

人参皂苷 Rg₃ 对 H₂O₂ 诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制研究

吴胜斌, 王应灯*

上海交通大学医学院附属第九人民医院 肾内科, 上海 200011

摘要: 目的 探究人参皂苷 Rg₃ 对 H₂O₂ 诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其作用机制。方法 采用 H₂O₂ 诱导建立人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型。以不同浓度的人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞预处理 24 h, 采用 CCK-8 试验、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒以及丙二醛 (MDA) 测定试剂盒分别检测细胞凋亡数量、细胞培养液中 LDH 水平和 MDA 含量。通过流式细胞术、qRT-PCR 以及 Western blotting 检测细胞周期、CDK4 的 mRNA 水平和蛋白表达。结果 400 μmol/L H₂O₂ 培养细胞 4 h 能够建立稳定有效的人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型。随着人参皂苷 Rg₃ 浓度的增加, 被 H₂O₂ 损伤的细胞的凋亡数量、细胞外 LDH 活性、细胞产生的 MDA 的含量均明显下降。40 μmol/L 人参皂苷 Rg₃ 可以把人肾小球系膜细胞的细胞周期阻滞在 G1 期, 下调 CDK4 的 mRNA 水平和蛋白表达水平。结论 人参皂苷 Rg₃ 可以通过抑制 CDK4 而对人肾小球系膜细胞氧化应激损伤发挥保护作用。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 人肾小球系膜细胞; 氧化应激; 保护作用

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)12-1437-06

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.12.002

Protection of ginsenoside Rg₃ on oxidative stress injury of human glomerular mesangial cells induced by H₂O₂ and its mechanism

WU Sheng-bin, WANG Ying-deng

Department of Nephrology, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract: Objective To investigate protective effects of ginsenoside Rg₃ on oxidative stress injury of human glomerular mesangial cells induced by H₂O₂ and to explore its mechanism. **Methods** Oxidative stress injury models on human glomerular mesangial cells induced by H₂O₂ were established. Human glomerular mesangial cells were pretreated for 24 h by various concentrations of ginsenoside Rg₃, then activity of cells, activity of LDH, and contents of MAD in culture medium were detected by CCK-8 test, LDH kit, and MDA kit. Cell cycle, mRNA level and protein express of CDK4 were determined by flow cytometry, qRT-PCR, and Western blotting. **Results** Stable and effective models of oxidative stress injury of human glomerular mesangial cells were established by 400 μmol/L H₂O₂ cultured for 24 h. With the increase of concentrations of ginsenoside Rg₃, the amount of apoptotic cells damaged by H₂O₂ reduced, activity of LDH, and contents of MAD in culture medium were increased. Ginsenoside Rg₃ with concentration of 40 μmol/L could block cell cycle in G1 phase, and down-regulate mRNA and protein expresses of CDK4 of human glomerular mesangial cells. **Conclusion** Ginsenoside Rg₃ has protective effect on glomerular mesangial cells against oxidative stress injury of human glomerular mesangial cells induced by H₂O₂ which may be related to reduction of CDK4.

Key words: ginsenoside Rg₃; human glomerular mesangial cells; oxidative stress; protective effect

糖尿病肾病是糖尿病的第二大并发症,也是引发终末期肾病的主要原因。有统计数据显示,在美国约有 42% 的接受肾替代疗法的患者是糖尿病肾病患者^[1]。肾小球系膜是一种位于肾小球毛细血管袢

收稿日期: 2015-10-30

作者简介: 吴胜斌 (1973-), 男, 上海人, 主治医师, 1996 年毕业于上海第二医科大学, 2012 年攻读上海交通大学医学院内科学硕士学位, 从事中西医结合治疗慢性肾脏病的临床工作和基础研究。Tel: 13601907108 E-mail: wushengbin@medmail.com.cn

*通信作者 王应灯 (1969-), 男, 安徽铜陵人, 副主任医师, 硕士生导师, 1993 年毕业于安徽医科大学医疗系, 2001 年取得第四军医大学内科学硕士, 从事各种慢性肾脏病诊治和血液净化的临床工作和基础研究。Tel: 13761354308 E-mail: wangyd7001@sina.com

