

网络出版时间:2023-05-09 15:43:27 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20230508.1430.036.html

# 人参皂苷 Rg1 通过抑制 NOX4/MAPK 通路减轻 棕榈酸钠诱导 HMCs 细胞的纤维化

周慧敏,张洁,黄蕾,孙冉,姬朋敏,孔亮亮,李维祖,李卫平

(安徽医科大学基础医学院药理学教研室,安徽合肥 230032)

doi:10.12360/CPB202209074

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2023)05-0917-09

中国图书分类号:R284.1;R322.61;R329.24;R345.4;  
R345.57;R587.24

**摘要:目的** 探讨人参皂苷 Rg1 对棕榈酸钠(sodium palmitate,PA)诱导的人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMCs)纤维化的抑制作用及机制。**方法** (1)用不同浓度的 PA 将 HMCs 处理 24 h,通过油红 O 染色观察脂质变化, H2DCFDA 法检测 ROS 生成情况;(2)将 HMCs 细胞分为对照组、PA(160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、HG(25 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ )组、PA + HG 组,用活细胞成像观察细胞 24 h 内形态变化;(3)将 HMCs 细胞分为对照组、PA(160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、PA + Rg1(5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、PA + Rg1(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、PA + Apocynin(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,免疫荧光法检测 Col4 的表达,Real-time PCR 检测 Col4、TGF- $\beta$  和 FN 的 mRNA 表达;Western blot 测定 TGF- $\beta$ 、FN 以及 NOX4、MAPK 通路相关蛋白表达。**结果**

PA 各浓度处理 HMCs 可剂量依赖性增加细胞内脂质沉积和 ROS 生成;PA 组和 PA + HG 组均能导致 HMCs 细胞形态异常变化;Apocynin 和 Rg1(5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )可抑制 PA 引

起的 HMCs 内脂质积累、ROS 的增多,以及 Col4、TGF- $\beta$  和 FN mRNA 的过表达,并明显下调 PA 诱导的 HMCs 中 TGF- $\beta$ 、FN、NOX4 和 MAPK 相关蛋白的增多。**结论** 人参皂苷 Rg1 能明显抑制 PA 诱导的 HMCs 细胞的纤维化,其机制可能与减少脂质沉积、抑制 NOX4/MAPK 通路等有关。

**关键词:**人参皂苷 Rg1;人肾小球系膜细胞;棕榈酸钠;NADPH 氧化酶 4;MAPK;纤维化

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



糖尿病(diabetes mellitus,DM)引起的糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是导致终末期肾功能衰竭的主要原因之一。近年来,DN 的发病率和死亡率在世界范围内迅速上升,成为影响人类寿命的一大主要死因<sup>[1]</sup>。DN 是糖尿病患者普遍存在的微血管并发症,其病理特征包括进行性白蛋白尿、肾小球肥大、肾小球基底膜增厚和肾小管间质纤维化<sup>[2]</sup>。其中,肾小球系膜细胞(mesangial cells,MCs)的增殖及细胞外基质(extracellular matrix,ECM)过度积累会导致肾小球硬化从而加快 DN 的进程。目前,早期的血糖控制、肾素-血管紧张素系统的拮抗作用以及透析或肾移植是可用于治疗 DN 的主要措施,但它们不足以阻止大多数患者该疾病的发展<sup>[3]</sup>。目前,已有研究并没有完全阐明 DN 的发病机制。因此,研究与 DN 发展密切相关的分子机制,有助于推进新靶点和治疗药物的研究。

收稿日期:2022-10-10,修回日期:2023-01-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No 81970630);安徽省自然科学基金资助项目(No 2208085MH219);安徽省高校自然科学研究重大项目(No KJ2020ZD14)

作者简介:周慧敏(1998-),女,硕士生,研究方向:内分泌药理学,E-mail:zhouhuimin2021@126.com;

李维祖(1971-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:内分泌药理学,通信作者,E-mail:liweizu@126.com;

李卫平(1960-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:内分泌药理学,通信作者,E-mail:lwp19@126.com

sis, and the possibility of differential protein as a potential therapeutic target for DCM was assessed. **Results**

The results showed that the diabetic mice showed DCM symptoms, with 19 significantly increased proteins and 35 decreased proteins compared with the normal group. These differential proteins were mainly enriched in lipid metabolism signaling pathway, cytokines and inflammatory cell pathways. STRING data were analyzed using protein-protein interactions and 11 proteins

were screened out targeting the above mentioned targets. Inhibition of ACOT2 alleviated DCM symptoms in the mice model. **Conclusions** In summary, the proteomics and DCM transcriptome analysis indicate that ACOT2 might be a new target for DCM prevention and treatment.

**Key words:** ACOT2; diabetic cardiomyopathy (DCM); transcriptomics; proteomics; KEGG enrichment analysis; GO enrichment analysis

有文献报道,肾小球系膜细胞易受脂毒性的影响,脂毒性可能是糖尿病肾病发生的关键机制<sup>[4]</sup>。我们前期的研究表明,棕榈酸钠(sodium palmitate, PA)可导致细胞脂质代谢异常来诱导人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMCs)纤维化<sup>[5]</sup>,然而其作用机制尚不完全清楚。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一种高度保守的信号通路,在细胞增殖、应激、炎症和凋亡中发挥核心作用。氧化应激和炎症反应等刺激可激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、C-Jun N 末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)在多种疾病的发病中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。NADPH 氧化酶 4(NADPH oxidases 4, NOX4)是一种专门调控氧化应激反应的组成酶,在肾小球系膜细胞、肾小管和足细胞中高度表达。NOX4 的上调主要导致 ROS 的积累,ROS 过多进一步诱导促炎细胞因子释放,从而加剧炎症反应<sup>[7]</sup>。激活 NOX4 可造成氧化应激损伤,并能激活 p38MAPK 通路,促进肾细胞纤维化及炎症,这是糖尿病肾病发展的关键机制之一<sup>[8]</sup>。因此,NOX4/MAPK 通路可能是研究高脂诱导人肾小球系膜细胞氧化应激、纤维化的关键药物靶点。

