

三七总皂苷通过调节蛋白酶激活受体-1抗肺纤维化的作用机制研究

穆素贞, 宋 玲, 高云航, 陈腾飞, 杨依霏, 张广平*, 李 晗*

中国中医科学院中药研究所, 北京 100029

摘要: 目的 考察三七总皂苷(PNS)的体内抗肺纤维化作用,并探讨其作用机制。方法 将60只Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、吡非尼酮(阳性药, 50 mg·kg⁻¹)组和PNS低、中、高剂量(50、100、200 mg·kg⁻¹)组,采用气管内注入博来霉素(5 mg·kg⁻¹)建立肺纤维化大鼠模型,假手术组注入生理盐水;造模24 h后给药,持续28 d;检测大鼠肺脏系数,利用BUXCO系统检测大鼠气道阻力与肺顺应性变化,HE染色后观察大鼠肺组织病理结构损伤,免疫荧光法检测大鼠肺组织E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)表达,免疫组化法检测大鼠肺组织蛋白酶激活受体-1(PAR-1)蛋白表达;体外培养人胚肺成纤维细胞MRC-5,设对照组、模型组(凝血酶2 U·mL⁻¹建立体外肺纤维化模型)和PNS 5、10、20 μg·mL⁻¹组,体外划痕实验检测细胞迁移率,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blotting实验检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、波形蛋白(Vim)和PAR-1基因和蛋白表达水平;随后使用PAR-1 si RNA抑制PAR-1表达后,进一步采用qRT-PCR和Western blotting检测α-SMA与Vim基因与蛋白表达。结果 体内实验中,与模型组相比,PNS各剂量组肺脏系数显著降低($P<0.001$)、肺顺应性显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),100、200 mg·kg⁻¹ PNS组大鼠气道阻力显著降低($P<0.05$ 、 0.01),同时PNS能够改善大鼠肺组织的病理结构损伤,在下调N-cad的蛋白表达同时上调E-cad的蛋白表达,且100、200 mg·kg⁻¹ PNS组PAR-1蛋白表达显著下调($P<0.01$ 、 0.001)。体外实验中,与模型组相比,10、20 μg·mL⁻¹ PNS组细胞的迁移率显著降低($P<0.01$ 、 0.001),20 μg·mL⁻¹ PNS组α-SMA与Vim mRNA水平下调($P<0.05$ 、 0.01),20 μg·mL⁻¹ PNS组α-SMA蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),10、20 μg·mL⁻¹ PNS组Vim蛋白表达水平显著下调($P<0.05$ 、 0.01),PAR-1 si RNA组α-SMA mRNA水平和α-SMA、Vim蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 PNS具有抗肺纤维化的作用,其机制可能与调控PAR-1的异常有关。

关键词: 肺纤维化; 三七总皂苷; 博来霉素; 凝血酶; 蛋白酶激活受体-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)04-0701-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.004

Research on mechanism of *Panax notoginseng* saponins in inhibiting pulmonary fibrosis by regulating protease activated receptor-1

MU Suzhen, SONG Ling, GAO Yunhang, CHEN Tengfei, YANG Yifei, ZHANG Guangping, LI Han

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the *in vivo* and *in vitro* anti pulmonary fibrosis effects of *Panax notoginseng* saponins (PNS) and preliminarily explore its pharmacological mechanism. **Methods** Totally 60 Wistar rats were randomly divided into sham-surgery group, model group, pirfenidone (positive drug, 50 mg·kg⁻¹) group, and PNS (50, 100, and 200 mg·kg⁻¹) group. A pulmonary fibrosis rat model was established by tracheal injection of bleomycin (5 mg·kg⁻¹), physiological saline were injected into rats in sham-surgery group. After 24 hours, the treatment group was given corresponding drugs once a day for 28 d. The lung coefficient of rats were detected, the BUXCO system was used to detect changes in airway resistance and lung compliance, pathological structural damage of rat lung tissue was observe after HE staining, the expression of E-cadherin (E-cad) and N-cadherin (N-cad) in rat lung tissue were detected using immunofluorescence method, and the expression of tissue protease activated receptor-1 (PAR-1) protein in rat lung tissue were detected using immunohistochemistry method. Meanwhile, human embryonic lung fibroblasts MRC-5 were

收稿日期: 2024-01-26

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82204740);中国中医科学院中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015);中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项(ZZ16-YQ-027)

第一作者: 穆素贞(2000—),女,硕士研究生,研究方向为中药药理。E-mail: musuzhen567@163.com

*通信作者: 李 晗(1989—),女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向为中药药理。E-mail: hli1989@icmm.ac.cn

张广平(1975—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向为中药药理。E-mail: iamgpz@163.com

cultured *in vitro*, with control group, model group (thrombin $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ to establish a pulmonary fibrosis model) and PNS 5, 10, and $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group were set up, *in vitro* scratch assay to detect cell migration rate, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting assay were used to detect the expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), Vim, and PAR-1 genes and proteins. Subsequently, after inhibiting PAR-1 expression using PAR-1 si-RNA, qRT-PCR and Western blotting were further used for detection α -SMA and Vim gene and protein expression. **Results** *In vivo* experiments, compared with model group, the lung index of the 50, 100, and $200 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS groups decreased ($P < 0.001$), the lung compliance of the 50, 100 and $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS groups significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the airway resistance of rats in the 100 and $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS groups significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). PNS improved the pathological structural damage of rat lung tissue, downregulated the protein expression of N-cad, upregulated the protein expression of E-cad, and the expression of PAR-1 protein in the 100 and $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS groups were significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01$). *In vitro* experiments, compared with the model group, the migration rate of 10 and $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS group cells was significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$), α -SMA and Vim mRNA levels in $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS group were downregulated ($P < 0.05, 0.01$), the α -SMA protein expression level in $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS group was significantly downregulated ($P < 0.05$), while the Vim protein expression level in the 10 and $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PNS group was significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01$), the expression levels of α -SMA mRNA and SMA and Vim proteins were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** PNS have anti-pulmonary fibrosis effects, and its mechanism may be related to the regulation of PAR-1.