之间的特殊间充质,由系膜基质和系膜细胞组成。近年来研究显示,诸如高糖、超氧化物、炎症因子、血管紧张素 II 等多种因素的刺激均可能导致肾小球系膜细胞造成氧化应激损伤,并有可能最终发展为糖尿病肾病。因此以肾小球系膜细胞为研究对象,寻找合适的药物修复其在特殊情况下导致的氧化应激损伤或许能够提高肾小球系膜细胞抵御氧化应激损伤的能力,具有重要的科研意义和临床价值。人参皂苷 Rg₃ 是人参中提取出来的一种活性成分,具有广泛且重要的用药价值。研究表明人参皂苷 Rg₃ 具有抗肿瘤、清除氧自由基、抗氧化、抗缺血再灌注损伤等多种生理功能^[2-3]。本实验利用 H₂O₂ 诱导建立人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型,通过部分细胞实验及分子生物学实验探讨人参皂苷 Rg₃ 对肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人肾小球系膜细胞购自中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 试剂及仪器

H₂O₂、Tempol (国药集团化学试剂有限公司); CDK4 单克隆抗体 (Abcam 公司); PrimeScript 1 st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit ([宝生物工程(大连)有限公司]; CCK-8 试剂盒[东仁化学科技(上海)有限公司]; 细胞周期与凋亡检测试剂盒 (Life Technologies 公司); 丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成科技有限公司); 20(S)-人参皂苷 Rg₃ (中国食品药品检定研究院提供, HPLC 分析质量分数 >95%)。

电热恒温水浴槽 (上海精宏实验设备有限公司); 蛋白质电泳槽 (伯乐生命医学产品有限公司); 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); PCR 仪、实时定量 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; NanoDrop 2000 (赛默飞世尔科技公司); 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); 二氧化碳恒温培养箱 (日本 ASTEC); 倒置生物显微镜 (OPTEC 公司); MoFlo XDP 流式细胞仪 (Beckman Coulter 有限公司)。

2 方法

2.1 H₂O₂ 诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型的建立

当培养瓶中人肾小球系膜细胞融合率达到 80%

左右时,以 2.5 mg/mL 胰酶消化细胞,使用 DMEM 培养基调节细胞密度至 3×10^5 /mL,每孔 200 μ L 铺至 96 孔培养板。培养 24 h 后吸弃培养基,然后各自加入 200 μ L 含有 H₂O₂ 浓度分别为 100、200、300、400、500 μ mol/L 的 DMEM 培养液,培养 4 h。然后每孔加入 CCK-8 试剂 8 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h 后用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

对照组人肾小球系膜细胞的细胞存活率记为 100%。筛选细胞存活率在 50%~80% 的实验组加入的 H₂O₂ 浓度,把这个浓度作为最佳的诱导浓度来建立 H₂O₂ 体外诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型。

2.2 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护

根据既往研究^[4-5],人参皂苷 Rg₃ 浓度定为 10~50 μ mol/L。含人参皂苷 Rg₃ 10、20、30、40、50 μ mol/L 的 DMEM 培养液预处理人肾小球系膜细胞 24 h,用 100 μ mol/L 抗氧化剂 Tempol 作为对照,然后通过 2.1 项下探索出的最适 H₂O₂ 浓度诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤,采用 CCK-8 (cell counting kit-8) 试验、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒以及丙二醛 (MDA) 测定试剂盒分别检测人参皂苷 Rg₃ 对氧化应激受损细胞的细胞活力和细胞培养液中 LDH、MDA 含量的影响。具体实验步骤参照试剂盒说明操作。

2.3 细胞周期实验

将细胞接种在 6 孔板,待细胞长到 50% 时,48 h 后用胰酶消化细胞,离心并收集细胞;用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入预冷的 70% 乙醇,于 -20 $^{\circ}$ C 固定过夜;离心后用 PBS 洗涤 1 次,然后加入 100 μ g/mL 碘化丙啶 250 μ L、RNase A 250 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;最后用流式细胞仪检测样品,并用流式细胞分析软件 FlowJo 分析结果。

