

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250515.003

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250515.1301.006>

基于 Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路探讨人参皂苷 Rd 抑制内质网应激治疗非酒精性脂肪性肝炎的机制研究

路 瑶¹, 李丽萍¹, 王炳予²✉, 袁星星³✉

(1. 研究生学院, 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036; 2. 腔镜室, 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150006; 3. 肝胆脾胃病二科, 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150006)

[摘要] **目的:** 观察人参皂苷 Rd 对肝细胞 Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路的影响, 从而阐明其调控内质网应激治疗非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的分子机制。 **方法:** 采用 CCK8 法检测人参皂苷 Rd 的肝细胞毒性, 随后通过游离脂肪酸诱导 HepG2 构建 NASH 细胞模型, 并给予人参皂苷 Rd 和内质网抑制剂进行干预。分别采用油红 O 染色、生化检测、免疫荧光、酶联免疫吸附试验、蛋白印迹法和实时荧光定量 PCR 检测人参皂苷 Rd 对甘油三酯、肝功能、氧化应激、细胞因子和 Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路中关键分子表达的影响。 **结果:** 与模型组相比, 人参皂苷 Rd 能够显著抑制 HepG2 细胞中 TG 的含量和 AST 与 ALT 的水平, 增加 GSH 的含量和 SOD 的活性, 降低 MDA 的含量和 ROS 的平均荧光强度, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。此外, 人参皂苷 Rd 能够显著抑制 HepG2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、CCL2 和 CXCL1 的含量, 下调 ATF4、CHOP 蛋白的表达和降低 p-PERK/PERK 和 p-eIF2 α /eIF2 α 的比值, 与模型组比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。不仅如此, 人参皂苷 Rd 干预还能显著抑制 Derlin-1 蛋白和 mRNA 的表达, 与模型组比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论:** 人参皂苷 Rd 通过抑制 Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路的激活, 从而抑制内质网应激, 达到治疗 NASH 的作用。

[关键词] 人参皂苷 Rd; Derlin-1; 内质网应激; 非酒精性脂肪性肝炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)16-1220-09

Mechanism of ginsenoside Rd in inhibiting endoplasmic reticulum stress for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis via the Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP signaling pathway

LU Yao¹, LI Liping¹, WANG Bingyu²✉, YUAN Xingxing³✉

(1. Graduate School, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China; 2. Department of Endoscopy, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150006, China; 3. Department of Gastroenterology, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150006, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Excellent Youth Project of Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (YQ2022H015)

[Author]: LU Yao, E-mail: 836065438@qq.com.

[Correspondence to]: WANG Bingyu, Ph.D., Associate Chief Physician, E-mail: wangbingyu1987@sina.com; YUAN Xingxing, Ph.D., Associate Chief Physician, E-mail: yuanxingxing@hljucm.edu.cn.

Received: 2025-02-23 **Revised:** 2025-05-02

JHMu, 2025;31(16):1220-1228

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of ginsenoside Rd on the Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP signaling pathway in hepatocytes, thereby elucidating its molecular mechanism in regulating endoplasmic reticulum stress for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods:** The cytotoxicity of ginsenoside Rd was assessed using the CCK8 assay. Subsequently, a NASH cell model was established by inducing HepG2 cells with free fatty acids, followed by intervention with ginsen-

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(YQ2022H015)

[作者简介] 路瑶, E-mail: 836065438@qq.com。

[通讯作者] 王炳予, 博士, 副主任医师, E-mail: wangbingyu1987@sina.com; 袁星星, 博士, 副主任医师, E-mail: yuanxingxing@hljucm.edu.cn。

[收稿日期] 2025-02-23 **[修回日期]** 2025-05-02 **网络出版时间:** 2025-05-15 16:23:29

oside Rd and an endoplasmic reticulum inhibitor. The effects of ginsenoside Rd on triglyceride (TG) levels, liver function, oxidative stress, cytokines, and the expression of key molecules in the Derlin-1/PERK/eIF2 α /CHOP signaling pathway were evaluated using Oil Red O staining, biochemical assays, immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, and real-time quantitative PCR. **Results:** Compared to the model group, ginsenoside Rd significantly reduced TG content and the levels of AST and ALT in HepG2 cells, increased GSH content and SOD activity, and decreased MDA content and ROS mean fluorescence intensity, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Additionally, ginsenoside Rd significantly inhibited the levels of TNF- α , IL-1 β , CCL2, and CXCL1 in HepG2 cells, downregulated the expression of ATF4 and CHOP proteins, and reduced the ratios of p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α , with statistically significant differences compared to the model group ($P < 0.01$). Moreover, ginsenoside Rd intervention significantly suppressed the expression of Derlin-1 protein and mRNA, with statistically significant differences compared to the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ginsenoside Rd inhibits the activation of the PERK/eIF2 α /CHOP signaling pathway, thereby suppressing endoplasmic reticulum stress and exerting therapeutic effects on NASH.

