

# 人参皂苷Rg3对氧化应激诱导神经细胞损伤的保护作用

于子翔, 何元洋, 王一媚, 董博奇, 刘水, 刘迪\*, 冯宪敏\*

(吉林医药学院基础医学院, 吉林吉林 132013)

**摘要:** 该文探讨了人参皂苷 Rg3 对氧化应激诱导 PC12 细胞损伤的保护作用。通过细胞抗氧化活性 (CAA) 实验检测 Rg3 对氧自由基诱导细胞氧化的抑制作用, 并建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞氧化应激模型, CCK-8 法检测 Rg3 对细胞的保护和毒性作用, 运用 Western blot 检测 Rg3 对炎症和凋亡相关信号通路中 p65 磷酸化蛋白和 CREB 磷酸化蛋白的影响。结果发现 Rg3 对氧自由基的抗氧化能力约是 Trolox 的 7.3 倍。200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 氧化应激时细胞活力下降至 60.11%, p-p65 蛋白相对量为 1.30, p-CREB 蛋白相对量为 0.80。10、20 和 40 μmol/L Rg3 保护组的细胞活力分别提高至 74.00%、76.04%、80.36%, 呈浓度依赖式提高; 细胞 p-p65 蛋白相对量分别降低至 1.18、1.03、0.82; 细胞 p-CREB 蛋白相对量分别提高至 1.31、1.75、2.30。结果表明人参皂苷 Rg3 可能通过清除氧自由基, 参与 NF-κB/CREB 通路调控, 减轻 PC12 细胞炎症和凋亡, 抑制氧化应激诱导的神经细胞损伤, 为人参的神经营养特性研究及相关功能食品开发提供理论依据。

**关键词:** 人参皂苷 Rg3; 氧化应激; CREB; NF-κB p65; 神经损伤

文章编号: 1673-9078(2024)08-116-122

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0693

## Protective Effect of Ginsenosides Rg3 against Nerve Cell Injury Induced by Oxidative Stress

YU Zixiang, HE Yuanyang, WANG Yimei, DONG Boqi, LIU Shui, LIU Di\*, FENG Xianmin\*

(College of Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China)

**Abstract:** To determine protective effect of ginsenoside Rg3 on oxidative stress-induced injury in PC12 cells, the inhibitory effect of Rg3 on oxygen free radicals induced cell oxidation was detected in a cellular antioxidant activity experiment. To this end, an oxidative stress model of PC12 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was established, whose cell viability was detected using the CCK-8 method. The effects of Rg3 on the protein expression of p65 and CREB, related to inflammatory and apoptosis, were detected by western blotting. The results showed that the antioxidant ability of Rg3 in response to oxygen free radicals was approximately 7.3-fold that of Trolox. Cell viability was decreased by 60.11% after treatment with 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Meanwhile, the relative expression of p-p65 protein was increased to 1.30, and p-CREB protein was decreased to 0.80. The cell viabilities of protective groups pretreated with different concentrations of Rg3 (10, 20, and 40 μmol/L) were found to

引文格式:

于子翔,何元洋,王一媚,等.人参皂苷Rg3对氧化应激诱导神经细胞损伤的保护作用[J].现代食品科技,2024,40(8): 116-122.

YU Zixiang, HE Yuanyang, WANG Yimei, et al. Protective effect of ginsenosides Rg3 against nerve cell injury induced by oxidative stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 116-122.

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 吉林省自然科学基金项目 (20200201146JC)

作者简介: 于子翔 (1986-), 男, 学士, 助理工程师, 研究方向: 生物信息与大数据, E-mail: wujasang@126.com

通讯作者: 刘迪 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性物质的研究与开发, E-mail: liudi1542@163.com; 共同通讯作者: 冯宪

敏 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 病原体分子致病机制, E-mail: fengxianmin28@163.com

increase by 74.00%, 76.04%, and 80.36%, respectively. The relative expressions of p-p65 protein decreased to 1.18, 1.03, and 0.82, respectively. Meanwhile, the relative expression of p-CREB protein increased to 1.31, 1.75 and 2.30, respectively. These results suggest that ginsenoside Rg3 may protect PC12 cells from oxidative damage by scavenging oxygen free radicals. The underlying mechanisms may be related to the NF- $\kappa$ B/CREB pathway, which reduces inflammation and apoptosis in PC12 cells, thereby inhibiting the oxidative stress-induced nerve cell damage. These findings provide a theoretical basis for the study of the neurotrophic characteristics of ginseng and the development of related functional foods.