2.4 qRT-PCR 法

先用 Trizol 法提取人肾小球系膜细胞的总 RNA,然后通过 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit 制备 mRNA 定量的 cDNA 模板,得到反转录 cDNA 模板后,选择 SYBR Premix Ex Taq II 进行 Real Time PCR。

2.5 Western blotting 法

收集好待提蛋白的细胞,加入适量 RIPA 裂解

液以获得所需胞内蛋白,用 Lowry 法测定蛋白浓度后,将 5×蛋白上样缓冲液与蛋白溶液按 1:4 体积比混合并煮沸 5 min,使得蛋白充分变性以配制蛋白样品。然后将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将蛋白从胶转移至 PVDF 膜上,然后通过封闭、一抗孵育、二抗孵育后用 ECL 显色液显色,并在凝胶成像仪中成像。

2.6 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行整理和统计分析。计

量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's *t*-test 对资料进行统计分析。

3 结果

3.1 人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型的建立

选择了 100~500 μmol/L H₂O₂ 短时间处理人肾小球系膜细胞,检测细胞存活率随着时间的变化情况,见表 1。结果表明处理 4 h 效果良好,处理 8 h 时间过长,故不选择。CCK-8 实验结果表明,细胞存活率与 H₂O₂ 浓度呈明显负相关。

表 1 不同浓度 H₂O₂ 对人肾小球系膜细胞细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of various concentrations of H₂O₂ on cell activity of human glomerular mesangial cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	处理 2 h		处理 4 h		处理 8 h	
		A _{450 nm}	存活率/%	A _{450 nm}	存活率/%	A _{450 nm}	存活率/%
对照	—	0.98±0.04	100.0	0.82±0.03	100.0	0.72±0.03	100.0
H ₂ O ₂	100	0.93±0.03	94.8	0.62±0.05*	75.9	0.41±0.08*	56.9
	200	0.91±0.05	92.9	0.60±0.04*	73.2	0.39±0.06*	54.2
	300	0.92±0.03*	93.9	0.59±0.04*	71.9	0.35±0.05*	48.6
	400	0.87±0.02*	88.8	0.45±0.01*	54.9	0.27±0.02*	37.5
	500	0.85±0.02*	86.7	0.29±0.01*	35.4	0.21±0.02*	29.2

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

培养液 LDH 活性随着 H₂O₂ 浓度上升而显著增加,见表 2。当 H₂O₂ 浓度达到 400 μmol/L 时,细胞存活率相对于正常组仅为 54.9%,可见细胞受损明显,且此时培养液中 LDH 活性约为正常组的 2.5 倍,变化明显,既便于检测又便于开展后续实验,因此 400 μmol/L H₂O₂ 培养细胞 4 h 的处理方式能够建立稳定有效的人肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型。

表 2 不同浓度 H₂O₂ 对人肾小球系膜细胞培养液中 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of various concentrations of H₂O₂ on LDH activity ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	LDH 活性/(U·L ⁻¹)
对照	—	660±35
H ₂ O ₂	100	991±42*
	200	1 021±43*
	300	1 378±61*
	400	1 612±55*
	500	2 210±52*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

3.2 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护

CCK-8 实验发现人参皂苷 Rg₃ 对正常的人肾小球系膜细胞无明显的促增殖或促凋亡作用,提示人参皂苷 Rg₃ 对未受损的人肾小球系膜细胞无影响。采用人参皂苷 Rg₃ 预处理的人肾小球系膜细胞对于 H₂O₂ 的氧化应激损伤有明显的抵制效果,见表 3。与模型组比较,除人参皂苷 Rg₃ 10 μmol/L 组外,人参皂苷 Rg₃ 其余各组和 Tempol 组的 A₄₅₀、LDH 活性和 MDA 含量均明显降低 (P<0.05),并且随着人参皂苷 Rg₃ 浓度的增加,LDH 活性和 MDA 含量有明显的降低趋势。表明随着人参皂苷 Rg₃ 浓度的增加,被 H₂O₂ 损伤的细胞的凋亡数量、细胞外 LDH 活性、细胞产生的 MDA 的含量均明显下降。

