

## · 实验与方药 ·

# 人参皂苷 Re 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制心肌成纤维细胞增殖研究

韩路拓<sup>1</sup> 郭宏伟<sup>2</sup> 任钧国<sup>3</sup> 刘建勋<sup>3</sup> 王攀<sup>3</sup> 杨佳妹<sup>3</sup>

<sup>1</sup>黑龙江中医药大学中医药博物馆, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; <sup>3</sup>中国中医科学院西苑医院基础医学研究所 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091

通信作者: 任钧国, Email: reek2003@163.com

**【摘要】目的** 观察人参皂苷 Re 对体外高糖培养的原代心肌成纤维细胞(CFs)增殖与蛋白分泌的影响, 以及对 Wnt/ $\beta$ -连接蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路的调控作用。**方法** 采用体外高糖诱导 CFs 增殖模型, 经不同浓度的人参皂苷 Re 干预后, 采用 MTT 法检测 CFs 细胞增殖能力, 流式细胞仪检测细胞增殖周期, ELISA 法检测 I 型胶原、III 型胶原及 TGF- $\beta_1$  水平, Western blot 检测  $\beta$ -catenin、糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )、磷酸化糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (p-GSK-3 $\beta$ ) 蛋白表达情况。**结果** 与模型对照组比较, 人参皂苷 Re 各剂量组吸光度值降低( $P<0.01$ ), G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub> 期细胞百分比增加( $P<0.01$ ), S+G<sub>2</sub>+M 期细胞百分比降低( $P<0.01$ ), TGF- $\beta_1$  水平降低( $P<0.01$ ), 人参皂苷 Re 高、中剂量组 III 型胶原[(6.566±1.620) ng/ml、(7.170±0.470) ng/ml 比 (11.241±2.234) ng/ml] 水平降低( $P<0.01$ ), 人参皂苷 Re 高、中剂量组  $\beta$ -catenin[(0.281±0.016)、(0.301±0.021)比(0.409±0.037)]表达降低( $P<0.01$ ), 人参皂苷 Re 高剂量组 p-GSK-3 $\beta$ [(0.369±0.049)比(0.268±0.048)]表达升高( $P<0.01$ )。**结论** 人参皂苷 Re 可调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路异常表达, 有效抑制 CFs 增殖, 减少高糖条件下 CFs 胶原和 TGF- $\beta_1$  合成, 具有延缓糖尿病心肌纤维化的作用。

**【关键词】** 人参皂苷 Re; Wnt 信号通路; 细胞增殖; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 成纤维细胞

**基金项目:** 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2017ZX09301018); 黑龙江省经济社会发展重点研究课题(20415)

## Research on Ginsenoside Re inhibition of CFs proliferation by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

Han Lutuo<sup>1</sup>, Guo Hongwei<sup>2</sup>, Ren Junguo<sup>3</sup>, Liu Jianxun<sup>3</sup>, Wang Pan<sup>3</sup>, Yang Jiamer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chinese Medicine Museum, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Department of Basic Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; <sup>3</sup>Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China

Corresponding author: Ren Junguo, Email: reek2003@163.com

**【Abstract】Objective** To observe the effect of Ginsenoside Re on the proliferation and protein secretion of primary cardiac fibroblasts (CFs) cultured in high glucose by vitro, and the regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods** The myocardial fibroblast proliferation model induced by high glucose in vitro was used. Cell proliferation was detected by MTT method, cell cycle was measured by flow cytometry, concentration of type I, III collagens and TGF- $\beta_1$  protein

DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20210628-00253

收稿日期 2021-06-28 本文编辑 张琪

引用本文: 韩路拓, 郭宏伟, 任钧国, 等. 人参皂苷 Re 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制心肌成纤维细胞增殖研究[J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(3): 298-304. DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20210628-00253.



were tested by ELISA assay. Protein expression of  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$  and p-GSK-3 $\beta$  were determined by Western blot. **Results** Compared with the model group, the cell proliferation in Ginsenoside Re high, medium, low group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), the percentage of cells in  $G_0 + G_1$  phase was increased ( $P<0.01$ ), and the percentage of cells in  $S + G_2 + M$  phase was decreased ( $P<0.01$ ), the content of TGF- $\beta_1$  was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The content of type III collagen [(6.566 $\pm$ 1.620)ng/ml, (7.170 $\pm$ 0.470)ng/ml vs. (11.241 $\pm$ 2.234)ng/ml] in Ginsenoside Re high, medium group were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The expression of  $\beta$ -catenin (0.281 $\pm$ 0.016, 0.301 $\pm$ 0.021 vs. 0.409 $\pm$ 0.037) was significantly decreased and the expression of p-GSK-3 $\beta$  (0.369 $\pm$ 0.049 vs. 0.268 $\pm$ 0.048) in Ginsenoside Re high, medium group were significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Ginsenoside Re plays an important role in inhibiting CFs proliferation and reducing the synthesis of collagen and TGF- $\beta_1$  by regulating abnormal expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. It has the potential to delay the myocardial fibrosis of diabetes mellitus.

