

# 人参皂苷Rg2通过PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B信号通路减轻LPS诱导的RAW264.7细胞炎症

谢静<sup>1,2</sup>, 袁巧云<sup>2\*</sup>, 何姿良<sup>2</sup>, 杨贵贵<sup>1,2</sup>, 高翔<sup>2</sup>, 张雯霞<sup>2</sup>, 张迹<sup>1,2</sup>, 胡卫成<sup>1,3\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300) (3. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225109)

**摘要:** 基于细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型, 该文深入研究了人参皂苷 Rg2 的抗炎效果, 并利用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)、蛋白印迹等技术检测分析了人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症相关基因和蛋白的表达水平。结果显示, 人参皂苷 Rg2 呈剂量依赖性抑制炎症细胞一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 的释放 ( $P < 0.05$ ) 以及一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、环氧合酶 2 (Cyclooxygenase-2, COX2)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等炎症相关基因的转录水平 ( $P < 0.05$ )。扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 观察分析显示人参皂苷 Rg2 可以有效改善 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞形态。蛋白印迹结果显示人参皂苷 Rg2 能够抑制 PI3K、PDK1、AKT、GSK-3 $\beta$  等蛋白的磷酸化和 NF- $\kappa$ B 蛋白入核。该研究结果表明人参皂苷 Rg2 具有明确的抗炎作用, 能够通过 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症。该研究结果有助于全面理解人参皂苷 Rg2 的抗炎活性及其机制, 为相关功能食品开发奠定基础。

**关键词:** 人参皂苷 Rg2; 抗炎; RAW264.7 细胞; PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路

文章编号: 1673-9078(2024)12-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.0016

## Ginsenoside Rg2 Alleviates Lipopolysaccharide-induced Inflammation of RAW264.7 Cells by Regulating the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

XIE Jing<sup>1,2</sup>, YUAN Qiaoyun<sup>2\*</sup>, HE Ziliang<sup>2</sup>, YANG Guigui<sup>1,2</sup>, GAO Xiang<sup>2</sup>, ZHANG Wenxia<sup>2</sup>,

ZHANG Ji<sup>1,2</sup>, HU Weicheng<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China) (2. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China) (3. College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225109, China)

引文格式:

谢静, 袁巧云, 何姿良, 等. 人参皂苷 Rg2 通过 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(12): 1-9.

XIE Jing, YUAN Qiaoyun, HE Ziliang, et al. Ginsenoside Rg2 alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW264.7 cells by regulating the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 1-9.

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 江苏省高等学校基础科学 (自然科学) 研究重大项目 (23KJA550001)

作者简介: 谢静 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: xiej0705@foxmail.com

通讯作者: 袁巧云 (1981-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: qiaoyunyan@163.com; 共同通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品分子营养学, E-mail: hu\_weicheng@163.com

**Abstract:** The anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg2 were investigated based on a bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation model of RAW264.7 cells. The expression levels of inflammation-related genes and proteins in the model were analyzed using PCR, RT-qPCR, and western blotting. The results demonstrated that ginsenoside Rg2 dose-dependently inhibited the release of nitric oxide from inflammatory cells ( $P<0.05$ ) and transcription levels of inflammation-related genes, including inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ). Scanning electron microscopy analysis showed that ginsenoside Rg2 improved the morphology of inflammatory RAW264.7 cells after LPS induction. Western blotting results revealed that ginsenoside Rg2 inhibited the phosphorylation of PI3K, PDK1, AKT, and GSK-3 $\beta$  and prevented NF- $\kappa$ B from entering the nucleus. These results suggest that ginsenoside Rg2 has an anti-inflammatory effect and can reduce LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells via the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway. The findings of this study improve the understanding of the anti-inflammatory activity of ginsenoside Rg2 and associated mechanism and provide a foundation for the development of related functional foods.

**Key words:** ginsenoside Rg2; anti-inflammation; RAW264.7 cells; PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway

炎症反应是机体抵抗外界环境的生理反应，主要包括激活和招募先天免疫应答和适应性免疫细胞，通常表现为局部组织红肿、热痛和功能障碍<sup>[1]</sup>。不受控制的炎症反应会导致组织损伤，如：结肠炎、胃损伤、动脉粥样硬化、帕金森病等<sup>[2]</sup>。巨噬细胞是先天免疫细胞，作为免疫系统中的关键组分，具有多样化的功能和精密的调控机制。巨噬细胞可以通过吞噬和消化细菌、病毒和细胞碎片来清除异物，此外，巨噬细胞也是抗原呈递的专业细胞，能够将病原体的片段呈递给其他免疫细胞，引发更广泛的免疫反应<sup>[3,4]</sup>。LPS与巨噬细胞之间的相互作用是免疫调节过程中的关键步骤，LPS作为革兰氏阴性细菌外膜的主要成分，能够通过与其表面上的特定受体相结合，引发一系列信号传导路径的激活，从而促进细胞炎症因子的释放，进而导致炎症反应<sup>[5]</sup>。

