

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2024.10.017

论著 · 基础

人参皂苷 Rb1 调控线粒体自噬对脓毒症血管内皮的保护作用及其机制研究

卢彩云,刘畅,黄敏,张洪泉,陶星宇,贾宝辉



基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(212102310724); 江西省青年科学基金资助项目(2020BABL216002); 江西省中医药管理局科技计划课题(2022B325)

作者单位: 453000 河南新乡 新乡医学院(卢彩云); 450000 郑州 郑州大学附属郑州中心医院急诊科(卢彩云、刘畅、贾宝辉); 330000 南昌 南昌市第一医院老年医学科(黄敏); 330000 南昌 南昌大学(张洪泉、陶星宇)

通信作者: 贾宝辉, E-mail: bhjia@126.com

【摘要】 目的 研究人参皂苷 Rb1 通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/糖原合成激酶 3β (PI3K/AKT/GSK3β) 信号通路调控线粒体自噬对脓毒症血管内皮的保护作用及机制。方法 健康 SPF 级雄性昆明小鼠 30 只随机分为 5 组: 假手术组 (Sham 组)、脓毒症组 (CLP 组)、人参皂苷 Rb1+脓毒症组 (人参皂苷 Rb1 组)、PI3K 抑制剂 LY294002+人参皂苷 Rb1+脓毒症组 (LY294002 组) 和线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1+人参皂苷 Rb1+脓毒症组 (Mdivi-1 组), 每组 6 只。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制脓毒症小鼠模型, 每组给予相应药物处理。术后观察小鼠一般情况, 24 h 后取主动脉组织样本, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察主动脉组织病理学改变, 免疫组织化学法检测 vWF、p-AKT、p-GSK3β 及线粒体自噬相关蛋白 Parkin 的水平。结果 Sham 组及人参皂苷 Rb1 组小鼠一般情况及腹腔感染情况较轻, 主动脉组织内膜结构完整, 细胞排列较整齐, 形态分布规则; CLP 组和抑制剂组均可见不同程度的内膜损伤突起, 中膜增生且排列紊乱, 管壁厚薄不一。免疫组化结果显示, 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠主动脉 vWF、Parkin 表达升高 ($P<0.05$), p-AKT、p-GSK3β 表达降低 ($P<0.05$)。与 CLP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组 vWF 表达明显降低 ($P<0.05$), p-AKT、p-GSK3β 及 Parkin 表达升高 ($P<0.05$)。与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组 p-AKT、p-GSK3β 及 Parkin 表达降低, vWF 升高 ($P<0.05$), Mdivi-1 组 p-AKT 及 p-GSK3β 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), Parkin 表达明显降低, vWF 升高 ($P<0.05$)。与 LY294002 组比较, Mdivi-1 组 p-AKT、p-GSK3β 表达明显升高 ($P<0.05$), Parkin 表达降低 ($P<0.05$)。结论 人参皂苷 Rb1 通过激活 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬, 进而对脓毒症血管内皮起保护作用。

【关键词】 脓毒症; 人参皂苷 Rb1; 血管内皮; 线粒体自噬; PI3K/AKT/GSK3β 通路; 作用机制; 小鼠

【中图分类号】 R459.7; R285.5 **【文献标识码】** A

The protective effects and mechanisms of ginsenoside Rb1 on vascular endothelium of sepsis by regulating mitophagy

Lu Caiyun*, Liu Chang, Huang Min, Zhang Hongquan, Tao Xingyu, Jia Baohui.* Xinxiang Medical University, Henan Province, Xinxiang 453000, China

Funding program: Key Research and Development and Promotion Special (Science and Technology Tackling) Project of Henan Province (212102310724); Jiangxi Provincial Youth Science Foundation Grant (2020BABL216002); Jiangxi Provincial Health and Family Planning Commission Traditional Chinese Medicine Scientific Research Program (2022B325)