**【Key words】** Ginsenoside Re; Wnt signaling pathway; Cell proliferation; Transforming growth factor beta1; Fibroblasts

**Fund program:** Major Special Project "New Drug Innovation" of National Science and Technology (2017ZX09301018); Key Research Project of Economic and Social Development of Heilongjiang Province (20415)

人参(*Panax ginseng* C.A.Meyer)为五加科多年生草本植物,具有大补元气、固脱生津、安神益智的功效<sup>[1]</sup>。《神农本草经》记载人参“主养命以应天,无毒多服久服不伤人,欲轻身益气不老延年”<sup>[2]</sup>。研究表明,人参有抗肿瘤、抗休克等作用,对内分泌系统、心血管系统、神经中枢系统均有一定的药效作用<sup>[3-4]</sup>。人参皂苷 Re 为人参主要活性成分,具有抗氧化、抗心律失常保护心肌、降低血糖改善糖耐量、提升免疫力、抗炎等作用<sup>[5-6]</sup>。

糖尿病是一种病因复杂多发且病程较长的慢性内分泌和代谢性疾病,以高血糖为特征。糖尿病患者心肌病和心血管疾病并发风险较高,最终导致的糖尿病晚期病死是世界范围内严重威胁人类健康的重大公共卫生问题<sup>[7]</sup>。糖尿病患者并发糖尿病心肌病尤为常见,DCM 病变的关键特征是发生心肌纤维化,因此,心肌细胞功能与数量的改变是反映心肌纤维化程度的重要指标<sup>[8-9]</sup>。研究表明,Wnt/ $\beta$ -连接蛋白( $\beta$ -catenin)通路的异常活化与心肌纤维化病理过程紧密关联<sup>[10-11]</sup>。因此推测可通过阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的活化预防糖尿病心肌纤维化。本研究以体外高糖培养的心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)为研究对象,观察人参皂苷 Re 对其增殖的影响,并从调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路角度探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 乳鼠,出生 24 h 内,雌雄不限,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证

号 SCXK(京)2012-0001。

### 1.2 实验仪器

SYNERGYTM4 酶标仪(美国 BioTek);Epics Elite 流式细胞分析仪(美国 Beckman Coulter);Chem Doc XRS 凝胶成像分析系统和垂直电泳仪(美国 Bio-Rad)。

### 1.3 药品与试剂

人参皂苷 Re、卡托普利对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110754-200822、100318-201103);胎牛血清(美国 GIBCO 公司,批号 1227693);II 型胶原酶、进口分装试剂胰酶、MTT(美国 Sigma 公司,批号分别为 20121109、0458、20091223);I 型、III 型胶原 ELISA 试剂盒(美国 USCN 公司,批号分别为 153540、070893);TGF- $\beta_1$  因子 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司,批号 314362);DNA PREP 试剂盒(美国 BECKMAN COULTER,批号 34152);小鼠抗波形蛋白(德国 Biogenes,批号 990305w);小鼠抗结蛋白单克隆抗体(德国 Biogenes,批号 980788w);ECL 发光液(美国 Thermo Scientific Thermo Scientific,批号 34096);兔抗大鼠  $\beta$ -catenin 单克隆抗体(英国 Abcam,批号 9582);兔抗大鼠糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )单克隆抗体(英国 Abcam,批号 2118);兔抗大鼠磷酸化糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (phospho-glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , p-GSK-3 $\beta$ )单克隆抗体(英国 Abcam,批号 5558);兔抗大鼠  $\beta$ -actin 多克隆抗体(英国 Abcam,批号 9315);HRP 标记的羊抗兔多克隆二抗(英国 Abcam,批号 108092);其他试剂均为国产分析纯。



