

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.08.004

人参皂苷 Rg3 通过调节自噬减轻脓毒症心肌损伤 *

袁瑶薇¹ 王文宇² 白秀萍³ 王晓慧¹ 张 博^{3Δ}

(1 黑龙江中医药大学 基础医学院 解剖学与组胚学教研室 黑龙江 哈尔滨 150040;

2 哈尔滨医科大学附属第二医院 医保办公室 黑龙江 哈尔滨 150086;

3 哈尔滨医科大学附属第四医院 心血管内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨人参皂苷 Rg3(ginsenoside Rg3, Rg3)对脓毒症介导的心肌损伤的作用效果及机制。**方法:**本研究通过对小鼠进行盲肠结扎穿孔手术的方法构建脓毒症模型。32 只 BALB/c 小鼠随机分为假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLP 组)、人参皂苷 Rg3 治疗组(Rg3+CLP 组)以及自噬抑制剂干预组(3-MA+Rg3+CLP 组),每组 8 只。术后 18 h 分别留取各组小鼠血浆及心肌组织。通过 ELISA 方法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)及半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达水平。通过 HE 染色观察心肌组织形态结构的变化。应用 Western-blot 方法检测自噬及 NLRP3 炎性小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)的表达。**结果:**与 Sham 组相比,CLP 组小鼠心肌组织结构紊乱,炎性细胞浸润明显。另外, Caspase-3 活性增加, NLRP3 炎性小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)表达升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 CLP 组相比,外源应用 Rg3 组小鼠心肌组织炎性细胞浸润减少,并且 Caspase-3 活性降低, NLRP3 炎性小体相关蛋白表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$),而部分自噬相关蛋白表达升高。应用自噬抑制剂后,较单纯应用 Rg3 组,心肌组织损伤明显,而 NLRP3 炎性小体活性增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**脓毒症时 NLRP3 炎性小体激活,释放大量的细胞因子,进而导致心肌损伤。而 Rg3 治疗后,可以调节心肌细胞自噬,抑制 NLRP3 炎性小体激活,进而减轻细胞因子对心肌细胞的损伤。本研究表明 Rg3 可能通过调节心肌自噬,抑制 NLRP3 炎性小体的激活,进而减轻脓毒症时心脏的损伤。

关键词:人参皂苷 Rg3;脓毒症;自噬;NLRP3 炎性小体

中图分类号:R-33;R631.2;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)08-1419-05

Ginsenoside Rg3 Alleviates Myocardial Impairment via Autophagy in Sepsis*

YUAN Yao-wei¹, WANG Wen-yu², BAI Xiu-ping³, WANG Xiao-hui¹, ZHANG Bo^{3Δ}

(1 Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China; 2 Department of Medical Care Insurance, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China; 3 Department of Cardiology, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanism of ginsenoside Rg3 (Rg3) on sepsis mediated myocardial injury. **Methods:** In this study, sepsis models were constructed by cecal ligation and perforation (CLP). 32 BALB/c mice were randomly divided into sham operation group (Sham group), sepsis group (CLP group), ginsenoside Rg3 treatment group (Rg3+CLP group) and autophagy inhibitor intervention group (3-MA+Rg3+CLP group), with 8 mice in each group. Plasma and myocardial tissue were collected 18 h after operation. The expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) and cysteine protease-3 (Caspase-3) were detected by ELISA. Our research group observed the changes in the morphological structures of myocardial tissue by HE staining and detected the expression of autophagy and NLRP3 inflammasome associated proteins (NLRP3, ASC, Caspase-1) by Western-blot method. **Results:** Compared with Sham group, the myocardial tissue structures of mice in CLP group were disorganized, and inflammatory cell infiltration was obvious. In addition, Caspase-3 activity and the expression levels of NLRP3 inflammasome associated proteins (NLRP3, ASC, Caspase-1) were increased ($P<0.05$). Compared with CLP group, inflammatory cell infiltration in myocardial tissue of mice in Rg3+CLP group was reduced. Moreover, Caspase-3 activity and the expression levels of NLRP3 inflammasome associated proteins were decreased ($P<0.05$), while the expression levels of some autophagy associated proteins were increased. After the application of autophagy inhibitor, compared with Rg3+CLP group, the myocardial injury was more obvious, and the NLRP3 inflammasome activity was increased ($P<0.05$). **Conclusions:** In sepsis, NLRP3 inflammasome is activated, releasing large amounts of cytokines, which in turn leads to myocardial injury. After treatment of Rg3, it can regulate the autophagy of cardiomyocytes and inhibit the activation of NLRP3 inflammasome, thereby reducing the injury of cardiomyocytes by cytokines. This

