

芬戈莫德对 2 型糖尿病小鼠肝纤维化的改善作用及其机制

李 舒^{1,2}, 郭迦期³, 李宛淞⁴, 甄艳凤², 翟红佳⁴, 李 捷⁴, 房 辉²

(1. 华北理工大学临床医学院内科教研室, 河北 唐山 063000; 2. 河北省唐山市工人医院内分泌科, 河北 唐山 063000; 3. 广东省深圳市龙华区中心医院重症医学科, 广东 深圳 518000; 4. 河北医科大学临床医学院内科教研室, 河北 石家庄 050000)

[摘 要] **目的:** 探讨芬戈莫德对 2 型糖尿病 (T2DM) 小鼠肝纤维化的改善作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 60 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、对照+芬戈莫德组、模型组和模型+芬戈莫德组, 每组 15 只。采用高脂饲料联合低剂量链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射诱导 T2DM 模型。模型建立后, 模型+芬戈莫德组和对照+芬戈莫德组小鼠每日腹腔注射芬戈莫德 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 干预 8 周。检测各组小鼠肝脏系数和空腹血糖 (FBG) 水平。采用试剂盒检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性及甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, HE 染色观察各组小鼠肝组织病理形态表现, Masson 染色观察各组小鼠肝纤维化形态表现, 油红 O 染色检查各组小鼠肝组织脂质沉积情况, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组小鼠肝组织中 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和 Janus 激酶 (JAK) /信号转导与转录激活因子 (STAT) 通路相关分子 *JAK1*、*JAK2*、*STAT1*、*STAT3*、干扰素 γ (*IFN- γ*) 和白细胞介素 6 (*IL-6*) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组小鼠肝组织中 α -SMA、*IFN- γ* 、*IL-6*、*STAT1*、磷酸化 *STAT1* (p-*STAT1*)、*STAT3*、磷酸化 *STAT3* (p-*STAT3*)、*JAK1*、磷酸化 *JAK1* (p-*JAK1*)、*JAK2* 及磷酸化 *JAK2* (p-*JAK2*) 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏系数和 FBG 水平明显升高 ($P < 0.001$); 肝细胞肿胀、肝血窦变窄, 肝组织内出现大量脂滴和明显胶原积累, 肝组织 CVF 和脂滴面积占比明显升高 ($P < 0.001$); 血清中 ALT 和 AST 活性及 TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高 ($P < 0.001$), HDL-C 水平明显降低 ($P < 0.001$); 肝组织中 *IL-6* 和 α -SMA mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), *IFN- γ* mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$), p-*STAT3*/*STAT3*、p-*JAK1*/*JAK1* 和 p-*JAK2*/*JAK2* 比值明显升高 ($P < 0.001$), p-*STAT1*/*STAT1* 比值明显降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝脏系数和 FBG 水平明显降低 ($P < 0.01$); 肝细胞脂肪变性减轻, 脂滴减少, 纤维化程度减轻, 肝组织 CVF 和脂滴面积占比明显降低 ($P < 0.001$); 血清中 ALT 和 AST 活性及 TC、TG 和 LDL-C 水平明显降低 ($P < 0.001$), HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.001$); 肝组织中 *IL-6* 和 α -SMA mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$), *IFN- γ* mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), p-*STAT3*/*STAT3*、p-*JAK1*/*JAK1* 和 p-*JAK2*/*JAK2* 比值明显降低 ($P < 0.001$), p-*STAT1*/*STAT1* 比值明显升高 ($P < 0.001$)。**结论:** 芬戈莫德可改善 T2DM 小鼠糖脂代谢紊乱、肝功能损伤和肝组织内脂质沉积, 减轻肝纤维化, 其作用机制可能与上调 *IFN- γ* 和 p-*STAT1* 表达及下调 *IL-6* 和 p-*STAT3* 表达有关。

[关键词] 芬戈莫德; 2 型糖尿病; 代谢相关脂肪性肝病; 肝纤维化; 代谢紊乱

[收稿日期] 2025-05-14

[录用日期] 2025-07-06

[基金项目] 河北省卫健委医学科学研究课题计划项目 (20241681, 20250216); 河北省唐山市科技局自然科学基金资助项目 (H2024105016)

[作者简介] 李 舒 (1996—), 女, 河北省唐山市人, 在读硕士研究生, 主要从事糖尿病认知功能障碍方面的研究。

[通信作者] 房 辉, 主任医师, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: fanghui2818@126.com)

[中图分类号] R587.2; R575.2 [文献标志码] A

Improvement effect of fingolimod on hepatic fibrosis in type 2 diabetes mellitus mice and its mechanism

LI Shu^{1,2}, GUO Jiaqi³, LI Wansong⁴, ZHEN Yanfeng², ZHAI Hongjia⁴, LI Jie⁴, FANG Hui²

