

## 人参皂苷 Rg1 调节 NF- $\kappa$ B/VCAM-1 减轻胆汁淤积性肝纤维化

罗 飘<sup>1,2</sup>, 楚世峰<sup>2</sup>, 彭 也<sup>1,2</sup>, 张 钊<sup>2</sup>, 陈乃宏<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 神经科学中心, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本文通过胆总管结扎 (bile duct ligation, BDL) 建立胆汁淤积性肝纤维化模型小鼠, 研究人参皂苷 Rg1 对胆汁淤积诱发的肝纤维化的治疗作用, 并探讨潜在的作用机制。本文中所有动物实验都获得单位伦理学委员会批准。检测血清生化指标和病理切片评估小鼠肝功能、肝损伤和纤维化; 免疫组织化学和 qPCR 等方法检测血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 在 BDL 诱导的肝纤维化过程中的表达变化规律; 为探讨 Rg1 治疗作用的相关机制, 检测转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 及炎症因子。结果显示, VCAM-1 表达先上调, 至第 7 天达到高峰, 随后表达有所下降, 但与假手术组相比仍有高表达。与模型组相比, 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Rg1 治疗可降低血清中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 和总胆红素 (T.Bili) 水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 减轻肝功能损害, 减缓 BDL 诱导的肝纤维化进程, 显著地下调 VCAM-1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 抑制炎症反应。此外, Rg1 可明显降低细胞核内 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。本研究表明 VCAM-1 在 BDL 诱导的肝纤维化过程中的表达呈动态变化, Rg1 通过调节 NF- $\kappa$ B/VCAM-1 信号途径抑制炎症损伤, 减轻胆汁淤积性肝纤维化, 为将来 Rg1 开发成有效的肝纤维化治疗药物提供实验基础。

**关键词:** 人参皂苷 Rg1; 胆汁淤积; 肝纤维化; 血管细胞黏附分子-1; 肝炎

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0321-08

## Rg1 alleviates the cholestatic liver fibrosis through regulation of NF- $\kappa$ B/VCAM-1

LUO Piao<sup>1,2</sup>, CHU Shi-feng<sup>2</sup>, PENG Ye<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhao<sup>2</sup>, CHEN Nai-hong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Neuroscience Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** A mouse model of cholestatic liver fibrosis was established by bile duct ligation (BDL) method. The effect of ginsenoside Rg1 in the disease progress and the mechanism of cholestatic liver fibrosis are investigated in this mouse model. All animal experiments in this paper have been approved by the Unit Ethics Committee. Analysis of serum biochemical indicators and pathological sections assessed liver function, liver damage and fibrosis in mice. Immunohistochemistry and Western blot assays were used to detect vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in BDL-induced mice. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and inflammatory factors were detected to investigate related mechanism of Rg1. The results showed that expression of VCAM-1 was up-regulated and peaked at 7 days, followed by decreased expression, but still efficiently expressed compared to the sham-operated group. Compared with the model group, 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Rg1 treatment reduced serum aspartate transaminase

收稿日期: 2018-08-02; 修回日期: 2018-09-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81730096, 81603316); 湖南省教育厅高校科研经费开放基金项目 (15K091); 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心开放基金资助项目 (BG201701).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165177, E-mail: chennh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0699

(AST), alanine transaminase (ALT) and total bilirubin (T.Bili) levels ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) and liver function damage, alleviated BDL-induced liver fibrosis, significantly down-regulated the expression of VCAM-1 ( $P < 0.05$ ), and inhibited the inflammatory response. In addition, Rg1 significantly reduced NF- $\kappa$ B p65 level in the cellular nucleus ( $P < 0.05$ ). This study demonstrates that VCAM-1 is dynamically altered during BDL-induced liver fibrosis. Rg1 could dampen inflammation and alleviate cholestatic liver fibrosis *via* regulation of the NF- $\kappa$ B/VCAM-1 pathway. The results provide an experimental basis for Rg1 application for treating liver fibrosis.

**Key words:** ginsenoside Rg1; cholestasis; liver fibrosis; vascular cell adhesion molecule 1; hepatitis

肝纤维化是一种严重影响人们生活质量的疾病,是肝硬化和肝癌早期的重要病理特征<sup>[1]</sup>。肝纤维化因其发病率高、治愈率低和致死率高日益受到重视<sup>[1-3]</sup>。肝纤维化主要由肝病毒感染、酗酒、胆汁淤积和代谢紊乱等因素引发的慢性病<sup>[1,4]</sup>。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与降解失衡,导致ECM过度沉积是引发肝纤维化主要的原因。肝星形细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的激活在肝纤维化中发挥了关键性作用<sup>[5]</sup>。目前,无有效可逆转肝纤维化的药物。

人参皂苷 Rg1 是一种四环三萜类皂苷,许多中草药含有 Rg1。药理学研究表明, Rg1 具有抗氧化、抗凋亡、抗炎、抗肿瘤和抗疲劳等作用<sup>[6,7]</sup>。人参皂苷 Rg1 在多种肝脏疾病中具有广泛的药理作用<sup>[8]</sup>。先前的研究表明, Rg1 对脂肪肝、酒精肝炎和药物性肝损伤具有强效作用<sup>[8-12]</sup>。Rg1 可介导核因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 信号通路抵抗酒精等因素引发的氧化应激。另外, Rg1 通过其他多种途径抵抗四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 等因素诱发的肝炎和肝纤维化<sup>[13-17]</sup>。但是, Rg1 对胆汁淤积诱导的肝纤维化的作用尚未见报道。

