

原人参二醇、人参皂苷 CK 和原人参三醇对阿霉素诱导足细胞损伤的保护作用

王梦影¹, 宋泽宇¹, 甘海林¹, 郑美华¹, 刘 倩¹,
潘志城¹, 刘 珂^{1,2}, 范华英¹

(1. 烟台大学药学院, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学), 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 山东 烟台 264005; 2. 山东铂源生物医药有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探讨原人参二醇(PPD)、人参皂苷 CK 和原人参三醇(PPT)对肾病综合征(NS)中足细胞损伤的保护作用, 本研究采用阿霉素(ADR)诱导足细胞损伤。通过 CCK8 及细胞划痕、Transwell 实验分析, 结果表明三种人参皂苷可以改善 ADR 损伤后足细胞的增殖活力并抑制其迁移能力。Western blot 及细胞免疫荧光实验结果表明 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 均可以通过降低 Desmin、NF- κ B P65、p-NF- κ B P65、p-I κ B α 及升高 I κ B α 的表达水平缓解足细胞损伤, 并且可以促进 GR 的表达及其核转位, 其中 PPD 的作用效果较好。计算机分子对接结果显示 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 与 GR 均具有一定的结合活性, 但 PPD 与 GR 的结合活性最优。因此, PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 均可以在一定程度上改善 ADR 诱导的足细胞损伤, 其中 PPD 在保护足细胞损伤方面具有一定的优势。

关键词: 人参皂苷; 肾病综合征; 足细胞损伤; 糖皮质激素受体

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A

肾病综合征(Nephrotic Syndrome, NS)是一组临床表现为蛋白尿、水肿、高脂血症和低白蛋白血症的症候群^[1], 主要是由于肾小球基底膜受损而导致尿蛋白大量丢失的一类慢性肾病。目前临床上治疗 NS 的首选药物是糖皮质激素类药物(Glucocorticoids, GCs)^[2], 如地塞米松(Dexamethasone, DEX)等。GCs 主要通过结合并激活糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)而发挥作用^[3]。长期服用 GCs 会导致严重的不良反应, 如脂质代谢异常、糖尿病肾病、骨质疏松等^[2], 严重影响了患者的健康。因此, 急需开发新的治疗药物及方法。

足细胞是一种位于肾小球基底膜外层的终末期分化肾上皮细胞, 在维持肾小球滤过屏障完整性和肾小球正常滤过功能方面发挥重要作用^[4]。足细

胞的再生能力非常有限并对于细胞压力较为敏感, 极易受到损伤。足细胞损伤后其迁移能力异常增加, 会从肾小球基底膜脱落, 导致肾小球滤过屏障受损^[5], 产生蛋白尿。研究发现, 通过免疫抑制而发挥药理活性的药物如 GCs, 可以直接作用于足细胞发挥作用^[6]。因此, 缓解足细胞损伤、维持足细胞结构的完整性等保护足细胞的方法对治疗 NS 等慢性肾病至关重要。

人参是传统中药之一, 具有抗炎、抗肿瘤、调节人体免疫力等药理活性^[7]。人参提取物在治疗慢性肾病上具有独特的优势^[8-9], 其中人参皂苷是主要活性成分。根据苷元的骨架不同, 人参皂苷主要分为原人参二醇(Protopanaxadiol, PPD)型和原人参三醇(Protopanaxatriol, PPT)型^[10]。在人体肠道菌群

的作用下,二醇型人参皂苷主要被代谢为 PPD 和人参皂苷 CK,三醇型人参皂苷主要被代谢为 PPT^[11]。研究报道,PPD 和 PPT 与 GR 具有一定的结合活性并可以促进 GR 的核转位^[12]。另外,PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 可以通过抑制核因子 κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) 的活性,从而发挥抗炎的作用^[13-15]。目前研究结果证实 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 与足细胞损伤密切相关^[16]。因此,本文主要通过体外建立阿霉素 (Adriamycin, ADR) 诱导的足细胞损伤模型^[17],研究 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 三种人参皂苷对足细胞损伤的保护作用,并初步探究其作用机制可能与影响 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 通路相关蛋白的表达水平及 GR 的核转位有关。

1 实验部分

1.1 细胞株

人肾足细胞购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司 (HTX2426),所有细胞在 33 ℃ 下经 $\text{IFN-}\gamma$ 诱导增殖后在补充有 10% 胎牛血清 (Invitrogen, 美国) 和 1% 青链霉素混合液 (100 ×) (北京索莱宝科技有限公司, 中国北京) 的 McCoy's 5A 培养基 (HyClone, 美国) 中,在 37 ℃ 5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2 主要实验仪器与设备

CCL-170B-8 二氧化碳培养箱 (ESCO, 新加坡), ACB-4A1 垂直流超净工作台 (ESCO, 新加坡), Powerpac Basic 型电泳仪 (Bio-Rad, 美国), ImageQuant LAS4000 型超灵敏化学发光成像分析仪 (GE Healthcare, 美国), ST16 型离心机 (Thermo Fisher, 美国), CKX41 生物显微镜 (OLYMPUS, 日本), IX73 生物显微镜 (OLYMPUS, 日本), SpectraMax M3 型酶标仪 (Molecular Devices, 美国)。

1.3 药品与试剂

PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 均由山东铂源生物医药有限公司 (中国山东) 提供; DEX 购自北京索莱宝科技有限公司 (中国北京); 针对 GR、Histone H3 的抗体购自 Abcam (英国剑桥), $\text{NF-}\kappa\text{B}$ P65、磷酸化的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ P65 (p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ P65)、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 、磷酸化的 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)、Desmin、GAPDH 的抗体购自 Santa Cruz Biotechnology Inc. (美国达拉斯), CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司 (中国上海), ECL 蛋白印迹检测试剂盒购自诺伦生物医药技术有限公司 (中国上海), 核蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司 (中国北京)。

