

## 稀有人参皂苷对特发性肺纤维化的影响

姚磊<sup>1,2</sup>, 屈琳琳<sup>1,2</sup>, 范代娣<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>西北大学化工学院, 西安 710069; <sup>2</sup>西北大学生物医药研究院, 西安 710069)

**摘要** 探究稀有人参皂苷是否可以缓解特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)。体内实验选用 C57BL/6 小鼠, 小鼠分为对照组、博来霉素(bleomycin, BLM)诱导 IPF 组、稀有人参皂苷 Rk1、Rk3、Rh4、Rg5 组, 除对照组外其余小鼠均腹腔注射 BLM 28 d 以构建 IPF 模型, 各治疗组同时分别灌胃给予人参皂苷 Rk1、Rk3、Rh4、Rg5, 实验结束后收集小鼠的肺脏组织, 通过苏木精-伊红染色法(HE)观察小鼠肺部的病理变化; 测量小鼠肺部组织羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量; 检测小鼠肺部组织 IPF 相关基因的表达。体外实验选用人胚肺成纤维细胞(MRC-5), 使用(TGF- $\beta$ 1)诱导 IPF 细胞模型, 通过细胞毒性实验、HYP 含量测定和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析 4 种皂苷对 IPF 相关基因表达的影响。4 种稀有人参皂苷均能有效缓解 IPF 引起的肺泡结构破坏等病理进程, 降低 HYP 含量, 下调 IPF 相关基因的表达, 表明稀有人参皂苷能够有效缓解 IPF。

**关键词** 肺纤维化; 稀有人参皂苷; MRC-5 细胞; 转化生长因子  $\beta$ 1; 博来霉素

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2023)05-0607-07

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 2023042002

**引用本文** 姚磊, 屈琳琳, 范代娣. 稀有人参皂苷对特发性肺纤维化的影响[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5): 607–613.

**Cite this article as:** YAO Lei, QU Linlin, FAN Daidi. Effects of rare ginsenoside on idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(5): 607–613.

## Effects of rare ginsenoside on idiopathic pulmonary fibrosis

YAO Lei<sup>1,2</sup>, QU Linlin<sup>1,2</sup>, FAN Daidi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069;

<sup>2</sup>Biotech & Biomed Research Institute, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract** To investigate whether rare ginsenosides could alleviate idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), C57BL/6 mice were randomly divided into control group, bleomycin (BLM)-induced IPF group, rare ginsenoside Rk1 group, rare ginsenoside Rk3 group, rare ginsenoside Rh4 group and rare ginsenoside Rg5 group. All mice except those in the control group were given bleomycin injection. The IPF model was established by BLM for 28 days. The treatment group was given ginsenoside intragastrically at the same time. After the experiment, the lung tissues of mice were collected and the pathological changes of the mice lungs were observed. The content of hydroxyproline (HYP) in mouse lung tissue was measured. The expression of IPF-related genes in mouse lung tissues was detected. In *in vitro* experiments, Medical Research Council cell strain-5 (MRC-5) was used to induce IPF cell model using transforming growth factor- $\beta$ 1 (10 ng/mL). The effects of four saponins on the expression of IPF-related genes were analyzed by MTT assay, HYP content determination and RT-qPCR. All four rare ginsenosides could effectively alleviate the pathological process such as alveolar structure destruction caused by IPF, reduce the content of HYP, and down-regulate the expression of IPF-related genes, indicating that rare ginsenosides can effectively alleviate IPF.

**Key words** pulmonary fibrosis; rare ginsenoside; MRC-5 cell; transforming growth factor  $\beta$ 1; bleomycin

**收稿日期** 2023-04-20 **\*通信作者** Tel: 029-88305118 E-mail: fandai@nwu.edu.cn

**基金项目** 国家重点研发计划资助项目(No. 2021YFC2101500); 陕西省重点研发计划资助项目(No. 2022ZDLSF05-12)

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2021YFC2101500), and Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2022ZDLSF05-12)

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性进展的纤维化间质性肺炎,其特征是肺功能下降<sup>[1]</sup>,但是因其病因不明,没有较好的治疗方法,导致患者的病死率较高,平均生存期仅有2~3年<sup>[2]</sup>。此外,在过去的几十年里,这种疾病的发病率逐年增加<sup>[3]</sup>,在治疗方法上,临床主要使用的是激素类药物、免疫抑制剂和抗氧化类药物治疗IPF<sup>[4]</sup>,但是效果并不明显,且长期使用药物的不良反应大<sup>[5]</sup>。而对于终末期的IPF患者,最有效的方法是肺移植<sup>[6]</sup>,但由于供体不足和价格昂贵,在临床应用方面受到了很大的限制。因此,寻找安全高效缓解IPF药物迫在眉睫。

