

## Research Paper

# The Effects of Rosmarinic Acid on the Liver Fibrosis Induced by Non-alcoholic Steatohepatitis in Male Mice



Tahereh Komeili-Movahhed<sup>1</sup> , \*Azam Moslehi<sup>1</sup> 

1. Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.



**Citation** Komeili-Movahhed T, Moslehi A. The Effects of Rosmarinic Acid on the Liver Fibrosis Induced by Non-alcoholic Steatohepatitis in Male Mice. Qom Univ Med Sci J. 2021; 15(1):2-9. <https://doi.org/10.52547/qums.15.1.2>

 <https://doi.org/10.52547/qums.15.1.2>



Received: 13 Mar 2021

Accepted: 20 Apr 2021

### Keywords:

Liver, NASH, Transforming Growth Factor beta, Alpha-smooth muscle actin, Rosmarinic acid

## ABSTRACT

**Background and Objectives:** Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) is a serious and increasing liver disease, which develops into cirrhosis, fibrosis, and hepatocellular carcinoma. Rosmarinic Acid (RA) is a powerful antioxidant and anti-inflammatory compound. Therefore, this study aimed to assess the role of RA on a mouse model of NASH-induced liver fibrosis.

**Methods** In this research, C57/BL6 mice were divided into 4 equal groups, as follows: the control, RA, NASH, and NASH+RA groups. In the third and fourth groups, NASH was induced by Methionine-Choline Deficient (MCD) diet for 8 weeks. In the RA and NASH+RA group, RA was intraperitoneally injected daily for 8 weeks in mice. After 8 weeks, the explored animals were sacrificed and the blood and liver samples were obtained. Then, Trichrome-Masson staining, serum, and molecular analyses were performed.

**Results** After RA administration, the plasma levels of ALT and AST decreased. RA administration also reduced TGF $\beta$  and  $\alpha$ -SMA genes expression. Finally, the histopathological evaluation revealed that RA administration decreased NASH-induced liver fibrosis.

**Conclusion** It seems that RA administration improves NASH-induced liver fibrosis through the inhibition of the  $\alpha$ -SMA/ TGF- $\beta$  signaling pathway.

\* Corresponding Author:

Azam Moslehi, MD.

Address: Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 6510489

E-Mail: moslehi2000@gmail.com

## مقاله پژوهشی

## بررسی نقش رزمارینیک اسید بر فیروز کبدی ناشی از بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش های سوری نر

طاهره کمیلی موحد<sup>۱</sup>، \* اعظم مصلحی<sup>۱</sup>

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

## چکیده

تاریخ دریافت: ۲۳ اسفند ۱۳۹۹  
تاریخ پذیرش: ۳۱ فروردین ۱۴۰۰

**زمینه و هدف:** بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) یک اختلال جدی و رو به افزایش در سراسر جهان است که به صورت فیروز کبدی، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار پیشرفت می کند. رزمارینیک اسید به عنوان یک ترکیب آنتی آکسیدان و ضد التهاب قوی شناخته می شود که اثرات مثبتی بر بهبود آسیب های کبدی دارد؛ این مطالعه جهت بررسی اثر رزمارینیک اسید روی فیروز کبدی ایجاد شده در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش های سوری انجام شد.

**روش بررسی:** موش های سوری نر نژاد C57/BL6 به چهار گروه مساوی شامل کنترل، رزمارینیک اسید NASH، (RA) و NASH+RA تقسیم شدند. در گروه های سه و چهار، استئاتوهپاتیت غیرالکلی با استفاده از رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین و در طی هشت هفته القا شد. در گروه های RA و NASH+RA، حیوانات روزانه رزمارینیک اسید را به شکل داخل صفاقی دریافت کردند. پس از هشت هفته حیوانات کشته شده و نمونه خون و بافت کبد تهیه شد. سپس ارزیابی های بیوشیمیایی و مولکولی و رنگ آمیزی تری کروم ماسون جهت بررسی فیروز کبدی انجام شد.

**یافته ها:** پس از استفاده از رزمارینیک اسید سطوح سرمی Alanine transaminase (ALT) و Aspartate transaminase (AST) کاهش یافت. همچنین رزمارینیک اسید موجب کاهش بیان  $\alpha$ -SMA و TGF- $\beta$  شد و در نهایت ارزیابی های بافت شناسی نشان داد که استفاده از رزمارینیک اسید، فیروز کبدی ایجاد شده به وسیله NASH را کاهش داد.