**Key words:** ginsenoside Rg3; oxidative stress; CREB; NF- $\kappa$ B p65; nerve injury

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 的化学成分复杂, 具有广泛的生物活性。人参皂苷是其主要有效成分, 具有多种药理活性, 包括抗疲劳、抗氧化、神经保护、抗炎症和抗糖尿病等<sup>[1]</sup>, 其抵抗自由基的能力在这些功能中发挥重要作用。人参皂苷 Rg3 具有抗肿瘤、清除氧自由基、抗氧化等多种生理功能<sup>[2]</sup>。人参皂苷 Rg3 是一种原人参二醇皂苷 (PPD), 是目前研究较多的人参皂苷之一, 在红参中含量相对丰富, 具有免疫调节、抗疲劳、抗炎、抗衰老、心血管保护、肝脏保护、抗糖尿病、抗癌等药理作用<sup>[3,4]</sup>。而 Rg3 的抗氧化应激在这些药理活性中发挥重要作用。研究表明, 人参皂苷具有抗神经氧化应激、神经炎症和神经凋亡介质的潜力<sup>[5]</sup>。人参皂苷 Rg3 可能成为治疗炎症性和氧化应激性疾病的一种有前景的候选药物<sup>[6]</sup>。近年来, 人参皂苷 Rg3 的神经保护作用被广泛研究。人参皂苷 Rg3 对大鼠局灶性脑缺血损伤和鱼藤酮诱导的小鼠帕金森病均具有神经保护作用<sup>[7,8]</sup>。腹腔注射人参皂苷 Rg3 4 周可通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制三甲基锡诱导的癫痫发作, 改善行为功能<sup>[9]</sup>。此外, 人参皂苷 Rg3 灌胃可改善脂多糖诱导的体重减轻和抑郁样行为<sup>[10]</sup>。有研究显示, 人参皂苷 Rg3 不仅能提高氧葡萄糖剥夺 SH-SY5Y 细胞的细胞活力, 还能抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>。前期研究显示, Rg3 的同级异构体 F2 具有抑制氧化应激、抗凋亡作用<sup>[12,13]</sup>。

氧化应激是指产生多余活性氧 (Reactive Oxygenspecies, ROS) 超出了身体的清除能力。目前氧化应激的含义已被重新修订, 即促氧化剂和抗氧化剂失衡并伴有氧化还原回路的干扰和大分子损伤<sup>[5]</sup>。ATP 的重要来源是线粒体中的氧化磷酸化, 该过程的副产物可产生自由基、活性氧 (ROS)、活性氮 (RNS)。实际上, 每个有氧细胞都会产生 ROS, 这是第二信息传递分子家族的一部分。但过量的 ROS 能损伤脂类、蛋白质和碳水化合物等分子, 影响其生理活性<sup>[14]</sup>。前期研究表明, 过量的

ROS 可激活细胞凋亡相关通路, 导致细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>。CREB 属于一个具有转录因子功能的蛋白质家族, 在细胞核内选择性结合 CREs, 刺激基因转录, 提高基因转录活性, 包括一些抑制细胞凋亡的核蛋白<sup>[5]</sup>。CREB 转录因子通常被认为是记忆和认知的关键因素<sup>[15]</sup>。研究表明, CREB 转录级联的下调与氧化应激和神经变性有关<sup>[16]</sup>。从机制上看, Akt 能够激活 CREB, 从而诱导靶基因 (如 BDNF) 的转录, 从而促进神经保护<sup>[17]</sup>。NF- $\kappa$ B 通路与细胞凋亡、炎症密切相关, 该通路中的 p65 蛋白几乎分布与所有细胞中, 而且主要以 p65/p50 二聚体形式存在<sup>[18]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种触发许多促凋亡和抗凋亡基因表达的转录因子, 它在引发小胶质细胞神经炎症反应的信号通路中起着至关重要的作用<sup>[19]</sup>。研究表明, CREB 能通过影响 NF- $\kappa$ B 和抑制炎症介质的转录来减少神经炎症<sup>[18]</sup>。

本研究首先考察人参皂苷 Rg3 对细胞的抗氧化作用, 并采用过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 诱导 PC12 细胞氧化应激, 基于 CREB 和 NF- $\kappa$ B 考察人参皂苷 Rg3 对氧化应激诱导神经损伤的抑制作用, 探讨人参皂苷 Rg3 的神经保护作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PC12 细胞 (褐家鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的细胞系), 中国科学院细胞库; HepG2 细胞 (人肝癌细胞系), 中国科学院细胞库; 人参皂苷 Rg3 ( $\geq 98\%$ ), 中国药品生物制品检定所; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素 (PSS)、PBS 缓冲液、胰酶, 美国 Gibco 公司; 质量分数 35% 过氧化氢溶液 ( $H_2O_2$ ), 中国 Alfa Aesar 公司; DCFH-DA、AAPH、Trolox, 美国 Sigma; 细胞增殖与毒性检测试剂盒 (cck-8), 日本同仁化学研究所; PMSF (RIPA 裂解液)、超敏 ECL 化学发光试剂盒, 中国碧云