本研究采用胆总管结扎 (BDL) 的方法制备胆汁淤积性肝纤维化模型<sup>[18]</sup>,在此基础上,通过灌胃给予人参皂苷 Rg1 的方法评价其对 BDL 诱导的肝纤维化的治疗作用,同时观察 Rg1 在此模型中对 VCAM-1 的表达影响,进一步探究 VCAM-1 在此模型肝纤维化过程中表达变化规律,并探讨 Rg1 对肝纤维化治疗相关的作用机制,为将 Rg1 开发成有效的肝纤维化治疗药物提供理论依据。

## 材料与方法

**动物** 雄性 C57 BL/6J 小鼠 (8 周, 体重 22~24 g), 购自北京斯贝福生物技术有限公司 [清洁级, 合格证号: SCXK (京) 2016-0002], 饲养于中国医学科学院药物研究所动物房。所有动物实验都获得单位伦理学委员会批准。实验动物在明暗交替 (12 h: 12 h) 的清洁级动物房中饲养, 自由进食饮水, 预适应环境 7 天。

**药品与试剂** 人参皂苷 Rg1 购自云南北极生生物科

技有限公司, 纯度 > 98%; 异氟烷 (瑞沃德实验技术有限公司); DAPI、AlexaFluor 546 标记驴抗兔抗体 (Life Technology 公司); NF- $\kappa$ B p65 抗体、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 抗体、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抗体、VCAM-1 抗体、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 抗体和  $\alpha$  平滑肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (Abcam 公司); 谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 试剂盒、总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 试剂盒和总胆红素 (total bilirubin, T.Bili) 试剂盒 (中生北控生物科技有限公司); P1200 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒、RIPA 裂解液、ECL 超敏发光液 (北京普利莱基因技术有限公司); 其他相关试剂购自北京化工厂。

**胆总管结扎模型的建立** 将小鼠分成两批进行实验: 第 1 批进行胆总管双结扎, 随机分为假手术组、BDL-1d 组、BDL-3d 组、BDL-7d 组和 BDL-14d 组 (分别在胆总管双结扎后的第 1、3、7 和 14 天进行取材), 经过禁食不禁水 12 h。采用异氟烷吸入性麻醉后, 将小鼠仰卧于手术台上, 头部放置通有异氟烷的小鼠面罩, 以便手术中持续麻醉小鼠, 医用胶条固定其四肢, 75% 酒精消毒。在剑突处下方正中切口, 长约 1.5 cm 左右, 打开腹腔后找到胆总管, 过程中注意避免伤及肝脏和胰腺等, 游离出胆总管后, 用手术缝合线在近十二指肠端和靠近肝脏端双重结扎, 然后依层复位, 缝合手术切口, 碘酊消毒后常规饲养。假手术组不进行结扎, 其余操作同胆总管双结扎的模型组。手术后先将小鼠放置于温控毛毯上, 待小鼠苏醒。第 2 批小鼠也随机分为假手术组、BDL-14d 组和 Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗组。小鼠经过胆总管结扎后, 1 天 1 次进行灌胃给药。假手术组和 BDL-14d 组以同样的方式给予生理盐水, 治疗组每天通过灌胃给药方式给予 Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>), 每天观察小鼠状态, 连续给药 14 天, 禁食不禁水 12 h 后进行取材。

**血清生化指标检测** 将血浆室温静置 2 h 后进行

离心, 常规分离血清, 利用全自动生化分析仪测定小鼠血清中 ALT、AST、TBA 和 T.Bili 含量。

**肝脏病理切片** 小鼠麻醉后固定, 用常规浓度磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 经心脏灌流, 至肝脏白色, 换 4% 多聚甲醛灌流 5 min, 取小鼠肝脏固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上, 石蜡切片脱蜡水化, 进行苏木素-伊红染色 (苏木素染细胞核, 伊红染细胞质), 脱水封片, 显微镜镜检, 图像采集分析。

**Sirius red 染色** 石蜡切片脱蜡至水。天狼猩红染色液染色: 切片入饱和苦味酸天狼猩红染色液内染色 8 min。漂洗: 切片入无水酒精漂洗数分钟, 显微镜下观察满意为止。封片: 切片于 60 °C 烤箱烤干后于二甲苯透明 5 min, 中性树脂胶封片。显微镜镜检, 图像采集分析。

**Masson 染色** 石蜡切片脱蜡至水, 苏木素染细胞核, 丽春红染色, 磷钼酸处理, 苯胺蓝染色, 分化, 脱水中性树脂胶封片, 显微镜镜检, 图像采集分析。

**免疫组化** 检测肝脏中 VCAM-1 表达情况。主要的操作步骤: 石蜡切片经二甲苯和酒精梯度脱蜡, 抗原修复, 透化打孔 (0.5% Triton X-100 室温孵育 10 min), 灭活 10 min (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 5% BSA 室温封闭 45 min, 将 VCAM-1 抗体溶液 1:200 (3% BSA+PBS) 加于切片上, 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 5 min×3 次, 二抗羊抗兔 1:200, 室温孵育 120 min, PBS 漂洗 5 min×3 次, DAB 试剂盒显色, 适当时终止显色, 脱水封片, 显微镜下观察, 采集图像。