3.3 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞周期的阻滞

采用流式细胞技术检测对照组、模型组和人参皂苷 Rg₃ 40 μmol/L 组人肾小球系膜细胞周期,结果见表 4。可见处于 G1 期的细胞周期百分比,模型组明显低于对照组、人参皂苷 Rg₃ 组;处于 S 期的细胞百分比 3 组之间没有明显的差异,而处于 G2/M 期的细胞与 G1 期的变化趋势正好相反,模型组明

显高于对照组、人参皂苷 Rg₃ 组, 说明氧化应激作用可以把细胞周期从 G1 期向前诱导, 加快了细胞

周期的进程。而人参皂苷 Rg₃ 可以把人肾小球系膜细胞的细胞周期阻滞在 G1 期, 见图 1。

表 3 人参皂苷 Rg₃ 对 H₂O₂ 诱导人肾小球系膜细胞活力、培养液中的 LDH 活性及 MAD 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of various concentrations of ginsenoside Rg₃ on activity of human glomerular mesangial cells, activity of LDH, and contents of MAD in culture medium ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	A ₄₅₀	LDH/(U·L ⁻¹)	MDA/($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)
模型	—	0.57±0.06	1 340±90	0.82±0.07
Tempol	100	0.85±0.05*	811±45*	0.43±0.05*
人参皂苷 Rg ₃	10	0.61±0.05	1 256±62	0.78±0.07
	20	0.70±0.05*	1 150±63*	0.75±0.05*
	30	0.81±0.04*	982±51*	0.71±0.03*
	40	0.83±0.04*	830±57*	0.61±0.04*
	50	0.84±0.06*	800±49*	0.50±0.08*

与模型组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs model group

表 4 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞周期百分比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of ginsenoside Rg₃ on cell cycle progression of human glomerular mesangial cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞周期百分比/%		
	G1 期	S 期	G2/M 期
对照	59.2±5.0	20.9±3.0	19.9±3.0
模型	48.7±6.0*	16.6±5.0	34.7±5.0*
人参皂苷 Rg ₃	57.1±5.0 [#]	20.4±7.0	22.5±4.0 [#]

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05

*P<0.05 vs control group; [#]P<0.05 vs model group

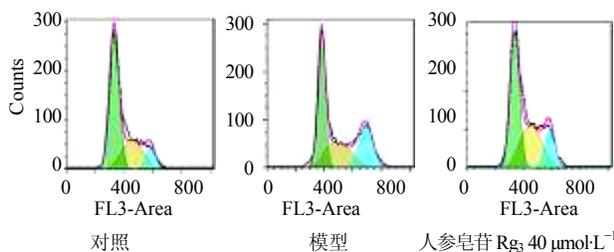


图 1 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞阻滞的流式检测图
Fig. 1 Flow detection curves of ginsenoside Rg₃ on blocks of human glomerular mesangial cells

有研究表明, 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞的抑癌机制是能够阻滞细胞 G1 期向 S 期的进程, 形成 G1 期阻滞, 造成 G1 期细胞堆积阻滞并阻断细胞的 DNA 合成和复制, 起到抑制癌细胞增殖的作

用^[6], 与本实验中体现出的对氧化应激损伤细胞的保护作用类似。

3.4 人参皂苷 Rg₃ 调控细胞周期蛋白 CDK4 的 mRNA 水平

分别收集对照组、模型组和人参皂苷 Rg₃ 40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的总 RNA, 反转录成 cDNA, qRT-PCR 法检测 CDK4 的 mRNA 表达水平, 见表 5。结果表明, 人参皂苷 Rg₃ 预保护的人肾小球系膜细胞中, CDK4 的 mRNA 水平受到了抑制, 提示 40 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃ 下调 CDK4 的 mRNA 水平。

表 5 人参皂苷 Rg₃ 对人肾小球系膜细胞 CDK4 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of ginsenoside Rg₃ on mRNA express level of CDK4 of human glomerular mesangial cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	CDK4 mRNA 表达
对照	1.00±0.01
模型	1.49±0.06*
人参皂苷 Rg ₃	0.61±0.04 [▲]