[**Key words**] Ginsenoside Rd; Derlin-1; Endoplasmic reticulum stress; Non-alcoholic steatohepatitis

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种以肝细胞大泡性脂肪变性(>5%的肝细胞受累)为病理基础,且排除过量饮酒及其他继续性肝脂肪变病因的慢性代谢性肝病^[1]。随着生活方式的改变,NAFLD的发病率呈现逐年递增的趋势,从1990~2006年的25.26%增加到2016~2019年的38.00%,增加了50.4%^[2]。作为NAFLD的一个重要亚型,非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是单纯性肝脂肪变发展至终末期肝病的核心环节,针对NASH的早期干预对于阻断疾病进展、改善患者预后具有重要意义^[3]。

目前尚无药物或手术被批准用于NASH的治疗,因此,生活方式干预仍然是NASH管理的基石策略。芪参汤为临床治疗痰瘀互结证NASH的经验方,已被证实可通过抑制炎症改善NASH组织病理学和纤维化水平^[4-7]。人参皂苷Rd是芪参汤的主要活成分,具有抗炎、调节免疫和改善机代谢水平的作用^[8]。已有研究证实,人参皂苷Rd通过调节雌激素相关受体 α 介导的P2X7r通路抑制炎症反应和改善肝纤维化的发生^[9]。然而,人参皂苷Rd在NASH中的作用机制尚不明确。本研究旨在探讨人参皂苷Rd对Derlin-1介导的内质网应激的影响,从而阐明其在NASH治疗中分子机制,并为芪参汤治疗NASH的核心物质基础提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肝癌细胞株HepG2(编号为SCSP-510)采购自中国科学院典型培养物保藏委员会武汉细胞资源中心。该细胞系采用Dulbecco改良Eagle培养基进行培养。培养基中含10%胎牛血清及1%双抗溶液(青霉素-链霉素),培养环境为饱和湿度、37℃并含5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养。当细胞生

长至80%融合时候进行后续实验。本研究经黑龙江省中医药科学院实验动物伦理委员会批准(SY3R-2022035)。

1.2 药物

油酸(纯度 $\geq 99\%$, CAS号:112-80-1)、棕榈酸(纯度 $\geq 99\%$, CAS号:57-10-3)和人参皂苷Rd(纯度 $\geq 98\%$, 分子量:946.12 g/mol, CAS号:52705-93-8)购于美国Sigma-Aldrich公司(货号分别为O1008、P0500和SML4126)。4-苯基丁酸(4-Phenylbutyric acid, 4-PBA, 分子量:164.20, CAS号:1821-12-1)购于美国MedChemExpress公司(货号为HY-A0281)。

1.2.1 游离脂肪酸配制 称取1.88 mg油酸和0.85 mg棕榈酸,加入1 mL二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,充分混合溶解,配制游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)储备液(油酸66.5 mmol/L+棕榈酸33.5 mmol/L,总浓度100 mmol/L)。随后取100 μ L FFA储备液,加入10 mL无血清培养基中,充分混匀,得到1 mmol/L FFA工作液。其中油酸与棕榈酸的比例为2:1(终浓度:油酸0.67 mmol/L,棕榈酸0.33 mmol/L),DMSO终浓度为1‰。工作液需现配现用,避免脂肪酸氧化。

1.2.2 人参皂苷Rd溶液配制 称取9.46 mg人参皂苷Rd,加入1 mL DMSO中,配制成10 mmol/L储备液。采用梯度稀释法配制工作液:(1)取10 μ L储备液加入990 μ L培养基,混匀后得到100 μ mol/L中间液;再取10 μ L中间液加入990 μ L培养基,得到1 μ mol/L工作液。(2)分别取5、10、20、50、100 μ L储备液加入10 mL培养基,混匀后补充DMSO使终浓度为1‰得到5、10、20、50和100 μ mol/L工作液。

1.2.3 4-PBA溶液配制 称取82.1 mg 4-PBA,加入1 mL DMSO中,充分溶解后配制成500 mmol/L储备液,随后取2 μ L储备液,加入1 mL培养基中,

得到 1 mmol/L 工作液。

1.3 试剂

DMSO 购于南京化学试剂股份有限公司(货号为 C0491520223); MEM 培养基购于美国 Gibco 公司(货号为 11095080)。天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglycerides, TG)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒均采购自南京建成生物工程研究所(货号分别为 C010-2-1、C009-2-1、A110-1-1、A006-2-1、A003-1-2 和 A001-3-2)。CCK8 和油红 O 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司(货号为 CA1210 和 G1262)。RIPA 裂解液、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、TRIzol、SYBR Green qPCR 预混试剂和 cDNA 第一链合成试剂盒于上海碧云天生物科技有限公司(货号分别为 P0013B、S0033S、R016、D7260 和 D7168M)白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和趋化因子配体 2(chemokine ligand 2, CCL2)购于上海江莱生物科技有限公司(货号分别为 JL10208-48T、JL13662-48T 和 JL19334D-48T)。C-X-C 基序趋化因子配体 1(C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1)均购于上海酶联生物科技有限公司(货号为 ml057794)。PERK、eIF2 α 、phospho-eIF2 α (Ser51)、ATF4 和 CHOP 均购于武汉三鹰生物技术有限公司(货号分别为 20582-1-AP、11170-1-AP、28740-1-AP、10835-1-AP 和 15204-1-AP)。Derlin-1、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的二抗购于美国 CST 公司(货号分别为 #30260、#2118 和 #7074)。ECL 化学发光试剂购于德国密理博公司(货号为 WBKLS0500)。

1.4 细胞分组

选择对数生长期的 HepG2 细胞, 经过胰蛋白酶消化后进行离心(1 000 r/min, 3 min), 经弃上清后补充新鲜完全培养基对细胞重悬, 并调整细胞密度。HepG2 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养至细胞贴壁。细胞分为空白组、模型组、人参皂苷 Rd 低剂量、中剂量、高剂量和抑制剂组, 每组设置 3 个复孔。

1.5 造模与药物干预

吸除原培养基, 除空白组外, 余下各组均采用 FFA 诱导建立 NASH 细胞模型^[10]。造模与药物干预方法如下: (1) 空白组: 1% DMSO 的无血清培养