目前,能有效延缓肾脏衰老和损伤的药物和方法很少。大量文献报道中药人参对身体有多方面的益处。人参中含有多种活性成分,人参皂苷 Rg1(ginsenoside Rg1)是从人参的根、茎中提取的主要活性成分,具有延缓衰老、兴奋中枢神经和抗氧化的作用。报道显示,人参皂苷 Rg1 在多种疾病中具有抗炎和抗凋亡作用,包括糖尿病、中枢神经系统疾病、心血管疾病等<sup>[9]</sup>。课题组前期研究表明,人参皂苷 Rg1 能明显减轻链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠的肾脏病理损伤及炎症<sup>[10]</sup>。同时,人参皂苷 Rg1 可改善高糖诱导的 HMCs 细胞氧化应激损伤及凋亡<sup>[11]</sup>。然而,很少有研究探讨人参皂苷 Rg1 能否通过抑制 NOX4/MAPK 通路改善 PA 诱导的 HMCs 细胞氧化应激及纤维化。因此,本实验通过体外研究 NOX4/MAPK 通路对 PA 引起的 HMCs 细胞损伤的影响,以及人参皂苷 Rg1 对其的保护作用。该研究为糖尿病肾病的防治寻求新靶点和治疗药物,为人参皂苷 Rg1 的应用提供实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验细胞** 人肾小球系膜细胞株,惠赠于安徽医科大学药理实验室冻存库。

**1.2 药品与试剂** 人参皂苷 Rg1 (质量分数 ≥

98%),成都德思特生物技术有限公司, DST190828-009; Apocynin, 德国 Merck Millipore 公司(178385-1GM); DMEM 低、高糖培养基, Gibco 公司(8122252、8122211); 胎牛血清, 天杭生物科技(702208611); RIPA 细胞裂解液(P0013B)、细胞消化液(C0201)、H2DCFDA 活性氧检测试剂盒(S0033S)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010S)、RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒(R0024FT)、PMSF(ST505)、磷酸酶抑制剂(P1081)、Hoechst33258(C1018)购于碧云天生物科技;山羊抗兔 IgG 抗体,中杉金桥,ZF-0316;棕榈酸钠, Sigma, SLBR4966V;油红染料, BoMEI, Y07512;。

**1.3 实验仪器** 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, Heal Force 公司; HH 数显恒温水浴锅, 金城国胜实验仪器厂; 荧光倒置显微镜, 奥林巴斯; 电泳仪, Bio Rad 公司; TGL-16H 型高速冷冻离心机, 珠海黑马仪器; 4600 化学发光成像系统, 上海欧翔科学仪器; 酶标仪, Thermo Fisher; 高内涵细胞成像分析系统, Molecular Devices; 活细胞成像, Phase Holographic Imaging; 智能组织切片成像分析系统, 3D HISTECH。

## 1.4 方法

**1.4.1 细胞的培养与分组** 将冻存的 HMCs 细胞复苏, 使用 DMEM 低糖培养基(含 10% 胎牛血清)在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待 HMCs 长至约 80% 时将其接种至培养板中。选择 NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin 作为阳性药。实验 HMCs 细胞分组如下: (1) 对照组、PA (40 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA (80 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA (160 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA (320 μmol · L<sup>-1</sup>) 组; (2) 对照组、PA (160 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、HG (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA + HG (160 μmol · L<sup>-1</sup> + 25 mmol · L<sup>-1</sup>) 组; (3) 对照组、PA (160 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA + Rg1 (5 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA + Rg1 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 组、PA + Apocynin (50 μmol · L<sup>-1</sup>) 组。对照组 HMCs 正常培养, 其余各组按实验条件处理。

**1.4.2 活细胞成像观察细胞的形态变化** 将正常培养的 HMCs 细胞均匀的接种至 6 孔板中, 将活细胞成像设备用酒精消毒后, 放入超净工作台中照紫外 4 h, 然后进行组装; 细胞分组给药刺激后, 放入活细胞成像设备中, 观察给药后 24 h 内细胞形态的变化。

**1.4.3 油红 O 染色观察细胞内脂质沉积情况** 将 HMCs 细胞均匀的接种于 24 孔板中。100 mL 异丙醇中加入 0.5 g 油红粉末制成母液, 油红母液与蒸馏水按体积比 3 : 2 混合过滤后得到工作液。培养结束后弃去培养基, 每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30

min,弃去多聚甲醛,加 PBS 放摇床上洗 3 次,加入油红工作液避光染色 20 min;弃去油红染液加 PBS 洗 3 次后,每孔加入 0.5 mL 苏木精染色 10 s,最后每孔加入 1 mL PBS 在显微镜下观察并拍照记录。

**1.4.4 H2DCFDA 法检测细胞内 ROS 生成** 将细胞均匀的接种于 24 孔板中分组处理,培养结束后取出 24 孔板,用 PBS 洗 3 次,将 H2DCFDA 储备液与培养基按 1 : 1 000 配制成工作液,每孔加入 H2DCFDA 工作液 500  $\mu$ L,避光孵育 30 min;吸出工作液用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,使用高内涵成像系统拍照记录细胞内 ROS 生成量。

**1.4.5 细胞免疫荧光法检测蛋白表达情况** 将玻片放入 24 孔板中,将细胞接种于 24 孔板并分组处理。培养结束后,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,加 PBS 洗 3 次;加 200  $\mu$ L 0.5% Triton X-100 (5  $\mu$ L Triton X-100 + 1 mL PBS 配制)室温透膜 30 min 后 PBS 洗 3 次。每孔加入 200  $\mu$ L 免疫染色封闭液,室温封闭 1 h,再加 PBS 洗 3 次。每孔加入一抗 COL4 (Bioworld,BS61809,1 : 50)200  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;将一抗吸出后 PBS 洗 3 次,每孔加入 200  $\mu$ L 荧光标记的二抗(1 : 200)避光孵育 1 h,PBS 洗 3 次。每孔加入 Hoechst33258 染色 10 min,PBS 浸洗 3 次。取出玻片,滴加抗荧光淬灭剂并封片,使用智能组织切片成像分析系统观察并记录。

**1.4.6 RT-PCR 检测细胞内 mRNA 表达情况** 将 HMCs 细胞接种于 6 孔板,培养结束后弃去培养基,每孔加入裂解液 300  $\mu$ L,将细胞混悬液转移至离心管;使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。通过核酸蛋白分析仪测定吸光度,计算 RNA 浓度。根据 RNA 浓度进行反转录得到产物 cDNA, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。制备 PCR 反应液,使用荧光定量 PCR 仪进行检测;反应条件为:95  $^{\circ}$ C 30 s 后,95  $^{\circ}$ C 5 s 接着 60  $^{\circ}$ C 30 s(40 cycles)。以 GAPDH 为内参分析各分子 mRNA 相对表达水平。各引物序列见 Tab 1。

