

# 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 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

邓宏哲<sup>1</sup>, 陈 昆<sup>1</sup>, 李 鹏<sup>2</sup>, 朱清海<sup>1\*</sup>

1. 黄淮学院直属附属驻马店市中心医院 普外腹腔镜、减重与代谢外科, 河南 驻马店 463000

2. 黄淮学院化学与制药工程学院, 河南 驻马店 463003

**摘要:** **目的** 探究人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对大鼠肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 的影响及作用机制。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (72 mg/kg) 组、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 激动剂 (200 mg/kg) 组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (72 mg/kg) + AMPK 抑制剂 (20 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠气管内注射博来霉素 (5 mg/kg) 构建大鼠 PF 模型。造模成功后 2 d 开始给药, 连续给药 28 d 后检测大鼠肺功能指标; 采用苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色观察肺组织病理变化; 采用免疫组化检测肺组织 I 型胶原 (collagen I) 和  $\alpha$ -肌动球蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 表达; 采用试剂盒测定肺组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平; 采用 Western blotting 检测肺组织 p-AMPK/AMPK、NOD 样蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1)、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 AMPK 激动剂组大鼠肺功能指标明显升高 ( $P < 0.05$ ), 肺纤维化程度改善, 肺指数及肺组织 Hyp、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 肺组织 collagen I、 $\alpha$ -SMA、NLRP3、cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ), p-AMPK/AMPK 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> + AMPK 抑制剂组大鼠肺功能指标降低 ( $P < 0.05$ ), 肺纤维化程度加重, 肺指数及肺组织 Hyp、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平均明显增加 ( $P < 0.05$ ), 肺组织 collagen I、 $\alpha$ -SMA、NLRP3、cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), p-AMPK/AMPK 表达降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够抑制 AMPK/NLRP3 介导的细胞焦亡改善博来霉素诱导的大鼠 PF。

**关键词:** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 肺纤维化; 博来霉素; 细胞焦亡; AMPK/NLRP3 通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)03 - 0841 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.018

## Ginsenoside Rg<sub>1</sub> inhibits pulmonary fibrosis in rats by regulating AMPK/NLRP3 pathway-mediated pyroptosis

DENG Hong-zhe<sup>1</sup>, CHEN Kun<sup>1</sup>, LI Peng<sup>2</sup>, ZHU Qing-hai<sup>1</sup>

1. Department of General Laparoscopy, Weight Loss and Metabolic Surgery, Zhumadian Central Hospital Directly Affiliated to Huanghuai College, Zhumadian 463000, China

2. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Huanghuai College, Zhumadian 463003, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on pulmonary fibrosis (PF) in rats. **Methods** A total of 50 male SD rats were randomly divided into control group, model group, ginsenoside Rg<sub>1</sub> (72 mg/kg) group, adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) agonist (200 mg/kg) group and ginsenoside Rg<sub>1</sub> (72 mg/kg) + AMPK inhibitor group (20 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for the control group, rats in the other groups were injected with bleomycin (5 mg/kg) into trachea to establish a rat model of PF. The drug was administered two days after successful modeling. After continuous administration for 28 d, pulmonary function indexes of rats were detected; HE and Masson staining were used to observe pathological

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 河南省高等学校自然科学重点科研项目 (21B320122)

作者简介: 邓宏哲 (1992—), 男, 硕士, 研究方向为脏器纤维化临床治疗及中药干预机制。E-mail: denghongzhe1992@163.com

\*通信作者: 朱清海 (1971—), 男, 主任医师, 研究方向为脏器纤维化中医药临床治疗。E-mail: liuyedaodocor@163.com

changes of lung tissue; Immunohistochemistry was used to detect the expressions of collagen I and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in lung tissue; Levels of hydroxyproline (Hyp), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  and IL-18 in lung tissue were measured by kit. p-AMPK/AMPK, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteine-aspartate protease-1 (Caspase-1), gasdermin D (GSDMD), IL-1 $\beta$  and IL-18 protein expressions in lung tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, lung function indexes of rats in ginsenoside Rg<sub>1</sub> group and AMPK agonist group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), degree of pulmonary fibrosis was improved, lung index and levels of Hyp, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 in lung tissue were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), collagen I,  $\alpha$ -SMA, NLRP3, cleaved Caspase-1/pro Caspase-1, GSDMD-N/GSDMD, IL-1 $\beta$  and IL-18 protein expressions in lung tissues were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while p-AMPK/AMPK protein expression was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with ginsenoside Rg<sub>1</sub> group, lung function index in ginsenoside Rg<sub>1</sub> + AMPK inhibitor group was decreased ( $P < 0.05$ ), pulmonary fibrosis was aggravated, lung index and levels of Hyp, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 in lung tissue were significantly increased ( $P < 0.05$ ), collagen I,  $\alpha$ -SMA, NLRP3, cleaved caspase-1/pro caspase-1, GSDMD-N/GSDMD, IL-1 $\beta$  and IL-18 protein expressions in lung tissue were increased ( $P < 0.05$ ), but p-AMPK/AMPK expression was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rg<sub>1</sub> can inhibit AMPK/NLRP3-mediated cell scorch and improve bleomycin-induced PF in rats.