在中药中,人参(*Panax ginseng*)是一种性能优良的稀有药材。它具有疗效高、性质温和、不良反应小、安全性高等特点,在医疗保健等方面得到了广泛的青睐<sup>[7]</sup>。人参在传统中草药体系中有极大的应用价值<sup>[8]</sup>。多项研究证实,人参可以治疗多种疾病,如糖尿病<sup>[9]</sup>、神经性疾病<sup>[10-11]</sup>、肠道溃疡<sup>[12]</sup>、炎症<sup>[13]</sup>以及各种肿瘤<sup>[14-15]</sup>。目前已分离的人参主要活性成分有人参皂苷、多肽、多糖、黄酮类化合物等<sup>[16-17]</sup>,其中人参皂苷含量丰富,活性高,受到广泛关注。研究证实,人参总皂苷能够调控TGF- $\beta$ 1/Smad信号通路和MMP途径改善博来霉素诱导的IPF模型,其中,人参总皂苷通过下调金属蛋白酶-1、MMP-2、MMP-9、Smad2、Smad3以及TGF- $\beta$ 1,上调Smad7的表达改善IPF<sup>[18]</sup>;此外,人参皂苷Rg1可以通过抑制TGF- $\beta$ 1/Smad途径缓解烟雾诱导的气道纤维化<sup>[19]</sup>;人参皂苷Rg3可以通过抑制HIF-1 $\alpha$ 的核定位来缓解IPF导致的肺功能衰退<sup>[20]</sup>。

因此,本研究分别通过体内外IPF模型,通过检测羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量及纤维化相关基因表达量探究稀有人参皂苷对IPF的影响。

## 1 材料

### 1.1 试剂

注射用博来霉素(bleomycin, BLM, 批号:H20055883,瀚辉制药有限公司);HYP试剂盒(货号:BC0255,北京索莱宝科技有限公司);转化生长因子(transforming growth factor, TGF- $\beta$ 1, 美国

Pepro Tech公司);Trizol、第一链反转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司);氯仿、异丙醇(阿拉丁控股集团有限公司);qPCR试剂盒(瑞士Roche公司);稀有人参皂苷Rk1、Rk3、Rh4、Rg5(纯度 $\geq 98\%$ ,通过HPLC与标准品进行对比)由西北大学生物医药研究院提供。

### 1.2 仪器

TS100倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);TGL16-WS台式高速离心机(美国贝克曼公司);PS100超声波清洗机(宁波恒大设备公司);XS2酶标仪(美国BioTek公司);TEC2800石蜡包埋机(上海精密仪器仪表公司);YD-1508A组织切片机(北京佳源兴业科技有限公司)。

### 1.3 细胞与动物

人胚肺成纤维细胞MRC-5(上海富恒生物科技有限公司);SPF级C57BL/6小鼠,雄性,周龄为6~8周,体重( $20 \pm 2$ )g,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。本课题中动物实验严格按照《中华人民共和国动物伦理指南》操作,获西北大学动物伦理委员会批准(批准号:NWU-AWC-20220903M)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养与IPF模型建立

MRC-5细胞在MEM培养基中培养,二氧化碳培养箱设置为37℃、5% CO<sub>2</sub>和95%湿度,每2天传代1次,传代比例为1:2。

使用转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1, 10 ng/mL)处理MRC-5细胞24 h,诱导建立特发性肺纤维化模型。

### 2.2 MTT法检测细胞毒性

将细胞收集后使用血细胞计数板进行计数,调整细胞浓度至每毫升 $1 \times 10^5$ 个细胞,将调整好浓度的细胞悬液均匀铺在96孔板中,布板结束后,放入37℃培养箱培养24 h后,将稀有人参皂苷单体粉末进行溶解、稀释,加入96孔板中继续培养24 h。去除培养液,随后向每孔加入MTT溶液150  $\mu$ L,放入培养箱孵育2~4 h,孵育结束后,去除MTT溶液,随后向每孔加入二甲基亚砜(DMSO)溶液150  $\mu$ L,使用酶标仪测量490 nm的波长下的吸