#### 1.4 大鼠心肌成纤维细胞体外培养及鉴定

参考 Sreejit 等<sup>[12]</sup>方法并加以改进,取出生 24 h 内的 SD 大鼠乳鼠,无菌条件下,开胸摘取心脏,置 4 °C 0.01% PBS 缓冲液中除血细胞,心内膜上内皮细胞和心外膜细胞需经 75% 乙醇浸泡 30 s 灭活。充分剪碎心脏组织至 1 mm<sup>3</sup> 碎块后,弃掉 PBS,加入等体积的 0.125% 胰蛋白酶和 0.1% II 型胶原酶,37 °C 水浴反复旋转消化(10 min/次),至组织块完全消失。合并细胞悬液,加入 10% 胎牛血清含量的 DMEM 低糖培养基终止消化。将合并的消化悬液过 200 目筛,2 000 r/min 离心(离心半径 13.5 cm) 10 min,弃上清,加进 10% 胎牛血清含量的 DMEM 低糖培养基,吹匀重悬 CFs,接种至培养瓶,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。根据心肌细胞与 CFs 静置贴壁时间的不同,采用差速黏附分离法筛选 CFs。待细胞贴壁 1 h 后弃上清液,贴壁者用预冷的 PBS 清洗后即得 CFs,更换 10% 胎牛血清含量的 DMEM 低糖培养基继续孵育。2 d 更换 1 次培养基。经免疫荧光法鉴定波形蛋白染色阳性、结蛋白染色阴性者为实验所需 CFs。经计算纯度达 98.5%,台盼兰染色计数细胞存活比率大于 92%。待 85%~95% 细胞融合后,用 0.25% 胰酶消化传代(1:2),采用 2~4 代细胞进行实验。所有细胞接种孵育 24 h 后,需更换无血清低糖 DMEM 进行细胞生长同步 24 h 搏动处理。

#### 1.5 细胞分组和干预

取 2~4 代细胞,按随机数字表法分为正常对照组(D-葡萄糖含量为 5.5 mmol/L 的 DMEM 低糖培养基),模型对照组(D-葡萄糖含量为 25 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基),高渗对照组(D-葡萄糖含量为 5.5 mmol/L 的 DMEM 培养基+19.5 mmol/L 甘露醇),人参皂苷 Re 高(50 mg/L 人参皂苷 Re+D-葡萄糖含量为 25 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基)、中(25 mg/L 人参皂苷 Re+D-葡萄糖含量为 25 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基)、低剂量组(12.5 mg/L 人参皂苷 Re+D-葡萄糖含量为 25 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基),西药对照组(22 mg/L 卡托普利+D-葡萄糖含量为 25 mmol/L 的 DMEM 高糖培养基)。

#### 1.6 细胞增殖能力检测

将处于对数生长期的 CFs 制成细胞混悬液,以 5×10<sup>4</sup> 个/ml 接种于 96 孔板,孵育同步搏动后,按上述分组并进行干预。分别于干预 24、48 h 后,每孔加入 10 μl 的 MTT 溶液(1 g/L),培养箱内孵育 4 h 后停止培养,弃上清,加入 100 μl 的 DMSO,酶标仪

490 nm 波长处测定吸光度值。以每孔吸光度值代表细胞增殖活性。

#### 1.7 流式细胞仪检测细胞周期

取 CFs 制成细胞悬液,以 1×10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 6 孔板,同步搏动后按上述分组并进行干预。孵育 48 h 后 PBS 液洗,以预热的 0.25% 胰酶覆盖 CFs 表面,消化温度 37 °C,收集细胞悬液,调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup> 个/ml,谨慎遵循细胞周期试剂盒说明书操作,在流式细胞仪进行检测,采用 MCYCLE 软件进行细胞周期分析。

#### 1.8 酶联免疫吸附法检测

将处于对数生长期的 CFs 制成细胞混悬液,以 1×10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 6 孔板上孵育,同步搏动后按实验分组并进行干预。孵育 48 h 后,收集合并细胞上清液,采用 ELISA 法测定 450 nm 波长处吸光度值,实验步骤严格按试剂盒说明书进行操作,根据浓度曲线,计算 I 型胶原、III 型胶原、TGF-β<sub>1</sub> 含量。

#### 1.9 蛋白质印迹法检测

收集经干预后的 CFs,加入 RI-PA 裂解液置冰浴中 30 min。将细胞刮刀刮取的裂解液合并收集,以 4 °C、2 000 r/min 离心(离心半径 13.5 cm) 30 min 后取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性后,上样,行 SDS-PAGE 电泳,转膜,加入含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 于室温封闭 30 min,加入 β-catenin(1:5 000)、GSK-3β(1:2 000)、p-GSK-3β(1:2 000)一抗室温孵育 20 min 后,置 4 °C 冰箱孵育过夜。次日取出,洗膜,加入二抗(1:10 000)室温孵育 90 min,ECL 发光显影。采用 Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值。以 β-actin 为内参,以目的蛋白和内参蛋白条带灰度值的比值代表目的蛋白相对表达量。

#### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理。数据行正态性检验、方差齐性检验,符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

