

人参皂苷F2对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的改善作用

牛志强^{1,2}, 李琦², 刘亚男^{1,2}, 胡焯焯², 何姿良², 胡卫成³, 陶永霞^{1*}, 张迹^{1,2*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 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: 作为人参的主要生物活性物质, 多数人参皂苷已被证实具有良好的抗炎作用, 但是其抗炎机制研究较少, 尤其是人参皂苷F2。因此, 该研究基于脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症, 构建体外细胞炎症模型, 探究人参皂苷F2的抗炎作用。细胞活力实验表明人参皂苷F2在100 μmol/L内对细胞无毒性作用, 为安全浓度范围。人参皂苷F2可以显著抑制LPS刺激RAW264.7细胞NO释放, 且呈剂量依赖性抑制 (0~100 μmol/L)。人参皂苷F2 (50、100 μmol/L) 也呈剂量依赖性抑制一氧化氮合酶 (iNOS) 和肿瘤坏死因子 (TNF-α) 的 mRNA 表达, 100 μmol/L 时显著抑制 iNOS 和 TNF-α 的 mRNA 表达。经人参皂苷F2处理可显著下调 iNOS 蛋白表达, 但对 COX2 蛋白表达无显著促进作用 ($P>0.05$)。此外, 经扫描电镜 (SEM) 观察, 100 μmol/L 人参皂苷F2处理可以显著改善LPS刺激RAW264.7细胞的细胞形态改变。蛋白印迹表明, 人参皂苷F2提高了PDK1、AKT、IκB-α蛋白的表达, 降低了AKT蛋白磷酸化、NF-κB的核易位。该文研究结果表明人参皂苷F2具有较好的抗炎作用, 并可能通过AKT/IκB-α/NF-κB信号通路发挥其抗炎作用, 可为相关天然抗炎药物的开发提供理论支撑。

关键词: 人参皂苷F2; 抗炎作用; RAW264.7细胞

文章编号: 1673-9078(2024)01-27-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0141

Regulatory Effects of Ginsenoside F2 on LPS-induced Inflammation in RAW264.7 Cells

NIU Zhiqiang^{1,2}, LI Qi², LIU Yanan^{1,2}, HU Yeye², HE Ziliang², HU Weicheng³, TAO Yongxia^{1*}, ZHANG Ji^{1,2*}

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

(3. Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225109, China)

Abstract: Most ginsenosides (the main bioactive substances in ginseng) have been shown to exert potent anti-inflammatory effects, but their anti-inflammatory mechanisms, especially that of ginsenoside F2 (GF2), are incompletely understood.

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.

NIU Zhiqiang, LI Qi, LIU Yanan, et al. Regulatory effects of ginsenoside F2 on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 27-33.

收稿日期: 2023-02-13

基金项目: 江苏省区域环境与现代农业协同创新中心 (HSXT30411); 江苏省大学生创新创业训练计划项目 (202210323091Y)

作者简介: 牛志强 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与功能性, E-mail: M_Niu_Zhiqiang@163.com

通讯作者: 陶永霞 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品活性物质, E-mail: taoyongxia2010@163.com; 共同通讯作者: 张迹 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养学, E-mail: zhangji@hytc.edu.cn

understood. This study was conducted to explore the anti-inflammatory effect of GF2 in an *in vitro* model of inflammation using LPS-induced RAW264.7 cells. Cell viability analysis revealed that the safe concentration threshold of GF2 to be 100 $\mu\text{mol/L}$. GF2 significantly inhibited NO release in a dose-dependent manner (0~100 $\mu\text{mol/L}$) in LPS-induced RAW264.7 cells. GF2 (50, 100 $\mu\text{mol/L}$) also inhibited the mRNA expression of iNOS, IL-1 β , COX2, and TNF- α . GF2 markedly downregulated the protein expression of iNOS, but not that of COX2. Further, treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ GF2 markedly attenuated LPS-induced cell morphology changes in RAW264.7 cells. A western blot showed that GF2 increased PDK1, AKT, and I κ B- α protein expression, and decreased AKT phosphorylation and NF- κ B nuclear translocation. Our findings demonstrate that GF2 exerts potent anti-inflammatory effects and suggest that these effects are achieved through the AKT/I κ B- α /NF- κ B signaling pathway. This study can thus provide theoretical support for the development of natural anti-inflammatory drugs.