Key words: pulmonary fibrosis; *Panax notoginseng* saponins; bleomycin; thrombin; protease activated receptor-1

肺纤维化是一种慢性进行性的肺间质疾病,主要以炎细胞浸润、气道重塑、肺泡破坏和纤维化为特征。近些年来,肺纤维化发病率呈逐年增加趋势,且患者预后状况极差,诊断后的平均生存期仅2.8年,因此肺纤维化被称为“不是癌症的癌症”,对患者生命造成严重威胁^[1]。目前临床尚无治疗肺纤维化的特效药物,尼达尼布与吡非尼酮虽能延缓患者肺功能下降,但无法阻止或逆转疾病的发展^[2]。因此积极探索肺纤维化的发病机制,寻找更有效药物作用靶点已成为肺纤维化研究的热点。蛋白酶激活受体(PARs)在促进肺纤维化发展中扮演着重要的角色,靶向PARs成为一种潜在治疗手段^[3]。三七总皂苷(PNS)是三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen的主要有效成分,其包含多种单体皂苷成分,如人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、三七皂苷R₁和人参皂苷Re等。药理学研究表明其在抗氧化、抗炎、血管舒张、抗肿瘤以及调节能量代谢等方面具有显著功效^[4]。现代研究进一步发现PNS具有抗纤维化作用^[5-8]。本团队^[9]前期药效学研究发现PNS具有显著抗肺纤维化作用,主要表现为降低炎症因子,减少胶原的生成;同时发现PNS能够调控PAR-1的表达,提示PAR-1可能为其发挥药效作用的关键靶点。因此本研究基于PAR-1靶点继续探索PNS抗肺纤维化药效机制,以期为进一步开发与肺纤维化临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级Wistar雄性大鼠60只,体质量180~

220 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0011,饲养于中国中医科学院中药研究所SPF级动物房,环境温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 15)%,12 h/12 h昼夜明暗循环光照,自由进食饮水。研究方案获得中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核批准,实验动物伦理审查编号为2021B038。

1.2 细胞

人胚肺成纤维细胞MRC-5细胞株,购于中国医学科学院基础医学研究所。

1.3 药物和主要试剂

注射用盐酸博来霉素(日本化药株式会社,规格15 mg,批号X10750);PNS(中国食品药品检定研究院,批号110870-202105,含三七皂苷R₁ 8.6%、人参皂苷Rg₁ 35.0%、人参皂苷Re 5.0%、人参皂苷Rb₁ 28.8%、人参皂苷Rd 3.7%);吡非尼酮(北京康蒂尼药业股份有限公司,规格100 mg,批号20210303);凝血酶(美国Sigma-Aldrich公司,批号T4393);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,英国Abcam公司,批号ab104139);E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(Vim)和PAR-1抗体(美国proteintech公司,批号00103236、00103442、00059325、00016979和00091320);PAR-1 siRNA质粒(美国Santa Cruz公司,批号sc-36663);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG(H+L)(北京索莱宝科技有限公司,批号20220414);组织RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号U9225);2×EasyPCR

SuperMix(北京全式金生物技术有限公司,批号20220541),其他试剂均为国产分析纯。

1.4 主要仪器

BUXCO气道阻力和肺顺应性监测系统(美国DSI公司);Spectramax i3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司);Centrifuge 5810R型离心机(德国Eppendorf公司);MP Fastprep-24匀浆仪(美国MP Biomedicals公司);CFX™96实时荧光定量PCR、165-8001型Mini-PROTEANTetra电泳系统(美国Bio-Rad公司);化学发光成像分析仪(美国GE Healthcare公司);Cytation5 imaging reader高内涵成像检测系统(美国BioTeck公司);TCS SP8激光扫描共聚焦显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

大鼠适应性喂养5 d,按照体质量将大鼠随机分为假手术组、模型组、吡非尼酮(阳性药,50 mg·kg⁻¹)组和PNS低、中、高剂量(50、100、200 mg·kg⁻¹)组,每组10只。除假手术组外,其他组大鼠肺纤维化模型采用气管内注射博来霉素的方法建立^[10]:ip 0.8%戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)麻醉后,消毒颈部皮肤,用剪刀纵向剪开皮肤,钝性分离正中部肌肉并暴露气管,用1 mL注射器向气管内一次性注入博来霉素(5 mg·kg⁻¹),随后直立旋转大鼠,使博来霉素均匀到达两侧肺部,缝合肌肉皮肤,待大鼠苏醒后常规饲养。假手术组大鼠气管内注射等量的生理盐水,其余操作相同。造模24 h后开始给药,吡非尼酮组大鼠以ig方式给予吡非尼酮溶液,PNS组以ip方式给药相应剂量的PNS溶液,假手术组和模型组采用ip的方式给予对应剂量的0.9%氯化钠溶液^[6],每天给药1次,连续给药28 d。

2.2 肺功能检测

造模第28天,ip 0.8%戊巴比妥钠麻醉大鼠,剪开颈部皮肤行气管插管,利用BUXCO系统检测大鼠气道阻力与肺顺应性变化。

2.3 肺脏系数测定

肺功能测定结束后,大鼠腹主动脉取血,打开胸腔并剥离左右肺组织,用滤纸拭干肺组织表面水分后称质量,并计算肺脏系数。

肺脏系数=肺脏质量/体质量

2.4 肺组织病理学观察

取左肺转移至4%的多聚甲醛溶液中,常温固定24 h后,进行脱水、透明、浸蜡、包埋与切片,随后进行HE染色。光学显微镜下观察其病理形态。

2.5 免疫荧光法检测大鼠肺组织N-cad和E-cad蛋白表达

将石蜡切片进行脱蜡后进行抗原修复,室温下封闭60 min,将切片与相应的一抗(N-cad, 1:200; E-cad, 1:200)在4℃下孵育过夜,PBS洗片,滴加相应的二抗后室温孵育60 min,PBS再次洗片,DAPI进行复染,室温继续孵育30 min,封片后利用激光共聚焦显微镜拍摄。

2.6 免疫组化法检测大鼠肺组织PAR-1蛋白表达

将石蜡切片按照免疫组化检测试剂盒说明书要求处理,滴加PAR-1抗体(1:400)在4℃下孵育过夜,PBS洗片,滴加相应的二抗,并滴加DAB染色,封片后于显微镜下观察肺组织PAR-1的阳性表达。采用Image J软件进行定量分析,将图像设置为“RGB stack”类型,并在将Threshold设置为“Red”,选择阳性区域后,测量其%Area数值。