1.4 实验方法

1.4.1 MTT 法检测 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足

细胞活力的影响 将足细胞接种在 96 孔板中,每孔大约 6×10^3 个细胞。加入不同剂量 (5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 的 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 进行干预,每组设置 5 个复孔。24 h 后,加入 20 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL) 继续孵育 4 h。吸出上清液,加入 150 μL 的 DMSO 后检测各组细胞 570 nm 处的吸光度,结果表示为与空白对照组吸光度的比值。

1.4.2 MTT 法检测足细胞损伤后的活力 将足细胞接种在 96 孔板中,每孔大约 6×10^3 个细胞。按照空白对照组 (空白对照)、模型组 (ADR)、DEX 组、20 $\mu\text{mol/L}$ PPD 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 CK 组和 20 $\mu\text{mol/L}$ PPT 组的实验分组给药进行预保护。每组设置 5 个复孔。除空白对照组加入空白培养液外,其余各组加入终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ADR 刺激,并放入培养箱中继续培养 24 h。后续加入 MTT 溶液、检测及结果表示同“1.4.1”。

1.4.3 CCK-8 法检测足细胞损伤后的活力 将足细胞接种在 96 孔板中,每孔大约 6×10^3 个细胞。分组与加药同“1.4.2”。后续吸出上清液,每孔加入 100 μL 的培养液和 10 μL 的 CCK-8 试剂,2 h 后检测各组细胞 450 nm 处的吸光度,结果表示同“1.4.1”。

1.4.4 细胞划痕法检测足细胞的迁移水平 在 6 孔板背面水平划出 6 条平行的直线 (每孔均匀地穿过两条直线),将足细胞接种在 6 孔板中,每孔大约 3×10^5 个细胞。除空白对照组外,其余各组加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ADR 刺激,放入细胞培养箱中继续培养。24 h 后在孔中均匀地划出与背面直线垂直的两条直线,用 PBS 清洗后于显微镜下拍照,此时划痕面积记录为 W_0 。按照“1.4.2”的实验分组给药,24 h 后再次于显微镜下拍照,此时划痕面积记录为 W_1 。细胞迁移水平 = [细胞处理组 ($W_0 - W_1$) / W_0] / [空白对照组 ($W_0 - W_1$) / W_0]。

1.4.5 Transwell 法检测足细胞的迁移水平 取出 12 孔板中的 Transwell 小室,下层小室中加入含 15% 胎牛血清的培养基作为趋化因子,将足细胞以每孔大约 1×10^5 个细胞接种于 Transwell 上层小室中,分组与加药同“1.4.2”。Transwell 膜以 4% 的多聚甲醛固定 30 min,用 0.1% 的结晶紫染液染色。用棉签拭去上层小室内 Transwell 膜表面的细胞,将膜取出并用中性树胶封闭于玻片中。于显微镜下观察穿过 Transwell 膜的细胞并拍照,随机选取 5 个视野计数,并使用 Image J 软件统计穿膜细胞数。

1.4.6 Western blot 法检测 Desmin、GR 及 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路相关蛋白的表达水平 将足细胞接种于 6

孔板,每孔大约 3×10^5 个细胞,分组与加药同 1.4.2。弃去培养液,用预冷的 PBS 冲洗细胞 3 遍。再将 PMSF 及磷酸酶抑制剂加入到 RIPA 裂解液中(1:2:100),取适量混合液加入到细胞上,4 ℃裂解 0.5 h 后取上清液,并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量,用 SDS-PAGE 上样缓冲液(5 ×)煮沸 5 min。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白并转移到 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 4 h 后分别与 Desmin、GR、NF- κ B P65、p-NF- κ B P65、I κ B α 、p-I κ B α 和 GAPDH 抗体(稀释比例:1:1000)4 ℃孵育过夜,然后与相应的二抗室温孵育 1.5 h。最后,使用 ECL 蛋白印迹检测试剂盒检测蛋白条带,并使用 Image J 软件对蛋白进行半定量分析。

1.4.7 免疫荧光法检测足细胞中 GR 的核转位情况 将足细胞接种于 12 孔板,每孔大约 1×10^5 个细胞,分组与加药同“1.4.2”。用 4% 的多聚甲醛固定细胞 15 min 后,用 PBS 清洗 3 遍后,Triton-X100 透化 10 min,继续用 PBS 清洗 3 遍。每孔依次加入 5% BSA 封闭液于培养箱中孵育 1.5 h。之后吸出孔内封闭液,加入用封闭液稀释的 GR 抗体(1:50)于 4 ℃孵育过夜。隔天室温静置 15 min 后,用 PBS 清洗 3 遍,再加入封闭液稀释(1:500)的荧光二抗,避光孵育 2 h。加入 DAPI 进行细胞核染色 30 min。用 PBS 清洗 3 遍后再分别加入 100 μ L 的 PBS 及一滴抗荧光猝灭剂,用倒置荧光显微镜在同一位置拍照成像,将同一位置的荧光图片进行 Merge 处理,并使用 Image J 软件进行荧光强度定量。

1.4.8 Western blot 法检测足细胞细胞核内 GR 的表达水平 将足细胞接种于 6 孔板,每孔大约 3×10^5 个细胞,分组与加药同“1.4.2”。使用核蛋白提取试剂盒分别提取各组足细胞的浆蛋白和核蛋白,并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒分别对胞浆和核蛋白进行定量。用 SDS-PAGE 上样缓冲液(5 ×)煮沸 5 min。用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白并转移到 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 4 h 后分别与 GR、Histone H3(核蛋白)和 GAPDH(浆蛋白)抗体(稀释比例:1:1000)4 ℃孵育过夜,后续孵育二抗和蛋白条带检测同“1.4.6”。