Key words: ginsenoside F2; anti-inflammatory effect; RAW264.7 cells

人参 (*Panax ginseng* C.A.Mey.), 多年生草本植物, 人们常说的人参并不是单指一种植物, 大多数情况下指的是人参属植物的根, 人参属植物分有中国参、三七、韩参、日本参、越南参和西洋参等^[1]。人参作为我国传统草药之一, 原产于亚洲东部, 近些年来已在全世界范围内流行。这主要取决于人参本身的特性, 从古至今, 人参已被广泛使用了几千年, 而随着科学技术的发展, 人参中越来越多的化学成分被分离鉴定了出来, 各种药理药性也被陆续研究发现, 使得世人对人参更加重视^[2,3]。人参的主要活性成分是皂苷, 统称为人参皂苷 (Ginsenoside), 目前, 从人参或加工人参中提取出的人参皂苷有近百种, 大多数人参皂苷已被证实具有良好的抗炎、抗氧化和抗肥胖作用, 对肿瘤、糖尿病和心血管疾病也有明显的改善^[3]。此外, 有研究表明人参可对人类的认知性产生有益的影响^[4,5]。

人参已被证实具有多种炎症改善或治疗的生物活性作用, 大多数人参皂苷及其代谢物具有良好的抗炎能力^[6]。目前已被证实具有抗炎作用的人参皂苷有 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rf、Rg1、Rg2、Rg3、Rg5、Rh1、Rh2、Rk3、Ro、Rp1、CK 和 R4 等^[7-24]。目前人参皂苷 F2 已被证实具有降糖^[25]、抗肥胖^[26]和抑制细胞凋亡^[27], 且可通过增加调节性 T 细胞以及减少 Th17 细胞减轻乙醇暴露诱导的慢性肝损伤^[28]。在本课题组前期的探索性研究中, 发现人参皂苷 F2 具有良好的抗炎作用。目前, 关于人参皂苷 F2 单体的抗炎作用研究较少, 有研究表明人参皂苷 F2 可通过抑制 $\gamma\delta$ T 细胞和中性粒细胞中 IL-17 以及 ROS 的产生来改善小鼠皮肤炎症^[29], 但该研究未能揭示具体的信号通路, 人参皂苷 F2 的抗炎作用机制尚不明确。本文旨在研究人参皂苷 F2 的抗炎作用机制。

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分之一, 可

以引起细胞炎症。LPS 与细胞表面受体 TLR4 结合, 将信号传递给细胞内, 经由接头蛋白接收信号, 进一步产生信号级联反应, 激活经典的 NF- κ B 炎症信号通路^[7]。作为该通路典型的炎症效应物, NO 可进一步刺激炎症的发生^[11]。本研究使用经典的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的体外细胞炎症模型, 评价了人参皂苷 F2 对 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用, 并以此来探究其抗炎作用, 可为开发相关天然抗炎药物提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参皂苷 F2, 纯度 >98% (HPLC), 四川成都至纯本草生物科技有限公司; 小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7), 美国菌种保藏中心 (ATCC); RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素抗生素 (AB)、胎牛血清 (FBS), Invitrogen Gibco; 二甲亚砜 (DMSO)、台盼蓝、甲氮甲唑蓝、Trizol Reagent, Sigma-Aldrich; 细胞全蛋白及核蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒, 康为世纪; BCA 蛋白定量试剂盒, 爱必信; BSA, VWR; PDK1、p-PDK1、AKT、p-AKT、NF- κ B、p-NF- κ B、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、TLR4 等相关抗体, CST; 甲醇、乙醇、异丙醇、氯化钠、十二烷基硫酸钠、三氯甲烷、三羟甲基氨基甲烷等基础化学试剂, 国药集团。

1.2 仪器与设备

细胞 CO₂ 培养箱 (HERACELL I50i), Thermo Fisher; 倒置显微镜 (IX71), Olympus; 低温高速离心机 (5414R), Eppendorf; 酶标仪 (M200 Pro), Tecan; PCR 仪 (T100 Thermal Cycle PCR), Bio-Rad; 实时荧光定量 PCR 仪、电泳槽 (Power PacTMHC), Bio-Rad; 凝胶成像系统 (Tannon