**Key words:** ginsenoside Rg<sub>1</sub>; pulmonary fibrosis; bleomycin; pyroptosis; AMPK/NLRP3 pathway

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种罕见的呼吸系统疾病, 主要特征为肺泡壁及间质内大量炎性细胞浸润、成纤维细胞过度增殖以及细胞外基质合成增多、肺结构破坏等, 并最终导致进行性严重呼吸困难<sup>[1]</sup>。既往研究显示, PF 发病率呈逐年增加趋势, 且患者预后状况极差, 确诊后平均生存时间仅为 2~3 年, 严重危害人类健康<sup>[2]</sup>。目前, 对于 PF 除肺移植外尚缺乏理想的药物治疗。因此以 PF 发病机制的关键环节为切入点, 研发有效的治疗药物对于改善 PF 患者预后具有重要的临床价值。

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 是三七总皂苷中的主要活性成分, 具有抗炎、抗纤维等作用<sup>[3]</sup>。研究显示, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够上调小窝蛋白-1 表达, 下调转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 表达, 降低肺组织  $\alpha$ -肌动球蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 含量, 从而改善 PF 大鼠组织形态<sup>[4]</sup>, 提示人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可能是治疗 PF 的潜在药物。但是目前有关人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 在 PF 中的机制研究仍然较少。细胞焦亡作为一种新的炎症性细胞死亡方式, 在 PF 进展中发挥重要作用。研究显示, 博来霉素诱导的大鼠 PF 模型中焦亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-18 表达显著升高, 而抑制 Caspase-1 表达能够抑制细胞焦亡过程, 从而显著改善大鼠 PF 组织形态<sup>[5]</sup>, 提示通过调控 Caspase-1 依赖性细胞焦亡可能为治疗 PF 的关键机制之一。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) /

NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 是细胞焦亡调节的重要途径, 抑制 AMPK 表达能够激活 NLRP3 进而启动细胞焦亡<sup>[6]</sup>, 且 AMPK 及 NLRP3 炎性小体激活在 PF 组织损伤中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。本研究拟通过构建博来霉素诱导大鼠 PF 模型, 旨在从 AMPK/NLRP3 介导细胞焦亡途径探究人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 抗大鼠 PF 的作用机制, 以期为人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 开发临床应用治疗 PF 提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 180~200 g, 6~8 周龄, 购自郑州大学医学院实验动物学部, 生产许可证号 SCXK (豫) 2018-0007, 使用许可证号 SYXK (豫) 2019-0013。动物饲养于 (24 $\pm$ 2) °C、相对湿度 (55 $\pm$ 5)% 的环境中, 昼夜交替光照, 自由进食饮水, 适应性喂养 1 周。动物实验符合 3R 原则, 通过驻马店市中心医院动物医学伦理委员会审查 (批准号 2021LL020)。

### 1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (批号 AF20033002, 质量分数为 90%) 购自成都埃法生物科技有限公司; 博来霉素 (批号 20067411) 购自瀚晖制药有限公司; AMPK 激动剂 AICAR (批号 S1802)、AMPK 抑制剂 Compound C (批号 S7306) 购自美国 Selleck 公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-18 检测试剂盒 (批号分别为 20180052IL6M、20165200IL1M、20160645TNF1M、20160648IL18M) 购自上海拜力生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、牛血清白蛋白 (bovine

serum albumin, BSA)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、显影液、 $\beta$ -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号分别为 P0012S、ST023、C0105S、C1091、AF5001、A0412、A0408)购自上海碧云天生物技术公司; Masson 染色液(批号 G1343)购自北京 Bioss 公司; 免疫组化检测试剂盒(批号 SP-9001)购自北京中杉金桥公司; Hyp 检测试剂盒(批号 A030-2-1)购自南京建成生物工程研究所; collagen I 抗体(批号 ab270993)、 $\alpha$ -SMA 抗体(批号 ab265588)购自英国 Abcam 公司; AMPK 抗体、p-AMPK 抗体、NLRP3 抗体、Caspase-1 抗体、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 抗体、IL-1 $\beta$  抗体、IL-18 抗体(批号分别为 9158、5759、13158、83383、39754、12703、67775)购自美国 CST 公司。