2.7 细胞培养及处理

MRC-5细胞生长于含有10%胎牛血清、1%非必需氨基酸的MEM培养基中,并于37℃、5% CO₂条件下培养,待细胞融合至70%~80%时,以1:3的比例传代,并取对数生长期的细胞用于实验。根据实验要求分为对照组、模型组(凝血酶,2 U·mL⁻¹)和PNS 5、10、20 μg·mL⁻¹组。

2.8 高内涵成像系统检测细胞迁移能力

取对数生长期细胞,以5×10⁵个·mL⁻¹的密度接种于6孔板中,使用10 μL枪头垂直于孔板制造细胞划痕,吸去旧培养基,加入PBS,清晰、高内涵成像系统拍照,作为0 h对照;随后加入含药物的无血清培养基(组别设置同“2.7”项),于24 h取出细胞,利用高内涵成像系统观察划痕宽度并拍照。利用Image J定量初始划线(0 h)和后期观察点(24 h)的划痕的面积,计算迁移率。

迁移率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积

2.9 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测MRC-5细胞中α-SMA、Vim和PAR-1基因表达水平

取对数生长期细胞,每孔5×10⁴个接种于6孔板中,待细胞融合至80%时,加入含药物的无血清培养基(组别设置同“2.7”项),24 h后利用TRIzol法进行细胞总RNA的提取。紫外分光光度计检测RNA浓度和纯度[260 nm和280 nm吸光度(A)比值为1.8~2.0],取1 000 ng总RNA进行cDNA反转录,随后进行qRT-PCR反应,PCR反应条件为预变性为95℃、5 s,循环时为95℃、5 s,60℃、20 s,72℃、10 s,共40个循环,以各目标基因2^{-ΔΔCt}值计

算 mRNA 相对表达量,特异性引物序列见表 1。

2.10 Western blotting 法检测 MRC-5 细胞中 α -SMA、Vim 和 PAR-1 蛋白表达水平

取对数生长期细胞,每孔 5×10^4 个接种于 6 孔板中,待细胞融合至 80% 时,加入含药物的无血清培养基(组别设置同“2.7”项),48 h 后,加入每孔 100 μ L 的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,提取全蛋白。BCA 法进行蛋白质定量后加入 Loading buffer 进行变性(100 $^{\circ}$ C、5 min),蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,室温下封闭 1 h,分别孵育 α -SMA(1:1 000)、Vim(1:1 000)、PAR-1(1:2 500)、GAPDH(1:2 500)和 β -actin(1:2 500)的一抗,TBST 洗膜,孵育二抗(1:2 000),采用 ECL 发光液显色,显影,采用 Image J 软件进行半定量分析,以目标蛋白/GAPDH(或 β -actin)灰度值的比值表示待测蛋白的相对表达水平。

2.11 PAR-1 siRNA

取对数生长期细胞,每孔 5×10^4 个接种于 6 孔板中,待细胞融合至 30% 左右时,加入 PAR-1 siRNA(60 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)转染 6 h,随后用含有 20% 胎牛血清的 MEM 洗涤,随后分别加入凝血酶/PNS,继续培养 24 h,完成转染。

设置对照组、单给 PAR-1 siRNA 组、模型[凝血

酶(2 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)]组、PNS(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组、PAR-1 siRNA 组,按照上述操作转染、给药后,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 PAR-1 mRNA 与蛋白表达水平。

设置对照组、模型[凝血酶(2 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)]组、PNS(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组、PAR-1 siRNA 组、PNS(20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+PAR-1 siRNA 组,按照上述操作转染、给药后,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 α -SMA、Vim mRNA 与蛋白表达水平。

2.12 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS Statistics 22 统计软件对各组数据进行统计分析,采用单因素方差分析(One-Way-Anova)进行组间比较。

3 结果

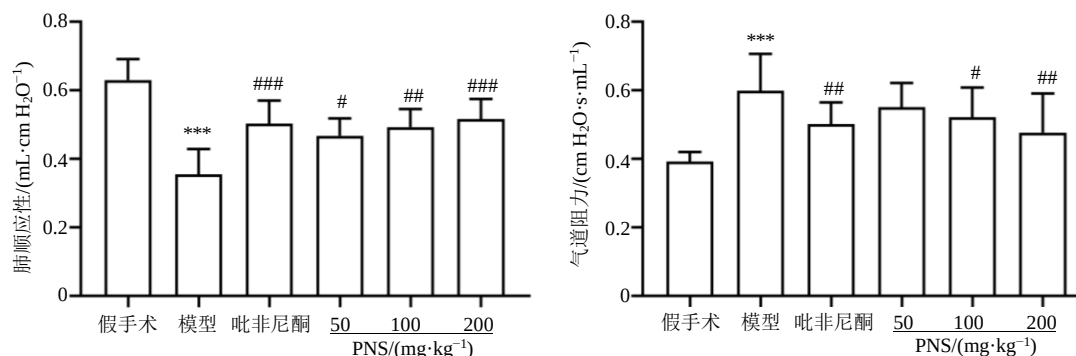
3.1 PNS 对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响

如图 1 所示,与假手术组比较,模型组大鼠的肺顺应性与气道阻力出现了较为明显的改变,主要表现为动态肺顺应性显著降低($P < 0.001$)与气道阻力显著升高($P < 0.001$);与模型组相比,50、100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组大鼠肺顺应性显著升高($P < 0.05$ 、0.01、0.001),同时 100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组大鼠气道阻力显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
α -SMA	TCGCTGTCAGGAACCTGAGACG	ATCATCACCAGCGAAGCCGGC
Vim	GAGTCAAACGAATACCGGAGAC	CTCTTCCATTTACGCATCTG
PAR-1	TCCTAAGAAAGTAGGCGACC	GGGAGCTTCTAGATCTCGTC
β -Actin	CACTGTGCCCATCTACGAGG	TAATGTCACGCACGATTCC



与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;1 $\text{cmH}_2\text{O} = 0.1 \text{ kPa}$ 。
*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; 1 $\text{cmH}_2\text{O} = 0.1 \text{ kPa}$ 。