基; (2) 模型组: 1 mmol/L FFA; (3) 人参皂苷 Rd 低剂量: 1 mmol/L FFA + 5 μ mol/L 人参皂苷 Rd 溶液; (4) 人参皂苷 Rd 中剂量: 1% DMSO 溶液 + 1 mmol/L FFA + 10 μ mol/L 人参皂苷 Rd 溶液; (5) 人参皂苷 Rd 高剂量: 1 mmol/L FFA + 20 μ mol/L 人参皂苷 Rd 溶液; (6) 抑制剂组: 1 mmol/L FFA + 1 mmol/L 4-PBA。将 6 孔板置于培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中 24 h, 收集细胞。

1.6 指标检测

1.6.1 细胞毒性及药物浓度筛选 取 HepG2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 分别给予人参皂苷 Rd 溶液 0、1、5、10、20、50 和 100 μ mol/L 进行干预, 每个浓度设置 3 个复孔。另取 HepG2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 设置空白组、模型组、1、5、10、20 μ mol/L 人参皂苷 Rd 组。除空白组外, 余下各组通过 1 mmol/L FFA 构建细胞模型。同时, 各组给予相应的药物干预。24 h 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 轻轻晃动混匀, 继续孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值(OD 值)。

1.6.2 油红 O 染色 取“1.5”中 HepG2 细胞, PBS 洗涤 $\times 2$ 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 $\times 3$ 次。加入油红 O 工作液, 室温下避光染色 30 min。吸除染色液, 用蒸馏水洗涤 $\times 2$ 次, 去除多余染料。光学显微镜下拍照。脂滴含量的定量分析采用 ImageJ 软件计算各组细胞油红 O 染色的积分光密度(integrated optical density, IOD)。

1.6.3 生化检测 取“1.5”中 HepG2 细胞, PBS 洗涤 $\times 2$ 次, 加入适量的胰酶对细胞进行消化, 随后离心(1 000 r/min, 3 min)并收集细胞沉淀。加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C 离心(12 000 r/min, 10 min)后取上清。参照试剂盒说明书检测各组细胞中 AST、ALT、TG、GSH 和 MDA 的含量及 SOD 的活力。

1.6.4 ROS 检测 取“1.5”中 HepG2 细胞, PBS 洗涤 $\times 2$ 次, 每孔加入 1 mL 稀释后的 DCFH-DA 溶液, 置于培养箱中避光孵育 30 min。每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 室温避光固定 15 min, 采用 PBS 洗涤 $\times 3$ 次。每孔加入 1 mL 稀释后的 DAPI 染液, 室温下避光进行固定 5 min, PBS 洗涤 $\times 3$ 次。随后加入抗荧光淬灭封片剂, 盖上盖玻片, 以荧光显微镜下观察。DCFH-DA 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm, 显示绿色荧光, 代表 ROS 水平。DAPI 的激发波长为 358 nm, 发射波长为 461 nm, 显示蓝色荧光, 用于标记细胞核。采用 ImageJ 软件计算

各组细胞平均荧光强度。

1.6.5 酶联免疫吸附试验检测 取“1.5”中HepG2细胞,离心(1 000 r/min, 5 min)取上清。参照试剂盒说明书,采用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度值(OD值)。根据标准品的OD值绘制标准曲线,计算待测样本中TNF- α 、IL-1 β 、CCL2和CX-CL1的浓度。

1.6.6 Western blot 检测 取“1.5”中HepG2细胞,弃培养基,PBS洗涤 $\times$ 2次。加入RIPA裂解液与冰上裂解30 min。4 $^{\circ}$ C离心(12 000 r/min, 15 min),取上清。BCA法测定蛋白浓度。上样后进行电泳,随后将凝胶中的蛋白转至PVDF膜。将膜浸至5%脱脂牛奶中室温摇床封闭1 h,加入适当比例稀释的PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Derlin-1和GAPDH一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗涤 $\times$ 3次,加入HRP标记的二抗后与室温下摇床孵育1 h, TBST洗涤 $\times$ 3次。将ECL化学发光试剂均匀覆盖在膜上,避光反应1 min,凝胶成像系统成像,采用ImageJ软件分析各条带灰度值。

1.6.7 RT-qPCR 检测 取“1.5”中HepG2细胞,弃培养基,PBS洗涤 $\times$ 2次。使用TRIzol法提取总RNA,并测定RNA浓度和纯度。采用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。配置反应体系,加入Derlin-1及GAPDH引物。引物信息如下:Derlin-1: Forward Primer: 5'-CGGACATCGGAGACTG-GTTC-3', Reverse Primer: 5'-GGCTGATGAG-GCCGAGTTTG-3',产物长度:102 bp; GAPDH: Forward Primer: 5'-ACAACCTTTGGTATCGTG-GAAGG-3', Reverse Primer: 5'-GCCATCACGC-CACAGTTTC-3',产物长度:101 bp。设置反应程序:预变性95 $^{\circ}$ C 30 s,循环40次(95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s),熔解曲线分析。使用GAPDH作为内参基因,采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算Derlin-1 mRNA相对表达量。

1.7 统计学处理

在本研究中,数据分析通过SPSS软件(版本29.0)完成,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)形式呈现。两组数据间的差异采用Student's *t*检验进行分析,而多组数据间的比较则使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

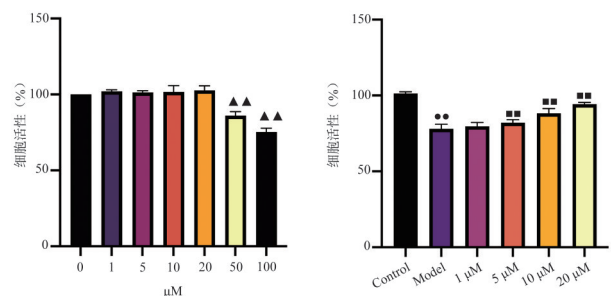
2 结果

2.1 人参皂苷Rd对HepG2细胞毒性和药物浓度筛选

与0浓度组相比,1、5、10、20 μ mol/L组HepG2细胞活性无明显改变,差异无统计学意义($P >$

0.05),而50和100 μ mol/L组HepG2细胞活性显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),表明当人参皂苷Rd浓度高于50 μ mol/L时对HepG2细胞存在一定药物毒性。见图1A。