天; Anti-p-CREB、Anti-p-p65, 英国 Abcam; Anti- $\beta$ -Actin、Anti-Rabbit IgG-HRP, 中国 Abclonal。

SpectraMax iD5 型多功能酶标仪 (Molecular Devices, 美国), Thermo Forma 3111 型二氧化碳培养箱 (Thermo, 美国), SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰, 中国), PowerPac Basi 型电泳和转膜仪 (Bio-Rad, 美国), Tanon5200 型图像采集仪 (天能, 中国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞抗氧化能力 (CAA) 测定

HepG2 细胞以每毫升  $5 \times 10^4$  个浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 3 平行/组, 培养 24 h, PBS 清洗后加入含有不同浓度人参皂苷 Rg3 (1.25、2.5、5、10、20  $\mu$ mol/L) 和 DCFH-DA (25 mmol/L) 的混合溶液每孔 100  $\mu$ L, 继续培养 1 h 后移除染液, PBS 清洗 3 遍去除探针, 加入 100  $\mu$ L AAPH 溶液 (终浓度 600 mmol/L), 置于酶标仪中每 5 min 检测一次荧光值 (激发波长 485/20, 发射波长 528/20), 连续检测 1 h, 以空白组为零做归一化统计, 绘制荧光变化曲线图。CAA 值计算公式如下:

$$\text{CAA unit} = 1 - (\int \text{SA} - \int \text{CA}) \quad (1)$$

式中:

$\int \text{SA}$ ——不同浓度 Rg3 组的曲线累计面积;

$\int \text{CA}$ ——PBS 组的曲线积分面积。

以 Trolox 为标准曲线计算每 100  $\mu$ mol/L Rg3 相当于多少  $\mu$ mol/L 的 Trolox (TE 当量)。根据中效方程计算三个平行试验的  $\text{EC}_{50}$ , 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $\text{EC}_{50}$  值越小, 则 CAA 值越大, 表示抗氧化效果越好。

### 1.2.2 细胞氧化应激模型建立

PC12 细胞培养基采用含有体积分数 10% FBS、1% PSS 和 90% DMEM 培养基。试验含空白组、对照组和损伤组等三个组 (5 平行/组), 96 孔板每孔接种  $(5 \sim 6) \times 10^3$  个 PC12 细胞, 培养基体积 90  $\mu$ L, 空白组只有培养基, 培育 24 h。然后空白组和对照组补充 10  $\mu$ L 培养基, 损伤组分别加入终浓度为 50、100、150、200、250、300、350、400  $\mu$ mol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu$ L, 置于培养箱中培育 6 h。结束后, 加入 CCK-8 试剂每孔 10  $\mu$ L, 继续培育 1.5 h, 最后置于酶标仪中测 450 nm 处吸光度值, 按如下公式计算细胞活力, 以对照组为 100%。

$$B = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$B$ ——细胞活力 (CV), %;

$A_0$ ——空白组吸光度值;

$A_1$ ——对照组吸光度值;

$A_2$ ——损伤组吸光度值。

### 1.2.3 细胞毒性试验

设对照组和人参皂苷 Rg3 组, 每组设 5 个平行。96 孔板每孔接种  $5 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$  个 PC12 细胞, 培养基体积 90  $\mu$ L, 培育 24 h。Rg3 组分别加入终浓度为 5、10、20、40、100、200  $\mu$ mol/L 的人参皂苷 Rg3, 每孔 10  $\mu$ L, 对照组补充培养基, 培育 12 h, 每孔加入 cck-8 10  $\mu$ L, 在 37  $^{\circ}\text{C}$   $\varphi=5\%$   $\text{CO}_2$  环境培养 1.5 h, 置于酶标仪中测 450 nm 处吸光度值, 按如下公式计算细胞活力, 以对照组为 100%。

$$B = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$B$ ——细胞活力, %;

$A_0$ ——对照组吸光度值;

$A_1$ ——人参皂苷组吸光度值。

### 1.2.4 细胞保护试验

设对照组、损伤组和 Rg3 保护组, 每组设 5 个平行。96 孔板每孔接种  $5 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$  个 PC12 细胞, 培养基体积每孔 80  $\mu$ L, 培养 24 h; Rg3 保护组加终浓度 5、10、20 和 40  $\mu$ mol/L 的 Rg3 每孔 10  $\mu$ L, 其它组补充培养基, 培育 12 h。损伤组和 Rg3 保护组加入由 1.2.3 细胞损伤试验筛选出的达半数抑制量 ( $\text{IC}_{50}$ ) 时的过氧化氢 (200  $\mu$ mol/L), 每孔 10  $\mu$ L, 对照组补充培养基, 培育 6 h, 培育结束后, CCK-8 法检测细胞活力, 计算方法同 1.2.4, 以对照组为 100%。