图 1 PNS 对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

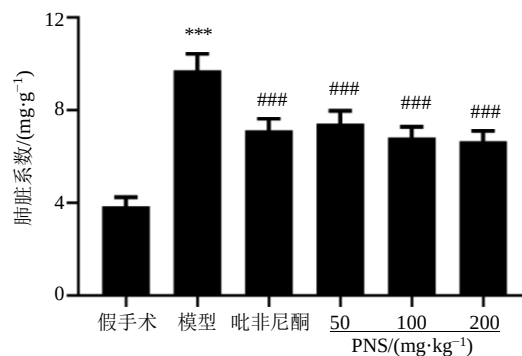
Fig. 1 Effect of PNS on pulmonary function in rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.2 PNS对肺纤维化模型大鼠肺脏系数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的肺脏系数显著升高($P<0.001$);与模型组相比,50、100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组大鼠肺脏系数显著降低($P<0.001$)。结果见图2。

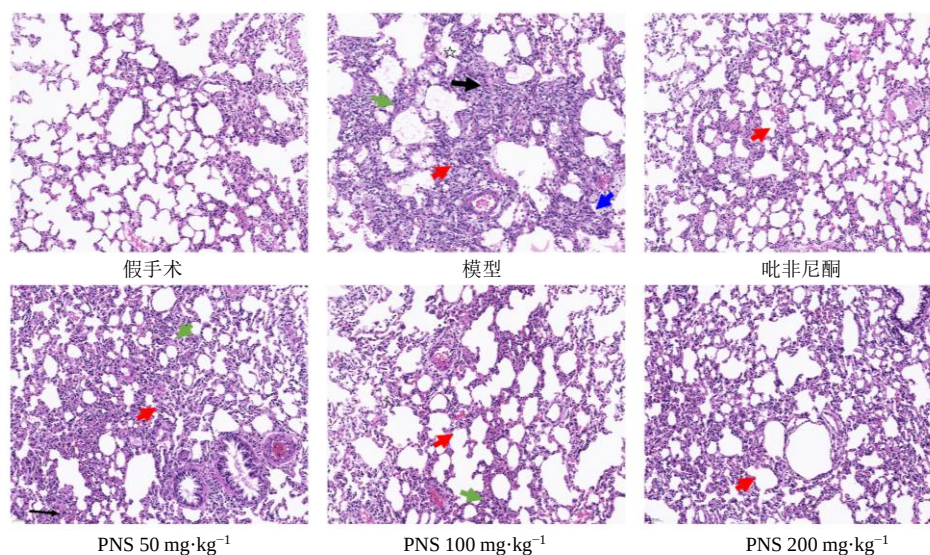
3.3 PNS对肺纤维化模型大鼠肺组织病理学的影响

HE染色如图3显示,假手术组大鼠肺组织结构正常,肺泡间隔清晰纤细,未见明显病变;模型组大鼠肺泡结构明显紊乱,纤维增生(黑色箭头),肺泡间隔增厚(绿色箭头),并出现出血(红色箭头)以及泡沫细胞聚集(蓝色箭头)等现象;而给予PNS后,大鼠肺组织结构较模型组明显改善,其中



与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:### $P<0.001$ 。
*** $P<0.001$ vs sham-operated group; ### $P<0.001$ vs model group.

图2 PNS对肺纤维化模型大鼠肺脏系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Fig. 2 Effect of PNS pulmonary coefficient in pulmonary fibrosis model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)



黑色箭头-纤维增生;绿色箭头-肺泡间隔增厚;红色箭头-出血;蓝色箭头-泡沫细胞聚集。

Black arrow-fibrosis; Green arrow-thickening of alveolar septa; Red arrow-bleeding; Blue arrow-foam cell aggregation.

图3 PNS对肺纤维化模型大鼠肺组织病理的影响(HE, ×200)

Fig. 3 Effect of PNS on lung tissue pathological in rats (HE, ×200)

50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组大鼠肺组织可见纤维增生与出血,100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组大鼠肺组织可见肺泡间隔增厚与出血,200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组大鼠肺组织可见肺泡间隔略增厚与出血,治疗效果最优。

3.4 PNS对肺纤维化模型大鼠肺组织N-cad和E-cad蛋白表达的影响

结果如图4所示,与假手术组相比,模型组大鼠肺组织中N-cad蛋白表达水平升高,而E-cad蛋白表达水平降低;与模型组相比,50、100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组N-cad蛋白表达水平降低,E-cad蛋白表达水平升高,其中200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PNS组逆转效果更优。

3.5 PNS对肺纤维化模型大鼠肺组织PAR-1蛋白表达的影响

结果如图5所示,模型组大鼠肺组织中PAR-1

以棕黄色分布在细胞膜上,与假手术组相比PAR-1表达显著性升高($P<0.001$);与模型组相比,PNS组阳性表达显色减弱,其中50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组PAR-1表达水平虽有下调,但无显著性差异,而100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组PAR-1表达水平显著性降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 PNS对MRC-5细胞迁移的影响

结果如图6所示,与对照组相比,模型组细胞迁移率显著升高($P<0.001$);与模型组相比,10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PNS组细胞的迁移率显著降低($P<0.01$ 、 0.001),表明PNS对MRC-5细胞的迁移能力有明显的浓度相关性抑制作用。

