人参不定根调节 NLRP3 炎症小体通路改善心肌缺血损伤作用

王秦玺，曲雪峰，谢泽眯，陈一豪，卓胜男，吴月金，王 茵*
杭州医学院药学院（食品科学与工程学院），浙江 杭州 310013

摘 要：目的 探讨人参不定根对心肌缺血（myocardial ischemia，MI）诱导的心肌细胞凋亡和心肌纤维化的影响及作用机制。**方法** 采用高效液相色谱法和电感耦合等离子体质谱法检测人参不定根的主要成分。雄性 C57BL/6 小鼠 sc 异丙肾上腺素建立心肌缺血模型，心电图用于心肌缺血的诊断；采用苏木素-伊红（HE）染色和 Masson 染色评估心脏组织病理变化；ELISA 检测血清中炎症因子水平；qRT-PCR 和 Western blotting 检测心脏组织凋亡、纤维化和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3，NLRP3）炎症小体、核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）相关因子表达。**结果** 人参不定根能明显缓解心肌缺血导致的心肌形态的病理变化，减少心肌纤维化面积，改善 ST 段抬高，抑制过度炎症。此外，人参不定根能明显抑制转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）、NF-κB 和 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白的表达水平（P＜0.05、0.01、0.001）。**结论** 人参不定根可通过抑制 TGF-β1、NF-κB 通路和 NLRP3 炎症小体的激活，缓解心肌缺血诱发的损伤。人参不定根具有缓解心肌缺血损伤的潜力。
关键词：心肌缺血；人参不定根；核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3；核因子-κB；转化生长因子-β1；凋亡；纤维化
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2024)12 - 4065 - 10
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.014

Ginseng adventitious root ameliorates myocardial ischemic injury by regulating NLRP3 inflammasome pathway

WANG Qinxi, QU Xuefeng, XIE Zemi, CHEN Yihao, ZHUO Shengnan, WU Yuejin, WANG Yin
School of Pharmacy (School of Food Science and Engineering), Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of ginseng adventitious root on myocardial ischemia (MI)-induced myocardial apoptosis and cardiac fibrosis. **Methods** High-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry were performed to detect the primary constituents of ginseng adventitious root. An MI model was established by subcutaneously injecting isoproterenol to male C57BL/6 mice. Electrocardiographs were used for the diagnosis of MI; Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were used to evaluate the pathological changes; ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors in serum; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expressions of apoptosis, fibrosis, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome and nuclear factor-κB (NF-κB) related factors in cardiac tissues. **Results** Ginseng adventitious root markedly alleviated the pathological changes of myocardial morphology caused by MI, reduced the area of myocardial fibrosis, improved ST segment elevation and suppressed excessive inflammation. Furthermore, ginseng adventitious root significantly inhibited the expressions of transforming growth factor-β1 (TGF-β1), NF-κB and NLRP3 inflammasome pathway related proteins (P < 0.05, 0.01, 0.001). **Conclusion** Ginseng adventitious root may ameliorate MI-induced injury partly by inhibiting the activation of TGF-β1, NF-κB pathway and NLRP3 inflammasome. Ginseng adventitious root has the potential to alleviate myocardial ischemic injury.
Key words: myocardial ischemia; ginseng adventitious root; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3; nuclear factor-κB; transforming growth factor-β1; apoptosis; fibrosis

收稿日期：2024-01-27
基金项目：国家自然科学基金资助项目（82003445）；浙江省营养重点学科（16-zc03）；浙江省医药卫生科学规划项目（2021KY631）；浙江省医学科学院科技项目（C72009Q04）
作者简介：王秦玺（1999—），硕士研究生，研究方向为营养与食品卫生。E-mail: wqxshangan@163.com
***通信作者：**王 茵（1963—），研究员，主要研究方向为营养与食品卫生。E-mail: wy3333@hmc.edu.cn

人参 *Ginseng Radix* et *Rhizoma* 是一种传统的名贵中药材，具有多种药理活性，如抗氧化、抗炎、抗癌、抗糖尿病、抗衰老和免疫调节作用，对于治疗心血管疾病也十分重要[1-2]。种植人参是一个缓慢的过程，5～7 年才能收获成熟的人参根。此外，人参皂苷的含量还受到气候、土壤、环境污染和虫害的影响[3]。作为田间种植人参的替代方法，利用生物反应器技术培育的人参不定根培养物已被应用于人参的生产[4]。安全性研究表明，人参不定根没有明显的急性口服毒性、致突变毒性、致畸毒性和亚慢性口服毒性[5]。市售人参不定根产品作为健康食品、功能性食品和膳食补充剂越来越受欢迎[6]。以往的研究表明，人参对心肌缺血引起的损伤有保护作用[7-8]。然而，人参不定根对心肌缺血诱发损伤的保护作用及其潜在的分子机制尚不清楚。

心肌缺血是由冠状动脉闭塞引起的一种疾病，其特征是心肌缺血和缺氧，是导致全球死亡的主要原因之一[9]。再灌注即恢复缺血心肌的血流量，是临床上经常使用的一种治疗方法。然而，再灌注治疗可能会引发心肌缺血再灌注损伤[10]。因此，有必要找到有效的方法来改善心肌缺血引起的损伤。心肌细胞凋亡和心肌纤维化以及过度炎症是心肌缺血后心肌损伤的主要原因[11]。炎症是心肌缺血引起损伤的主要病理因素之一[12]。白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-18 和核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）等炎症因子会引发心肌凋亡、细胞外基质沉积和心肌纤维紊乱[13-14]。因此，探索抗炎药物是预防和治疗心肌缺血的重要策略。

多项研究表明，炎症因子风暴会通过激活先天性炎症信号通路之一的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3，NLRP3）炎性小体通路引发不良的心肌重塑[15-16]。NLRP3 炎症小体是一种细胞内多蛋白复合物，由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein，ASC，包括一个 Caspase 激活和招募结构域）和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 前体（pro-cysteine-requiring aspartate protease-1，pro-Caspase-1）组成[17]。心肌损伤会促进炎症转录因子 NF-κB 的激活，从而增加 NLRP3、pro-IL-1β 和 pro-IL-18 的水平[18]。NLRP3 炎性小体促进 pro-Caspase-1 转化为 Caspase-1 cut，然后 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 分别转化为成熟的 IL-1β 和 IL-18[19]。IL-1β 和 IL-18 通过调节免疫细胞募集、焦亡、细胞凋亡、细胞外基质积累和激活转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）通路，诱发炎症和心肌损伤[20-21]。本研究拟考察人参不定根对心肌缺血诱导的心肌细胞凋亡和心肌纤维化的影响及作用机制。