1.4.9 计算机分子对接法评价 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 与 GR 蛋白晶体结构的结合活性 采用计算机分子对接软件 SYBYL-X2.0 中的 Surflex-Dock 功能模块完成分子对接研究。在 Chemdraw 20.0 中绘制待对接化合物 DEX、PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 的平面结构。在 SYBYL-X2.0 中创建数据库,将这些化合物导入后进行能量最小化处理,使每个化合物

有最稳定的构象,最后加入到创建的数据库中。根据分子模拟对接的结果,比较 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 与 GR 的结合活性。本研究的靶点 GR 从 RSCB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中获取(PDB ID:4UDC)。蛋白晶体前处理及结合口袋的定义:提取原配体分子,删除水分子及其非相关的蛋白质构象,补充非完整的氨基酸残基,为蛋白加氢,以原配体分子位置为中心,选择半径 0.5 nm 范围内为活性口袋,其他参数为默认值。按默认参数进行分子对接后,分别得到每个化合物与各靶点蛋白的对接得分 Toal-Score 值,用 Toal-Score 值表示配体与受体的结合活性^[18],并使用 Pymol 2.3 软件绘制 DEX、PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 与 GR 分子对接的作用示意图。

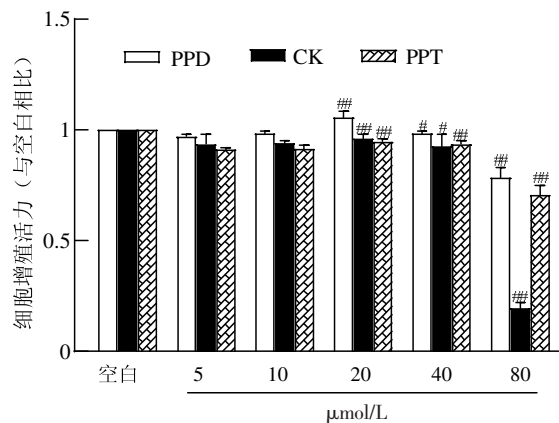
1.5 统计学方法

每次实验均平行重复 3 次,实验数据均通过 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0.2 分析绘图,并表示为平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)。首先检验了数据方差的同质性。在方差齐的情况下,采用单因素方差分析和最小显著性差异(LSD)检验方法进行统计分析。在方差不齐的情况下,采用 Kruskal-Wallis 进行非参数检验,在检验有统计学意义的情况下,进一步使用 Mann-Whitney U 检验方法进行统计分析。所有统计结果都依照 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对人肾足细胞活力的影响

如图 1 所示,与空白组比,在 20 μ mol/L 剂量时,各人参皂苷给药组足细胞的活力最佳($P < 0.01$),40 μ mol/L 时各人参皂苷给药组足细胞的活



$\bar{x} \pm s, n = 3$ 。与空白组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足细胞活力的影响
Fig. 1 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on the podocytes viability

力有所减弱,在 80 $\mu\text{mol/L}$ 时人参皂苷 CK 对足细胞的活力产生明显的抑制作用。

2.2 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对 ADR 损伤的足细胞活力的改善作用

MTT 和 CCK-8 实验结果如图 2 所示,与空白组比,模型组足细胞的活力明显下降($P < 0.01$),模型组相比,DEX 组足细胞的活力显著升高($P < 0.01$),三种人参皂苷给药组足细胞的活力也明显升高($P < 0.05$)。

2.3 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足细胞迁移水平的影响

细胞划痕和 Transwell 实验结果如图 3 所示,与空白相比,模型组足细胞的迁移水平异常升高($P < 0.01$);与模型组相比,DEX 组足细胞的迁移水平显著受到抑制($P < 0.01$),三种人参皂苷组足细胞的迁移水平也受到抑制($P < 0.05$),其中人参皂苷 PPD 作用效果略优。

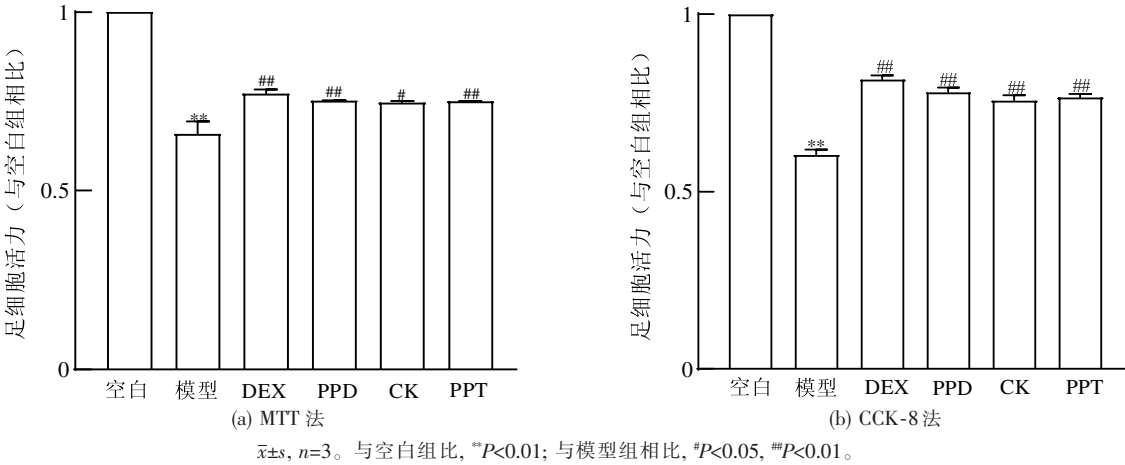


图 2 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对 ADR 损伤的足细胞活力的影响

Fig. 2 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on ADR-injured podocytes viability