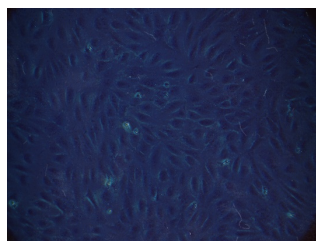
#### 2.1 大鼠心肌成纤维细胞体外培养与鉴定

乳鼠 CFs 生长速度较快,48~72 h 即成为融合状态。细胞多呈梭形,含有椭圆形细胞核 2~3 个,胞质透明,胞体体大,无自发性搏动,见图 1。

免疫荧光染色显示,CFs 波形蛋白染色呈阳性,结蛋白染色呈阴性,见图 2。

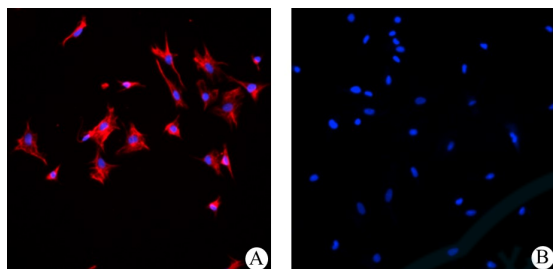






注 CFs: 心肌成纤维细胞

图1 乳鼠CFs形态(×200)



注 CFs: 心肌成纤维细胞; A: 波形蛋白; B: 结蛋白

图2 乳鼠CFs波形蛋白、结蛋白染色(免疫荧光染色 ×400)

## 2.2 各组心肌成纤维细胞增殖率比较

干预 24、48 h 后, 正常对照组与高渗对照组细胞吸光度值比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 表明细胞增殖与渗透压无关。与正常对照组比较, 模型对照组吸光度值明显增高( $P<0.01$ )。与模型对照组比较, 人参皂苷 Re 高、中、低剂量组及西药对照组吸光度值明显降低( $P<0.01$ ); 与正常对照组比较, 人参皂苷 Re 低剂量组比较, 24 h 人参皂苷 Re 高、中剂量组及西药对照组吸光度值降低( $P<0.01$ ), 48 h 人参皂苷 Re 高剂量组吸光度值降低( $P<0.05$ ), 表明高、中剂量的人参皂苷 Re 具有较好的抑制细胞增殖的作用, 见表 1。

表1 各组CFs细胞增殖率比较(吸光度,  $\bar{x} \pm s$ )

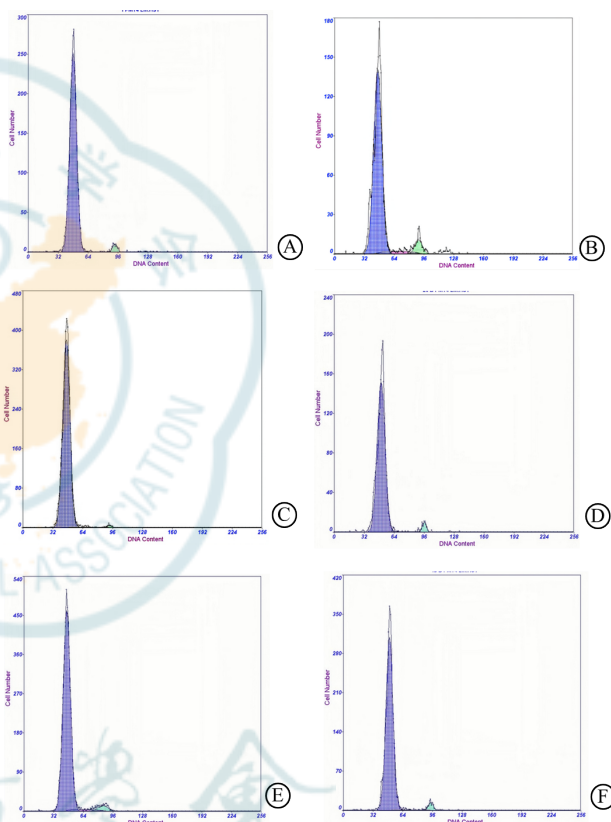
| 组别           | n | 24 h                      | 48 h                      |
|--------------|---|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组        | 6 | 0.146±0.007               | 0.153±0.015               |
| 模型对照组        | 6 | 0.173±0.014 <sup>a</sup>  | 0.189±0.012 <sup>a</sup>  |
| 高渗对照组        | 6 | 0.138±0.005               | 0.155±0.020               |
| 人参皂苷 Re 高剂量组 | 6 | 0.109±0.006 <sup>bc</sup> | 0.116±0.009 <sup>bc</sup> |
| 人参皂苷 Re 中剂量组 | 6 | 0.119±0.011 <sup>bc</sup> | 0.119±0.011 <sup>b</sup>  |
| 人参皂苷 Re 低剂量组 | 6 | 0.144±0.020 <sup>b</sup>  | 0.130±0.012 <sup>b</sup>  |
| 西药对照组        | 6 | 0.115±0.007 <sup>bc</sup> | 0.119±0.002 <sup>b</sup>  |