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد که استفاده از رزمارینیک اسید، فیروز کبدی ایجاد شده در موش های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی را از طریق مهار مسیر سیگنالینگ TGF- $\beta$ / $\alpha$ -SMA بهبود می بخشد.

## کلیدواژه ها:

کبد، فاکتور رشد متغیر  
پتا آکتین عضله صاف  
آلفا، رزمارینیک اسید

## مقدمه

سلول های کوپفر و سلول های ستاره ای کبد<sup>۱</sup> و رهایش سیتوکین ها و کموکین ها از آن ها و در نتیجه التهاب و فیروز در کبد می شود [۴]. مطالعات مختلف نشان داده اند که پیشرفت NASH با درجات مختلفی از فیروز کبدی همراه است [۵، ۶]. فیروز کبدی با تولید غیرطبیعی ماتریکس خارج سلولی، افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی مثل  $\alpha$ -SMA<sup>۲</sup> و  $\alpha$ 1 collagen، desmin و در نهایت افزایش فیبرهای کلاژن در بافت کبد همراه است [۸، ۷].<sup>۵</sup> TGF- $\beta$  به عنوان اصلی ترین سیتوکین پیش فیروزی شناخته می شود که به وسیله سلول های ستاره ای کبد ترشح می شود

امروزه بیماری کبد چرب غیرالکلی یک اختلال شایع و رو به افزایش در سراسر جهان است. این بیماری ناشی از تجمع چربی<sup>۱</sup> در سلول های کبدی است [۱]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده اند که در حدود ۲۰ درصد از موارد کبد چرب غیرالکلی به سمت یک عارضه جدی تر به نام استئاتوهپاتیت غیرالکلی<sup>۲</sup> یا NASH پیشرفت می کنند [۲] که در صورت عدم بهبود می تواند به فیروز کبدی، سیروز و حتی کارسینوم هپاتوسلولار منجر شود [۳]. تجمع بیش از حد چربی در کبد منجر به فعال شدن

3. Hepatic satellite cell
4.  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin
5. Transforming Growth Factor

1. Steatosis
2. Non-alcoholic Steatohepatitis

## \* نویسنده مسئول:

دکتر اعظم مصلحی

نشانی: قم، دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.

تلفن: ۶۵۱۰۴۸۹ (۹۱۲) ۹۸+

رایانامه: moslehi2000@gmail.com

دریافت می‌کردند [۲۲]؛ گروه NASH: حیواناتی بودند که به مدت هشت هفته تحت رژیم فاقد متیونین کولین یا MCD<sup>۶</sup> قرار داشتند تا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در آن‌ها ایجاد شود [۲۳] و گروه NASH+ RA: موش‌هایی بودند که رژیم MCD را به مدت هشت هفته دریافت کرده و هم‌زمان تزریق روزانه همان دُز رزمارینیک اسید را دریافت می‌کردند. بعد از این مدت حیوانات با استفاده از تزریق داروی بیهوشی کتامین گزیلازین بیهوش شدند [۲۴] و یک برش میانی در ناحیه شکمشان ایجاد شد و کبد در معرض دید قرار گرفت. کبد بلافاصله خارج و شسته شد و بخشی از آن در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. بخش دیگری از بافت نیز جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه خون به شکل مستقیم از قلب حیوانات تهیه شد.

#### ارزیابی بیوشیمیایی

نمونه‌های خون با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم تهیه شد. برای اندازه‌گیری غلظت سرمی ALT و AST از دستورالعمل کیت‌های بیوشیمیایی (پارس‌آزمون، ایران) و دستگاه اتوآنالیزر استفاده شد.

#### مطالعات بافت‌شناسی

۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن بخشی از لوب میانی کبد در فرمالین ۱۰ درصد بافت آگیری و با پارافین قالب‌گیری شد. سپس برش‌های ۵ میکرومتری از این قالب‌ها تهیه شد و تحت رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون قرار گرفت و با استفاده از میکروسکپ نوری (OLYMPUS, AX70) جهت بررسی فیبروز کبدی و مشاهده رسوب کلاژن ارزیابی شد.