Tab 1 The primer sequences for PCR

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
GAPDH	CGCCGCCAGCTCACCATG	CACGATGGAGGGGAAGAC
Col4	CCCAGGAGAAAGAGGTGATA AAGGAAC	GTGAAATCCAGGTGCTCCGTATC TTC
TGF- $\beta$	TCTGCTGAGGCTCAAGTTAAA AGTGG	TGAGGTATCGCCAGGAATTGTTGC
FN	ACACGACTGTGGACCAAGTTG ATG	CTGCTACCTTCTACTGAAGCGGAA TAG

**1.4.7 蛋白质印迹分析** HMCs 细胞接种于 6 孔板,培养结束后弃去培养基,用 PBS 洗 3 次后每孔加

入 250  $\mu$ L RIPA 裂解液(RIPA : PMSF : 磷酸酶抑制剂 = 100 : 1 : 1),在冰上裂解 30 min,用细胞刮刀将贴壁细胞刮下来,收集于 1.5 mL 离心管内,4  $^{\circ}$ C, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>离心 10 min,收集上清液于 0.5 mL 离心管中,得细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,再加入 loading buffer,在 100  $^{\circ}$ C 下变性。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移到 PVDF 膜上,转膜后于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h,放进一抗:p22phox (Bioworld, BS60290, 1 : 1 000)、p47phox (Bioworld, BS64056, 1 : 1 000)、NOX4 (Bioworld, BS60435, 1 : 1 000)、ERK (Bioworld, BS5016, 1 : 1 000)、p-ERK (Affinity, AF1014, 1 : 1 000)、JNK (Santa, SC-137019, 1 : 1 000)、p-JNK (ABclonal, AP0631, 1 : 1 000)、P38 (Affinity, BF8015, 1 : 1 000)、p-P38 (Affinity, BF8015, 1 : 1 000)、TGF- $\beta$  (Bioworld, BS1361, 1 : 1 000)、FN (Bioworld, BS90514, 1 : 1 000)和 GAPDH (塞维尔生物科技,GB12002,1 : 1 000),4  $^{\circ}$ C 冰箱摇床上孵育过夜。将膜放摇床上用 TBST 洗 3 次,放进 HRP 标记的二抗(1 : 10 000)中室温孵育 1 h,最后将 PVDF 膜浸泡于 ECL 化学发光液中,用化学发光成像仪显影。使用 ImageJ 1.53K 软件分析目的条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各目标蛋白的相对表达量。

**1.4.8 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 9 分析实验结果,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异使用单因素方差分析(ANOVA 检验)。

2 结果

**2.1 不同浓度 PA 对 HMCs 细胞内脂质沉积以及 ROS 生成的影响** 用不同浓度的 PA 处理 HMCs 细胞,油红 O 染色结果显示,对照组中几乎检测不到脂质沉积,而 PA 组中,细胞形态变圆,HMCs 的胞浆内可见红色脂滴,并呈浓度依赖性,尤其在 PA(160、320  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)组( $P < 0.01$ ),见 Fig 1A、B。结果表明,PA 可引起 HMCs 内脂质过度沉积。使用 H2DCFDA 荧光染色法检测不同浓度的 PA 处理 HMCs 细胞后 ROS 水平。结果显示,对照组细胞状态较好,只有少量 ROS 生成;与对照组相比,PA 组细胞内 ROS 生成明显增多,其中 PA(160、320  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)的趋势更加明显( $P < 0.01$ ),见 Fig 1C、D。因此,在本研究中我们使用 PA(160  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)研究其对 HMCs 细胞的氧化应激损伤和纤维化的影响。

**2.2 PA 单独或联合高糖对 HMCs 细胞形态的影响** 使用活细胞成像系统实时观察 0 ~ 24 h 内 HMCs 细胞的细胞面积、周长、厚度及运动距离的变

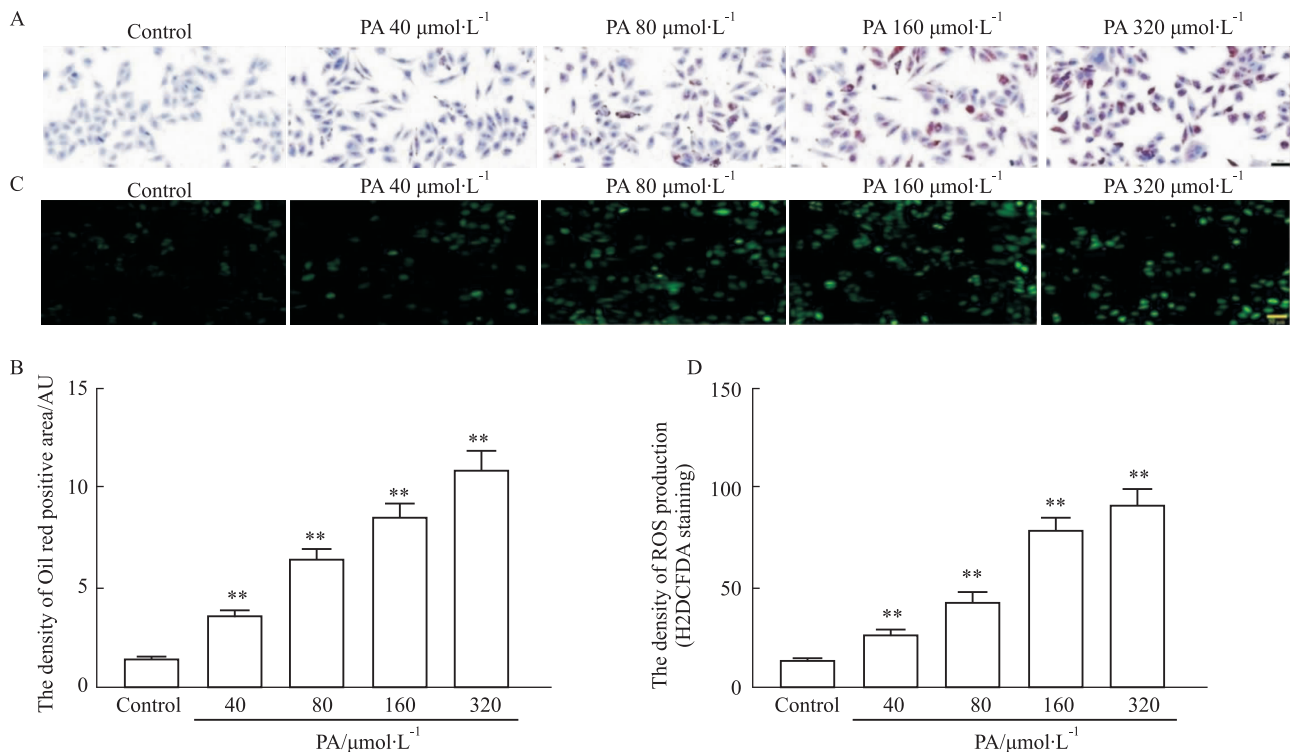


Fig 1 Effects of PA on lipid deposition and ROS production in HMCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: Lipid deposition was detected by Oil red staining (200 $\times$ ). B: Densitometric analysis for oil red staining. C: ROS production was detected by H2DCFDA Kit (200 $\times$ ). D: The density of ROS production. \*\*  $P < 0.01$  vs Control group.