5200), 天能; 扫描电子显微镜 (Quanta FEG450), Quanta FEG。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及传代

从液氮罐取出 RAW264.7 细胞, 加入含有体积分数为 10% 的 FBS 和 1% AB 的 RPMI 1640 培养基, 置于 CO₂ 细胞培养箱中 (37 °C) 培养, 待细胞贴壁后换液。当细胞生长到培养瓶贴壁面积的 80% 左右时进行传代。吸去旧培养基, 加入新培养基, 将细胞吹打重悬, 并在显微镜下观察确认后, 按传代比为 1:3~1:5 进行传代培养。约 2~3 d 传代一次, 待传代三次后, 进行实验。

1.3.2 细胞存活率测定

本实验采用 MTT 法测定细胞存活率。取对数生长期的细胞, 接种于 96 孔板, 每孔接种量 1×10^5 个细胞, 培养过夜。设空白组、对照组和药物组, 每组三个重复。使用不同浓度的人参皂苷 F2 (10、20、40、60、80、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24 h, 吸去培养基, 加入 100 μL MTT 工作液 (0.5 mg/mL) 后置于细胞培养箱孵育 4 h, 加入 100 μL MTT 终止液, 孵育过夜, 550 nm 处测定吸光值, 计算细胞存活率。细胞存活率计算方法: 对空白组进行归一化, 按公式 (1) 进行计算。

$$C = \frac{a}{b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C —细胞存活率, %;

a —样本吸光值;

b —对照组吸光度平均值。

1.3.3 一氧化氮 (NO) 释放量测定

取对数生长期的细胞, 接种于 96 孔板 (设

空白组、模型组和药物组, 每组三个重复), 每孔接种量 1×10^5 个细胞, 培养过夜。用不同浓度的人参皂苷 F2 (0、12.5、25、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min, 加入 LPS (终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24 h 后, 采用 Griess 法测定上清 NO 含量。

1.3.4 细胞形态观察

取对数生长期的细胞, 接种在底部放有无菌玻片的六孔板中 (设空白组、模型组和药物组), 每孔接种量 2×10^6 个细胞, 培养过夜, 待细胞贴壁后, 药物组使用人参皂苷 F2 (终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min, 加入 LPS 处理 24 h 后, 弃去培养液, 加入适量 PBS 清洗, PBS 浸没玻片轻轻摇动即可, 清洗三遍; 加入固定液 (体积分数为 2.5% 的戊二醛), 4 °C 静置固定约 1 h; 用 PBS 清洗后使用梯度乙醇脱水, 去除水分, 乙醇体积分数依次为 25%、50%、75%、100%, 每次脱水时间约 3~5 min。脱水完成后, 将样品置于干燥器中一段时间, 再使用离子溅射仪对样品进行导电处理, 随后进行扫描电镜 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 观察分析。

1.3.5 mRNA 表达量分析 (RT-qPCR)

将处于对数生长期的细胞接种在 6 孔板中, 每孔接种量 2×10^6 个细胞, 过夜培养。人参皂苷 F2 (终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min, 加入 LPS 处理 6 h。收细胞后加入 1 mL Trizol 试剂, 提取细胞总 RNA。将 RNA 反转录成 cDNA 后进行实时荧光定量分析目的基因 mRNA 的表达量。反转录实验步骤按照试剂盒说明书进行, 内参基因为 *GAPDH*, 所用引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物序列如表 1^[30]。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of primer

基因名称	正向引物	反向引物
<i>iNOS</i>	CATTGATCTCCGTGACAGCC	CATGCTACTGGAGGTGGGTG
<i>COX2</i>	GGGAGTCTGGAACATTGTGAA	GCACATTGTAAGTAGGTGGACTGT
<i>TNF-α</i>	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACCTCT
<i>IL-1β</i>	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTAAACTCCAC
<i>GAPDH</i>	CACTCACGGCAAATTCAACGGCACA	GACTCCACGACATACTCAGCAC