* 基金项目:黑龙江省中医药科研项目(ZHY2020-171;ZHY2020-172);黑龙江省青年科学基金项目(QC2016106)

作者简介:袁瑶薇(1986-),女,硕士研究生,讲师,主要研究方向:中西医结合基础,电话:0451-82193433, E-mail: weiweichunfeng@126.com

Δ 通讯作者:张博(1986-),女,博士研究生,主治医师,主要研究方向:心脏损伤, E-mail: zhangbo_zobe@163.com

(收稿日期:2021-09-22 接受日期:2021-10-23)

study suggests that Rg3 may inhibit the activation of NLRP3 inflammasome by regulating the autophagy of cardiomyocytes, thereby alleviating myocardial injury in sepsis.

Key words: Ginsenoside Rg3; Sepsis; Autophagy; NLRP3 inflammasome

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)08-1419-05

前言

脓毒症是从感染、脓毒症、严重脓毒症到脓毒症休克的复杂病理生理过程。对于脓毒症的诊断和治疗方法虽然已经有了巨大的进展,但感染性休克仍然与高死亡率相关。每年全世界约有 1800 余万新发脓毒症患者^[1]。根据目前流行病学调查显示,脓毒症为 ICU 非心脏病患者死亡的主要原因^[2]。特别是脓毒症合并心脏损伤的患者其死亡率大大提高。脓毒症发生时,炎性小体激活,进而促进炎性细胞因子成熟及释放^[3]。大量的细胞因子如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等短时间内爆发性失控性的大量释放,称为“细胞因子风暴”^[4]。细胞因子风暴发生期间,可对机体造成严重的损害,如我们所知的流感后肺炎和新型冠状病毒肺炎,而心脏也是细胞因子风暴受累的常见器官之一。如何避免“细胞因子风暴”对靶器官的损伤是目前研究的热点。已有文献报道人参皂苷 Rg3(ginsenoside Rg3, Rg3)可抑制 NLRP3 炎性小体激活^[5],减轻脓毒症造成的肝脏损伤^[6]。而 Rg3 对脓毒症介导的心脏损伤是否有作用目前研究尚少。本研究旨在进一步探讨 Rg3 可能的抗炎机制及其对脓毒症小鼠心脏的作用。而这种效应是否与自噬介导的 NLRP3 炎性小体失活相关也是本研究的重点。

1 材料与方法

1.1 材料

人参皂苷 Rg3(Meilunbio, 中国);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)、Caspase-3 活性检测试剂盒(南京建成生物技术工程研究所);NLRP3、ASC、Caspase-1、LC3、Beclin-1、p62 抗体(美国 Santa Cruz 公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 健康雄性 BALB/c 小鼠(6-8 周龄)购自维通利华实验动物有限公司(北京)。实验小鼠分随机分为四组,每组 8 只。(1)假手术对照组(Sham 组):小鼠腹腔注射生理盐水一日一次,每只小鼠注射生理盐水剂量定为 0.2 mL/次。连续注射 3 日后对小鼠进行麻醉,剪开小鼠腹部皮肤,暴露腹腔,寻找小鼠盲肠,缝合线穿过盲肠末端,既不结扎也不穿孔,术后缝合腹部切口,然后皮下注射生理盐水补液。(2)脓毒症组(CLP 组):术前给予小鼠腹腔注射 0.2 mL 的生理盐水,一日一次,共 3 日。乌拉坦麻醉小鼠,经术前备皮、酒精消毒后,沿腹正中线剪开皮肤,暴露腹腔,探查盲肠,远离回盲瓣处结扎盲肠,用针头贯穿穿刺盲肠,纳回腹腔,缝合关闭腹腔,皮下注射生理盐水补液^[7]。(3)Rg3+脓毒症组(Rg3+CLP 组):给小鼠腹腔注射 10 mg/kg 的 Rg3,将 Rg3 溶于生理盐水中,一日一次,共 3 日。然后对小鼠进行盲肠结扎穿孔手术。术后注射