### 1.2.5 Western Blot 法测 CREB 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达量

设对照组、损伤组和 Rg3 保护组, 接种于 6 孔板 (每孔 2 mL, 每毫升  $5.0 \times 10^5$  个), 3 个平行/组, 培养 24 h; Rg3 保护组加入终浓度为 10、20 和 40  $\mu$ mol/L 的 Rg3 每孔 250  $\mu$ L, 培养 12 h; 损伤组和 Rg3 保护组加入 200  $\mu$ mol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  每孔 250  $\mu$ L, 孵育 6 h 后移除培养基。PBS 清洗后加入裂解液每孔 100  $\mu$ L, 冰浴裂解 10 min 后 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心, 设置 12000 r/min, 10 min, 测定上清液的蛋白浓度并确保上样量一致, SDS-PAGE 电泳的上样量为 20  $\mu$ g。电泳后将样品转

至 PVDF 膜上, 质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 使用 PBS 清洗 2 遍, 一抗 (浓度稀释为 1:1 000) 培育过夜。使用 PBS 清洗 2 遍, 二抗 (浓度 1:4 000) 培养 1 h。加入适量显色剂 ECL 于成像仪中成像, 拍照。图像使用 Image J 进行灰度分析。 $\beta$ -Actin 为内参基因, 以待测样品的灰度值比  $\beta$ -Actin 灰度值得出相对值, 以对照组为 1, 得出各组的相对值。

### 1.2.6 统计学分析

GraphPad Prism 8.0 软件用于数据分析, 结果以平均值  $\pm$  标准差表示, T-test 及 One Way ANOVA 法进行各组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果和讨论

### 2.1 人参皂苷 Rg3 的细胞抗氧化能力

为探究 Rg3 的抗氧化作用, 本研究首先在细胞水平考察了 Rg3 对氧自由基生成的抑制作用。细胞抗氧化活性 (CAA) 是目前检测动植物活性成分抗氧化功能评价的经典方法之一, 利用外源性荧光探针在细胞环境中有效预测天然产物的抗氧化活性<sup>[20]</sup>。从图 1 中可以看出, 随着人参皂苷 Rg3 浓度增强, 荧光逐渐减少, 并呈现浓度依赖性降低, 说明人参皂苷 Rg3 能有效抑制 AAPH 自由基对 DCFH 的氧化。人参皂苷 Rg3 半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 由中效原理 (图 2) 和剂量 - 反应曲线 (图 3) 计算得出,  $EC_{50}$  值为 27.46  $\mu\text{mol/L}$ , 表明人参皂苷 Rg3 能够有效抑制 DCFH 氧化为 DCF。CAA 值由  $EC_{50}$  值转化而来, CAA 值为 734.57  $\mu\text{mol TE}$  每 100  $\mu\text{mol}$  人参皂苷 Rg3, 表明人参皂苷 Rg3 的抗氧化能力很强, 约是 Trolox 的 7.3 倍。结果表明, Rg3 可能通过清除活性氧自由基发挥细胞抗氧化作用。

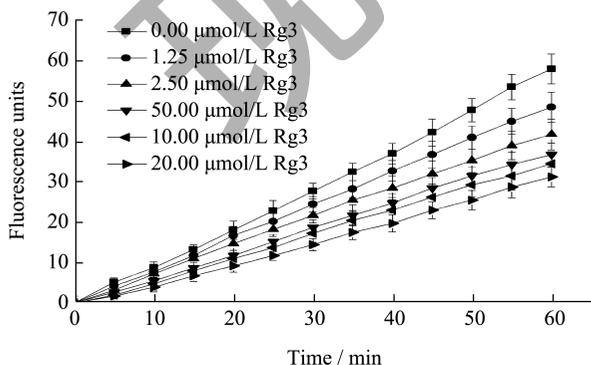


图 1 人参皂苷 Rg3 抑制 AAPH 自由基诱导 DCFH 氧化的动力学曲线

Fig.1 Kinetic curves for inhibition of AAPH radical-induced DCFH oxidation by ginsenoside Rg3

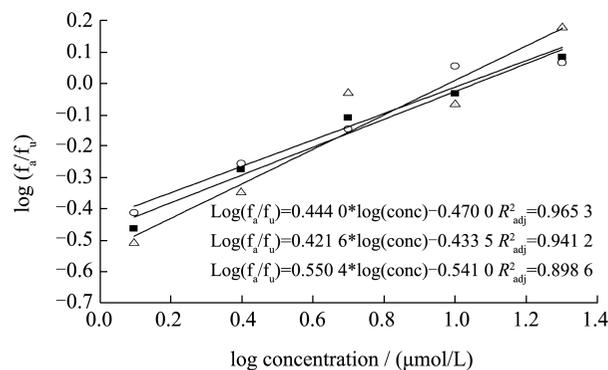


图 2 人参皂苷 Rg3 抑制 AAPH 自由基诱导 DCFH 氧化的中效原理图

Fig.2 Median effect plots for inhibition of AAPH radical-induced DCFH oxidation by ginsenoside Rg3

