

文章编号 1006-8147(2023)04-0398-08

论 著

人参皂苷 Rg1 抑制 NLRP3/Caspase-1 通路抵抗肾纤维化的作用研究

滕杰, 陈业刚

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津 300211)

摘要 目的:通过体内实验探讨人参皂苷 Rg1 对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)诱导的人肾小管上皮细胞 HK2 纤维化细胞株中炎症及其抗纤维化的机制。方法:将 HK2 细胞诱导分为对照组、纤维化模型组(2 ng/mL 的 TGF- β 1 诱导纤维化)、低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组(2 ng/mL 的 TGF- β 1+15 μ g/mL 人参皂苷 Rg1)、高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组(2 ng/mL 的 TGF- β 1+45 μ g/mL 人参皂苷 Rg1);Western 印迹及免疫荧光检测结缔组织生长因子(CTGF)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原蛋白(Col-1)表达水平;Western 印迹检测 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)表达水平;透射电镜检测细胞焦亡水平。动物研究将大鼠诱导分为对照组、模型组(单侧输尿管梗阻)、低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组(单侧输尿管梗阻大鼠+50 mg/kg 人参皂苷 Rg1)、高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组(单侧输尿管梗阻大鼠+100 mg/kg 人参皂苷 Rg1);Western 印迹检测肾组织中蛋白表达水平;苏木精-伊红(HE)及 Masson 检测肾脏病理改变及纤维化程度;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中炎症因子表达水平;透射电镜检测组织焦亡水平。结果:细胞实验中,人参皂苷 Rg1 处理后,细胞中 CTGF、 α -SMA、Col I 及 NLRP3、Caspase-1 的表达水平均较模型组以剂量依赖的减低(均 $P<0.05$);细胞焦亡水平显著降低。动物实验中,人参皂苷 Rg1 处理后,大鼠肾组织中 CTGF、 α -SMA、Col I 及 NLRP3、Caspase-1 的表达水平均较模型组以剂量依赖的减低(均 $P<0.05$);血清 TGF- β 1、白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)呈剂量依赖的显著下降(均 $P<0.05$);大鼠肾脏病理改变减轻,胶原沉积减少;组织焦亡水平显著降低。结论:人参皂苷 Rg1 可以通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路抑制肾小管上皮细胞焦亡,进而降低 CTGF、 α -SMA、Collagen I 的表达,从而实现对肾脏的保护作用。

关键词 肾纤维化;人参皂苷 Rg1;细胞焦亡;NLRP3;Caspase-1

中图分类号 R692

文献标志码 A

Effect of ginsenoside Rg1 on inhibition of NLRP3/Caspase-1 pathway against renal fibrosis

TENG Jie¹, CHEN Ye-gang¹

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of ginsenoside Rg1 on inflammatory response and anti-fibrosis in human renal tubular epithelial cell line HK2 fibrotic induced by transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** HK2 cells were grouped into control group, fibrosis model group(2 ng/mL of TGF- β 1 induced fibrosis), low-dose ginsenoside Rg1 treatment group(2 ng/mL of TGF- β 1+15 μ g/mL ginsenoside Rg1), and high-dose ginsenoside Rg1 treatment group(2 ng/mL of TGF- β 1+45 μ g/mL ginsenoside Rg1). Western blotting and immunofluorescence were used to detect the expression of connective tissue growth factor(CTGF), α -smooth muscle actin(α -SMA) and collagen I(Col-1). Western blotting was used to detect the expression of Nod-like receptor protein3(NLRP3) and caspase-1. The level of cellular pyroptosis was detected by transmission electron microscopy. Rats were divided into control group, model group(unilateral ureteral obstruction), low-dose ginsenoside Rg1 treatment group(unilateral ureteral obstruction rats+50 mg/kg ginsenoside Rg1), and high-dose ginsenoside Rg1 treatment group(unilateral ureteral obstruction rats+100 mg/kg ginsenoside Rg1) in animal studies. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the expression level of inflammatory factors in serum. Hematoxylin-eosin staining(HE) and Masson were used to detect renal pathological changes and the degree of fibrosis. Western blotting was used to detect the protein expression level in renal tissues. Transmission electron microscopy was used to detect the level of tissue pyroptosis. **Results:** In cellular experiments, the expression levels of CTGF, α -SMA, Col I, NLRP3 and caspase-1 in cells were reduced in a dose-dependent manner after ginsenoside Rg1 treatment compared with the model group(all $P<0.05$); the level of cell pyroptosis was significantly reduced. In the animal test, the expression levels of CTGF, α -SMA, Col I, NLRP3 and caspase-1 in the kidney tissues of rats after ginsenoside Rg1 treatment were reduced in a dose-dependent manner compared with the model group(all $P<0.05$); the expression levels of TGF- β 1, interleukin-18(IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the serum were reduced in a dose-dependent manner(all $P<0.05$); the pathological changes in rat kidney were alleviated and collagen

基金项目 天津市卫健委中医课题一般项目(2021171)

作者简介 滕杰(1993-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科疾病;通信作者:陈业刚, E-mail: 18822349806@163.com。

deposition was reduced; the level of tissue pyroptosis decreased significantly. **Conclusion:** Ginsenoside Rg1 can inhibit renal tubular epithelial cell pyroptosis by inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway, and reduce the expression of CTGF, α -SMA and Col I, thus achieving a protective effect on the kidney.