1 材料

1.1 动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠，8 周龄，体质量 20～22 g，购自杭州医学院实验动物中心，生产许可证号 SCXK（浙）2019-0002，合格证编号 20220429Abzz0100018945。动物饲养于温度（22±1）℃、相对湿度（55±5）%的环境下，动物实验经杭州医学院伦理委员会批准（批准号 2018-045）。

1.2 药材

人参不定根由大连普瑞康生物技术有限公司提供，经杭州医学院王茵教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.的不定根。这些不定根以长白山区的野生人参为种源，诱导产生人参愈伤组织细胞，筛选培养后进一步形成人参不定根，实验取材部位为整个不定根的全部组织，其外表形态为不规则根丝状，整体呈黄色，外表形态符合人参不定根的形态要求。

1.3 药品与试剂

肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-6、IL-1β、IL-18 ELISA 试剂盒（批号分别为 EMC102a.96、EMC004.96、EMC001b.96、EMC011.96）购自上海欣博盛公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 E162-01）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；异丙肾上腺素（isoproterenol，ISO，批号 I5627）、二抗（羊抗鼠）Alexa Fluor 700（批号 A-21036）、二抗（羊抗兔）Alexa Fluor 800（批号 A32735）购自美国 Sigma 公司；TRIzol 试剂（批号 DP424）购自北京天根生物技术有限公司；反转录试剂盒（批号 K1691）购自美国赛默飞公司；SYBR Green Mix（批号 RR820A）购自日本 Takara 公司；B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（批号 3498）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 2772）、Caspase-3 抗体（批号 9665）、硫氧还蛋白互作蛋白（thioredoxin interacting protein，TXNIP）抗体（批号 14715）、Caspase-1 抗体（批号 24232）、IL-1β 抗体（批号 12242）、Caspase-1 cut 抗体（批号 89332）、IL-18 抗体（批号 57058）、NF-κB 抗体（批号 8242）、p-NF-κB 抗体（批号 3033）、核因子-κB 抑制因子（inhibitor of NF-κB，IκB）抗体（批号 9242）、

p-IκB 抗体（批号 9246）购自美国 CST 公司；NLRP3 抗体（批号 BA3677）购自武汉博士德生物工程有限公司；I 型胶原（collogen-I，Col-I）抗体（批号 14695-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；III 型胶原（collogen-III，Col-III）抗体（批号 ab184993）、TGF-β1 抗体（批号 ab215715）购自英国 Abcam 公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 BK7021）购自杭州宝科生物科技有限公司。

1.4 仪器

1260 型高效液相色谱分析仪（美国安捷伦科技公司）；iCAP-Q 系列电感耦合等离子体质谱仪、5119670DP 型多功能酶标仪、NanoDrop 2000 型超微量核酸蛋白测定仪、A37834 型 Mini Amp PCR 仪、QuantStudio3 型实时荧光定量 PCR 系统（美国赛默飞公司）；BX3 型显微镜（日本奥林巴斯公司）；ETH-256 型心电图仪（美国 iWorx 公司）；NU-C200R-E 型低温离心机（美国 NUAIRE 公司）；Licor Odyssey CLX-0657 型双色红外激光成像系统（美国 LI-COR 公司）；Power Pac TM HC 043BR71015 型蛋白电泳转印系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 人参不定根提取物的制备

将人参不定根进行粉碎，过 80 目筛，取人参不定根粉末 100 g，用 70%乙醇 2 L 回流提取 2 h，滤过，收集滤液。残渣加入 70%乙醇 2 L，回流提取 2 h。合并 2 次滤液，真空旋蒸后得到人参不定根提取物。

2.2 人参不定根中人参皂苷含量的测定[22]

采用 HPLC 检测人参不定根中的主要人参皂苷含量。Sepax Bio-C_{18} 色谱柱（300 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇（A）-超纯水（B），梯度洗脱：0～12 min，52% A；12～14 min，52%～57% A；14～17 min，57%～65% A；17～62 min，65% A；62～65 min，65%～100% A；65～83 min，100% A；83～85 min，100%～52% A。体积流量 0.5 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 5 μL。

2.3 iCAP-Q 系列电感耦合等离子体质谱仪测定人参不定根的元素含量[23]

人参不定根提取物经王水处理后，使用 iCAP-Q 系列电感耦合等离子体质谱仪检测人参不定根中的元素含量。

2.4 动物模型的制备、分组和给药

40 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和人参不定根低、高剂量（500、1 000 mg/kg）组。各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 双蒸水，1 次/d，连续 28 d。给药第 27、28 天，除对照组外，其余各组小鼠连续 2 d 每隔 24 h sc 1 次 ISO（100 mg/kg），以诱导心肌缺血；对照组小鼠 sc 生理盐水。小鼠在首次注射 ISO 48 h 后，麻醉进行后续实验。

2.5 心电图检测

首次注射 ISO 48 h 后，用 2%三溴乙醇麻醉小鼠。将心电图仪的针电极穿过小鼠皮肤插入导联 III 位置，使用心电图仪记录心电图。

2.6 心脏组织病理学变化观察

麻醉小鼠后，眼眶取血并分离血清，在冰上剖取小鼠心脏和肾脏，心脏组织、肾脏称定质量并记录，计算脏器指数。心脏组织在 4%多聚甲醛中固定 24 h，然后用石蜡包埋，切成 4 μm 的切片，分别进行 Masson 和苏木素-伊红（HE）染色，以观察心脏纤维化和心肌损伤。使用光学显微镜观察病理变化，使用 Image-Pro Plus 成像软件分析纤维化区域。

2.7 ELISA 测定血清中 IL-1β、IL-6、IL-18 和 TNF-α 水平

使用 ELISA 试剂盒测定各组小鼠血清中 IL-1β、IL-6、IL-18 和 TNF-α 水平。

2.8 Western blotting 测定心脏组织相关蛋白表达

用 PBS 溶液洗涤各组小鼠左心室，并在含 1% 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中进行裂解，4 ℃、13 500 r/min 离心 30 min，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对总蛋白进行定量。蛋白样品经 8%～15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，室温下用 5%牛血清白蛋白阻断非特异性结合 2 h 后，分别加入 Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Caspase-3 抗体、TXNIP 抗体、Caspase-1 抗体、IL-1β 抗体、Caspase-1 cut 抗体、IL-18 抗体、Col-III抗体、NF-κB 抗体、p-NF-κB 抗体、IκB 抗体、p-IκB 抗体、NLRP3 抗体、Col-I抗体、TGF-β1 抗体和 GAPDH 抗体，4 ℃孵育过夜；用相应的荧光二抗在膜上孵育 1 h，然后用 Odyssey 成像系统观察条带灰度值。