在此基础上,选取1、5、10、20 μ mol/L人参皂苷Rd进行药物浓度筛选。相较于空白组,模型组中HepG2细胞的活性显著下降,差异均显示出统计学意义($P < 0.01$)。当给予5、10和20 μ mol/L人参皂苷Rd进行干预后,HepG2的细胞活性明显增加,相较于模型组差异均显示出统计学意义($P < 0.01$),而1 μ mol/L人参皂苷Rd干预后细胞活性与模型组比较未见明显改善,差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,随后的实验选择5、10和20 μ mol/L人参皂苷Rd进行。见图1B。



与0浓度组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与空白组比较, $\bullet\bullet P < 0.01$; 与模型组比较, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$

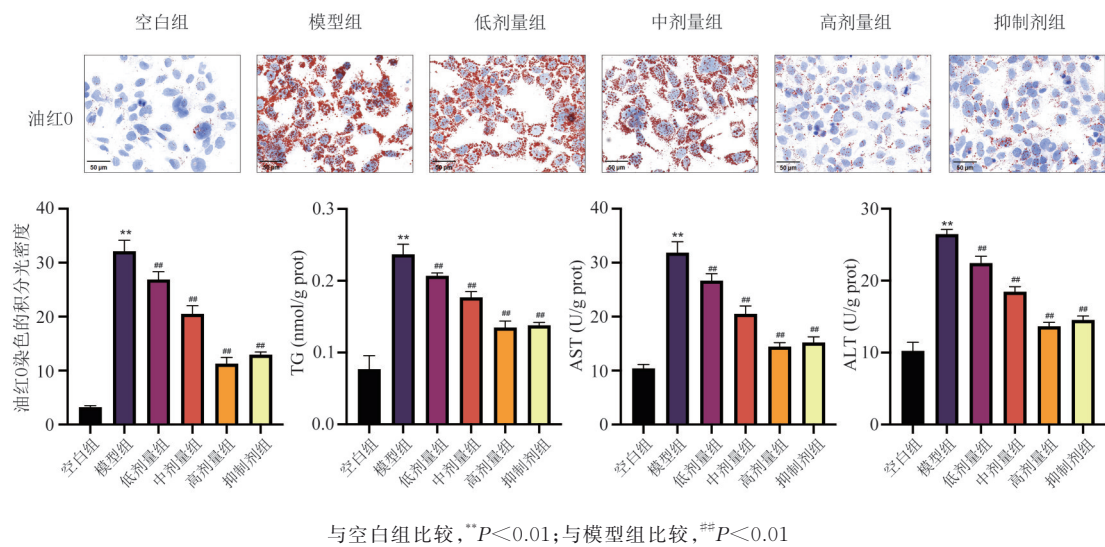
图1 人参皂苷Rd对HepG2细胞毒性和药物浓度筛选

Fig 1 Screening of ginsenoside Rd on HepG2 cells and drug concentration

2.2 人参皂苷Rd对NASH脂质代谢和损伤的影响

空白组HepG2细胞内可见极少量散在红色脂滴,而模型组细胞内可见大量脂滴形成,细胞呈现明显的红色。通过ImageJ软件对HepG2细胞中脂滴进行定量评估,结果显示,与空白组相比,模型组HepG2细胞油红染色的IOD显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,低、中、高剂量的人参皂苷Rd组及抑制剂组中HepG2的油红染色的IOD明显改善,差异均表现出统计学意义($P < 0.01$)。见图2A。

此外,相较于空白组,模型组的HepG2细胞的TG的含量及AST与ALT的水平均明显的增加,差异均表现出统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,人参皂苷Rd低剂量组、中剂量组、高剂量组和抑制剂组HepG2细胞中TG的含量和AST与ALT的水平显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见图2B。