Key words renal fibrosis; ginsenoside Rg1; pyroptosis; NLRP3; caspase-1

肾纤维化几乎是所有肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同病理改变^[1],研究肾间质纤维化的机制有助于找到延缓肾脏疾病进展的有效措施。细胞焦亡(pyroptosis)又称细胞炎性坏死,是一种重要天然免疫机制,表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物的释放进而激活强烈的炎症。参与其中的主要信号分子包括:Caspase 家族的部分蛋白、Gasdermin 蛋白家族、炎性小体^[2]。免疫炎症反应是肾脏纤维化过程中的关键因素^[3],而炎性小体 NOD 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)在细胞焦亡中发挥至关重要的作用,故研究 NLRP3、细胞焦亡与各类肾损伤间的关系可以为后续机制的探索和治疗提供新的方向和可能。

人参皂苷 Rg1 属于原人参三醇型皂苷,具有抗炎、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤和抗凋亡等作用,在机体多个组织器官系统中发挥保护作用^[4-5]。有研究证实,人参皂苷 Rg1 能够下调 NLRP3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)通路,抑制肝脏细胞损伤,从而抵抗器官纤维化^[6]。然而关于人参皂苷 Rg1 能否介导 NLRP3/Caspase-1 通路,调控肾脏细胞焦亡,抵抗肾纤维化的研究还相对较少。本研究旨在探究人参皂苷 Rg1 对介导 NLRP3/Caspase-1 通路的调控作用,并对其肾脏保护作用的内在机制进行深入研究及探讨,为临床针对治疗肾纤维化疾病提供实验依据,全面阐明人参皂苷 Rg1 在肾纤维化中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只 6~8 周龄雄性健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重为 180~200 g,购买自斯贝福[许可证:SCXK(京)2019-0010]。大鼠标准环境饲养,自由饮水、进食。

1.2 实验药物与主要试剂 人参皂苷 Rg1 购于北京百奥莱博科技有限公司(批号:0703-201921),人肾小管上皮细胞 HK2 细胞株购于 ATCC 细胞库;DMEM 低糖培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、Collagen I、NLRP3、Caspase-1 单抗均购自 Abcam(美国 CST 公司,批号:ab209780、ab240678、ab138492、ab263899、ab207802)。ELISA

试剂盒购自江苏酶免[转化生长因子(TGF)- β 1、白细胞介素(IL)-18,血清 IL-1 β ,批号:MM-0181R1、MM-71282R1、MM-0040M1]。

1.3 模型制备与分组

1.3.1 细胞培养和药物处理 HK-2 细胞培养在 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清)中,置于 5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中进行传代培养,取对数增殖期的细胞用于后续实验。将 HK-2 细胞分为对照组,即采用普通 DMEM 培养液进行培养;纤维化模型组,用 2 ng/mL 的 TGF- β 1 刺激 HK2 细胞 48 h 诱导成纤维化模型组;低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组,即采用 2 ng/mL 的 TGF- β 1+15 μ g/mL 人参皂苷 Rg1 的 DMEM 培养液进行培养;高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组,即采用 2 ng/mL 的 TGF- β 1+45 μ g/mL 人参皂苷 Rg1 的 DMEM 培养液进行培养。培养 48 h 后,提取蛋白进行后续实验。

1.3.2 动物模型建立 本研究利用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)致大鼠肾间质纤维化模型^[7]。用 5%的戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,常规进行皮肤消毒,在腹部右侧切开并进入腹腔,剥离右肾和输尿管,在肾盂下端输尿管 1/3 处利用缝合线对输尿管进行结扎,随后缝合腹壁组织关闭腹腔,并消毒皮肤手术切口。对侧肾及输尿管不作处理。

1.3.3 分组与给药 40 只雄性健康 SD 大鼠,饲养 1 周后建模,随机分为对照组,即假手术组+生理盐水灌胃;模型组,即单侧输尿管梗阻大鼠+生理盐水灌胃;低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组,即单侧输尿管梗阻大鼠+50 mg/kg 人参皂苷 Rg1;高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组,即单侧输尿管梗阻大鼠+100 mg/kg 人参皂苷 Rg1。每组大鼠每日灌药剂量一致,每日 1 次,连续 2 周。

1.4 Western 印迹实验 样本经过 RIPA 裂解液,裂解后,取上清;提取蛋白后均按照蛋白浓度检测试剂盒的说明操作。所有蛋白质均采用 10%分离胶,5%的浓缩胶进行操作,用已获的各组蛋白质按照每个样本 40 μ g 的上样量,进行电泳、转膜、分别加入 1:1 000 稀释的特异性一抗(CTGF、 α -SMA、collagen type I、NLRP3、Caspase-1),在 4℃反应 24 h,再加入 1:5 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记

山羊抗兔)孵育1 h后,用ECL显色。利用图像分析系统扫描,用 β -actin作为内参照。

1.5 免疫荧光 将上述处理的各组细胞用4%多聚甲醛固定20 min后,吸弃多聚甲醛,用PBS常温润洗3遍,每次5 min;用1%Triton X-100室温通透20 min,用PBS常温润洗3遍,每次5 min;滴加10%的正常山羊血清室温封闭2 h,PBS常温润洗3遍,每次5 min;一抗CTGF(1:100)、 α -SMA(1:100)、collagen type I(1:200)4℃过夜。加荧光二抗(1:5 000)温避光染色1 h。DAPI(1:10 000)避光孵育5 min,PBS常温润洗3遍,每次5 min,封片,固定,荧光显微镜拍照。