#### مطالعات مولکولی

جهت بررسی بیان ژن‌های  $TGF-\beta$  و  $\alpha-SMA$  از روش Real-time RT-PCR استفاده شد. در این روش ابتدا RNA از بافت کبد استخراج شد و میزان خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanolytik، آلمان) تعیین شد. سپس از روی آن cDNA به طور معکوس ساخته شد و در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، میزان بیان هر کدام از ژن‌ها به طور کمی با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اندازه‌گیری شد و با میزان بیان ژن GAPDH<sup>۷</sup> مقایسه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در زیر آورده شده است:

A-SMA (F): CCCAGACATCAGGGAGTAATGG

(R) TCTATCGGATACTTCAGCGTCA

TGF $\beta$  (F): CTTCAATACGTCAGACATTCGGG

6. Methionine-choline deficient

7. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

[۱۰، ۹]. افزایش تولید  $TGF-\beta$  به نوبه خود موجب افزایش بیان  $\alpha-SMA$  و  $\alpha-1$  collagen شده و منجر به رسوب رشته‌های کلاژن و فیبروز در کبد می‌شود [۱۱]. تحقیقات انجام‌شده در این زمینه نشان داده است که نارینجین به عنوان یک فلاونوئید با مهار ترشح  $TGF-\beta$  موجب کاهش فیبروز کبدی القاشده به وسیله تتراکلرید کربن شود [۱۲]. همچنین ارسنیک می‌تواند با فعال کردن مسیر  $TGF-\beta$ /Smad و افزایش تولید  $\alpha-SMA$  موجب فیبروز کبدی شود [۱۳].

رزمارینیک اسید یک ترکیب سنتتیک است، اما به فراوانی در گیاهانی چون *Lamiaceae* family including *Ros-marinus officinalis* (R. officinalis) (rosemary)، *Coleus arthymus vul-* و *maticus Origanum vulgare L.* (oregano) *garis L.* (thyme) یافت می‌شود [۱۴]. مطالعات متعدد اثرات مثبت رزمارینیک اسید را بر بهبود دیابت، شوک سیتیک و آسیب‌های کبدی و کلیوی نشان داده‌اند [۱۵، ۱۶]. رزمارینیک اسید با مهار مقاومت به انسولین و افزایش بیان GLUT4 موجب کاهش گلوکز خون می‌شود [۱۷]. همچنین رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی نیز در کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو داشته و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته می‌شود [۱۸، ۱۹، ۱۵]. گزارش شده است که رزمارینیک اسید با کاهش فعالیت مسیر  $TGF-\beta$ 1/SMAD3/ $\alpha-SMA$ ، فیبروز کلیوی ایجادشده توسط کادمیم را بهبود بخشیده است [۲۰]. علاوه بر این مطالعه‌های دیگر نشان داد که رزمارینیک اسید باعث کاهش فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد و کاهش بیان  $TGF-\beta$  و  $\alpha-SMA$  در محیط *in vitro* در کبد شد [۲۱].

با توجه به شیوع و اهمیت بیماری NASH و گسترش آن به سمت فیبروز کبدی و نیز اثرات مثبت رزمارینیک اسید در کاهش التهاب، استرس اکسیداتیو و فیبروز، این مطالعه جهت بررسی اثرات رزمارینیک اسید بر کاهش فیبروز کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر و نقش  $TGF-\beta$  در این زمینه انجام شد.

#### روش بررسی

این مطالعه در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی قم و روی ۲۴ سر موش سوری نر نژاد C57/BL6 در محدوده وزنی ۲۵ تا ۲۷ گرم انجام شد (خریداری شده از انستیتو پاستور، ایران). حیوانات در مدت مطالعه در شرایط استاندارد دمایی (۲۹±۲) درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (۴۵ تا ۴۸ درصد) و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند؛ شامل گروه کنترل: حیواناتی که سالم بوده و از غذای معمولی استفاده می‌کردند؛ گروه RA: حیواناتی که رژیم غذایی معمولی داشته و روزانه به مدت هشت هفته ۱۰ میلی‌گرم / کیلوگرم رزمارینیک اسید را به شکل داخل صفاقی

کبدی به شکل منظم در اطراف مجرای ورید مرکزی قرار گرفته‌اند در حالی که در گروه NASH سلول‌ها بزرگ شده و در دیواره ورید مرکزی و فضای پورت رسوب فیبرهای کلاژن مشاهده می‌شود که به تدریج به سمت سلول‌های اطراف پیشروی کرده است و در گروه NASH+RA این رشته‌ها کاهش یافته و به میزان بسیار کمتری دیده می‌شود (تصویر شماره ۲).