与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.01$

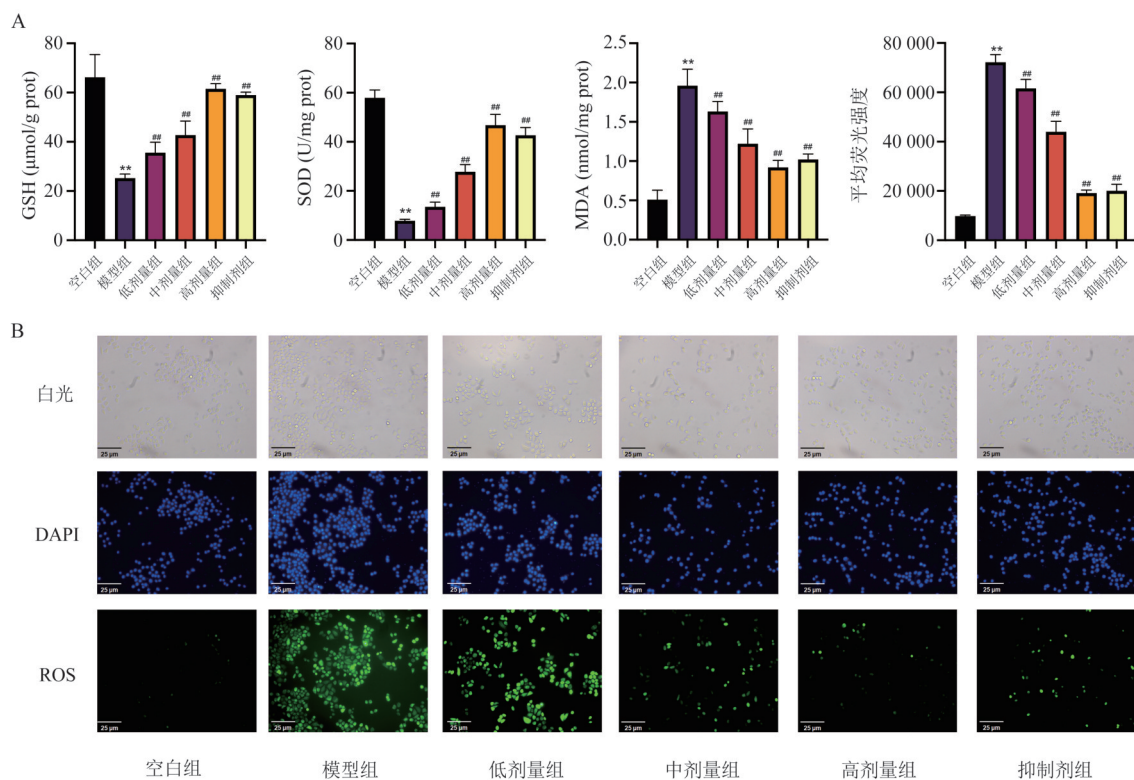
图2 人参皂苷Rd对HepG2细胞脂质代谢和损伤的影响

Fig 2 Effects of ginsenoside Rd on lipid metabolism and damage in HepG2 cells

2.3 人参皂苷Rd对NASH氧化应激的影响

与空白组相比,模型组HepG2细胞中GSH和SOD的活性显著降低,MDA的含量和ROS的平均荧光强度显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,人参皂苷Rd低剂量组、中剂

量组、高剂量组和抑制剂组HepG2细胞中GSH的含量和SOD的活性显著增加,MDA的含量和ROS的平均荧光强度显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见图3。



与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.01$

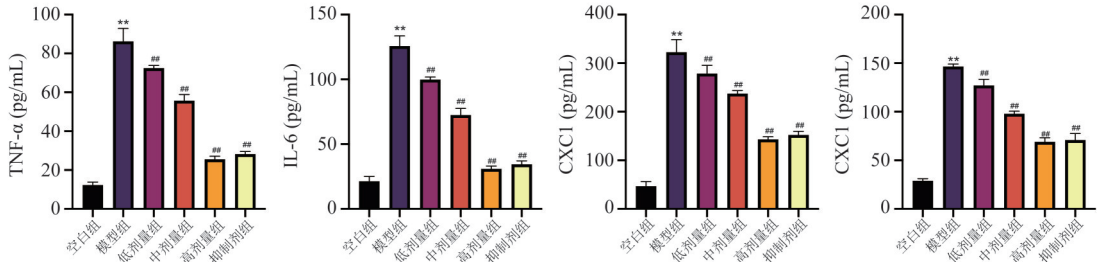
图3 人参皂苷Rd对NASH氧化应激的影响

Fig 3 Effects of ginsenoside Rd on oxidative stress in NASH

2.4 人参皂苷Rd对NASH细胞因子分泌的影响

与空白组相比,模型组HepG2细胞中TNF- α 、IL-1 β 、CCL2和CXCL1的含量显著增加,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。相较于模型组,人参皂苷

Rd低剂量组、中剂量组、高剂量组和抑制剂组中的HepG2细胞中TNF- α 、IL-1 β 、CCL2及CXCL1的含量明显的降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见图4。



与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

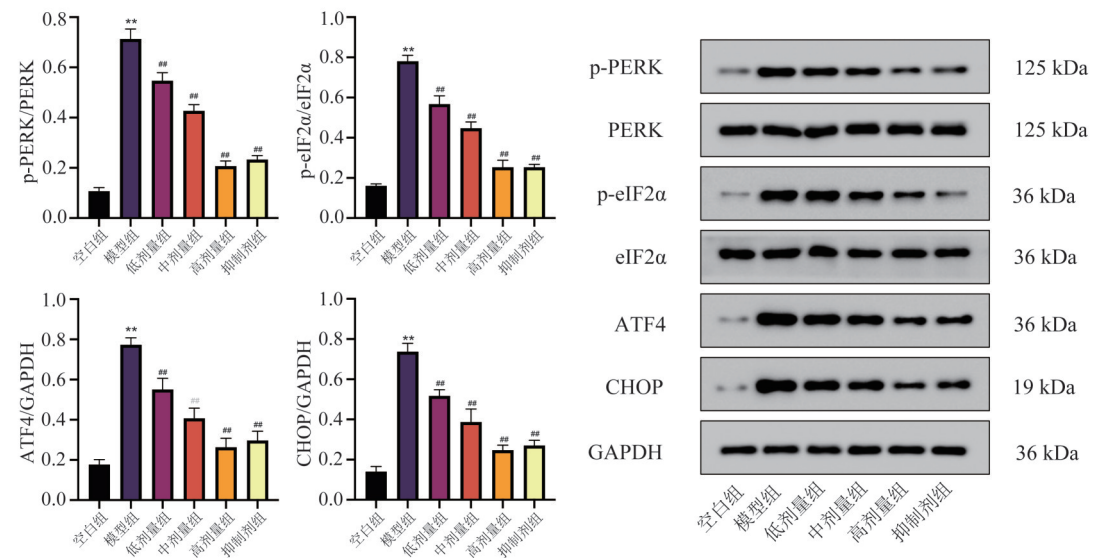
图4 人参皂苷Rd对NASH细胞因子分泌的影响

Fig 4 Effects of ginsenoside Rd on cytokine secretion in NASH

2.5 人参皂苷Rd对PERK/eIF2 α /CHOP信号通路的影响

与空白组相比,模型组HepG2细胞中PERK、ATF4、CHOP蛋白的表达和p-eIF2 α /eIF2 α 的比值显著增加,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与模