Corresponding author: Jia Baohui, E-mail: bhjia@126.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect and mechanism of ginsenoside Rb1 on vascular endothelium of sepsis by regulating mitophagy through phosphatidylinositol-3 kinase /protein kinase B/glycogen synthase kinase 3β (PI3K/AKT/GSK3β) signaling pathway. **Methods** Healthy male Kunming mice were randomly divided into 5 groups: Sham operation group (Sham group), sepsis group (CLP group), ginsenoside Rb1+ sepsis group (ginsenoside Rb1 group), PI3K inhibitor LY294002+ ginsenoside Rb1+ sepsis group (LY294002 group) and mitophagy inhibitor Mdivi-1+ ginsenoside Rb1+ sepsis group (Mdivi-1 group). The sepsis mouse model was replicated by cecal ligation and puncture (CLP). Each group was treated with corresponding drugs. The general condition of mice was observed after operation. After 24 hours, aortic tissue samples were taken to observed the pathological changes by Hematoxylin-eosin (HE) staining and detected the expression levels of vWF, p-AKT, p-GSK3β and Parkin by immunohistochemistry. **Results** The general condition and abdominal infection of

mice in the Sham group and the ginsenoside Rb1 group were mild, the intima structure of the aortic tissue was complete, the cells were arranged neatly, and the shape distribution was regular. In the CLP group and the inhibitor group, there were different degrees of intimal damage hyperplasia and disordered arrangement of the media, and different thickness of the wall. Immunohistochemical results showed that compared with the Sham group, the expression of vWF and Parkin in the CLP group was increased ($P < 0.05$), and the expression of p-AKT and p-GSK3 β was decreased ($P < 0.05$). Compared with the CLP group, the expression of vWF in the ginsenoside Rb1 group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of p-AKT, p-GSK3 β and Parkin was increased ($P < 0.05$). Compared with ginsenoside Rb1 group, the expression of p-AKT, p-GSK3 β and Parkin were decreased in LY294002 group ($P < 0.05$), and the expressions of p-AKT and p-GSK3 β were not significantly different in Mdivi-1 group, but the expression of Parkin was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with LY294002 group, the expression of p-AKT and p-GSK3 β was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of Parkin was decreased in Mdivi-1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 promotes mitophagy by activating PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway, which has a protective effect on vascular endothelium in patients with sepsis.

【Key words】 Sepsis; Ginsenoside Rb1; Vascular endothelium; Mitochondrial autophagy; PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway; Mechanism

脓毒症是由于宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍,是威胁人类生命健康的主要原因之一。血管内皮功能障碍可导致炎症反应失衡、毛细血管渗漏和凝血异常,在脓毒症相关的器官功能障碍的发病机制中起着重要作用^[1]。因此,血管内皮是治疗脓毒症的一个潜在靶点。通过深入研究血管内皮功能障碍的分子机制,或能找到更有效的治疗方法来降低脓毒症的病死率。

人参皂苷 Rb1 是我国传统中药人参发挥药效的主要成分之一。有研究者发现,人参皂苷 Rb1 可以激活 PI3K/AKT/GSK3 β (phosphatidylinositol-3 kinase / protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β) 信号通路来提高血管内皮生长因子及其受体的表达水平^[2]。本课题组前期研究发现,人参皂苷 Rb1 能够减轻脓毒症和感染性休克引起的器官损伤,其机制可能与拮抗炎症因子抑制内质网应激的过表达有关^[3-5]。内质网应激时,经由线粒体相关内质网膜(MAM)介导,Ca²⁺大量进入线粒体,造成线粒体钙超载,引起线粒体功能障碍^[6]。线粒体自噬是选择性清除受损线粒体的过程^[7]。脓毒症时,通过激活线粒体自噬,清除受损线粒体,维持细胞稳态,对各组织器官起保护作用^[8-9]。然而对于脓毒症血管内皮损伤时,人参皂苷 Rb1 干预对线粒体自噬的影响及 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路在其中发挥的作用尚不清楚。本研究拟通过盲肠结扎穿孔术复制脓毒症小鼠模型,观察人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠血管内皮损伤的保护作用,并探讨其与线粒体自噬以及 PI3K/AKT/GSK3 β 信号传导通路的关系,报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 6~8 周龄健康 SPF 级雄性昆明小鼠 30 只(体质量 35~40 g),购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号 SCXK(京)2019-0010]。动物于室温 23

