## 罗汉果皂苷VI调控肝组织细胞上皮–间质转化 及肝纤维化进程的作用与机制研究

熊龙辉 曹欢 王展 侯杰\* (深圳市宝安区人民医院普通外科, 深圳 518101)

摘要 为探讨罗汉果皂苷VI是否通过调控Hedgehog通路抑制肝组织上皮-间质转化及纤维 化、该研究采用SD大鼠皮下注射含40% CCL制作肝纤维化模型、并将其随机分为模型对照组、罗 汉果皂苷VI低剂量组和高剂量组、另外将皮下注射含橄榄油的SD大鼠作为正常对照组。罗汉果皂 苷VI低剂量组和高剂量组大鼠分别每天灌胃给予10 mg/kg和20 mg/kg罗汉果皂苷VI,模型对照组和 正常对照组大鼠每天灌胃给予同体积纯净水,各组大鼠均连续给药8周。各组大鼠末次给药30 min 后,麻醉取血和肝脏组织测定相关基因和蛋白,取血清测定肝脏功能指标和血清肝脏纤维化指标,取 肝脏组织经Masson染色后进行病理学观察,另外采用qRT-PCR和Western-blot法测定肝脏组织Shh、 Smo、Ptch-1、Gli-1、α-SMA、E-cadherin和vimentin mRNA和蛋白表达水平。结果显示,罗汉果皂 苷VI低剂量组和高剂量组胶原沉积减少、纤维化程度减轻, 血清ALT、AST、ALB和TBIL水平均 较模型对照组显著降低(P<0.05); 血清HN、LN、PC-III和COL-IV水平均较模型对照组显著降低 (P<0.05); 肝脏组织α-SMA和vimentin mRNA和蛋白表达水平均较模型对照组显著降低(P<0.05), Ecadherin mRNA和蛋白表达水平均较模型对照组显著升高(P<0.05); 肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1和 Gli-1 mRNA和蛋白表达水平均较模型对照组显著降低(P<0.05)。该研究证明罗汉果皂苷VI具有保 肝作用,可通过抑制肝组织上皮-间质转化抑制肝纤维化进程,该作用可能通过调控Hedgehog信号 通路而发挥作用。

关键词 罗汉果皂苷VI; 上皮-间质转化及纤维化; 肝纤维化; Hedgehog信号通路

## Effects and Mechanisms of Mogroside VI on Hepatic Epithelial-Mesenchymal Transformation and Hepatic Fibrosis

XIONG Longhui, CAO Huan, WANG Zhan, HOU Jie\* (General Surgery of Shenzhen Bao'an People's Hospital, Shenzhen 518101, China)

**Abstract** In order to investigate whether Mogroside VI inhibits EMT (epithelial-mesenchymal transformation) and fibrosis by regulating Hedgehog pathway, the liver fibrosis model was established by subcutaneous injection of 40% CCl<sub>4</sub> in Sprague-Dawley rats. The rats were randomly divided into model control group, low dose group and high dose group. The rats in the low dose group and the high dose group were given Mogroside VI 10 mg/kg and 20 mg/kg daily. The rats in the model control group and the normal control group were given the same volume of purified water daily. The rats in each group were anesthetized for 30 min after the last administration. The blood and

Received: November 1, 2022 Accepted: November 30, 2022

收稿日期: 2022-11-01 接受日期: 2022-11-30

广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2021A1515220082)和宝安人民医院(集团)一院青年基金(批准号: 2018B018)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 15323883477, E-mail: houjie19781978@126.com

This work was supported by the Basic and Applied Basic Research Fund of Guangdong Province (Grant No.2021A1515220082) and the Bao'an People's Hospital (Group) First Hospital Youth Fund Project (Grant No.2018B018)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-15323883477, E-mail: houjie19781978@126.com

liver tissues were taken to measure the liver function index and liver fibrosis index. The liver tissues were taken for pathological observation after Masson staining. The mRNA and protein expression levels of Shh, Smo, Ptch-1, Gli-1,  $\alpha$ -SMA, E-cadherin and vimentin in liver were determined by qRT-PCR and Western-blot. The results showed that Collagen deposition and fibrosis were reduced in the low and high dose groups (*P*<0.05); the serum levels of ALT, AST, ALB and TBIL in the low and high dose groups were significantly lower than those in the model control group (*P*<0.05); the levels of serum HN, LN, PC-III and COL-IV in the low dose group and high dose group were significantly lower than those of the model control group (*P*<0.05); the levels of  $\alpha$ -SMA, vimentin mRNA and protein in the liver of the low and high dose groups were significantly lower than those of the model control group (*P*<0.05), and the levels of E-cadherin mRNA and protein were significantly higher than those of the model control group (*P*<0.05); The expression of Shh, Smo, Ptch-1, Gli-1 mRNA and protein in the liver of the low dose group were significantly lower than those of the model control group (*P*<0.05); The expression of Shh, Smo, Ptch-1, Gli-1 mRNA and protein in the liver of the low dose group and the high dose group were significantly lower than those of liver fibrosis by inhibiting the EMT, which may play a role in regulating Hedgehog signaling pathway.