(1. Department of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Department of Endocrinology, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, China; 3. Department of Critical Care Medicine, Central Hospital, Longhua District, Guangdong Province, Shenzhen 518000, China; 4. Department of Internal Medicine, School of Clinical Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the improvement effect of fingolimod on liver fibrosis in the mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM), and to clarify its mechanism. **Methods:** Sixty male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, control+fingolimod group, model group, and model+fingolimod group, with 15 mice in each group. The T2DM model was induced by high-fat diet combined with low dose of streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection. After the model was established, the mice in model+fingolimod group and control+fingolimod group were given daily intraperitoneal injection of fingolimod ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 8 weeks. The liver coefficients and fasting blood glucose (FBG) levels of the mice in various groups were detected. The kits were used to detect the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and the levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum of the mice in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of liver tissue of the mice in various groups; Masson staining was used to observe the morphology of liver fibrosis of the mice in various groups; Oil red O staining was used to detect the lipid deposition in liver tissue of the mice in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR(RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway-related molecules *JAK1*, *JAK2*, *STAT1*, *STAT3*, interferon- γ (*IFN- γ*), and interleukin-6 (*IL-6*) mRNA in liver tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of α -SMA, *IFN- γ* , *IL-6*, *STAT1*, phosphorylated *STAT1* (p-*STAT1*), *STAT3*, phosphorylated *STAT3* (p-*STAT3*), *JAK1*, phosphorylated *JAK1* (p-*JAK1*), *JAK2* and phosphorylated *JAK2* (p-*JAK2*) proteins in liver tissue of the mice in various groups. **Results:** Compared with control group, the liver coefficient and FBG level of the mice in model group were significantly increased ($P < 0.001$); the hepatocytes were swollen, the hepatic sinusoids were narrowed, a large number of lipid droplets and obvious collagen accumulation in liver tissue were observed, and the CVF and lipid droplet area proportion of liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$); the activities of ALT and AST and the levels of TC, TG, and LDL-C in serum were significantly increased ($P < 0.001$), while the level of HDL-C was significantly decreased ($P < 0.001$); the expression levels of *IL-6* and α -SMA mRNA and protein in liver tissue were significantly increased ($P < 0.001$), the expression levels of *IFN- γ* mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.001$), the ratios of p-*STAT3*/*STAT3*, p-*JAK1*/*JAK1*, and p-*JAK2*/*JAK2* were significantly increased ($P < 0.001$), and the ratio of p-*STAT1*/*STAT1* was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with model group, the liver coefficient and FBG level of the mice in model+fingolimod group were significantly decreased ($P < 0.01$); the hepatocyte steatosis, lipid droplets, and fibrosis degree were alleviated, and the CVF and lipid droplet

area proportion of liver tissue were significantly decreased ($P < 0.001$); the activities of ALT and AST and the levels of TC, TG, and LDL-C in serum were significantly decreased ($P < 0.001$), while the level of HDL-C was significantly increased ($P < 0.001$); the expression levels of *IL-6* and α -SMA mRNA and protein in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.001$), the expression levels of *IFN- γ* mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.001$), the ratios of p-STAT3/STAT3, p-JAK1/JAK1, and p-JAK2/JAK2 were significantly decreased ($P < 0.001$), and the ratio of p-STAT1/STAT1 was significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion:** Fingolimod can improve glucose and lipid metabolism disorders, liver function injury, and lipid deposition in liver tissue of T2DM mice, and alleviate liver fibrosis. Its mechanism may be related to up-regulating the expressions of *IFN- γ* and p-STAT1 and down-regulating the expressions of *IL-6* and p-STAT3.

KEYWORDS Fingolimod; Type 2 diabetes mellitus; Metabolism-associated fatty liver disease; Liver fibrosis; Metabolic disorder

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是以胰岛素分泌缺陷和作用受损为特征的慢性高血糖疾病,常伴随全身代谢紊乱。代谢相关脂肪性肝病(metabolism-associated fatty liver disease, MAFLD)是一种与代谢紊乱密切相关的慢性肝病,其主要特征是肝脏脂肪异常堆积,且非由酒精摄入或其他已知肝病所致^[1]。流行病学研究^[2]显示:T2DM是导致MAFLD发生和进展的关键危险因素之一;在T2DM患者中,MAFLD发病率高达55.48%,约为普通人群的2倍。同时,MAFLD与肝纤维化关系密切。肝纤维化的全球患病率高,可进展为肝硬化、肝癌和肝衰竭,带来沉重的公共卫生负担^[3]。MAFLD发病机制错综复杂,当肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)被激活后,肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度且持续沉积可导致肝纤维化发生^[4]。ECM组成成分主要包含 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原蛋白和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)等^[5],上述成分均可作为肝纤维化的生物标志物。

γ 干扰素(interferon-gamma, *IFN- γ*)/Janus激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导与转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)信号通路具有抗氧化和抗炎作用,可通过抑制HSC活化、调节炎症反应、抑制ECM的合成及促进抗纤维化基因表达等机制,发挥抗肝纤维化的作用^[6]。相反,白细胞介素6(interleukin-6, *IL-6*)/JAK/信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路是肝脏炎症和纤维化发生的促进因素,该通路通过激活HSC和促进ECM合成等作

用,可加速肝纤维化的发生和进展^[7]。因此,靶向干预*IFN- γ* /JAK/STAT1与*IL-6*/JAK/STAT3信号通路的相关药物,有望为T2DM并发肝纤维化患者的临床治疗开辟全新路径,成为全新的治疗策略。