人参在传统中草药中有着重要的地位，其作为补剂已使用上千年<sup>[6]</sup>。常见的人参有亚洲参、西洋参和西伯利亚参等类型<sup>[7]</sup>。人参皂苷是人参的主要活性成分，具有抗炎<sup>[8]</sup>、增强免疫力<sup>[9]</sup>、降脂<sup>[10]</sup>、降糖<sup>[11]</sup>等多种药理活性。人参皂苷主要分为两种类型，即原人参二醇型（Protopanaxadiol, PPD）和原人参三醇型（Panaxotriol, PPT），其中PPD型人参皂苷包括Rg3、Rh2、Rb1、Rd、Rb3、Rc、Rb2等，PPT型人参皂苷包括Rh1、Rg2、Rg1、Rf、Re等<sup>[12]</sup>。人参皂苷Rg2具有多种生物学活性和药理学效应，因其强大的抗氧化活性而被广泛关注。研究表明，人参皂苷Rg2能有效保护氧化应激诱导的骨髓间充质干细胞的衰老，还可以降低成脂转录因子PPAR $\gamma$ 的表达水平，促进AMPK蛋白激酶的激活，从而

达到减脂的效果<sup>[13]</sup>。人参皂苷Rg2可以通过调节AKT/mTOR介导的自噬，改善高脂肪饮食（High-Fat Diet, HFD）诱导的肝纤维化<sup>[14]</sup>；还可以改善LPS诱导的急性肝脏炎症，其机制是通过增加Nrf2的表达，降低炎症反应<sup>[15]</sup>；并且还可以通过调节TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路改善脑损伤<sup>[16]</sup>；也有文章表明人参皂苷Rg2通过调节PI3K/AKT信号通路改善阿尔兹海默症<sup>[17]</sup>。

尽管人参皂苷Rg2在多个领域都表现出显著的生物活性，但其具体的抗炎作用机制仍需进一步深入研究。该文从人参皂苷Rg2改善LPS诱导RAW264.7细胞炎症出发，对细胞内NO的产生，炎症相关基因转录水平和蛋白表达等方面进行了深入研究。该研究结果可为更全面认识人参皂苷Rg2的抗炎活性及其作用机制提供数据和理论支撑，为相关功能食品或药物研发提供参考和文献支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人参皂苷Rg2，由中国科学院成都生物研究所天然产物研究中心提供；RAW264.7细胞，购于中国典型培养物保藏中心CCTCC；LPS（L2880）、二甲基亚砜（Dimethyl Sulfoxide, DMSO）、胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）、台盼蓝等，购于Sigma公司；噻唑蓝[3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide, MTT]，购于德国BioFRox公司；1640培养基，购于赛默飞世尔科技公司；青霉素-链霉素购于Cytiva；细胞裂解液和

超敏 BCA 蛋白定量试剂盒等, 购于碧云天有限公司; 核蛋白提取试剂盒和 eECL 化学发光试剂盒等, 购于江苏康为世纪有限公司; 反转录试剂盒购于 Takara; 牛血清白蛋白 (Bovine Albumin, BSA), 购于 AMRESCO; iNOS、COX2、p-PI3K、PI3K、p-PDK1、PDK1、p-AKT、AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、GAPDH 等抗体, 购于 CST; Anti-Rabbit IgG (HRP)、Anti-Mouse IgG (HRP) 购于 Abcam 公司; 三氯甲烷、戊二醛、多聚甲醛、甲醇、异丙醇等, 购于国药有限公司。

## 1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO<sub>2</sub> 培养箱, SANYO; Tanon-5200 Multi 荧光及化学发光成像系, 上海天能科技有限公司; Quanta FEG450 扫描电镜, Quanta FEG; Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; IX71 倒置显微镜, OLYMPUS; 5810R 台式冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; ME104 电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统公司; PCR 仪、RT-qPCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像仪、蛋白印迹相关仪器, Bio RAD。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 细胞培养及传代

取出液氮冻存的 RAW264.7 细胞使用 1640 培养基 (含有体积分数为 10% 胎牛血清和 1% 链霉素-青霉素) 进行复苏和传代培养。培养环境: 37 °C、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 的无菌环境。显微镜下观察细胞的贴壁程度和生长状态。按照 1:3 的比例进行 3 次传代, 待细胞状态稳定后可用于后续实验。

### 1.3.2 细胞存活率测定

细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 96 孔板, 过夜培养后使用终浓度为 5、25、50、100、200、400  $\mu$ mol/L 的 Rg2 处理 24 h。采用 MTT 法检测细胞的存活率, 方法如下: 弃去培养基, 每孔加入 100  $\mu$ L 终质量浓度为 0.5 g/L 的 MTT 溶液后, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h, 随后加入 100  $\mu$ L MTT 终止液, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育约 16 h 后, 酶标仪检测 550 nm 处的吸光值, 并按如下公式计算各处理组细胞活力:

$$C = \frac{A_1 - B}{A_2 - B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$C$ —细胞存活率, %;

$A_1$ —实验组吸光值;

$A_2$ —对照组吸光值;

$B$ —空白组吸光值。

### 1.3.3 NO 释放量测定

细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 96 孔板, 过夜培养。次日, 使用终浓度为 25、50、100  $\mu$ mol/L 的 Rg2 处理 30 min 后, 再使用终质量浓度 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 处理 24 h。分别吸取细胞培养基至新的 96 孔板中, 加 Griess 溶液孵育 10 min 后, 在酶标仪下检测 570 nm 处的吸光值。Griess 溶液配制方法如表 1。

表 1 Griess 溶液配制方法

Table 1 The Griess solution preparation method

试剂	组分 1	组分 2
Griess A	对氨基苯磺酰胺 (400 mg)	$\rho=5\%$ 磷酸 (40 mL)
Griess B	N-(1-萘基) 乙二胺 二盐酸盐 (40 mg)	纯水 (40 mL)