**免疫荧光** 检测肝脏内中性粒细胞 (MPO 阳性细胞) 数目的变化情况。具体操作步骤: 石蜡切片脱蜡, 抗原修复, 透化打孔 (0.5% Triton X-100 室温孵育 10 min), 5% BSA 室温封闭 45 min, 将 MPO 抗体溶液 1:200 (3% BSA+PBS) 滴加于切片上, 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 10 min×3 次, 免疫荧光二抗 (AlexaFluor 546 标记驴抗兔抗体 1:500, Hoechst 33342 1:1 000) 室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗 10 min×3 次, 90% 甘油封片, 荧光显微镜下观察, 采集图像。

**Western blot** 小鼠安乐处死, 分离并取出肝脏, 总蛋白提取, 液氮速冻后加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液超声破碎, 离心取上清液, BCA 法蛋白定量, 加入上样缓冲液, 沸水中 15 min, -20 °C 保存。根据胞浆核蛋白提取试剂盒说明书提取核内蛋白。蛋白上样量为 40  $\mu$ g, 具体步骤: 配制聚丙烯酰胺凝胶, 电泳, 将蛋白转印至 PVDF 膜, 用封闭液 3% BSA 封闭 2 h, 一抗 (VCAM-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、PCNA、 $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -actin) 4 °C 孵育过夜, PBST 漂洗 10 min×3 次, 二抗室温孵育 2 h, PBST 漂洗 10 min×3 次, 加入

ECL 超敏发光液显影。用 Quantity one 分析软件对蛋白条带进行灰度分析。

**Real-time PCR 分析** 小鼠安乐处死, 分离并取出肝脏, 液氮速冻后加入 Trizol 试剂提取肝脏组织中总 RNA, 总 RNA 的纯度分析及含量计算, 经逆转录得到 cDNA, 获得的 cDNA 保存于 -20 °C。实时荧光定量 PCR 检测, 检测指标 VCAM-1。

**统计学分析** 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验结果用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析。数据多组间比较采用方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计分析; 两两比较采用 *t* 检验, 当  $P < 0.05$ , 则有显著性差异。