Keywords Mogroside VI; epithelial mesenchymal transformation and fibrosis; hepatic fibrosis; Hedgehog signal path

肝纤维化是一种可逆病变,并且也是各种慢性 肝病向肝硬化转变的必经阶段,其主要病理学特征 为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)的异常增多和 活化以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)的 显著增多和过度沉积。已有研究结果显示,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 可能是肝脏发生纤维化的重要机制印。具有上皮表 型的各类肝脏组织细胞可通过EMT转化成为具有 间质细胞表型的肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cells, MFLC), 并参与肝纤维化的发生发展<sup>[2]</sup>。抑制 肝细胞EMT、减少MFB的生成,可能是预防甚至是 逆转肝纤维化的有效手段<sup>[3]</sup>。罗汉果是药食同源的 药材,其主要有效成分为罗汉果皂苷,罗汉果皂苷具 有降糖、降脂、抗肿瘤、抗炎等药理作用<sup>[4]</sup>。已有 体外研究显示,罗汉果皂苷VI可有效抑制脂多糖导 致的肝细胞损伤,其潜在机制可能与通过激活PGC-1α/NRF-1/TFAM信号通路促进肝细胞线粒体生物合 成、降低细胞内氧化应激水平以及抑制细胞凋亡有 关<sup>[5]</sup>。另有体内研究显示,罗汉果皂苷VI可能通过 降低肝脏氧化应激水平并增强PGC-1α介导的肝脏 细胞线粒体合成能力而抑制脓毒症导致的小鼠急性 肝损伤<sup>[6]</sup>。而罗汉果皂苷VI抑制肝纤维是否通过调 控Hedgehog通路介导EMT而抑制肝纤维化目前尚未 见相关报道。本研究采用四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl4)肝纤维化大鼠模型, 观察罗汉果皂苷VI的 护肝作用,和对肝组织EMT及肝纤维化的抑制作用,

并且探讨其作用机制是否与调控Hedgehog通路介导 EMT有关,为肝纤维化的防治提供新的理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

SPF级大鼠38只,6~8周龄,体质量为(140±20)g,购于深圳市拓普生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SYXK(粤)2020-0230,饲养于室温(24±2)℃,湿度(45±5)%,12h光暗循环的环境。所有大鼠实验期间均采用普通颗粒饲料进行喂养,自由饮用自来水。动物实验方案经深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物伦理委员会审核批准,批件号为:2021-128。

### 1.2 药物与试剂

CCl4购自成都市科龙化工试剂厂;秋水仙碱购 自昆明制药集团股份有限公司;丙氨酸转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、天冬氨酸转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、透明质酸 酶(hyaluronidase, HA)试剂盒和层黏连蛋白(laminin, LN)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;白蛋白 (albumin, ALB)试剂盒、总胆红素(total bilirubin, TBIL)试剂盒、III型前胶原肽(procollagen-III, PC-III)和IV型胶原(collagen-IV, COL-IV)试剂盒购自武 汉华美生物工程有限公司;HE和Masson染色试剂盒 购自北京杰美生物科技有限公司;Trizol试剂盒购自 美国 Sigma公司; PrimeScript RT Reagent Kit逆转录 试剂盒和SYBR Green Realtime PCR Master Mix荧光 定量试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; RIPA 裂解液和BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物 科技研究所; Shh和上皮-钙黏素(epithelial-cadherin, E-cadherin)蛋白一抗购自美国CST公司; 平滑受体 (smoothened, Smo)、Ptch-1抗体和α-平滑肌肌动蛋 白(alpha smooth muscle actin, α-SMA)一抗, 购自美 国Abcam公司; Gli-1蛋白一抗购自美国Santa Cruz公 司; 波形蛋白(vimentin)抗体购自美国Sio-Rad公司; GAPDH、HRP-IgG抗体购自北京中杉金桥生物技 术有限公司; 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒购自美国Millipore公司。Shh、Smo、 Ptch-1、Gli-1、α-SMA、E-cadherin、vimentin和 GAPDH的PCR引物由生工生物科技(上海)股份有限 公司合成,引物序列和产物长度见表1。