### 1.3.4 细胞形态观察

12 孔板中放置盖玻片, 细胞以每孔  $1 \times 10^6$  个接种于此孔板中, 过夜培养后使用终浓度为 50、100  $\mu$ mol/L 的 Rg2 处理 30 min, 再使用终质量浓度 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 处理 24 h。使用 PBS 漂洗细胞两次以去除培养基, 加入体积分数为 2.5% 戊二醛后置于 4 °C 冰箱固定 2 h。PBS 洗去残留戊二醛后, 依次加入体积分数为 20%、50%、70%、90%、100%、100% 的乙醇进行梯度脱水, 每次脱水时间 5 min, 脱水后样品置于干燥箱内干燥暂存。各组样品喷金后使用 SEM 进行拍照分析。

### 1.3.5 PCR 和 RT-qPCR

细胞以每孔  $2 \times 10^6$  个接种于 6 孔板, 过夜培养后使用终浓度 50  $\mu$ mol/L 和 100  $\mu$ mol/L 的 Rg2 处理 30 min, 再用终质量浓度 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 处理 6 h。PBS 漂洗细胞两次以去除培养基, 使用 Trizol 收集细胞, 随后使用三氯甲烷和异丙醇提取细胞 RNA, 将提取的 RNA 使用焦碳酸二乙酯 (Diethyl Pyrocarbonate, DEPC) 水溶解, 并使用反转录试剂盒合成 cDNA。使用内参基因 *GAPDH* 验证 cDNA, 对 *iNOS*、*COX2*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$*  等炎症相关基因的 mRNA 转录水平进行 PCR 和 RT-qPCR 检测分析。用于实验的引物由上海生工合成, 其序列见表 2。

表 2 该研究所用PCR引物

Table 2 Primers used in the present study

基因名称	正向引物	反向引物
<i>iNOS</i>	CATTGATCTCCGTGACAGCC	CATGCTACTGGAGGTGGGTG
<i>COX2</i>	CGCAAATACTGCAGCCCTAC	GGATGTCTTGTTCGTCTGCC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	GTCTACTGAACTTCGGGGTGAT	GGCTACAGGCTTGTCACTCG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTAAACTCCAC
<i>GAPDH</i>	CACTCACGGCAAATTCACGGCACA	GACTCCACGACATACTCAGCAC

### 1.3.6 酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 96 孔板, 过夜培养。次日, 使用终浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的 Rg2 处理 30 min 后, 再使用终质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS 处理 24 h, 取细胞培养上清根据 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

### 1.3.7 蛋白印迹

细胞以每孔  $1.5 \times 10^6$  个接种于 6 孔板, 过夜培养后使用终质量浓度 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 Rg2 处理 30 min, 再使用终质量浓度 1  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS 分别处理 15、30 和 60 min。PBS 漂洗细胞两次去除培养基后, 收集细胞样品至离心管中, 使用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 根据核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒定量分析, 根据实验需求配置用于 SDS-PAGE 电泳的蛋白样品, 设置电泳程序: 80 V, 30 min; 120 V, 100 min。电泳结束后进行转膜, 设置电泳程序: 100 V, 100 min。随后使用体积分数为 5% BSA 室温封闭 2 h, TTBS 洗膜后按照 1:1 000 的比例稀释一抗并孵育过夜。TTBS 洗膜后按照 1:2 500 的比例稀释二抗室温孵育 2 h。TTBS 洗膜后加入发光液, 使用化学发光系统进行曝光显色。

### 1.4 数据处理及统计分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析, 所有数据采用单因素 ANOVA 方差分析, 再采用邓肯多重比较分析, 每组数据至少重复 3 次,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 人参皂苷 Rg2 对 RAW264.7 细胞活力的影响

该研究采用 MTT 法评价了不同浓度人参皂苷 Rg2 对 RAW264.7 细胞活力的影响。结果如图 1 所

示, 人参皂苷 Rg2 的浓度在 100  $\mu\text{mol/L}$  以内时对细胞活力无影响, 浓度在 200 和 400  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞活力分别下降至 74.08% 和 50.18% ( $P < 0.05$ ), 人参皂苷 Rg2 在此浓度下具有一定的毒性。该结果表明, 人参皂苷 Rg2 的用药浓度在 100  $\mu\text{mol/L}$  以内对 RAW264.7 细胞是没有毒性的, 因此该文采用此浓度范围开展后续实验。

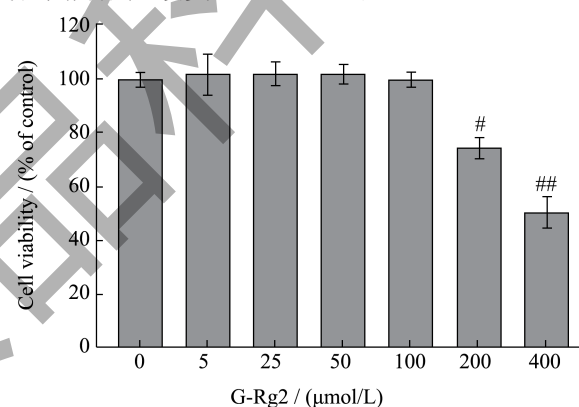


图 1 人参皂苷 Rg2 对细胞活力的影响

Fig.1 Effect of ginsenoside Rg2 on cell viability

注: 与对照组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

### 2.2 人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

NO 的释放量是衡量细胞炎症水平的重要指示物之一, 其在调节多种细胞功能中发挥着重要的作用, 在正常生理水平时, NO 可以维持细胞生理功能, 在炎症的发展中发挥关键作用, 相反, 机体内过量 NO 的释放会破坏免疫平衡, 从而损伤机体<sup>[18]</sup>。NO 的过量释放会导致机体炎症反应, 引起如皮肤炎症、克罗恩病、神经炎症等炎症性疾病<sup>[19]</sup>。根据人参皂苷的结构类型分类, 人参皂苷 Rg2 属于四环三萜类的达玛烷型, 此结构是人参活性的代表成分, 拥有此结构的人参皂苷现已被证明具有多种药理学活性。人参皂苷 Rf 能抑制 TNF- $\alpha$  刺激 RAW264.7 细胞所诱导的 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 下游的炎症激活, 如减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO 和 ROS 生产; 人