2.9 qRT-PCR 测定心脏组织相关基因表达

按照试剂盒说明书提取各组小鼠心脏组织中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。*Col-I*、*Col-III*、*TGF-β1*、基质金属蛋白酶 2（matrix metallopeptidase，*MMP2*）、*MMP9*、纤连蛋白（fibronectin，*Fn*）引物序列见表 1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因	引物序列（5'-3'）
Col-I	F: TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA
	R: GGGTCCCTCGACTCCTACAT
Col-III	F: CAATGGCACGGCTGTGTGCG
	R: CACTCGCCCTCCCGTCTTTGG
MMP2	F: AACGGTCGGGAATACAGCAG
	R: TGGTAAACAAGGCTTCATGGG
MMP9	F: TGGTAAACAAGGCTTCATGGG
	R: TGGTAAACAAGGCTTCATGGG
TGF-β1	F: CCACCTGCAAGACCATCGAC
	R: CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
Fn	F: ATGTGGACCCCTCCTGATAGT
	R: GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
GAPDH	F: AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC
	R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

2.10　统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间的分析采用单因素方差分析法。

3　结果

3.1　人参不定根中的人参皂苷含量

如表 2 所示，人参不定根中主要成分为人参皂苷 Rg_1、Rg_2、Re、Rb_1、Rc、Rb_2 和 Rd。人参不定根中 Rg_1、Re、Rb_1 和 Rb_2 的含量较高，其中 Rg_1＋Re 的质量分数大于 0.3%，Rb_1 的质量分数大于 0.2%。根据《中国药典》2020 年版的规定，人参中 Rg_1＋Re 的质量分数不低于 0.3%，Rb_1 的质量分数不低于 0.2%，表明人参不定根中人参皂苷含量符合《中国药典》2020 年版规定。

3.2　人参不定根中的主要元素含量

采用 iCAP-Q 系列电感耦合等离子体质谱仪测定人参不定根中 74 种元素的含量，表 3 列出了主要元素的含量，其中 Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Ni 和 Zn 的含量较高。As 和 Hg 的含量明显低于《中国药典》2020 年版的限定含量。

表 2　人参不定根中的人参皂苷含量

Table 2　Contents of ginsenoside in ginseng adventitious roots

人参皂苷	质量分数/(mg·g^{-1})
Rg_1	1.09
Rg_2	0.40
Re	3.30
Rb_1	4.72
Rc	0.86
Rb_2	10.69
Rd	0.96

表 3　人参不定根中的主要元素含量

Table 3　Contents of major elements in ginseng adventitious roots

元素	质量分数/(μg·g^{-1})
Na	121.358 7
Mg	37.993 9
P	32.325 4
K	2 558.894 8
Ca	24.231 2
Mn	2.562 7
Zn	5.958 8
As	0.029 1
Hg	未检出

3.3　人参不定根对心肌缺血小鼠心脏和肾脏指数的影响

如表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠心脏质量、肾脏质量、心脏指数和肾脏指数均显著升高（P＜0.01、0.001）；与模型组比较，人参不定根高剂量组小鼠心脏质量、心脏指数和肾脏指数均显著降低（P＜0.05、0.01）。各组小鼠体质量均无明显差异。

表 4　人参不定根对心肌缺血小鼠心脏和肾脏指数的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 10$）

Table 4　Effect of ginseng adventitious roots on cardiac and renal indexes in mice with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	体质量/g	心脏质量/g	心脏指数	肾脏质量/g	肾脏指数
对照	—	24.47±1.65	103.10±10.00	4.21±0.21	283.60±23.17	11.61±0.78
模型	—	22.84±1.76	116.10±7.91**	5.10±0.40***	333.20±30.69**	14.60±0.88***
人参不定根	500	22.84±1.44	113.50±5.38	4.99±0.39	317.50±20.01	13.95±1.20
	1 000	23.71±1.30	106.30±8.38$^{\#}$	4.49±0.32$^{\#\#}$	317.80±26.19	13.40±0.77$^{\#}$

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.