#### 1.3 主要仪器

MSD97K49型微量离心机购自美国Beckman公司;日立7020型全自动生化分析仪购自日立高新技术株式会社;Nikon 50i型光学显微镜购自日本Nikon公司;3001型多功能酶标仪购自美国ThermoFisher公司;ABI 7900型荧光定量PCR扩增仪购自美国ABI公司;Western blot电泳仪和转膜仪购自美国Bio-Rad公司。

#### 1.4 肝纤维化大鼠模型的制作

随机选择27只SD大鼠皮下注射含40% CCl4的 3 mL/kg橄榄油溶液(首次加倍,之后2次/周)制作肝

纤维化模型大鼠;剩余11只SD大鼠皮下注射3 mL/kg 的橄榄油溶液(每周2次)作为正常对照大鼠。所有大 鼠均给予普通颗粒饲料喂养,自由饮水,6周后随机 选择3只模型大鼠和3只正常对照大鼠,颈椎脱臼处 死,取出肝脏进行大体观察,然后用2~8 °C预冷的生 理盐水冲洗,于4%多聚甲醛溶液中固定2 h,常规石 蜡包埋、切片,Masson染色后于显微镜下进行病理 观察以确认造模成功:模型大鼠肝脏组织出现蓝色 染色(纤维化),正常大鼠肝脏组织未出现蓝色染色。

#### 1.5 分组及给药

剩余32只纤维化模型大鼠随机分为模型对照 组、罗汉果皂苷VI低剂量和高剂量组(*n*=8),剩余8 只正常对照大鼠作为正常对照组。罗汉果皂苷VI低 剂量组和高剂量组大鼠分别每天灌胃给予10 mg/kg 和20 mg/kg罗汉果皂苷VI,模型对照组和正常对照 组大鼠每天灌胃给予同体积纯净水。各组大鼠均连 续8周,其间给予标准饲料喂养,自由饮水。

#### 1.6 血清和肝脏组织样本的采集

大鼠处理前晚禁食不禁水,实验当日各组大鼠 末次给药30 min后腹腔注射3%戊巴比妥钠(45 mg/kg) 进行麻醉,腹腔静脉取血,室温下静置30 min,离心 (4 000 r/min×15 min),分离得血清,进行肝功能指标 及血清肝纤维化指标的测定。分离、收集肝脏标本, 将左叶肝脏分成3份,其中1份在同一位置剪成1 cm× 1 cm的组织样本,放置于4%的多聚甲醛溶液中进行固

Table 1         Primer sequence and product length of PCR			
基因	引物序列	产物长度/bp	
Gene	Primer sequence	Product length /bp	
Shh	F: 5'-AGG CTG GAT TCG ACT GGG TCT-3'	142	
	R: 5'-AAC TTG GTG CCA CCC TGC TC-3'		
Smo	F: 5'-GCC TCC TGC TTA TTC TGG-3'	75	
	R: 5'-GGT GGT TGC TCT TGA TGG-3'		
Ptch-1	F: 5'-ACC CGC CAG AAG ATA GGA GA-3'	124	
	R: 5'-GGA GTG CTG AGT CCA GGT GT-3'		
Gli-1	F: 5'-AAC ATG GCA GTC GGT AAC ATG AG-3'	132	
	R: 5'-CCG CGT GTG TGT AGC CAT TTA G-3'		
a-SMA	F: 5'-ACC ATC GGG AAT GAA CGC TT -3'	106	
	R: 5'-TTG CGT TCT GGA GGA GCA AT-3'		
E-cadherin	F: 5'-TCT CTT GTC CCT TCC ACA GC-3'	120	
	R: 5'-CTC CAG ACC CAC ACC AAA GT-3'		
Vimentin	F: 5'-TGA GAT CGC CAC CTA CAG GA-3'	141	
	R: 5'-AAG GTC ATC GTG GTG CTG AG-3'		
GAPDH	F: 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC-3'	211	
	R: 5'-GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'		

表1 PCR 引物序列和产物长度

定,后续进行病理学观察;另外2份放置于--80°C,用于qRT-PCR和Western blot实验。

#### 1.7 检测指标

1.7.1 肝脏功能指标检测 将各组大鼠血清采用 全自动生化仪检测血清ALT、AST、ALB和TBIL水平。 ALT检测采用2,4-二硝基苯肼法,AST测定采用酶动 力学法,ALB测定采用溴甲酚绿法,TBIL测定采用钒 酸氧化法,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.7.2 血清肝脏纤维化指标的测定 将各组大鼠 分离所得血清采用酶标仪检测血清HA、LN、PC-III和COL-IV水平, HA和LN测定双抗体夹心法, PC-III和COL-IV测定采用ELISA法, 具体操作严格按照 试剂盒说明书进行。