参皂苷 Rg2 对 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 INFs 的表达具有较高的抑制活性，并可减轻关节炎的炎症症状和乙醇诱导的胃炎以及 LPS/D-半乳糖胺引发的肝炎；人参皂苷 Rg2 因含有多个环结构，具有较好的稳定性和抗氧化能力，能有效清除自由基，减少氧化应激，从而减轻炎症反应<sup>[20,21]</sup>。因此该文使用 Griess 法验证人参皂苷 Rg2 对细胞 NO 释放量的影响。如图 2 所示，人参皂苷 Rg2 在 100  $\mu\text{mol/L}$  以内的浓度下，呈剂量依赖性抑制细胞 NO 释放。与对照组比较，LPS 处理组 NO 释放量为 27.99  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.01$ )，人参皂苷 Rg2 在 25、50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时，LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 释放量分别为 24.79、21.01  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ) 和 12.38  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.01$ )。该结果表明，人参皂苷 Rg2 能够有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的释放。

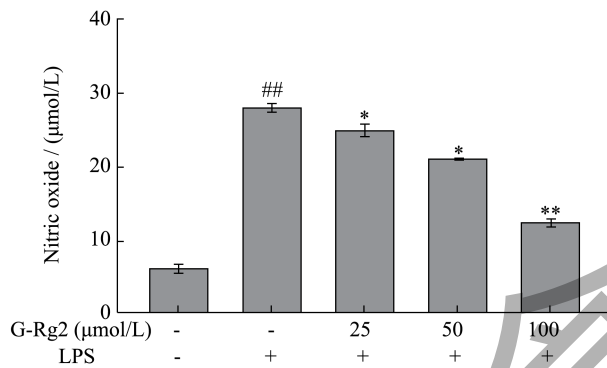


图 2 人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig.2 Effect of ginsenoside Rg2 on NO release from LPS induced RAW264.7 cells

注：与对照组比较，### $P < 0.01$ ；与 LPS 组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。图 5、6 同。

### 2.3 人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞形态的影响

研究表明，在 LPS 刺激下巨噬细胞的形态和功能会发生改变，从而增加吞噬和杀伤能力<sup>[20]</sup>，该文使用扫描电镜观察人参皂苷 Rg2 处理对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞形态的影响。如图 3 所示，未经处理组细胞形态小且圆润（图 3a）；LPS 处理模型组细胞形态改变，由圆形变成梭形，细胞明显增大，出现明显的“伪足”延伸（图 3b）；低剂量（50  $\mu\text{mol/L}$ ）人参皂苷 Rg2 加 LPS 处理组相比于 LPS 处理模型组，细胞形态有所恢复，逐渐恢复到正常细胞大小，“伪足”减少（图 3c）；高剂量（100  $\mu\text{mol/L}$ ）人参皂苷 Rg2 加 LPS 处理组细胞

形态和未经处理组相似，细胞形态小且圆润，“伪足”消失（图 3d）。该结果表明了人参皂苷 Rg2 能够逆转 LPS 导致细胞形态的改变，显示了其显著的抗炎活性。

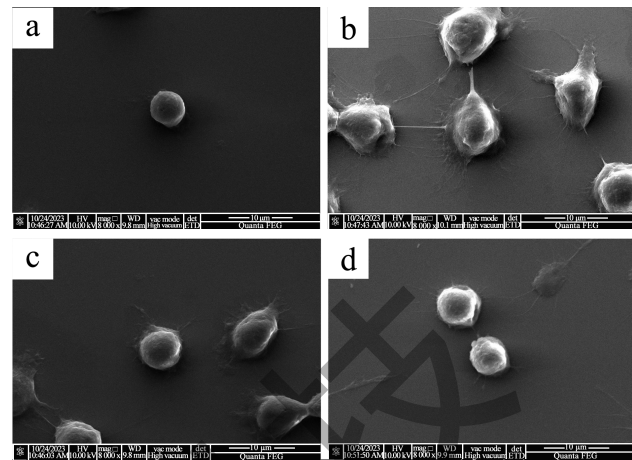


图 3 人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞形态的影响

Fig.3 Effect of ginsenoside Rg2 on the morphology of RAW264.7 cells induced by LPS

注：a 为对照组，b 为 LPS 处理组，c 为 LPS 和人参皂苷 Rg2 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组，d 为 LPS 和人参皂苷 Rg2 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组。放大倍数为 8 000 倍。