3.4　人参不定根对心肌缺血小鼠心电图的影响

如图 1 所示，对照组小鼠的心电图显示正常，模型组小鼠 ST 段明显增加，表明小鼠心肌缺血。与模型组比较，人参不定根高剂量组小鼠 ST 段显著下降。

3.5　人参不定根对心肌缺血小鼠心脏损伤的影响

如图 2-A 所示，HE 染色显示对照组小鼠的心脏结构正常，模型组小鼠则出现心肌纤维排列不规

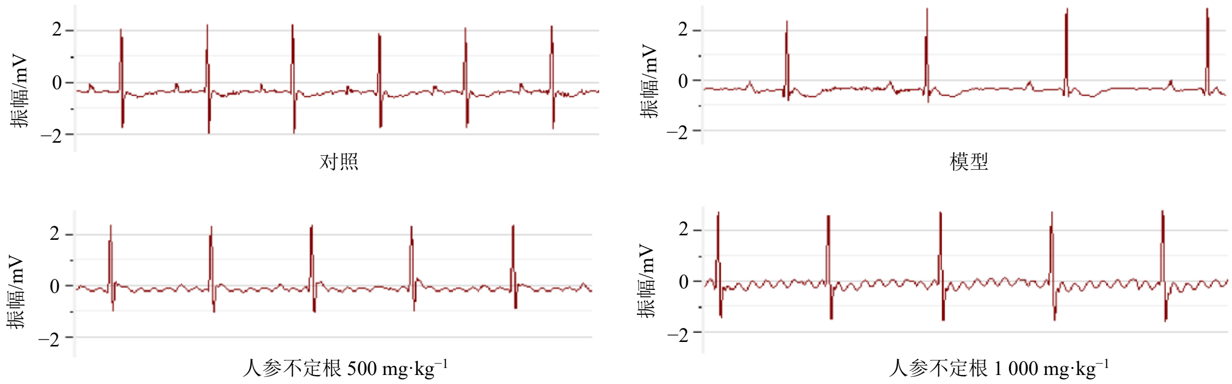
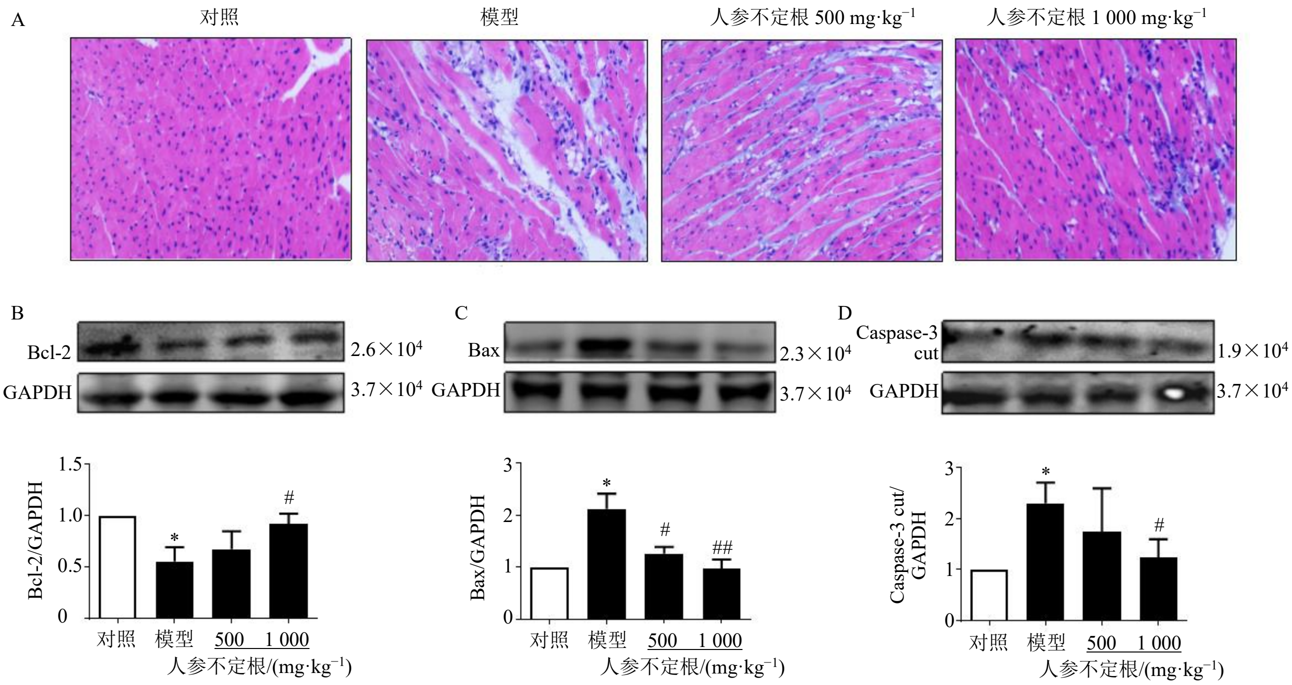


图 1 人参不定根对心肌缺血小鼠心电图的影响

Fig. 1 Effect of ginseng adventitious roots on electrocardiogram in mice with myocardial ischemia



A-各组心脏组织 HE 染色（×200）；B～D-各组心脏组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 cut 蛋白表达（n＝4）；与对照组比较：$^{*}P$＜0.05 $^{**}P$＜0.01 $^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01 $^{\#\#\#}P$＜0.001，下图同。

A-HE staining of cardiac tissue in each group (× 200); B—D-expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 cut proteins in cardiac tissues of each group (n = 4); $^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 $^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05 $^{\#\#}P$ < 0.01 $^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* model group, same as below figures.

图 2 人参不定根对心肌缺血小鼠心脏损伤的影响

Fig. 2 Effect of ginseng adventitious roots on cardiac injury in mice with myocardial ischemia

则、断裂和溶解以及炎性细胞浸润，人参不定根高剂量组心脏组织病理学变化显著改善。如图 2-B～D 所示，与对照组比较，模型组心脏组织抗凋亡信号蛋白 Bcl-2 的水平显著降低（P＜0.05），而促凋亡信号蛋白 Bax 和 Caspase-3 cut 水平显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，人参不定根高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05），Caspase-3 cut 蛋白表达水平显著降低（P＜0.05），人参不定根各剂量组 Bax 蛋白表达水平显著降低（P＜0.05、0.01）。

3.6 人参不定根对心肌缺血小鼠炎症反应的影响

心肌缺血引起的心肌损伤与血清和心肌中炎症因子水平的升高有关。如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 IL-1β、IL-6、IL-18 和 TNF-α 水平明显升高（P＜0.01）；与模型组比较，人参不定根各剂量组 IL-1β、IL-18 和 TNF-α 水平明显降低（P＜0.05、0.01），人参不定根高剂量组 IL-6 水平显著降低（P＜0.001）。表明人参不定根能明显减轻心肌缺血小鼠的炎症反应。