~25℃ 相对湿度 50%~70%的环境下,适应性喂养 1 周。自由饮水摄食,明暗节律 12 h/12 h。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求,本研究已由郑州市中心医院伦理委员会审核批准(202372)。

1.2 主要试剂与仪器 人参皂苷 Rb1(上海源叶生物科技有限公司,批号:G01011Y1264291); HE 染色试剂盒(广州硕谱生物科技有限公司,批号 22059595); 线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1(美国 MCE 公司,批号 HY-15886); 乌拉坦(合肥巴斯夫生物科技有限公司,批号:BSF201009); vWF 抗体、Parkin 抗体(武汉 Abclonal 公司,批号分别为 3500012029、3523041463); p-AKT 抗体、p-GSK3 β 抗体(美国 invitrogen 公司,批号分别为 1944235、WE3280654); 山羊抗兔 IgG 抗体(上海中杉金桥试剂公司,批号为 210060324); 光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 实验方法 实验于 2022 年 8 月—2023 年 6 月在河南省天然药物提取和医疗技术应用工程研究中心进行。将 30 只小鼠随机分为 5 组:假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLP 组)、脓毒症+人参皂苷 Rb1 组(人参皂苷 Rb1 组)、脓毒症+人参皂苷 Rb1+PI3K 抑制剂组(LY294002 组)和脓毒症+人参皂苷 Rb1+线粒体自噬抑制剂组(Mdivi-1 组),每组 6 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症小鼠模型。小鼠术前适应性喂养 7 d。术前禁食 12 h,20%乌拉坦(2 000 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,麻醉成功后于左下腹做 1.0~1.5 cm 纵行切口,游离肠系膜及盲肠,在距盲肠盲端 2/3 长度处环行结扎,在距盲肠末端 1 cm 处贯通穿刺,挤出少许粪便,回纳肠系膜和盲肠入腹腔,逐层缝合关腹。其中 Sham 组仅进行开腹关腹,不进行结扎穿孔;人参皂苷 Rb1 组腹腔注射 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1; LY294002 组腹腔注射 0.3 mg/kg LY294002(PI3K

特异性抑制剂) ,30 min 后给予 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1 腹腔注射; Mdivi-1 组腹腔注射 25 mg/kg Mdivi-1(线粒体自噬抑制剂) ,30 min 后给予 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1 腹腔注射; Sham 组和 CLP 组术后腹腔注射同等体积的生理盐水。各组药物每 8 h 腹腔注射 1 次,共 3 次。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 小鼠一般情况观察:造模术后观察小鼠一般情况,包括有无萎靡、脓性尿、黏液便、眼角分泌物增加及进食、活动情况。处死动物后观察小鼠结扎盲肠情况,有无缺血、乌黑、坏疽、周围有无大量脓液;观察腹水情况,有无脓性、血性腹水,有无恶臭等。

1.4.2 HE 染色观察主动脉组织病理学变化:模型制备成功后,在 CLP 后 24 h 进行取材。小鼠 20% 乌拉坦(2 000 mg/kg) 麻醉后,取主动脉,置于 4% 多聚甲醛中固定,梯度酒精脱水后进行石蜡包埋和切片。将切片依次浸入二甲苯及梯度酒精中进行脱蜡至水。蒸馏水冲洗后依次进行苏木素染色液染色、分化液分化、伊红染色。最后将切片依次浸入梯度酒精及二甲苯中进行脱水,最后使用中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.4.3 免疫组化检测主动脉组织蛋白水平:取小鼠主动脉 4% 多聚甲醛固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片后,使用二甲苯及梯度酒精脱蜡至水,然后置于柠檬酸(pH6.0) 抗原修复液中,微波炉加热进行抗原修复,之后放于 3% 过氧化氢溶液中阻断内源性过氧化物酶,3% BSA 均匀覆盖组织,37℃ 封闭 30 min。甩掉封闭液,滴加相应按一定比例配置好的一抗(vWF、p-AKT、p-GSK3 β 或 Parkin 抗体),玻片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。次日滴加与一抗相应种属的二抗(山羊抗兔或山羊抗小鼠),37℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤后依次进行 DAB 显色、苏木素复染、1% 盐酸酒精分化、返蓝液返蓝,将切片依次放入梯度酒精及二甲苯中脱水,中性树胶封片。光学显微镜下拍照观察,使用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析,计算免疫组化图片平均光密度值(累计光密度值与面积的比值 OD/Area)。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多重比较采用 LSD(L) 法和 S-N-K(S) 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况比较 与 Sham 组及人参皂苷 Rb1 组相比,其余 3 组小鼠术后表现精神萎靡,活动及进食减少,出现竖毛、糊状便及脓性尿,开腹后可闻及腹腔有恶臭,结扎盲肠有缺血、乌黑、坏疽,且被腹腔内肠道