芬戈莫德是一种已知的鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)受体激动剂,具有明显抗炎作用^[8]。研究^[9]表明:芬戈莫德可通过调节脂质代谢,预防自身免疫性糖尿病和非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)。研究^[10]显示:芬戈莫德可通过激活Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)信号通路,减轻糖尿病肝脏的氧化应激和炎症,调节葡萄糖代谢,从而对糖尿病小鼠的肝脏有保护作用。尽管芬戈莫德在抗纤维化方面具有潜在作用,但其作用机制尚未完全明确,尤其是能否通过调节*IFN- γ* /JAK/STAT1和*IL-6*/JAK/STAT3信号通路发挥肝脏保护作用,目前尚未见报道。本研究探讨芬戈莫德对小鼠T2DM伴肝纤维化的作用及其潜在机制,以期为T2DM伴肝纤维化的临床治疗提供科学依据和潜在治疗途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 8周龄SPF级雄性、体质量16~20 g的C57BL/6J小鼠共60只,购于北京斯贝福生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,饲养于河北省唐山市糖尿病与代谢病重点实验室。芬戈莫德和链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Cayman Chemical公司。天冬氨酸氨基转移酶(aspartate

transaminase, AST) 试剂盒、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒、甘油三酯 (triglycerides, TG) 试剂盒、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 抗 STAT1、抗 JAK1、抗 IL-6 和抗 IFN- γ 抗体均购自江苏亲科生物研究中心有限公司, 抗磷酸化 JAK1 (phosphorylated JAK1, p-JAK1)、抗磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 和抗磷酸化 JAK2 (phosphorylated JAK2, p-JAK2) 抗体购自艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司, 抗 STAT3 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 抗 α -SMA 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 抗 JAK2、抗磷酸化 STAT1 (phosphorylated STAT1, p-STAT1)、抗 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗购自成都正能生物技术有限责任公司, 超纯总 RNA 提取试剂盒购自杭州新景生物试剂开发有限公司, FastKing cDNA 第一链合成试剂盒和 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂购自北京天根生化科技有限公司。全景切片扫描仪 (3DHISTECH 型) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司, 全波长酶标仪 (Multiskan Fc 型) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (7500 型) 购自河北正皓医疗器械有限公司, 化学发光凝胶成像系统 (MiniChem 610 Plus 型) 购自北京赛智创业科技有限公司。

1.2 实验动物分组和 T2DM 模型制备 将小鼠置于 12 h/12 h 的明暗循环环境中, 温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ ~24 $^{\circ}\text{C}$, 饲养期间可自由摄食饮水。适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为 4 组, 即对照组、对照+芬戈莫德组 (1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、模型组和模型+芬戈莫德组 (1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组 15 只。对照组和对照+芬戈莫德组小鼠接受正常饮食喂养 16 周, 模型组和模型+芬戈莫德组小鼠在整个实验期间接受高脂饲料 (high-fat diet, HDF) 喂养。实验第 6 周起, 模型组和模型+芬戈莫德组小鼠连续 5 d 腹腔注射溶解于 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 中的 STZ (35 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 对照组和对照+芬戈莫德组小鼠注射等体积的柠檬酸缓冲液^[11]。自 STZ 注射开始,

每 2 周测量各组小鼠体质量和空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平。末次注射 STZ 后第 9 天, 取各组小鼠尾尖静脉采血测定 FBG 水平, 以 $\text{FBG}\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为标准判定 T2DM 模型构建成功。将芬戈莫德溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 对照+芬戈莫德组和模型+芬戈莫德组小鼠每天腹腔注射 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 芬戈莫德溶液, 对照组和模型组小鼠注射等体积 DMSO, 持续 8 周^[12-14]。干预结束后, 各组小鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (3 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉后, 采血、分离血清, 处死后留取肝组织样本, 称量肝脏质量。测定各组小鼠 FBG 水平, 并计算肝脏系数。肝脏系数=肝脏质量/体质量 $\times 100\%$ 。本实验通过华北理工大学动物伦理委员会审批 (批准号: SQ2024018)。

1.3 采用试剂盒检测各组小鼠血清中肝功能指标和血脂水平 采用微板法分析试剂盒, 取各组小鼠血清, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测各组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性以及 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 水平。

1.4 HE 染色观察各组小鼠肝组织病理形态表现 取各组小鼠肝组织, 经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋后制成切片。切片依次进行水化、苏木素染色、分化、返蓝和伊红染色, 脱水后以中性树胶封片。于光学显微镜下观察各组小鼠肝组织病理形态表现, 采用全景切片扫描仪进行图像采集, 使用 CaseViewer 2.4 软件进行图像分析。

1.5 Masson 染色观察各组小鼠肝纤维化形态表现 取各组小鼠肝组织石蜡切片, 经脱蜡、水化后, 依次放入 Masson A 液、Masson B 液和 Masson C 液浸染, 分化后再依次放入 Masson D 液、Masson E 液和 Masson F 液浸染, 醋酸漂洗后脱水, 以中性树胶封片。于光学显微镜下观察各组小鼠肝纤维化形态表现, 采用全景切片扫描仪进行图像采集, 使用 CaseViewer (v 2.4) 和 Image J 软件进行图像分析, 计算肝脏胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF)。CVF=胶原纤维面积/组织总面积 $\times 100\%$ 。

1.6 油红 O 染色检查各组小鼠肝组织脂质沉积情况 制备油红 O 工作液。将各组小鼠肝脏冰冻切片复温后, 以组织固定液固定, 浸入油红 O 工作液浸染, 经异丙醇分化、苏木素染色、分化液分化和返蓝后, 以甘油明胶封片剂封片。于光学显微镜下

观察各组小鼠肝组织内脂质沉积情况，采用全景切片扫描仪进行图像采集，使用CaseViewer（v 2.4）和Image J软件进行图像分析，计算脂滴面积占比。脂滴面积占比=红色脂滴面积/组织总面积×100%。