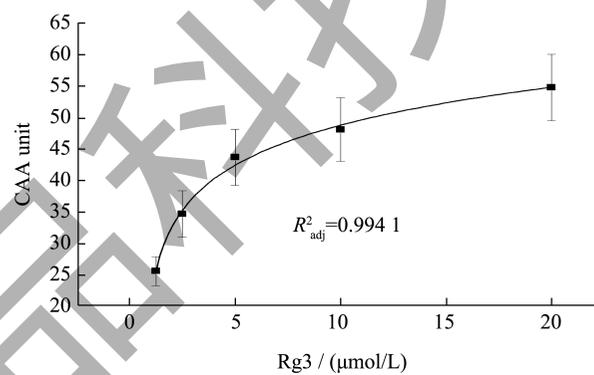


图 3 人参皂苷 Rg3 抑制 AAPH 自由基诱导 DCFH 氧化的剂量 - 反应曲线

Fig.3 Dose-response curves for inhibition of AAPH radical-induced DCFH oxidation by ginsenoside Rg3

### 2.2 人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞的毒性作用

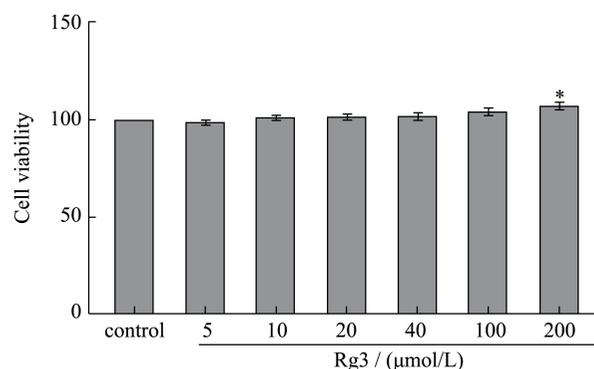


图 4 人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞的毒性作用

Fig.4 Toxic effect of ginsenoside Rg3 on PC12 cell

注: 与对照组比, \* $P < 0.05$ 。

如图 4 所示, 与对照组相比, 200  $\mu\text{mol/L}$  Rg3 处理组的细胞活力显著提高 ( $P < 0.05$ ), 5、10、20、40 和 100  $\mu\text{mol/L}$  Rg3 各组的细胞活力无显著差异 ( $P > 0.05$ )。表明 5~100  $\mu\text{mol/L}$  的 Rg3 对 PC12

细胞均无促增殖和毒性作用，所以能够将此浓度范围的 Rg3 应用于后续实验，进一步考察无毒性剂量 Rg3 对氧化应激细胞的影响。

### 2.3 过氧化氢诱导PC12细胞氧化应激

过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 作为一种较强的氧化剂，极易进入细胞内，形成高活性的氧自由基或羟基自由基。这些自由基进一步诱发脂质过氧化反应，产生过量 ROS；过量 ROS 导致机体内抗氧化物和氧化物生成的失衡，诱导细胞氧化应激<sup>[21,22]</sup>。近年来，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 多用于氧化应激模型的建立。如图 5 所示，用不同浓度过氧化氢处理 PC12 细胞后，在过氧化氢浓度为 200 μmol/L 时，PC12 细胞的活力为 60.11%，与对照组相比差异有统计学意义 (P<0.05)。上面 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够明显降低 PC12 细胞的活力，且呈浓度依赖式降低，确定以 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导成功建立 PC12 细胞氧化应激模型。

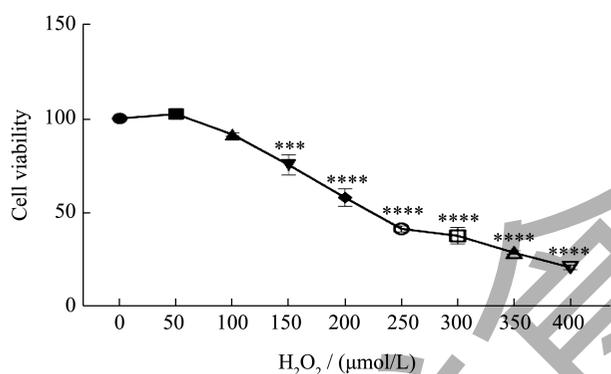


图 5 不同浓度的过氧化氢损伤 PC12 细胞的细胞活力

Fig.5 Cell viability of PC12 damaged by different concentrations of hydrogen peroxide