注 CFs: 心肌成纤维细胞; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与正常对照组比较, <sup>c</sup> $P<0.01$ ; <sup>d</sup> $P<0.05$

## 2.3 各组心肌成纤维细胞增殖周期比较

因细胞增殖实验结果表明细胞增殖与渗透压无关, 故后续实验中不再设立高渗对照组。

与正常对照组比较, 模型对照组及各干预组  $G_0+G_1$  期细胞百分比降低( $P<0.01$ ),  $S+G_2+M$  期细胞百分比增加( $P<0.01$ )。与模型对照组比较, 人参皂苷 Re 高、中、低剂量组及西药对照组  $G_0+G_1$  期细胞百分比增加( $P<0.01$ ),  $S+G_2+M$  期细胞百分比降低( $P<0.01$ ); 与正常对照组比较, 人参皂苷 Re 低剂量组  $G_0+G_1$  期细胞百分比增加( $P<0.01$ ),  $S+G_2+M$  期细胞百分比降低( $P<0.01$ ); 与西药对照组比较, 人参皂苷 Re 高剂量组  $G_0+G_1$  期细胞百分比增高( $P<0.01$ ), 见图 3、表 2。



注 CFs: 心肌成纤维细胞; A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 人参皂苷 Re 高剂量组; D: 人参皂苷 Re 中剂量组; E: 人参皂苷 Re 低剂量组; F: 西药对照组

图3 各组CFs细胞增殖周期流式细胞图

表2 各组CFs增殖周期细胞百分比比较(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | n | $G_0+G_1$                   | $S+G_2+M$                  |
|--------------|---|-----------------------------|----------------------------|
| 正常对照组        | 6 | 97.131±0.530                | 2.869±0.530                |
| 模型对照组        | 6 | 88.987±0.929 <sup>a</sup>   | 11.013±0.929 <sup>a</sup>  |
| 人参皂苷 Re 高剂量组 | 6 | 98.231±0.178 <sup>bcd</sup> | 1.769±0.178 <sup>bcd</sup> |
| 人参皂苷 Re 中剂量组 | 6 | 95.615±0.102 <sup>acd</sup> | 4.385±0.102 <sup>acd</sup> |
| 人参皂苷 Re 低剂量组 | 6 | 93.330±0.070 <sup>ac</sup>  | 6.670±0.070 <sup>ac</sup>  |
| 西药对照组        | 6 | 95.053±0.776 <sup>bcd</sup> | 5.242±0.280 <sup>acd</sup> |

注 CFs: 心肌成纤维细胞; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.01$ , <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与模型对照组比较, <sup>c</sup> $P<0.01$ ; 与正常对照组比较, <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 与西药对照组比较, <sup>e</sup> $P<0.01$



## 2.4 各组心肌成纤维细胞 I 型、Ⅲ型胶原水平比较

与正常对照组比较,模型对照组及各干预组 I 型、Ⅲ型胶原水平升高( $P<0.01$ )。与模型对照组比较,人参皂苷 Re 高、中剂量组 Ⅲ型胶原水平降低( $P<0.01$ ),且低于低剂量组( $P<0.01$ );与西药对照组比较,人参皂苷 Re 高剂量组 I 型胶原水平降低( $P<0.01$ ),人参皂苷 Re 高、中剂量组 Ⅲ型胶原水平降低( $P<0.01$ ),见表 3。

表 3 各组 CFs 中 I 型、Ⅲ型胶原水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | n | Ⅲ型胶原<br>(ng/ml)             | I 型胶原<br>(pg/ml)                |
|--------------|---|-----------------------------|---------------------------------|
| 正常对照组        | 6 | 6.218±0.822                 | 326.901±123.582                 |
| 模型对照组        | 6 | 11.241±2.234 <sup>a</sup>   | 1 250.123±231.623 <sup>a</sup>  |
| 人参皂苷 Re 高剂量组 | 6 | 6.566±1.620 <sup>bcd</sup>  | 1 004.133±411.998 <sup>ac</sup> |
| 人参皂苷 Re 中剂量组 | 6 | 7.170±0.470 <sup>acde</sup> | 1 242.117±162.923 <sup>a</sup>  |
| 人参皂苷 Re 低剂量组 | 6 | 9.003±0.971 <sup>a</sup>    | 1 374.913±151.333 <sup>a</sup>  |
| 西药对照组        | 6 | 9.770±0.938 <sup>a</sup>    | 1 395.619±130.910 <sup>a</sup>  |