1.7 RT-qPCR法检测各组小鼠肝组织中JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、IFN-γ、IL-6和α-SMA mRNA表达水平 采用离心柱纯化法提取小鼠肝组织总RNA，采用核酸分析仪测定其浓度。使用

FastKing cDNA 第一链合成试剂盒将RNA反转录至cDNA。使用荧光定量预混试剂盒进行RT-qPCR检测。引物序列由安徽通用生物股份有限公司合成。反应条件：95℃预变性15 min、95℃变性10 s、60℃退火延伸32 s，共40个循环。记录各组基因扩增的Ct值。以β-actin作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组小鼠肝组织中JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、IFN-γ、IL-6和α-SMA mRNA表达水平。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Forward sequence(5'-3')	Reverse sequence(5'-3')
β-actin	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GCCGGACTCATCGTACTCC
JAK1	AGTGCAGTATCTCTCTCTCTG	GATTCGGTTCGGAGCGTACC
JAK2	GGAATGGCCTGCCTTACAATG	TGGCTCTATCTGCTTCACACAAT
STAT1	TCACAGTGGTTTCGAGCTTCAG	CGAGACATCATAGGCAGCGTG
STAT3	CACTTGGATTGAGAGTCAAGAC	AGGAATCGGCTATATTGCTGGT
IFN-γ	GCCACGGCACAGTCATTGA	TGCTGATGGCCTGATTGTCTT
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
α-SMA	TCGGATACTTCAGCGTCA	GGGAGTAATGGTTGGAATG

1.8 Western blotting法检测各组小鼠肝组织中α-SMA、IL-6和IFN-γ蛋白表达水平及p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3、p-JAK1/JAK1和p-JAK2/JAK2比值 提取各组小鼠肝组织总蛋白，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）（4%~20%），并将蛋白转移到聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜上，用无蛋白快速封闭液在室温下结合封闭膜30 min。将膜与一抗在4℃下孵育过夜，包括抗STAT1（1:1 000稀释）、抗p-STAT1（1:500）、抗STAT3（1:2 000）、抗p-STAT3（1:2 000）、抗JAK1（1:500）、抗p-JAK1（1:500）、抗JAK2（1:500）、抗p-JAK2（1:500）、抗IFN-γ（1:500）、抗IL-6（1:500）、抗α-SMA（1:500）和抗β-actin（1:5 000）。次日加入含吐温的Tris缓冲盐溶液（Tris-buffered saline with Tween, TBST）清洗一抗，并与相应的HRP标记的二抗（1:20 000）在室温下孵育2 h。清洗二抗后，使用特超敏增强化学发光法（enhanced chemiluminescence, ECL）化学发光试剂盒捕获印迹。采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水

平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。
1.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.5.0软件进行统计学分析。各组小鼠体质量，肝脏系数，FBG水平，血清中ALT和AST活性及TG、TC、HDL-C和LDL-C水平，肝脏CVF，肝组织中脂滴面积占比，肝组织中JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、IFN-γ、IL-6和α-SMA mRNA表达水平及肝组织中α-SMA、IL-6和IFN-γ蛋白表达水平以及p-JAK1/JAK1、p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3比值均符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、肝脏系数和FBG水平 实验开始时，各组小鼠体质量处于同一基线水平，无明显差异。前6周内，模型组和模型+芬戈莫德组小鼠体质量迅速升高；注射STZ后，模型组和模型+芬戈莫德组小鼠体质量有所降低；8~16周，模型组和模型+芬戈莫德组小鼠体质量缓慢升高，模型+芬戈莫德组小鼠体质量升高速度小于模型组小鼠。1~16周内，对照组和对照+芬戈莫德组小鼠体

质量始终缓慢升高, 2组小鼠体质量较为接近, 且均低于模型组和模型+芬戈莫德组。见图1。

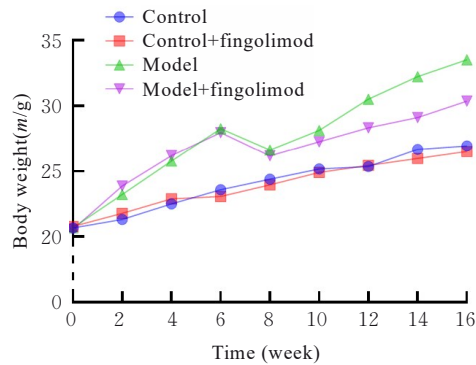


图1 各组小鼠的体质量

Fig. 1 Body weights of mice in various groups

芬戈莫德干预8周后, 与对照组比较, 对照+芬戈莫德组小鼠肝脏系数和FBG水平有所升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 模型组小鼠肝脏系数和FBG水平明显升高 ($P<0.001$)。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝脏系数和FBG水平明显降低 ($P<0.01$)。见表2。

2.2 各组小鼠肝组织病理形态表现 HE染色结果显示: 对照组和对照+芬戈莫德组小鼠肝组织形态正常; 模型组小鼠肝细胞肿胀, 肝血窦变窄, 可见部分肝细胞坏死及门管区少量炎症细胞浸润。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝细胞形态明显改善。见图2。

2.3 各组小鼠肝纤维化形态表现 Masson染色结

表2 各组小鼠肝脏系数和FBG水平

Tab. 2 Liver coefficients and FBG levels of mice in various groups ($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Liver coefficient ($\eta/\%$)	FBG level [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]
Control	3.54 ± 0.18	5.80 ± 1.06
Control+fingolimod	3.65 ± 0.29	5.31 ± 0.95
Model	$4.69\pm 0.31^*$	$21.90\pm 1.96^*$
Model+fingolimod	$4.17\pm 0.24^\Delta$	$15.68\pm 1.65^\Delta$

* $P<0.001$ compared with control group; $^\Delta P<0.01$ compared with model group.