等组织包裹,与周围粘连。

2.2 人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠主动脉组织病理改变的影响 HE 染色显示,Sham 组小鼠内膜光滑连续,细胞排列整齐,各层结构完整,血管形态分布规则。CLP 组小鼠内膜可见明显损伤突起,各层结构紊乱,管壁厚薄不一,失去规则。人参皂苷 Rb1 组较 CLP 组主动脉组织病理改变明显改善,内膜较光滑,中膜少量增生变厚,各层结构较为完整,形态分布规则。LY294002 组和 Mdivi-1 组较人参皂苷 Rb1 组主动脉组织损伤加重,各层结构紊乱,中膜明显增生,管壁厚薄不一,见图 1。

2.3 各组小鼠主动脉组织 vWF 水平比较 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与人参皂苷 Rb1 组比较,LY294002 组和 Mdivi-1 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平呈现不同程度升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、表 1。

2.4 各组小鼠主动脉组织 p-AKT 水平比较 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉 p-AKT 蛋白水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组 p-AKT 水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与人参皂苷 Rb1 组比较,LY294002 组 p-AKT 蛋白水平明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),Mdivi-1 组 p-AKT 蛋白水平差异不明显($P > 0.05$);与 LY294002 组比较,Mdivi-1 组 p-AKT 蛋白水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 3、表 1。

2.5 各组小鼠主动脉组织 p-GSK3 β 水平比较 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉 p-GSK3 β 蛋白水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组 p-GSK3 β 水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与人参皂苷 Rb1 组比较,LY294002 组 p-GSK3 β 蛋白水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),Mdivi-1 组 p-GSK3 β 蛋白水平差异不明显($P > 0.05$);与 LY294002 组比较,Mdivi-1 组 p-GSK3 β 蛋白水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 4、表 1。

2.6 各组小鼠主动脉组织 Parkin 水平比较 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与人参皂苷 Rb1 组比较,LY294002 组和 Mdivi-1 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 5、表 1。

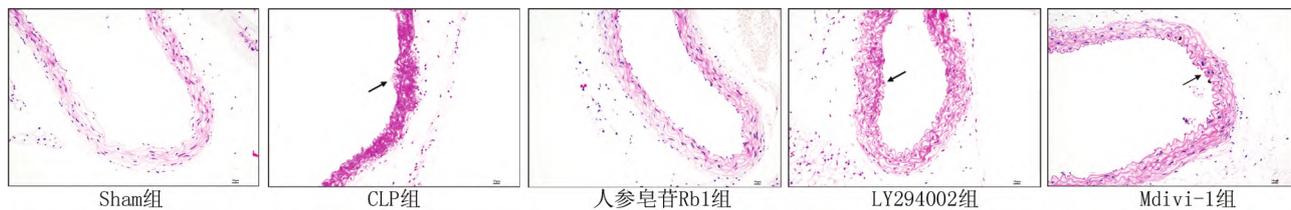


图 1 各组小鼠主动脉组织病理变化比较(HE 染色 ×200)

Fig.1 Pathological changes in aortic tissue of mice in each group (HE staining , × 200)