1.3.6 蛋白印迹分析

细胞处理结束后,收集细胞,用PBS清洗细胞两次,离心后吸去PBS,根据细胞全蛋白、细胞核蛋白提取试剂盒说明书进行全蛋白或核蛋白的提取。使用BCA蛋白定量试剂盒对上一步的蛋白质样品定量后,进行蛋白印迹分析。SDS-PAGE电泳分离,随后将蛋白转到PVDF膜上,用质量分数为5%的BSA封闭2h,清洗三遍后将膜装入抗体孵育袋,加入一抗,4℃孵育过夜,清洗三遍后加入二抗孵育两小时,采用化学发光进行曝光分析。

1.4 数据处理及分析

本文采用IBM SPSS Statistics 26进行*t*检验、单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。采用SigmaPlot 10.0进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷F2对RAW264.7细胞活力影响

本文首先评价了人参皂苷F2对RAW264.7细胞的毒性作用,人参皂苷F2浓度分别为0、10、20、40、60、80、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$,每个浓度设三个重复。结果如图1所示,在浓度10~100 $\mu\text{mol/L}$ 时,人参皂苷F2对RAW264.7细胞无细胞毒性作用,反而稍有促进细胞增殖的作用,而在125 $\mu\text{mol/L}$ 时,对细胞活力产生较大影响,有较大的细胞毒性,在150 $\mu\text{mol/L}$ 时,对细胞产生巨大毒性。结果表明,人参皂苷F2对于RAW264.7细胞的安全用药浓度在100 $\mu\text{mol/L}$ 以内。

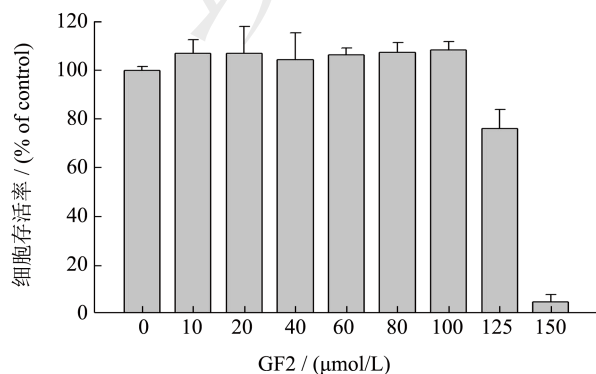


图1 人参皂苷F2对RAW264.7细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of ginsenoside F2 on cell viability of RAW264.7 cells

2.2 人参皂苷F2对LPS刺激RAW264.7细胞产生NO的抑制作用

作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,LPS可

以引起细胞炎症,作为典型的炎症效应物,NO可进一步刺激炎症的发生。实验表明,在安全用药浓度范围内,人参皂苷F2对LPS刺激RAW264.7细胞的NO释放量呈剂量依赖性抑制,如图2所示,相对于未加药物处理组,人参皂苷F2浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时,NO释放量为87.80%,而在100 $\mu\text{mol/L}$ 时,NO释放量为71.11%。结果表明,人参皂苷F2可以有效抑制LPS刺激RAW264.7细胞的NO释放量,进而发挥抗炎作用。