3.7 PNS对MRC-5细胞 α -SMA与Vim mRNA与蛋白表达的影响

结果如图7所示,与对照组相比,模型组 α -SMA

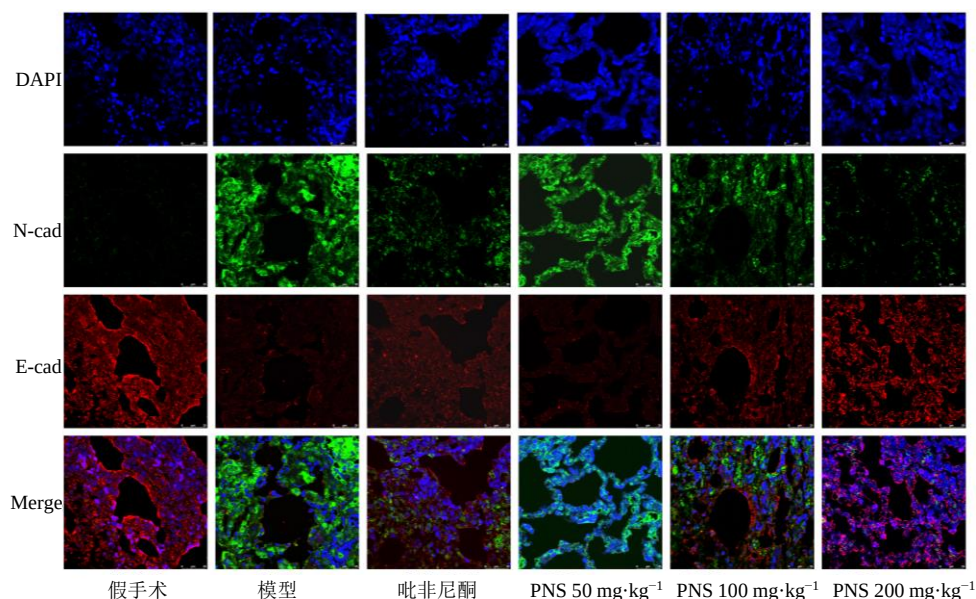
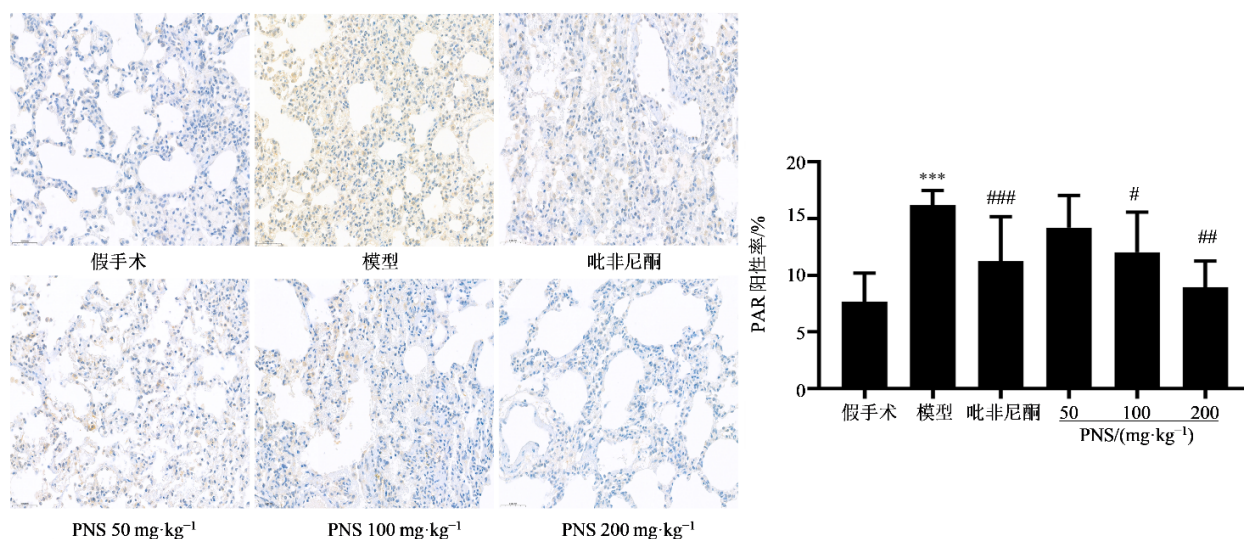


图 4 PNS 对肺纤维化模型大鼠肺组织 N-cad 和 E-cad 蛋白表达的影响($\times 630$)

Fig. 4 Effect of PNS on expression of N-cad and E-cad protein in pulmonary fibrosis model rats ($\times 630$)



与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 5 PNS 对肺纤维化模型大鼠肺组织 PAR-1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Effect of PNS on expression of PAR-1 protein in pulmonary fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

与 *Vim* mRNA 转录水平显著上调($P < 0.001$);与模型组相比,PNS 组 α -SMA 与 *Vim* mRNA 转录水平下调,其中 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组出现显著性差异($P < 0.05, 0.01$)。

与对照组相比,模型组 α -SMA 与 *Vim* 蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$);与模型组相比, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PNS 组 α -SMA 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$), $10, 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PNS 组 *Vim* 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05, 0.01$)。

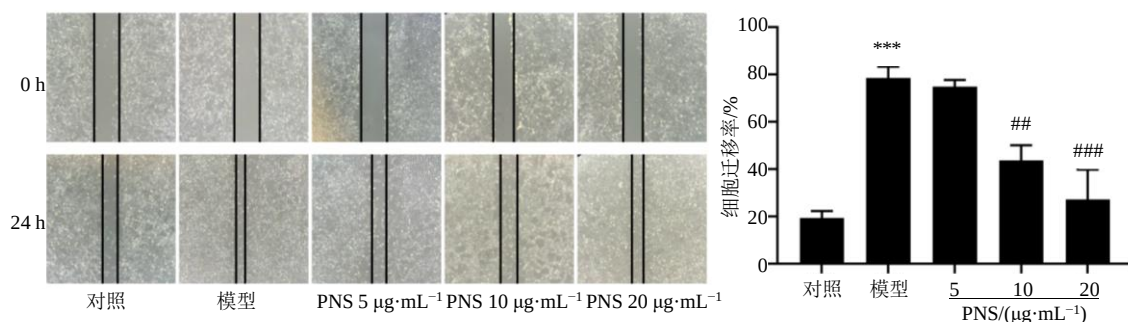
3.8 PNS、PAR-1 siRNA 对 MRC-5 细胞 PAR-1 mRNA 与蛋白表达的影响

结果如图 8 所示,与对照组相比,模型组 PAR-1

mRNA 与蛋白表达水平显著上调($P < 0.01, 0.001$),单给 PAR-1 siRNA 组 PAR-1 mRNA 与蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$);与模型组相比,PNS 组 PAR-1 mRNA 与蛋白表达水平显著下调($P < 0.05, 0.001$); PAR-1 siRNA 组 PAR-1 mRNA 与蛋白表达水平显著下调($P < 0.05, 0.001$)。

3.9 siRNA 转染后 PNS 对 MRC-5 细胞 α -SMA、*Vim* mRNA 与蛋白表达的影响

结果如图 9 所示,在 mRNA 转录水平方面,与对照组相比,模型组 α -SMA 与 *Vim* mRNA 表达水平显著上调($P < 0.001$);与模型组相比,PAR-1 siRNA