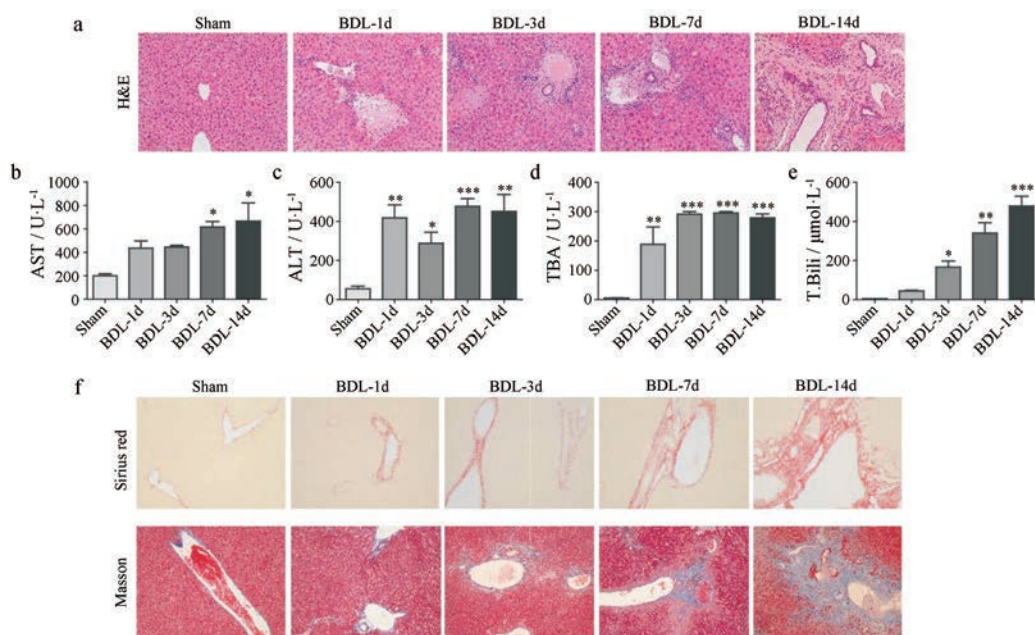
## 结果

### 1 BDL 诱导小鼠肝纤维化过程中肝损伤和肝功能随胆总管结扎时间延长而加重

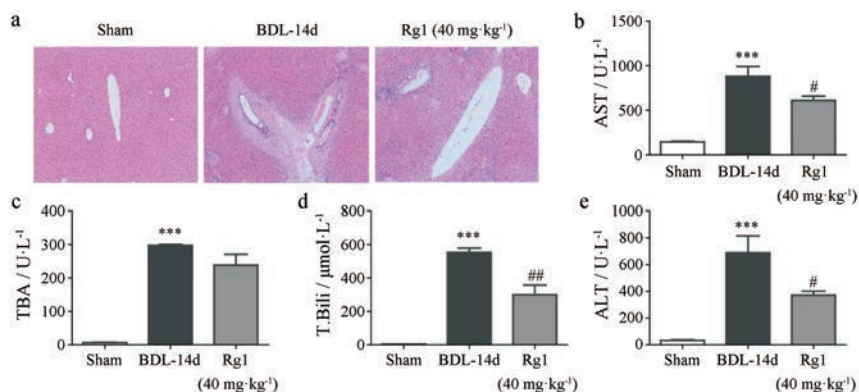
如图 1a 所示, 分别对每组小鼠的肝组织进行了苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E)。正常小鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞形态完整。BDL 诱导的模型组小鼠肝组织可见大量炎性细胞浸润、显著的空泡样病变、肝细胞坏死及明显的胆汁淤积现象, 并随 BDL 时间的延长而加重。另外, BDL 对小鼠肝功能产生严重影响, 随着 BDL 造模时间的延长, 模型组小鼠的肝功能明显受到损伤, 小鼠血清中 AST 和 ALT 测定结果见图 1b, c。BDL 造成胆汁淤积现象, 随着造模时间延长而加重, 如图 1d, e 所示, 总胆汁酸 (TBA) 和总胆红素 (T.Bili) 随造模时间延长而升高。此外, 本研究分别对每组小鼠的肝组织进行了 Sirius red 染色和 Masson 染色, 结果见图 1f, 假手术组小鼠肝几乎没有胶原纤维, BDL 诱导的模型组小鼠肝组织中胶原纤维随胆总管结扎时间延长而增加, 胶原纤维结缔组织大量增生沉积, 形成宽大致密的汇管区-中央静脉纤维间隔和假小叶。与假手术组相比, BDL-7d 组胶原基质沉积有明显差异, 而 BDL-14d 组肝组织 Sirius red 染色和 Masson 染色的阳性面积显著增加。这些指标表明 BDL 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型是成功的。

### 2 Rg1 改善 BDL 诱导的胆汁淤积性肝损伤和肝功能

如图 2a 所示, H&E 染色发现人参皂苷 Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) 对胆汁淤积性肝损伤具有保护作用, 可保护肝细胞组织结构。BDL 导致小鼠肝组织肿胀、点状坏死和融合性坏死、大量炎性细胞浸润及胆汁淤积现象。Rg1 治疗后可缓解这些病理改变。通过 14 天造模和给药后, 取血清检测 AST、TBA、T.Bili 和 ALT 水平的改变 (图 2b~e)。由图可见, BDL 导致这些血清生化指标显著升高 ( $P < 0.001$ ), Rg1 可降低这些指标, 但未能降低至正常水平。与模型组相比, Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) 组



**Figure 1** Aggravation of liver function and collagen fibers with prolonged time during bile duct ligation (BDL)-induced fibrosis. a: Representative HE staining results of BDL mice. b-e: Representative serum biochemical parameters of BDL mice. b: Aspartate transaminase (AST); c: Alanine transaminase (ALT); d: Total bile acid (TBA); e: Total bilirubin (T.Bili). Liver tissue sections are semi-quantitatively analyzed for the positive areas of collagen fiber staining. f: Sirius red staining and Masson staining.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs sham group. Original magnification, 100 $\times$



**Figure 2** Protective effect of Rg1 on histopathological changes and serum parameters. a: Representative liver histology of mice by H&E staining. The abnormal elevations of AST, ALT, TBA and T.Bili were reversed by the treatment of Rg1 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). b: AST; c: TBA; d: T. Bili; e: ALT.  $n = 4-6$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs sham group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs BDL-14d group. Original magnification, 40 $\times$

可显著降低AST、ALT和T.Bili水平, 而TBA水平有所下降, 但无显著性差异。综上, 人参皂苷Rg1能够减轻BDL诱导的胆汁淤积性肝损伤, 并改善肝功能。

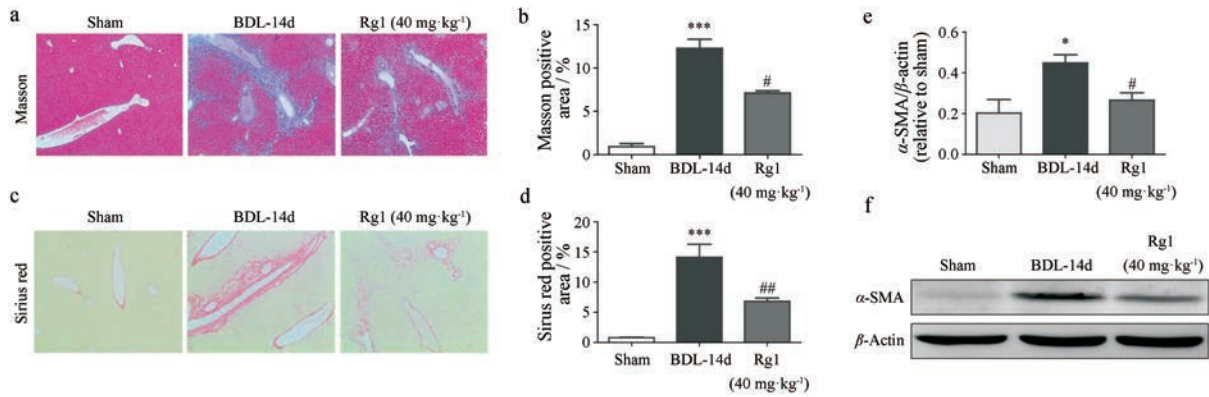
### 3 Rg1能缓解BDL诱导的肝纤维化

本研究结果显示, 人参皂苷Rg1能明显缓解BDL诱导的胆汁淤积性肝纤维化。分别对假手术组、BDL-14d组和给药组Rg1 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的肝组织切片进行了Masson染色和Sirius red染色, 结果见图3。在图3a, c中, 假手术组小鼠肝组织中几乎没有胶原纤维沉积, BDL诱导的模型组小鼠肝中胶原纤维缔结大量增