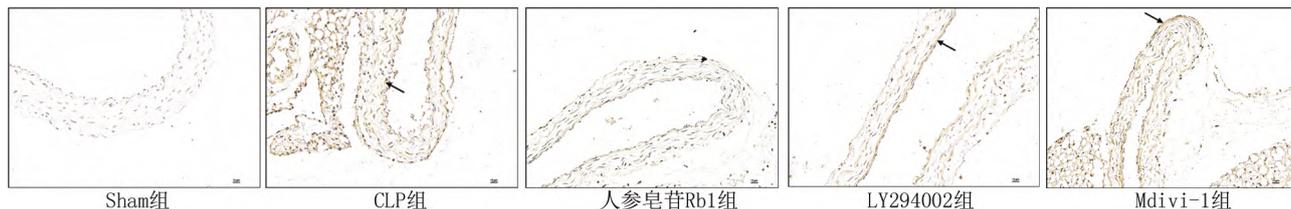


图 2 各组小鼠主动脉组织血管损伤标志物 vWF 水平比较(免疫组化染色 ×200)

Fig.2 Comparison of vWF levels , a vascular injury marker in the aortic tissue of mice in different groups (immunohistochemistry , × 200)

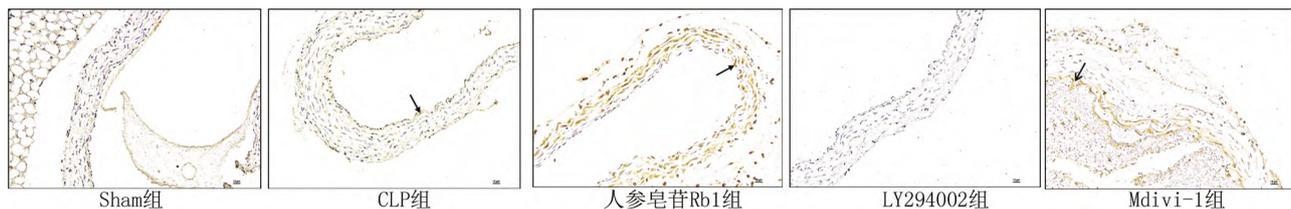


图 3 各组小鼠主动脉组织信号通路标志物 p-AKT 水平比较(免疫组化染色 ×200)

Fig.3 Comparison of p-AKT levels in aortic tissue signaling pathway markers among different groups of mice (immunohistochemistry , × 200)

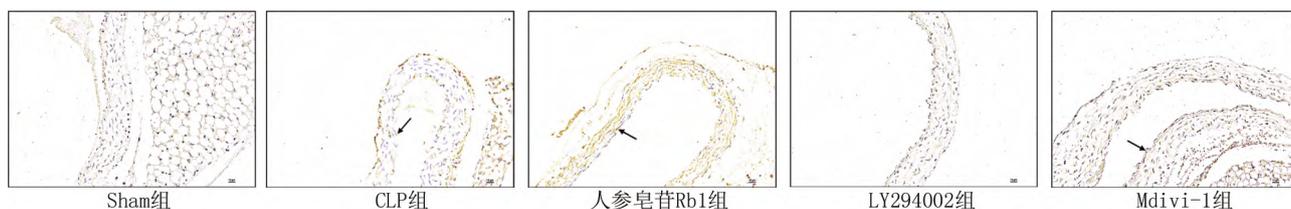


图 4 各组小鼠主动脉组织信号通路标志物 p-GSK3β 水平比较(免疫组化染色 ×200)

Fig.4 Comparison of p-GSK3 β levels in aortic tissue signaling pathway markers among different groups of mice (immunohistochemistry , × 200)

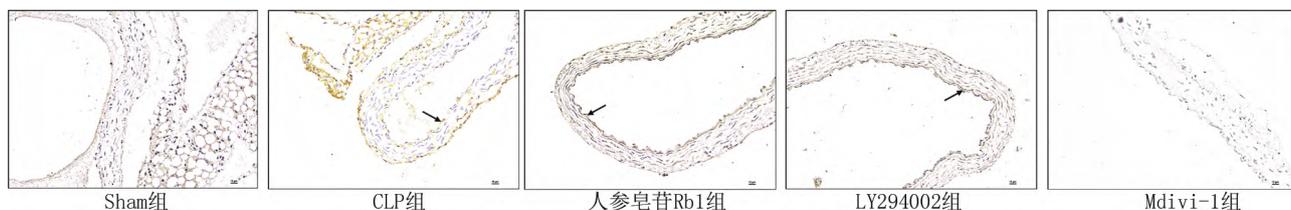


图 5 各组小鼠主动脉组织血管损伤标志物 Parkin 水平比较(免疫组化染色 ×200)