**بررسی اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان ژن‌های  $TGF-\beta$  و  $\alpha-SMA$  کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر**

داده‌های این مطالعه افزایش معنی‌داری در میزان بیان mRNA ژن  $TGF-\beta$  در گروه NASH نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $0.36 \pm 1/66$  در مقابل ۱،  $P < 0.01$ ). در حالی که استفاده از رزمارینیک اسید به مدت هشت هفته در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی موجب کاهش بیان  $TGF-\beta$  در گروه NASH+RA نسبت به گروه NASH شد ( $0.8 \pm 1/01$  در مقابل  $0.36 \pm 1/66$ ،  $P < 0.05$ ). به همین شکل میزان بیان mRNA ژن  $\alpha-SMA$  در گروه NASH نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ( $1.92 \pm 0/14$  در مقابل ۱،  $P < 0.01$ ) و در گروه NASH+RA نسبت به گروه NASH به شکل معنی‌داری کاهش یافت ( $0.82 \pm 0/22$  در مقابل  $1.92 \pm 0/14$ ،  $P < 0.05$ ) (تصویر شماره ۳).

### بحث

فیروز کبدی یک اختلال جدی است که می‌تواند به دنبال بیماری‌هایی چون کله استاز، NASH، داروهای شیمی‌درمانی و مواد شیمیایی مختلف ایجاد شده و کبد را به سمت کارسینوم پیش ببرد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از رزمارینیک اسید موجب کاهش سطح سرمی ALT و AST شده، بیان ژن‌های  $TGF-\beta$  و  $\alpha-SMA$  را مهار کرده و در نهایت موجب

(R) GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA

GAPDH: (F)TGGCCTTCCGTGTTCTAC

(R) GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

### ارزیابی آماری داده‌ها

داده‌های این مطالعه به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شدند. برای ارزیابی آماری و مقایسه بین گروه‌های مختلف از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی<sup>۸</sup> استفاده شد. در تمامی محاسبات،  $P < 0.05$  به عنوان سطح معناداری لحاظ شد.

### یافته‌ها

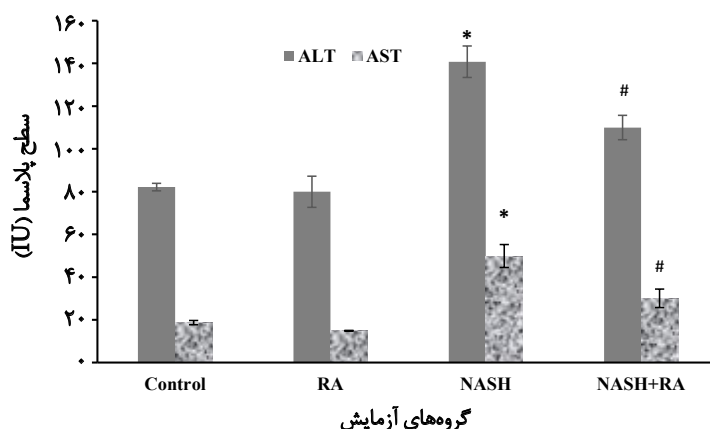
**بررسی اثر رزمارینیک اسید بر غلظت سرمی ALT و AST در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر**