### 1.3 仪器

LP-5117 型多功能酶标仪(长春乐璞科技有限公司); CKX53 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); H3-18KR 型高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司); Flexivent fv-fx4 型小动物肺功能分析系统(加拿大 Scireq 公司); Gel Doc XR<sup>+</sup>型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); MDF-C8V(N)型-80 °C 冷冻冰箱(日本 SANYO 公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

参照文献方法<sup>[4,9]</sup>构建 PF 大鼠模型,大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后,取仰卧位固定,行器官插管后单次注射博来霉素(5 mg/kg),模型成功率为 100%。造模成功后 2 d,动物随机分为模型组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(72 mg/kg)<sup>[4,10]</sup>组、AMPK 激动剂(200 mg/kg)组、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(72 mg/kg) + AMPK 抑制剂(20 mg/kg)<sup>[11-12]</sup>组,每组各 10 只,另取 10 只大鼠作为对照组。人参皂苷 Rg<sub>1</sub>组 ig 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, AMPK 激动剂组 ip AICAR, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> + AMPK 抑制剂组 ig 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 同时 ip Compound C, 对照组和模型组 ig 生理盐水, 1 次/d, 连续 28 d。

### 2.2 大鼠呼吸功能指标检测

各组大鼠麻醉后,行气管插管并利用小动物肺功能分析系统检测大鼠呼吸功能相关指标,测定用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、第 0.3 秒用力呼气容积(forced expiratory volume, FEV<sub>0.3</sub>)与 FVC 的比值(FEV<sub>0.3</sub>/FVC)、最大呼气量(peak

expiratory flow, PEF)和最大通气量(maximal voluntary ventilation, MVV)。以上检测指标均由同一人完成,每只大鼠测量 3 次,取平均值。

### 2.3 肺组织标本采集

给药结束后,称定各组大鼠体质量,大鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉,断头处死,取全肺,生理盐水冲洗肺组织表面血渍,滤纸吸干水平,称定质量,计算肺指数。将部分左肺组织放置于 4%多聚甲醛溶液中固定,右肺组织放置于冷冻管内放置于-80 °C 冰箱保存备用。

肺指数 = 肺湿质量/体质量

### 2.4 肺组织病理形态学观察

取于 4%多聚甲醛中固定的左肺组织,脱水、透明石蜡包埋,制备组织切片,切片厚度约 3~5  $\mu$ m,进行 HE 染色、封片后,于显微镜下观察肺组织病理学变化;进行 Masson 染色,观察肺组织病理学变化及胶原沉积情况。

### 2.5 肺组织 Hyp、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和 IL-18 含量检测

剪取 100 mg 各组大鼠右肺组织,充分匀浆,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定 Hyp、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-18 含量。

### 2.6 免疫组化检测肺组织 collagen I 和 $\alpha$ -SMA 蛋白表达

取各组大鼠左肺组织石蜡切片,按照免疫组化检测试剂盒处理,分别滴加 collagen I、 $\alpha$ -SMA 抗体(1:200)孵育后,滴加二抗(1:1000)孵育,DAB 显色,于显微镜下观察肺组织 collagen I、 $\alpha$ -SMA 阳性表达, collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒。利用 Image Pro Plus 图像分析软件进行半定量分析,每组取 6 张切片,随机取 6 个高倍视野,测量每个视野中蛋白阳性染色区域面积,计算得到阳性染色区域面与总面积比值,即为 collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量。

### 2.7 Western blotting 检测肺组织 AMPK/NLRP3 通路及焦亡相关蛋白表达

取各组大鼠右肺组织,剪碎,液氮碾磨成细粉状,加入 5 倍量裂解液,4 °C 裂解 40 min,提取蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% BSA,室温封闭 2 h; 分别加入 p-AMPK 抗体(1:1000)、AMPK 抗体(1:1000)、NLRP3 抗体(1:1000)、Caspase-1 抗体(1:1000)、GSDMD 抗

体 (1:1000)、IL-1 $\beta$  抗体 (1:1000)、IL-18 抗体 (1:1000) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:2000), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入相应二抗 (1:5000), 室温孵育 1~2 h; 洗膜 3 次, 每次 5 min, 滴加显影液, 显影并拍照。

### 2.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺功能的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺功能指标 FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC、PEF 和 MVV 均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组和 AMPK 激动剂组 FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC、PEF 和 MVV 指标均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组 FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC、PEF 和 MVV 指标均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织病理变化的影响