型组相比,人参皂苷Rd低剂量组、中剂量组、高剂量组和抑制剂组HepG2细胞中PERK、ATF4及CHOP蛋白的表达与p-eIF2 α /eIF2 α 的比值均显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见图5。



与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

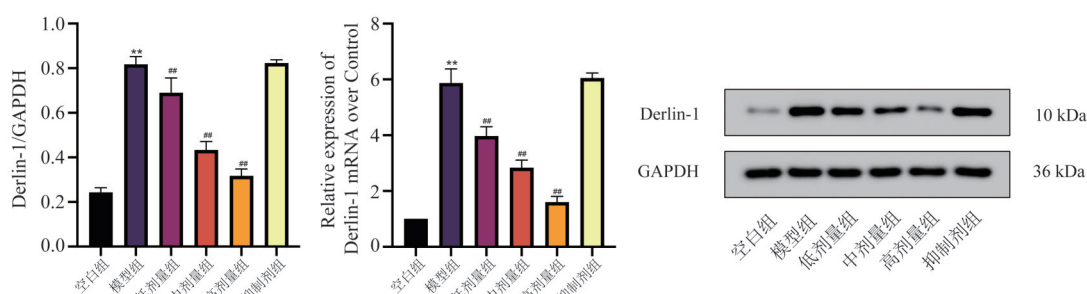
图5 人参皂苷Rd对PERK/eIF2 α /CHOP信号通路的影响

Fig 5 Effects of ginsenoside Rd on the PERK/eIF2 α /CHOP signaling pathway

2.6 人参皂苷Rd对Derlin-1表达的影响

相较于空白组,模型组的HepG2细胞中Derlin-1蛋白与mRNA的表达均明显上调,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,人参皂苷Rd低剂量组、中剂量组和高剂量组的HepG2细胞

中Derlin-1蛋白与mRNA的表达均明显的下调,差异均具有统计学意义($P<0.01$);而抑制剂组HepG2细胞中Derlin-1蛋白和mRNA的表达未见明显改变,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图6。



与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$

图6 人参皂苷Rd对Derlin-1表达的影响

Fig 6 Effects of ginsenoside Rd on Derlin-1 expression

3 讨论

NASH的发病机制具有高度复杂性,其理论框架经历了从强调线性病理过程的“二次打击学说”向揭示多因素动态互作的“多次打击学说”的重要演变。胰岛素抵抗导致脂肪组织脂解作用增强,释放大量的FFA进入肝脏^[11]。肝细胞摄取FFA后,通过酯化反应生成TG,从而导致脂质沉积。前期研究表明,芪参汤可通过巨噬细胞极化改善胰岛素抵抗^[12]。而本研究首次揭示,人参皂苷Rd能够显著抑制肝细胞内脂质沉积。FFA过载导致线粒体 β 氧化能力下降,引起电子传递链泄漏,生成大量ROS,进一步导致线粒体DNA和膜结构的损伤。GSH是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过肽键连接而成的三肽,是防御ROS的第一道防线^[13]。SOD作为线粒体抗氧化系统的核心组分,通过清除超氧阴离子,从而保护线粒体功能,减轻氧化应激和炎症反应^[14]。MDA是脂质过氧化反应的关键终产物,既是氧化损伤的标志物,也是诱导细胞损伤和纤维化的介质^[15]。本研究结果显示,人参皂苷Rd能够显著抑制肝细胞中ROS和MDA的生成,增加GSH的含量和SOD的活性,从而抑制氧化应激反应。

TNF- α 作为一种重要的促炎细胞因子,在炎症、免疫调控以及细胞分化与凋亡中起关键作用。在肝脏中,TNF- α 主要由Kupffer细胞、脂肪细胞和肝细胞产生,并通过诱导线粒体功能障碍和ROS产生加剧肝细胞损伤和脂质过氧化^[16]。IL-1 β 是重要的炎症因子,已被证实可促进肝内脂质沉积和肝纤维化的进程^[17]。此外,IL-1 β 还可增强中性粒细胞和单核细胞的浸润,并与TNF- α 协同放大炎症信号。作为趋化因子,CCL2属于CC亚家族的一员,主要由免疫细胞和肝细胞分泌。CCL2通过与受体CCR2结合,招募单核细胞和巨噬细胞至炎症部位,

进一步释放TNF- α 与IL-1 β 等促炎因子,形成炎症正反馈循环^[18]。CXCL1属于CXC趋化因子亚家族,由约73个氨基酸组成,在结构上包含由两个半胱氨酸残基被一个非半胱氨酸氨基酸分隔开的特征基序。CXCL1通过招募中性粒细胞激活NLRP3炎症小体,促进IL-1 β 的成熟和释放,加剧炎症和纤维化^[19]。本研究结果证实,人参皂苷Rd能够显著抑制肝细胞中TNF- α 、IL-1 β 、CCL2和CXCL1的水平,从而达到改善肝脏炎症反应的作用。