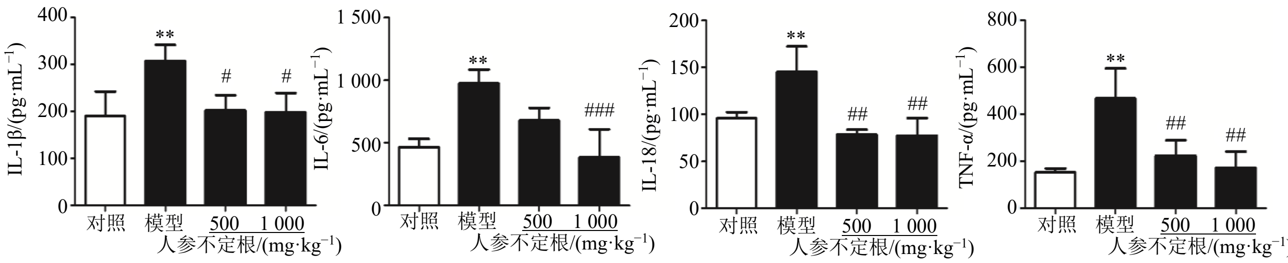
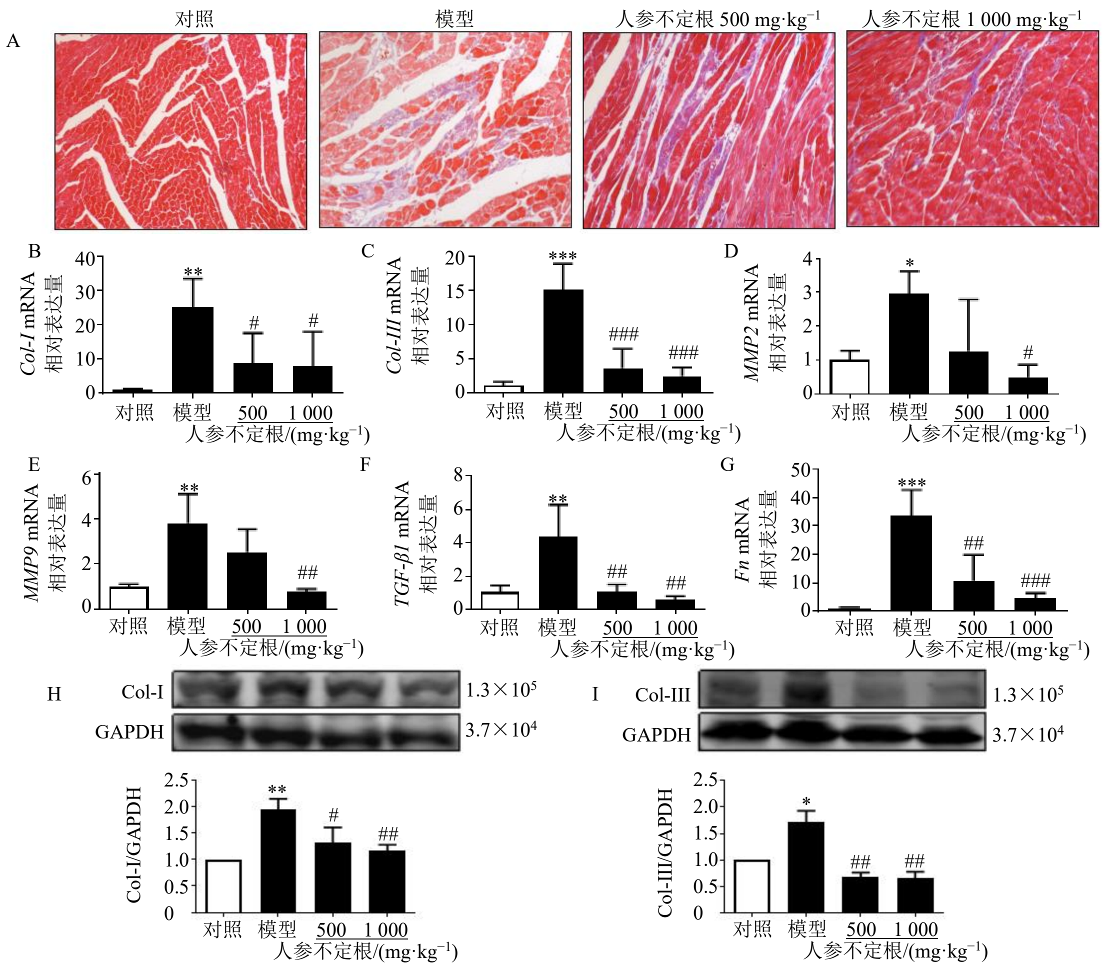


图 3　人参不定根对心肌缺血小鼠血清中炎症因子水平的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 4$）

Fig. 3　Effect of ginseng adventitious roots on levels of inflammatory factors in serum of mice with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

3.7　人参不定根对心肌缺血小鼠心脏纤维化的影响

如图 4-A 所示，Masson 染色结果表明，与对照组比较，模型组小鼠的心脏纤维化面积显著增加，而人参不定根可降低心肌缺血小鼠的心脏纤维化程度。如图 4-B～G 所示，各剂量的人参不定根显著降低心肌缺血小鼠心脏组织中促纤维化因子 *Col-I*、*Col-III*、*TGF-β1*、*Fn* 的 mRNA 表达水平（P＜0.05、0.01、0.001），高剂量的人参不定根显著降低心肌缺血小鼠心脏组织中 *MMP2*、*MMP9* 的 mRNA 表达水平（P＜0.05、0.01）。如图 4-H、I 所示，各剂量的人参不定根显著降低心肌缺血小鼠心脏组织中 Col-I、Col-III 蛋白表达水平（P＜0.05、0.01）。



A-各组心脏组织 Masson 染色（×200）；B～G-各组心脏组织 *Col-I*、*Col-III*、*MMP2*、*MMP9*、*TGF-β1* 和 *Fn* 的 mRNA 表达（n=4）；H、I-各组心脏组织 Col-I 和 Col-III 蛋白表达（n=3～4）。

A-Masson staining of cardiac tissue in each group (× 200); B—G-expressions of *Col-I*, *Col-III*, *MMP2*, *MMP9*, *TGF-β1* and *Fn* mRNA in cardiac tissues of each group (n = 4); H, I-expressions of Col-I and Col-III proteins in cardiac tissues of each group (n = 3—4).

图 4　人参不定根对心肌缺血小鼠心脏纤维化的影响

Fig. 4　Effect of ginseng adventitious roots on cardiac fibrosis of mice with myocardial ischemia

3.8 人参不定根对心肌缺血小鼠心脏组织 TGF-β1 和 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

TGF-β1 和 NF-κB 通路在心肌缺血诱发的心脏纤维化中发挥着重要作用。为了确定人参不定根是否通过下调 TGF-β1 和 NF-κB 通路来减轻心肌缺血诱导的损伤，采用 Western blotting 测定了心脏组织中 TGF-β1、p-NF-κB 和 p-IκB 的蛋白水平。如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠心脏组织 TGF-β1、p-NF-κB 和 p-IκB 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，人参不定根各剂量组 p-NF-κB 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），人参不定根高剂量组 TGF-β1、p-IκB 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。表明人参不定根通过下调 TGF-β1 和 NF-κB 通路来减轻心肌缺血小鼠的心脏纤维化。

3.9 人参不定根对心肌缺血小鼠心脏组织 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠心脏组织 NLRP3、TXNIP、Caspase-1、Caspase-1 cut、