注：与对照组比，\*\*\*P<0.001；\*\*\*\*P<0.000 1。

### 2.4 人参皂苷Rg3对PC12细胞的保护作用

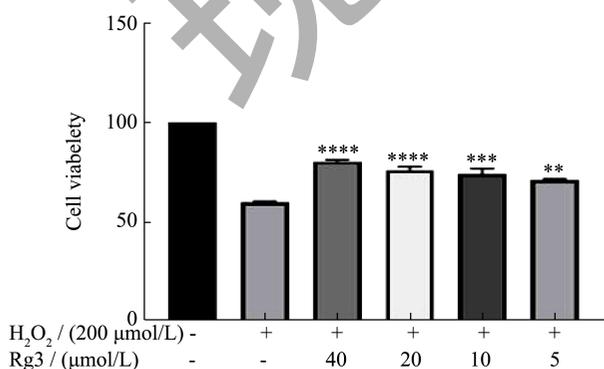


图 6 人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞的保护作用

Fig.6 Protective effect of ginsenoside Rg3 on PC12 cell

注：与损伤组比，\*\*P<0.01；\*\*\*P<0.001；\*\*\*\*P<0.000 1。

如图 6 所示，200 μmol/L 过氧化氢处理后细胞活力为 59.66%，与损伤组相比，5、10、20 和 40 μmol/L Rg3 保护组的细胞活力显著提高 (P<0.05)，分别为 71.15%、74.00%、76.04%、80.36%，呈浓度依赖式提高。结果显示提前采用不同浓度的人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞进行保护，能够抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤时的细胞活力降低，这说明该浓度范围的人参皂苷 Rg3 能有效抵抗细胞氧化损伤。结合 CAA 试验结果，说明 Rg3 对氧自由基和羟基自由基具有很好的抑制效果，推测 Rg3 发挥细胞保护作用可能与清除氧自由基和羟基自由基有关。

### 2.5 人参皂苷Rg3对PC12细胞p-p65蛋白水平的影响

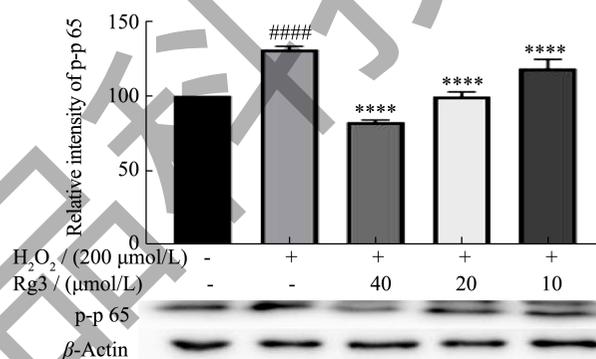


图 7 人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞的 p-p65 蛋白含量影响  
Fig.7 Effect of ginsenoside Rg3 on p-p65 protein content in PC12 cell

注：与对照组比，####P<0.000 1；与损伤组比，\*\*\*\*P<0.000 1。

NF-κB 是一组具有核转录因子功能的系列分子，可调控参与机体生理和病理的多种基因，是目前研究最多的转录因子之一。NF-κB 在炎症及免疫应答、细胞增殖与凋亡、细胞黏附等方面均具有重要作用<sup>[23]</sup>。因此，本研究进一步基于 NF-κB/p65 的表达考察人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞凋亡的影响，试图阐释 Rg3 对氧化诱导神经细胞损伤的保护机制。如图 7 所示，以对照组的 p-p65 蛋白表达量为 1，损伤组 p-p65 蛋白相对量为 1.30 (P>0.05)，10、20 和 40 μmol/L Rg3 保护组的细胞 p-p65 蛋白相对量分别为 1.18、1.03、0.82，与损伤组相比显著降低，并且呈浓度依赖式 (P<0.05)，说明 Rg3 干预 PC12 细胞氧化应激，可以显著降低 p-p65 蛋白的表达量。结果表明人参皂苷 Rg3 可以抑制 p65 蛋白磷酸化，从而抑制细胞氧化损伤发生。相关研究表明，Rg3 能抑制氧化应激相关的铁凋亡<sup>[24]</sup>，并且可以作

为肝保护剂, 保护急性肝损伤引起的干细胞凋亡<sup>[4]</sup>。此外, Rg3 还能通过抑制 NLRP3 炎性体和氧化应激, 促进 SIRT1 表达和抑制 NF- $\kappa$ B, 减轻血管紧张素 II 诱导的心肌肥大<sup>[25]</sup>。由此推测, Rg3 对氧化应激诱导神经细胞损伤的保护作用可能与减轻炎症、抑制凋亡有关。