1.7.3 肝脏组织病理切片观察 肝脏组织固定48 h, 经清水冲洗后用不同梯度乙醇进行脱水处理,然后 用二甲苯溶液进行透明处理,再用石蜡包埋机包埋 成肝脏组织蜡块,常规切片(4 μm)。将肝脏石蜡切片 烤片,经不同梯度乙醇进行水化,后进行常规HE染色 和Masson染色,然后将切片用不同浓度乙醇进行脱 水处理,二甲苯溶液透明处理,用中性树胶进行封片, 待切片干燥后,在光学显微镜下观察。

1.7.4 肝组织纤维化关键基因mRNA表达检测 取 出-80°C保存的肝脏组织,用滤纸吸干标本的水 分,眼科剪将心肌组织剪碎后,再加入Trizol试剂提 取总RNA,测定RNA纯度和浓度,参照逆转录试剂 盒说明书进行逆转录,得到cDNA产物,反应体系: 4 µg总RNA、2 µL 5× RT Master Mix, 以RNase free H<sub>2</sub>O补足至10 µL;反应条件: 25 °C逆转录10 min, 42 °C逆转录 30 min, 85 °C灭活 10 min。以cDNA为 模板,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative Realtime polymerase chain reaction, qRT-PCR)检 测肝脏 α-SMA、E-cadherin、vimentin、Shh、Smo、 Ptch-1和Gli-1 mRNA的表达水平,反应体系: 2 µL 2× SYBR 5 µL、10 ng/µL的 cDNA模板、10 µmol/L上 下游引物各0.4 µL、2.2 µL的ddH<sub>2</sub>O; qRT-PCR条件: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性30 s, 64 °C退火34 s, 72 °C延伸30 s, 反应40个循环, 72 °C延伸5 min。根 据目标基因与GAPDH扩增产物的2-44Ct比值来计算 相对表达量。

1.7.5 肝组织纤维化关键蛋白表达检测 取 出-80°C保存的待测肝脏组织,用滤纸吸干标本的 水分,用眼科剪将心肌组织剪碎后,使用RIPA裂解 缓冲液提取总蛋白。使用 BCA试剂盒测定各组大 鼠肝组织样本的蛋白含量。每孔上样量为50 μg,进 行10% SDS-PAGE电泳,转移至 PVDF膜上,在室温 下用5%脱脂牛奶封闭2 h后,洗膜,加入α-SMA、Ecadherin、vimentin、Shh、Smo、Ptch-1、Gli-1和 β-actin(稀释比例均为1:1 000)一抗,4°C过夜,洗膜, 加入二抗,在37°C下持续2 h。在室温下用ECL试剂 显影2 min,采用 ImageJ图像分析软件对各蛋白条带 进行灰度值测定。以β-actin为内参,计算目标蛋白 Shh、Smo、Ptch-1、Gli-1、α-SMA、E-cadherin和 vimentin的相对表达量。

#### 1.8 统计学分析

采用SPSS 22.0进行数据分析, 计量资料以均值± 方差表示, 组间分析采用单因素方差分析进行比较。 以P<0.05为差异有统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 两组大鼠肝脏组织病理学变化

HE染色结果:正常对照组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,肝组织未见病变;模型对照组大鼠肝小叶正常结构遭到破坏,大量肝细胞变性并且坏死,并伴有炎性细胞浸润现象;罗汉果皂苷VI低剂量组和高剂量组肝细胞变性、坏死及炎症程度均减轻;具体见图1。Masson染色结果:正常对照组大鼠肝脏组织结构正常(未出现蓝色染色区域),未出现纤维化;模型组大鼠肝脏出现胶原蛋白过度沉积,发生广发纤维化(出现广泛的蓝色染色区域);罗汉果皂苷VI低剂量组和高剂量组胶原沉积减少,纤维化程度减轻(蓝色染色区域减少);具体见图2。

#### 2.2 各组大鼠治疗后血清肝功能指标的比较

模型组大鼠血清ALT、AST、ALB和TBIL水 平均较正常对照组显著升高(P<0.05);罗汉果皂苷 VI低剂量组大鼠血清ALT、AST、ALB和TBIL水平 均较模型对照组显著降低(P<0.05);高剂量组大鼠 血清ALT、AST、ALB和TBIL水平均较模型对照组 和低剂量组显著降低(P<0.05);具体结果见图3。