生沉积, 主要分布在汇管区和坏死区域,  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Rg1组可减轻肝纤维化程度, 减少Masson染色和Sirius red染色阳性面积。如图3b, d所示, 分别是Masson染色和Sirius red染色的阳性面积量化结果。活化的HSC细胞是ECM主要的来源<sup>[19]</sup>, 而 $\alpha$ -SMA是HSC细胞活化的标记物。如图3e, f所示, 与BDL-14d组相比,  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Rg1组可降低肝脏中 $\alpha$ -SMA蛋白的表达水平, 抑制HSC细胞的活化。

### 4 Rg1抑制NF- $\kappa$ B的活化下调VCAM-1表达

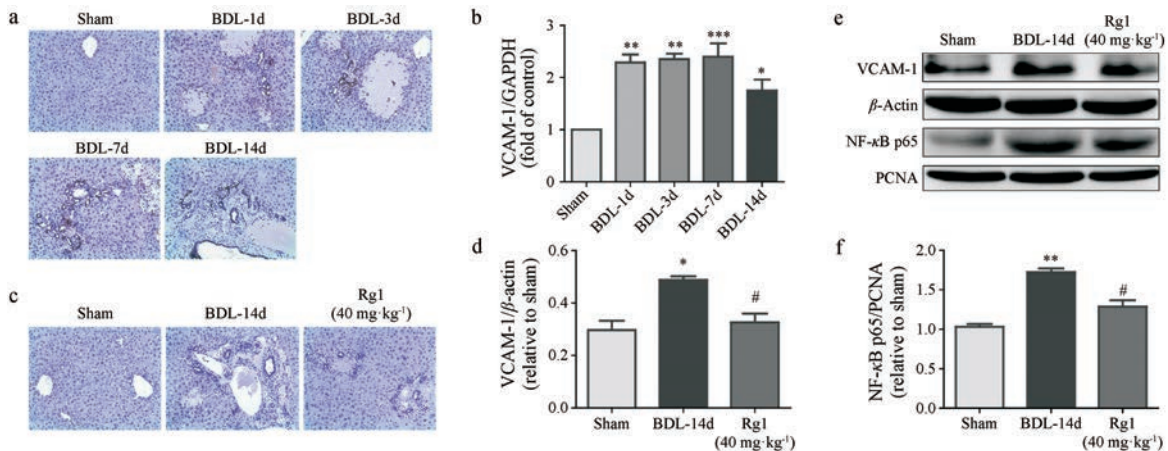
黏附分子在肝炎和肝纤维化中扮演了重要角色,



**Figure 3** Rg1 effectively ameliorated BDL-induced liver fibrosis. Liver tissue sections are semi-quantitatively analyzed for the positive areas of collagen fiber staining; Positive areas of Masson staining and Sirius red staining in BDL-14d group was significantly increased compared with sham group, while the Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) group was significantly reduced comparing with the BDL-14d group. Rg1 inhibited expression level of  $\alpha$ -SMA in BDL-induced mice. a: Masson staining; b: Quantitative results corresponding to Masson staining; c: Sirius red staining; d: Quantitative results corresponding to Sirius red staining; e, f: Western blot analysis of  $\alpha$ -SMA in liver tissue.  $n=4-6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  vs sham group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs BDL-14d. Original magnification, 40 $\times$

慢性肝炎患者的肝脏中黏附分子被上调<sup>[20]</sup>。本研究分析 Rg1 对 BDL 诱发肝纤维化中 VCAM-1 的影响。首先发现, VCAM-1 在 BDL 诱导的肝纤维化过程中呈现一种动态变化 (图 4a, b)。免疫组织化学 (图 4a) 显示, VCAM-1 主要表达在肝组织坏死区的肝细胞、血管内皮细胞和胆管上皮细胞, 诱导白细胞跨过上皮和内皮向炎症部位聚集, 加剧炎症反应。与假手术组相比, BDL 造模后第 1 天 VCAM-1 表达上调, 到第 7 天 VCAM-1 的表达达到高峰, 第 14 天表达略有下调。采用 qPCR 方法, 对各组肝组织中 VCAM-1 mRNA 水平进行检测, 结果 (图 4b) 显示, BDL 诱导的肝纤维化过程中

VCAM-1 mRNA 表达水平与蛋白水平一致。另外, 给予 Rg1 后降低 VCAM-1 的表达。如图 4c, d 所示, 与假手术组相比, VCAM-1 在 BDL-14d 组肝组织中表达升高, 40 mg·kg<sup>-1</sup> Rg1 可显著降低 VCAM-1 的蛋白水平。免疫组织化学显示, 40 mg·kg<sup>-1</sup> Rg1 也减轻肝损伤, 并缓解炎症细胞的聚集 (图 4c)。为进一步研究人参皂苷 Rg1 对 VCAM-1 的调控机制, 本研究检测了 VCAM-1 的上游 NF- $\kappa$ B 的活化情况。对 3 组实验小鼠的肝组织细胞核中 NF- $\kappa$ B 的含量进行检测发现, 与假手术组相比, BDL-14d 组肝组织细胞中 NF- $\kappa$ B 入核显著增加, 而 Rg1 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组可明显降低细胞核内 NF- $\kappa$ B 的含量