## 2.6 人参皂苷Rg3对PC12细胞p-CREB蛋白水平的影响

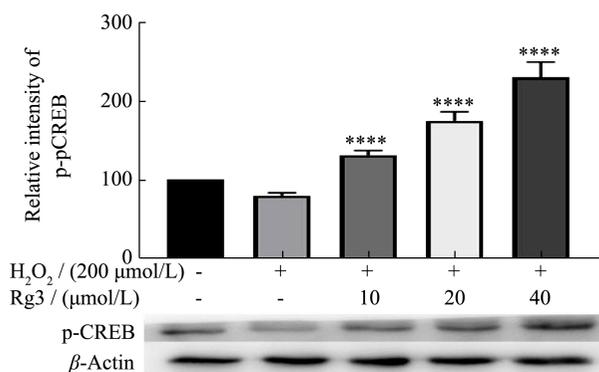


图8 人参皂苷 Rg3 对 PC12 细胞的 p-CREB 蛋白含量影响  
Fig.8 Effect of ginsenoside Rg3 on p-CREB protein content in PC12 cell

注: 与损伤组比, \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response Element Binding Protein, CREB) 相关信号通路与学习、记忆和神经可塑性有关, 广泛参与调节细胞的生长与分化、应激与凋亡<sup>[26]</sup>。有报道称人参皂苷可作为调节 Akt/CREB/BDNF 和相关下游神经保护通路的创新多靶点替代品<sup>[5]</sup>。为确定 Rg3 保护神经细胞的作用机制, 进一步考察了 Rg3 对 CREB 蛋白表达的影响。如图 8 所示, 以对照组的 p-CREB 蛋白表达量为 1, 损伤组 p-CREB 蛋白相对量为 0.80, 与对照组比有所降低, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  Rg3 保护组的细胞 p-CREB 蛋白相对量分别为 1.31、1.75、2.30, 与损伤组相比显著提高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 人参皂苷 Rg3 可以促进 CREB 蛋白磷酸化从而抑制细胞损伤。有研究发现天麻苧苧止眩片可通过抑制 ERK1/2-CREB 通路, 降低自噬, 同时促进自由基的分泌<sup>[27]</sup>, 说明 CREB 与自由基呈负相关。本研究结果显示, Rg3 能清除自由基, 促进 CREB 蛋白表达<sup>[28]</sup>。相关研究表明, Rg3 通过改变小鼠海马神经元细胞周期维持增殖并抑制 N-甲基-D-天冬氨酸诱导的凋亡, 其作用机制与 CREB 和 BDNF 信号磷酸化有关<sup>[29]</sup>。Rg1 通过抑制细菌内毒素刺激的 BV-2 细胞 CREB 和

NF- $\kappa$ B 的磷酸化, 抑制促炎细胞因子的表达<sup>[29]</sup>。由此推断, Rg3 能通过促进 CREB 蛋白磷酸化, 减轻 PC12 神经细胞炎症和凋亡。

## 3 结论

本研究通过考察 Rg3 对 AAPH 自由基诱导 DCFH 氧化的抑制作用, 发现 Rg3 对氧自由基具有良好抑制作用。通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞氧化应激模型, 发现细胞活力显著降低, NF- $\kappa$ B p-p65 蛋白表达显著升高, p-CREB 蛋白表达降低。无毒性浓度范围的 Rg3 干预后能显著提高细胞活力, 显著降低 p-p65 蛋白的表达量、提高 p-CREB 蛋白的表达量, 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞氧化损伤起到一定的保护作用。综上, 人参皂苷 Rg3 可能通过清除氧自由基, 参与 NF- $\kappa$ B/CREB 通路调控, 减轻 PC12 细胞炎症和凋亡, 抑制氧化应激诱导的神经细胞损伤。

## 参考文献

- [1] YANG Q Y, LAI X D, OU Y J, et al. Effects of ginsenoside Rg3 on fatigue resistance and SIRT1 in aged rats [J]. Toxicology, 2018, 409: 144-151.
- [2] 刘松. 人参皂苷对糖尿病视网膜病变大鼠血清中胱抑素 C 及 Chemerin 的影响 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(4): 6-8.
- [3] 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 & Disease, 2020, 11(6): 454.
- [4] ZHOU Y D, HOU J G, LIU W, et al. 20(R)-ginsenoside Rg3, a rare saponin from red ginseng, ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by suppressing PI3K/AKT pathway-mediated inflammation and apoptosis [J]. International Immunopharmacology, 2018, 59: 21-30.
- [5] ZARNESHAN S N, FAKHRI S, KHAN H. Targeting Akt/CREB/BDNF signaling pathway by ginsenosides in neurodegenerative diseases: A mechanistic approach [J]. Pharmacological Research, 2022, 177: 106099.
- [6] WANG J, ZENG L, ZHANG Y, et al. Pharmacological properties, molecular mechanisms and therapeutic potential of ginsenoside Rg3 as an antioxidant and anti-inflammatory agent [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 975784.
- [7] HAN Y J, WANG T, LI C Y, et al. Ginsenoside Rg3 exerts a neuroprotective effect in rotenone-induced Parkinson's disease mice via its anti-oxidative properties [J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 909: 174413.
- [8] TIAN J W, FU F H, GENG M Y, et al. Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats [J]. Neuroscience Letters, 2005, 374(2): 92-97.