化情况。结果显示,与对照组比较,PA组12 h后,细胞面积、周长明显减小,细胞厚度增加,运动距离增加,但仍低于正常组( $P < 0.05$ );24 h细胞面积进一步减小,细胞厚度明显增加( $P < 0.05$ )。高糖组12 h细胞形态变化不明显,24 h细胞面积、周长明显减少( $P < 0.05$ )。PA和高糖联合组12 h后细胞面积、周长明显减小( $P < 0.05$ );24 h后细胞厚度明显增加,运动距离更长但也低于正常组( $P < 0.05$ ),见Fig 2。由此可得,PA单独和PA联合高糖处理HMCs细胞均能导致细胞形态变化,因此选择PA单独处理HMCs细胞作为该实验的模型,观察PA对HMCs纤维化的影响及机制。

**2.3 人参皂苷 Rg1 对 PA 引起的 HMCs 细胞纤维化相关的 COL4、TGF- $\beta$ 、FN mRNA 和蛋白表达的影响** 我们通过免疫荧光法检测了HMCs细胞内COL4的表达,与对照组相比,模型组的COL4产生明显增多( $P < 0.01$ ),而人参皂苷 Rg1 处理可减少COL4的生成,其中人参皂苷 Rg1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和Apocynin的作用尤为明显( $P < 0.01$ ),见Fig 3A,B。Real-time PCR结果显示,对照组的COL4、TGF- $\beta$ 、FN mRNA表达水平较低,而模型组细胞中COL4、TGF- $\beta$ 、FN mRNA表达明显增多( $P < 0.01$ );与模型组相比,人参皂苷 Rg1 (5、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组和Apoc-

ynin组均能明显下调它们的表达( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见Fig 3C-E。同时Western blot结果也显示,与模型组比较,人参皂苷 Rg1 (5、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和Apocynin处理均能明显降低TGF- $\beta$ 、FN的表达( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见Fig 3F-H。这些结果表明,人参皂苷 Rg1可减轻PA引起的HMCs细胞纤维化。

**2.4 人参皂苷 Rg1 对 PA 诱导的 HMCs 细胞内脂质沉积以及 ROS 的影响** 为了进一步确定人参皂苷 Rg1 对细胞内脂质变化和氧化应激的影响,我们进行了油红O染色,并检测了细胞内ROS。结果显示,与模型组相比,人参皂苷 Rg1 及Apocynin处理可使细胞脂质沉积明显减少,其中以人参皂苷 Rg1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组尤为明显( $P < 0.05$ ),见Fig 4A、B。ROS检测结果显示,模型组细胞内ROS生成明显增加( $P < 0.01$ );而与模型组相比,Apocynin和人参皂苷 Rg1 (5、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组ROS的水平显著降低,其中以Rg1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组的作用尤为明显( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见Fig 4C、D。这些结果提示,人参皂苷 Rg1可通过抑制脂质沉积和ROS生成减轻PA诱导的HMCs细胞的氧化应激损伤。

**2.5 人参皂苷 Rg1 对 PA 诱导的 HMCs 细胞中 NOX4 通路相关蛋白表达的影响** NOX4是肾小球

系膜细胞中 ROS 主要来源之一,因此,我们进一步检测 PA 诱导的 HMCs 细胞中 ROS 生成是否与 NOX4 的激活有关。结果显示,对照组细胞 NOX4、p47phox 和 p22phox 蛋白表达水平较低,但与对照组比较,模型组细胞的 NOX4、p47phox 和 p22phox 蛋白表达明显增多 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );而与模型组比较,人参皂苷 Rg1 ( $5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 Apocynin 处理对它们的表达均有抑制作用 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见 Fig 5。因此,人参皂苷 Rg1 可通过下调 NADPH 氧化酶 4 相关蛋白的表达抑制 PA 诱导的 HMCs 细胞中 ROS 的生成。

**2.6 人参皂苷 Rg1 对 PA 诱导的 HMCs 细胞中 MAPK 通路相关蛋白表达的影响** 3 种关键的 MAPK 信号蛋白 (ERK、JNK 和 P38 MAPK) 的磷酸化可能在肾纤维化中起重要作用。因此,我们检测了 PA 诱导 HMCs 细胞纤维化时 MAPK 通路是否被激活。Western blot 结果显示,对照组细胞的 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 蛋白表达均较低;与对照组相比,

PA 组明显增加了 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 的表达 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,人参皂苷 Rg1 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 Apocynin 处理能明显减少 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 表达水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见 Fig 6。这些结果显示,人参皂苷 Rg1 可通过抑制 MAPK 通路的激活减轻 PA 诱导的 HMCs 细胞纤维化。

### 3 讨论

DN 是导致慢性肾病、肾衰竭的主要原因,同时也是引起糖尿病患者死亡的原因之一。目前,DN 的病理机制还没有完全阐明,用于 DN 的临床药物的治疗效果也不尽理想,需要进一步探索 DN 的病理生理机制及有效的治疗药物。肾小球系膜细胞是肾小球内较活跃的细胞,在维持系膜基质稳态和肾小球功能方面至关重要。研究表明,肾小球系膜细胞分泌的细胞外基质异常增多是早期糖尿病肾病的主要病理过程,系膜细胞功能失常加快了糖尿病介导的肾小球硬化,最终导致 DN<sup>[12]</sup>。因此,肾小球系膜细胞纤维化是研究糖尿病肾病的常用模型。