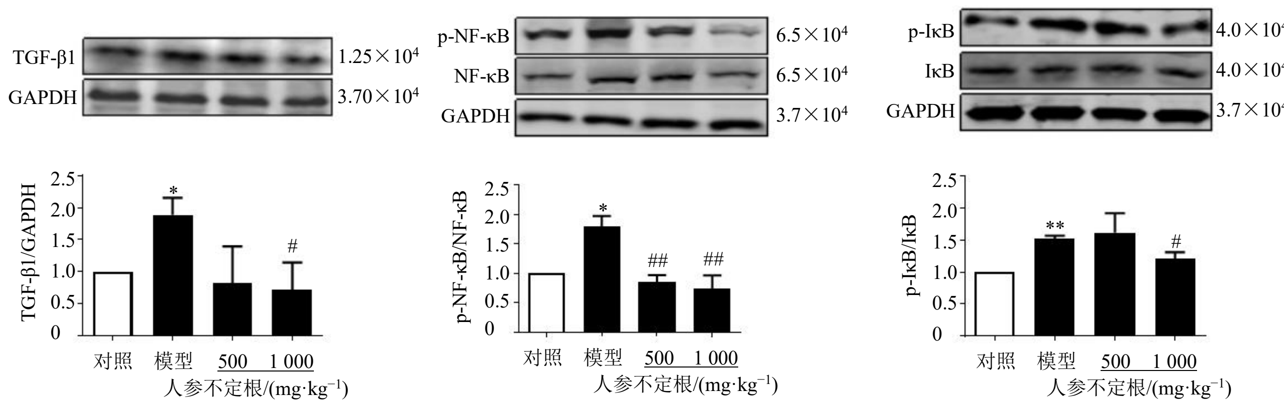


图 5 人参不定根对心肌缺血小鼠心脏组织 TGF-β1 和 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=4$）

Fig. 5 Effect of ginseng adventitious roots on expressions of TGF-β1 and NF-κB pathway related proteins in cardiac tissue of mice with myocardial ischemia ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

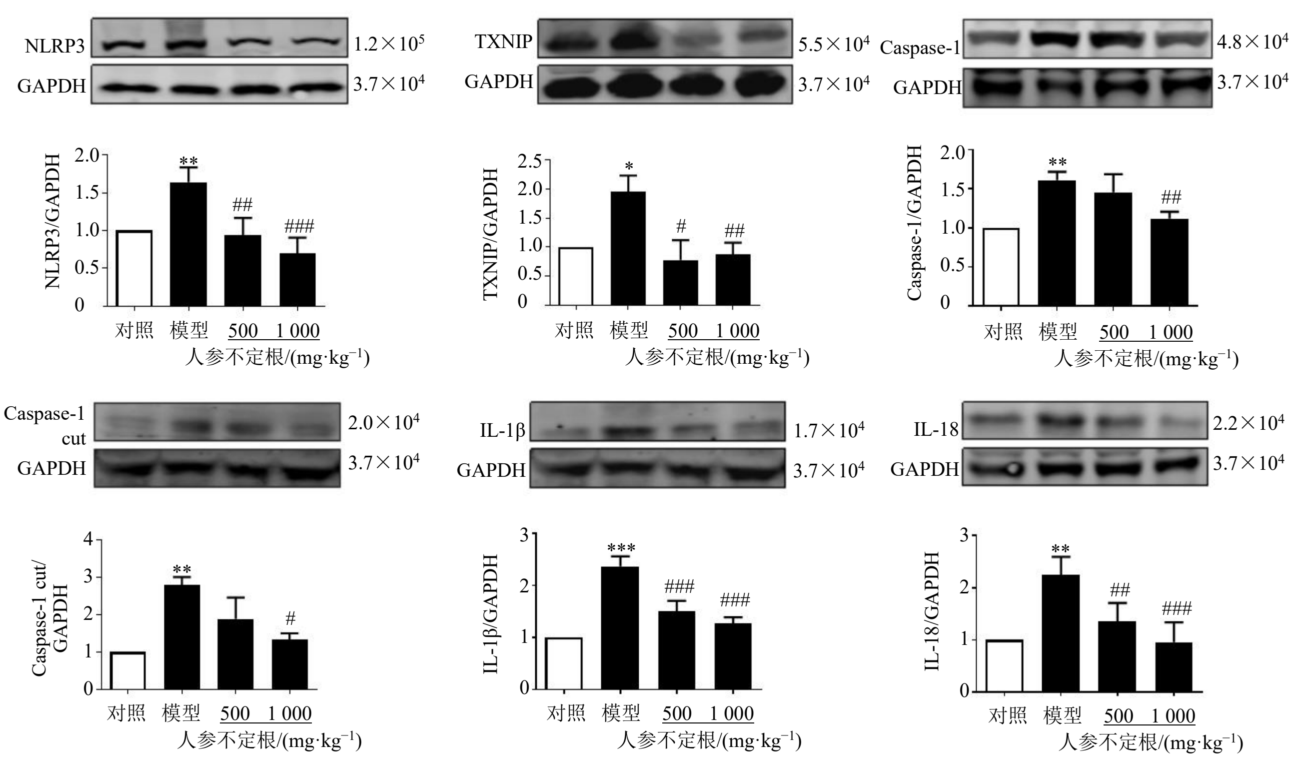


图 6 人参不定根对心肌缺血小鼠心脏组织 NLRP3 炎性小体通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=3$～4）

Fig. 6 Effect of ginseng adventitious roots on expressions of NLRP3 inflammasome pathway related proteins in cardiac tissue of mice with myocardial ischemia ($\bar{x}\pm s$, $n=3$—4)

IL-1β 和 IL-18 的蛋白表达水平显著升高（P＜0.05、0.01、0.001）；与模型组比较，人参不定根各剂量组 NLRP3、TXNIP、IL-1β 和 IL-18 的蛋白表达水平显著降低（P＜0.05、0.01、0.001），人参不定根高剂量组 Caspase-1、Caspase-1 cut 的蛋白表达水平显著降低（P＜0.05、0.01）。表明人参不定根可通过降低 NLRP3 炎性小体的活性，从而保护心肌缺血诱导的损伤。

4 讨论

人参不定根是利用生物反应器技术精心培育的组织培养物。目前，研究已经证实，与天然人参相比，人参不定根具有同等的安全性[24]，并且含有相似的皂苷成分[25]，如人参皂苷 Rg_1、Rg_2、Re、Rb_1、Rc、Rb_2。值得注意的是，在检测中发现，人参不定根中的 Rb_1、Rb_2、Rd、Rg_1＋Re 含量均超过了正常人参，这充分表明人参不定根在质量与品质上相较于普通人参具有更显著的优势。这一发现为人参不定根的进一步应用与开发提供了有力支持。

