

• 论 著 •

基于 TLR4/NF-κB/IL-1 β 通路研究人参皂苷 Rg3 对缓解慢性炎症痛的作用机制^{*}

孙 旭, 朱海丽, 谢 敏, 高 卉[△]

(湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100)

[摘要] 目的 研究人参皂苷 Rg3 缓解慢性炎症痛的作用机制。方法 采用脚掌注射完全弗氏佐剂构建慢性炎症痛小鼠模型, 鞘内注射人参皂苷 Rg3 进行脊髓给药。采用完全随机方法分为对照组、模型组和人参皂苷 Rg3 组, 每组 10 只。连续给药 3 d 后观察小鼠足肿胀、痛觉行为及体能变化; 采用免疫印迹法检测各组小鼠脊髓组织蛋白表达量。结果 给予完全弗氏佐剂干预后, 小鼠各项指标均有不同程度变化, 脊髓组织星形胶质细胞标志物——神经胶质纤维酸性蛋白、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、细胞 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88 和核因子 κB(NF-κB)蛋白表达水平均增加。人参皂苷 Rg3 鞘内给药后, 减少了小鼠自发缩足次数, 提高了机械痛阈值, 延长了转棒停留时间及运动距离, 使神经胶质纤维酸性蛋白、IL-1 β 、TLR4、髓样分化因子 88、NF-κB 蛋白表达水平被抑制。结论 人参皂苷 Rg3 通过降低 TLR4/NF-κB/IL-1 β 炎症信号缓解慢性炎症痛。

[关键词] 人参皂苷 Rg3; 慢性炎症痛; 细胞 Toll 样受体 4; 核因子 κB; 白细胞介素 1 β

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.07.002 **中图法分类号:** R741.02; R441.1

文章编号: 1009-5519(2023)07-1085-04

文献标识码: A

Mechanism of ginsenoside Rg3 in relieving chronic inflammatory pain

based on TLR4/NF-κB/IL-1 β pathway^{*}

SUN Xu, ZHU Haili, XIE Min, GAO Hui[△]

(School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on chronic inflammatory pain. **Methods** The mouse models of chronic inflammatory pain were established by injecting complete Freund's adjuvant into the sole of the foot, and ginsenoside Rg3 was injected intrathecally for spinal cord administration. The mice were randomly divided into the control group, the model group and the ginsenoside Rg3 group, 10 mice in each group. After three days of continuous administration, the changes of foot swelling, pain behavior and physical ability of the mice were observed. The expression of protein in spinal cord tissue of the mice in each group was detected by western blotting. **Results** After complete Freund's adjuvant intervention, all indexes of the mice changed in different degrees. The expression levels of astrocyte markers in spinal cord tissue: glial fibrillary acidic protein(GFAP), interleukin-1 β (IL-1 β), toll-like receptor 4(TLR4), myeloid differentiation factor 88(MyD88) and nuclear factor kappa B(NF-κB) all increased. Intrathecal administration of ginsenoside Rg3 reduced the number of spontaneous foot contraction in mice, increased the threshold of mechanical pain, increased the stay time and movement distance of rotating rod, and inhibited the expression levels of GFAP, IL-1 β , TLR4, MyD88 and NF-κB protein. **Conclusion** Ginsenoside Rg3 can relieve chronic inflammatory pain by reducing the inflammatory signal of TLR4/NF-κB/IL-1 β .