收度。

### 2.3 IPF小鼠模型的建立及分组处理

100只SPF级雄性C57BL/6小鼠随机分组,每组10只。分别为对照组、BLM组(35 IU/g)、低剂量Rk1(60 mg/kg)+BLM组、高剂量Rk1(120 mg/kg)+BLM组、低剂量Rk3(60 mg/kg)+BLM组、高剂量Rk3(120 mg/kg)+BLM组、低剂量Rh4(60 mg/kg)+BLM组、高剂量Rh4(120 mg/kg)+BLM组、低剂量Rg5(60 mg/kg)+BLM组、高剂量Rg5(120 mg/kg)+BLM组。除对照组外其余小鼠均腹腔注射BLM(35 IU/g)28 d以构建IPF模型<sup>[21]</sup>。对照组采用同等剂量生理盐水腹腔注射。造模开始第2天治疗组通过灌胃的方式给予稀有人参皂苷,对照组和模型组分别灌胃生理盐水。连续灌胃给药28 d后处死小鼠,取小鼠肺脏组织,经液氮快速冷冻后移至-80℃超低温冰箱保存备用。

### 2.4 小鼠肺组织病理学检查

将动物实验小鼠的肺脏组织解剖后放入多聚甲醛中进行固定,48 h后使用不同浓度的乙醇处理,去除肺脏中的水分。将组织中的水分去除干净后,利用二甲苯溶液处理组织,使其浸透过夜。将已经泡到透明的组织浸于提前预热融化的石蜡中,进行浸蜡处理,随后放入包埋石蜡中,进行包埋处理,包埋完成后即进行切片。

对切片组织使用二甲苯溶液进行脱蜡处理,脱蜡结束后用清水冲洗,随后利用苏木精染色试剂进行染色处理,染色时长为10 min。结束染色后,再次利用清水进行冲洗,冲洗后进行脱水处理。脱水处理后,使用伊红染色液对切片进行染色,染色时长为5 min。再次脱水,透明,封片。放入通风橱进行风干,待风干完全后即可于光学显微镜下进行观察。

### 2.5 HYP含量测定

对于动物组织样本,称取样本0.2 g于玻璃管,将组织尽量剪碎以便消化,加入提取液2 mL;对于细胞样本,计数后收集细胞 $5 \times 10^6$ 个,加入提取液1 mL。随后将其放入沸水中,消化至没有可见大的团块,冷却后用NaOH(10 mol/L)调节pH至6~8,使用蒸馏水定容至4 mL。最后放入离心机(4℃、12 000 r/min),离心20 min,取上清液待测。依照说明书分别稀释标准品与样品,利用酶标仪测量490 nm下的吸收度。

### 2.6 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

对于细胞样本,向处理后的MRC-5细胞每孔加入Trizol溶液1 mL,在冰上裂解5~10 min,随后转移至无酶EP管;对于组织样本,取小鼠肺部组织50 mg于研磨管中,加入研磨珠3~5颗,向管中加入Trizol溶液1 mL放入研磨机中。随后放入25℃水浴锅中进行水浴5~10 min,向管中加入氯仿200  $\mu$ L,混匀后再次25℃水浴10 min,水浴后放入离心机(4℃、12 000 r/min)离心15 min,收集上层液相350  $\mu$ L至新的EP管中,加入异丙醇500  $\mu$ L,混匀后25℃水浴10 min,随后放入离心机(4℃、12 000 r/min)离心15 min,弃去上清液,加入提前用无菌无酶水配置的75%乙醇,混匀后25℃水浴5 min,放入离心机(4℃、7 000 r/min)离心5 min,弃去上清液,风干后加无菌无酶水溶解。随后使用逆转录试剂盒将提出来的RNA反转录为cDNA。使用cDNA进行RT-qPCR实验,所得到的C<sub>q</sub>用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算,选用GAPDH作为内参,目标基因引物和内参基因引物序列如表1所述。

### 2.7 统计学分析

使用GraphPad Prism 9.0和IBM SPSS Statistics 21.0进行数据处理。所有实验独立重复3次,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。 $P < 0.05$ 即认为结果具有显著性,有统计学意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 稀有人参皂苷细胞模型浓度筛选