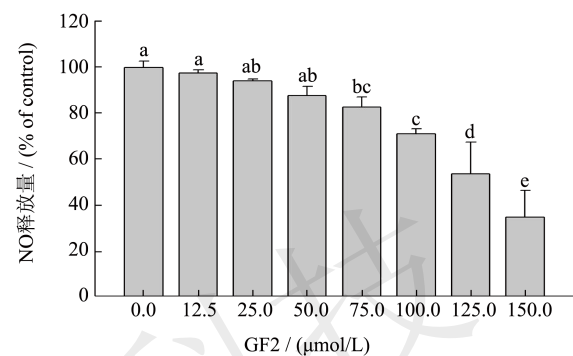


图2 人参皂苷F2对RAW264.7细胞NO释放量的影响

Fig.2 Effect of ginsenoside F2 on NO production of RAW264.7 cells

2.3 人参皂苷F2对LPS刺激RAW264.7细胞形态的保护作用

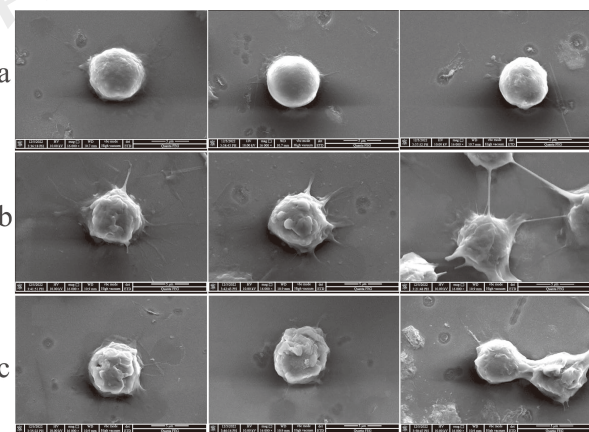


图3 人参皂苷F2对RAW264.7细胞的细胞形态的影响

Fig.3 Effect of ginsenoside F2 on cellular morphology of RAW264.7 cells

注:(a)对照组;(b)LPS处理组;(c)LPS和人参皂苷F2(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组。每组设三个代表图像,放大倍数为16000倍。

使用SEM观察RAW264.7细胞的形态学变化^[30]。如图3所示,未经处理的对照组(图3a)RAW264.7细胞为圆形,细胞边缘光滑,无伪足;经LPS刺激后(图3b),RAW264.7细胞形态发生改变,整体仍

为圆形，体积稍大，细胞边缘凹凸不平，有明显的孔隙形成，伪足变长；经人参皂苷 F2 处理后（图 3c），细胞形态有明显的改善，伪足明显变短、消失，孔隙减少。综上所述，人参皂苷 F2 可有效改善 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞的细胞形态的改变。

2.4 人参皂苷 F2 对炎症相关基因 mRNA 表达的影响

iNOS 和 COX2 为炎症反应发生的关键酶，在受到炎症刺激信号时 iNOS 和 COX2 会显著上调，进而产生炎症反应^[11]。作为炎症反应的效应物，炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等分泌到细胞外会产生各种炎症级联反应，刺激细胞持续释放炎症因子，使得炎症加剧，导致“炎症风暴”，也可导致各种炎症性疾病^[13]。本文选用 iNOS、COX2、TNF- α 和 IL-1 β 四种炎症相关分子作为炎症发生的标志，通过实时荧光定量 PCR 技术分别检测了 RAW264.7 细胞中的 iNOS、COX2、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达水平。如图 4 所示，与对照组相比，经 LPS 刺激后四种炎症分子 mRNA 的相对表达水平均显著提高，人参皂苷 F2 可呈剂量依赖性（50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ ）降低 iNOS 和 IL-1 β 的 mRNA 表达量，50 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 F2 处理对 iNOS 和 TNF- α 的 mRNA 表达量无显著促进作用 ($P>0.05$)，而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 F2 可显著降低 iNOS 和 TNF- α 的 mRNA 水平 ($P<0.05$)。综上所述，人参皂苷 F2 可以显著降低 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的 iNOS、COX2、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达量，进而发挥抗炎作用。

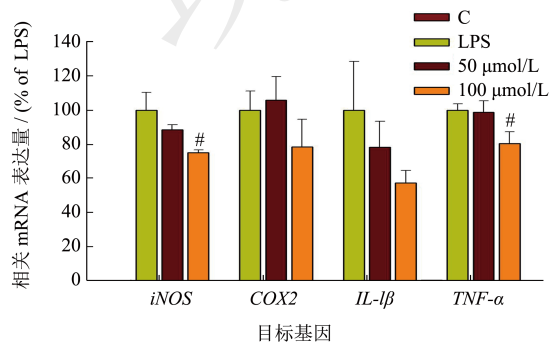


图 4 人参皂苷 F2 对 RAW264.7 细胞炎症基因表达的影响

Fig.4 Effect of ginsenoside F2 on inflammatory genes of RAW264.7 cells

注：# 代表与 LPS 处理组有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.5 人参皂苷 F2 对 iNOS 和 COX2 蛋白表达的影响