注 CFs: 心肌成纤维细胞;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与人参皂苷 Re 低剂量组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与西药对照组比较,<sup>e</sup> $P<0.01$

## 2.5 各组心肌成纤维细胞转化生长因子 $\beta_1$ 水平比较

与正常对照组比较,模型对照组及各干预组 TGF- $\beta_1$  水平升高( $P<0.01$ )。与模型对照组比较,人参皂苷 Re 高、中、低剂量组及西药对照组 TGF- $\beta_1$  水平降低( $P<0.01$ ),且人参皂苷 Re 高剂量组低于人参皂苷 Re 低剂量组和西药对照组( $P<0.01$ ),见表 4。

表 4 各组 CFs 中 TGF- $\beta_1$  水平比较(pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | n | TGF- $\beta_1$               |
|--------------|---|------------------------------|
| 正常对照组        | 6 | 72.530±7.760                 |
| 模型对照组        | 6 | 92.782±6.097 <sup>a</sup>    |
| 人参皂苷 Re 高剂量组 | 6 | 45.221±7.954 <sup>abcd</sup> |
| 人参皂苷 Re 中剂量组 | 6 | 49.823±10.635 <sup>ab</sup>  |
| 人参皂苷 Re 低剂量组 | 6 | 55.960±7.847 <sup>ab</sup>   |
| 西药对照组        | 6 | 58.722±4.894 <sup>ab</sup>   |

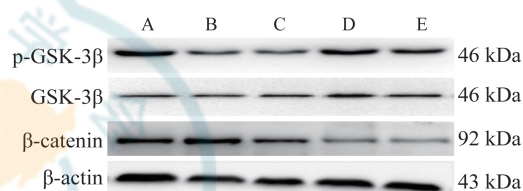
注 CFs: 心肌成纤维细胞;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与人参皂苷 Re 低剂量组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与西药对照组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$

## 2.6 各组心肌成纤维细胞 $\beta$ -连环蛋白、糖原合成酶激酶及其磷酸化蛋白表达比较

由细胞增殖实验、细胞周期实验及 ELISA 检测

结果可知,人参皂苷 Re 高剂量组与中剂量组作用效果明显优于低剂量组,因此后续实验中未设立人参皂苷 Re 低剂量组。

结果显示,与正常对照组比较,模型对照组及人参皂苷 Re 高、中剂量组  $\beta$ -catenin 表达升高( $P<0.05$ ),模型对照组及人参皂苷 Re 中剂量组 p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达降低( $P<0.05$ )。与模型对照组比较,人参皂苷 Re 高、中剂量组  $\beta$ -catenin 表达降低( $P<0.01$ ),人参皂苷 Re 高剂量组 p-GSK-3 $\beta$  表达升高( $P<0.01$ );与西药对照组比较,人参皂苷 Re 高、中剂量组  $\beta$ -catenin 蛋白表达降低( $P<0.01$ ),人参皂苷 Re 高剂量组 p-GSK-3 $\beta$  表达升高( $P<0.01$ ),见图 4、表 5。



注 CFs: 心肌成纤维细胞; $\beta$ -catenin: $\beta$ -连环蛋白;GSK-3 $\beta$ :糖原合成酶激酶-3;p-GSK-3 $\beta$ 磷酸化糖原合成酶激酶-3;A:正常对照组;B:模型对照组;C:西药对照组;D:人参皂苷 Re 高剂量组;E:人参皂苷 Re 中剂量组

图 4 各组 CFs 中  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白免疫印迹图

表 5 各组 CFs 中  $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、p-GSK-3 $\beta$  蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | n | $\beta$ -catenin           | GSK-3 $\beta$ | p-GSK-3 $\beta$           |
|--------------|---|----------------------------|---------------|---------------------------|
| 正常对照组        | 6 | 0.365±0.029                | 0.513±0.042   | 0.357±0.053               |
| 模型对照组        | 6 | 0.409±0.037 <sup>a</sup>   | 0.541±0.035   | 0.268±0.048 <sup>a</sup>  |
| 人参皂苷 Re 高剂量组 | 6 | 0.281±0.016 <sup>bcd</sup> | 0.612±0.110   | 0.369±0.049 <sup>cd</sup> |
| 人参皂苷 Re 中剂量组 | 6 | 0.301±0.021 <sup>bcd</sup> | 0.582±0.130   | 0.301±0.010 <sup>a</sup>  |
| 西药对照组        | 6 | 0.372±0.020 <sup>c</sup>   | 0.588±0.134   | 0.306±0.020               |

