过程为肝纤维化及肝细胞癌的发生奠定了基础^[9]。在 MAFLD 的发病机制中,多种炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 β)通过介导肝脏炎症及肝细胞损伤参与其中^[8]。既往研究^[32]表明,松果菊苷可抑制脂多糖诱导的 IEC-6 细胞中 IL-6 及 TNF- α 的表达。在缺血/再灌注诱导的视网膜损伤模型中,松果菊苷亦能显著下调 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 水平^[33]。此外,松果菊苷通过抑制小胶质细胞介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症信号通路发挥抗炎效应^[34]。本研究通过检测 IL-1 β 与 TNF- α 水平评估肝脏炎症状态,证实 MAFLD 模型小鼠存在严重的肝脏炎症,而松果菊苷干预可有效降低这些促炎细胞因子的表达。上述结果表明,松果菊苷干预可减轻 db/db 小鼠的肝脏炎症反应。

在慢性肝脏炎症的损伤修复过程中,纤维化扮演着关键角色。一项回顾性队列研究^[10]证实,在 MAFLD 患者中,纤维化分期(而非脂肪性肝炎本身)是预测远期死亡率和肝脏特异性并发症的最强

指标。值得注意的是,早期阶段的肝纤维化具有可逆性。胶原蛋白水平,尤其是 I 型和 III 型胶原的异常积聚,是评估 MAFLD 肝纤维化状况的核心指标,它们显著改变了受损肝脏的组织力学特性^[8]。肝损伤发生后,作为纤维化核心效应细胞的 HSCs 被激活并转化为肌成纤维细胞。这一转化过程促使 I 型和 III 型胶原的合成增加,同时抑制基质金属蛋白酶的降解活性,从而导致细胞外基质过度沉积,最终驱动肝纤维化的发展^[35]。因此,有效干预肝纤维化进程对于遏制 MAFLD 疾病进展至关重要。

TGF- β 1 是驱动肝星状细胞活化的关键因子,通过 Smad 信号通路参与多器官纤维化进程。在哺乳动物中, TGF- β 1 激活 ALK5 受体后磷酸化 Smad2/3,使其与 Smad4 形成复合物,转位至细胞核内调控靶基因转录(如胶原合成相关基因),最终促进纤维化病变^[22]。研究^[36]显示,黄芪甲苷等成分可通过阻断 TGF- β 1/Smad 通路减轻肝纤维化。本研究发现,松果菊苷能够显著抑制 db/db 小鼠肝脏中 TGF- β 1 表达及 p-Smad2/3 活化,并降低 I 型和 III 型胶原水平,提示其与既往报道具有类似的抗纤维化机制^[37],且目前尚未见明显不良反应报道^[38]。

本研究进一步证实松果菊苷可改善糖尿病相关肝损伤,对 MAFLD 具有治疗潜力。在 db/db 小鼠模型中,松果菊苷通过下调 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子减轻肝脏炎症,同时改善糖脂代谢紊乱和肝功能指标,抑制脂肪变性及胶原沉积。Western Blot 和 RT-qPCR 数据一致显示,松果菊苷可同步降低肝组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3、TNF- α 、IL-1 β 及 I / III 型胶原的表达($P < 0.05$)。其作用机制涉及抑制 TGF- β 1 表达、降低 Smad2/3 磷酸化、阻断 p-Smad2/3/Smad4 核转位、减少胶原基因转录,并改善炎症微环境,协同延缓肝纤维化进展(图 7)。

综上所述,松果菊苷可能通过抑制 TNF- α /IL-1 β 、调节 TGF- β 1 抑制下游 smad2/3 磷酸化,缓解炎症及肝纤维化进展,改善机体糖脂代谢,发挥抗 MAFLD 作用。鉴于其显著改善肝纤维化核心病理的效能,结合天然产物的安全性优势,松果菊苷有望成为治疗 MAFLD 的候选药物,尤其适用于合并 T2DM 的脂肪肝患者。后续研究应进一步阐明松果菊苷在肝细胞与 HSCs 中的特异性分布规律、肠道菌群对其生物利用度的影响以及长期用药的毒理学特性等研究缺口。