Fig.5 Comparison of Parkin levels , a marker of aortic tissue vascular injury , among different groups of mice (immunohistochemistry , × 200)

表 1 各组小鼠主动脉 vWF、p-AKT、p-GSK3β 及 Parkin 蛋白水平比较 (x±s)

Tab.1 Comparison of vWF , p-AKT , p-GSK3 β , and Parkin protein levels in the aorta of mice in each group

组 别	n	vWF	p-AKT	p-GSK3β	Parkin
Sham 组	6	0.095±0.009	0.115±0.006	0.101±0.014	0.106±0.010
CLP 组	6	0.126±0.010 ^a	0.100±0.005 ^a	0.086±0.007 ^a	0.119±0.007 ^a
人参皂苷 Rb1 组	6	0.097±0.010 ^b	0.133±0.012 ^b	0.112±0.007 ^b	0.131±0.008 ^b
LY294002 组	6	0.111±0.006 ^c	0.100±0.005 ^c	0.086±0.005 ^c	0.120±0.009 ^c
Mdivi-1 组	6	0.109±0.012 ^c	0.132±0.024 ^d	0.109±0.016 ^d	0.110±0.003 ^{cd}

注:与 Sham 组比较 ,^aP<0.05;与 CLP 组比较 ,^bP<0.05;与 人参皂苷 Rb1 组比较 ,^cP<0.05;与 LY294002 组比较 ,^dP<0.05。

3 讨 论

血管内皮细胞作为血管壁的重要组成部分,是维持血管内皮功能的主要细胞^[10]。脓毒症时血管内皮细胞向促凋亡、促炎、促黏附和促凝表型转化^[11]。适当的内皮细胞改变可以起到限制细菌扩散、协调白细胞募集以及细菌清除的作用,但是严重的、持续的内皮表型改变可能会导致微循环血流受阻、组织灌注不足和威胁生命的器官衰竭^[12]。血管内皮在脓毒症发病过程中经历了巨大的变化,是脓毒症治疗发展过程中引人注目的目标之一。

人参皂苷 Rb1 具有多种生物活性,可以通过抑制炎症反应、调节自噬和免疫等多种方式在疾病治疗中发挥作用^[13]。既往研究表明^[5-7],人参皂苷 Rb1 能够减轻脓毒症小鼠心肌和肺组织内质网应激因子表达,减轻脓毒症小鼠的感染程度,对脓毒症小鼠心肌和肺组织具有保护作用。本研究发现,与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉组织血管内皮损伤标志物 vWF 蛋白水平明显升高,主动脉组织病理学改变明显,内膜见明显损伤突起,各层结构紊乱,管壁厚薄不一,失去规则,提示脓毒症诱导的炎症反应使小鼠主动脉组织损伤明显。而人参皂苷 Rb1 组相较于 CLP 组 vWF 蛋白水平明显降低,主动脉组织病理改变对比明显,内膜较光滑,中膜少量增生变厚,结构完整,形态分布规则,提示人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠主动脉组织也具有保护作用。

脓毒症可通过增加氧化应激,降低抗氧化防御,导致线粒体 ROS 过量产生,致使线粒体功能缺陷,引起 ROS 产生增多和 ATP 生成障碍,进一步破坏线粒体功能和稳态,加剧血管内皮损伤^[14]。线粒体自噬则是清除受损线粒体、维持线粒体功能的重要途径。越来越多的研究表明,通过调控线粒体自噬可以减少血管内皮的损伤^[15-16]。PINK1/Parkin 诱导的自噬是线粒体自噬的主要方式^[17]。有研究发现,人参皂苷 Rb1 可以增加 PINK1、Parkin 的表达,表明人参皂苷 Rb1 能够通过激活线粒体自噬相关的 PINK1/Parkin 通路,激活细