### 2.4 人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症相关基因表达水平的影响

NO 和前列腺素 (Prostaglandin, PG) 的大量释放与 iNOS 和 COX2 的过度表达密切相关<sup>[23]</sup>。LPS 与巨噬细胞相互作用，触发 TLR 通路，激活 NF- $\kappa$ B 等转录因子，从而导致炎症因子的产生，炎症因子是一种化学信号，在维持机体平衡和炎症中发挥着重要的作用，这些炎症因子主要包括 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ <sup>[24]</sup>。TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活导致促炎基因的表达增加，如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ，人参皂苷 Rg2 可以降低子痫前期大鼠脑组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  炎症因子水平，也被证明可以降低小鼠肝脏中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 INF- $\beta$  的 mRNA 水平<sup>[14-16]</sup>，另外有文献报道，人参皂苷 Rg2 在人脐静脉内皮细胞中可以显著抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 这些细胞炎症因子在 mRNA 水平上的表达，进而缓解动脉粥样硬化<sup>[25]</sup>。该文使用 PCR 和 RT-qPCR 验证了炎症相关基因的 mRNA 表达水平。结果显示，与对照组比较，在 LPS 处理后，iNOS、COX2、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平显著增加（图 4、5）。50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  的人参皂苷 Rg2 能显著降低 iNOS 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ) (图 5a)。100  $\mu\text{mol/L}$  时，

人参皂苷 Rg2 能够显著降低 COX2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平 ( $P < 0.05$ ) (图 5b、5c), 此浓度下对于 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平呈现断崖式抑制 ( $P < 0.05$ ) (图 5d)。ELISA 结果如图 6 所示, LPS 组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌量分别为 26.81 和 489.56 pg/mL, 与对照组比较具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 经人参皂苷 Rg2 处理后呈剂量依赖性抑制了 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌水平, 人参皂苷 Rg2 在 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时 IL-1 $\beta$  的分泌量为 24.89 和 17.60 pg/mL ( $P < 0.05$ ) (图 6a); 人参皂苷 Rg2 在 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时 TNF- $\alpha$  的分泌量为 436.68 pg/mL ( $P < 0.05$ ) 和 325.83 pg/mL ( $P < 0.01$ ) (图 6b)。以上结果表明, 人参皂苷 Rg2 能够通过抑制 iNOS、COX2、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等炎症相关基因的 mRNA 表达水平以及炎症因子的释放来发挥抗炎作用。

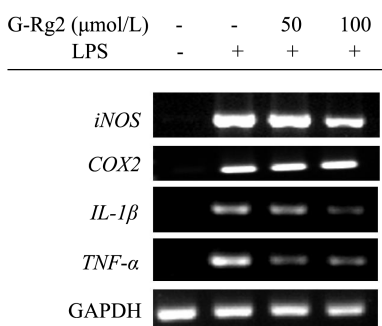


图 4 PCR 检测 iNOS、COX2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  基因 mRNA 的表达量

Fig.4 The expression levels of iNOS, COX2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  genes were detected by semi-quantitative PCR

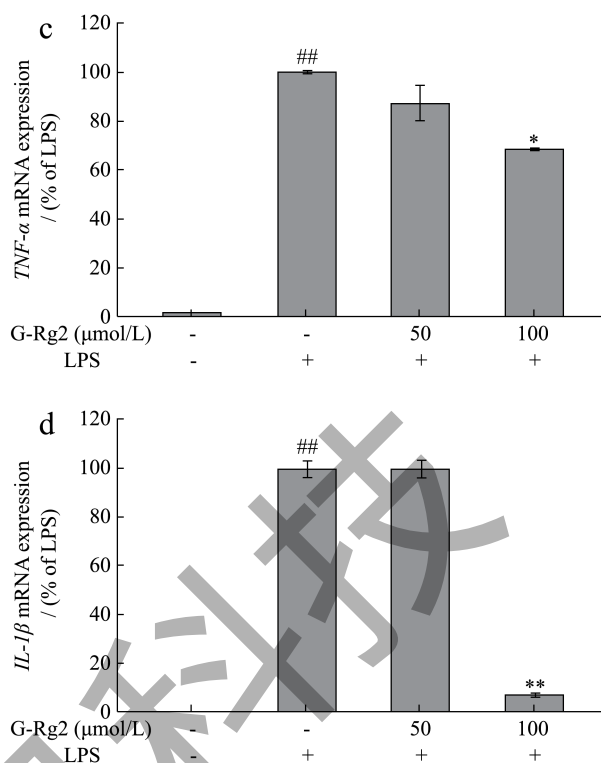
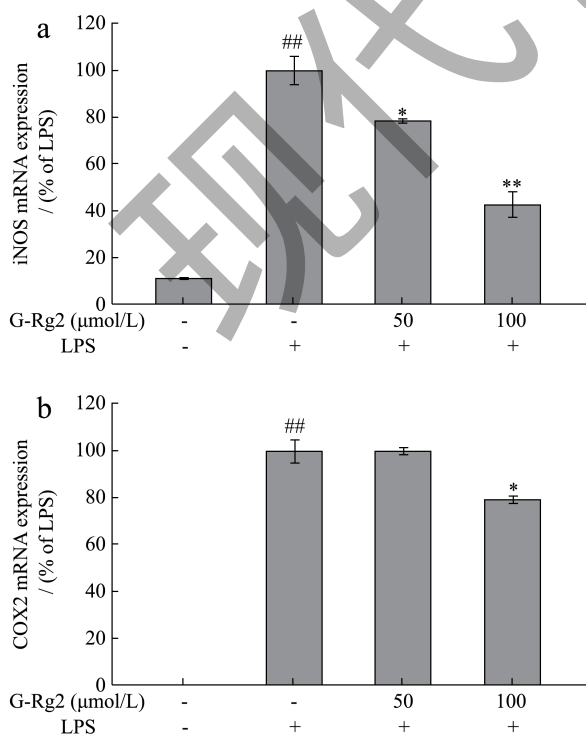