1.6 HE染色 肾脏组织石蜡切片(厚度4 μ m)后HE染色,脱水封片,应用正置显微镜观察肾脏组织纤维化程度的变化。

1.7 Masson染色 肾脏组织石蜡切片(厚度4 μ m),烤片,脱蜡水化,Masson染色封片。每只大鼠肾组织切片在光学显微镜(200 \times)下随机选取1个视野,观察并拍照。胶原纤维呈蓝绿色,以蓝绿色为阳性染色。

1.8 ELISA检测大鼠血清中TGF- β 1、IL-18、IL-1 β 根据ELISA试剂盒使用说明配制标准品并绘制标准曲线。分别将组织匀浆10 000 r/min离心5 min,弃去沉淀。分别将中和并稀释后的样品以100 μ L/孔加入相应孔中,室温孵育120 min。洗板5次,加入生物素化抗体100 μ L/孔,室温孵育60 min。洗板5次,加入辣根过氧化物酶标记Streptavidin 100 μ L/孔,封孔后室温避光孵育20 min。洗板5次,加入显色剂TMB溶液100 μ L/孔,封孔后室温避光孵育15~20 min,加入终止液50 μ L/孔,混匀后在450 nm处测定光密度,通过标准曲线测定浓度。

1.9 透射电镜 样品置于2.5%戊二醛中固定2~4 h,磷酸漂洗液漂洗3次,1%锇酸4℃固定2 h;ddH₂O漂洗3次后乙醇梯度脱水,环氧丙烷过渡,812树脂梯度渗透后包埋,60℃聚合,包埋块用Leica UC7型超薄切片机进行半薄定位及超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色切片,用透射电镜观察组织超微结构。

1.10 统计学处理 采用SPSS20.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,同组比较采用配对 t 检验,多组比较采用单因素ANOVA检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷Rg1可降低纤维化模型组中CTGF、 α -SMA和Collagen I的表达水平 免疫荧光及

Western印迹检测人参皂苷Rg1对各组HK2细胞中CTGF、 α -SMA和Collagen I表达水平的影响,与正常组相比,模型组中CTGF、 α -SMA和Collagen I的表达水平明显升高(均 $P<0.001$);而与模型组相比,低人参皂苷Rg1组和高人参皂苷Rg1组中CTGF、 α -SMA和Collagen I的表达水平明显降低(均 $P<0.01$);与低人参皂苷Rg1组相比,高人参皂苷Rg1组中CTGF、 α -SMA和Collagen I的表达水平降低(均 $P<0.05$),见图1。

2.2 人参皂苷Rg1可降低纤维化模型组中NLRP3、Caspase-1的表达水平 与正常组相比,模型组中NLRP3、Caspase-1的表达水平均明显升高(均 $P<0.001$);而与模型组相比,低人参皂苷Rg1组和高人参皂苷Rg1组中NLRP3、Caspase-1的表达水平明显降低(均 $P<0.05$);与低人参皂苷Rg1组相比,高人参皂苷Rg1组中NLRP3、Caspase-1的表达水平降低(均 $P<0.05$),见图2。

2.3 人参皂苷Rg1可以有效抑制细胞焦亡 透射电镜结果显示正常组中HK2细胞形态规整,细胞结构完整,细胞器结构无异常;模型组HK2细胞细胞膜破裂不连续,失去原有细胞结构,细胞核形态异常,细胞器肿胀破裂;低剂量人参皂苷Rg1治疗组细胞肿大变形,细胞膜结构不完整,细胞核正常,细胞器肿胀;高剂量人参皂苷Rg1治疗组细胞细胞形态基本完整,细胞核无异变,细胞器无肿胀(图3)。

2.4 大鼠肾形态观察 不同大鼠在饲养2周后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定大鼠,剥离周围肾周围结缔组织摘取大鼠双侧肾组织,液氮保存。正常肾脏外观形态完整,色泽红润且表面光滑;模型组大鼠肾脏体积明显增大,肾实质变薄,切开后可见大量液体滞留;低、高剂人参皂苷Rg1治疗组大鼠肾脏较模型组大鼠肾脏外观改变较轻,且高剂量治疗组较低剂量治疗组外观改变不明显,但较正常肾仍有缺血性表现(图4A)。