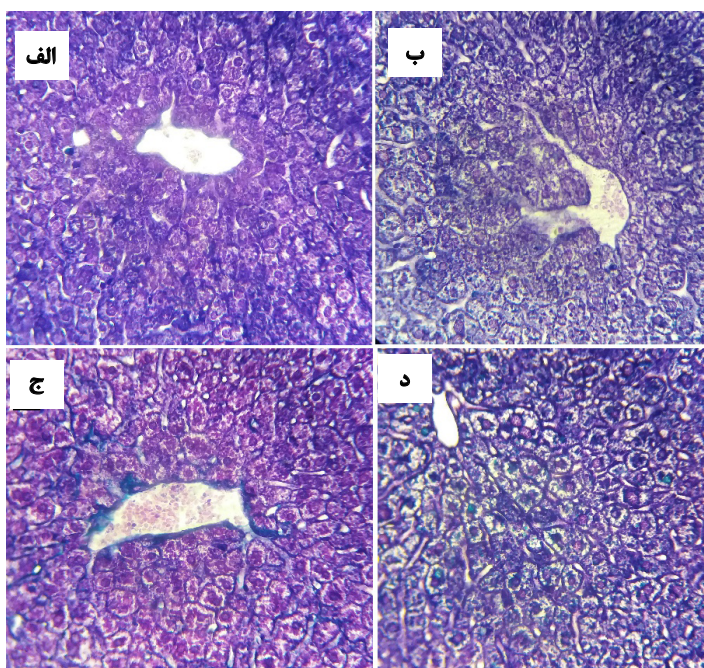
نتایج این مطالعه نشان داد که سطح سرمی ALT و AST در گروه NASH نسبت به گروه کنترل به شکل معنی‌داری افزایش یافته است ( $140.8 \pm 7/37$  و  $49/836 \pm 5/37$  در مقابل  $82/126 \pm 1/76$  و  $18/7 \pm 1$ ، به ترتیب  $P < 0.001$ ) در حالی که غلظت آن‌ها در خون در گروه NASH+RA نسبت به گروه NASH به شکل معنی‌داری کاهش پیدا کرد ( $110 \pm 5/7$  و  $30/063 \pm 4/33$  در مقابل  $140.8 \pm 7/37$  و  $49/836 \pm 5/37$  به ترتیب،  $P < 0.05$ ) (تصویر شماره ۱).

**بررسی اثر رزمارینیک اسید بر تغییرات بافت‌شناسی کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر**

ارزیابی‌ها از مطالعات بافت‌شناسی بیان می‌کنند که در گروه‌های کنترل و RA ساختار کبد طبیعی بوده و سلول‌های

### 8. Tukey





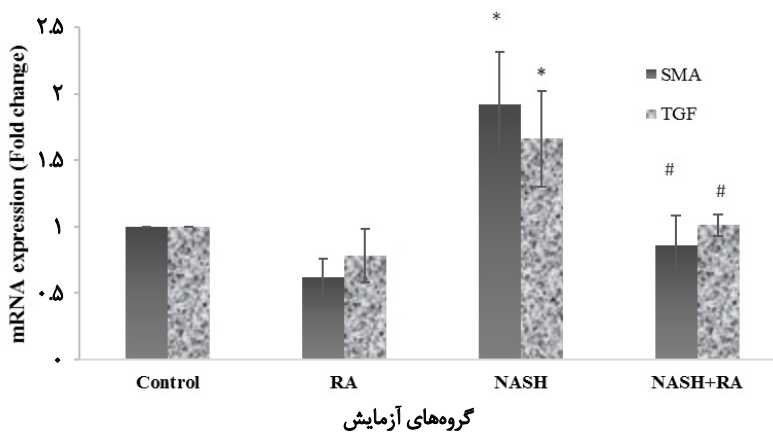
#### تصویر ۲. ارزیابی‌ها از مطالعات بافت‌شناسی

الف: گروه کنترل: ساختمان طبیعی کبد و سلول‌های کبدی را بدون نشانه‌ای از فیبروز و رسوب کلاژن نشان می‌دهد.  
ب: گروه RA: ساختار طبیعی کبد و سلول‌های کبدی را بدون نشانه‌ای از فیبروز و رسوب کلاژن نشان می‌دهد.  
ج: گروه NASH: نشانه‌های فیبروز کبدی و رسوب رشته‌های کلاژن در اطراف ورید مرکزی و انتشار آن‌ها به سمت خارج و در بین سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد.  
د: گروه NASH+RA: نشانه‌های کمتری از فیبروز کبدی و رشته‌های کلاژن در بین سلول‌ها دیده می‌شود.

اسید موجب حفاظت کبد در برابر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در موش‌های سوری مبتلا به NASH می‌شود [۲۵].