通过二苯基四氮唑溴盐比色法分析4种稀有人参皂苷对MRC-5的细胞毒性,结果见图1。由图1可知,当人参皂苷Rk1、Rk3、Rh4和Rg5浓度小于0.5  $\mu$ mol/L时,MRC-5细胞的活力大于90%,因此后续细胞实验人参皂苷使用浓度为0.5  $\mu$ mol/L。

### 3.2 对BLM诱导的IPF小鼠肺组织病理变化的影响

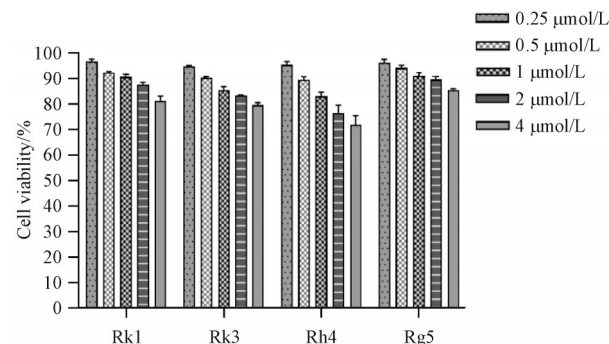
小鼠肺组织切片染色结果如图2所示,对照组小鼠的肺脏组织支气管结构无明显异常,肺泡壁由单层上皮细胞组成,结构清晰,肺泡壁没有出现增厚,肺泡腔内无明显渗出物,也没有明显的炎症细胞浸润;肺间质包括肺内结缔组织及血管等均无明显异常;与对照组相比,BLM组小鼠肺间质较多结缔组织增生,肺泡壁出现明显增厚现象,肺泡结构不清,伴有粒细胞浸润;可见血管周围淋巴细



**Table 1** RT-qPCR primer sequences

Protein	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
α-SMA (human)	CTATGAGGGCTATGCCCTGCC	GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA
α-SMA (mouse)	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
COL1A1 (human)	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGCACAAAC
COL1A1 (mouse)	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
Fibronectin (human)	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
Fibronectin (mouse)	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
IL-6 (human)	ACTCACCTTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL-6 (mouse)	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF-α (mouse)	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
TNF-α (human)	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGACTAGATGAG
plasminogen (mouse)	TGCAGTGGAGAAAAGTATGAGGG	AGGGATGTATCCATGAGCATGT
plasminogen (human)	TGTATCTCTCAGAGTGCAAGACT	CTGCCGATCGTTGTCTGGA
Factor X (mouse)	GAGGGACACCTACGACTATGAT	GCCCAGTCTTTCTGAGGCA
Factor X (human)	TGAGAGGGGCGACAACAAC	TCAGAATGGTTCCACCACAGA
GAPDH (human)	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
GAPDH (mouse)	AGGTCGGTCTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

胞灶性浸润;支气管上皮细胞变性。通过灌胃给予稀有人参皂苷后,可以发现IPF小鼠的肺泡壁破坏有所改善,淋巴细胞浸润减少,巨噬细胞与粒细胞数量显著减少。其中Rh4的效果最为显著。

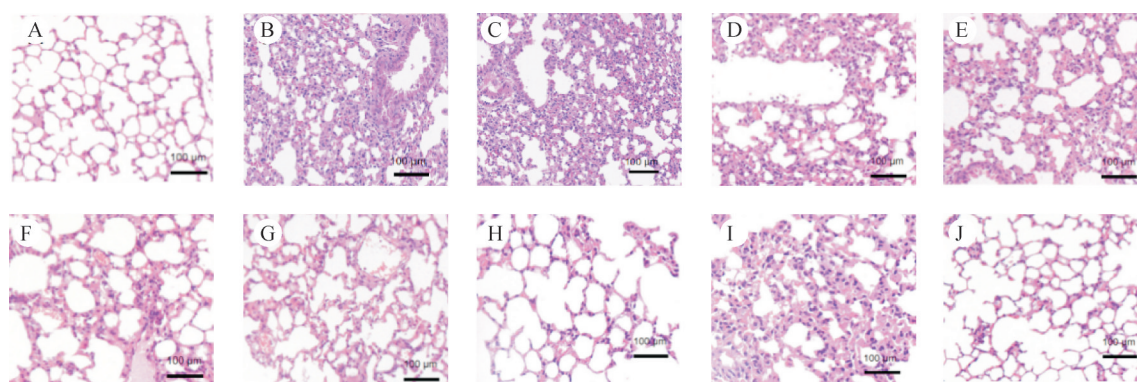
**Figure 1** Effects of concentrations of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on the viability of MRC-5 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 对肺纤维化模型中HYP含量的影响