果显示: 对照组和对照+芬戈莫德组小鼠肝组织未见明显的胶原积累; 模型组小鼠肝组织可见明显的胶原积累, 大范围窦周及较多汇管区周围可见纤维化; 模型+芬戈莫德组小鼠肝纤维化程度较模型组明显减轻。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏CVF明显升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝脏CVF明显降低 ($P<0.001$)。见图2和表3。

2.4 各组小鼠肝组织脂质沉积情况 油红O染色结果显示: 对照组和对照+芬戈莫德组小鼠肝细胞几乎无红染区域, 无脂肪沉积现象; 模型组小鼠肝组织中出现大量的较大鲜红脂滴, 部分已融合成片, 小鼠存在明显的肝细胞变性和脂质沉积; 与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝细胞脂肪变性明显减轻。与对照组比较, 模型组小鼠肝组织内脂滴面积占比明显升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝组织内脂滴面积占比

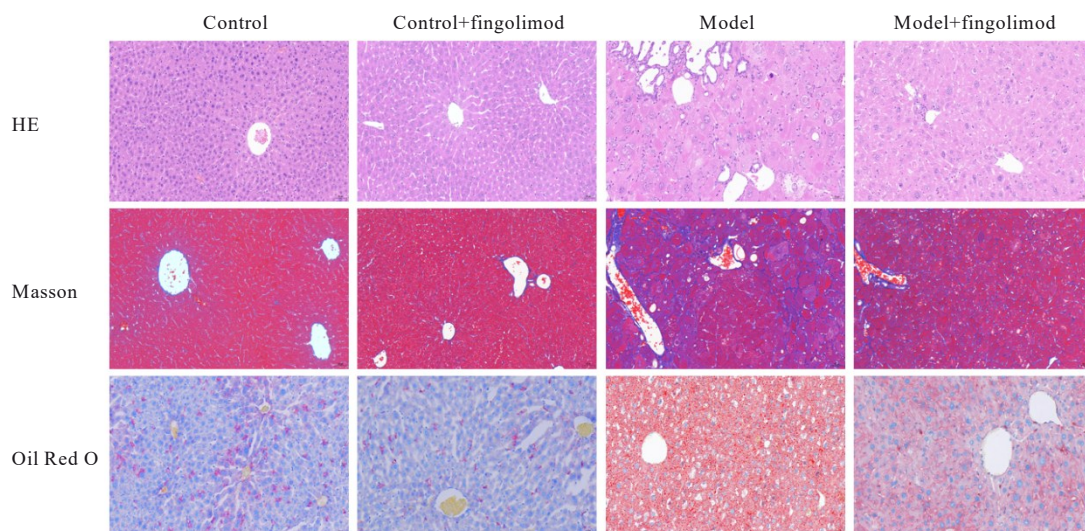


图2 各组小鼠肝组织病理形态表现(×200)

Fig. 2 Pathomorphology of liver tissue of mice in various groups (×200)

明显降低 ($P<0.001$)。见图 2 和表 3。

表 3 各组小鼠肝脏 CVF 和脂滴面积占比
Tab. 3 Hepatic CVF and lipid droplet area proportions of mice in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s, \eta/\%$)

Group	CVF	Lipid droplet area ratio proportion
Control	2.23±2.37	0.46±1.13
Control+ fingolimod	3.14±2.08	0.07±1.85
Model	38.61±2.95*	44.50±1.47*
Model+ fingolimod	22.15±2.07 [△]	10.17±1.43 [△]

* $P<0.001$ compared with control group; [△] $P<0.001$ compared with model group.

2.5 各组小鼠血清肝功能指标和血脂水平 对照组和对照+芬戈莫德组小鼠血清中 ALT 及 AST 活性以及 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组

小鼠血清中 ALT 和 AST 活性及 TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高 ($P<0.001$), HDL-C 水平明显降低 ($P<0.001$)。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性及 TC、TG 和 LDL-C 水平明显降低 ($P<0.001$), HDL-C 水平明显升高 ($P<0.001$)。见表 4。

2.6 各组小鼠肝组织中 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、IFN- γ 、IL-6 和 α -SMA mRNA 表达水平

与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 JAK1、JAK2、STAT3、IL-6 和 α -SMA mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.001$), STAT1 和 IFN- γ mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.001$)。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝组织中 JAK1、JAK2、STAT3、IL-6 和 α -SMA mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.001$), STAT1 和 IFN- γ mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.001$)。见表 5。

表 4 各组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性以及 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平
Tab. 4 Activities of ALT and AST, and levels of TC, TG, LDL-C, and HDL-C in serum of mice in various groups ($n=10, \bar{x}\pm s$)

Group	ALT [$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$]	AST [$\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$]	TC [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]	TG [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]	LDL-C [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]	HDL-C [$c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$]
Control	24.74±1.933	29.89±2.581	1.51±0.100	0.65±0.061	0.40±0.036	1.41±0.031
Control+ fingolimod	23.63±2.276	30.24±2.839	1.54±0.136	0.53±0.067	0.40±0.044	1.40±0.062
Model	74.13±8.297*	90.55±6.269*	2.45±0.133*	2.10±0.188*	1.28±0.074*	0.71±0.053*
Model+ fingolimod	36.73±4.480 [△]	44.37±3.360 [△]	2.02±0.0540 [△]	1.20±0.119 [△]	0.71±0.049 [△]	1.02±0.093 [△]

* $P<0.001$ compared with control group; [△] $P<0.001$ compared with model group.