[Key words] Ginsenoside Rg3; Chronic inflammatory pain; Toll-like receptor 4; Nuclear factor kappa B; Interleukin-1 β

慢性疼痛是一种常见的、复杂的、难以根治的疾病, 影响全球 30% 以上的人, 给患者造成巨大的经济负担和心理负担^[1]。慢性疼痛的治疗通常依据世界

卫生组织发布的阶梯止痛法, 包括阿片类镇痛药物、非甾体抗炎药、类固醇、抗抑郁药、抗惊厥药等辅助药物的使用。以上药物存在对其他内脏系统等不良反

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81901149)。

作者简介: 孙旭(1999—), 硕士研究生在读, 主要从事药理学研究。 △ 通信作者, E-mail: 172752661@qq.com。

应,目前为止,仍有 1/3 的患者长期疼痛得不到缓解,严重影响了患者的生活质量^[2]。因此,寻找新的不良反应少的镇痛药物非常有必要。

人参皂苷 Rg3 是人参的生物活性成分,具有广泛的药理活性,包括抗炎、抗癌、抗氧化、抗肥胖等,同时,也在多种病理性疼痛模型中发挥了镇痛作用^[3]。在福尔马林、角叉菜胶、肿瘤诱导的小鼠疼痛模型中,10~60 mg/kg 人参皂苷 Rg3 给药可产生明显的镇痛效应^[4]。在神经损伤、挫伤性脊髓损伤疼痛模型中,人参皂苷给药后可降低机械痛阈值和热痛超敏^[5]。临床研究发现,人参皂苷 Rg3 可缓解子宫内膜异位症相关痛经^[6]。然而,人参皂苷 Rg3 在慢性疼痛中的作用机制尚不明确。因此,本研究构建了完全弗氏佐剂诱导的慢性炎症痛小鼠模型并进行了人参皂苷 Rg3 鞘内给药研究,检测了其对疼痛的缓解作用,并探讨了其作用机制,以期为人参皂苷 Rg3 作为镇痛药物开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 30 只 C57BL/6J 小鼠购于湖北省实验动物中心[动物合格证书号,批号:SCXK(辽)2020-0001],体重 18~20 g,6~8 周龄。饲养于室温[(20±24)℃],以 12 h/12 h 昼夜节律交替的环境中,并提供适量的食物和水。本研究所有动物实验均经湖北科技学院实验动物伦理委员会审批(批准号:2020-01-900),遵循中国动物护理和机构伦理指导方针。

1.1.2 实验药物与主要试剂 人参皂苷 Rg3 购于上海源叶生物科技有限公司(批号:B21059),蛋白酶抑制剂、放射免疫沉淀裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶快速配制试剂盒、二辛可宁酸蛋白浓度测定试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司,人参皂苷 Rg3 购自上海源叶生物科技有限公司,RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购于美国 Gibco。一抗为 β-actin(批号:AF7018)、抗-细胞 Toll 样受体 4(TLR4,批号:AF7071)、抗-核因子 κB(抗-NF-κB,批号:BF8005)、抗-白细胞介素 1β(抗-IL-1β,批号:AF5103)均购于 Affinit 公司,抗-神经胶质纤维酸性蛋白(抗-GFAP,批号:A19058)、抗-髓样分化因子(抗-MyD88,批号:A0980)均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。二抗为 HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记山羊抗鼠均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 冰冻离心机购于德国 Eppendorf 公司(型号:5424R),微型垂直电泳仪购于北京韦克斯科技有限公司(型号:EP300),迷你手持均质仪购于北京兰杰柯科技有限公司(型号:L-C119-0502),凝胶成像分析系统购于美国 GE 公司(型号:29-0050-63)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模及给药 采用完全随机方法将 30 只小鼠分为对照组、模型组和人参皂苷 Rg3 组,每组 10 只。在小鼠脚掌注射完全弗氏佐剂(CFA,每只 20 μL)建立慢性炎症痛小鼠病理模型;对照组小鼠在脚掌部位注射等体积生理盐水。用二甲基亚砜(DMSO)将人参皂苷 Rg3 粉末配置成 20 mg/mL 的母液,存放于-20 ℃冰箱,正式实验时用 DMSO 将其稀释成工作质量浓度。将人参皂苷 Rg3 溶入 DMSO 中,使用前用 0.9% 氯化钠按 1:1 稀释。建模 14 d 后人参皂苷 Rg3 组小鼠在 CFA 诱导基础上鞘内给予 10 mg/kg 人参皂苷 Rg3 2 μL;模型组小鼠在 CFA 诱导基础上鞘内注射同等剂量 DMSO 和 0.9% 氯化钠混合液(V/V=1:1)。使用微量注射器在小鼠脚掌倾斜 45°方向进针,缓缓注入 2 μL,注射完成后用棉签消毒,按压注射位点 1 min。