生理盐水补液。(4)3-MA+Rg3+脓毒症组(3-MA+Rg3+CLP 组):先给小鼠腹腔注射 10 mg/kg 的 Rg3,一日一次,共 3 日。在盲肠结扎穿孔手术前给予小鼠自噬抑制剂 3-MA(15 mg/kg)皮下注射。术后注射生理盐水补液。各组小鼠分别于术后 18 小时进行取材。

1.2.2 HE 染色 小鼠经麻醉后,迅速正中开胸取心脏, PBS 冲洗心脏 3-5 次,经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,常规 HE 染色,观察小鼠心肌组织(n=3)。

1.2.3 Western-blot 检测 心肌组织经研磨后,加入 RIPA 组织裂解液,使用 RCA 法检测各组样本蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 电泳及转膜。分别经一抗、二抗孵育。使用 ECL 化学发光法,显示目的蛋白,凝胶图像处理系统进行结果分析。

1.2.4 ELISA 检测 用 ELISA 方法检测 LDH、CK-MB、IL-1 β 等。取 ELISA 板每孔加入 50 μ L(1 $\times$)稀释液,再分别向每孔中加入 50 μ L 的心肌组织匀浆样本或血清以及各浓度的标准品,严格按照试剂盒说明书操作。向每孔加入 100 μ L 酶标抗体,室温孵育 2 h,洗板 5 次,控干孔内液体。每孔加入 100 μ L 显色液,30 min 后,每孔加 100 μ L 终止液结束反应,酶标仪上读取结果。

1.3 统计学方法

所有实验均重复 3 遍以上,采用 GraphPad Prism5.0 统计软件进行数据分析及统计图制作。各组间比较采用 One-way ANOVA 分析,进一步两两比较采用 Student-Newman-Keuls 方法进行分析。

2 结果

2.1 Rg3 改善脓毒症小鼠心肌损伤

心肌组织病理学检测发现,对照组小鼠心肌结构清晰完整,无水肿及炎细胞浸润情况。脓毒症组小鼠心肌组织结构紊乱,炎细胞浸润明显。而经 Rg3 治疗组小鼠心肌水肿减轻,炎细胞浸润减轻。预先应用自噬抑制剂 3-MA 可以阻断 Rg3 对心肌组织的保护作用(图 1-A)。

为了进一步研究 Rg3 对小鼠心脏损伤的影响,我们检测了各组小鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的含量。实验表明 Rg3 可以显著降低脓毒症小鼠 CK-MB 活性 64.5%(图 1-B),降低 LDH 活性 63.8%(图 1-C)。此外,经 Rg3 治疗后,小鼠心肌组织中反应细胞凋亡的指标 cleaved caspase-3 的表达下降(图 1-D)。自噬抑制剂 3-MA 预孵育可削弱 Rg3 减轻脓毒症诱导的心肌酶学损伤和心肌细胞凋亡的作用。

2.2 Rg3 抑制脓毒症诱导的 NLRP3 炎性小体的激活

NLRP3、Caspase-1 和 ASC 的复合物在脓毒症中表达增加。治疗性应用 Rg3 可抑制 NLRP3 炎性小体相关蛋白(NLRP3、ASC、Caspase-1)的表达。我们还发现 Rg3 可以抑制作为 NLRP3 炎性小体激活后的下游 IL-1 β 和 IL-18 的释放。自噬抑

制剂 3-MA 预孵育可减弱 Rg3 对脓毒症诱导的心肌 NLRP3 炎性小体的作用(图 2)。

2.3 Rg3 促进脓毒症小鼠的心肌自噬

LC3、p62 和 Beclin-1 是参与自噬通量的自噬相关蛋白,通常作为检测自噬的生物学标记物。因此,我们在脓毒症诱导的

心肌损伤小鼠模型中研究 Rg3 是否对这些自噬相关蛋白有调控作用。我们发现 Rg3+CLP 组的 LC3 和 Beclin-1 水平高于脓毒症组,而 Rg3 处理对 p62 的作用不明显(图 3)。提示 Rg3 可促进脓毒症心肌损伤模型的自噬。