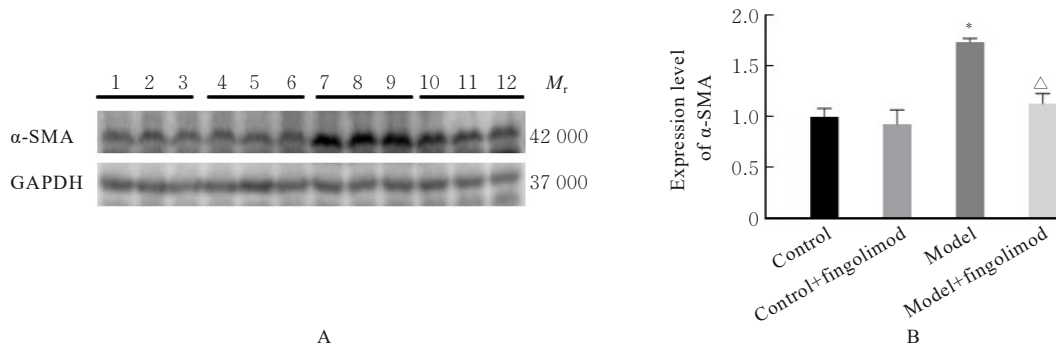
表 5 各组小鼠肝组织中 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、IFN- γ 、IL-6 和 α -SMA mRNA 表达水平
Tab. 5 Expression levels of JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, IFN- γ , IL-6, and α -SMA mRNA in liver tissue of mice in various groups ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Group	JAK1	JAK2	STAT1	STAT3	IFN- γ	IL-6	α -SMA
Control	1.00±0.08	1.00±0.15	1.00±0.06	1.00±0.10	1.00±0.08	1.00±0.13	1.02±0.23
Control+ fingolimod	1.15±0.19	0.93±0.08	0.94±0.16	0.91±0.12	0.93±0.13	1.07±0.19	0.69±0.13
Model	5.39±0.76*	6.01±0.48*	0.15±0.03*	3.92±0.22*	0.03±0.01*	2.99±0.15*	8.15±0.28*
Model+ fingolimod	2.78±0.49 [△]	3.00±0.49 [△]	0.48±0.06 [△]	2.84±0.20 [△]	0.27±0.03 [△]	1.56±0.11 [△]	2.45±0.42 [△]

* $P<0.001$ compared with control group; [△] $P<0.001$ compared with model group.

2.7 各组小鼠肝组织中 α -SMA、IL-6 和 IFN- γ 蛋白表达水平以及 p-STAT3/STAT3、p-STAT1/STAT1、p-JAK1/JAK1 和 p-JAK2/JAK2 比值 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 α -SMA 和 IL-6 蛋白表达水平及 p-STAT3/STAT3、p-JAK1/JAK1 和 p-JAK2/JAK2 比值均明显升高 ($P<0.001$), IFN- γ 蛋白表达水平和 p-STAT1/STAT1 比值明显降低 ($P<$

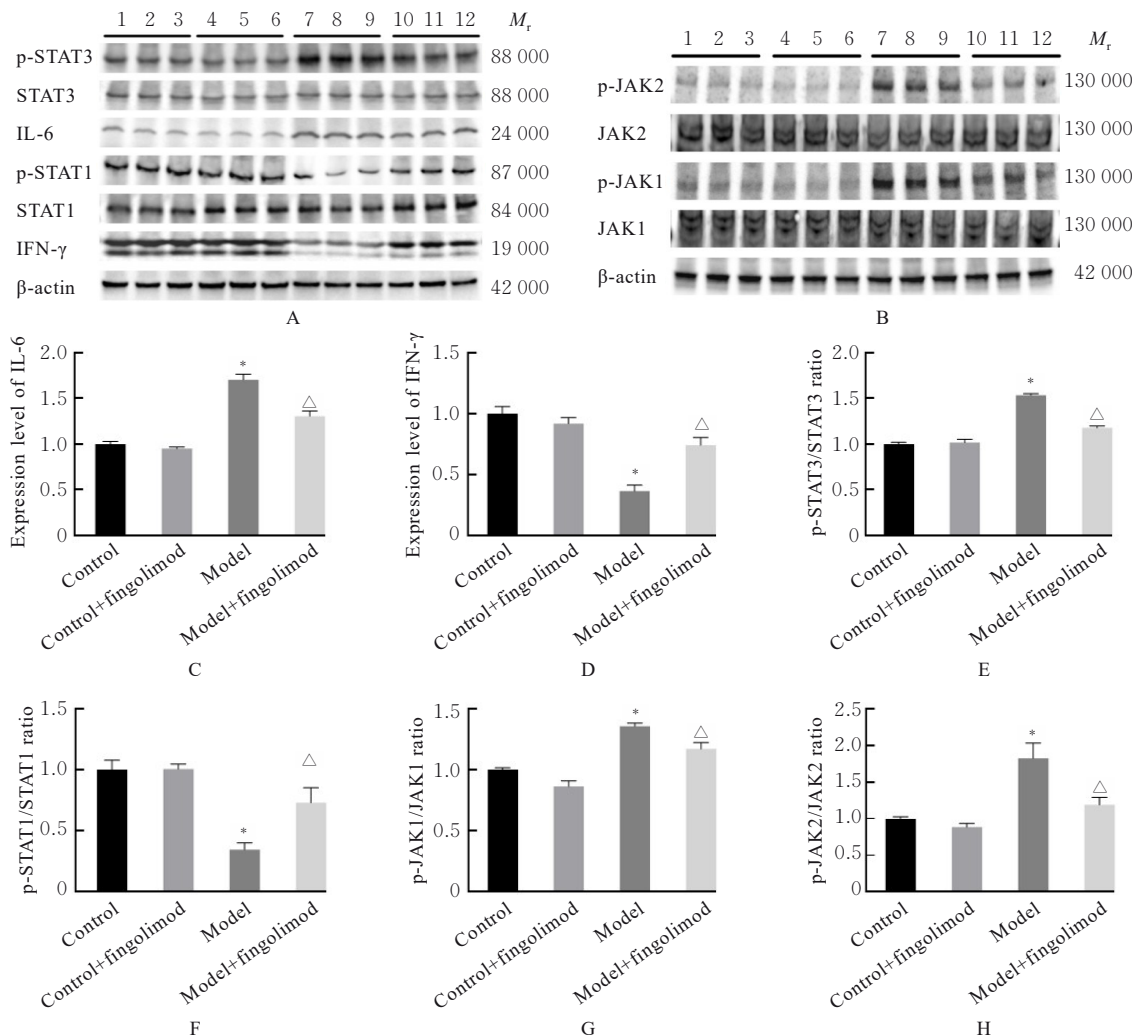
0.001)。与模型组比较, 模型+芬戈莫德组小鼠肝组织中 α -SMA 和 IL-6 蛋白表达水平及 p-STAT3/STAT3、p-JAK1/JAK1 和 p-JAK2/JAK2 比值明显降低 ($P<0.001$), IFN- γ 蛋白表达水平和 p-STAT1/STAT1 比值明显升高 ($P<0.001$)。与对照组比较, 对照+芬戈莫德组小鼠肝组织中上述指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 3 和 4。