1.2.2 自发缩足反射 将小鼠置于 30 cm×30 cm×30 cm 透明玻璃盒内,适应 30 min 后记录 5 min 内小鼠自发性缩足(或舔爪)反射次数,记录 3 次后计算平均值。

1.2.3 缩足阈值检测 将小鼠置于 30 cm×30 cm×30 cm 透明玻璃盒内,静置适应 30 min 后用 Von Frey 纤维(0.16~2.00 g)垂直刺激小鼠左侧后肢足底正中,每次刺痛时间为 5 s 左右,当小鼠出现舔足或抬足行为后为阳性反应,反之则为阴性反应。记 6 次数据后结束检测。使用公式缩足阈值(g)=10[Xf+Kδ]/10 000 计算各组小鼠缩足阈值。Xf 为本次行为学测试中使用的最后一个 Von Frey 纤维的阶数,K 为痛觉矫正系数,δ 为相邻不同纤维刺激之间的差异。

1.2.4 转棒运动实验 转棒运动实验开始将小鼠放在转棒仪器上匀速(4 r/min)进行适应,适应结束后每天同一时间对小鼠进行此实验,每次转棒结束休息 30 min,每天重复 3 次。3 d 后开始正式实验,每次实验以 10 r/min 运动 10 s,匀加速 10 s,以 20 r/min 运动 30 s,匀加速 10 s,以 20 r/min 运动 9 min。按以上步骤每天进行 3 次,记录实验仪器上小鼠运动的距离和在转棒上停留的时间。

1.2.5 免疫印迹法 注射适量麻醉剂——戊巴比妥钠处死小鼠,剥离出脊髓,在脊髓中提取蛋白,用二辛可宁酸蛋白分析试剂盒样品的蛋白质浓度进行检测。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法电泳分离蛋白质样品,将蛋白质电转至聚偏二氟乙烯膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,4 ℃ 孵育过夜。一抗孵育后用三羟甲基氨基甲烷-吐温缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min,并用二抗室温孵育 1 h(1:50 000),然后用 LAS500 凝胶成像系统扫描观察,Image J 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

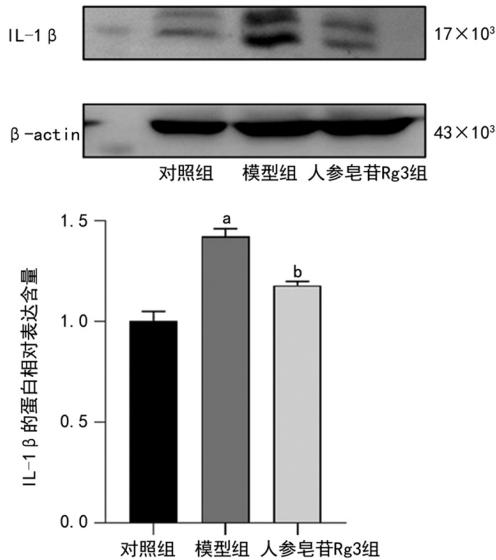
2.1 人参皂苷 Rg3 对小鼠行为学的影响 与对照组

表 1 人参皂苷 Rg3 对小鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	缩足阈值(g)	5 min 自发缩足次数(次)	停留时间(s)	运动距离(m)
对照组	10	1.01 ± 0.20	3.00 ± 0.62	406.57 ± 82.69	18.24 ± 3.54
模型组	10	0.37 ± 0.16 ^a	14.00 ± 1.87 ^a	145.20 ± 66.42 ^a	6.95 ± 3.71 ^a
人参皂苷 Rg3 组	10	0.95 ± 0.60 ^b	6.00 ± 2.21 ^b	419.14 ± 134.48 ^b	17.30 ± 5.96 ^b