یافته‌های از این مطالعه نشان داد که تزریق رزمارینیک اسید به مدت هشت هفته موجب کاهش سطوح سرمی ALT و AST شد. افزایش سطح این دو آنزیم معمولاً نشان‌دهنده آسیب‌های کبدی است و کاهش غلظت خونی آن‌ها نشانه‌ای از بهبود آسیب

کاهش تشکیل و رسوب رشته‌های کلاژن و بهبود فیبروز ناشی از بیماری NASH شده است. رزمارینیک اسید ماده مؤثر اصلی در گیاهانی چون رزماری است. مطالعات انجام‌شده در گذشته نشان داده‌اند که رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی در بهبود استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در بیماری‌های مختلف دارد [۱۷-۱۵]. کیم و همکارانش قبلاً نشان داده‌اند که رزمارینیک



#### تصویر ۳. میزان بیان mRNA $\alpha$ -SMA

\* افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، # افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه NASH

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد رزمارینیک اسید با مهار فعالیت مسیر سیگنالینگ  $TGF-\beta / \alpha-SMA$ ، فیبروز کبدی ایجاد شده در موش‌های سوری مبتلا به NASH را کاهش داده و می‌تواند اثرات مثبتی در بهبود آسیب کبدی ناشی از بیماری NASH در موش‌های سوری داشته باشد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قم این مقاله را تأیید کرده است (کد اخلاق: IR.MUQ.REC.1397.037).

#### حامی مالی

دانشگاه علوم پزشکی قم حامی مالی این پژوهش بوده است.

#### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

ایجاد شده است. در این زمینه کمیلی موحد و همکارانش نشان دادند که استفاده از آلتوتوئین به مدت چهار هفته موجب کاهش غلظت خونی ALT و AST و بهبود آسیب کبدی در موش‌های سوری مبتلا به NASH شد [۲۳]. همچنین حسنین و همکاران گزارش کردند که استفاده از رزمارینیک اسید، آسیب کبدی ناشی از مصرف استامینوفن را بهبود بخشیده و سطوح سرمی ALT و AST را کاهش داده است [۲۴]. در اینجا نیز به نظر می‌رسد که استفاده از رزمارینیک اسید توانسته است که صدمات کبدی ایجاد شده به دلیل بیماری NASH و التهاب ناشی از تجمع بیش از حد تری‌گلیسریدها را بهبود بخشد.

فیبروز کبدی معمولاً در مراحل انتهایی بیماری NASH ایجاد می‌شود و ناشی از فعالیت بیش از حد سلول‌های ستاره‌ای کبد و افزایش رهایش سیتوکین‌های ایجادکننده فیبروز است. ارزیابی‌های بافت‌شناسی در این مطالعه نشان داد که در گروه NASH رسوب فیبرهای کلاژن در فضای پورت و اطراف ورید مرکزی مشاهده می‌شود که به سمت هیپاتوسیت‌ها گسترش یافته‌اند در حالی که استفاده از رزمارینیک اسید موجب کاهش معنی‌داری در رسوب رشته‌های کلاژن و فیبروز کبدی شد. قبلاً جواردار و تیمش نشان داده بودند که رزمارینیک اسید موجب کاهش علائم فیبروز در بافت کلیه موش‌های صحرایی قرار گرفته در معرض کادمیم شده است [۲۰]. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که رزمارینیک اسید، فیبروز ریوی ایجاد شده توسط اشعه ایکس را کاهش داد [۲۷]. همسو با مطالعات گذشته، در اینجا نیز رزمارینیک اسید توانسته است باعث کاهش رسوب کلاژن و بهبود فیبروز کبدی در موش‌های سوری مبتلا به NASH شود.