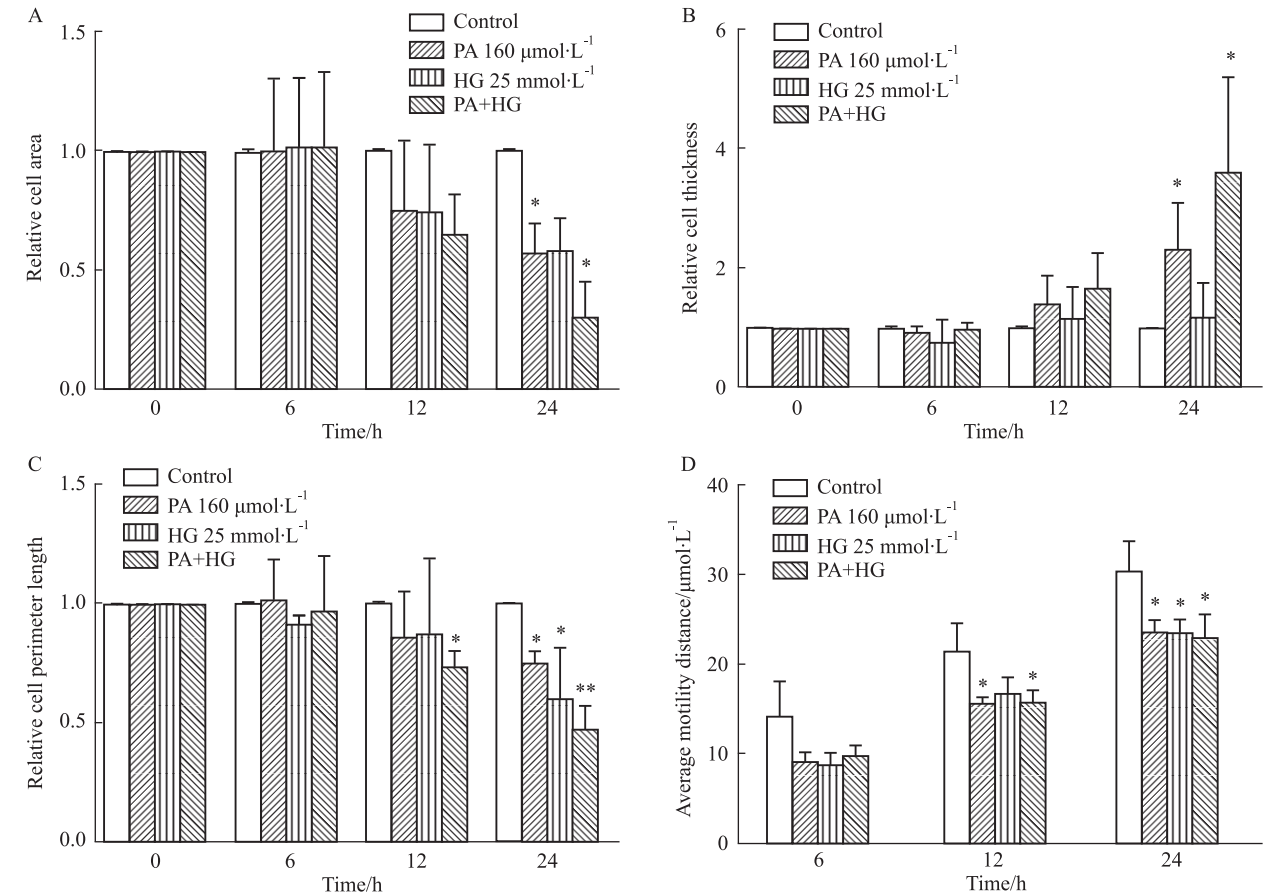
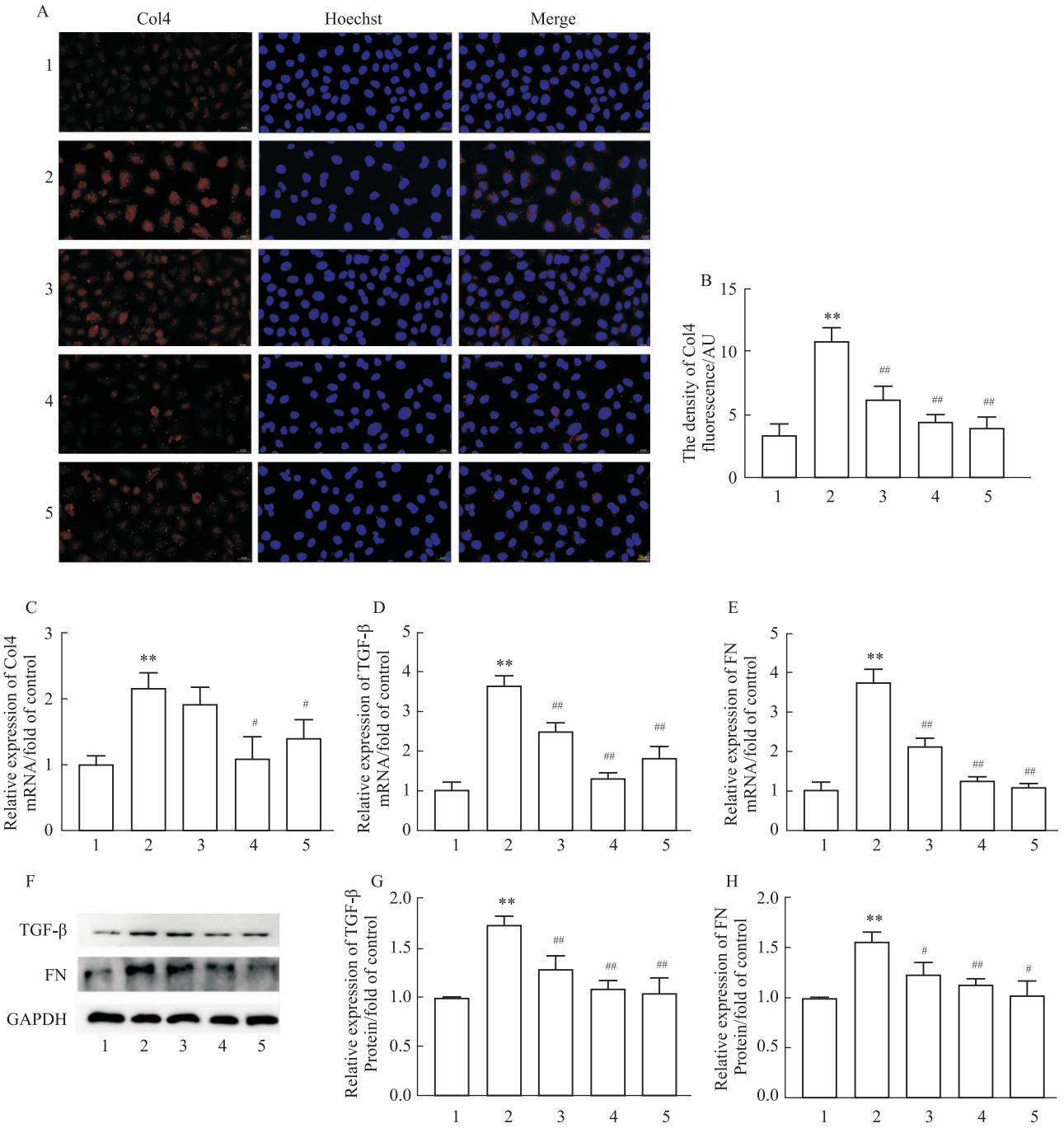


Fig 2 Effects of PA alone or combined with high glucose on cell morphology in HMCs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: The relative cell area. B: The relative cell irregularity. C: The relative cell perimeter length. D: The average motility distance. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group.