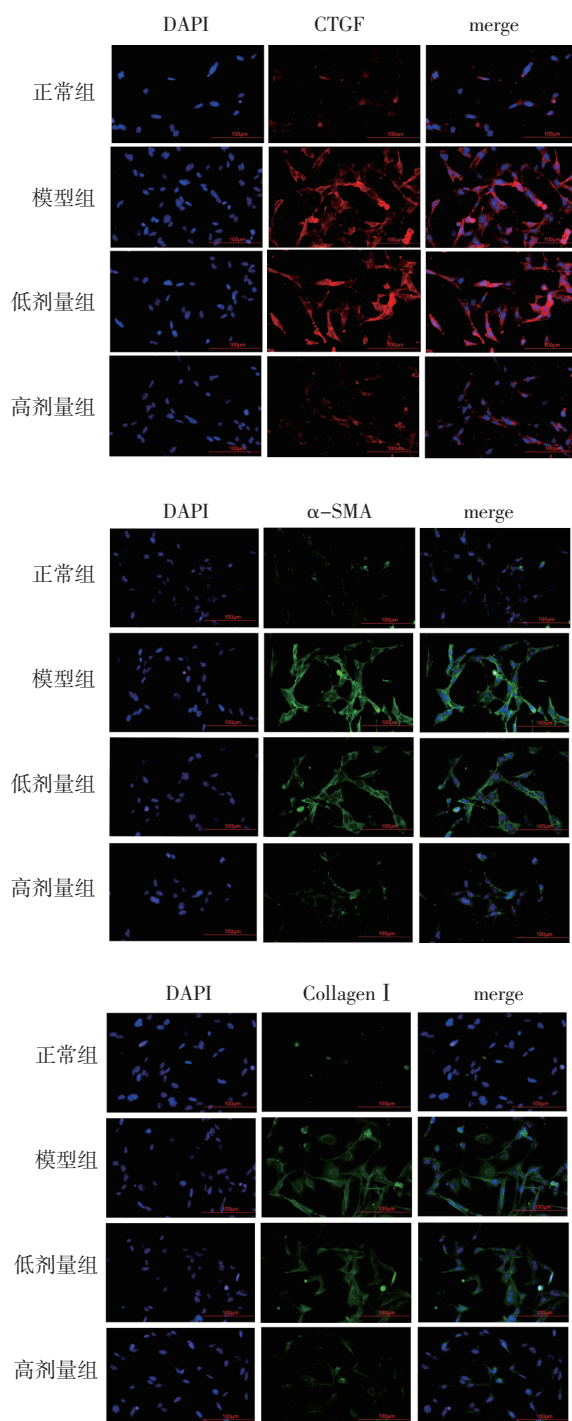
2.5 人参皂苷Rg1可减轻纤维化病理改变及减少胶原沉积 HE染色结果显示,假手术组肾小管结构基本正常,上皮细胞排列规则,无炎症细胞浸润及系膜增生;肾小球结构完整,形态规则。模型组大鼠可见系膜增生,细胞外基质沉积、实质细胞减少,肾小管不规则呈扩张或萎缩,部分肾小管刷状缘虫蚀样改变;肾间质有较多炎症细胞浸润,间质纤维组织增生,肾小球硬化且形态不规则,基底膜增厚。与模型组比较,人参皂苷Rg1治疗组肾间质病变较轻,轻度系膜增生,肾小管轻度扩张或萎缩,炎性细胞浸润较模型组减少,且随着人参皂苷Rg1治疗剂量

的增加,肾脏纤维化程度有所减轻(图 4B)。

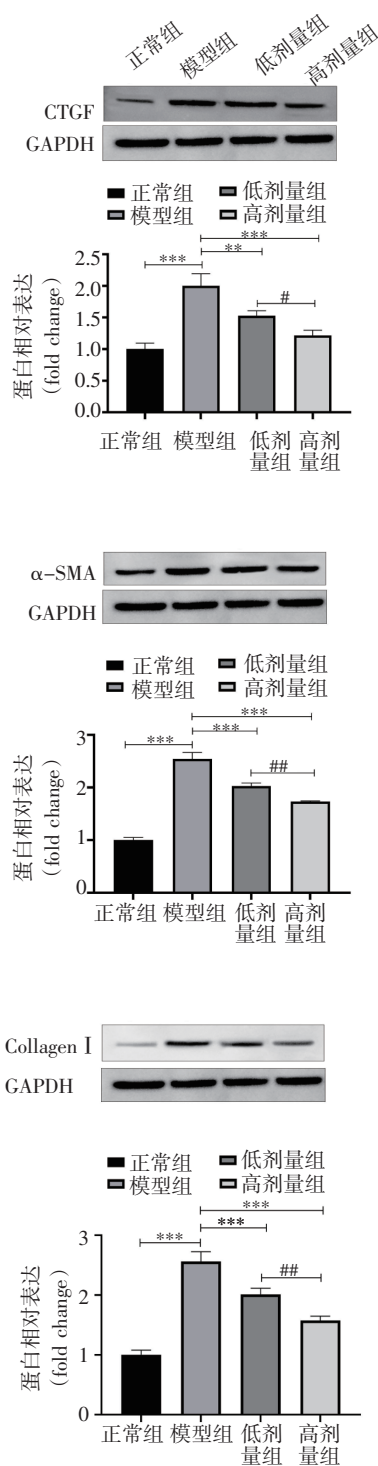
Masson 染色结果显示,正常组大鼠肾脏组织蓝色胶原沉积少;模型组大鼠肾脏组织大量胶原纤维

沉积,间质范围增宽;人参皂苷 Rg1 治疗大鼠肾脏组织较模型大鼠组胶原沉积减少,且高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组明显减少(图 4B)。

A



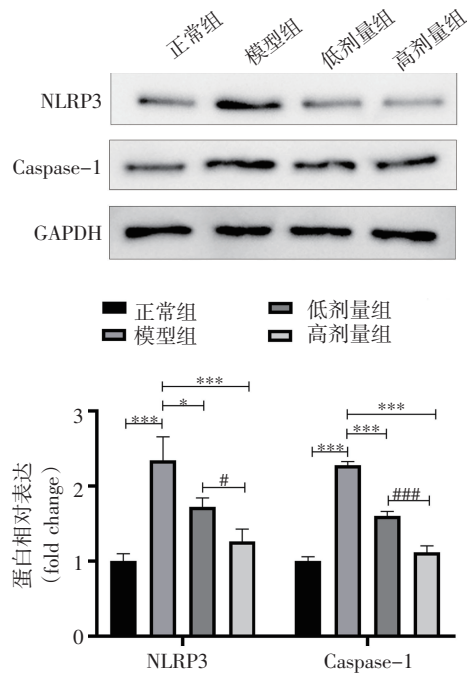
B



注:A:不同组细胞免疫荧光结果;B:不同组细胞 Western 印迹结果;CTGF:结缔组织生长因子;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;Collagen I: I 型胶原蛋白;正常组:正常对照组;模型组:纤维化模型组;低剂量组:低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组;高剂量组:高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组;免疫荧光实验中红色代表 CTGF,绿色分别代表 α-SMA 和 Collagen I,颜色面积越大则代表蛋白表达含量越高; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 免疫荧光及 Western 印迹检测 CTGF、α-SMA、I 型胶原蛋白的表达