HE 染色结果 (图 1) 显示, 对照组大鼠肺组织形态结构正常, 肺泡清晰可见, 未见明显的炎症细胞浸润。模型组大鼠肺组织结构紊乱, 肺泡壁明显

增厚且有部分肺泡已消失, 可见大量炎症细胞在肺泡和间质腔内浸润。与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠肺组织结构损伤减轻, 肺泡壁厚度降低, 炎症细胞浸润现象降低。与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组大鼠肺组织损伤程度较模型相似。

Masson 染色结果显示, 对照组大鼠肺组织结构正常, 无典型的纤维化现象。模型组大鼠肺组织出现大量胶原沉积, 纤维化程度严重。与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠胶原沉积降低, 纤维化程度减轻。与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组大鼠肺组织胶原沉积增多, 纤维化程度加重, 与模型组相近。

### 3.3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺指数和肺组织 Hyp 含量的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺指数和肺组织 Hyp 含量均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠肺指数和肺组织 Hyp 含量均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组大鼠肺指数和肺组织 Hyp 含量均显著增加 ( $P < 0.05$ )。

表 1 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on pulmonary function of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	FVC/mL	FEV <sub>0.3</sub> /FVC/%	PEF/(mL·s <sup>-1</sup> )	MVV/(mL·min <sup>-1</sup> )
对照	—	9.14 ± 1.04	89.87 ± 7.55	31.22 ± 2.15	150.88 ± 15.02
模型	—	3.50 ± 0.40 <sup>#</sup>	52.36 ± 7.63 <sup>#</sup>	15.70 ± 1.12 <sup>#</sup>	102.30 ± 9.32 <sup>#</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	72	6.90 ± 0.72 <sup>*</sup>	73.50 ± 8.03 <sup>*</sup>	24.41 ± 2.45 <sup>*</sup>	135.50 ± 9.90 <sup>*</sup>
AMPK 激动剂	200	6.88 ± 0.68 <sup>*</sup>	71.11 ± 9.12 <sup>*</sup>	23.33 ± 2.01 <sup>*</sup>	131.20 ± 10.15 <sup>*</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> +AMPK 抑制剂	72+20	5.01 ± 0.60 <sup>△</sup>	62.00 ± 6.10 <sup>△</sup>	18.77 ± 1.15 <sup>△</sup>	114.65 ± 8.76 <sup>△</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ , 下表同

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs ginsenoside Rg<sub>1</sub> group, same as below tables

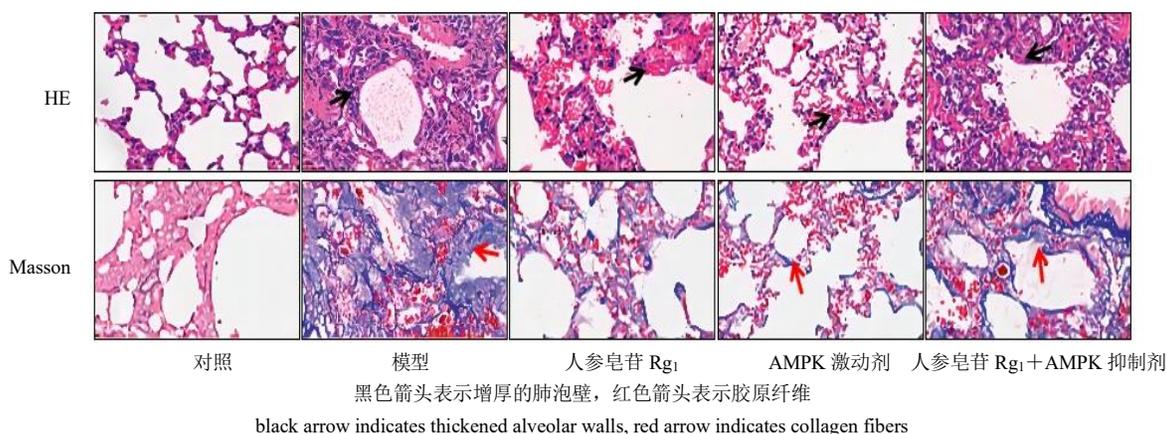


图 1 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织病理变化的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on pathological changes of lung tissue in PF rats (×400)

表2 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺指数和肺组织 Hyp 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on lung index and Hyp content in lung tissue of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	肺指数	Hyp/(μg·g <sup>-1</sup> )
对照	—	4.10±0.29	1.90±0.24
模型	—	9.84±0.84 <sup>#</sup>	6.97±0.15 <sup>#</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	72	6.45±0.52 <sup>*</sup>	4.64±0.20 <sup>*</sup>
AMPK 激动剂	200	6.30±0.50 <sup>*</sup>	4.51±0.30 <sup>*</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> +AMPK 抑制剂	72+20	8.21±0.64 <sup>△</sup>	5.20±0.20 <sup>△</sup>