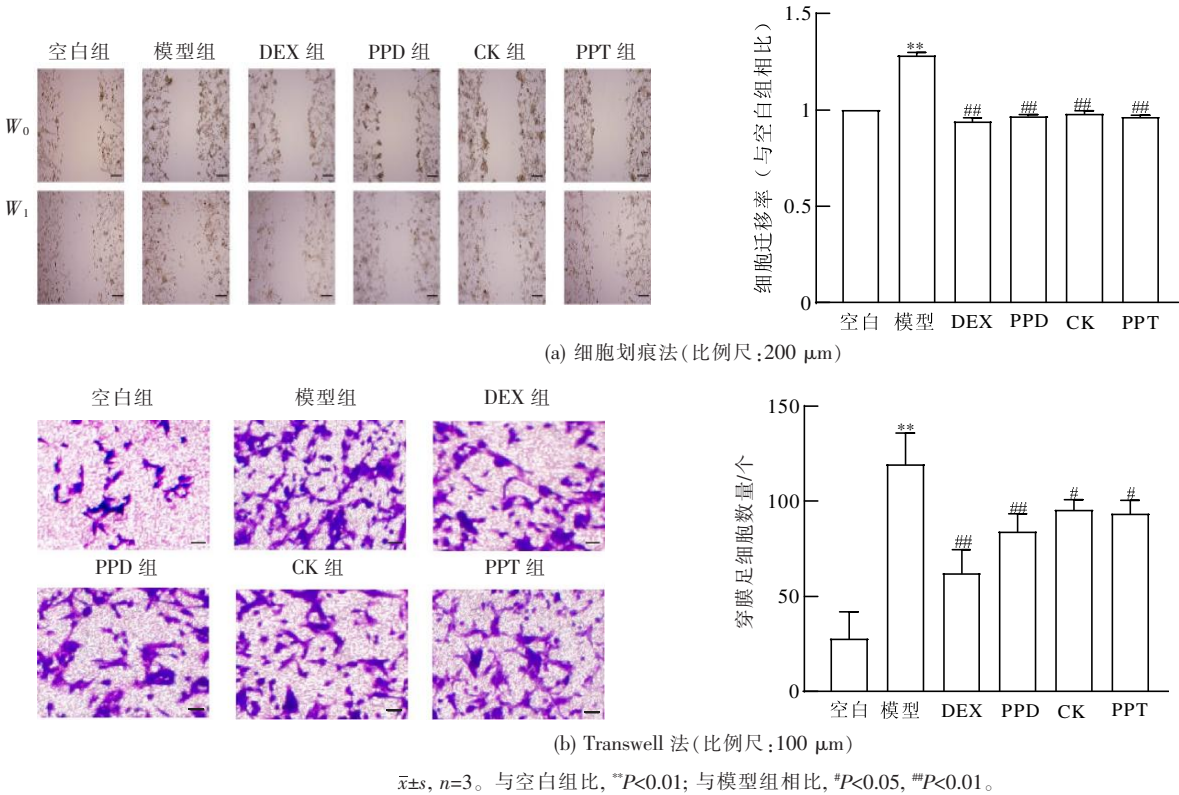


图 3 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足细胞迁移水平的影响

Fig. 3 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on the migration ability of podocytes

2.4 PPD、人参皂苷CK和PPT对Desmin、GR及NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的影响

通过Western blot法检测三种人参皂苷对足细胞损伤标志蛋白Desmin、GR及NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的影响,结果如图4所示。与空白组比,模型组足细胞中Desmin、NF- κ B P65、p-NF- κ B P65和p-I κ B α 表达水平异常升高($P < 0.01$),GR、I κ B α 的表达水平降低($P < 0.01$)。与模型组相比,DEX及三种人参皂苷给药组的Desmin、GR及NF- κ B P65、p-NF- κ B P65、I κ B α 和p-I κ B α 的表达水平均有不同程度的改善。

2.5 PPD、人参皂苷CK和PPT对足细胞中GR核转位的影响

通过细胞免疫荧光和Western blot法检测足细胞中GR的核转位情况,实验结果如图5、图6所示,与空白组比,模型组足细胞细胞核内GR的荧光强度和表达水平明显下调。与模型组相比,DEX组足细胞核内GR的荧光强度和表达水平显著升高($P < 0.01$),三种人参皂苷也均可以在一定程度上提高足细胞核内GR的荧光强度和表达水平,其中PPD的作用效果较好($P < 0.01$)。表明DEX和三种人参皂苷均可以促进损伤的足细胞中GR的核转位进程。

2.6 PPD、人参皂苷CK和PPT与GR蛋白晶体结构的分子对接评分

利用分子对接软件得到DEX与4UDC分子对接的Toal-Score值是6.0259,PPD、人参皂苷CK和PPT与4UDC分子对接的Toal-Score值分别为5.1993、4.7051和4.6293,表明三种人参皂苷与GR蛋白的晶体结构4UDC均有一定结合活性,但不如DEX的结合活性高;其中PPD与GR的结合活性优于人参皂苷CK和PPT。DEX、PPD、人参皂苷CK和PPT与GR蛋白晶体4UDC的氢键作用氨基酸位点见图7(虚线表示氢键、数值表示键长),DEX和三种人参皂苷和GR蛋白晶体均形成氢键相互作用。

3 讨论

人参皂苷具有与GCs相似的甾体类结构^[12],可以与GR结合并调节GR的表达情况。有研究报道人参皂苷对GCs具有增效减毒的作用,在治疗NS中具有独特的优势^[19]。本研究以生物活性较高的人参皂苷单体PPD、人参皂苷CK和PPT为代表,进一步探讨了人参皂苷对NS中足细胞损伤的保护作用。根据MTT实验结果,20 μ mol/L的PPD、人参皂苷CK和PPT组的足细胞的活力最好,因此后续实