**Figure 4** Dynamic changes of VCAM-1 during BDL-induced liver fibrosis and activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibited by Rg1. Rg1 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) inhibits the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway, down-regulates the expression of VCAM-1, and inhibits the inflammatory response, thereby reducing liver fibrosis. a: Immunohistochemistry results of VCAM-1 staining; b: Quantitative analysis of VCAM-1 by qPCR; c and d: Inhibitory effect of Rg1 on VCAM-1 level determined by immunohistochemistry and Western blot in BDL-induced mice. e and f: Inhibitory effect of Rg1 on nucleus NF- $\kappa$ B level determined by Western blot in BDL-induced mice.  $n=4-6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs sham group; # $P<0.05$  vs BDL-14d group. Original magnification, 100 $\times$

(图4e, f)。这提示Rg1可抑制NF- $\kappa$ B信号通路的活化,下调VCAM-1的表达,抑制炎症反应,从而减轻肝纤维化。

### 5 Rg1抑制炎症细胞浸润减轻炎症反应

VCAM-1可介导白细胞向炎症部位聚集,而上述结果表明Rg1可降低VCAM-1表达。本文检测了肝脏中性粒细胞浸润情况。结果显示,Rg1可显著减少受损后肝脏组织中性粒细胞浸润。如图5a所示,与假手术组相比,BDL-14d组肝组织中MPO阳性细胞显著增多,40 mg·kg<sup>-1</sup> Rg1组可明显降低MPO阳性细胞数,这可能与降低VCAM-1的表达相关。然后,采用Western blot方法,对肝纤维化组织中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的蛋白水平进行检测,如图5b, c所示,与假手术组相比,BDL-14d组的肝组织中两者含量显著上升,40 mg·kg<sup>-1</sup> Rg1组可有效地降低损伤肝组织内IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的含量。说明Rg1抑制炎症细胞浸润,降低炎症因子的含量,减轻炎症反应。

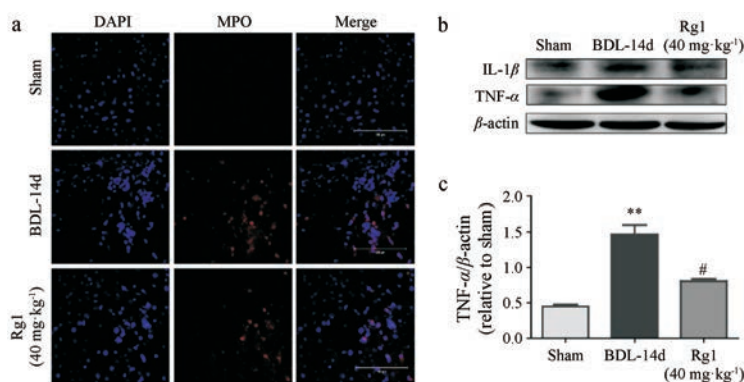
### 讨论

肝纤维化的高发病率和高致死率给社会带来沉重的负担,因而引发全世界广泛关注。然而,目前临床上无有效的可治愈肝纤维化的药物,开发有效治疗肝纤维化药物迫在眉睫。肝纤维化是肝硬化和肝癌早期的病理特征,是由慢性肝损伤所引发<sup>[19]</sup>。人参皂苷Rg1是一种具有广泛药理活性天然产物,在体内外和临床研究发现,Rg1对酒精性肝损伤<sup>[9,10]</sup>、药物性肝损伤<sup>[11]</sup>、CCl<sub>4</sub>诱导的肝损伤<sup>[14]</sup>和肝衰竭都有护肝作用<sup>[8]</sup>。但是Rg1在胆汁淤积性肝纤维化中的研究却很少见。在本文中,通过BDL建立胆汁淤积性肝纤维化模型,研究发现Rg1降低BDL诱导的慢性肝损伤中AST、ALT、TBA和T.Bili水平,改善肝功能和缓解胆汁淤积现象,可见Rg1预防BDL诱导的慢性肝损伤具有良好