注 CFs: 心肌成纤维细胞; $\beta$ -catenin: $\beta$ -连环蛋白;GSK-3 $\beta$ :糖原合成酶激酶-3;p-GSK-3 $\beta$ 磷酸化糖原合成酶激酶-3;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与人参皂苷 Re 中剂量组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与西药对照组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$ ,<sup>f</sup> $P<0.01$

## 3 讨论

糖尿病患者心脏胶原交联多因 I、Ⅲ型胶原纤维增多引起,导致心室壁加厚、膨胀,呈现类似限制型心肌病样的改变,临床表现为舒张功能障碍的早期症状<sup>[13]</sup>。心脏长期处于高血糖状态触发了非酶促糖基化反应,可减少胶原糖基化的降解,该反应



生成的终产物在心内膜下逐步累积,死亡的心肌细胞则因而被替代,导致心肌细胞重构与功能改变。持续高血糖条件下受体 II 与表达异常的 TGF- $\beta$  结合,可产生纤维组织,促进胶原蛋白表达及组织型金属蛋白酶抑制剂的加速合成,从而阻止基质的降解<sup>[14]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路是生物进化中极为保守的通路,其膜受体的激活多数是因自分泌或旁分泌作用。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的蛋白质作用网络极其复杂,涵盖的众多蛋白质均能与靶细胞上的受体相互作用,进而联合控制基因的表达。心肌纤维化在心肌不可逆重塑与心功能失代偿转变的过程具有重要作用<sup>[15]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路以  $\beta$ -catenin 为中心,可通过激活转导通路下游基因等多种方式引发心肌纤维化<sup>[16]</sup>。

本研究发现,高糖刺激的 CFs 经人参皂苷 Re 干预后,细胞增殖速度减缓,并停滞于细胞 S 期,表明该组分可减少 CFs 数量,抑制 CFs 增殖。进一步研究发现,经人参皂苷 Re 干预后,高糖刺激的 CFs I 型和 III 型胶原的分泌量有所降低,表明人参皂苷 Re 还可抑制 CFs 胶原分泌与合成,继而延缓心室重构。高糖刺激的 CFs 经人参皂苷 Re 干预后, $\beta$ -catenin、TGF- $\beta_1$  表达升高,p-GSK-3 $\beta$  表达降低,提示高糖环境中,以  $\beta$ -catenin 和 TGF- $\beta_1$  为关键中心分子的 2 条通路可能存在某些相互协同作用。人参皂苷 Re 可通过降低 Wnt 信号转导通路中  $\beta$ -catenin 与 TGF- $\beta_1$  水平、上调异常表达的 p-GSK-3 $\beta$  水平,阻碍 Wnt/ $\beta$ -catenin 与 TGF- $\beta_1$  信号转导通路的异常激活。

人参皂苷是人参作用于心肌病的有效成分,近年来有关人参皂苷 Rb1、Rh2、Rg1、Rg3 及稀有皂苷 Rg5 对心肌病的药理作用研究报道较多<sup>[17-21]</sup>,可见人参作用于心肌病的机制并非某一单一成分。人参皂苷 Rg1 为人参有效成分,含量占比远超人参皂苷 Re,对其生物活性的研究也较为广泛。笔者曾观察人参皂苷 Rg1 对 CFs 的影响及作用机制<sup>[22]</sup>,通过比较 2 个实验结果可知,2 个成分对于抑制细胞增殖及 Wnt 通路的调控均有作用效果,但在不同实验中优势有所不同。人参皂苷 Re 在实验中的用量小于人参皂苷 Rg1;2 种成分均可抑制 TGF- $\beta_1$  的合成;人参皂苷 Re 对于抑制细胞增殖,蛋白表达作用的实验结果优于人参皂苷 Rg1;而人参皂苷 Rg1 减少 I 型与 III 型胶原分泌的作用强于人参皂苷 Re。表明 2 种成分在糖尿病心肌纤维化的不同方面发

挥作用,充分体现了人参多成分、多靶点、生物活性广泛、作用机制复杂的特点。

综上,人参皂苷 Re 可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路的异常表达,有效抑制 CFs 增殖,或可成为延缓糖尿病心肌病的有效策略,其作用机制值得深入研究。本研究结果可为人参作用机制的发掘和糖尿病心肌纤维化的防治提供参考。