LPS 与细胞表面 TLR4 受体结合，进而激活细胞

各种炎症通路，如 NF- κB 和 AKT 等信号途径^[7]。蛋白印迹分析（图 5）显示，人参皂苷 F2（50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ ）预处理对 TLR4、NF- κB 和 AKT 等蛋白含量均无明显抑制。如图 5 所示，LPS 刺激后可显著提高 iNOS 和 COX2 蛋白表达，经人参皂苷 F2 处理，可显著下调 iNOS 蛋白表达，且呈剂量依赖，这与 2.4 所述人参皂苷 F2 可降低 iNOS 的 mRNA 水平相一致；而人参皂苷 F2 对 COX2 蛋白的表达量无明显影响，2.4 述中低浓度人参皂苷 F2（50 $\mu\text{mol/L}$ ）对 COX2 的 mRNA 表达量无明显影响一致，高浓度人参皂苷 F2（100 $\mu\text{mol/L}$ ）可显著降低 COX2 的 mRNA 表达量，而 COX2 蛋白质无显著促进作用 ($P>0.05$)。

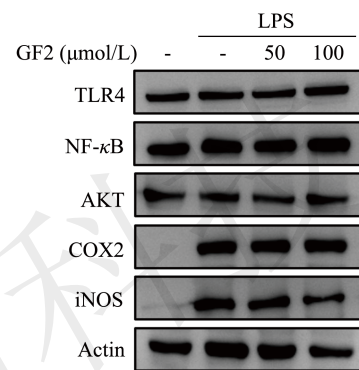


图 5 人参皂苷 F2 对 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX2 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of ginsenoside F2 on the protein expression of iNOS and COX2 in RAW264.7 cells

注：实验方法，人参皂苷 F2（50 $\mu\text{mol/L}$ 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。Actin 为内参蛋白。

2.6 人参皂苷 F2 对 PDK1、AKT、I κB - α 、GSK-3 β 和 NF- κB 等蛋白表达及活化的影响

在经典的炎症信号通路（NF- κB 信号通路）中，NF- κB 为典型炎症相关核转录因子，GSK-3 β 为典型炎症效应物。作为参与糖酵解途径的关键酶，PDK1（丙酮酸脱氢酶激酶 1）可以与 AKT（丝氨酸/苏氨酸激酶）的 308 丝氨酸位点结合并使其磷酸化，部分激活 AKT，此外 AKT 可被 mTORC2 磷酸化其第 473 丝氨酸位点进而完全激活 AKT，进而调节 NF- κB 信号转导^[23,31]。NF- κB /Rel 蛋白与 I κB 结合并受到 I κB 蛋白抑制，当 I κB 蛋白被磷酸化后，导致自身泛素化后降解，进而释放 NF- κB /Rel 蛋白，经过一系列翻译后修饰入核，作为一种核转录因子，NF- κB 入核后启动目的基因表达^[7]。如图 6 所示，在 0.5 和 1 h 时，相对于 LPS 组，经人

参皂苷 F2 处理可显著降低 PDK1 蛋白磷酸化; 在 3 h 时, 提高 AKT 蛋白表达, 降低 AKT 蛋白磷酸化。作为 NF- κ B 的抑制剂, 经药物处理后, I κ B- α 蛋白的表达量在 1 h 和 3 h 时有所增加, 而在 0.5 h 处对 I κ B- α 蛋白表达量无明显影响, 但是人参皂苷 F2 处理可明显减少 I κ B- α 蛋白磷酸化。如图 7 所示, 经人参皂苷 F2 处理后, 在 1 h 可以显著降低 NF- κ B 入核。综上所述, 人参皂苷 F2 可通过影响 PDK1/AKT/I κ B- α /NF- κ B 途径发挥抗炎作用。