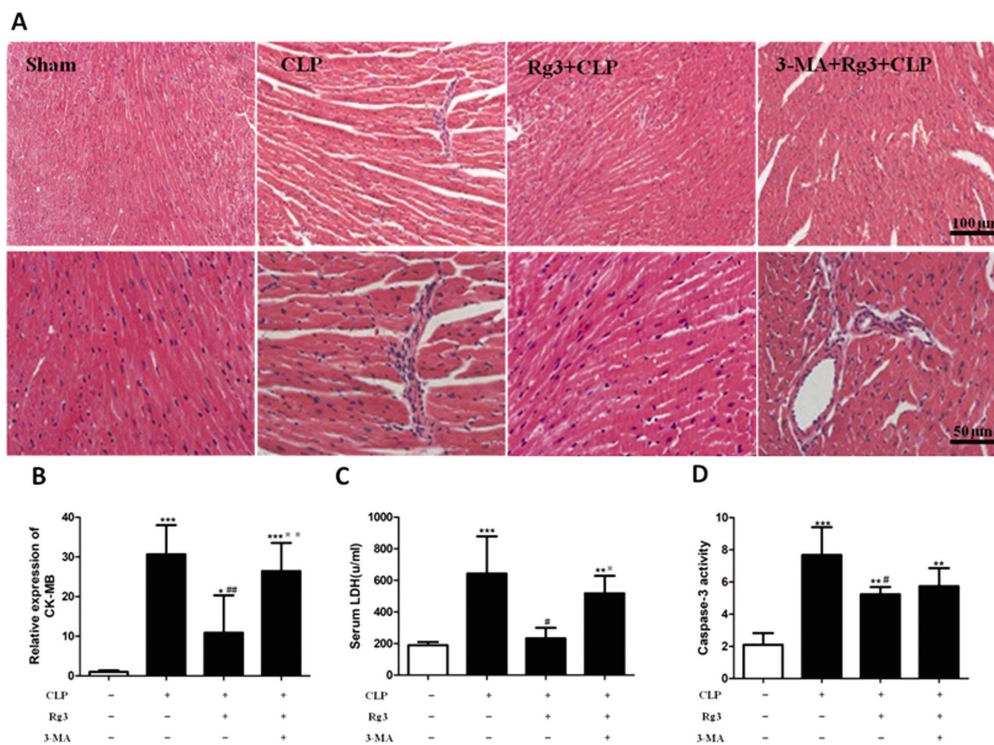


图 1 Rg3 减轻脓毒症所致小鼠心脏损伤

Fig.1 Rg3 alleviated sepsis induced myocardial injury in mice

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=7$. ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs. Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. CLP group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Rg3+CLP group.