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [▲]P<0.05

*P<0.05 vs control group; [▲]P<0.05 vs model group

Western blotting 试验发现, 人参皂苷 Rg₃ 预保护的人肾小球系膜细胞中, CDK4 的蛋白质表达水平也受到了抑制, 与其 mRNA 的抑制效果相吻合。提示 40 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃ 下调 CDK4 的 mRNA 水平, 见图 2。

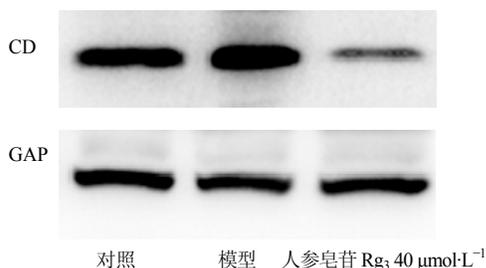


图 2 人参皂苷 Rg_3 对人肾小球系膜细胞蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of ginsenoside Rg_3 on expression of CDK4 protein in human glomerular mesangial cells

4 讨论

氧化应激在多种糖尿病并发症的发病过程中都扮演着关键作用。糖尿病患者的代谢异常可使线粒体产生过多的超氧化物，而这些超氧化物可提升多元醇通路循环量，促进晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 的形成，提高 AGEs 受体的表达，激活蛋白激酶 C，过度活化己糖胺途径等，并通过一系列的反应导致肾脏细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的含量大幅提升，然后在复杂的级联反应下最终造成包括糖尿病肾病在内的多种糖尿病并发症^[7]。

在对糖尿病肾病的治疗方式的探索过程中，中医对糖尿病肾病的认识由来已久。虽然大部分中药的成分复杂未知且药理机制尚未明确，但长久以来，中药治疗在改善临床症状、缓解病情、保护肾脏等方面发挥了重要作用。随着天然药物化学以及转化医学等相关领域的兴盛，中药在类似糖尿病肾病这种传统顽疾的治疗上将展现出明亮广阔的前景。人参皂苷 Rg_3 是传统名贵中药人参中提取出来的一种活性成分，对人体多种机能或病症具有优良效果，如增强非特异性免疫能力^[8]、舒张血管^[9]、提高胰岛细胞细胞活力^[10]。Niu 等^[11]使用链脲霉素诱导实验性 2 型糖尿病大鼠模型研究了 20(S)-人参皂苷 Rg_3 的作用，发现和确认了 6 个潜在的生物标记物，分别为 $C_{12}H_{24}O_{14}P$ 、 $C_{12}H_{18}N_5O_5$ 、 $C_6H_8N_5O$ 、 $C_{26}H_{44}NO_6$ 、 $C_4H_5O_3$ 和 $C_{12}H_{21}O_4$ ，认为人参皂苷 Rg_3 起作用的过程可能涉及到了核酸代谢、能量代谢、肠道菌群代谢的调节。同样是链脲霉素诱导的糖尿病大鼠，Liu 等则研究了人参皂苷 Rg_3 对大鼠勃起功能的保护作用，按照 100 mg/kg 人参皂苷 Rg_3 灌胃的实验组小鼠比不给喂食人参皂苷 Rg_3 的对照组平均血管内压高出很多，进一步的研究发现，实验组蛋白水平方面，caspase-3、bcl-2、bcl-xl、PECAM-1 和 SMA 的

表达比较对照组都恢复到了比较正常的水平，阴茎海绵体细胞凋亡的指数也降低了^[12]。Wang 等^[13]研究提示人参皂苷 Rg_3 可以明显降低糖尿病大鼠 24 h 尿蛋白、血糖和血肌酐，从而能够改善大鼠肾脏病理损害，具有保护肾脏的作用，进一步提示可以把人参皂苷 Rg_3 用于患者糖尿病肾病细胞的保护作用研究。