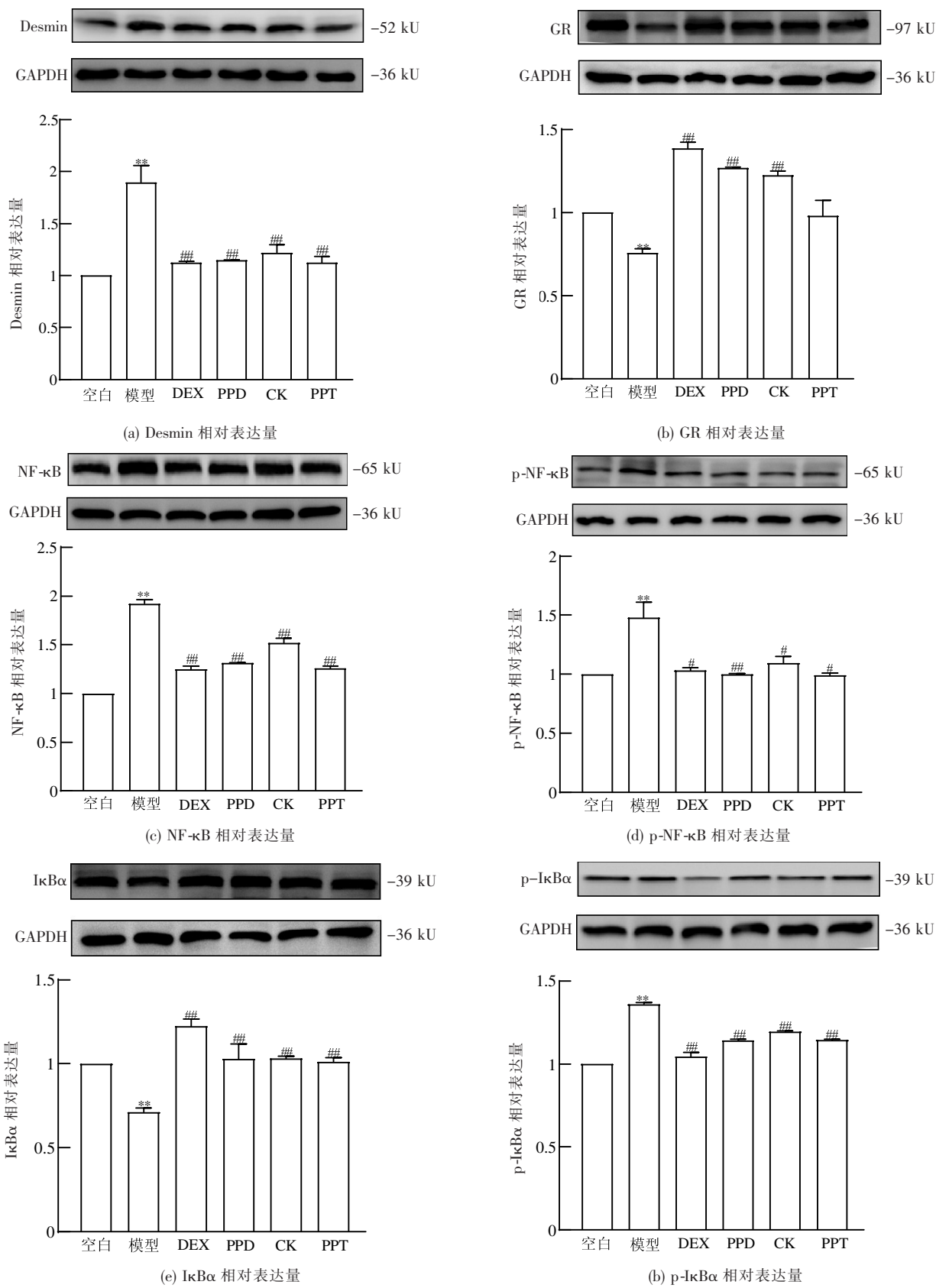
验选用20 μ mol/L作为各人参皂苷给药剂量。

ADR是常见的NS模型诱导剂,使用ADR作为诱导剂制备的NS模型大鼠出现大量蛋白尿、水肿、高血脂等病理现象,最符合临床上NS患者的病理特征^[20]。另外,ADR能够介导足细胞发生炎症反应,导致足细胞损伤^[17],并诱导足细胞损伤标志蛋白Desmin异常表达^[21]。因此,本研究通过利用ADR刺激人肾足细胞,建立足细胞损伤模型,检测PPD、人参皂苷CK和PPT缓解ADR诱导足细胞损伤的作用效果。研究结果表明,PPD、人参皂苷CK和PPT均可以在一定程度上改善ADR损伤后足细胞的活力并抑制其异常迁移,同时还可以降低Desmin的表达水平,缓解足细胞损伤。

NS的发病机制较复杂,常伴有炎症发生。NF- κ B参与炎症、免疫、分化、细胞生长和凋亡等多种生物学过程,并与肾脏损伤密切相关^[22]。I κ B α 是抑制NF- κ B活性最重要的核因子抑制蛋白之一,参与抑制NF- κ B活化的负反馈调节通路^[23],磷酸化的I κ B α 可以促进NF- κ B的激活,进而导致炎症反应的发生。在不受配体刺激的情况下,GR与HSP90等热休克蛋白和免疫元素结合以复合物的形式存在于细胞质中^[24]。GCs与GR结合后,激活GR,GR从复合物上解离下来,易位至细胞核,从而抑制NF- κ B的表达^[24-25],并促进I κ B α 的表达,进而发挥抗炎等作用。本研究表明,PPD、人参皂苷CK和PPT均可以上调GR和I κ B α 的表达水平,同时下调NF- κ B P65、p-NF- κ B P65和p-I κ B α 的表达水平,表明三种人参皂苷改善足细胞的炎症反应、缓解足细胞的损伤可能与影响GR及NF- κ B通路相关蛋白的表达水平有关,三种人参皂苷还可进一步提高足细胞细胞核内GR的表达水平、促进GR的核转位进程,从而发挥抗炎及缓解足细胞损伤的作用,且分子对接结果表明PPD、人参皂苷CK和PPT与GR蛋白的晶体结构均具有一定结合活性,其中人参皂苷PPD的作用效果较好。