人参作为一种传统的名贵药材，现代医学已经证实其具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和抗衰老等多种功能[26-28]。目前不同的研究团队也对人参不定根的药理作用进行了研究，许多结果显示人参不定根具有与正常人参相似的化学成分和药用价值，人参不定根同样能够发挥降血糖[29]、抗纤维化活性[30]、抗氧化活性和抗疲劳[31]等多种作用。与人参相似，有研究表明人参不定根能明显增加迟发性过敏反应的发生率，并能轻微增加脾淋巴细胞的增殖[32]。An 等[33]发现野山参的不定根能显著缩短小鼠逃离平台的潜伏期，减少小鼠游向平台的距离，并改善记忆力。Murthy 等[25]发现，人参不定根提取物能显著降低糖尿病大鼠的血糖浓度。然而，人参不定根对心肌缺血所致损伤的影响及其内在机制尚未见报道。

本研究发现人参不定根能有效抑制 ISO 处理小鼠的心肌凋亡、心脏纤维化和炎症细胞因子水平。人参不定根可通过减少 TGF-β1、NF-κB 和 NLRP3 炎症小体通路的活化来提供心肌保护。这些结果表明，对于心肌缺血引起的损伤患者来说，人参不定根是一种很有前景的人参替代品。

在心肌缺血的发病过程中，炎症因子在心肌细胞凋亡和坏死中起着至关重要的作用。心肌缺血会导致线粒体功能障碍，并伴随着活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平的显著增加[34]。过量产生的 ROS 会导致炎症细胞因子释放和炎症细胞浸润，促进心肌凋亡和细胞外基质沉积[35]。在本研究中，人参不定根能明显抑制炎症反应，降低 IL-1β、IL-6、IL-18 和 TNF-α 水平；人参不定根还具有抗凋亡作用，可降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白水平。此外，使用人参不定根治疗的心肌缺血小鼠的细胞外基质成分如 *Col-I*、*Col-III*、*MMP2*、*MMP9*、*TGF-β1* 和 *Fn* 的表达明显下降。

人参皂苷是人参的主要功能成分，多项研究表明人参皂苷具有保护心脏的作用。研究结果表明，人参不定根中的人参皂苷主要有人参皂苷 Rg_1、Rg_2、Re、Rb_1、Rc、Rb_2 和 Rd。人参皂苷 Rb_2 在人参不定根中的含量相对较高。Xue 等[36]发现人参皂苷 Rb_2 通过上调 Sirtuin 1 的表达、抑制炎症反应和减轻氧化应激减轻心肌梗死/再灌注损伤。人参皂苷 Rg_2 可下调心肌缺血小鼠心肌纤维化相关基因的表达水平，并改善其心脏功能[37]。研究表明，人参不定根能减轻 ISO 诱导的心肌缺血损伤，而人参不定根中的人参皂苷可能在这些保护作用中发挥了重要作用。

人参不定根含有丰富的元素，包括 K、Mg、P、Ca、Zn 和 Mn。许多研究表明，这些元素对心脏病有益。对心肌梗塞患者补充 K 可预防或改善心肌梗塞引起的损伤[38]。Zn 和 Mn 是超氧化物歧化酶的核心成分[39]，超氧化物歧化酶是一种重要的抗氧化酶，可降低心肌缺血损伤诱导的 ROS 水平[40]。低镁患者补充镁有利于减轻糖尿病心肌病损伤[41]。

越来越多的证据表明，TGF-β1 信号通路的异常激活是心脏纤维化的主要原因[42]。在心肌缺血的小鼠中，TGF-β1 可使 TGF-β II 型受体（TGF-β type II receptor，TβRII）和 I 型受体（TGF-β type I receptor，TβRI）磷酸化。TβRI 和 TβRII 的异四聚体复合物可促进 Smad2/3 磷酸化，从而可能导致纤维化相关基因的转录[43]。本研究结果表明，人参不定根干预的心肌缺血小鼠 TGF-β1 蛋白水平明显下降，表明人参不定根能够抑制 TGF-β1 信号通路。NF-κB 信号通路对炎症反应有重要影响[44]。本研究结果显示，人参不定根能显著降低缺血心脏中 IκB 和 NF-κB 的磷酸化。

心肌缺血的早期阶段会引发由损伤相关分子模式（damage-associated molecular patterns，DAMPs）介导的急性炎症反应[45]。DAMPs 可提高促炎趋化因子和细胞因子的水平，导致炎症细胞聚集和一系列炎症反应。DAMPs 还可能触发 NLRP3 炎性体的

激活。NLRP3 炎性小体是一个多蛋白复合物，包括 NLRP3、TXNIP、ASC 和 Caspase-1，能够触发活性 IL-1β 和 IL-18 的产生[46]。此外，活化的 IL-1β 和 IL-18 会导致心肌炎症，从而促进心肌凋亡和心脏纤维化[47]。因此，抑制心肌缺血后的心肌炎症对于缓解心肌凋亡和心脏纤维化至关重要。本研究结果表明，人参不定根能有效降低心肌缺血小鼠血清中的炎症因子水平。蛋白免疫印迹分析表明，人参不定根抑制了 NLRP3、TXNIP、Caspase-1、Caspase-1 cut、IL-1β 和 IL-18 的上调。这些发现表明，人参不定根通过抑制 NLRP3 炎性体诱导的炎症反应，对心肌缺血诱导的损伤具有保护作用。

综上，本研究发现人参不定根可通过抑制 TGF-β1、NF-κB 信号通路和 NLRP3 炎性小体的活性来减轻心肌缺血引起的损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ratan Z A, Haidere M F, Hong Y H, *et al*. Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(2): 199-210.

[2] Yang L, Hou A J, Zhang J X, *et al*. *Panacis Quinquefolii Radix*: A review of the botany, phytochemistry, quality control, pharmacology, toxicology and industrial applications research progress [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 602092.

[3] Le K C, Im W T, Paek K Y, *et al*. Biotic elicitation of ginsenoside metabolism of mutant adventitious root culture in *Panax ginseng* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(4): 1687-1697.

[4] Ahmed S, Shohael A M, Paek K Y. Evaluation of growth and some unexplored bioactivities of bioreactor grown adventitious root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(5): 2046-2060.

[5] Murthy H N, Dandin V S, Park S Y, *et al*. Quality, safety and efficacy profiling of ginseng adventitious roots produced *in vitro* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(17): 7309-7317.