#### 2.3 各组大鼠治疗后血清肝纤维化指标的比较

模型组大鼠血清HN、LN、PC-III和COL-IV水 平均较正常对照组显著升高(P<0.05);罗汉果皂苷VI 低剂量组大鼠血清HN、LN、PC-III和COL-IV水平 均较模型对照组显著降低(P<0.05);高剂量组大鼠血



A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 罗汉果皂苷VI低剂量; D: 罗汉果皂苷VI高剂量。
A: normal control group; B: model control group; C: Mogroside VI low dose group; D: Mogroside VI high dose group.
图1 各组大鼠治疗后组织病理切片(Masson染色)





A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 罗汉果皂苷VI低剂量; D: 罗汉果皂苷VI高剂量。
 A: normal control group; B: model control group; C: Mogroside VI low dose group; D: Mogroside VI high dose group.
 图2 各组大鼠治疗后组织病理切片(HE染色)

#### Fig.2 Histopathological sections of rats in each group after treatment (HE staining)

清HN、LN、PC-III和COL-IV水平均较模型对照组和低剂量组显著降低(P<0.05);具体结果见图4。

### **2.4** 各组大鼠治疗后肝脏组织中*α-SMA、E-cadherin和vimentin* mRNA表达水平的比较

模型组大鼠肝脏组织中α-SMA和vimentin mRNA

表达水平均较正常对照组显著升高(P<0.05), Ecadherin mRNA表达水平均较正常对照组显著降 低(P<0.05); 罗汉果皂苷VI低剂量组大鼠肝脏组织 a-SMA和vimentin mRNA表达水平均较模型对照组显 著降低(P<0.05), E-cadherin mRNA表达水平均较模



\*P<0.05, 与正常对照组比较; \*P<0.05, 与模型对照组比较; \*P<0.05, 与低剂量组比较。n=8。 \*P<0.05 compared with that in normal control group; \*P<0.05 compared with that in model control group; \*P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group. n=8.

图3 各组大鼠治疗后血清肝功能指标 Fig.3 Serum liver function indexes of rats after treatment

型对照组显著升高(P<0.05); 罗汉果皂苷VI高剂量 组大鼠肝脏组织α-SMA和vimentin mRNA表达水平 均较模型对照组和低剂量组显著降低(P<0.05), Ecadherin mRNA表达水平均较模型对照组和低剂量 组显著升高(P<0.05); 具体结果见图5。

## 2.5 各组大鼠治疗后肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1 和Gli-1 mRNA表达水平的比较

模型组大鼠肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1 mRNA表达水平均较正常对照组显著升高(P<0.05); 罗汉果皂苷VI低剂量组大鼠肝脏组织Shh、Smo、 Ptch-1和Gli-1 mRNA表达水平均较模型对照组显著 降低(P<0.05); 高剂量组大鼠肝脏组织Shh、Smo、 Ptch-1和Gli-1 mRNA表达水平均较模型对照组和低 剂量组显著降低(P<0.05); 具体结果见图6。

## **2.6** 各组大鼠治疗后肝脏组织α-SMA、E-cadherin和vimentin蛋白表达水平的比较

模型组大鼠肝脏组织α-SMA和vimentin蛋白

表达水平均较正常对照组显著升高(P<0.05), Ecadherin蛋白表达水平均较正常对照组显著降低 (P<0.05); 罗汉果皂苷VI低剂量组大鼠肝脏组织 α-SMA和vimentin蛋白表达水平均较模型对照组显 著降低(P<0.05), E-cadherin蛋白表达水平均较模 型对照组显著升高(P<0.05); 罗汉果皂苷VI高剂量 组大鼠肝脏组织α-SMA和vimentin蛋白表达水平 均较模型对照组和低剂量组显著降低(P<0.05), Ecadherin蛋白表达水平均较模型对照组和低剂量组显 基升高(P<0.05); 具体结果见图7。

# 2.7 各组大鼠治疗后肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1 和Gli-1蛋白表达水平的比较

模型组大鼠肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1 和Gli-1蛋白表达水平均较正常对照组显著升高 (P<0.05);罗汉果皂苷VI低剂量组大鼠肝脏组织 Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1蛋白表达水平均较模型 对照组显著降低(P<0.05);高剂量组大鼠肝脏组织



\*P<0.05, 与正常对照组比较; \*P<0.05, 与模型对照组比较; \*P<0.05, 与低剂量组比较。n=8。 \*P<0.05 compared with that in normal control group; \*P<0.05 compared with that in model control group; \*P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group. n=8.