Fig 1 Detection of CTGF, α-SMA and Collagen I expression by immunofluorescence and Western blotting



注: NLRP3: 炎性小体 NOD 样受体蛋白 3; Caspase-1: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; 正常组: 正常对照组; 模型组: 纤维化模型组; 低剂量组: 低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组; 高剂量组: 高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

图 2 Western 印迹检测不同细胞分组中 NLRP3、Caspase-1 的表达水平

Fig 2 Western blotting detected the expression levels of NLRP3 and Caspase-1 in different cell groups

2.6 人参皂苷 Rg1 可降低大鼠肾组织中 CTGF、 α -SMA 和 Collagen I 表达水平 Western 印迹检测人参皂苷 Rg1 对 UUO 大鼠肾脏组织中 CTGF、 α -SMA 和 Collagen I 表达水平的影响, 与正常对照组相比,

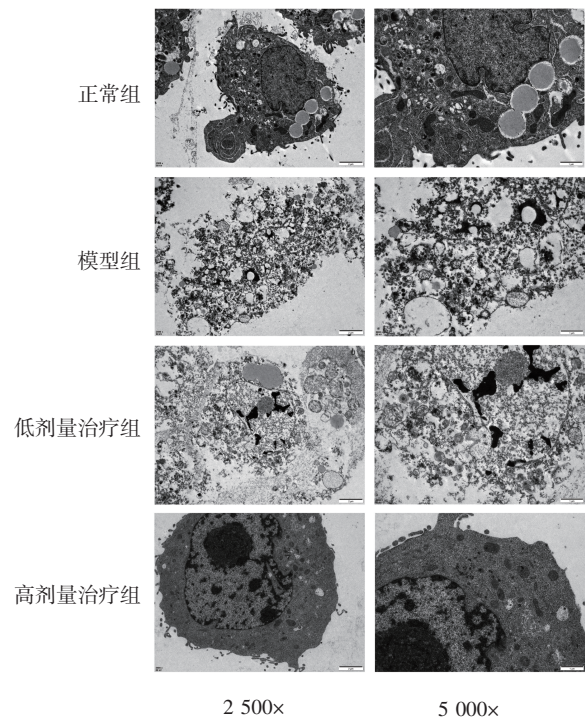
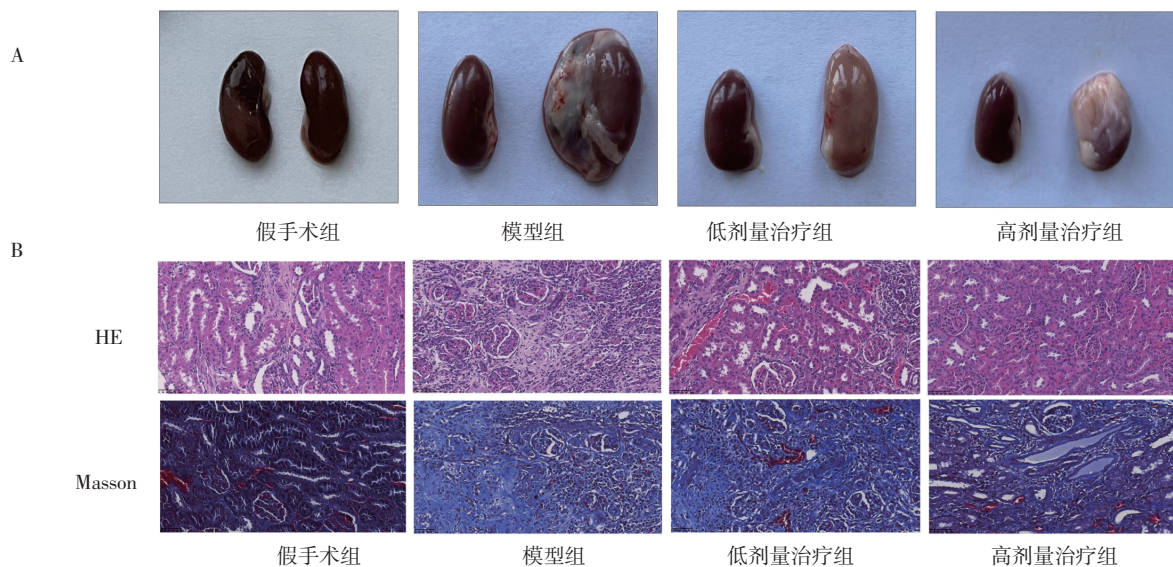


图 3 透射电镜检测不同细胞组中 HK2 细胞焦亡水平

Fig 3 Transmission electron microscopy detected the level of HK2 cell pyroptosis in different cell groups

模型组中 CTGF、 α -SMA 和 Collagen I 的表达水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 低剂量人参皂苷 Rg1 组和高剂量人参皂苷 Rg1 组中 CTGF、 α -SMA 和 Collagen I 的表达水平明显降低 (均 $P < 0.01$); 与低剂量人参皂苷 Rg1 组相比, 高剂量人参皂苷 Rg1 组中 CTGF、 α -SMA 和 Collagen I 的表达水平降低 (均 $P < 0.05$) (图 5A)。