برای درک بهتر مکانیسمی که به وسیله آن، رزمارینیک اسید موجب بهبود فیبروز کبدی در موش‌های سوری مبتلا به NASH می‌شود، بیان ژن‌های  $TGF-\beta$  و  $\alpha-SMA$  در بافت کبد اندازه‌گیری شد.  $TGF-\beta$  به عنوان یک فاکتور نسخه برداری و اصلی‌ترین عامل در فعال کردن مسیرهای فیبروزی شناخته می‌شود [۱۰]. در واقع با افزایش فعالیت HSC و رهایش سیتوکین‌ها و کموکین‌های التهابی از این سلول‌ها،  $TGF-\beta$  فعال شده و موجب افزایش نسخه‌برداری از ژن‌های سنتزکننده کلاژن مثل  $\alpha-SMA$ ،  $\alpha-1$  lagen و فیبرونکتین می‌شود [۱۱]. در یک پژوهش چن و تیمش بیان کردند که رزمارینیک اسید با مهار مسیر سیگنالینگ  $\alpha-SMA/TGF-\beta$  موجب کاهش فیبروز در سلول‌های اپی‌تلیال شده است [۲۸]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که رزمارینیک اسید با کاهش فعالیت مسیر  $\alpha-SMA/TGF-\beta$  فیبروز را در کله استاز خارج کبدی در موش‌های صحرایی بهبود بخشید [۲۹]. این مطالعات با نتایج ما سازگار است و به نظر می‌رسد که احتمالاً بهبود فیبروز ایجاد شده، ناشی از کاهش فعالیت  $TGF-\beta$  و در نتیجه کاهش ساخت  $\alpha-SMA$  و در نهایت کاهش سنتز و رسوب رشته‌های کلاژن باشد.

## References

- [1] Gottlieb A, Mosthael W, Sowa JP, Canbay A. Nonalcoholic fatty-liver-disease and nonalcoholic steatohepatitis: Successful development of pharmacological treatment will depend on translational research. *Digestion*. 2019; 100(2):79-85. [DOI:10.1159/000493259] [PMID]
- [2] Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10(11):627-36. [DOI:10.1038/nrgastro.2013.149] [PMID]
- [3] Liu W, Baker RD, Bhatia T, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Liff Sci*. 2016; 73(10):1969-87. [DOI:10.1007/s00018-016-2161-x] [PMID]
- [4] Nouredin M, Mato JM, Lu SC. Nonalcoholic fatty liver disease: update on pathogenesis, diagnosis, treatment and the role of S-adenosylmethionine. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015; 240(6):809-20. [DOI:10.1177/1535370215579161] [PMID] [PMCID]
- [5] Anty R, Gual P. [Physiopathologie des stéatoses hépatiques métaboliques [Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (French)]. *Presse Med*. 2019; 48(12):1468-83. [DOI:10.1016/j.lpm.2019.09.051] [PMID]
- [6] Takatani N, Kono Y, Beppu F, Okamatsu-Ogura Y, Yamano Y, Miyashita K, et al. Fucoxanthin inhibits hepatic oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020; 528(2):305-10. [DOI:10.1016/j.bbrc.2020.05.050] [PMID]
- [7] Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: Beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(5):8591-638. [DOI:10.3390/ijms15058591] [PMID] [PMCID]
- [8] Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(48):10512-22. [DOI:10.3748/wjg.v22.i48.10512] [PMID] [PMCID]
- [9] Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: A tale of "second hit". *World J Gastroenterol* 2013; 19(8):1158-65. [DOI:10.3748/wjg.v19.i8.1158] [PMID] [PMCID]
- [10] Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. *TGF-β/SMAD* Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2016; 64(3):157-67. [DOI:10.1369/0022155415627681] [PMID] [PMCID]
- [11] Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor-β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2013; 38(12):612-20. [DOI:10.1016/j.tibs.2013.10.001] [PMID]
- [12] Hernández-Aquino E, Muriel P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. *World J Gastroenterol*. 2018; 24(16):1679-707. [DOI:10.3748/wjg.v24.i16.1679] [PMID] [PMCID]
- [13] Dai J, Xu M, Zhang X, Niu Q, Hu Y, Li Y, et al. Bi-directional regulation of *TGF-β/Smad* pathway by arsenic: A systemic review and meta-analysis of in vivo and in vitro studies. *Life Sci*. 2019; 220:92-105. [DOI:10.1016/j.lfs.2019.01.042] [PMID]
- [14] Hasanein P, Seifi R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018; 96(1):32-7. [DOI:10.1139/cjpp-2017-0135] [PMID]