内质网应激是指由于内质网腔内未折叠或错误折叠蛋白质的积累,导致内质网稳态失衡,从而激活未折叠蛋白反应的过程。未折叠蛋白反应通过激活3种跨膜传感器蛋白(PERK、IRE1、ATF6)来恢复内质网稳态^[20]。PERK是一种跨膜蛋白,其N端位于内质网腔内,C端具有激酶活性^[21]。当内质网中未折叠或错误折叠蛋白积累时,内质网伴侣蛋白GRP78/BiP从PERK上解离,导致PERK二聚化和自磷酸化,从而激活其激酶活性。激活的PERK促进eIF2 α Ser51位点的磷酸化^[22]。eIF2 α 的磷酸化通过阻碍翻译起始复合物的形成,减少新蛋白质的合成,从而减轻内质网负荷。磷酸化的eIF2 α 通过调控ATF4 mRNA的选择性翻译,导致ATF4蛋白的大量生成,并最终通过ATF4-CHOP轴的过度激活导致肝细胞凋亡、炎症和纤维化^[23,24]。本研究结果表明,内质网应激抑制剂能够通过显著抑制PERK/eIF2 α /CHOP通路的激活改善肝脏脂质蓄积、炎症反应和氧化应激,从而证实了内质网应激在NASH中的重要作用。而人参皂苷Rd能够显著抑制肝细胞内PERK、ATF4、CHOP蛋白的表达和eIF2 α 的磷酸化水平,从而改善由FFA诱导的内质网应激。

Derlin-1属于Derlin蛋白家族成员之一,是一种

内质网膜整合蛋白。Derlin-1作为内质网相关降解途径的核心组分,参与将错误折叠或未折叠的蛋白质从内质网逆向转运至细胞质,供蛋白酶体降解^[25]。已有研究证实,与对照组相比,在高脂饮食喂养的小鼠和NASH患者的肝脏中Derlin-1的表达水平显著增加^[26]。因此,靶向Derlin-1作为新的干预点具有治疗甚至逆转NASH的潜力。此外,Fan等^[27]的研究指出,Derlin-1在369例肝癌组织中的表达明显高于160例正常组织。机制研究结果证实,Derlin-1通过AKT通路促进肝癌的进展。

综上所述,人参皂苷Rd通过抑制内质网应激改善肝细胞脂质蓄积、氧化应激和炎症反应,为NASH的治疗提供了新的潜在策略。然而,本研究存在以下局限性:首先,尽管观察到人参皂苷Rd能够抑制PERK/eIF2 α /CHOP信号通路的激活,但研究结果并不能证实其作用是通过靶向Derlin-1实现的,其具体分子机制仍需进一步探索;其次,研究主要基于氧化应激和炎症反应,然而关于人参皂苷Rd对NASH肝纤维化的调控作用有待进一步研究。尽管如此,本研究为芪参汤治疗NASH提供了重要的科学依据,并提示内质网应激可能是一个潜在的治疗靶点。未来研究应着重于深入解析人参皂苷Rd调控内质网应激的具体靶点及分子机制。本研究将有助于推动NASH的精准治疗,并为中医药现代化提供新的研究方向。

作者贡献度说明:

路瑶和李丽萍:完成实验;王炳予:指标检测,袁星星:实验设计,实验数据进行统计,并撰写论文。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Yuan X, Yang L, Gao T, et al. YinChen WuLing powder attenuates non-alcoholic steatohepatitis through the inhibition of the SHP2/PI3K/NLRP3 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1423903.
- Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review[J]. *Hepatology*, 2023, 77(4):1335-1347.
- Kanwal F, Shubrook JH, Younossi Z, et al. Preparing for the NASH Epidemic: A call to action[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(3):1030-1042.
- 袁星星, 杨柳欣, 高佳炜, 等. 芪参汤治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察[J]. *现代中药研究与实践*, 2024, 38(2): 60-63.
- Yuan XX, Yang LX, Gao JW, et al. Clinical efficacy of Qishen decoction in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with phlegm and blood stasis syndrome [J]. *Mod Chin Med Res Pract*, 2024, 38(2):60-63.
- 高山, 高佳炜, 杨柳欣, 等. 基于TGR5介导的NLRP3炎症小体探讨芪参汤抑制巨噬细胞M1型极化改善非酒精性脂肪性肝炎的机制[J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(20): 1531-1538.
- Gao S, Gao JW, Yang LX, et al. Mechanism of Qishen decoction in inhibiting M1 polarization of macrophages and improving non-alcoholic steatohepatitis based on TGR5-mediated NLRP3 inflammasome [J]. *J Hainan Med Univ*, 2023, 29(20):1531-1538.
- 李琨, 王炳予, 张雅丽, 等. 基于FABP4/PPAR- γ /NF- κ B信号通路探讨芪参汤对非酒精性脂肪肝病小鼠肝脏炎症的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(10): 59-66.
- Li K, Wang BY, Zhang YL, et al. Effect of Qishen decoction on liver inflammation in non-alcoholic fatty liver disease mice based on FABP4/PPAR- γ /NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2022, 29(10):59-66.
- 袁维, 王炳予, 杨磊, 等. 芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察及对肠道菌群的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021, 29(6): 383-391.
- Yuan W, Wang BY, Yang L, et al. Clinical efficacy of Qishen decoction in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its effect on intestinal flora[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2021, 29(6):383-391.
- 张瑜玉, 张伟, 孔德志. 人参皂苷Rd的神经保护作用机制研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37(2): 92-97.
- Zhang YY, Zhang W, Kong DZ. Research progress on the neuroprotective mechanism of ginsenoside Rd [J]. *Mod Chin Med Res Pract*, 2023, 37(2):92-97.
- Cui L, Tan YJ, Xu SQ, et al. Ginsenoside Rd, a natural production for attenuating fibrogenesis and inflammation in hepatic fibrosis by regulating the ERR α -mediated P2X7r pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(12):5606-5619.
- 张艳秋, 何蒙蒙, 李学炎, 等. 大蓼金丝桃素B抑制mTORC1信号通路改善非酒精性脂肪肝炎的作用和机制研究[J]. *药学报*, 2023, 58(8): 2391-2401.
- Zhang YQ, He MM, Li XY, et al. Effect and mechanism of hyperforin B on improving non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting mTORC1 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58(8):2391-2401.
- Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, et al. Role of insulin resistance in MAFLD[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8):4156.
- 孙志东, 高佳炜, 杨柳欣, 等. 基于miR-495/FTO通路介导的巨噬细胞极化探讨芪参汤改善胰岛抵抗治疗