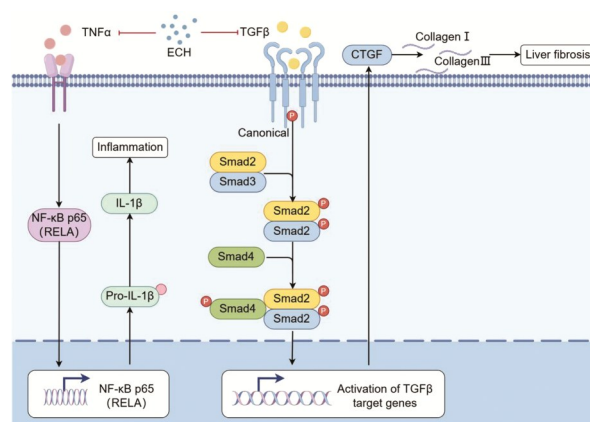


图7 ECH靶向调控 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制肝纤维化

注: ECH 不仅可以通过抑制 TNF- α /IL-1 β 介导的炎症反应,减轻微环境刺激,还可以通过阻断 TGF- β 1/Smad 通路,直接抑制纤维化进程。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] HUANG T, BEHARY J, ZEKRY A. Non-alcoholic fatty liver disease: A review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management[J]. Intern Med J, 2020, 50(9): 1038-1047.
- [2] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
- [3] WONG R J, AGUILAR M, CHEUNG R, et al. Non-alcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States[J]. Gastroenterology, 2015, 148(3): 547-555.
- [4] MAHADY S E, ADAMS L A. Burden of non-alcoholic fatty liver disease in Australia[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(Suppl 1): 1-11.
- [5] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. J Hepatol, 2019, 71(4): 793-801.
- [6] ROSSO C, KAZANKOV K, YOUNES R, et al. Crosstalk between adipose tissue insulin resistance and liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2019, 71(5): 1012-1021.
- [7] ALLER R, SIGÜENZA R, PINA M, et al. Insulin resistance is related with liver fibrosis in type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease proven bi-

- opsy and Mediterranean diet pattern as a protective factor[J]. *Endocrine*, 2020, 68(3): 557-563.
- [8] CHEN H J, LIU J. Actein ameliorates hepatic steatosis and fibrosis in high fat diet-induced NAFLD by regulation of insulin and leptin resistant[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1386-1396.
- [9] ELSHARKAWY A M, MANN D A. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. *Hepatology*, 2007, 46(2): 590-597.
- [10] HAGSTRÖM H, NASR P, EKSTEDT M, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(6): 1265-1273.
- [11] ZHANG J H, LI Y P, LIU Q H, et al. Sirt6 alleviated liver fibrosis by deacetylating conserved lysine 54 on Smad2 in hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2021, 73(3): 1140-1157.
- [12] YUAN X X, GONG Z Q, WANG B Y, et al. Astragaloside inhibits hepatic fibrosis by modulation of TGF- β 1/smud signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 3231647.
- [13] FU Z F, FAN X, WANG X Y, et al. Cistanche Herba: An overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 233-247.
- [14] LU C W, HUANG S K, LIN T Y, et al. Echinacoside, an active constituent of *Herba Cistanche*, suppresses epileptiform activity in hippocampal CA3 pyramidal neurons[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(3): 249-255.
- [15] LI W, ZHOU J, ZHANG Y J, et al. Echinacoside exerts anti-tumor activity via the miR-503-3p/TGF- β 1/Smad axis in liver cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 304.
- [16] LI X H, GOU C Y, YANG H S, et al. Echinacoside ameliorates *D*-galactosamine plus lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis and inflammation[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(8): 993-1000.
- [17] WU Y, LI L, WEN T, et al. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Toxicology*, 2007, 232(1/2): 50-56.
- [18] ZAR KALAI F, HAN J, KSOURI R, et al. Oral administration of *Nitraria retusa* ethanolic extract enhances hepatic lipid metabolism in *db/db* mice model 'BKS. Cg-Dock^{7m}+/+ Lepr^{db/J}' through the modulation of lipogenesis-lipolysis balance[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72: 247-256.
- [19] SANTHEKADUR P K, KUMAR D P, SANYAL A J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 230-237.
- [20] CIOBOATĂ R, GĂMAN A, TRĂȘCĂ D, et al. Pharmacological management of non-alcoholic fatty liver disease: Atorvastatin versus pentoxifylline[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2375-2381.
- [21] PAN L L, LI Z Z, WANG Y F, et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112842.
- [22] LIU F, ZHANG J, QIAN J M, et al. Emodin alleviates CCl₄-induced liver fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition and transforming growth factor- β 1 in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3262-3270.
- [23] UNALP-ARIDA A, RUHL C E. Noninvasive fatty liver markers predict liver disease mortality in the U. S. population[J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1170-1183.
- [24] XU F Y, LIU C W, ZHOU D D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.
- [25] KATSIKI N, MIKHAILIDIS D P, MANTZOROS C S. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update[J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1109-1123.
- [26] CHEN Z Q, LIU F, ZHENG N X, et al. Wuzhi capsule (*Schisandra Sphenanthera* Extract) attenuates liver steatosis and inflammation during non-alcoholic fatty liver disease development[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 285-293.
- [27] WEI X Y, HOU W X, LIANG J J, et al. Network pharmacology-based analysis on the potential biological mechanisms of sinisan against non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 693701.
- [28] LIANG Y, CHEN C, XIA B M, et al. Neuroprotective effect of echinacoside in subacute mouse model of Parkinson's disease[J]. *BioMed Res Int*, 2019, 2019(1): 4379639.
- [29] MORIKAWA T, NINOMIYA K, IMAMURA M, et al. Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice[J]. *J Nat Med*, 2014, 68(3): 561-566.
- [30] KHAN R S, BRIL F, CUSI K, et al. Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 711-724.
- [31] FANG Y L, CHEN H, WANG C L, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model"[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(27): 2974-2983.