### 3.4 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达的影响

如图 2 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.05$ )。

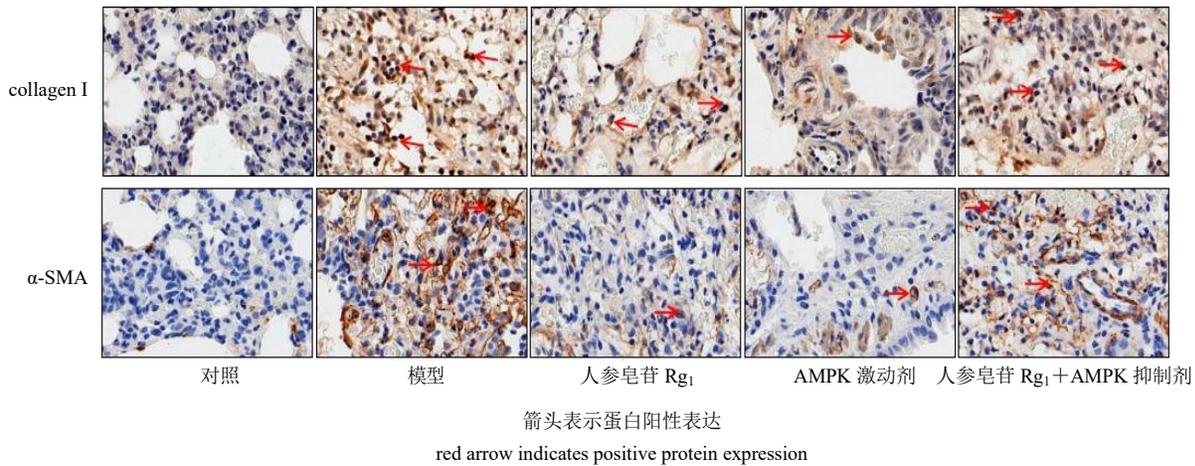


图 2 免疫组化检测各组大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达 (×400)

Fig. 2 Expressions of collagen I and α-SMA protein in lung tissue of rats in each group detected by immunohistochemistry (× 400)

表 3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织 collagen I 和 α-SMA 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on collagen I and α-SMA protein expressions in lung tissue of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	蛋白相对表达量	
		collagen I	α-SMA
对照	—	1.24±0.30	1.01±0.22
模型	—	12.36±3.00 <sup>#</sup>	13.68±3.69 <sup>#</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	72	5.64±2.01 <sup>*</sup>	5.00±1.88 <sup>*</sup>
AMPK 激动剂	200	5.78±2.14 <sup>*</sup>	5.41±2.08 <sup>*</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> +AMPK 抑制剂	72+20	9.88±3.01 <sup>△</sup>	10.62±3.02 <sup>△</sup>

### 3.5 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织炎症因子水平的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>+AMPK 抑制剂组大鼠肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。

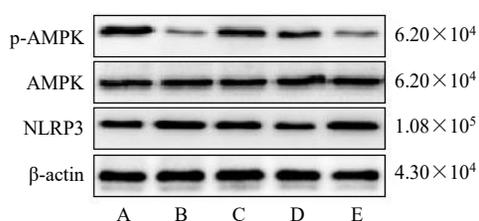
表 4 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on levels of TNF-α, IL-6, IL-1β and IL-18 in lung tissue of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	TNF-α/(ng·g <sup>-1</sup> )	IL-6/(ng·g <sup>-1</sup> )	IL-1β/(ng·g <sup>-1</sup> )	IL-18/(ng·g <sup>-1</sup> )
对照	—	20.13±5.01	15.23±4.50	17.23±3.60	24.68±4.43
模型	—	56.77±8.70 <sup>#</sup>	38.76±6.01 <sup>#</sup>	40.56±6.88 <sup>#</sup>	50.88±7.23 <sup>#</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	72	35.08±5.89 <sup>*</sup>	25.20±4.09 <sup>*</sup>	23.33±4.23 <sup>*</sup>	30.45±4.35 <sup>*</sup>
AMPK 激动剂	200	38.23±4.05 <sup>*</sup>	23.88±5.01 <sup>*</sup>	26.30±3.45 <sup>*</sup>	32.04±4.61 <sup>*</sup>
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> +AMPK 抑制剂	72+20	50.23±7.34 <sup>△</sup>	32.33±4.03 <sup>△</sup>	37.52±5.20 <sup>△</sup>	43.77±5.10 <sup>△</sup>