注: A: 不同大鼠饲养 2 周后肾脏形态变化; B: 不同组大鼠肾脏 HE 及 Masson 染色; Masson 染色 (200x): 胶原纤维呈蓝绿色, 以蓝绿色为阳性染色, 蓝绿色越深则说明纤维化程度越高; 低剂量治疗组: 低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组; 高剂量治疗组: 高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组

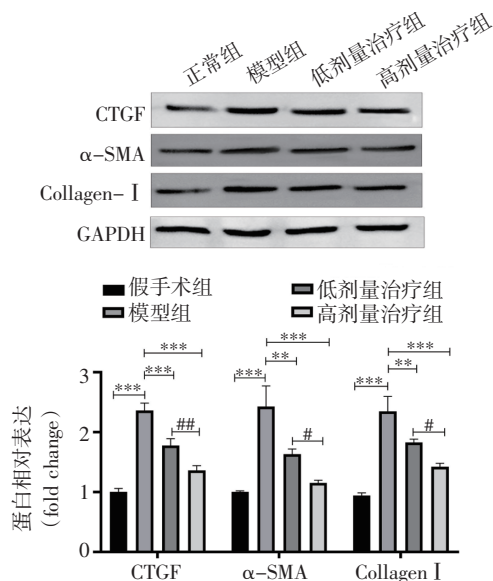
图 4 不同组大鼠肾脏外观改变及病理改变比较

Fig 4 Comparison of renal appearance and pathological changes in rats in different groups

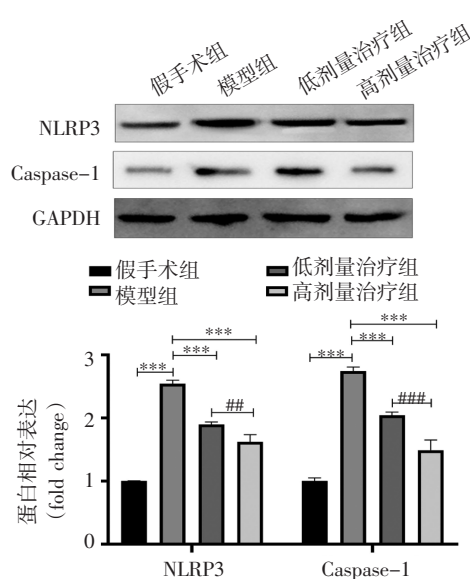
2.7 人参皂苷 Rg1 可降低大鼠肾组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平 与正常对照组相比, 模型组中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平明显升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 低人参皂苷 Rg1 组和高

人参皂苷 Rg1 组中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平明显降低 (均 $P<0.001$); 与低人参皂苷 Rg1 组相比, 高人参皂苷 Rg1 组中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平降低 (均 $P<0.01$) (图 5B)。

A



B



注: A: Western 印迹检测不同大鼠肾组织中 CTGF、α-SMA 和 Collagen I 的表达情况; B: Western 印迹检测不同大鼠肾组织中 NLRP3、Caspase-1 的表达情况; CTGF: 结缔组织生长因子; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白; Collagen-I: I 型胶原蛋白; NLRP3: 炎症小体 NOD 样受体蛋白 3; Caspase-1: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; 低剂量组: 低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组; 高剂量组: 高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$

图 5 不同组大鼠中纤维化相关蛋白及 NLRP3/Caspase-1 通路蛋白表达情况

Fig 5 Expression of fibrosis-related proteins and NLRP3/Caspase-1 pathway proteins in different groups of rats

2.8 人参皂苷 Rg1 可以有效抑制大鼠肾脏组织细胞焦亡 透射电镜结果显示, 假手术组大鼠肾脏组织细胞形态完整, 细胞膜结构完整, 细胞器结构无异常; 模型组中肾脏组织细胞肿胀, 细胞膜不连续, 细胞器肿胀破裂, 组织内出现多个空泡, 细胞核结构正常; 低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组肾脏细胞肿大变形, 细胞膜结构不完整, 细胞器肿胀、扩张, 细胞核正常; 高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组肾脏细胞形态基本完整, 细胞核无异变, 细胞器基本无肿胀 (图 6)。

2.9 人参皂苷 Rg1 可降低大鼠血清中炎症因子 TGF-β1、IL-18、IL-1β 表达水平 ELISA 实验检测结果显示, 模型组大鼠血清中的 TGF-β1、IL-18、IL-1β 表达水平显著高于正常组大鼠 (均 $P<0.001$); 与模型组相比, 低人参皂苷 Rg1 组和高人参皂苷 Rg1 组中大鼠血清中的 TGF-β1、IL-18、IL-1β 表达水平明显降低 (均 $P<0.001$); 与低人参皂苷 Rg1 组相比, 高人参皂苷 Rg1 组中大鼠血清中的 TGF-β1、IL-18、IL-1β 的表达水平降低 (均 $P<0.001$, 见图 7)。