注: 与对照组比较,^a $P < 0.05$; 与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 人参皂苷 Rg3 对 IL-1 β 蛋白表达水平的影响 与对照组比较, 模型组小鼠脊髓组织中 IL-1 β 蛋白表达量明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg3 组小鼠 IL-1 β 蛋白表达量被抑制, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



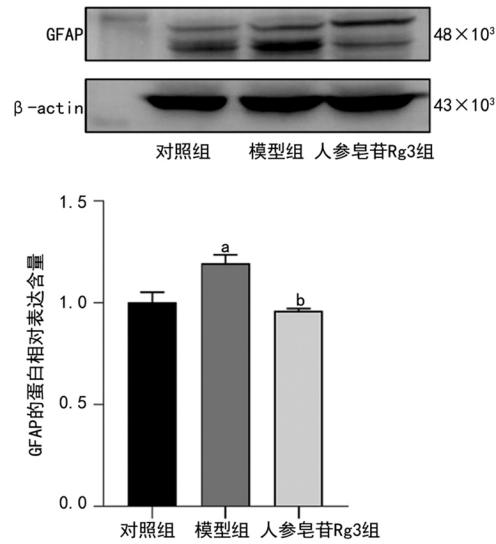
注: 与对照组比较,^a $P < 0.05$; 与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 1 人参皂苷 Rg3 对 IL-1 β 蛋白表达水平的影响

2.3 人参皂苷 Rg3 对脊髓星形胶质细胞的影响 与对照组比较, 模型组小鼠脊髓组织中星形胶质细胞标志物——GFAP 蛋白表达量明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg3 组小鼠 GFAP 蛋白表达量被抑制, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

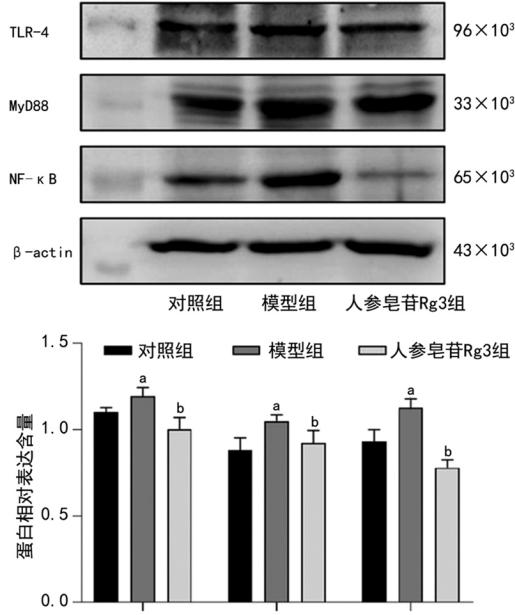
2.4 人参皂苷 Rg3 对 TLR-4/NF-κB 通路的影响 与对照组比较, 模型组小鼠脊髓组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达量均明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg3 组小鼠脊髓组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达量被抑制, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

比较, 模型组小鼠缩足阈值明显降低, 自发性缩足次数明显增加, 转棒停留时间和运动距离均明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg3 组小鼠中 50% 缩足阈值升高, 自发缩足次数减少, 转棒停留时间和运动距离均明显延长, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。



注: 与对照组比较,^a $P < 0.05$; 与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 2 人参皂苷 Rg3 对脊髓星形胶质细胞的影响



注: 与对照组比较,^a $P < 0.05$; 与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 3 人参皂苷 Rg3 对 TLR-4/NF-κB 通路的影响