### 3.6 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> + AMPK 抑制剂组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), NLRP3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。



A-对照组 B-模型组 C-人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组 D-AMPK 激动剂组 E-人参皂苷 Rg<sub>1</sub> + AMPK 抑制剂组 与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ ; 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较: Δ $P < 0.05$ , 下图同

A-control group B-model group C-ginsenoside Rg<sub>1</sub> group D-AMPK agonist group E-ginsenoside Rg<sub>1</sub> + AMPK inhibitor group # $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group; Δ $P < 0.05$  vs ginsenoside Rg<sub>1</sub> group, same as below figures

图 3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on expressions of AMPK/NLRP3 pathway related proteins in lung tissue of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

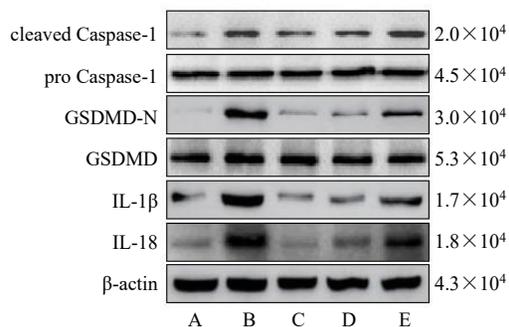


图 4 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织焦亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

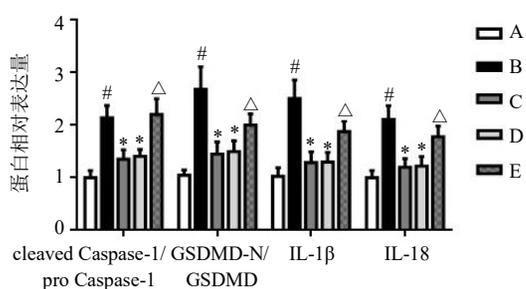
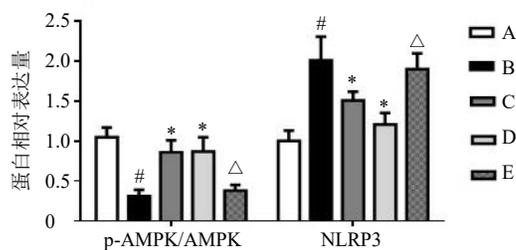
Fig. 4 Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on expressions of scorch-related proteins in lung tissue of PF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 4 讨论

PF 是一种不可逆且致命的肺部疾病, 并伴有组织炎症及肺泡结构破坏等特征。现代医学认为炎症调节失衡是 PF 主要的发病机制之一, PF 前期会发生明显的肺泡炎症, 导致巨噬细胞以及中性粒细胞在下呼吸道大量聚集, 从而引起肺泡上皮细胞凋亡增加, 并最终导致肺结构破坏, 渐进性形成 PF<sup>[13]</sup>。虽然早期诊断和治疗对于 PF 临床症状改善至关重要, 但是目前尚未有良好的治疗药物。尼达尼布和

### 3.7 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对 PF 大鼠肺组织焦亡相关蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组及 AMPK 激动剂组 cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 组比较, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> + AMPK 抑制剂组 cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1β 和 IL-18 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。



吡非尼酮被推荐为临床治疗 PF 的一线用药, 但是由于其诱发严重不良反应发生率高, 限制了上述药物临床应用。因此, 寻找安全有效的治疗药物已经成为众多学者研究的重点。

中医药替代疗法在 PF 中逐渐被广泛接受, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 是人参皂苷中的主要活性成分之一, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤<sup>[14]</sup>等药理学作用。研究发现, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够改善 PF 肺组织结构破坏, 具有潜在的 PF 治疗价值<sup>[4]</sup>。但是目前有关人参皂苷