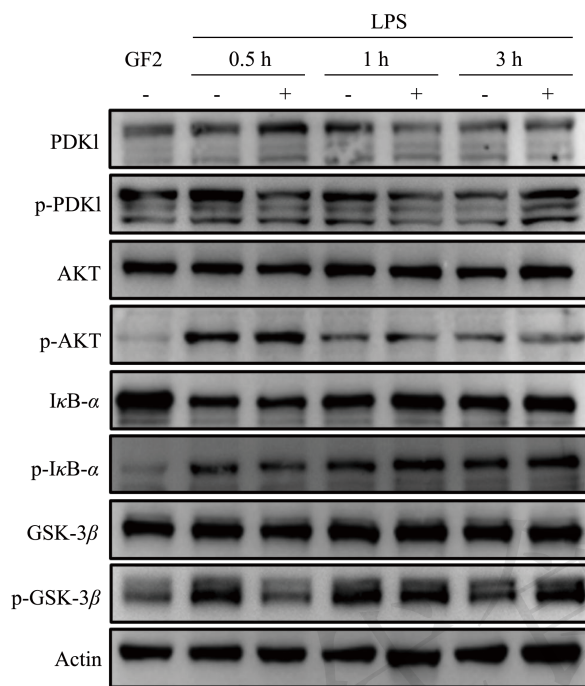


图 6 人参皂苷 F2 对 PDK1/AKT/I κ B- α /GSK-3 β 通路的影响

Fig.6 Effect of ginsenoside F2 on PDK1/AKT/I κ B- α /GSK-3 β pathway

注: 实验方法, 人参皂苷 F2 (100 μ mol/L) 预处理 30 min, LPS (1 μ g/mL) 分别刺激 0.5、1 和 3 h, 提取细胞全蛋白进行蛋白印迹。Actin 为内参蛋白。

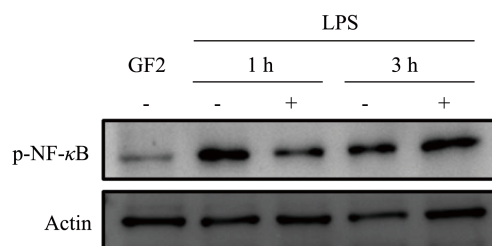


图 7 人参皂苷 F2 对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 核易位的影响

Fig.7 Effect of ginsenoside F2 on the nuclear translocation in RAW264.7 cells

注: 实验方法, 人参皂苷 F2 (100 μ mol/L) 预处理 30 min, LPS (1 μ g/mL) 刺激 1 或 3 h, 提取细胞核蛋白进行蛋白印迹。Actin 为内参蛋白。

3 结论

本文首先评价了人参皂苷 F2 的安全用药范围 (0~100 μ mol/L)。其次, 基于 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症, 构建体外细胞炎症模型, 探究人参皂苷 F2 的抗炎作用。相对于 LPS 处理组, 人参皂苷 F2 可以有效抑制 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的 NO 释放量, 下调 *iNOS*、*COX2*、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 相对表达量, 抑制 iNOS 蛋白的表达, 并且可以有效改善细胞形态。最后使用蛋白印迹分析在不同处理时间的细胞全蛋白、核蛋白中相关通路蛋白的表达量, 人参皂苷 F2 可通过影响 PDK1/AKT/I κ B- α /NF- κ B 途径发挥抗炎作用。综上所述, 本研究证明人参皂苷 F2 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症具有明显的改善作用, 但具体作用靶点有待进一步探索。

参考文献

- [1] KIEFER D, PANTUSO T. Panax ginseng [J]. Am Fam Physician, 2003, 68(8): 1539-1542.
- [2] YUN T K. Brief introduction of Panax ginseng CA Meyer [J]. Journal of Korean Medical Science, 2001, 16(Suppl): S3-S5.
- [3] ATTELE A S, WU J A, YUAN C S. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions [J]. Biochemical Pharmacology, 1999, 58(11): 1685-1693.
- [4] BYONG-KYU SHIN, SUNG WON KWON, JEONG HILL PARK. Chemical diversity of ginseng saponins from Panax ginseng [J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(4): 287-298.
- [5] GENG J S, DONG J C, NI H, et al. Ginseng for cognition [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2010 (12): 1465-1858.
- [6] PARK J, CHO J. Anti-inflammatory effects of ginsenosides from Panax ginseng and their structural analogs [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(16): 3682-3690.
- [7] GAO H, KANG N, HU C, et al. Ginsenoside Rb1 exerts anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* by modulating toll-like receptor 4 dimerization and NF- κ B/MAPKs signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2020, 69: 153197.
- [8] MIAO L, YANG Y, LI Z, et al. Ginsenoside Rb2: A review of pharmacokinetics and pharmacological effects [J]. Journal of Ginseng Research, 2022, 46(2): 206-213.
- [9] YU T, YANG Y, KWAK Y S, et al. Ginsenoside Rc from Panax ginseng exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2 [J]. Journal of Ginseng Research,