小鼠肺组织HYP含量结果如图3所示,BLM组与对照组相比,BLM诱导的小鼠肺组织中的HYP含量显著提高,给予人参皂苷后,HYP含量显著降低。其中,Rh4降低IPF模型中的HYP含量的效果最明显。

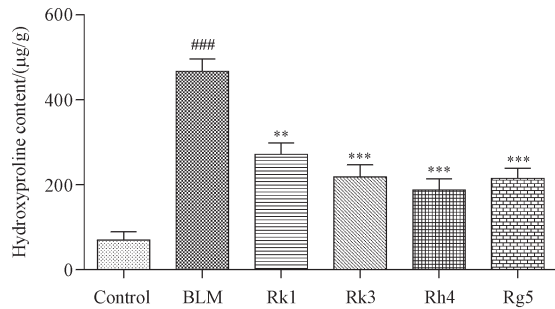
### 3.4 对IPF纤维化相关基因表达的影响

使用TGF-β1诱导MRC-5构建细胞IPF模型。MRC-5细胞中IPF相关基因表达量如图4。由图4可知,TGF-β1组与对照组相比,TGF-β1诱导的MRC-5细胞中COL1A1、纤维连接蛋白与α-SMA的mRNA表达量明显增加;Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与TGF-β1组相比,4种人参皂苷均可以降低MRC-5细胞中COL1A1、纤维连接蛋白与α-SMA的mRNA

**Figure 2** Lung sections of mice at day 28 after bleomycin (BLM) induction (HE staining)

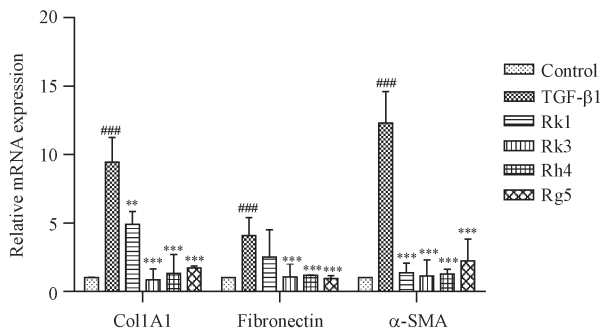
A: Control group; B: Model (BLM); C: Rk1 (60 mg/kg)+BLM; D: Rk1 (120 mg/kg)+BLM; E: Rk3 (60 mg/kg)+BLM; F: Rk3 (120 mg/kg)+BLM; G: Rh4 (60 mg/kg)+BLM; H: Rh4 (120 mg/kg)+BLM; I: Rg5 (60 mg/kg)+BLM; J: Rg5 (120 mg/kg)+BLM

表达量;其中Rh4组的效果最为显著。



**Figure 3** Effects of different concentrations of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on HYP content in lung tissue of IPF mice after BLM modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

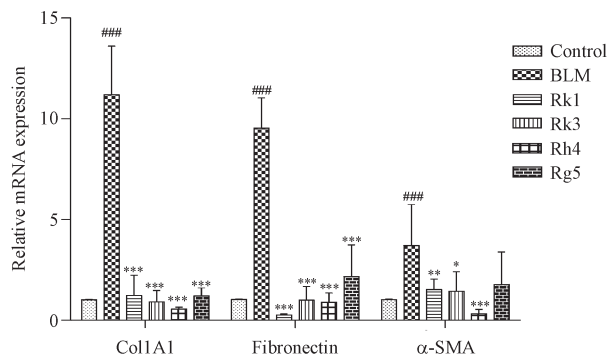
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs BLM group



**Figure 4** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on the expression level of fibrosis-related genes in IPF of MRC-5 after TGF-β1 modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β1 group

使用腹腔注射BLM构建小鼠IPF模型,小鼠肺组织中IPF相关基因表达量如图5。由图5可知, BLM组与对照组相比, BLM诱导的IPF小鼠肺部组织中COL1A1、纤维连接蛋白与α-SMA的mRNA表