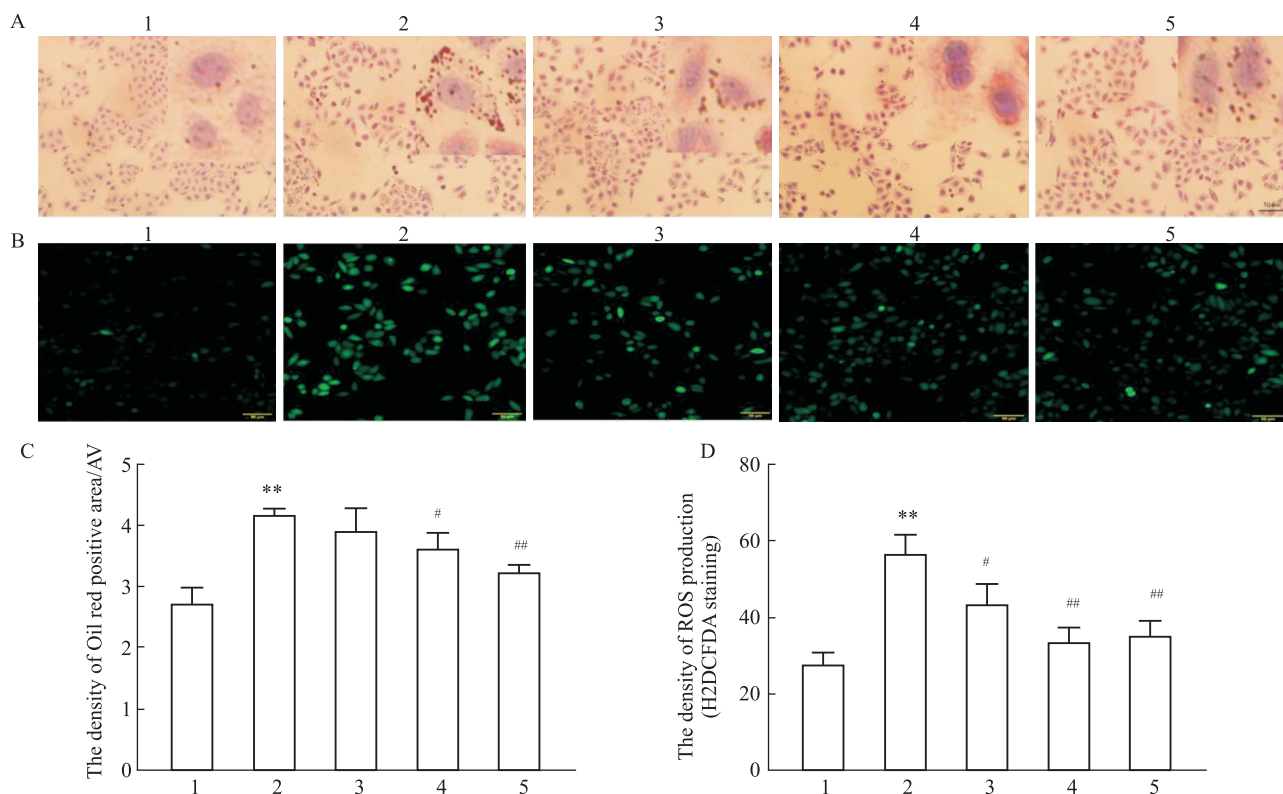


**Fig 3** Effects of ginsenoside Rg1 on expressions of COL4, TGF-β and FN mRNA and proteins in PA-induced HMCs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

1:Control;2:PA 160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;3:Rg1 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;4:Rg1 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;5:Apo 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; A: Col4 expression was detected by immunofluorescence (400 $\times$ ). B: Fluorescence intensity analysis of Col4 expression. C – E: Col4, TGF-β, FN mRNA were detected by PCR. G – H: The expressions of TGF-β, FN proteins (Western blot). \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Model group.

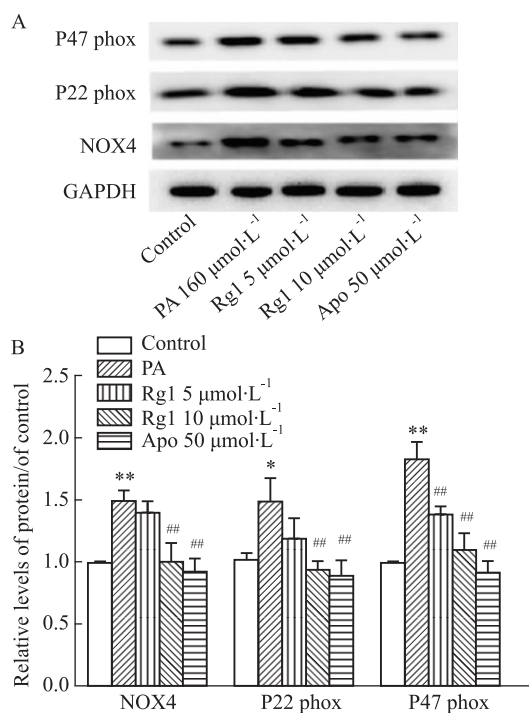
PA 是机体内最丰富的饱和脂肪酸,脂毒性较强,细胞长期暴露于较高浓度的 PA 时会刺激细胞脂代谢异常和细胞内脂质积累,引起脂质过氧化导致细胞损伤。课题组前期研究表明,PA 暴露可明显增加 HMCs 细胞内脂质的生成,导致细胞纤维化<sup>[13]</sup>,但机制仍需要进一步探讨。在本研究中,我们发现,随着 PA 暴露时间的延长,HMCs 脂质沉积

明显增加,细胞活力逐渐减弱,ROS 水平明显增加,说明 HMCs 细胞内氧化应激损伤与 PA 的诱导密切相关。同时,PA 处理明显增加了 Col4、TGF-β 及 FN 的表达,表明 PA 暴露是导致 HMCs 纤维化的重要原因。人参皂苷 Rg1 是人参皂苷中活性较强的成分。近年来,人参皂苷 Rg1 在神经退行性疾病、糖尿病肾病方面的抗衰老、抗纤维化作用受到广泛关