现有研究成果表明人参皂苷 Rg_3 拥有丰富的药理作用，除上述功效外，已有众多研究关注其另一个重要功能抗氧化能力^[14-16]，但人参皂苷 Rg_3 能否有效抑制氧化应激所致的肾小球系膜细胞损伤并以此对糖尿病肾病发挥一定治疗效果尚未见报道。由此可见，开展人参皂苷 Rg_3 与 (抗) 氧化应激作用的相关研究具有重大的科研意义和临床价值。本实验利用 H_2O_2 诱导肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型，人参皂苷 Rg_3 能够对 H_2O_2 诱导的肾小球系膜细胞的氧化应激损伤具有保护作用，即用 H_2O_2 诱导的肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型为实验对象，30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg_3 都可以明显提高肾小球系膜细胞内的 A_{450} 值，提示这些实验组中的细胞存活率是明显的；其次人参皂苷 Rg_3 组细胞的 LDH 活性明显降低，随着人参皂苷 Rg_3 浓度的增加，LDH 活性检测结果有比较明显降低的趋势；再者人参皂苷 Rg_3 组细胞的 MDA 活性明显降低，随着人参皂苷 Rg_3 浓度的增加，MDA 活性有比较明显降低的趋势。确定人参皂苷 Rg_3 的保护作用后，经过进一步的机制研究发现人参皂苷 Rg_3 对 H_2O_2 诱导肾小球系膜细胞氧化应激损伤模型可能保护过程机制是：降低 MDA 含量 (即降低脂质过氧化物的含量)、降低 LDH 的水平、抑制细胞周期相关蛋白 CDK4 的表达，把细胞周期阻滞在 G1 期，从而抑制细胞的增殖。

综上所述，本研究表明在人肾小球系膜细胞中，人参皂苷 Rg_3 可能通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4 而拮抗细胞氧化应激对 HMC 的损伤。因此，人参皂苷 Rg_3 有可能成为新的肾小球系膜细胞的保护药物，并有望为糖尿病肾病及其相关疾病的临床治疗提供新的途径。

参考文献

- [1] Akmal M. Hemodialysis in diabetic patients [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4 Suppl 1): S195-S199.
- [2] Park E H, Kim Y J, Yamabe N, et al. Stereospecific anticancer effects of ginsenoside Rg_3 epimers isolated

- from heat-processed American ginseng on human gastric cancer cell [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1): 22-27.
- [3] Kim B M, Kim D H, Park J H, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits constitutive activation of NF- κ B signaling in human breast cancer (MDA-MB-231) cells: ERK and Akt as potential upstream targets [J]. *J Cancer Prev*, 2014, 19(1): 23-30.
- [4] Hien T T, Kim N D, Kim H S, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells [J]. *Pharmazie*, 2010, 65(9): 699-701.
- [5] Shan X, Tian L L, Zhang Y M, *et al.* Ginsenoside Rg₃ suppresses FUT4 expression through inhibiting NF- κ B/p65 signaling pathway to promote melanoma cell death [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 701-709.
- [6] Zhang F, Li M, Wu X, *et al.* 20(S)-ginsenoside Rg₃ promotes senescence and apoptosis in gallbladder cancer cells via the p53 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3969-3987.
- [7] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [8] Choi Y J, Kang L J, Lee S G. Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg₃ through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKK ϵ /IRF3 signalling [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(8): 1050-1060.
- [9] Kim N D, Kim E M, Kang K W, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(4): 661-670.
- [10] Kim S S, Jang H J, Oh M Y, *et al.* Ginsenoside Rg₃ enhances islet cell function and attenuates apoptosis in mouse islets [J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(4): 1150-1155.
- [11] Niu J, Pi Z F, Yue H, *et al.* Effect of 20(S)-ginsenoside Rg₃ on streptozotocin-induced experimental type 2 diabetic rats: a urinary metabolomics study by rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(23): 2683-2689.
- [12] Liu T, Peng Y F, Jia C, *et al.* Ginsenoside Rg₃ improves erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Sex Med*, 2015, 12(3): 611-620.
- [13] 王娟, 崔春黎, 富力, 等. 人参皂甙 Rg₃ 对糖尿病肾病大鼠生化指标及病理的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(36): 7015-7018.
- [14] Lim S I, Cho C W, Choi U K, *et al.* Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white ginseng [J]. *J Ginseng Res*, 2010, 34(3): 168-174.
- [15] Hong C E, Lyu S Y. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Korean red ginseng extract in human keratinocytes [J]. *Immune Netw*, 2011, 11(1): 42-49.
- [16] Tewari R K, Hahn E J, Paek K Y. Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(3): 563-573.