**利益冲突** 除基金项目支持外,本文全体作者未接受过第三方的资助或服务,无个人或企业的经济利益

**作者贡献声明** 韩路拓:实施研究、起草文章;郭宏伟:对文章的知识性内容作批评性审阅、指导;任钧国:酝酿和设计实验;刘建勋:分析/解释数据;王攀:采集数据;杨佳妹:实施研究

## 参 考 文 献

- [1] 龙玉婷,孙志会,王志文,等. 人参大补元气的功效内涵浅析[J]. 中国中医急症, 2019, 28(9): 1679-1682. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2019.09.051.
- [2] 《图解经典》编辑部. 图解神农本草经白话版[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2017:49.
- [3] 吴斌,夏亮,冯方,等. 人参皂苷联合替莫唑胺对脑胶质瘤术后患者脑脊液 HGF、TNF- $\alpha$ 、IL-17 水平的影响[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(1): 50-52. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2017.01.014.
- [4] Kim H, Choi P, Kim T, et al. Ginsenosides Rk1 and Rg5 inhibit transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppress migration, invasion, anoikis resistance, and development of stem-like features in lung cancer[J]. J Ginseng Res, 2021, 45(1):134-148. DOI:10.1016/j.jgr.2020.02.005.
- [5] 孟红旭,姚明江,刘建勋. 人参皂苷 Re 对大鼠心室肌细胞钠、钾离子通道的影响[J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1147-1149. DOI:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.10.005.
- [6] 王全伟. 人参皂苷 Re 对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血损伤的保护作用及机制[D]. 长春:吉林大学,2020.
- [7] Einarson TR, Acs A, Ludwig C, et al. Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review[J]. Value Health, 2018, 21(7): 881-890. DOI: 10.1016/j.jval.2017.12.019.
- [8] Su D, Ju Y, Han W, et al. Tcf3-activated lncRNA Gas5 regulates newborn mouse cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(11): 4337-4346. DOI:10.1002/jcb.29630.
- [9] Murarka S, Movahed MR. Diabetic cardiomyopathy[J]. J Card Fail, 2010, 16(12): 971-979. DOI: 10.1016/j.cardfail.2010.07.249.
- [10] Habas R, He X. Activation of Rho and Rac by Wnt/frizzled signaling[J]. Methods Enzymol, 2006, 406: 500-511. DOI: 10.1016/S0076-6879(06)06038-1.
- [11] Hu J, Lu X, Zhang X, et al. Exogenous spermine attenuates myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy by inhibiting endoplasmic reticulum stress and the canonical Wnt signaling pathway[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(8): 1660-1670. DOI:10.1002/cbin.11360.
- [12] Sreejit P, Kumar S, Verma RS. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2008, 44(3/4): 45-50. DOI:





- 10.1007/s11626-007-9079-4.
- [13] 韦余. 冠心病合并 2 型糖尿病老年患者心肌纤维化及危险因素分析[D]. 重庆:重庆医科大学,2020.
- [14] Mizushige K, Yao L, Noma T, et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model[J]. *Circulation*, 2000, 101(8):899-907. DOI:10.1161/01.cir.101.8.899.
- [15] Wei WY, Zhao Q, Zhang WZ, et al. Secreted frizzled-related protein 2 prevents pressure-overload-induced cardiac hypertrophy by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 472(1/2):241-251. DOI:10.1007/s11010-020-03802-x.
- [16] Deb Arjun. Cell-cell interaction in the heart via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway after cardiac injury[J]. *Cardiovascular Research*, 2014, 102(2): 214-223. DOI: 10.1093/cvr/cvu054.
- [17] 李洋,姜永良,陆地,等. 人参皂苷 Rb1 改善自噬流抗离体大鼠心脏心肌缺血再灌注损伤[J]. *解剖学报*, 2020, 51(2): 265-272.
- [18] 邵悬,杨昌明,周芹,等. 人参皂苷 Rh2 对高脂饮食大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(17):2094-2096.
- [19] 黄茸茸,陆松侠,孙玲玲,等. 人参皂苷 Rg1 下调 NOX2-NLRP1 减轻 PC12 细胞缺氧再复氧损伤的作用[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(8): 1068-1075. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.08.007.
- [20] Sun GZ, Meng FJ, Cai HQ, et al. Ginsenoside Rg3 protects heart against isoproterenol-induced myocardial infarction by activating AMPK mediated autophagy. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*[J]. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2020, 10(2): 153-160. DOI: 10.21037/cdt.2020.01.0210.21037/cdt.2020.01.02.
- [21] Liu JI, Liu YH, Lin HQ, et al. The effect of ginsenoside Rg5, isolated from black ginseng, on heart failure in zebrafish based on untargeted metabolomics[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 76: 104325. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104325.
- [22] 韩路拓,任钧国,杨佳妹,等. 人参皂苷 Rg1 对高糖培养的心肌成纤维细胞 Wnt 信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(11): 758-762, 766, 插页 1. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2014.11.009.