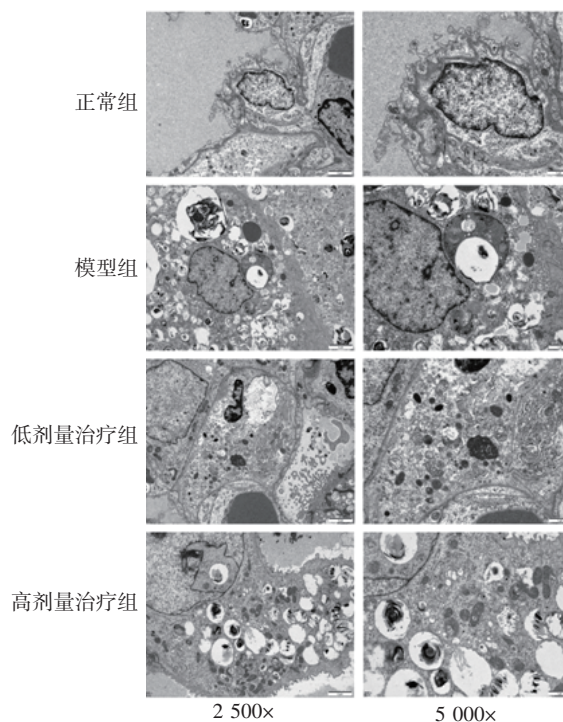
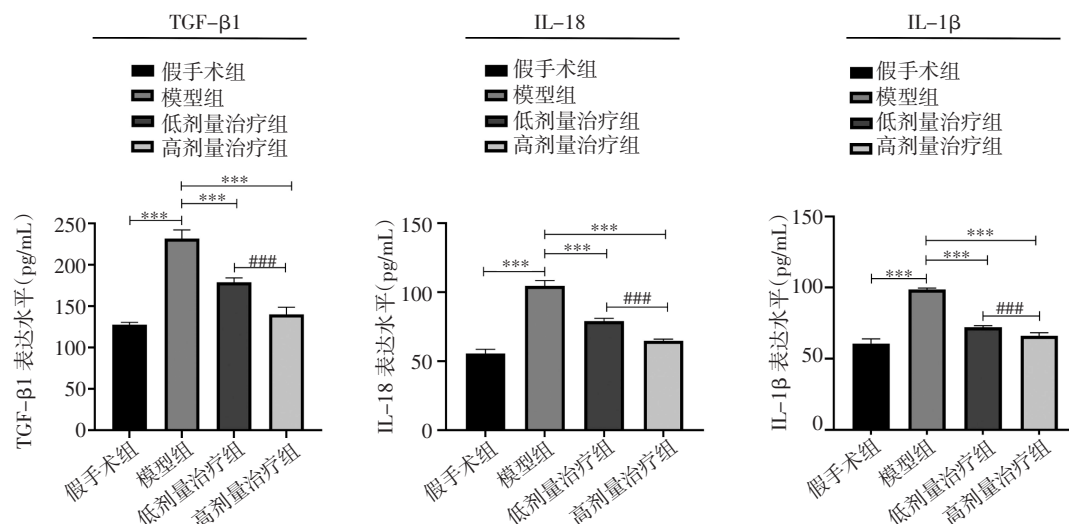


图 6 透射电镜检测不同组中大鼠肾脏组织细胞焦亡水平

Fig 6 Transmission electron microscopy detected the level of pyroptosis in rat kidney tissue in different groups



注:TGF-β1:转化生长因子-β1;IL-18:白细胞介素-18;IL-1β:血清白细胞介素-1β;低剂量组:低剂量人参皂苷 Rg1 治疗组;高剂量组:高剂量人参皂苷 Rg1 治疗组;*** $P<0.001$;### $P<0.001$

图 7 ELISA 检测不同组中大鼠肾脏组织中炎症因子 TGF-β1、IL-18、IL-1β 的表达水平

Fig 7 ELISA detected the expression of inflammatory factors TGF-β1, IL-18 and IL-1β in kidney tissue of rats in different groups

3 讨论

肾纤维化是慢性肾疾病持续进展的重要原因,其主要表现为细胞外基质沉积、实质细胞减少,炎症细胞浸润,肾脏结构破坏、功能减退,最终导致肾脏功能衰竭,早期纤维化阶段被普遍认为具有可逆性^[8],因此发现一种高效、低毒的抗肾纤维化天然产物一直是临床的迫切需要。

我国关于人参的研究以及应用已有 4 000 多年的历史^[9-10]。Xu 等^[11]研究发现,人参皂苷 Rg1 能显著抑制阿霉素诱导的自噬体形成和内质网扩张。Guan 等^[12]研究发现,人参皂苷 Rg1 能显著降低小鼠肺纤维化中 TGF-β1、Smad 2 和 Smad 3 在小鼠肺组织中的蛋白和 mRNA 表达,显著增强 Smad 7 的表达。Xie 等^[13]研究发现,人参皂苷 Rg1 显著减轻了 UUO 引起的肾小管间质损伤和胶原沉积,降低 TGF-β1 水平,从而起到抑制肾间质纤维化的作用。广泛的研究揭示了纤维化的复杂机制,包括各种细胞类型、因子、信号通道和基因。其中,细胞外基质沉积、α-SMA、Collagen I、CTGF 表达、TGF-β1/Smads 信号通路是目前公认的器官纤维化作用靶点^[14-15]。本次研究中,作者发现人参皂苷 Rg1 能够明显减少 CTGF、α-SMA 和 Collagen I 在细胞及大鼠肾脏纤维化模型中的表达水平,且随治疗剂量增加,治疗效果越加明显;大鼠肾脏形态改变及肾脏细胞缺血程度在经人参皂苷 Rg1 治疗后也出现明显改善,且肾组织胶原沉积及肾间质病理改变明显减轻,这些结果与文献报道一致。