4 结论

PPD、人参皂苷CK和PPT均可以在一定程度上缓解ADR诱导足细胞的损伤、改善损伤足细胞的炎症反应,其中PPD在缓解ADR诱导的足细胞损伤、促进GR核转位方面较优于人参皂苷CK和PPT,并且与GR的结合活性也较高,因此PPD在缓解足细胞损伤方面具有一定的优势,可能更适合开发为治疗NS的潜在药物,但仍需进一步探索。



$\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。与空白组比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图4 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对 Desmin、GR、NF-κB P65、p-NF-κB P65 及 IκBα、p-IκBα 蛋白表达水平的影响
Fig. 4 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on the expression of Desmin, GR, NF-κB P65, p-NF-κB P65 and IκBα, p-IκBα proteins

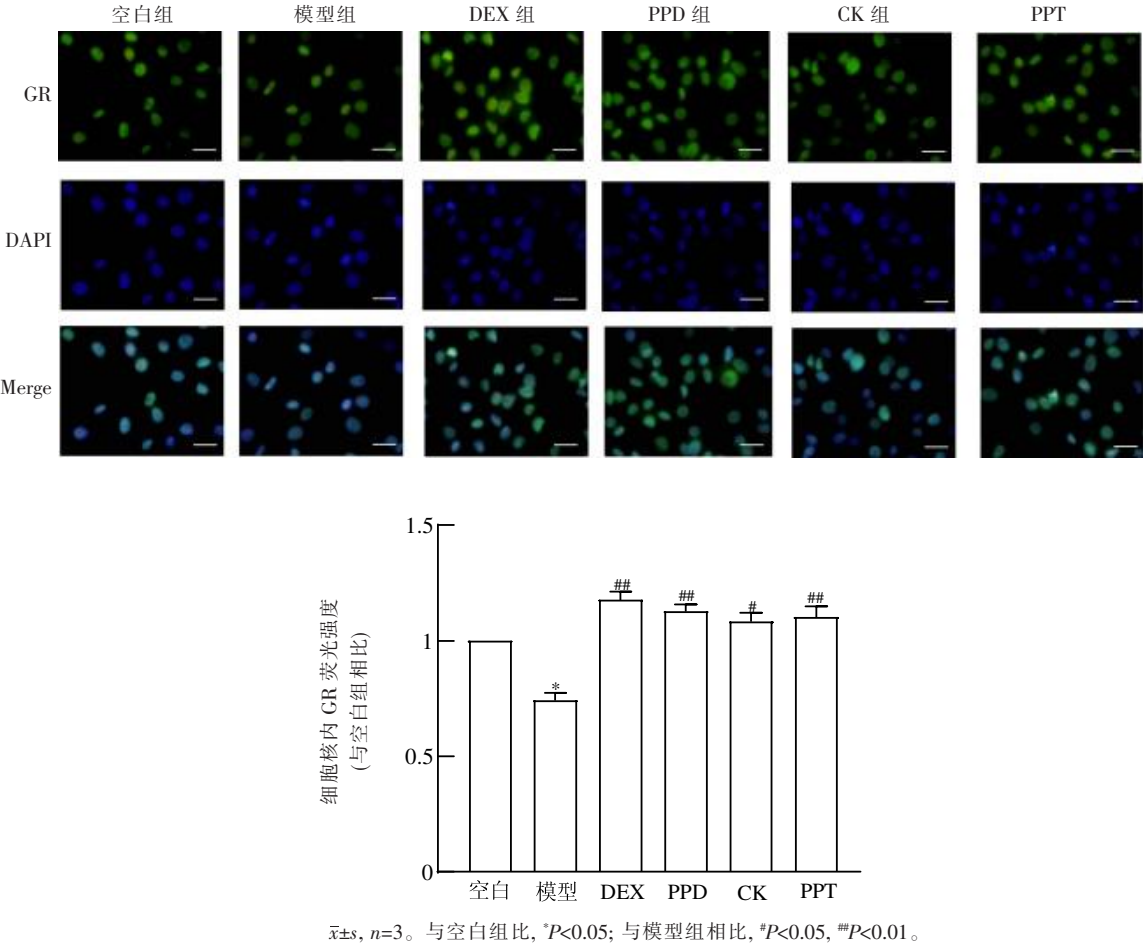


图 5 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足细胞中 GR 核转位过程的影响 (比例尺:100 nm)
Fig. 5 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on nuclear translocation of GR of podocytes (Scale:100 nm)