Rg<sub>1</sub> 对 PF 的作用机制尚不完全清楚。为此本研究首先通过博来霉素诱导大鼠 PF 模型, 观察人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对其作用。结果显示, 模型组大鼠肺功能 FVC、FEV0.3/FVC、PEF 和 MVV 指标均显著降低, 肺指数、肺组织胶原沉积现象及纤维化程度增加, 肺组织结构出现明显损伤, 提示 PF 大鼠模型构建成功。细胞外基质的合成与分解的动态平衡是维持肺组织正常结构和功能的关键。collagen I 作为 PF 时细胞外基质的主要组成成分, 由成纤维细胞和肌成纤维细胞合成分泌, 而当肺组织损伤时, 成纤维细胞大量增殖并向肌成纤维细胞转化, 从而合成大量细胞外基质, 导致肺实质性损伤与结构重塑, 诱导 PF<sup>[15]</sup>。α-SMA 是成纤维细胞转化为肌成纤维细胞时的标志物, PF 时 α-SMA 表达明显增加<sup>[16]</sup>。肺指数和 Hyp 是反映肺纤维化的重要指标。Hyp 作为胶原中特定氨基酸, 其含量高低是评估胶原含量的重要指标<sup>[17]</sup>。因此, 通过检测肺系数、肺组织 Hyp 含量以及 collagen I、α-SMA 蛋白表达能够准确反映肺组织胶原沉积情况, 评价 PF 时组织损伤程度。研究显示, 在 PF 大鼠模型中肺指数、肺组织 Hyp 含量以及 collagen I、α-SMA 蛋白表达均显著升高, 而抑制上述指标变化能够显著改善 PF 肺组织损伤程度<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, 模型组大鼠肺指数、肺组织 Hyp 含量以及 collagen I、α-SMA 蛋白表达升高, 给予人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 干预后肺指数、肺组织 Hyp 含量以及 collagen I、α-SMA 蛋白表达均显著降低, 表明人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够有效降低胶原蛋白沉积, 减轻 PF。PF 时肺泡上皮细胞释放大量炎症细胞因子如 TNF-α、IL-6、IL-1β 等, 高炎症反应会导致肺成纤维细胞过度增殖以及转向肌成纤维细胞, 导致胶原合成增加<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 模型组肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平明显升高, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够显著降低肺组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-18 水平, 表明人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够通过抑制炎症反应, 改善 PF。

细胞焦亡是一种新的程序性死亡, 也被称为炎症性调节性坏死, 主要表现为细胞膜胀大破裂导致内容物释放, 诱导炎症反应, 在 PF 中发挥重要作用。NLRP3 炎性小体是焦亡启动的关键, 当 NLRP3 被激活时会促进 NLRP3 炎性小体组装形成复合物, 继而激活 pro Caspase-1 形成具有活性的 cleaved Caspase-1, 诱导焦亡执行蛋白 GSDMD 形成具有细胞毒性的 GSDMD-N, 并使其募集至细胞膜上形成焦亡小孔, 促进炎症因子 IL-1β 和 IL-18 表达, 诱

导细胞焦亡<sup>[20]</sup>。研究显示, NLRP3 炎性小体参与 PF 疾病进展的各个阶段, 其活化后能够激活 IL-1β 和 IL-18, 而 IL-1β 能够刺激 TGF-β1 合成, 诱导肺泡上皮细胞间质转化, 从而加剧 PF 形成, 抑制 NLRP3 能够明显改善 PF<sup>[21]</sup>, 表明 NLRP3 炎性小体可能成为治疗 PF 的关键靶点。AMPK 被认为是细胞能量和代谢的调节剂, 参与调节炎症、氧化应激、自噬等途径, 在 PF 肺组织损伤中发挥保护作用<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, 模型组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK 表达降低, NLRP3 表达增加, 焦亡相关蛋白 (cleaved Caspase-1/pro Caspase-1、GSDMD-N/GSDMD、IL-1β、IL-18) 表达增加, 而人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够上调 p-AMPK/AMPK 表达, 下调 NLRP3 及焦亡相关蛋白表达。抑制 AMPK 活性可以通过激活 NLRP3 炎性小体, 促进细胞焦亡, 二甲双胍可以通过 AMPK 途径抑制 NLRP3 炎性小体活化, 抑制心肌细胞焦亡, 从而发挥心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 且此保护作用可显著被 AMPK 抑制剂 Compound C 阻断<sup>[23]</sup>。本研究结果显示, AMPK 激动剂组与人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 发挥同向抗 PF 作用, 肺组织 NLRP3 及焦亡相关蛋白表达均明显降低, 炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-18 水平降低, 提示 AMPK/NLRP3 途径可能是人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 抗 PF 的重要调节通路。为进一步确证 AMPK/NLRP3 在人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 抗 PF 中保护机制 (图 5), 同时给予人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 AMPK 抑制剂