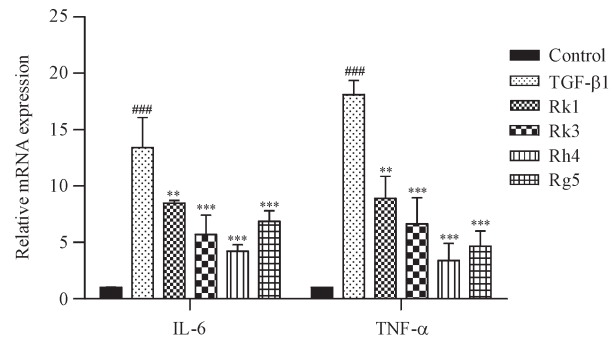
**Figure 5** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on IPF-related mRNA expression in lung tissue of mice after BLM modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs BLM group

达量增加; Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与BLM组相比, 加入人参皂苷后显著降低了COL1A1、纤维连接蛋白与α-SMA的mRNA表达量。其中Rh4组的效果最为显著。

### 3.5 对IPF炎症相关基因表达的影响

使用TGF-β1诱导MRC-5构建细胞IPF模型。MRC-5细胞中IPF的炎症相关基因表达量如图6。由图6可知, TGF-β1组与对照组相比, TGF-β1诱导的MRC-5细胞中IL-6和TNF-α的mRNA表达量明显增加; Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与TGF-β1组相比, 4种人参皂苷均可以降低MRC-5细胞中IL-6和TNF-α的mRNA表达量; 其中Rh4组的效果最为显著。



**Figure 6** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on expression levels of inflammatory genes in IPF in MRC-5 modeled by TGF-β1 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

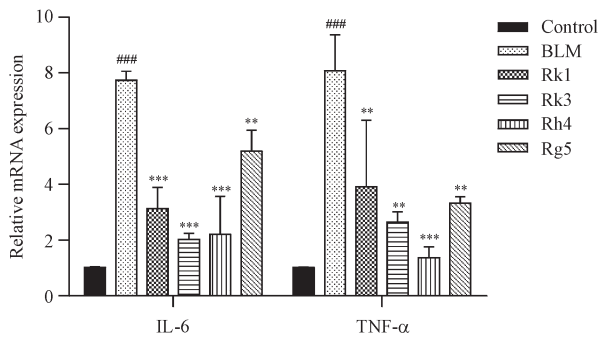
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β1 group

使用腹腔注射BLM构建小鼠IPF模型,小鼠肺组织中IPF的炎症相关基因表达量如图7。由图7可知, BLM组与对照组相比, BLM诱导的IPF小鼠肺部组织中IL-6和TNF-α的mRNA表达量增加; Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与BLM组相比, 加入人参皂苷后显著降低了IL-6和TNF-α的mRNA表达量。

### 3.6 对IPF凝血级联相关基因表达的影响

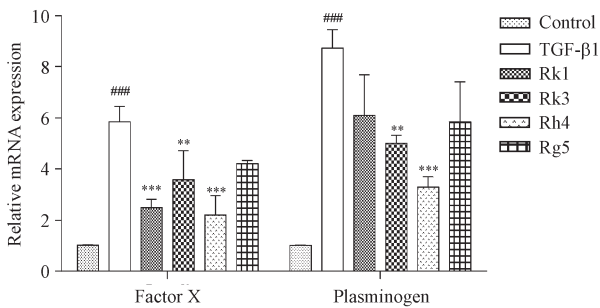
使用TGF-β1诱导MRC-5构建细胞IPF模型。MRC-5细胞中IPF的凝血级联相关基因表达量如图8。由图8可知, TGF-β1组与对照组相比, TGF-β1诱导的MRC-5细胞中Factor X和plasminogen的mRNA表达量明显增加; Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与TGF-β1组相比, 4种人参皂苷均可以降低MRC-5细胞中Factor X和plasminogen的mRNA表达量; 其中Rh4组的效果最为显著。

使用腹腔注射BLM构建小鼠IPF模型,小鼠肺



**Figure 7** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on expression levels of inflammatory genes in IPF in MRC-5 modeled by BLM ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

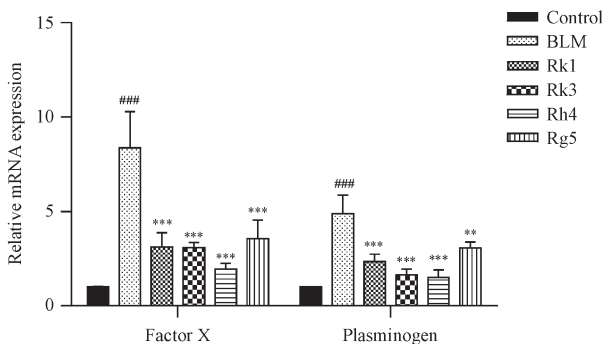
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs BLM group