图 5 RT-qPCR 定量检测 iNOS、COX2、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因 mRNA 的表达量

Fig.5 The expression levels of iNOS, COX2, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  genes were detected by RT-qPCR

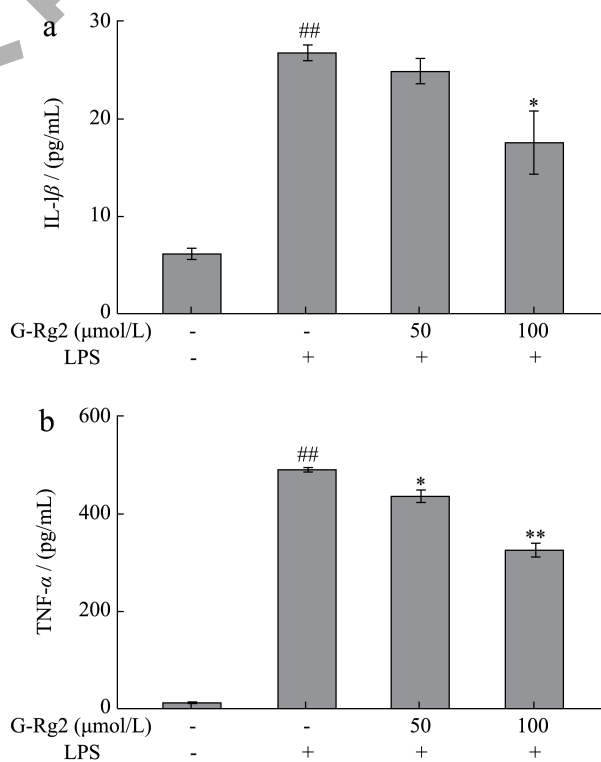


图 6 ELISA 检测细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌

Fig.6 The secretion of cellular inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were detected by ELISA

## 2.5 人参皂苷Rg2对细胞iNOS和COX2蛋白水平的影响

该研究进一步采用蛋白印迹实验验证了人参皂苷 Rg2 对 LPS 诱导 RAW264.7 胞内 iNOS 和 COX2 蛋白水平的影响。如图 7 所示, 与对照组相比, LPS 处理后胞内 iNOS 和 COX2 蛋白水平显著增加, 人参皂苷 Rg2 在 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时能够显著抑制 iNOS 的蛋白水平, 并且呈剂量依赖性, 此结果与 mRNA 水平保持一致; 人参皂苷 Rg2 在 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时能够抑制 COX2 的蛋白水平, 这与人参皂苷 Rg2 在 100  $\mu\text{mol/L}$  时能够抑制 COX2 的 mRNA 水平的实验结果也保持一致。该实验结果再次表明, 人参皂苷 Rg2 能够通过抑制 iNOS 和 COX2 的表达水平来发挥抗炎作用。

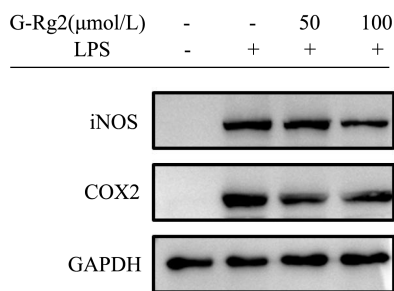


图 7 使用蛋白印迹检测 iNOS 和 COX2 蛋白

Fig.7 iNOS and COX2 proteins were detected by western blot

注: 实验方法, 人参皂苷 Rg2 (50 和 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 30 min, LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 刺激 6 h 提取细胞全蛋白进行蛋白印迹。GAPDH 为内参蛋白。

## 2.6 人参皂苷Rg2对PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B通路蛋白的影响

PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 通路是一个重要的信号传导路径, 涉及多种细胞生物学过程<sup>[26]</sup>。磷脂酰肌醇 3- 激酶 (Phosphatidylin-Ositol-3-Kinase, PI3K) 被激活后, 会催化磷脂酰肌醇双酯 (Phosphyl-Diphosphate Inositol, PIP2) 转化为磷脂酰肌醇三酮 (Inositol Triphosphate, PIP3), 进而激活蛋白激酶 B (Protein Kinase B, PKB/AKT)<sup>[27]</sup>。AKT 与这些磷脂相互作用, 导致其转运到内膜, 在那里被磷酸化并被 PDK1 和 PDK2 激活<sup>[28]</sup>。活化的 AKT 可调节多种底物的功能, 相关研究表明 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 通路在癌症、免疫调节和炎症等多个生理和病理过程中发挥关键作用<sup>[29]</sup>, 大量文献已深入探讨了该通路的调控机制以及潜在的治疗靶点<sup>[30]</sup>。有动物实验证明了人参皂苷 Rg2 显著抑制肝脏自噬通量增加, 激活体内