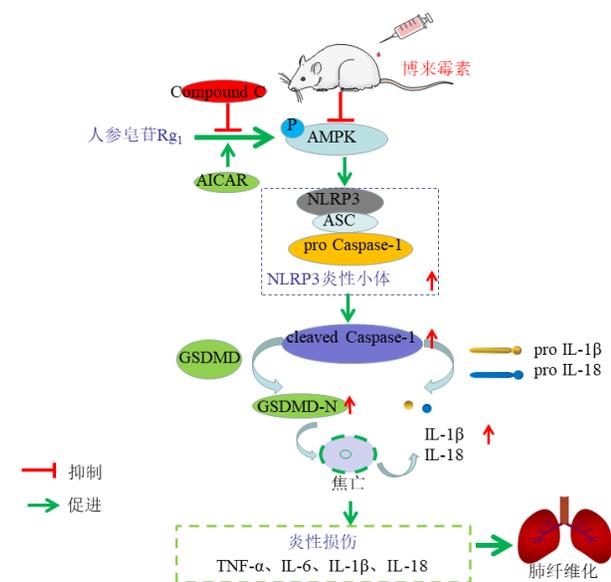


图5 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 通过调控 AMPK/NLRP3 通路抑制细胞焦亡减轻博来霉素诱导的 PF  
 Fig. 5 Ginsenoside Rg<sub>1</sub> inhibits pyroptosis by regulating AMPK/NLRP3 pathway to reduce bleomycin-induced PF

Compound C, 发现人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对博来霉素诱导的大鼠 PF 保护作用被逆转, 炎症因子及焦亡相关蛋白表达均明显升高, 提示人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可以通过促进 AMPK 表达, 抑制 NLRP3 介导细胞焦亡发挥 PF 肺组织损伤的保护作用。

综上所述, 本研究发现人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能够改善博来霉素诱导的 PF, 其作用机制与抑制 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡相关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Otoupalova E, Smith S, Cheng G J, *et al.* Oxidative stress in pulmonary fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2020, 10(2): 509-547.
- [2] Raghu G, Collard H R, Egan J J, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.
- [3] 白羽, 李傲寒, 刘丽萍, 等. 人参皂苷治疗纤维化疾病的分子作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2902-2911.
- [4] Zhan H Q, Huang F, Ma W Z, *et al.* Protective effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Involvement of caveolin-1 and TGF- $\beta$ 1 signal pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(8): 1284-1292.
- [5] Liang Q, Cai W Y, Zhao Y X, *et al.* Lycorine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104884.
- [6] Yuan Y J, Fan X Y, Guo Z P, *et al.* Metformin protects against spinal cord injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Anal Cell Pathol*, 2022, 2022: 3634908.
- [7] Cheng D M, Xu Q, Wang Y, *et al.* Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 349.
- [8] Li Y, Li H T, Liu S, *et al.* Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Immunol*, 2018, 99: 134-144.
- [9] Xing X Y, Qiang W J, Bao J L, *et al.* Jinbei Oral Liquid ameliorates bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis in rats via reversion of Th1/Th2 shift [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(3): 273-280.
- [10] 黄锋, 孙娟, 杨智华, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 灌胃对大鼠特发性肺间质纤维化的治疗作用及其机制探讨 [J]. *山东医药*, 2017, 57(27): 40-42.
- [11] 张晓蕾, 张凯, 秦永亭, 等. 木犀草素调控 AMPK/NLRP3 轴介导的细胞焦亡对病毒性心肌炎的保护作用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5): 514-519.
- [12] 周俊, 林文静, 林森, 等. AMPK 通过抑制炎症反应减轻小鼠肾脏缺血再灌注后纤维化 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2016, 32(6): 450-456.
- [13] O'Dwyer D N, Ashley S L, Gurczynski S J, *et al.* Lung microbiota contribute to pulmonary inflammation and disease progression in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(9): 1127-1138.
- [14] 李渊, 顾守美, 刘小虎, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对移植性白血病模型小鼠的作用 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(12): 2571-2577.
- [15] 贺彬, 曾骞, 刘伟, 等. 水蛭素通过调控 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路抗肺纤维化的作用及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(9): 1334-1340.
- [16] Zhang Y, Jiao H, Wu Y, *et al.* P120-catenin regulates pulmonary fibrosis and TGF- $\beta$  induced lung fibroblast differentiation [J]. *Life Sci*, 2019, 230: 35-44.
- [17] Qu S J, Zhao L, Song Z Z, *et al.* Expression and significance of miR-223 in rats with pulmonary fibrosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3951-3958.
- [18] Wang J P, Wang H, Fang F, *et al.* Danggui Buxue Tang ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing the TLR4/NLRP3 signaling pathway in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8030143.
- [19] Zhou Y, Li P, Duan J X, *et al.* Aucubin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2062-2073.
- [20] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [21] Li M, Zhang S L, Yuan F, *et al.* NecroX-5 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 128.
- [22] Cheng D M, Xu Q, Wang Y, *et al.* Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 349.
- [23] Zhang J, Huang L L, Shi X, *et al.* Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(23): 24270-24287.

[责任编辑 李亚楠]