Lane 1–3: Control group; Lane 4–6: Control+tingolimod group; Lane 7–9: Model group; Lane 10–12: Model+tingolimod group. * $P < 0.001$ compared with control group; $\Delta P < 0.001$ compared with model group.

图3 小鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of α -SMA protein in liver tissue of mice in various groups



Lane 1–3: Control group; Lane 4–6: Control+tingolimod group; Lane 7–9: Model group; Lane 10–12: Model+tingolimod group. * $P < 0.001$ compared with control group; $\Delta P < 0.001$ compared with model group.

图4 小鼠肝组织中IL-6、IFN- γ 、p-STAT1、STAT1、p-STAT3、STAT3、p-JAK1、JAK1、p-JAK2和JAK2蛋白表达电泳图(A,B)及直条图(C~H)

Fig. 4 Electrophoregrams(A,B) and histograms(C–H) of expressions of IL-6, IFN- γ , p-STAT1, STAT1, p-STAT3, STAT3, p-JAK1, JAK1, p-JAK2 and JAK2 proteins in liver tissue of mice in various groups

3 讨论

IFN- γ 参与JAK/STAT1通路调节,在免疫反应、细胞周期调控与凋亡等过程中发挥重要作用^[15]。研究^[16]显示:激活IFN- γ /JAK/STAT1信号可抑制 α -SMA表达,并有效阻断HSC的活化过程,从而发挥抗肝纤维化作用。研究^[15]表明:甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)可通过促进CUG结合蛋白1(CUG-binding protein 1, CUGBP1)介导的IFN- γ /STAT1/Smad7信号通路来减轻肝纤维化和HSC活化。本研究中,芬戈莫德处理后小鼠肝组织中IFN- γ 和p-STAT1蛋白表达水平均明显升高,推测芬戈莫德可能通过调节IFN- γ /JAK/STAT1信号通路发挥作用。

IL-6的激活可诱导JAK1与JAK2发生磷酸化,进而促使STAT3被进一步活化,引发HSC激活,加速肝纤维化进展^[17]。研究^[18]显示:应用选择性JAK/STAT3信号通路抑制剂可阻断HSC增殖与迁移,逆转肝纤维化,这表明IL-6/JAK/STAT3信号通路在肝纤维化的发展过程中具有重要作用。研究^[19]发现:芬戈莫德作为S1P受体1(S1P receptor 1, S1PR1)的功能拮抗剂,可通过干扰IL-6/JAK/STAT3信号通路,抑制辅助性T细胞17(T helper 17 cell, Th17)细胞极化。另有研究^[20]显示:芬戈莫德可下调S1PR1和STAT3之间的级联反应,从而有效抑制淋巴瘤。本研究中,芬戈莫德处理后小鼠肝组织中p-JAK1/JAK1、p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3比值及IL-6蛋白表达水平明显降低,提示其可能通过抑制IL-6/JAK/STAT3信号通路发挥作用。