虽然人参皂苷抗纤维化效果显著,但肾纤维化相关机制的研究相对较少,尤其是人参皂苷 Rg1 在肾纤维化中的作用机制,有待进一步诠释。

细胞焦亡是近年新发现的一种促炎性程序性细胞死亡方式,参与多种肾脏病发病及纤维化过程^[16]。细胞焦亡表现为细胞胀大、细胞膜破裂,细胞内容物释放激活强烈的炎症。本研究中细胞以及组织透射电镜结果显示,在模型组中细胞胀大且有细胞膜破裂的现象,经过人参皂苷 Rg1 处理后,细胞胀大及细胞膜破裂现象显著降低,由此证实人参皂苷 Rg1 能够显著抑制肾组织或者细胞病变,抵抗细胞发生细胞焦亡,抵抗肾组织细胞病变。这些结果与文献报道一致。

在受到刺激时,炎症小体 NLRP3 发生寡聚,诱导 Caspase-1 活化,激活细胞焦亡途径,促进促炎细胞因子 IL-18 及 IL-1β 的活化^[17]。促炎细胞因子 IL-18 及 IL-1β 可以引发与感染、炎症和自身免疫过程相关的多种生物学效应,进而参与纤维化的发生,是导致肾脏纤维化的关键细胞因子。有研究表明,人参皂苷 Rg1 可以通过 NLRP3/Caspase-1 通路抑制细胞焦亡而减轻心肌、视网膜、神经系统等病变^[18-20]。在本研究中,笔者发现人参皂苷 Rg1 可以明显减少细胞及大鼠纤维化模型组中的 NLRP3 及 Caspase-1 的表达含量;抑制组织中炎症因子 TGF-β1、IL-18 及 IL-1β 释放,抑制肾脏组织及细胞发生细胞焦亡,抵抗肾纤维化,保护肾脏的功能。

综上所述,人参皂苷 Rg1 可以通过抑制 NLRP3/

Caspase-1 通路进而抑制肾小管上皮细胞焦亡,同时通过降低 CTGF、 α -SMA 及 Collagen I 的表达,实现对肾脏的保护作用。

参考文献:

- [1] ALLINOVI M, DE CHIARA L, ANGELOTTI M L, et al. Anti-fibrotic treatments: a review of clinical evidence[J]. Matrix Biol, 2018, 68-69: 333-354.
- [2] 刘紫琦, 杜玄一. 细胞焦亡在急性肾损伤中的研究进展[J]. 中国血液净化, 2021, 20(11): 762-765.
- [3] LV W S, BOOZ G W, WANG Y G, et al. Inflammation and renal fibrosis: recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820: 65-76.
- [4] 吴胜斌, 王应灯. 人参皂苷 Rg1 对肾间质纤维化大鼠肾组织肝细胞生长因子及转化生长因子- β 1 的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(5): 422-425.
- [5] WU J, SAOVIENG S, CHENG I S, et al. Ginsenoside Rg1 supplementation clears senescence-associated β -galactosidase in exercising human skeletal muscle[J]. J Ginseng Res, 2019, 43(4): 580-588.
- [6] LI Y, ZHANG D D, LI L, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates aging⁺ induced liver fibrosis by inhibiting the NOX4/NLRP3 inflammasome in SAMP8 mice[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(5): 801.
- [7] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 845-852.
- [8] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309-326.
- [9] DUAN L, XIONG X J, HU J Y, et al. Panax notoginseng saponins for treating coronary artery disease: a functional and mechanistic overview[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 702.
- [10] MANCUSO C, SANTANGELO R. Panax ginseng and panax quinquefolius: from pharmacology to toxicology[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 107(PtA): 362-372.
- [11] XU Z M, LI C B, LIU Q L, et al. Ginsenoside Rg1 prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through the inhibition of autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): E3658.
- [12] GUAN S B, LIU Q, HAN F F, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates cigarette smoke-induced airway fibrosis by suppressing the TGF- β 1/smad pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 6510198.
- [13] XIE X S, LIU H C, YANG M, et al. Ginsenoside Rb1, a panoxadiol saponin against oxidative damage and renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction[J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(2): 133-140.
- [14] TANG, G, LI, S, ZHANG C, et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2749-2767.
- [15] 王悦彤, 徐薇, 李现成, 等. 益血降浊汤对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞 α -SMA 表达的影响[J]. 云南中医中药杂志, 2019, 40(10): 68-72.
- [16] 孙晓怡, 姜玉勤, 唐余燕, 等. 细胞焦亡机制及其在多种肾脏病中的作用[J]. 中国医药导报, 2021, 18(33): 53-56.
- [17] KELLEY N, JELTEMA, D, DUAN, Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328.
- [18] 阚晨静. 基于细胞焦亡 NLRP3/Caspase-1 通路探究人参皂苷 Rg1 对心肌纤维化的作用机制[D]. 南京中医药大学, 2022.
- [19] 龙俊鹏, 孙洋, 刘莎莎, 等. 人参皂苷 Rg1 的神经保护作用研究进展[J]. 药学报, 2023, 1: 14.
- [20] 李彬, 张大传, 李学望, 等. 人参皂苷 Rg1 抑制 NLRP3 炎症小体对 2 型糖尿病小鼠视网膜病变的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 476-483.

(2023-01-17 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对医学符号的使用说明

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是英文 \bar{x} , 卡方的符号是希腊字母 χ^2 , 自由度的符号是希腊文“ ν ”, 样本的相关系数是英文“ r ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++} 、 P^{--} 、 Al^{+3} 、 O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如 ^{131}I 、 ^{32}P 。表示激发状态的 m 写在右上角,例如: $^{99}\text{Tc}^m$ 、 $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成 ^{131}I 碘、 ^{133}In 钢^m等。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部