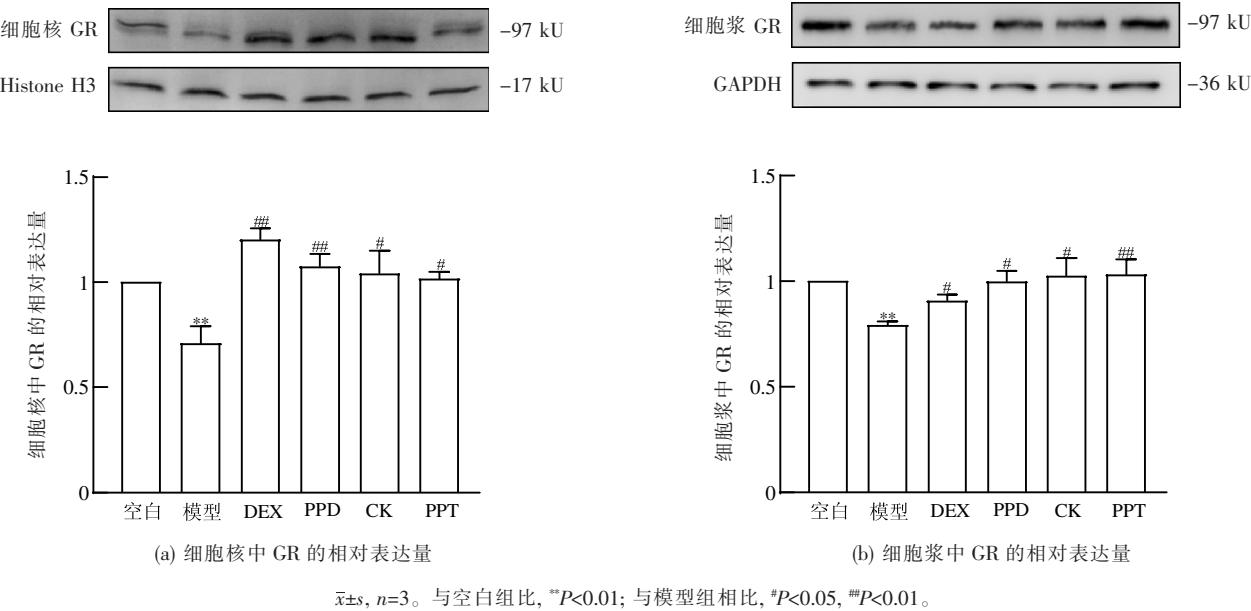


图 6 PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 对足细胞的细胞核和细胞浆中 GR 表达水平的影响
Fig. 6 Effects of PPD, Ginsenoside CK and PPT on the expression levels of GR in nuclear and cytoplasm of podocytes

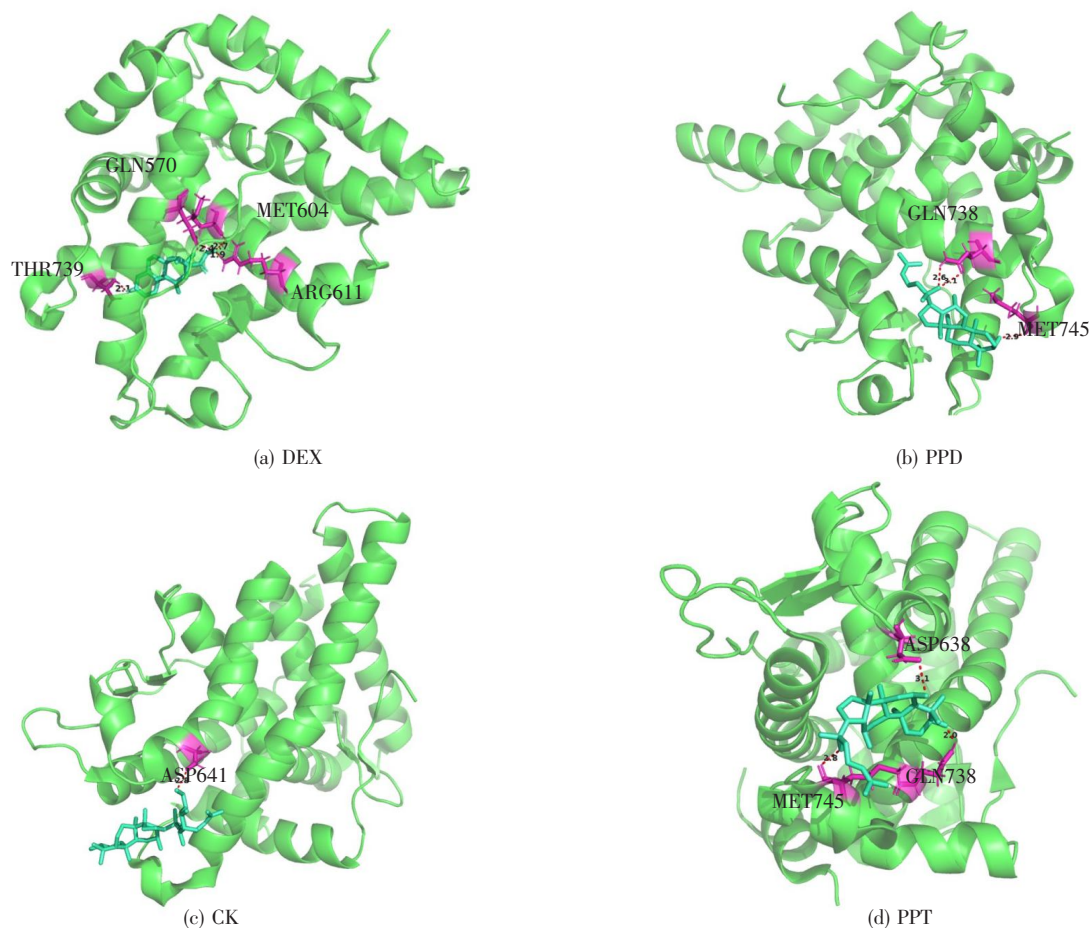


图 7 DEX、PPD、人参皂苷 CK 和 PPT 与 GR 蛋白晶体的对接模式

Fig.7 Molecular docking of DEX, PPD, Ginsenoside CK, PPT and GR protein crystal structure

参考文献:

[1] GBD CHRONIC KIDNEY DISEASE COLLABORATION. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2020, 395: 709–733.