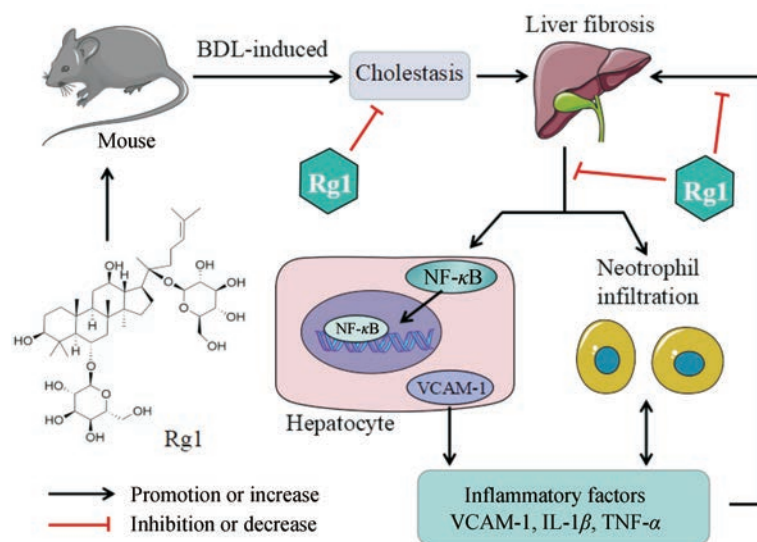
的效果。Rg1明显降低MPO阳性细胞数,减少中性粒细胞浸润肝脏,降低IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的蛋白水平,缓解炎症反应。同时,Rg1减少此模型小鼠肝脏中 $\alpha$ -SMA的表达,抑制HSC的活化,从而缓解肝纤维化。深入研究发现,Rg1显著抑制BDL诱导的肝纤维化肝脏中VCAM-1的表达,并抑制细胞核中NF- $\kappa$ B蛋白水平的升高,因而Rg1可能通过抑制NF- $\kappa$ B/VCAM-1信号通路,进而减少炎症细胞浸润肝脏,缓解BDL诱导的肝纤维化。由于前期报道发现Rg1治疗肝损伤的有效剂量为10~160 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[8,9,14]</sup>,Rg1治疗缺血性脑损伤的有效剂量也在此范围<sup>[21]</sup>。因而,本文选用了40 mg·kg<sup>-1</sup>剂量对胆汁淤积性肝纤维化进行实验。

前期研究表明,Rg1可改善化学性等外源性物质诱发的肝损伤和血清生化指标。其最主要是由于Rg1的抗氧化活性,通过调控Keap1-Nrf2-ARE信号通路<sup>[8-11,14]</sup>。但是Rg1对BDL导致的胆汁淤积性肝纤维化的影响尚未见报道。BDL诱发的肝病可良好地模仿胆汁淤积性肝病。BDL引发胆汁排泄受阻,严重造成肝内胆管血管损伤,如胆管扩张、血管内溶血,管壁通透性升高,甚至导致肝纤维化和肝硬化<sup>[22]</sup>。本文研究了Rg1对BDL诱导的肝纤维化的影响,发现长期给予Rg1可以有效改善AST和ALT,能有效地抵抗胆汁淤积诱发的肝损伤。

慢性炎症驱动肝纤维化的进程<sup>[23]</sup>。因而抗炎治疗可有效地削弱这种驱动力,并可预防或逆转肝炎和肝纤维化。Rg1可有效地增强机体免疫力和抗氧化能力。Rg1通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活及其下游TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等炎症因子的表达,发挥抗炎护肝作用<sup>[9]</sup>。另外,Rg1能抵抗四氯化碳诱发的急慢性肝炎<sup>[7,14]</sup>。本研究显示,BDL诱导的肝纤维化中炎症因子水平升高,而给予Rg1治疗后可下调损伤肝内TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等炎症因子的表达,这表明Rg1可减弱BDL



**Figure 5** Attenuation of hepatitis and liver fibrosis induced by Rg1 in BDL-induced liver fibrosis mice. a: Representative MPO staining results of BDL-induced mice treated with Rg1; b, c: Inhibitory effect of Rg1 on pro-inflammation cytokines levels, including IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by Western blot.  $n=4-6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P<0.01$  vs sham group; # $P<0.05$  vs BDL-14d group. Scale bar=100  $\mu$ m



**Figure 6** Schematic of Rg1 mechanism of preventing BDL-induced liver fibrosis through NF- $\kappa$ B signal pathway

诱导的胆汁淤积性肝损伤中炎症反应。VCAM-1 是一种在免疫系统具有重要作用的免疫球蛋白分子<sup>[24]</sup>。其主要表达于内皮细胞在内的多种细胞上,能够介导白细胞跨越内皮向炎症部位聚集<sup>[25]</sup>。可溶性血管细胞黏附分子-1 (soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1) 作为肝硬化的不同阶段检测的潜在标志物<sup>[26]</sup>。VCAM-1 可通过与  $\alpha 4\beta 1$  结合促进淋巴细胞存活,加剧慢性肝炎症状<sup>[27]</sup>。另外,特发性肺纤维化患者外周血中 VCAM-1 显著升高,并且其参与了成纤维细胞增殖,促进肺纤维化的进程<sup>[28]</sup>。本文研究发现, Rg1 可显著降低肝纤维化组织中 VCAM-1 的蛋白水平。BDL 诱导的肝纤维化中中性粒细胞数目增加,而给予  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Rg1 治疗后可有效减少 VCAM-1 分泌,降低中性粒细胞的浸润数目。另有报道显示, Rg1 可显著减少受损脑区中性粒细胞数量<sup>[29]</sup>,与本文结果一致。