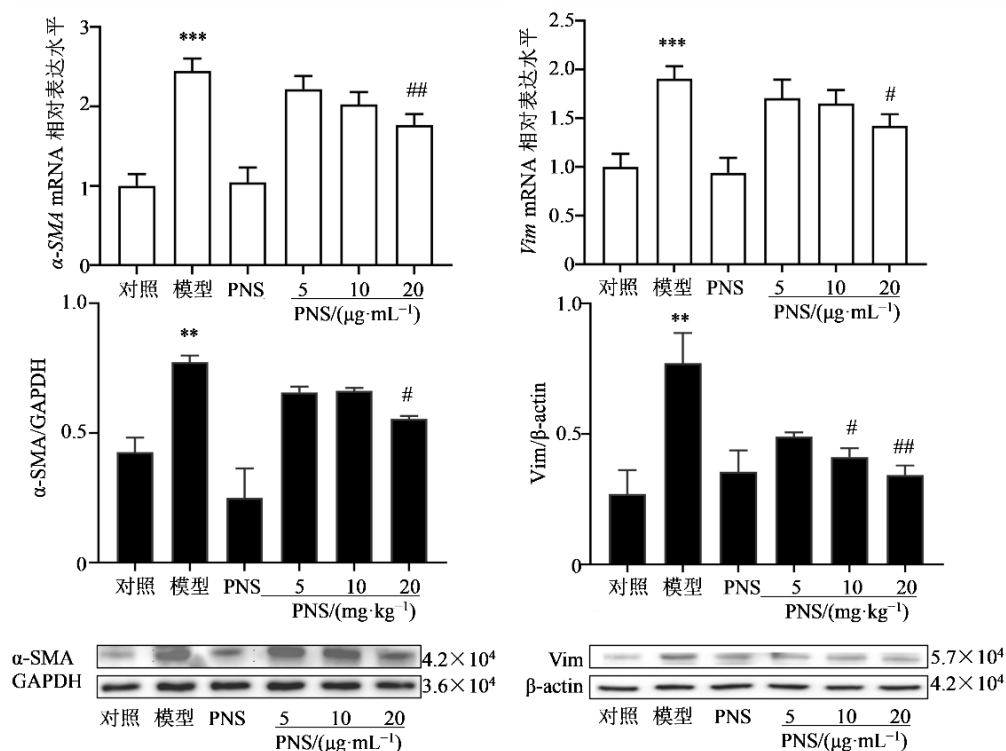


与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图6 PNS对MRC-5细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Effect of PNS on migration of MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与对照组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较:# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图7 PNS对MRC-5细胞α-SMA与Vim mRNA与蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of PNS on mRNA and protein expression of α-SMA 与 Vim in MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

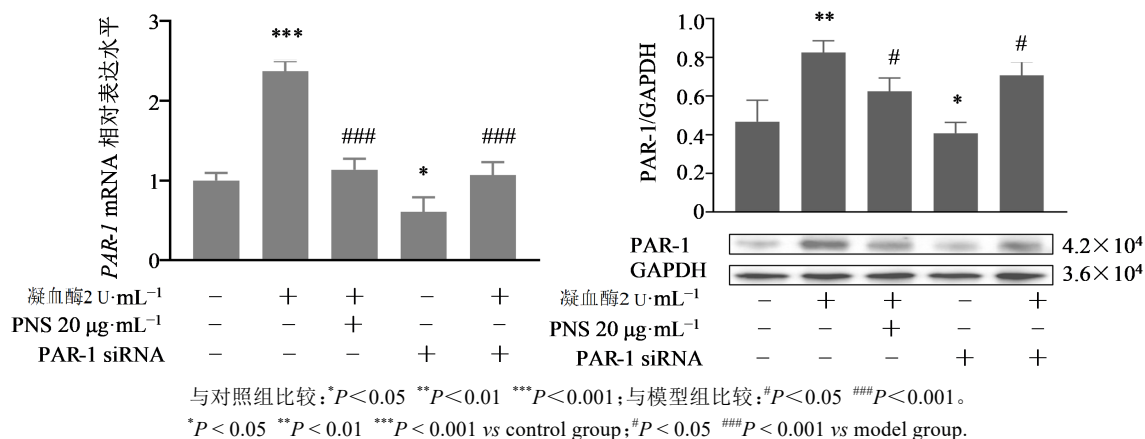
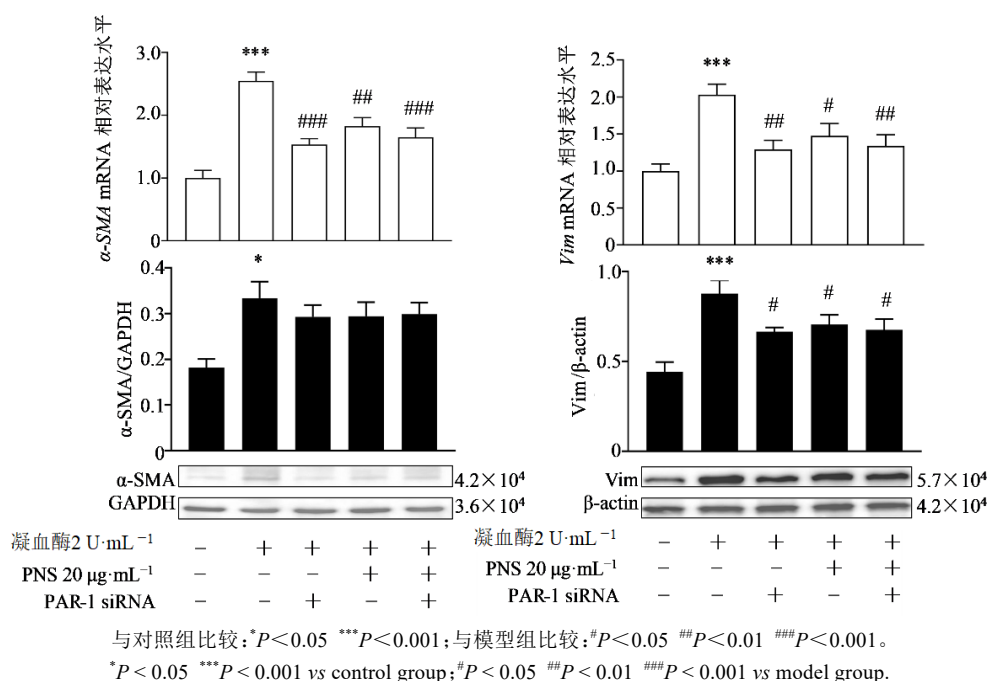
组、PNS组和PNS+PAR-1 siRNA组α-SMA、Vim mRNA表达水平显著下调($P < 0.05, 0.01, 0.001$),其中PNS+PAR-1 siRNA组的下调作用弱于PAR-1 siRNA,强于PNS组。