3 讨 论

本研究结果显示,人参皂苷 Rg3 可降低脊髓炎症并缓解小鼠慢性炎症痛。脊髓炎症是慢性疼痛发生的重要原因。在慢性疼痛状态下外周组织损伤激活伤害性信号活化脊髓星形胶质细胞,活化的星形胶质细胞释放促炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 等促进慢性疼痛的维持^[7-8]。NF- κ B 是炎症免疫反应的关键调节因子之一,NF- κ B 调节星形胶质细胞中促炎性细胞因子转录及表达,包括 TNF- α 、IL-1 β 等^[9]。选择性 NF- κ B 抑制剂可降低星形胶质细胞活化,随后下调星形胶质细胞释放的趋化因子,减少中枢神经系统疾病的继发性炎症损伤^[10]。在肺炎细胞及组织中人参皂苷 Rg3 给药后 NF- κ B 活性显著抑制,并降低了哮喘组织中 IL-4、TNF- α 分泌水平^[11]。在软骨损伤模型中人参皂苷 Rg3 可激活沉默调节蛋白 1 通路,抑制 NF- κ B 信号而减少 IL-8、基质金属蛋白酶 9 的产生^[12]。在结肠癌细胞实验中,人参皂苷 Rg3 作用可显著抑制 NF- κ B 活性,从而发挥抑制癌细胞生长的作用^[13]。本研究结果显示,人参皂苷 Rg3 给药后可降低胶质细胞激活 NF- κ B 介导的炎症反应。

TLR 信号可调节 NF- κ B 介导的炎症反应。星形胶质细胞中 TLR4 激活导致其下游衔接蛋白 MyD88 募集,激活 NF- κ B 并增加 IL-1 β 、TNF- α 等促炎性细胞因子的表达水平^[14]。在肥胖引起的结肠炎模型中人参皂苷通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路,有效改善了肠道菌群的代谢失调,并抑制了炎症级联反应^[15]。在巨噬细胞中,人参皂苷 Rg3 通过 TLR4 影响磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素蛋白通路,从而提高抗炎能力^[16]。本研究结果显示,人参皂苷 Rg3 可明显抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路,从而抑制脊髓炎症。

综上所述,在慢性炎症痛病理进程中脊髓 TLR4/MyD88/NF- κ B/IL-1 β 信号被激活。人参皂苷 Rg3 可明显抑制脊髓 TLR4 信号介导的炎症反应,从而缓解病理性疼痛。本研究结果为人参皂苷 Rg3 在病理性疼痛中的应用开发提供了数据支持。

参考文献

- [1] COHEN S P, VASE L, HOOTEN W M. Chronic pain: An update on burden, best practices, and new advances [J]. Lancet, 2021, 397 (10289): 2082-2097.
- [2] FILLINGIM R B, LOESER J D, BARON R, et al. Assessment of chronic pain: Domains, methods, and mechanisms [J]. J Pain, 2016, 17 (9 Suppl): 10-20.
- [3] LI M X, WEI Q Q, LU H J. Progress on the elucidation of the antinociceptive effect of ginseng and ginsenosides in chronic pain[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 821940.
- [4] SUN Y Q, SHI S D, ZHENG Y, et al. Analgesic effect and related amino acids regulation of ginsenoside Rg3 in mouse pain models[J]. Life Sci, 2019, 239: 117083.
- [5] LEE J Y, CHOI H Y, PARK C S, et al. Total saponin extract, ginsenoside Rb1, and compound K alleviate peripheral and central neuropathic pain through estrogen receptors on rats [J]. Phytother Res, 2021, 35(4): 2119-2132.
- [6] WANG S, DUAN H, LI B, et al. BDNF and TrKB expression levels in patients with endometriosis and their associations with dysmenorrhoea[J]. Ovarian Res, 2022, 15(1): 35-37.
- [7] HANNA A, FRANGOGIANNIS N G. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2020, 34(6): 849-863.
- [8] 蒲家欣,周希瑗.糖尿病性视网膜病变的早期病理改变与检测手段研究进展[J].现代医药卫生, 2022, 38(6): 978-982.
- [9] SCANDIFFIO R, GEDDO F, COTTONE E, et al. Protective effects of (E)- β -caryophyllene (BCP) in chronic inflammation[J]. Nutrients, 2020, 12(11): 3273.
- [10] LIU H, WU X, LUO J, et al. Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- κ B phosphorylation [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2408.
- [11] LEE I S, UH I, KIM K S, et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg3 Via NF- κ B pathway in a549 cells and human asthmatic lung tissue [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 7521601.
- [12] MA C H, CHOU W C, WU C H, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates TNF- α -induced damage in chondrocytes through regulating SIRT1-mediated anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms [J]. Antioxidants(Basel), 2021, 10(12): 1972.
- [13] KIM S M, LEE S Y, YUK D Y, et al. Inhibition of NF- κ appaB by ginsenoside (下转第 1093 页)