关于JAK/STAT3通路在肝脏疾病中的作用仍存在争议。研究^[21]表明:JAK抑制剂SHR0302可通过抑制JAK1活性,阻断下游的STAT3信号通路,从而抑制HSC激活、增殖和迁移以及胶原的合成,并诱导HSC凋亡,进而缓解肝纤维化,上述结果显示了JAK/STAT3通路的治疗作用,与本研究结果相符。然而,也有研究^[22]认为:肝脏代谢调节因子斯坦钙蛋白2(stanniocalcin 2, STC2)可通过激活STAT3信号通路,改善瘦素缺乏和HFD诱导的肥胖小鼠肝纤维化和高甘油三酯血症,这与本研究结果有较大差异。这种分歧可能与JAK/STAT3通路功能广泛、上下游调控因子众多及肝脏功能相关机制复杂性有关联。因此,JAK/STAT3信号通路在改善肝脏功能中的作用仍需要

进一步研究。

本研究存在一定局限性,即未使用IFN- γ /JAK/STAT1和IL-6/JAK/STAT3信号通路的抑制剂或激动剂进行验证,也未开展体外实验。肝脏内细胞类型复杂,未来研究将开展体外细胞实验,并结合信号激活剂或信号抑制剂进行验证,以进一步阐明芬戈莫德改善肝脏功能的作用和机制。

综上所述,芬戈莫德可改善T2DM小鼠糖脂代谢、肝功能和肝组织内脂质沉积,减轻肝纤维化的程度,其机制可能与上调IFN- γ 和p-STAT1表达及下调IL-6和p-STAT3表达有关。芬戈莫德或将作为T2DM并发肝纤维化患者的潜在治疗策略,为个体化医疗提供新方向。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李舒参与实验设计和论文撰写,郭迦期、李宛淞、甄艳凤、翟红佳和李捷参与数据收集、整理及统计学分析,房辉参与论文审阅和修改。

[参考文献]

- [1] YAMAMURA S, ESLAM M, KAWAGUCHI T, et al. MAFLD identifies patients with significant hepatic fibrosis better than NAFLD[J]. *Liver Int*, 2020, 40(12): 3018-3030.
- [2] ZHAO J, LIU L, CAO Y Y, et al. MAFLD as part of systemic metabolic dysregulation[J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(Suppl 2): 834-847.
- [3] WANG Q X, LU T M, SONG P, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting oxidative stress via AKR7A2[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155878.
- [4] CHEN J Z, GE J M, CHEN W S, et al. UPLC-Q-TOF-MS based investigation into the bioactive compounds and molecular mechanisms of Lamiophlomis Herba against hepatic fibrosis[J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155085.
- [5] GUO M M, WANG Z D, DAI J Y, et al. Glycyrrhizic acid alleviates liver fibrosis *in vitro* and *in vivo* via activating CUGBP1-mediated IFN- γ /STAT1/Smad7 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154587.
- [6] HIGASHI T, FRIEDMAN S L, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42.
- [7] 韩超,王丽娟,王鹏源,等. IL-6/JAK/STAT3信号通路在纤维化疾病中作用的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(12): 2285-2290.

- [8] WANG Z F, KAWABORI M, HOUKIN K. FTY720 (fingolimod) ameliorates brain injury through multiple mechanisms and is a strong candidate for stroke treatment[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(18): 2979-2993.
- [9] ROHRBACH T D, ASGHARPOUR A, MACZIS M A, et al. FTY720/fingolimod decreases hepatic steatosis and expression of fatty acid synthase in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(7): 1311-1322.
- [10] YE H J, SUN M Y, JIN Z J, et al. FTY-720 alleviates diabetes-induced liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2023, 37(5): 960-970.
- [11] LOU D, FANG Q, HE Y H, et al. Oxymatrine alleviates high-fat diet/streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 J mice by modulating oxidative stress, inflammation and fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116491.
- [12] SOOD A, FERNANDES V, PREETI K, et al. Sphingosine 1 phosphate lyase inhibition rescues cognition in diabetic mice by promoting anti-inflammatory microglia[J]. *Behav Brain Res*, 2023, 446: 114415.
- [13] SOOD A, FERNANDES V, PREETI K, et al. Fingolimod alleviates cognitive deficit in type 2 diabetes by promoting microglial M2 polarization *via* the pSTAT3-jmjd3 axis[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 901-922.
- [14] YIN Z Y, FAN L N, WEI L P, et al. FTY720 protects cardiac microvessels of diabetes: a critical role of S1P1/3 in diabetic heart disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42900.
- [15] LIU Z L, XU B G, DING Y P, et al. Guizhi Fuling pill attenuates liver fibrosis *in vitro* and *in vivo* *via* inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 and activating IFN- γ /Smad7 signaling pathways[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 9357-9368.
- [16] WENG H L, MERTENS P R, GRESSNER A M, et al. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads[J]. *J Hepatol*, 2007, 46(2): 295-303.
- [17] ZAI W J, CHEN W, LUAN J Y, et al. Dihydroquercetin ameliorated acetaminophen-induced hepatic cytotoxicity *via* activating JAK2/STAT3 pathway and autophagy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(3): 1443-1453.
- [18] YU H, LEE H, HERRMANN A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 736-746.
- [19] GARRIS C S, WU L F, ACHARYA S, et al. Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(11): 1166-1172.
- [20] LIU Y, DENG J H, WANG L, et al. S1PR1 is an effective target to block STAT3 signaling in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2012, 120(7): 1458-1465.
- [21] GU Y J, SUN W Y, ZHANG S, et al. Targeted blockade of JAK/STAT3 signaling inhibits proliferation, migration and collagen production as well as inducing the apoptosis of hepatic stellate cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3): 903-911.
- [22] ZHAO J J, JIAO Y, SONG Y P, et al. Stanniocalcin 2 ameliorates hepatosteatosis through activation of STAT3 signaling[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 873.