在蛋白翻译水平方面,与对照组相比,模型组α-SMA与Vim蛋白表达水平显著上调($P < 0.05, 0.001$);与模型组相比,PAR-1 siRNA组、PNS组和PNS+PAR-1 siRNA组α-SMA蛋白表达水平虽有下调,但未出现显著性,同时PAR-1 siRNA组、PNS组和PNS+PAR-1 siRNA组Vim蛋白表达水平显著

下调($P < 0.05$),其中PNS+PAR-1 siRNA组的下调作用弱于PAR-1 siRNA,强于PNS组。

4 讨论

肺纤维化作为一种致死性肺间质疾病,其临床表现主要为干咳、呼吸困难,疾病后期发展为呼吸衰竭、心衰,进而导致死亡。近些年,由于新型冠状病毒、人口老龄化、环境改变、疾病意识的提高和诊断工具的改进等原因,使得肺纤维化的发病率逐年增加,给患者和社会造成了沉重的负担^[11]。尽管尼达尼布、吡非尼酮或传统抗氧化剂、糖皮质激素有

图 8 PNS、PAR-1 siRNA 对 MRC-5 细胞 PAR-1 mRNA 与蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Effect of PNS and PAR-1 siRNA on expression of PAR-1 mRNA and protein in MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 9 PAR-1 siRNA 对 MRC-5 细胞 α -SMA、Vim mRNA 与蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 9 Effect of PAR-1 siRNA on mRNA and protein expression of α -SMA and Vim in MRC-5 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

助于改善症状并在一定程度上缓解患者的疼痛,但它们均存在治疗效果有限、不良反应明显等问题。因此,亟需寻找新型的抗肺纤维化药物。

越来越多的研究表明,在肺组织损伤后凝血级联反应的激活以及在此过程中产生的蛋白酶在肺纤维化中起着关键作用^[12]。在肺纤维化患者肺中,当肺组织受损后,组织因子(TF)与活化因子VIIa(FVIIa)结合形成TF-FVIIa复合物,TF-FVIIa复合物引发凝血酶生成,随后凝血酶将可溶性纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白,导致异常的凝血级联反应被激活^[13],患者出现高凝状态^[14]。凝血酶主要通过活化PARs诱导肺组织损伤,PARs属于G蛋白

耦联受体家族成员,作为凝血级联反应过程中的重要效应蛋白,其广泛分布于肺上皮细胞、成纤维细胞、神经细胞、气道平滑肌细胞、间质细胞和各类白细胞等^[15]。PAR-1具有诱发凝血反应、促进细胞分裂与增殖、释放炎症介质等生理功能。因此抑制PAR-1被视为治疗肺纤维化的潜在方法。研究发现,PAR-1拮抗剂沃拉帕沙能够降低肺炎链球菌导致肺部细菌感染期间中性粒细胞数量增加,并防止肺泡屏障被破坏,同时能够改善纤维化^[16];同时PAR-1抑制剂RWJ-56110通过抑制I型胶原mRNA与蛋白表达并降低羟脯氨酸的含量,从而抑制纤维化的进展^[17]。然而靶向PAR-1虽在治疗肺纤维化

方面表现出较好的前景,但现阶段相关基础实验较少,在临床转化和商业应用中受到阻碍。

中药作为天然药物资源库,在防治肺纤维化研究过程中显示一定的特色与优势^[18]。中医理论认为“肺为娇脏,外合皮毛,开窍于鼻,故六淫等邪气侵袭多易犯肺”。发病时期外邪犯肺,肺朝百脉功能失常,助心行血功能受损,肺气虚弱无力助心推动血液运行而致血瘀^[19],因此“血瘀”是肺纤维化发生发展过程中的一个基本的病机^[20]。现代研究也进一步发现,肺纤维化患者普遍存在高凝状态^[21]。与此同时,有关三七、川芎、当归、丹参等活血化瘀类药物治疗肺纤维化的报道日益增多^[22-23]。三七为作为亚洲使用最高频的中药之一,在治疗心血管、代谢和神经退行性疾病中发挥了显著效果,并且因其广泛应用于制药与保健品等行业,吸引了众多学者对其进行深入研究^[24]。三七富含皂苷类成分,其中PNS为三七的主要活性成分。相关研究人员已经证明PNS可改善肝^[25]、肾纤维化^[26],这也表明其具有治疗肺纤维化潜力。本团队前期对PNS抗肺纤维化进行了初步药效学研究,发现PNS可以改善肺纤维化模型大鼠肺部影像学,减少其胶原纤维的生成,并下调肺纤维化的生物标志物,同时PNS可以显著下调博来霉素引起PAR-1的mRNA和蛋白表达的上调,进而推测PAR-1为PNS抗肺纤维化关键靶点^[6],因此本实验在前期工作基础上对其进行了深入和拓展。

本实验首先利用气管滴注博来霉素法复制了肺纤维化大鼠模型。博来霉素为一种水溶性糖肽类抗生素,其毒副作用为诱发肺纤维化,且病理过程与临床相近,并且结合博来霉素价格低、手术操作过程简单等特点,被认为是肺纤维化最佳表征动物模型^[7]。本实验结果显示,给予博来霉素后大鼠肺脏系数增加,肺功能下降,同时大鼠肺组织出现肺泡结构明显紊乱、肺泡间隔增厚、纤维增生、出血与泡沫细胞聚集等现象,并出现上皮间充质转化的现象,以上结果表明该模型复制成功。而给予PNS可降低大鼠肺脏系数、缓解肺功能、改善纤维化肺组织结构损伤,并抑制了上皮间充质转化的现象。同时免疫组化结果显示,PNS下调了PAR-1蛋白的表达。与此同时本研究设计体外实验针对PNS是否作用于关键靶点PAR-1进行验证。凝血酶作为关键的促纤维化因子能够刺激成纤维细胞的异常增殖,并向肌成纤维细胞转化。因此本实验以凝血酶为刺激条件,选择MRC-5细胞进行实验^[27]。体外实

验结果显示,PNS能够抑制MRC-5细胞迁移,降低 α -SMA与Vim mRNA与蛋白的表达,体外实验表明PNS具有较好的抗肺纤维化作用。而在后续靶点验证实验中,通过转染si RNA敲低MRC-5细胞中PAR-1的表达,发现敲低PAR-1后下调 α -SMA与Vim mRNA与蛋白的表达。以上结果进一步证实PNS是通过调控PAR-1从而发挥抗肺纤维化作用。