胞的线粒体自噬,以达到清除受损线粒体的作用^[18]。本研究发现,CLP 组小鼠主动脉组织损伤明显, Parkin 水平较 Sham 组升高,提示在脓毒症早期,线粒体功能发生障碍,内皮细胞能够在一定程度上增强线粒体自噬,以达到维持细胞稳态的目的。人参皂苷 Rb1 干预后, vWF 蛋白水平降低, Parkin 水平进一步升高,线粒体自噬水平明显升高,降低了主动脉组织的损伤程度。而线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 则部分阻断了人参皂苷 Rb1 对主动脉组织的保护作用,使血管内皮病理损伤加重, vWF 水平升高, Parkin 水平明显降低。这提示人参皂苷 Rb1 可以作用于 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬水平,发挥其对脓毒症血管内皮的保护作用。

PI3K/AKT 信号通路是一种经典的细胞内信号转导通路,能够调节细胞增殖、代谢、凋亡、生长和血管生成等多种细胞生物过程。GSK3 参与了包括 PI3K/AKT 在内的许多与疾病病理相关的信号通路,是治疗脓毒症等炎症疾病的有效靶点之一^[19]。AKT 介导的 GSK3α 和 GSK3β 在 Ser21 和 Ser9 位点的磷酸化可以抑制 GSK3 的活性。有研究者在实验中观察到,与正常对照组比较,脓毒症小鼠心肌组织中 p-GSK3β 蛋白水平降低^[20]。GSK3β 能够参与线粒体能量代谢、运动、凋亡等过程,抑制 GSK3β 活性可以上调线粒体自噬相关蛋白 Parkin 水平^[21]。此外,有研究者发现,人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI3K/AKT 使 GSK3β 磷酸化而失去活性^[22]。本研究发现,与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组 p-AKT、p-GSK3β 及 Parkin 蛋白水平明显升高,使用线粒体自噬抑制剂后, Mdivi-1 组较人参皂苷 Rb1 组 Parkin 水平明显降低,线粒体自噬过程被抑制,主动脉组织病理损伤加重。而使用 PI3K 抑制剂 LY294002 后, p-AKT、p-GSK3β 及 Parkin 水平均降低,主动脉组织损伤加重,接近 CLP 组。上述结果表明,人参皂苷 Rb1 可以激活 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬,进而对脓毒症血管内皮起保护作用。

综上所述,人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬,显著改善脓毒症时小鼠血管内皮损伤。且在研究中发现使用信号通路抑制剂后,线粒体自噬标志蛋白水平仍高于线粒体自噬抑制剂组,线粒体自噬过程不能被完全阻断。因此,人参皂苷 Rb1 可能也通过其他途径调节线粒体自噬过程,其确切调节机制有待进一步研究。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

卢彩云、黄敏: 设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;刘畅、陶星宇、贾宝辉: 提出研究思路,论文修改、审核;张洪泉: 实施研究过程,论文修改

参考文献

[1] Vincent JL, Ince C, Pickkers P. Endothelial dysfunction: A therapeutic target in bacterial sepsis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25 (9): 733-748. DOI: 10. 1080/14728222. 2021.1988928.

[2] Zhang H, Su Y, Wang J, et al. Ginsenoside Rb1 promotes the growth of mink hair follicle via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 229 (2019): 210-218. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2019.05.033.

[3] 徐宏平,贾宝辉,艾启帆,等.人参皂甙 Rb1 对感染性休克大鼠重要器官的保护作用 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2014, 49(3): 319-322. DOI: 10. 13705/j. issn. 1671-6825. 2014.03.007.

[4] 黄敏,陶星宇,贾宝辉,等.人参皂苷 Rb1 调控内质网应激对脓毒症小鼠重要脏器的保护作用 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16 (30): 17-20, 5.

[5] Wu LL, Jia BH, Sun J, et al. Protective effects of ginsenoside Rb1 on septic rats and its mechanism [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27 (4): 300-303. DOI: 10.3967/bes2014.053.