- [15] Diao J, Wei J, Yan R, Liu X, Li Q, Li L, et al. Rosmarinic Acid suppressed high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by ameliorating the mitochondrial function and activating STAT3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 477(4):1024-30. [DOI:10.1016/j.bbrc.2016.07.024] [PMID]
- [16] Zhang Y, Chen X, Yang L, Zu Y, Lu Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct*. 2015; 6(3):927-31. [DOI:10.1039/C4FO01051E] [PMID]
- [17] Prasannarong M, Saengsirisuwan V, Surapongchai J, Buniam J, Chukijrungsat N, Rattanavichit Y. Rosmarinic acid improves hypertension and skeletal muscle glucose transport in angiotensin II-treated rats. *BMC Complement Altern Med*. 2019; 19(1):165. [DOI:10.1186/s12906-019-2579-4] [PMID] [PMCID]
- [18] Ding Y, Zhang Z, Yue Z, Ding L, Zhou Y, Huanh Z, et al. Rosmarinic Acid Ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in L02 Cells Through MAPK and Nrf2 Pathways. *Rejuvenation Res*. 2019; 22(4):289-98. [DOI:10.1089/rej.2018.2107] [PMID]
- [19] Lu C, Zou Y, Liu Y, Niu Y. Rosmarinic acid counteracts activation of hepatic stellate cells via inhibiting the ROS-dependent MMP-2 activity: Involvement of Nrf2 antioxidant system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017; 318:69-78. [DOI:10.1016/j.taap.2017.01.008] [PMID]
- [20] Joardar S, Dewanjee S, Bhowmick S, Dua TK, Das S, Saha A, et al. Rosmarinic Acid Attenuates Cadmium-Induced Nephrotoxicity via Inhibition of Oxidative Stress, Apoptosis, Inflammation and Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(8):2027. [DOI:10.3390/ijms20082027] [PMID] [PMCID]
- [21] Li GS, Jiang WL, Tian JW, Qu GW, Zhu HB, Fu FH. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*. 2010; 17(3-4):282-8. [DOI:10.1016/j.phymed.2009.05.002] [PMID]
- [22] Zhang X, Ma ZG, Yuan YP, Xu SC, Wei WY, Song P, et al. Rosmarinic acid attenuates cardiac fibrosis following long-term pressure overload via AMPKα/Smad3 signaling. *Cell Death Dis*. 2018; 9(2):102. [DOI:10.1038/s41419-017-0123-3] [PMID] [PMCID]
- [23] Komeili Movahhed T, Moslehi A, Golchoob M, Abadzadeh S. Allantoin improves methionine-choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice through involvement in endoplasmic reticulum stress and hepatocytes apoptosis-related genes expressions. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; 22(7):736-44. [DOI:10.22038/IJBMS.2019.33553.8012]
- [24] Nikoukar LR, Nabavizadeh F, Mohamadi SM, Moslehi A, Harsanzadeh G, Nahrevanian H, et al. Protective effect of ghrelin in a rat model of celiac disease. *Acta Physiol Hung*. 2014; 101(4):438-47. [DOI:10.1556/APhysiol.101.2014.4.5] [PMID]
- [25] Kim M, Yoo G, Randy A, Son YJ, Hong CR, Kim SM, et al. Lemon balm and its constituent, Rosmarinic Acid, alleviate liver damage in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients*. 2020; 12(4):1166. [DOI:10.3390/nu12041166] [PMID] [PMCID]

- [26] Hasanein P, Sharifi M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats. *Pharm Biol.* 2017; 55(1):1809-16. [DOI:10.1080/13880209.2017.1331248] [PMID] [PMCID]
- [27] Zhang T, Ma S, Liu C, Hu K, Xu M, Wang R. Rosmarinic acid prevents radiation-induced pulmonary fibrosis through attenuation of ROS/MYPT1/TGF $\beta$ 1 signaling via miR-19b-3p. *Dose Res.* 2020; 18(4):1559325820968413. [DOI:10.1177/1559325820968413] [PMID] [PMCID]
- [28] Chen YY, Tsai CF, Tsai MC, Chen WK, Hsu YW, Lu FJ. Anti-fibrotic effect of rosmarinic acid on inhibition of pterygium epithelial cells. *Int J Ophthalmol.* 2018; 11(2):189-95. [DOI:10.1177/1559325820968413] [PMID] [PMCID]
- [29] Lin SY, Wang YY, Chen WY, Liao SL, Chou ST, Yang CP, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. *Food Chem Toxicol* 2017; 108(Pt A):214-23. [DOI:10.1016/j.fct.2017.08.005] [PMID]