AKT/mTOR 信号通路, 进一步改善 HFD 引起的肝脏纤维化, 在细胞实验中同样证明了人参皂苷 Rg2 通过上调 p-AKT 和 p-mTOR 激活 AKT/mTOR 信号通路, 从而发挥其抗炎作用<sup>[14]</sup>。炎症相关蛋白的磷酸化与 LPS 刺激时间密切相关, 因此该研究采用蛋白印迹法研究 LPS 分别处理 15、30 和 60 min 条件下, 人参皂苷 Rg2 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 RAW264.7 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的影响。结果如图 8 所示, 与对照组比较, 在 LPS 处理 30 min 时, 人参皂苷 Rg2 能够显著抑制 PI3K 的磷酸化水平; 在 LPS 处理 15 和 60 min 时, 人参皂苷 Rg2 能够显著抑制 PDK1 的磷酸化水平; 在 LPS 处理 60 min 时, 人参皂苷 Rg2 能够显著抑制 AKT 的磷酸化水平; 在 LPS 处理 15 min 和 30 min 时, 人参皂苷 Rg2 能够显著抑制 GSK-3 $\beta$  的磷酸化水平。结果表明, 人参皂苷 Rg2 能够通过调节 PI3K/AKT 信号通路, 抑制 PI3K、PDK1、AKT、GSK-3 $\beta$  蛋白的磷酸化而发挥其抗炎作用。

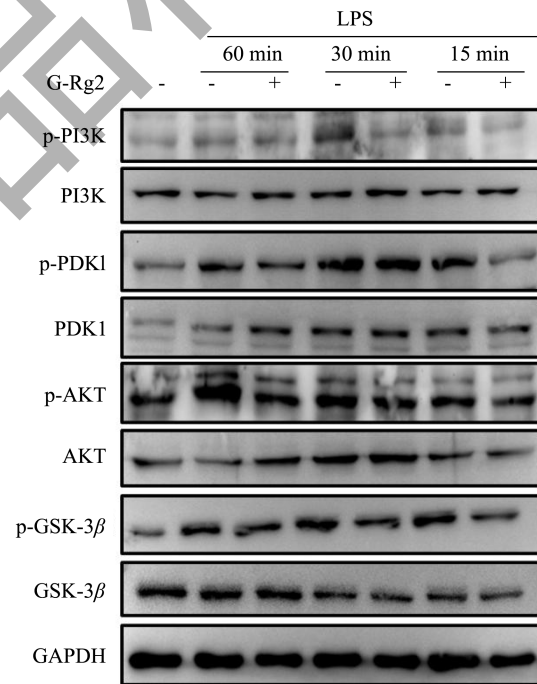


图 8 使用蛋白印迹检测 PI3K/AKT 通路蛋白

Fig.8 PI3K/AKT pathway proteins were detected by western blotting

注: 实验方法, 人参皂苷 Rg2 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 30 min, LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 刺激 15、30 和 60 min, 提取细胞全蛋白进行蛋白印迹。GAPDH 为内参蛋白。

此外, 该文亦采用蛋白印迹实验研究了人参皂苷 Rg2 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白入核的影响。AKT 通过多途径, 包

括直接磷酸化和抑制其抑制因子, 激活核 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 是一种核转录因子, 参与调控炎症、细胞增殖和细胞凋亡等生物学过程, 此通路异常激活与多种疾病相关, 尤其是与癌症的发展密切相关<sup>[31,32]</sup>。有研究证明人参皂苷 Rg2 和 Rh1 联合使用能够抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 磷酸化和 p38 MAPK 的激活, 进一步影响 NF- $\kappa$ B 的入核, 但没有单独证明人参皂苷 Rg2 的抗炎机制<sup>[15]</sup>。在子痫前期大鼠模型中, 人参皂苷 Rg2 治疗抑制了 TLR4、MyD88、p-I $\kappa$ B $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B 表达的增加, 表明了人参皂苷 Rg2 可以通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路调节血脑屏障, 发挥神经保护作用<sup>[16]</sup>。该研究结果显示, 与对照组相比, LPS 处理促进了 NF- $\kappa$ B 的入核, 在 LPS 处理 60 min 时, 细胞核中 NF- $\kappa$ B 显著增加, 而人参皂苷 Rg2 能够显著抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 的入核 (图 9)。该结果表明人参皂苷 Rg2 能够逆转 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 入核, 进而减少炎症因子的转录, 减轻细胞炎症水平, 起到抗炎的作用。

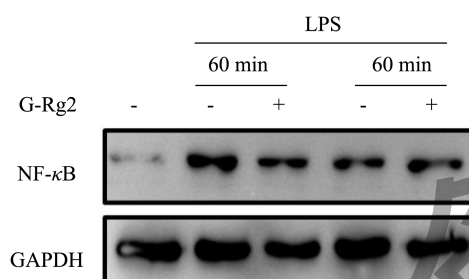


图 9 使用蛋白印迹检测细胞核中 NF- $\kappa$ B 蛋白

Fig.9 Nuclear NF- $\kappa$ B protein was detected by western blotting

注: 实验方法, 人参皂苷 Rg2 (100  $\mu$ mol/L) 预处理 30 min, LPS (1  $\mu$ g/mL) 刺激 30 min 和 60 min, 提取细胞核蛋白进行蛋白印迹。GAPDH 为内参蛋白。

### 3 结论

本文基于 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型, 研究了人参皂苷 Rg2 的抗炎活性及其作用机制, 发现人参皂苷 Rg2 在 100  $\mu$ mol/L 的浓度范围内对 RAW264.7 细胞无毒性, 能够有效抑制炎症细胞 NO 的释放, 并能逆转 LPS 引起的细胞形态改变。PCR、RT-qPCR、ELISA 以及蛋白印迹等实验结果显示人参皂苷 Rg2 能够抑制 iNOS、COX2 以及 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的表达水平, 抑制 PI3K、PDK1、AKT、GSK-3 $\beta$  等蛋白的磷酸化和 NF- $\kappa$ B 的入核, 表明其抗炎机制与 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。该研究结果有助于全面理解