**Figure 8** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on coagulation cascade mRNA expression in lung tissue of mice after TGF-β1 modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs TGF-β1 group

组织中IPF的凝血级联相关基因表达量如图9。由图9可知, BLM组与对照组相比, BLM诱导的IPF小鼠肺部组织中Factor X和plasminogen的mRNA表达量增加; Rk1, Rk3, Rh4, Rg5组与BLM组相比, 加入人参皂苷后显著降低了Factor X和plasminogen的mRNA表达量。



**Figure 9** Effect of rare ginsenosides (Rk1, Rk3, Rh4, Rg5) on coagulation cascade mRNA expression in lung tissue of mice after BLM modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### $P < 0.001$  vs control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs BLM group

#### 4 讨论与结论

本研究的IPF模型采用腹腔注射BLM(35 IU/g) 28 d<sup>[21]</sup>, 建模完成后, 通过HE染色可知, BLM诱导的IPF小鼠肺部组织的肺泡壁增厚, 伴有粒细胞浸润, 以及淋巴细胞灶性浸润等, 这与IPF的病理进程基本一致, 表明IPF模型建立成功, 然而加入稀有人参皂苷后, IPF引起的肺泡结构破坏等病理进程得到了缓解。

HYP作为胶原纤维的标志性水解产物, HYP的含量可以直接反应胶原的沉积情况, 胶原蛋白的过度沉积是纤维化疾病的主要特征。因为HYP是胶原所特有的氨基酸, 约占胶原氨基酸总量的13%, 利用生物化学法(如比色法和高效液相色谱法)测定组织中HYP的总含量已经成为纤维化严重程度评价最常用的方法, 该方法在2017年被美国胸科协会确立为肺纤维化临床前评价的重要标准<sup>[22]</sup>。本研究通过测定发现, TGF-β1组的MRC-5细胞与BLM组的小鼠肺部组织中HYP含量显著增加, 加入稀有人参皂苷后, HYP含量显著降低。

研究发现, 凝血级联(coagulation cascade)指的是在受损的血管处产生纤维蛋白进而防止失血过度<sup>[23]</sup>。在伤口愈合的初期, 内皮与上皮损伤均可以激活凝血级联反应, 从而产生凝血酶, 紧接着凝血酶使血清中的纤维蛋白原转变为纤维蛋白<sup>[24]</sup>。研究证明, 凝血级联与IPF患者肺部组织中的纤维蛋白沉积关系密切, 在IPF患者肺部组织中发现外源性凝血级联和纤溶酶的几种酶原(Factor X、plasminogen)被激活<sup>[25]</sup>。研究表明, IPF患者的肺泡灌洗液中促凝血因子增加, 导致ECM沉降减少<sup>[26]</sup>; 同时蛋白酶激活受体诱导成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 从而加剧了IPF。本研究发现TGF-β1诱导的MRC-5细胞与BLM诱导的小鼠肺部组织中纤维化相关蛋白基因(如: COL1A1、α-SMA和纤维连接蛋白)、炎症相关基因(如: IL-6和TNF-α)和凝血级联相关基因(如: Factor X和plasminogen)的表达量均有明显增加, 加入稀有人参皂苷后, 纤维连接蛋白、COL1A1、α-SMA、IL-6、TNF-α、Factor X和plasminogen的基因表达量均有明显下降。

综上所述, 稀有人参皂苷(Rk1、Rk3、Rh4、Rg5)均可以通过降低HYP含量, 下调纤维连接蛋白、COL1A1、α-SMA、IL-6、TNF-α、Factor X和plas-

minogen 的基因表达缓解 IPF。其中,稀有人参皂苷 Rh4 的效果最为显著。本研究为稀有人参皂苷缓解 IPF 进程提供了理论依据,并为今后的临床应用提供了需要改进的方向和数据支持。