- [9] HOU J G, XUE J J, WANG Z, et al. Ginsenoside Rg3 and Rh2 protect trimethyltin-induced neurotoxicity via prevention on neuronal apoptosis and neuroinflammation [J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(12): 2531-2540.
- [10] KANG A, XIE T, ZHU D, et al. Suppressive effect of ginsenoside Rg3 against lipopolysaccharide-induced depression-like behavior and neuroinflammation in mice [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2017, 65(32): 6861-6869.
- [11] HE B, CHEN P, XIE Y, et al. 20(R)-Ginsenoside Rg3 protects SH-SY5Y cells against apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation/reperfusion [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(16): 3867-3871.
- [12] 刘迪,张浩,张寒雪,等.人参皂苷F2干预Caspase级联反应抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡[J].*现代食品科技*,2020,36(7):11-16.
- [13] 刘迪,于子翔,张浩,等.人参皂苷F2干预NF- $\kappa$ B通路抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡[J].*现代食品科技*,2020,36(12):1-6.
- [14] SALIM S. Oxidative stress and the central nervous system [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, 360(1): 201-205.
- [15] 张东云.ENT1抑制剂调控CREB通路参与大鼠脑缺血再灌注后神经保护作用的研究[D].遵义:遵义医学院,2018.
- [16] MEHRAFZA S, KERMANSHAHI S, MOSTAFIDI S, et al. Pharmacological evidence for lithium-induced neuroprotection against methamphetamine-induced neurodegeneration via Akt-1/GSK3 and CREB-BDNF signaling pathways [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2019, 22(8): 856-865.
- [17] YU X X, GUAN Q B, WANG Y P, et al. Anticonvulsant and anti-apoptosis effects of salvianolic acid B on pentylenetetrazole-kindled rats via AKT/CREB/BDNF signaling [J]. *Epilepsy Research*, 2019, 154: 90-96.
- [18] LIMA G B, DOORDUIN J, KLEIN H C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: Focus on Neuroinflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(5): 3295-3312.
- [19] LI C, CHEN T, ZHOU H, et al. BHDPC is a novel neuroprotectant that provides anti-neuroinflammatory and neuroprotective effects by inactivating NF- $\kappa$ B and activating PKA/CREB [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 25(9): 614.
- [20] Wolfe K L, LIU R H. Cellular antioxidant activity(CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [21] DEL-RÍO L A, LÓPEZ-HUERTAS E. ROS Generation in peroxisomes and its role in cell signaling [J]. *Plant And Cell Physiology*, 2016, 57(7): 1364-376.
- [22] PARK J H, PARK S A, LEE Y J. et al. TOPK inhibition accelerates oxidative stress-induced granulosa cell apoptosis via the p53/SIRT1 axis [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46(5): 1923-1937.
- [23] TCHURIKOV N A, ZAVILGELSKY G B, MANUKHOV I V, et al. Genespecific silencing by expression of parallel complementary RNA in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 26523-26529.
- [24] SHAN Y, LI J, ZHU A, et al. Ginsenoside Rg3 ameliorates acute pancreatitis by activating the NRF2/HO-1-mediated ferroptosis pathway [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2022, 50(1): 89.
- [25] REN B, FENG J, YANG N, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy through repressing NLRP3 inflammasome and oxidative stress via modulating SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 98: 107841.
- [26] SEKERES M J, NEVE R L, FRANKLAND P W, et al. Dorsal hippocampal CREB is both necessary and sufficient for spatial memory [J]. *Learning & Memory*, 2010, 17(6): 280-283.
- [27] 雍苏南,房赤,李苏,等.天麻芎芩止眩片通过调控ERK1/2-CREB通路及自噬标志物对自发性高血压大鼠血管内皮功能的影响[J].*中国临床药理学杂志*,2023,39(9):1252-1256.
- [28] ZHANG H, ZHOU Z, CHEN Z, et al. Ginsenoside Rg3 exerts anti-depressive effect on an NMDA-treated cell model and a chronic mild stress animal model [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2017, 134(1): 45-54.
- [29] ZONG Y, AI Q L, ZHONG L M, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via the phospholipase C- $\gamma$ 1 signaling pathway in murine BV-2 microglial cells [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(5): 770-779.