#### 图4 各组大鼠治疗后血清肝纤维化指标





\*P<0.05, 与正常对照组比较; \*P<0.05, 与模型对照组比较; \*P<0.05, 与低剂量组比较。 \*P<0.05 compared with that in normal control group; \*P<0.05 compared with that in model control group; \*P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group.

#### 图5 各组大鼠治疗后肝脏组织a-SMA、E-cadherin和vimentin mRNA表达水平 Fig.5 Gene expression levels of a-SMA, E-cadherin and vimentin in liver tissues of rats in each group after treatment

Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1蛋白表达水平均较模型 对照组和低剂量组显著降低(P<0.05);具体结果见 图8。

#### 3 讨论

全球每年有200万人死于肝脏疾病,肝纤维化 是病毒性肝炎、酒精肝、脂肪肝、自身免疫性肝炎



\*P<0.05, 与正常对照组比较; <sup>#</sup>P<0.05, 与模型对照组比较; <sup>&</sup>P<0.05, 与低剂量组比较。n=8。 \*P<0.05 compared with that in normal control group; <sup>#</sup>P<0.05 compared with that in model control group; <sup>&</sup>P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group. n=8.

图6 各组大鼠治疗后肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1 mRNA表达水平

Fig.6 Gene expression levels of Shh, Smo, Ptch-1 and Gli-1 in liver tissues of rats in each group after treatment



A:正常对照组; B:模型对照组; C:罗汉果皂苷VI低剂量组; D:罗汉果皂苷VI高剂量组。\*P<0.05,与正常对照组比较; \*P<0.05,与模型对照组比较; \*P<0.05,与低剂量组比较。

A: normal control group; B: model control group; C: Mogroside VI low dose group; D: Mogroside VI high dose group. \*P<0.05 compared with that in normal control group; \*P<0.05 compared with that in model control group; \*P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group.

图7 各组大鼠治疗后肝脏组织α-SMA、E-cadherin和vimentin蛋白表达水平

Fig.7 Protein expression levels of α-SMA, E-cadherin and vimentin in liver tissues of rats in each group after treatment

等各种慢性肝病发展的共同结果,并且也是肝硬化的 必经病理环节<sup>[7]</sup>。在肝纤维化的病理过程中,相关的 细胞或细胞因子可对肿瘤微环境进行调节,从而影响 肿瘤相关的血管形成,并且通过不同的机制促进肝细 胞发生异常增生以及恶性转变,从而导致肝癌的发生 风险显著提高<sup>[8]</sup>。因此,肝纤维化的预防和治疗,在预 防肝硬化和肝癌的中发挥极其重要作用。CCL4诱导 的肝损伤模型由于操作简单,重复性高,被广泛用于 肝损伤的基础研究或保肝药物的评价。本研究采用 CCL4诱导的肝损伤模型来研究罗汉果皂苷VI抑制肝 纤维的作用并探讨其作用机制。

当肝细胞受到破坏时肝细胞内AST和ALT大量 进入血液,故血清中AST和ALT水平可以用来衡量肝 脏受损的严重程度<sup>[9]</sup>。当肝功能损伤时肝细胞排泄 功能受到一定影响,胆红素的排出受到抑制而导致血 清中TBIL水平显著升高,因此可根据血清中TBIL水 平评估肝脏的分泌、排泄功能。ALB是由肝脏合成的, 当肝脏的合成功能受损时,血清中ALB水平可显著降 低<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,罗汉果皂苷VI可显著降低肝 损伤大鼠血清ALT、AST、ALB和TBil水平,并且具 有剂量依赖性的特征,因此罗汉果皂苷VI可显著改善 肝损伤大鼠的肝功能。

EMT被认为是肝纤维化中产生肌成纤维细胞的机制之一。肝脏对各种致病因素的损伤进行修复时引起以胶原蛋白为主的ECM合成与降解失衡,使ECM合成显著增加、异常沉积增多,最终导致肝脏内



A:正常对照组; B:模型对照组; C:罗汉果皂苷VI低剂量组; D:罗汉果皂苷VI高剂量组。\*P<0.05,与正常对照组比较; \*P<0.05,与模型对照组比较; \*P<0.05,与低剂量组比较。

A: normal control group; B: model control group; C: Mogroside VI low dose group; D: Mogroside VI high dose group. \*P<0.05 compared with that in normal control group; \*P<0.05 compared with that in model control group; \*P<0.05 compared with that in Mogroside VI low dose group.