本实验首先从肺脏系数、肺功能、肺组织病理、上皮间质转化等角度探究PNS对肺纤维化大鼠模型的改善作用,并利用体外实验对关键作用靶点进行验证,提示PNS抗肺纤维化作用机制与调控PAR-1有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Poletti V, Tomassetti S, Ravaglia C. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2018, 379(8): 797.
- [2] Sathiyamoorthy G, Sehgal S, Ashton R W. Pirfenidone and nintedanib for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. South Med J, 2017, 110(6): 393-398.
- [3] Lin C, Borensztajn K, Spek C A. Targeting coagulation factor receptors-protease-activated receptors in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Thromb Haemost, 2017, 15(4): 597-607.
- [4] Peng M, Yi Y X, Zhang T, et al. Stereoisomers of saponins in *Panax notoginseng* (sanqi): A review [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 188.
- [5] 邓宏哲, 陈昆, 李鹏, 等. 人参皂苷Rg₁通过调控AMPK/NLRP3通路介导的细胞焦亡抑制大鼠肺纤维化研究[J]. 中草药, 2023, 54(3): 841-848.
Deng H Z, Chen K, Li P, et al. Ginsenoside Rg₁ inhibits pulmonary fibrosis in rats by regulating AMPK/NLRP3 pathway-mediated pyroptosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(3): 841-848.
- [6] 李媛, 高睿, 单颖, 等. 人参皂苷抗器官纤维化作用机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2237-2246.
Li Y, Gao R, Dan Y, et al. Research progress on mechanism of ginsenosides against organ fibrosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(7): 2237-2246.
- [7] Kang H, Zhang D X, Chan W J, et al. Identification of anti-inflammatory components in *Panax ginseng* of Sijunzi Decoction based on spectrum-effect relationship [J]. Chin Herb Med, 2023, 15(1): 123-131.
- [5] 陈思思, 王俊, 郑杭生. 三七皂苷类成分防治肝纤维化的研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3688-3692.
Chen S S, Wang J, Zheng H S. Research progress of *Panax notoginseng* saponins in preventing and treating

- liver fibrosis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(11): 3688-3692.
- [6] Li H, Wang Y G, Chen T F, et al. *Panax notoginseng* saponin alleviates pulmonary fibrosis in rats by modulating the renin-angiotensin system [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt B): 116979.
- [7] Mouratis M A, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(5): 355-361.
- [8] Podolanczuk A J, Thomson C C, Remy-Jardin M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: State of the art for 2023 [J]. Eur Respir J, 2023, 61(4): 2200957.
- [9] Chambers R C, Scotton C J. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis [J]. Proc Am Thorac Soc, 2012, 9(3): 96-101.
- [10] Cavaco R A, Kaul S, Chapman T, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis associated with pulmonary vein thrombosis: A case report [J]. Cases J, 2009, 2: 9156.
- [11] 张颖, 王超超, 牛瑞. 利用蛋白质组学技术筛选特发性肺间质纤维化患者血清生物标志物 [J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(8): 1117-1120.
- Zhang Y, Wang C C, Niu R. Screening on serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis patients by proteomics technology [J]. Chin J Epidemiol, 2018, 39(8): 1117-1120.
- [12] José R J, Williams A E, Chambers R C. Proteinase-activated receptors in fibroproliferative lung disease [J]. Thorax, 2014, 69(2): 190-192.
- [13] Xiao T, Ren S F, Bao J L, et al. Vorapaxar proven to be a promising candidate for pulmonary fibrosis by intervening in the PAR1/JAK2/STAT1/3 signaling pathway-an experimental *in vitro* and *vivo* study [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 943: 175438.
- [14] Schuliga M, Jaffar J, Harris T, et al. The fibrogenic actions of lung fibroblast-derived urokinase: A potential drug target in IPF [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41770.
- [15] 丁大力, 沈学彬, 姚佳慧, 等. 中药治疗肺纤维化的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 7006-7024.
- Ding D L, Shen X B, Yao J H, et al. Research progress on traditional Chinese medicine against treating pulmonary fibrosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(22): 7006-7024.
- [16] 姜梦笔, 赵梦雅, 黄高, 等. 从瘀论治特发性肺纤维化研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 98-102.
- Jiang M B, Zhao M Y, Huang G, et al. Research progress of IPF treating from stasis [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2022, 50(2): 98-102.
- [17] 田丽, 刘学, 张伟. 从气虚血瘀论治肺纤维化 [J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(6): 1217-1219.
- Tian L, Liu X, Zhang W. Treatment of pulmonary fibrosis from qi deficiency and blood stasis [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2019, 35(6): 1217-1219.
- [18] Fujii M, Hayakawa H, Urano T, et al. Relevance of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for hypercoagulable state in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Thromb Res, 2000, 99(2): 111-117.
- [19] 王慧颖, 李晗, 宋玲, 等. 血栓通注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1753-1762.
- Wang H Y, Li H, Song L, et al. Pharmacodynamic study of Xueshuantong Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(9): 1753-1762.
- [20] 葛春蕾, 张兴彩, 李珂珂. 单味中药及其提取物在肺纤维化治疗中的研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48(6): 67-72.
- Ge C L, Zhang X C, Li K K. Research progress of single Chinese medicinal and its extracts in the treatment of pulmonary fibrosis [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2020, 48(6): 67-72.
- [21] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- Wang Y, Chu Y, Li W, et al. Advances in study on saponins in *Panax notoginseng* and their pharmacological activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [22] 王京凯, 王艳春, 王振宇. 三七总皂苷对肝纤维化小鼠转化生长因子 β_1 及重组人SMAD家族成员3的调控作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(10): 1163-1166.
- Wang J K, Wang Y C, Wang Z Y. Research of *Panax notoginseng* saponins on the expression of transforming growth factor- β_1 and recombinant human mothers against decapentaplegic homolog 3 in the mice with liver fibrosis [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(10): 1163-1166.
- [23] Fan M L, Lan X T, Wang Q L, et al. Renal function protection and the mechanism of ginsenosides: Current progress and future perspectives [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1070738.
- [24] Xiao T, Ren S, Bao J, et al. Vorapaxar proven to be a promising candidate for pulmonary fibrosis by intervening in the PAR1/JAK2/STAT1/3 signaling pathway-an experimental *in vitro* and *in vivo* study [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 943: 175438.