[6] Murthy H N, Georgiev M I, Kim Y S, *et al*. Ginsenosides: Prospective for sustainable biotechnological production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(14): 6243-6254.

[7] Lim K H, Ko D, Kim J H. Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(3): 273-282.

[8] Lin Z, Xie R F, Zhong C H, *et al*. Recent progress (2015—2020) in the investigation of the pharmacological effects and mechanisms of ginsenoside Rb_1, a main active ingredient in *Panax ginseng* Meyer [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(1): 39-53.

[9] Liang H H, Su X M, Wu Q X, *et al*. LncRNA *2810403D21Rik*/*Mirf* promotes ischemic myocardial injury by regulating autophagy through targeting *Mir26a* [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1077-1091.

[10] Bai Y, Wu J J, Yang Z Y, *et al*. Mitochondrial quality control in cardiac ischemia/reperfusion injury: New insights into mechanisms and implications [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(1): 33-51.

[11] Orogo A M, Gustafsson Å B. Cell death in the myocardium: My heart won't go on [J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(8): 651-656.

[12] Henein M Y, Vancheri S, Longo G, *et al*. The role of inflammation in cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12906.

[13] Yang Y N, Han J P, Lilly R G, *et al*. Bergapten mediated inflammatory and apoptosis through AMPK/eNOS/AKT signaling pathway of isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(9): e23143.

[14] Zhang X Q, Qu H Y, Yang T, *et al*. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-2322.

[15] Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(2): 37-41.

[16] Wei Z X, Fei Y D, Wang Q, *et al*. Loss of Camk2n1 aggravates cardiac remodeling and malignant ventricular arrhythmia after myocardial infarction in mice via NLRP3 inflammasome activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 167: 243-257.

[17] Elliott E I, Sutterwala F S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 35-52.

[18] Bauernfeind F G, Horvath G, Stutz A, *et al*. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 787-791.

[19] Yang F, Qin Y, Lv J, *et al*. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1000.

[20] Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 138-153.

[21] Abbate A, Toldo S, Marchetti C, *et al*. Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular

disease [J]. *Circ Res*, 2020, 126(9): 1260-1280.

[22] Liang W, Wang S, Yao L, *et al*. Quality evaluation of *Panax ginseng* adventitious roots based on ginsenoside constituents, functional genes, and ferric-reducing antioxidant power [J] *Food Biochem*, 2019, 43(8): e12901.

[23] 汪浩, 金丽. 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定人参中砷、铅、镉、汞、铜、铬、铝残留量 [J]. 湖南有色金属, 2018, 34(3): 74-77.

[24] 黄宗锈, 黄佳宁, 钟礼云, 等. 人参组培不定根遗传毒性及亚慢性毒性研究 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5): 389-394.

[25] Murthy H N, Dandin V S, Lee E J, *et al*. Efficacy of ginseng adventitious root extract on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 917-921.

[26] 李媛, 高睿, 单颖, 李蜀欣, 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.

[27] Su J Q, Su Q F, Hu S, *et al*. Research progress on the anti-aging potential of the active components of ginseng [J]. *Nutrients*, 2023, 15(15): 3286.

[28] Wang Y F, Chen Y L, Peng M Y, *et al*. Identification of microRNA and analysis of target genes in *Panax ginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(1): 69-75.

[29] Zhang L, Qi X, Lu X T, *et al*. Study on hypoglycemic effects of irradiated ginseng adventitious roots [J]. *Food Chem X*, 2022, 13: 100234.

[30] Hou Y L, Tsai Y H, Lin Y H, *et al*. Ginseng extract and ginsenoside Rb_1 attenuate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 415.

[31] 邢艺缤, 王馨悦, 王慕尧, 等. 人参不定根总皂苷的提取工艺优化及其抗氧化与抗疲劳作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 193-201.

[32] Wang J, Man S L, Gao W Y, *et al*. Cluster analysis of ginseng tissue cultures, dynamic change of growth, total saponins, specific oxygen uptake rate in bioreactor and immuno-regulative effect of ginseng adventitious root [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, 41: 57-63.

[33] An K S, Choi Y O, Lee S M, *et al*. Ginsenosides Rg_5 and Rk_1 enriched cultured wild ginseng root extract bioconversion of *Pediococcus pentosaceus* HLJG0702: Effect on scopolamine-induced memory dysfunction in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(5): 1120.

[34] Fioranelli M, Bottaccioli A G, Bottaccioli F, *et al*. Stress and inflammation in coronary artery disease: A review psychoneuroendocrineimmunology-based [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2031.

[35] Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, *et al*. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 251-255.

[36] Xue Y, Fu W W, Liu Y Z, *et al*. Ginsenoside Rb_2 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through SIRT1 activation [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(11): 4039-4049.

[37] Li X H, Xiang N, Wang Z R. Ginsenoside Rg_2 attenuates myocardial fibrosis and improves cardiac function after myocardial infarction via AKT signaling pathway [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(11): 2199-2206.

[38] Green D M, Ropper A H, Kronmal R A, *et al*. Serum potassium level and dietary potassium intake as risk factors for stroke [J]. *Neurology*, 2002, 59(3): 314-320.

[39] Tomat A L, de los Ángeles Costa M, Arranz C T. Zinc restriction during different periods of life: Influence in renal and cardiovascular diseases [J]. *Nutrition*, 2011, 27(4): 392-398.

[40] Huang X L, Hou R R, Pan W, *et al*. A functional polysaccharide from *Eriobotrya japonica* relieves myocardial ischemia injury via anti-oxidative and anti-inflammatory effects [J]. *Food Funct*, 2022, 13(1): 113-120.

[41] Whang R, Sims G. Magnesium and potassium supplementation in the prevention of diabetic vascular disease [J]. *Med Hypotheses*, 2000, 55(3): 263-265.

[42] Chen X Y, Zhang F Y, Hu G Y, *et al*. LRRC8A critically regulates myofibroblast phenotypes and fibrotic remodeling following myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2022, 12(13): 5824-5835.

[43] Zhang Q, Wang L, Wang S Q, *et al*. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 78.

[44] Bartekova M, Radosinska J, Jelemensky M, *et al*. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease [J]. *Heart Fail Rev*, 2018, 23(5): 733-758.

[45] Ong S B, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan G E, *et al*. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.

[46] Schaefer L. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(51): 35237-35245.

[47] Toldo S, Mezzaroma E, O'Brien L, *et al*. Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(7): H1025-H1031.

[责任编辑　李亚楠]