- 2017, 41(2): 127-133.
- [10] SHIN D W, LIM B O. Nutritional interventions using functional foods and nutraceuticals to improve inflammatory bowel disease [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2020, 23(11): 1136-1145.
- [11] LEE I A, HYAM S R, JANG S E, et al. Ginsenoside Re ameliorates inflammation by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to TLR4 on macrophages [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(38): 9595-9602.
- [12] KIM M K, KANG H, BAEK C W, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ginsenoside Rf in a rat model of incisional pain [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2018, 42(2): 183-191.
- [13] GAO Y, LI J, WANG J, et al. Ginsenoside Rg1 prevent and treat inflammatory diseases: A review [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 87: 106805.
- [14] HUYNH 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.
- [15] KANG S, PARK S J, LEE A Y, et al. Ginsenoside Rg3 promotes inflammation resolution through M2 macrophage polarization [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2018, 42(1): 68-74.
- [16] ZHU Y, ZHU C, YANG H, et al. Protective effect of ginsenoside Rg5 against kidney injury *via* inhibition of NLRP3 inflammasome activation and the MAPK signaling pathway in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Pharmacological Research*, 2020, 155: 104746.
- [17] TAM D N H, TRUONG D H, Nguyen T T H, et al. Ginsenoside Rh1: a systematic review of its pharmacological properties [J]. *Planta Medica*, 2018, 84(3): 139-152.
- [18] BAATAR D, SIDDIQI M Z, IM W T, et al. Anti-inflammatory effect of ginsenoside Rh2-mix on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2018, 21(10): 951-960.
- [19] TIAN M, MA P, ZHANG Y, et al. Ginsenoside Rk3 alleviated DSS-induced ulcerative colitis by protecting colon barrier and inhibiting NLRP3 inflammasome pathway [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 85: 106645.
- [20] XU H L, CHEN G H, WU Y T, et al. Ginsenoside Ro, an oleanolic saponin of *Panax ginseng*, exerts anti-inflammatory effect by direct inhibiting toll like receptor 4 signaling pathway [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2022, 46(1): 156-166.
- [21] BAE J, KOO J, KIM S, et al. Ginsenoside Rp1 exerts anti-inflammatory effects via activation of dendritic cells and regulatory T cells [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2012, 36(4): 375-382.
- [22] BAIK I H, KIM K H, LEE K. Antioxidant, anti-inflammatory and antithrombotic effects of ginsenoside compound k enriched extract derived from ginseng sprouts [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 4102.
- [23] LUO Y, JIANG Y, HE Y, et al. Vina-ginsenoside R4 from *Panax ginseng* leaves alleviates 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells *Via* the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(51): 15239-15248
- [24] PARK J, CHO J. Anti-inflammatory effects of ginsenosides from *Panax ginseng* and their structural analogs [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(16): 3682-3690.
- [25] 韩胜强.人参皂苷F2降糖作用研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2021.
- [26] 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.
- [27] 刘迪,于子翔,张浩,等.人参皂苷F2干预NF- κ B通路抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡[J].现代食品科技,2020,36(12):1-6.
- [28] KIM M H, KIM H H, JEONG J M, et al. Ginsenoside F2 attenuates chronic-binge ethanol-induced liver injury by increasing regulatory T cells and decreasing Th17 cells [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2020, 44(6): 815-822.
- [29] PARK S H, SEO W, EUN H S, et al. Protective effects of ginsenoside F2 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(4): 1713-1719.
- [30] CAO Y, LI F, LUO Y, et al. 20-Hydroxy-3-oxolupan-28-oic acid attenuates inflammatory responses by regulating PI3K-AKT and MAPKs signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 386.
- [31] 谢元,胡焯焯,李甫,等.基于PI3K/Akt信号通路研究积雪草中微量皂苷(CA-1)的神经保护作用[J].现代食品科技,2022,38(10):62-70.