## References

- [1] Xie WN, Ding Q, Sun J, *et al.* Protective effects of Baibu Tang on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(4): 483-489.
- [2] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Med*, 2013, **64**: 265-276.
- [3] Miao Y, Wang YH, Bi Z, *et al.* Antifibrotic mechanism of avitinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *BMC Pulm Med*, 2023, **23**(1): 94.
- [4] Xiang J, Yu P, Li MD, *et al.* Protective effects of stemona alkaloids on mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(1): 76-81.
- [5] Prasse A, Probst C, Bargagli E, *et al.* Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **179**(8): 717-723.
- [6] Wang J, Xu LZ, Xiang Z, *et al.* Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206<sup>+</sup> M2-like macrophage polarization[J]. *Cell Death Dis*, 2020, **11**(2): 136.
- [7] Zhang SN, Li LQ, Zhang HC, *et al.* Clinical study on treating idiopathic pulmonary fibrosis with TCM method of invigorating Qi, moisturizing the lung and removing blood stasis and toxic substance[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 1999, **22**(3): 57-60.
- [8] Kang A, Zhang SJ, Shan JJ, *et al.* Pharmacokinetics of ginsenoside Rb<sub>1</sub> in lincomycin-induced gut microbiota dysbiosis rats [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(2): 182-187.
- [9] Wu W, Jiao CX, Li H, *et al.* LC-MS based metabolic and metabolomic studies of *Panax ginseng*[J]. *Phytochem Anal*, 2018, **29**(4): 331-340.
- [10] Liang Y, Zhao S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis[J]. *Plant Biol*, 2008, **10**(4): 415-421.
- [11] Zhu MR, Yang CL. Blue fluorescent emitters: design tactics and applications in organic light-emitting diodes[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(12): 4963-4976.
- [12] Wang CZ, Aung HH, Ni M, *et al.* Red American ginseng: ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed *Panax quinquefolius* roots[J]. *Planta Med*, 2007, **73**(7): 669-674.
- [13] Jin X, Zhu LY, Shen H, *et al.* Influence of sulphur-fumigation on the quality of white ginseng: a quantitative evaluation of major ginsenosides by high performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2012, **135**(3): 1141-1147.
- [14] Pan WL, Xue BL, Yang CL, *et al.* Biopharmaceutical characters and bioavailability improving strategies of ginsenosides[J]. *Fito-terapia*, 2018, **129**: 272-282.
- [15] Yu T, Rhee MH, Lee J, *et al.* Ginsenoside re from Korean red ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) attenuates inflammatory symptoms of gastritis, hepatitis and arthritis[J]. *Am J Chin Med*, 2016, **44**(3): 595-615.
- [16] Leung KW, Pon YL, Wong RN, *et al.* Ginsenoside-Rg1 induces vascular endothelial growth factor expression through the glucocorticoid receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and beta-catenin/T-cell factor-dependent pathway in human endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(47): 36280-36288.
- [17] Bai X, Fu RZ, Duan ZG, *et al.* Ginsenoside Rh4 alleviates antibiotic-induced intestinal inflammation by regulating the TLR4-MyD88-MAPK pathway and gut microbiota composition [J]. *Food Funct*, 2021, **12**(7): 2874-2885.
- [18] Guan SB, Yu P, Cao JH, *et al.* Ginsenoside Rg1 protects against cigarette smoke-induced airway remodeling by suppressing the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, **12**(2): 493-506.
- [19] Zeng DF, Wang JL, Kong PY, *et al.* Ginsenoside Rg3 inhibits HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in patient with acute leukemia via inhibiting the activation of PI3K/Akt and ERK1/2 pathways [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, **7**(5): 2172-2178.
- [20] Liu Q, Kou JP, Yu BY. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF- $\kappa$ B activation[J]. *Neurochem Int*, 2011, **58**(1): 119-125.
- [21] Guo CY, Zhang C, Xia ZM, *et al.* Nano-designed CO donor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via macrophage manipulation[J]. *J Control Release*, 2022, **341**: 566-577.
- [22] Ciccolo JT, Carr LJ, Krupel KL, *et al.* The role of resistance training in the prevention and treatment of chronic disease[J]. *Am J Lifestyle Med*, 2010, **4**(4): 293-308.
- [23] Yang K, Palm J, König J, *et al.* Matrix-Metallo-Proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury[J]. *Int J Radiat Biol*, 2007, **83**(10): 665-676.
- [24] José RJ, Williams AE, Chambers RC. Proteinase-activated receptors in fibroproliferative lung disease[J]. *Thorax*, 2014, **69**(2): 190-192.
- [25] Betensley A, Sharif R, Karamichos D. A systematic review of the role of dysfunctional wound healing in the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Med*, 2016, **6**(1): 2.
- [26] Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **157**(4 Pt 1): 1063-1072.