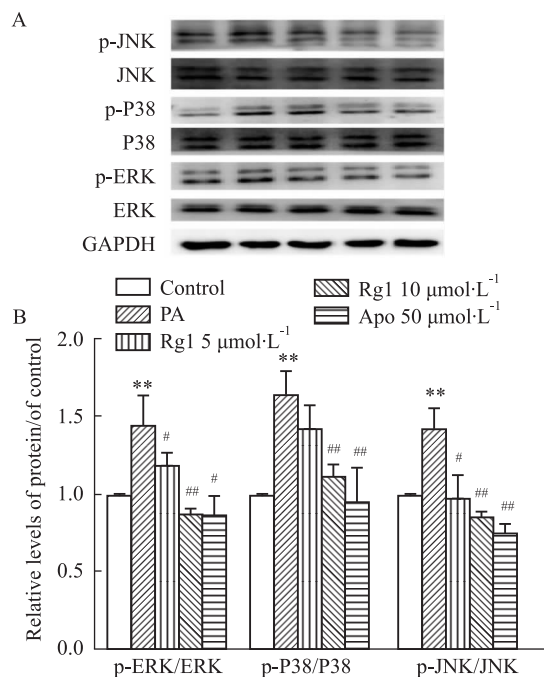
**Fig 4** Effects of ginsenoside Rg1 on PA-induced lipid deposition and ROS production in HMCs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

1:Control;2:PA 160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;3:Rg/5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;4:Rg/10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;5:Apo 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; A: Lipid deposition was detected by Oil red staining (200  $\times$ ); B: ROS production was detected by H2DCFDA Kit (200  $\times$ ); C: Densitometric analysis for oil red staining;D: The density of ROS production. \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Model group.



**Fig 5** Effects of ginsenoside Rg1 on expression of NOX4 pathway-related proteins in PA-induced HMCs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: The expressions of p47phox, p22phox and NOX4 in HMCs cells; B: Relative expression of p47phox, p22phox and NOX4. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ##  $P < 0.01$  vs PA group.



**Fig 6** Effects of ginsenoside Rg1 on expression of MAPK signaling pathway in PA-induced HMCs cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A: The expressions of p-JNK, JNK, p-P38, P38, p-ERK, ERK in HMCs; B: Relative expression of p-JNK/JNK, p-P38/P38 and p-ERK/ERK. \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Model group.

注,已成为近年来研究较多的一个成分<sup>[9]</sup>。但人参皂苷 Rg1 在糖尿病肾病中抗 HMCs 细胞纤维化的作用及机制有待充分阐明。本研究显示,人参皂苷 Rg1 作用于 HMCs 细胞后可减少 PA 引起的细胞内脂质沉积和 ROS 的产生。这些结果表明人参皂苷 Rg1 能够减轻 PA 暴露对 HMCs 的脂毒性和氧化应激,抑制 HMCs 细胞纤维化。

MAPKs 是免疫反应中重要的信号通路,能调节细胞增殖、分化、炎症反应等生理过程<sup>[6]</sup>。研究发现,高糖可激活 p38MAPK 信号通路并促进转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的表达,TGF- $\beta$  又可增强 p38MAPK 的活性,两者相互作用共同参与肾脏的纤维化<sup>[14]</sup>。MAPKs 的激活将诱导下游产物纤连蛋白 (fibronectin, FN) 的表达;并促进 IV 型胶原蛋白 (collagen IV, Col4) 的合成以及 ECM 沉积,进而引起系膜的扩张和纤维化,加速肾损伤<sup>[15]</sup>。该研究中,我们观察到 PA 暴露能导致 HMCs 中 COL4、FN 以及 TGF- $\beta$  的表达增加;在人参皂苷 Rg1 组中,这些蛋白质的表达明显降低。此外,PA 能明显升高 HMCs 内 JNK、p38 和 ERK 磷酸化水平,而人参皂苷 Rg1 ( $5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 Apocynin 处理能明显减少 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 表达。因此,人参皂苷 Rg1 可通过抑制 MAPK 通路相关蛋白的磷酸化减轻 PA 引起的 HMCs 细胞纤维化。

氧化应激可引起足细胞、系膜细胞损伤,导致蛋白尿和肾小球硬化<sup>[8]</sup>,因此氧化应激水平的升高和过量的 ROS 是 DN 发生和发展的重要因素之一。有报道显示,当 NADPH 氧化酶 4 受到抑制时,肾脏中 ROS 水平会相应降低,DN 小鼠的抗氧化能力增强,肾间质纤维化症状有所减轻<sup>[16]</sup>。因此,抗氧化应激和抑制 NOX4 信号可能是治疗 DN 的重要药物靶点。此外,过量的 ROS 会激活 MAPK,使 p38 磷酸化而被活化,促进纤维化分子和炎症因子的释放,加速 DN 的氧化损伤<sup>[17]</sup>。已有文献支持,MAPK 参与了氧化应激和炎症之间的恶性循环,细胞的氧化应激损伤可通过激活 JNK/p38 MAPK 信号通路促进肾小球肾炎大鼠的系膜细胞增生<sup>[18]</sup>。此外,外源性给予  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激能激活 MAPK 通路,而抗氧化剂可抑制 MAPK 通路发挥作用,因此 NOX4 可能是激活 MAPK 的潜在靶点。因此,本研究进一步探讨人参皂苷 Rg1 是否通过 NOX4 抑制 MAPK 的磷酸化,减轻 PA 引起的 HMCs 氧化应激及纤维化。本实验结果表明,人参皂苷 Rg1 可明显下调 PA 引起的 HMCs 中 ROS 的生成、NOX4 相关蛋白的过表达和

MAPK 关键分子的磷酸化,提示人参皂苷 Rg1 可能通过抑制 NOX4 通路减轻氧化应激损伤,进一步抑制 MAPK 的磷酸化,减轻 HMCs 细胞纤维化。

综上所述,PA 处理能明显引起人肾小球系膜细胞形态改变、活力降低、脂质积累、氧化应激损伤、NOX4/MAPK 信号通路及纤维化相关蛋白表达明显上调。而 Apocynin 和人参皂苷 Rg1 ( $5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理能明显减轻 PA 诱导的 HMCs 细胞损伤,下调 NOX4 相关蛋白表达和 MAPK 通路的磷酸化水平,从而抑制氧化应激反应及纤维化。