图8 各组大鼠治疗后肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1蛋白表达水平

#### Fig.8 Protein expression levels of Shh, Smo, Ptch-1 and Gli-1 in liver tissues of rats in each group after treatment

部纤维结缔组织增生,使肝脏组织的结构和功能发 生变化<sup>[11]</sup>。当肝脏出现纤维化样病变时,HA、LN、 PC-III、COL-IV随肝纤维化程度的加重而显著升高, 因此它们可作为临床判断肝纤维化病情发展情况和 治疗效果的重要指标<sup>[12]</sup>。本研究显示,罗汉果皂苷 VI可显著降低肝损伤大鼠血清HN、LN、PC-III和 COL-IV水平,并且表现出剂量依赖性,因此罗汉果 皂苷VI可显著抑制肝损伤大鼠的肝纤维程度。此外, HE和Masson染色结果显示,罗汉果皂苷VI可使肝细 胞变性、坏死及炎症程度减轻,肝组织胶原沉积减 少,纤维化程度减轻,进一步从病理上证明罗汉果皂 苷VI可显著抑制肝损伤大鼠的肝纤维程度。

在慢性肝损伤因素的刺激下,多种肝脏组织细胞可能发生EMT并转化为MFLC,此病理过程是发生 肝纤维化的重要环节<sup>[13-14]</sup>。上皮细胞发生EMT的标 志表现为E-cadherin等的表达下调,以及部分间质细 胞分子标志如α-SMA和vimentin等表达上调<sup>[15]</sup>。本 研究显示,罗汉果皂苷VI可剂量依赖性降低肝损伤 大鼠肝脏组织α-SMA和vimentin mRNA和蛋白的表 达水平,升高E-cadherin mRNA和蛋白表达水平,因 此罗汉果皂苷VI可显著抑制肝损伤大鼠的EMT,这 可能是罗汉果皂苷VI抑制肝纤维化的机制。刺猬蛋 白(Hedgehog)信号通路是参与动物胚胎发育最重要 的信号通路,可促进肝纤维化,激活肝星状细胞,尤 其是可促进上皮到间质转换,表明该信号通路可能 是肝纤维化的潜在治疗靶标<sup>[16-17]</sup>。Hedgehog信号通路主要由Shh配体、跨膜蛋白受体(Smo、Ptch)及下游转录因子(Gli-1、Gli-2、Gli-3)等组成。Shh配体与Smo受体是Hedgehog信号通路的激动因子,当配体Shh与Patched结合后,可激活下游Gli家族转录因子。Gli-1是重要的效应基因,绝大多数的靶基因可被Gli-1转录激活,因此Gli-1的活化是Hedgehog信号通路激活的重要标志<sup>[18]</sup>。抑制Hedgehog信号的激活将有助于抑制肝纤维化<sup>[19]</sup>。本研究显示,罗汉果皂苷VI可剂量依赖性降低肝损伤大鼠肝脏组织Shh、Smo、Ptch-1和Gli-1mRNA和蛋白的表达水平,因此罗汉果皂苷VI可显著抑制Hedgehog信号通路,此可能为罗汉果皂苷VI抑制肝组织上皮–间质转化而抑制肝纤维化进程的原因。

综上所述,罗汉果皂苷VI具有保肝作用,可通过 抑制肝组织上皮-间质转化而抑制肝纤维化进程,该 作用可能通过调控Hedgehog信号通路而发挥作用。

#### 参考文献 (References)

- FINTHA A, GASPARICS K, ROSIVALL L, et al. Therapeutic targeting of fibrotic epithelial-mesenchymal transition-an outstanding challenge [J]. Front Pharmacol, 2019, 10(388): 1-11.
- [2] 王永娟,谢肖立,姜慧卿. 肝纤维化中上皮间质转化的调控及 靶向治疗的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志(WANG Y J, XIE X L, JIANG H Q. Research advances in the regulation of epithelialmesenchymal transition and targeted therapy for liver fibrosis. J Clinical Hepatol), 2021, 37(1): 165-8.