[2] LI X, QI D, WANG M Y, et al. Salvianolic acid A attenuates steroid resistant nephrotic syndrome through suPAR/uPAR- α v β 3 signaling Inhibition[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114351.

[3] VANDEWALLE J, LUYPAERT A, DE BOSSCHER K, et al. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(1): 42–54.

[4] NOONE D G, IJIMA K, PAREKH R. Idiopathic nephrotic syndrome in children[J]. Lancet, 2018, 392: 61–74.

[5] CAMPBELL K N, TUMLIN J A. Protecting podocytes: a key target for therapy of focal segmental glomerulosclerosis[J]. Am J Nephrol, 2018, 47 Suppl 1(Suppl 1): 14–29.

[6] MALLIPATTU S K, HE J C. The podocyte as a direct target for treatment of glomerular disease? [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(1): F46–F51.

[7] 倪赛宏, 傅水莲, 何丽明, 等. 人参皂苷在肾脏疾病中的药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2018, 30(2): 37–40.

[8] 杜世豪, 张子惠, 谢群玲, 等. 曲札芪苷对肾病综合征大鼠的治疗作用及机制[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2021, 34(3): 323–329.

[9] 冀凯, 杜世豪, 李新, 等. 人参皂苷 Rg₃ 抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞过度增殖、炎症反应和 PTX3 的表达[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2020, 33(1): 55–62.

[10] BAI L T, GAO J L, WEI F, et al. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 423.

[11] YANG L, ZOU H C, GAO Y C, et al. Insights into gastrointestinal microbiota-generated ginsenoside metabolites and their bioactivities[J]. Drug Metab Rev, 2020, 52(1): 125–138.

[12] KARRA A, KONSTANTINOU M, TZORTZIOU M, et al. Potential dissociative glucocorticoid receptor activity for protopanaxadiol and protopanaxatriol[J]. Int J Mol Sci, 2018, 20(1): 94.

[13] OH G S, PAE H O, CHOI B M, et al. 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. *Cancer Lett*, 2004, 205(1): 23–29.

[14] SONG W, WEI L, DU Y W, et al. Protective effect of ginsenoside metabolite compound K against diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and NF-κB/p38 signaling pathway in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 227–238.

[15] JIANG N, LV J W, WANG H X, et al. Ginsenoside 20(S)-protopanaxadiol attenuates depressive-like behaviour and neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats[J]. *Behav Brain Res*, 2020, 393: 112710.

[16] ZHU M M, WANG L, YANG D, et al. Wedelolactone alleviates doxorubicin-induced inflammation and oxidative stress damage of podocytes by IκK/IκB/NF-κB pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109088.

[17] LI F, MAO X, ZHUANG Q Y, et al. Inhibiting 4E – BPI re-activation represses podocyte cell cycle re-entry and apoptosis induced by adriamycin[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 241.

[18] LIU W, MENG Q, SUN Y T, et al. Targeting P-glyco-

protein: nelfinavir reverses adriamycin resistance in K562/ADR cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(4): 1616–1631.

[19] 夏国胜. 人参皂苷辅助治疗肾病综合征的随机双盲对照研究[D]. 上海:第二军医大学, 2009.

[20] 王新斌, 戴恩来, 薛国忠, 等. 右归丸对激素抵抗型肾病综合征大鼠肾脏组织中 JNK/p38 信号通路的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(6): 1794–1802.

[21] 龙海波, 张辉, 钟娟, 等. 肾康丸对早期糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用[J]. *南方医科大学学报*, 2008(7): 1268–1272.

[22] KANAREK N, BEN-NERIAH Y. Regulation of NF-κB by ubiquitination and degradation of the IκBs[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 77–94.

[23] GHOSH S, DASS J F P. Study of pathway cross-talk interactions with NF-κB leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: a brief review[J]. *Gene*, 2016, 584(1): 97–109.

[24] PONTICELLI C, LOCATELLI F. Glucocorticoids in the treatment of glomerular diseases: pitfalls and pearls[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(5): 815–822.

[25] RONCHETTI S, MIGLIORATI G, BRUSCOLI S, et al. Defining the role of glucocorticoids in inflammation[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(14): 1529–1543.

Protective Effects of Protopanaxadiol, Ginsenosides CK and Protopanaxatriol on Adriamycin-Induced Podocytes Injury

WANG Meng-ying¹, SONG Ze-yu¹, GAN Hai-lin¹, ZHENG Mei-hua¹, LIU Qian¹,
PAN Zhi-cheng¹, LIU Ke^{1,2}, FAN Hua-ying¹

(1. School of Pharmacy, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Boyuan Biomedical Co., Ltd, Yantai 264003, China)

Abstract: In order to explore the protective effects of Protopanaxadiol (PPD), Ginsenosides CK and Protopanaxatriol (PPT) on podocytes injury in nephrotic syndrome (NS), the podocytes injury model is established by stimulating podocytes injury with adriamycin (ADR). The results show that the three ginsenosides can improve the proliferation and migration of ADR-induced podocytes through CCK8, cell scratch and transwell method. The results of Western blot and immunofluorescence show that PPD, Ginsenosides CK and PPT can alleviate podocytes injury by reducing the expression levels of Desmin, NF-κB P65, p-NF-κB P65 and p-IκBα proteins and increasing the expression level of IκBα proteins, and promote the GR expression and its nuclear translocations. Among them, PPD has a better effect. In addition, the results of molecular docking reveal that PPD, Ginsenosides CK and PPT are able to bind GR, and PPD exhibits the best binding activity. Therefore, PPD, Ginsenoside CK and PPT can ameliorate podocyte injury induced by ADR in some way, and PPD has more advantages in protecting podocyte injury.

Key words: ginsenoside; nephrotic syndrome; podocyte injury; glucocorticoid receptor

(责任编辑 周雪莹)