本文利用胆汁淤积模型,探讨了 VCAM-1 在肝纤维化过程中的表达变化规律及 Rg1 对其调控机制。BDL 对小鼠肝功能的影响随着给予 BDL 时间的延长而加重,在 BDL-14d 出现明显的纤维化。VCAM-1 主要表达在肝组织坏死区的肝细胞、血管内皮细胞和胆管上皮细胞,VCAM-1 在 BDL-1d 表达上调,至 BDL-7d 达到高峰,BDL-14d 表达有所下降,与对照组相比仍有高表达。Marx 等<sup>[21,30]</sup>研究表明抑制 NF- $\kappa$ B 易位可降低 VCAM-1 启动子活性,减少白细胞黏附和抑制随后的跨内皮细胞迁移。为研究 Rg1 对 VCAM-1 的调控机制,本研究检测了 VCAM-1 的上游 NF- $\kappa$ B 在细胞核内的含量变化情况。结果表明, Rg1 治疗可明显降低核 NF- $\kappa$ B 蛋白水平。如图 6 所示, Rg1 可抑制 NF- $\kappa$ B 异位,减弱 VCAM-1 启动活性,抑制炎症反应,从而减轻

胆汁淤积性肝纤维化。然而 Rg1 如何调节 NF- $\kappa$ B 表达或异位活性,以及其对肝纤维化的治疗效果及作用机制仍有待进一步研究。

## References

- [1] Lim YS, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease [J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12: 733-746.
- [2] Davis GL, Alter MJ, El-Serag H, et al. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138: 513-521.e6.
- [3] Mitchell AE, Colvin HM, Beasley RP. Institute of medicine recommendations for the prevention and control of hepatitis B and C [J]. *Hepatology*, 2010, 51: 729-733.
- [4] Fujii H, Kawada N. Fibrogenesis in alcoholic liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 8048-8054.
- [5] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.
- [6] Budiarto BR, Chan WH. Oxidative stresses-mediatedapoptotic effects of ginsenoside Rb1 on pre- and post-implantation mouse embryos *in vitro* and *in vivo* [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32: 1990-2003.
- [7] Tian W, Chen L, Zhang L, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on glucose metabolism and liver injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats [J]. *Genet Mol Res*. 2017. DOI: 10.4238/gmr16019463.
- [8] Luo P, Chu SF, Gao Y, et al. Advances in study of pharmacological effects of ginsenoside Rg1 in hepatic diseases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 21-27.
- [9] Gao Y, Chu SF, Li JW, et al. Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway [J]. *J Ethnophar-*

- macol, 2015, 173: 231-240.
- [10] Gao Y, Chu SF, Xia CY, et al. Rg1 attenuates alcoholic hepatic damage through regulating AMPK and Nrf2 signal pathways [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18: 765-778.
- [11] Gao Y, Chu SF, Shao QH, et al. Antioxidant activities of ginsenoside Rg1 against cisplatin-induced hepatic injury through Nrf2 signaling pathway in mice [J]. *Free Radic Res*, 2017, 51: 1-13.
- [12] Gao Y, Chu S, Zhang Z, et al. Hepatoprotective effects of ginsenoside Rg1 - a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206: 178-183.
- [13] Zhao J, Shi Z, Liu S, et al. Ginsenosides Rg1 from Panaxginseng: a potential therapy for acute liver failure patients? [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 538059.
- [14] Li JP, Gao Y, Chu SF, et al. Nrf2 pathway activation contributes to anti-fibrosis effects of ginsenoside Rg1 in arat model of alcohol- and CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 1031-1044.
- [15] Yao X, Jiang W, Ma CH, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of inflammation [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23: 583-588.
- [16] Dong XQ, Duan LP, Miao YL, et al. A stereological analysis of ginsenoside Rg1 in inhibiting hepatic fibrosis [J]. *Chongqing Med (重庆医学)*, 2014, 43: 3599-3601, 3616.
- [17] Geng J, Peng W, Huang Y, et al. Ginsenoside-Rg1 from Panaxnotoginseng prevents hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 634: 162-169.
- [18] Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, et al. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice [J]. *J Surg Res*, 2010, 164: 221-227.
- [19] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1655-1669.
- [20] Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Immunohistochemical study of adhesion molecules in liver inflammation [J]. *Hepatology*, 1990, 12: 59-65.
- [21] Xie CL, Wang WW, Xue XD, et al. A systematic review and meta-analysis of ginsenoside-Rg1 (G-Rg1) in experimental ischemic stroke [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7790.
- [22] Ghonem NS, Assis DN, Boyer JL. Fibrates and cholestasis [J]. *Hepatology*, 2015, 62: 635-643.
- [23] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25: 195-206.
- [24] Zhang D, Yuan D, Shen J, et al. Up-regulation of VCAM1 relates to neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage in adult rats [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40: 1042-1052.
- [25] Yamada Y, Arao T, Matsumoto K, et al. Plasma concentrations of VCAM-1 and PAI-1: a predictive biomarker for post-operative recurrence in colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101: 1886-1890.
- [26] Lo Iacono O, Rincón D, Hernando A, et al. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule are related to hyperdynamic circulation in patients with liver cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2008, 28: 1129-1135.
- [27] Afford SC, Humphreys EH, Reid DT, et al. Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis [J]. *Hepatology*, 2014, 59: 1932-1943.
- [28] Agassandian M, Tedrow JR, Sembrat J, et al. VCAM-1 is a TGF- $\beta$ 1 inducible gene upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2015, 27: 2467-2473.
- [29] Chu SF, Zhou X, Zhang Z, et al. HMGB1 is involved into the anti-ischemic stroke effect of ginsenoside Rg1 in diabetic rats [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2018, 53: 958-965.
- [30] Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPAR $\alpha$  activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells [J]. *Circulation*, 1999, 99: 3125-3131.