- [3] 孔德松,张自力,张峰,等.姜黄素通过影响自噬调控肝细胞上 皮间质转化及肝纤维化进程的作用与机制研究[J].中国药理 学通报(KONG D S, ZHANG Z L, ZHANG F, et al. Curcumin blunt epithelial to mesenchymal transduction of hepatocytes to aggravate liver fibrosis through promoting autophagy in hepatocytes. Chin Pharmacol Bull), 2019, 35(10): 1388-93.
- [4] JU P J, DING W H, CHEN J H, et al. The protective effects of Mogroside V and its metabolite 11-oxo-mogrol of intestinal microbiota against MK801-induced neuronal damages [J]. Psychopharmacology, 2020, 237(4): 1011-26.
- [5] 周海银, 罗兰, 陈艳瑛, 等. 罗汉果皂苷VI对LPS诱发肝细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 中医药导报(ZHONG H Y, LUO L, CHEN Y Y, et al. Study on the protective effect and mechanism of mogroside VI on LPS induced hepatocyte injury. Guid J Tradit Chin Med Pharm), 2022, 28(4): 6-11.
- [6] 周海银,隆彩霞,罗兰,等.罗汉果皂苷VI对小鼠脓毒症致急 性肝损伤的作用及其机制探讨[J].中国当代儿科杂志(ZHOU H Y, LONG C X, LUO L, et al. Effect of mogroside VI on acute liver injury induced by sepsis in mice and related mechanisms, Chin J Contemp Pediatr), 2020, 22(11): 1233-9.
- [7] 孙振亮, 吴哲, 贵襄平, 等. 复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠的保护作用及其机制[J]. 云南中医学院学报(SUN Z L, WU Z, GUI X P, et al. Protective effect and mechanism of compound Biejia Ruangan tablet on liver fibrosis in rats [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med), 2019, 42(1): 30.
- [8] DHAR D, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(2): 96-108.
- [9] ZHANG K F, GAO Y, ZHONG M L, et al. Hepatoprotective effects of *Dicliptera chinensis* polysaccharides on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and its underlying mechanism [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 179: 38-44.
- [10] ZHAO Y L, MA X, WANG J B, et al. Curcumin protects against CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats by inhibiting HIF-1α through an ERK-dependent pathway [J]. Molecules, 2014, 19(11): 18767-80.

- [11] 张梦师, 黄奕璇, 李洁莲, 等. 棒柄花叶提取物对肝纤维化大鼠的防治作用及其机制[J]. 广西医科大学学报(ZHANG M S, HUANG Y X, LI J L, et al. Preventive effect of water extract of Cleidion brevipetiolatum leaves on hepatic fibrosis in rats and its mechanism. J Guangxi Med Univ), 2022, 39(8): 1217-23.
- [12] 廖智红,陈燕燕,黄修影,等. 裂果薯总皂苷抗大鼠肝纤维 化作用及其机制[J]. 中国药理学通报(LIAO Z H, CHENG Y Y, HUANG X Y, et al. Effects of total saponins of Schizocapsa plantaginea Hance on hepatic fibrosis in rats and its mechanism. Chin Pharmacol Bull), 2019, 35(5): 624-9.
- [13] MUNKER S, WU Y L, DING H G, et al. Can a fibrotic liver afford epithelial-mesenchymal transition [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(26): 4661-8.
- [14] YU KK, LI Q, SHI G F, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis [J]. Saudi J Gastroenterol, 2018, 24(1): 5-11.
- [15] ZHUANG H, CAO G, KOU C, et al. CCL2/CCR2 axis induces hepatocellular carcinoma invasion and epithelial-mesenchymal transition *in vitro* through activation of the Hedgehog pathway [J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 21-30.
- [16] 周薏, 阙任烨, 李勇, 等. 白藜芦醇调控Hedgehog信号通路抑 制肝星状细胞活化的研究[J]. 广州中医药大学学报(ZHOU Y, QUE R Y, LI Y, et al. Resveratrol suppresses activation of HSC cells through regulating and controlling hedgehog signaling pathway. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med), 2020, 37(3): 516-23.
- [17] LIN X, LI J, XING Y Q. Geniposide, a sonic hedgehog signaling inhibitor, inhibits the activation of hepatic stellate cell [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 330-8.
- [18] HE Y H, LI Z, NING M M, et al. Cryptolepine derivative-6h inhibits liver fibrosis in TGF-β1-induced HSC-T6 cells by targeting the Shh pathway [J]. Can J Physiol Pharm, 2016, 94(9): 987-95.
- [19] 李梓萌, 周僮, 高雅, 等. 龙胆苦苷对大鼠肝纤维化Sonic Hedgehog 信号通路的影响[J]. 天然产物研究与开发(LI Z M, ZHOU T, GAO Y, et al. Effects of gentiopicrin on Sonic Hedgehog signaling pathway in rat liver fibrosis. Nat Prod Res Dev), 2020, 32: 946-52.