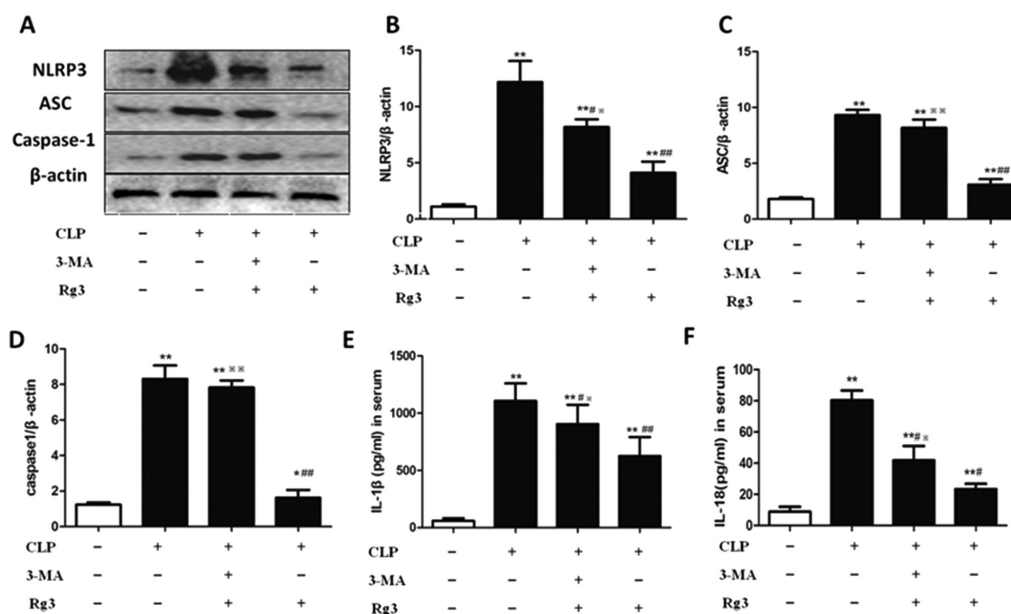


图 2 Rg3 抑制脓毒症小鼠心肌 NLRP3 炎性小体激活

Fig.2 Rg3 inhibited NLRP3 inflammasome activation in myocardial tissue of septic mice

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3-4$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. CLP group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Rg3+CLP group.

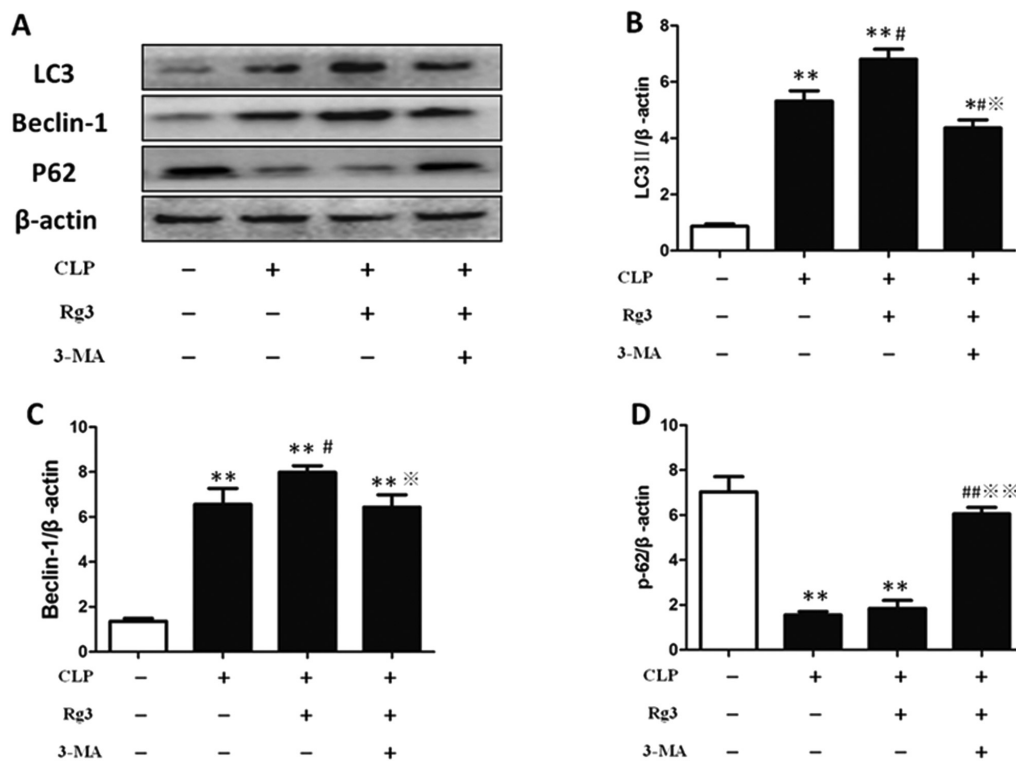


图3 Rg3 促进脓毒症小鼠心肌自噬

Fig.3 Rg3 promoted myocardial autophagy in septic mice

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3-4$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. CLP group;

※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$ vs. Rg3+CLP group.