[6] Liu H, Li X, Wang Z, et al. Elaidic acid leads to mitochondrial dysfunction via mitochondria-associated membranes triggers disruption of mitochondrial calcium fluxes [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13 (1): 287-298. DOI: org/10. 26599/FSHW. 2022.9250024.

[7] Li A, Gao M, Liu B, et al. Mitochondrial autophagy: Molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 444. DOI: 10.1038/s41419-022-04906-6.

[8] Zhang Z, Chen Z, Liu R, et al. Bcl-2 proteins regulate mitophagy in lipopolysaccharide-induced acute lung injury via pink1/parkin signaling pathway [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 1-20. DOI: 10.1155/2020/6579696.

[9] Wang Y, Zhu J, Liu Z, et al. The PINK1/PARK2/optineurin pathway of mitophagy is activated for protection in septic acute kidney injury [J]. *Redox Biology*, 2021, 38: 101767. DOI: 10.1016/j. redox.2020.101767.

[10] Dolmatova EV, Wang K, Mandavilli R, et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications [J]. *Cardiovascular*

Research, 2021, 117(1): 60-73. DOI: 10.1093/cvr/cvaa070.

[11] Joffe J, Hellman J, Ince C, et al. Endothelial responses in sepsis [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, 202(3): 361-370. DOI: 10.1164/rccm.201910-1911TR.

[12] Fernández S, Palomo M, Molina P, et al. Progressive endothelial cell damage in correlation with sepsis severity. Defibrotide as a contender [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2021, 19 (8): 1948-1958. DOI: 10.1111/jth.15343.

[13] Chen S, Li X, Wang Y, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia/reperfusion-induced inflammation and oxidative stress via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3633-3641. DOI: 10.3892/mmr.2019.10018.

[14] Yang H, Zhang Z. Sepsis-induced myocardial dysfunction: The role of mitochondrial dysfunction [J]. *Inflammation Research*, 2021, 70 (4): 379-387. DOI: 10.1007/s00011-021-01447-0.

[15] Cao Y, Chen X, Pan F, et al. Xinmaikang-mediated mitophagy attenuates atherosclerosis via the PINK1/Parkin signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154955. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2023.154955.

[16] Kong X, Lin D, Lu L, et al. Apelin-13-Mediated AMPK ameliorates endothelial barrier dysfunction in acute lung injury mice via improvement of mitochondrial function and autophagy [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101(Pt B): 108230. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2021.108230.

[17] Wu Y, Jiang T, Hua J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in cardiovascular disease: From pathogenesis to novel therapy [J]. *International Journal of Cardiology*, 2022, 361: 61-69. DOI: 10.1016/j. ijcard. 2022.05.025.

[18] Zhang Q, Hu J, Mao A, et al. Ginsenoside Rb1 alleviated concanavalin A-induced hepatocyte pyroptosis by activating mitophagy [J]. *Food & Function*, 2023, 14(8): 3793-3803. DOI: 10. 1039/d2fo03130b.

[19] Zhu Y, Wang H, Guo Y, et al. Advances in the therapeutic potential of inhibitors targeting glycogen synthase kinase 3 in inflammatory diseases [J]. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, 2023, 23 (19): 1893-1904. DOI: 10.2174/1389557523666230412083123.

[20] Jin Y, Wang H, Li J, et al. Exploring the beneficial role of telmisartan in sepsis-induced myocardial injury through inhibition of high-mobility group box 1 and glycogen synthase kinase-3 β /nuclear factor- κ B pathway [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2020, 24 (4): 311-317. DOI: 10.4196/kjpp.2020.24.4.311.

[21] Balasubramaniam M, Parcon PA, Bose C, et al. Interleukin-1 β drives NEDD8 nuclear-to-cytoplasmic translocation, fostering parkin activation via NEDD8 binding to the P-ubiquitin activating site [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 275-291. DOI: 10. 1186/s12974-019-1669-z.

[22] Zhang H, Su Y, Wang J, et al. Ginsenoside Rb1 promotes the growth of mink hair follicle via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 229: 210-218. DOI: 10.1016/j. lfs. 2019.05.033.

(收稿日期: 2024-05-17)