## 参考文献:

- [1] Xiong Y, Zhou L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, **2019**:7495629.
- [2] Li X, Lu L, Hou W, et al. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, **54**(2):163–72.
- [3] Van Krieken R, Krepinsky J C. Caveolin-1 in the pathogenesis of diabetic nephropathy: Potential therapeutic target[J]? *Curr Diab Rep*, 2017, **17**(3):19.
- [4] Tanaka Y, Kume S, Araki S-I, et al. Fenofibrate, a PPAR $\alpha$  agonist, has renoprotective effects in mice by enhancing renal lipolysis[J]. *Kidney International*, 2011, **79**(8):871–82.
- [5] Su Y, Chen Q, Ma K, et al. Astragaloside IV inhibits palmitate-mediated oxidative stress and fibrosis in human glomerular mesangial cells via downregulation of CD36 expression[J]. *Pharmacol Rep*, 2019, **71**(2):319–29.
- [6] Bai J, Zhang Y, Tang C, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, **133**:110985.
- [7] Yoo J Y, Cha D R, Kim B, et al. LPS-induced acute kidney injury is mediated by Nox4-SH3YL1[J]. *Cell Rep*, 2020, **33**(3):108245.
- [8] Samsu N. Diabetic nephropathy: Challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Biomed Res Int*, 2021, **2021**:1497449.
- [9] Alolga R N, Nuer-Allomuvor G F, Kuugbee E D, et al. Ginsenoside Rg1 and the control of inflammation implications for the therapy of type 2 diabetes: A review of scientific findings and call for further research[J]. *Pharmacol Res*, 2020, **152**:104630.
- [10] Shen X, Dong X, Han Y, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates glomerular fibrosis during kidney aging by inhibiting NOX4 and NLRP3 inflammasome activation in SAMP8 mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, **82**:106339.
- [11] 刘文华, 望永鼎, 翟一飞, 等. 人参皂苷 Rg1 介导 PI3K/AKT/FOXO3 通路缓解高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激反应[J]. *免疫学杂志*, 2020, **36**(4):285–91.
- [11] Liu W H, Wang Y D, Zhai Y F, et al. Ginsenoside Rg1 mediates PI3K/AKT/FOXO3 pathway to alleviate high glucose-induced oxidative stress in mesangial cells[J]. *Immunol J*, 2020, **36**(4):



- 285–91.
- [12] 邓艳辉, 公文艳, 李 强, 等. 白藜芦醇调节 SphK1/AP-1 信号通路抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖[J]. 中国药理学通报, 2018, **34**(7):959–63.
- [12] Deng Y H, Gong W Y, Li Q, et al. Resveratrol regulates SphK1/AP-1 signaling pathway to inhibit high glucose-induced glomerular tethered cell proliferation[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, **34**(7):959–63.
- [13] 张 洁. 人参皂苷 Rg1 对棕榈酸钠诱导的肾小球系膜细胞纤维化的改善作用及机制[D]. 合肥:安徽医科大学, 2022.
- [13] Zhang J. Effect and mechanism of Ginsenoside Rg1 on sodium palmitate-induced glomerular mesangial cell fibrosis[D]. Hefei: Anhui Med Univ, 2022.
- [14] Sawires H, Botrous O, Aboulmagd A, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in children with diabetic nephropathy[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, **34**(1):81–5.
- [15] Yu D, Shi M, Bao J, et al. Genipin ameliorates hypertension-induced renal damage via the angiotensin II-TLR/MyD88/MAPK pathway[J]. *Fitoterapia*, 2016, **112**:244–53.
- [16] Wang W, Wu Q-H, Sui Y, et al. Rutin protects endothelial dysfunction by disturbing Nox4 and ROS-sensitive NLRP3 inflammasome[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **86**:32–40.
- [17] 马冰沁, 钱唯韵, 罗振国, 等. 芦荟苷对糖尿病肾病大鼠 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, **30**(9):1–7.
- [17] Ma B Q, Qian W Y, Luo Z G, et al. Effects of aloin on NOX4/ROS/p38 MAPK signaling pathway and podocyte function in diabetic nephropathy rats[J]. *Chin J Comp Med*, 2020, **30**(9):1–7.
- [18] 凌 磊, 张 玮, 裘琳琳, 等. 补肾活血汤对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾功能及 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 新中医, 2022, **54**(9):29–33.
- [18] Ling L, Zhang W, Qiu L L, et al. Effects of Bushen Huoxue decoction on renal function and JNK/p38 MAPK signaling pathway in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis[J]. *New J Tradit Chin Med*, 2022, **54**(9):29–33.

## Ginsenoside Rg1 attenuates palmitate-induced HMCs fibrosis by inhibiting NOX4/MAPK pathways

ZHOU Hui-min, ZHANG Jie, HUANG Lei, SUN Ran, JI Peng-min,

KONG Liang-liang, LI Wei-zu, LI Wei-ping

(Dept of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract:** **Aim** To investigate the inhibitory effect of ginsenoside Rg1 on sodium palmitate induced fibrosis in human glomerular mesangial cells (HMCs) and its mechanism. **Methods** (1) HMCs were treated with different concentrations of PA for 24 h, the intracellular lipid accumulation was observed by oil red staining, and the intracellular ROS production was detected by H2DCFDA kit; (2) HMCs were divided into control, PA (160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), HG (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and PA + HG groups, then the changes in cell morphology were detected by live cell imaging technique for 24 h; (3) HMCs were divided into control, PA (160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PA + Rg1 (5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PA + Rg1 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PA + Apocynin (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) groups, the expression of Col4 was observed using immunofluorescence, and the mRNA expressions of Col4, TGF- $\beta$  and FN were detected by Real-time PCR; Western blot was used to determine the expression of

TGF- $\beta$ , FN, NOX4 and MAPK related proteins. **Results** Different concentrations of PA exposure could dose-dependently increase intracellular lipid deposition and ROS generation in HMCs. Both PA and PA + HG groups could lead to abnormal changes in HMCs. Apocynin and ginsenoside Rg1 (5, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could inhibit PA-induced intracellular lipid accumulation, ROS increase, and Col4, TGF- $\beta$  and FN mRNA overexpression, and significantly downregulated the expression of TGF- $\beta$ , FN, NOX4 and MAPK related proteins. **Conclusions** Ginsenoside Rg1 could significantly inhibit PA-induced fibrosis in HMCs, and its mechanism may be related to reducing lipid deposition, inhibiting NOX4/MAPK pathways.

**Key words:** ginsenoside Rg1; human glomerular mesangial cells; sodium palmitate; NADPH oxidases 4; MAPK; fibrosis