3 讨论

脓毒症是由宿主对感染反应失调引起。组织低灌注引起的血流动力学变化导致以多器官功能衰竭为特征的严重脓毒症^[89]。炎症细胞因子 IL-1 β 在脓毒症引起的心功能障碍中起关键作用^[10]。在体外心肌细胞试验中添加 IL-1 β 可显著降低心肌细胞缩短的最大程度和减缓峰值速度^[11-13]。IL-1 β 释放信号可能是通过激活带有 pyrin 结构域(NLRP3)的核苷酸结合寡聚结构域样受体介导的^[14]。激活的 NLRP3 蛋白,它将炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的前体切割成其成熟型,作为细胞分泌的有效细胞因子参与细胞免疫反应^[15]。正如文献所述,我们发现 NLRP3 炎性小体相关蛋白在脓毒症小鼠的心脏组织中表达增加。我们在治疗性应用 Rg3 后,降低了由脓毒症介导的 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达水平,同时也降低了 IL-1 β 、IL-18 的释放,这一结果提示 Rg3 可以抑制脓毒症介导的 NLRP3 炎性小体的活化。

Rg3 是一种天然的人参皂苷,已被证明对心血管系统有广泛的益处^[16-18]。研究表明 20 (R/S)-Rg3 立体异构体可以与 PPAR γ 配体结构域结合,通过增加糖基化终产物的产生,进而发挥抑制血管平滑肌增殖及迁移的作用^[19]。有研究表明人参皂苷能够通过调节诱导型一氧化氮合成酶的表达来抑制 NLRP3 炎性小体的一氧化氮生成,从而抑制致命的内毒素休克和 S-亚硝基化,从而防止小鼠脾细胞凋亡^[20]。另有研究证实人参皂苷 Rg3 特异性抑制 NLRP3 的激活,但不抑制 NLRC4 或 AIM2 炎性小体的激活,且 Rg3 对 NLRP3 炎性小体的上游调控无影响^[21]。但 Rg3 对脓毒症介导的心脏损伤的作用效果及其作用机制目前尚缺少研究。在我们的研究中,我们发现脓毒症小鼠有典型

的血流动力学障碍,心肌酶学升高,心肌组织出现水肿及炎症细胞浸润。但给予小鼠 Rg3 治疗后,小鼠一般状态改善,心肌酶学指标损伤减轻,心肌组织病理损伤减轻。这一结果提示 Rg3 对脓毒症造成的小鼠心肌损伤有一定的治疗作用。同时我们在脓毒症小鼠心肌组织中观察到一些自噬相关蛋白表达增高。

生理或病理情况中自噬就是“吃掉”自身损伤细胞器或入侵微生物,并且从自噬体形成到自噬体-溶酶体融合的动态过程,可使受损蛋白和细胞器再生,包括线粒体^[22]。在自噬的各种重要调控因子中,Beclin1 是启动自噬所必需的。LC3 常被用来证明自噬活性。P62 作为 LC3 结合蛋白,调节蛋白聚集物的形成^[23]。先前的研究表明,脓毒症时受损的线粒体与 NLRP3 炎性小体相关^[24]。已有研究表明自噬参与调控 NLRP3 炎性小体^[25-27]。有研究证实 Rg3 剂量依赖性地抑制大鼠肝脏细胞自噬^[28]。另有研究证实人参皂苷通过诱导卵巢肿瘤细胞自噬抑制肿瘤细胞的迁移及侵袭^[29]。Rg3 通过调节神经细胞的自噬通量减弱蛋白诱导的线粒体损伤^[30]。但 Rg3 抑制炎症因子的产生和抑制 NLRP3 炎性小体激活的机制是否与自噬有关尚不清楚。课题组通过应用自噬抑制剂,研究 Rg3 治疗脓毒症心脏损伤的机制是否与自噬相关。结果表明,自噬抑制剂削弱了 Rg3 减轻脓毒症心脏损伤和抑制 NLRP3 炎性小体激活的作用。提示 Rg3 对脓毒症介导的 NLRP3 炎性小体激活的抑制可能与自噬相关。一些研究提示 Rg3 具有抑制细胞自噬的作用,但在本研究中观察到 Rg3 可以促进脓毒症心肌组织中一些自噬蛋白的表达。对于这一点差别,我们考虑可能是疾病模型不同以及不同细胞所处刺激的不同阶段表现出的差异。这方面我们还需通过增加不同时间点观察不同组织细胞进一步的完善。