- 2型糖尿病的分子机制[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(14): 1075-1081.
- Sun ZD, Gao JW, Yang LX, et al. Molecular mechanism of Qishen decoction in improving insulin resistance and treating type 2 diabetes based on miR-495/FTO pathway-mediated macrophage polarization [J]. J Hainan Med Univ, 2023, 29(14):1075-1081.
- 13 李龙, 廖小立. 苦参中药汤剂对RA小鼠GSH、ROS和IL-18浓度的影响[J]. 北方药学, 2024, 21(11): 8-11.
Li L, Liao XL. Effect of Kushen decoction on GSH, ROS and IL-18 concentrations in RA mice [J]. North Pharm J, 2024, 21(11):8-11.
 - 14 Li J, Wang T, Liu P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation *via* the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD [J]. Food Funct, 2021, 12(9):3898-3918.
 - 15 王倩, 安颂歌, 王文川, 等. 王枣荷叶调脂汤联合穴位贴敷治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝病疗效及对血清SOD、MDA的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(2): 114-117.
Wang Q, An SG, Wang WC, et al. Efficacy of Wangzao Heye Lipid-regulating decoction combined with acupoint application in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease with phlegm and blood stasis syndrome and its effect on serum SOD and MDA levels [J]. J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2023, 33(2): 114-117.
 - 16 Tiegs G, Horst AK. TNF in the liver: Targeting a central player in inflammation [J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(4):445-459.
 - 17 姚春苗, 杨玲, 尚雪妍, 等. 三仁汤合茵陈五苓散加减联合多烯磷脂酰胆碱治疗非酒精性脂肪性肝病(湿热蕴结证)的疗效及对肝纤维化和血清IL-1 β 、内脂素、HO-1水平的影响[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(3): 56-63.
Yao CM, Yang L, Shang XY, et al. Efficacy of Sanren decoction combined with Yinchén Wuling powder and polyene phosphatidylcholine in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (damp-heat accumulation syndrome) and its effect on liver fibrosis and serum IL-1 β , visfatin and HO-1 levels [J]. Chin J Hepatol (Electron Ed), 2023, 15(3):56-63.
 - 18 Wu L, Lu Z, He B, et al. Pure total flavonoids from citrus improve nonalcoholic steatohepatitis liver inflammatory responses by regulating the CCL2/CCR2-PI3K-Akt signal transduction pathway [J]. Anat Rec (Hoboken), 2023, 306(12):3169-3177.
 - 19 占寿丰, 张津铭, 于牧鑫, 等. 中性粒细胞及中性粒细胞胞外诱捕网促进非酒精性脂肪性肝炎疾病进展的作用[J]. 安徽医药, 2024, 28(11): 2121-2126.
Zhan SF, Zhang JM, Yu MX, et al. Role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in promoting the progression of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Anhui Med J, 2024, 28(11): 2121-2126.
 - 20 张秋令, 姚黎超, 李汛, 等. 未折叠蛋白反应在非酒精性脂肪性肝病中的作用研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2024, 33(7): 917-921.
Zhang QL, Yao LC, Li X, et al. Research progress on the role of unfolded protein response in non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2024, 33(7):917-921.
 - 21 王映云, 于利国, 曹海燕, 等. PERK信号通路介导的线粒体未折叠蛋白反应在低氧缺血性脑损伤中的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2024, 49(10): 1081-1087.
Wang YY, Yu LG, Cao HY, et al. Role of PERK signaling pathway-mediated mitochondrial unfolded protein response in hypoxic-ischemic brain injury [J]. J Chongqing Med Univ, 2024, 49(10): 1081-1087.
 - 22 李贞, 余冬平, 罗武, 等. FABP4沉默通过调节PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP信号通路对妊娠糖尿病大鼠内质网应激和胰岛素抵抗的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(4):705-713.
Li Z, Yu DP, Luo W, et al. Effect of FABP4 silencing on endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in gestational diabetes mellitus rats by regulating PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(4):705-713.
 - 23 Hao L, Zhong W, Dong H, et al. ATF4 activation promotes hepatic mitochondrial dysfunction by repressing NRF1-TFAM signalling in alcoholic steatohepatitis [J]. Gut, 2021, 70(10):1933-1945.
 - 24 Li J, Li X, Liu D, et al. Phosphorylation of eIF2 α signaling pathway attenuates obesity-induced non-alcoholic fatty liver disease in an ER stress and autophagy-dependent manner [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12):1069.
 - 25 Rao B, Li S, Yao D, et al. The cryo-EM structure of an ERAD protein channel formed by tetrameric human Derlin-1 [J]. Sci Adv, 2021, 7(10): eabe8591.
 - 26 Wang T, Wang D, Kuang G, et al. Derlin-1 promotes diet-induced non-alcoholic fatty liver disease *via* increasing RIPK3-mediated necroptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 217:29-47.
 - 27 Fan J, Tian L, Huang S, et al. Derlin-1 promotes the progression of human hepatocellular carcinoma *via* the activation of AKT pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:5407-5417.