人参皂苷 Rg2 的抗炎活性及其机制, 但其更深入的抗炎机制仍有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] GRIVENNIKOV S I, GRETEN F R, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.
- [2] FURMAN D, CAMPISI J, VERDIN E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span [J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(12): 1822-1832.
- [3] MARTINEZ F O, HELMING L, GORDON S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective [J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 451-483.
- [4] LOCATI M, CURTALE G, MANTOVANI A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2020, 15(1): 123-147.
- [5] LUYC, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [6] RATAN Z A, HAIDERE M F, HONG Y H, et al. Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2021, 45(2): 199-210.
- [7] KIEFER D, PANTUSO T. Panax ginseng [J]. *American Family Physician*, 2003, 68(8): 1539-1542.
- [8] 钟京霖, 曹惠敏, 潘亚茹, 等. 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺/复糖复氧损伤 PC12 细胞保护作用的机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(2): 177-183.
- [9] 翟鹏, 李秀琴, 张大文, 等. 一种基于人参皂苷 RH2 增强免疫力的保健食品: 中国, 202211660630.2 [P]. 2023-03-10.
- [10] ZHOU J, ZHANG J, LI J, et al. Ginsenoside F2 suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells and obesity in mice via the AMPK pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(32): 9299-9312.
- [11] HAN S, YOU L, HU Y Y, et al. Ginsenoside F2 enhances glucose metabolism by modulating insulin signal transduction in human hepatocarcinoma cells [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2023, 47(3): 420-428.
- [12] GAO X Y, LIU G C, ZHANG J X, et al. Pharmacological properties of ginsenoside Re [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 754191.
- [13] LIU H, LIU M, JIN Z, et al. Ginsenoside Rg2 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and suppresses obesity in high-fat-diet-induced obese mice through the AMPK pathway [J]. *Food & Function*, 2019, 10(6): 3603-3614.
- [14] HE Z, CHEN S, PAN T, et al. Ginsenoside Rg2 ameliorating CDAHFD-induced hepatic fibrosis by



- regulating AKT/mTOR-mediated autophagy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(6): 1911-1922.
- [15] HUYHN D T N, BAEK N, SIM S, et al. Minor ginsenoside Rg2 and Rh1 attenuates LPS-induced acute liver and kidney damages via downregulating activation of TLR4-STAT1 and inflammatory cytokine production in macrophages [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6656-6682.
- [16] CAI L, FU W, YU X, et al. Ginsenoside Rg2 ameliorates brain injury after intracerebral hemorrhage in a rat model of preeclampsia [J]. *Reproductive Sciences*, 2020, 28(12): 3431-3439.
- [17] CYU J, SHAN R, CAO Y, et al. Protective effects of ginsenoside Rg2 against memory impairment and neuronal death induced by A $\beta$ 25-35 in rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 266(10): 113466.
- [18] MASSION P B, FERON O, DESSY C, BALLIGAND J L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing [J]. *Circulation Research*, 2003, 93(5): 388-398.
- [19] DEVIKA NT, JAFFAR ALI BM. Analysing calcium dependent and independent regulation of eNOS in endothelium triggered by extracellular signalling events [J]. *Molecular Biosystems*, 2013, 9(11): 2653-2664.
- [20] 牛志强,李琦,刘亚男,等.人参皂苷F2对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的改善作用[J].*现代食品科技*, 2024,40(1):27-33.
- [21] 孔凡秀,杨琪,董佳萍,等.人参皂苷Rg1对疲劳小鼠骨骼肌中TFAM和NRF-1基因表达的影响[J].*食品与生物技术学报*,2022,41(2): 67-72.
- [22] FREITAG A, REIMANN A, WESSLER I, et al. Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on rat tracheal epithelial cells in culture: morphology, proliferation and induction of nitric oxide (NO) synthase [J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 1996, 9(3): 149-156.
- [23] KIELBIK M, SZULC K I, KLINK M. The potential role of iNOS in ovarian cancer progression and chemoresistance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1751-1767.
- [24] HABANJAR O, BINGULA R, DECOMBAT C, et al. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4002-4042.
- [25] 薛茜茜.人参皂苷Rg2对动脉粥样硬化的保护作用 and 机制[D].青岛:青岛大学,2022.
- [26] ZHA L, CHEN J, SUN S, et al. Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Public Library of Science One*, 2014, 9(9): 107655.
- [27] FRANJE T F. PI3K/Akt: getting it right matters [J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6473-6488.
- [28] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANII E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Genes*, 2019, 698: 120-128.
- [29] 谢元,胡烨烨,李甫,等.基于PI3K/Akt信号通路研究积雪草中微量皂苷(CA-1)神经保护作用[J].*现代食品科技*, 2022,38(10): 62-70.
- [30] ENGELMAN J A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(8): 550-562.
- [31] PATEL M, HORGAN P G, MCMILLAN D C. NF- $\kappa$ B pathways in the development and progression of colorectal cancer [J]. *Translational Research*, 2018, 197: 43-56.
- [32] ZHONG Z, CAO Y, YANG S, et al. Overexpression of RRM2 in gastric cancer cell promotes their invasiveness via AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Pharmazie*, 2016, 71(5): 280-284.