综上所述,我们发现 Rg3 能够抑制 NLRP3 炎性小体的活性,减少 IL-1 β 和 IL-18 的释放,减轻脓毒症介导的心肌损伤。在接受 Rg3 治疗的脓毒症小鼠中,自噬抑制剂降低了 Rg3 对心肌的保护作用。这一结果提示,Rg3 通过抑制心肌 NLRP3 炎性小体的活性对心肌细胞具有一定的保护作用,且这种作用与自噬有关。本研究为 Rg3 在临床中用于心脏损伤的治疗提供了一定的理论基础,但其作用机制还有待进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Finfer S, Machado FR. The Global Epidemiology of Sepsis. Does It Matter That We Know So Little? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 228-230
- [2] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(3): 304-377
- [3] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328
- [4] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, et al. Host innate immune responses to sepsis[J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 36-44
- [5] Yoon SJ, Park JY, Choi S, et al. Ginsenoside Rg3 regulates S-nitrosylation of the NLRP3 inflammasome via suppression of iNOS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 1184-1189
- [6] Xing W, Yang L, Peng Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates sepsis-induced injury and mitochondrial dysfunction in liver via AMPK-mediated autophagy flux[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4): BSR20170934
- [7] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36
- [8] Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, et al. Sepsis: evolving concepts and challenges[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(4): e8595
- [9] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87
- [10] Szekely Y, Arbel Y. A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today?[J]. *Cardiol Ther*, 2018, 7(1): 25-44
- [11] Stock AT, Jama HA, Hansen JA, et al. TNF and IL-1 Play Essential but Temporally Distinct Roles in Driving Cardiac Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease [J]. *J Immunol*, 2019, 202(11): 3151-3160
- [12] Yin J, Wang Y, Hu H, et al. P2X₇ receptor inhibition attenuated sympathetic nerve sprouting after myocardial infarction via the NLRP3/IL-1 β pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2695-2710
- [13] Abbate A, Toldo S, Marchetti C, et al. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease [J]. *Circ Res*, 2020, 126(9): 1260-1280
- [14] Green JP, Yu S, Martín-Sánchez F, et al. Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(40): E9371-E9380
- [15] Alehashemi S, Goldbach-Mansky R. Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1-, and NLRC4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1840
- [16] Li L, Wang Y, Guo R, et al. Ginsenoside Rg3-loaded, reactive oxygen species-responsive polymeric nanoparticles for alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Control Release*, 2020, 317: 259-272
- [17] Sun GZ, Meng FJ, Cai HQ, et al. Ginsenoside Rg3 protects heart against isoproterenol-induced myocardial infarction by activating AMPK mediated autophagy [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(2): 153-160
- [18] Tu C, Wan B, Zeng Y. Ginsenoside Rg3 alleviates inflammation in a rat model of myocardial infarction via the SIRT1/NF-kappaB pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 238
- [19] Kwok HH, Guo GL, Lau JK, et al. Stereoisomers ginsenosides-20(S)-Rg₃ and -20(R)-Rg₃ differentially induce angiogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(7): 893-902
- [20] Yoon SJ, Park JY, Choi S, et al. Ginsenoside Rg3 regulates S-nitrosylation of the NLRP3 inflammasome via suppression of iNOS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 1184-1189
- [21] Shi Y, Wang H, Zheng M, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses the NLRP3 inflammasome activation through inhibition of its assembly [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 208-221
- [22] Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(16): 1564-1576
- [23] Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124: 161-170
- [24] Danielski LG, Giustina AD, Bonfante S, et al. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 24-31
- [25] Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 591803
- [26] Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(4 Suppl 98): 12-16
- [27] Cao Z, Wang Y, Long Z, et al. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(11): 1087-1095
- [28] Liu X, Mi X, Wang Z, et al. Ginsenoside Rg3 promotes regression from hepatic fibrosis through reducing inflammation-mediated autophagy signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 454
- [29] Zheng X, Chen W, Hou H, et al. Ginsenoside 20 (S)-Rg₃ induced autophagy to inhibit migration and invasion of ovarian cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 620-626
- [30] Moon JH, Lee JH, Lee YJ, et al. Autophagy flux induced by ginsenoside-Rg₃ attenuates human prion protein-mediated neurotoxicity and mitochondrial dysfunction[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 85697-85708