- based therapy regimens [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2019, 19(1):63-70.
- [8] PARK J H, QIAO B, PANAGEAS K S, et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid [J]. Blood, 2011, 118(5):1248-1254.
- [9] 马军. 中国急性早幼粒细胞白血病诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(3): 179-183.
- [10] STAHL M, TALLMAN M S. Acute promyelocytic leukemia(APL): Remaining challenges towards a cure for all [J]. Leuk Lymphoma, 2019, 60(13):3107-3115.
- [11] TALLMAN M S, LO-COCO F, KWAAN H C, et al. Early death in patients with acute promyelocytic leukemia. Proceedings from a live roundtable at the 2010 American society of hematology annual meeting, December 4-7, 2010, Orlando, Florida[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2011, 9(Suppl 2):1-16.
- [12] DELASERNA J, MONTESINOS P, VELLEN-GA E, et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin [J]. Blood, 2008, 111(7):3395-3402.
- [13] MONTESINOS P, BERGUA J M, VELLEN-GA E, et al. Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: Characteristics, outcome, and prognostic factors [J]. Blood, 2009, 113(4):775-783.
- [14] 鲍协炳, 胡晓慧, 田长玉, 等. 急性早幼粒细胞白血病诱导分化综合征个体化预测模型列线图初探[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(11):961-965.
- [15] 梅恒, 胡豫.《中国弥漫性血管内凝血诊断积分系统》解读[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(7): 495-498.
- [16] 孙佳耐. 急性早幼粒细胞白血病患者早期死亡原因的临床分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [17] 郑译. 急性早幼粒细胞白血病患者早期死亡的危险因素分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [18] 方力维, 秦铁军, 徐泽峰, 等. 急性早幼粒细胞白血病患者早期死亡及生存影响因素分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(1):52-57.
- [19] 李丽君. 急性早幼粒细胞白血病早期死亡原因分析[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [20] 钟琳. 急性早幼粒细胞白血病早期死亡患者的临床特征分析[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020.
- [21] 吴雅雪, 吴德沛, 陈苏宁, 等. 急性早幼粒细胞白血病早期死亡危险因素及预后分析[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(12):1025-1030.
- [22] 蔡萍. 急性早幼粒细胞白血病患者早期死亡风险评估及预测模型的建立[D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [23] 沈晓雅, 娄引军, 王文娟. 急性早幼粒细胞白血病预后生存模型的建立[J]. 检验医学, 2021, 36(3):292-295.
- [24] 陈宁宁. 急性早幼粒细胞白血病早期死亡临床危险因素分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2021.

(收稿日期: 2022-11-22 修回日期: 2023-01-13)

(上接第 1088 页)

- Rg3 enhances the susceptibility of colon cancer cells to docetaxel[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(5):755-765.
- [14] LIU M, XIE J, SUN Y. TLR4/MyD88/NF-κB-mediated inflammation contributes to cardiac dysfunction in rats of PTSD[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(6):1029-1035.
- [15] CHEN H, YANG H, DENG J, et al. Ginsenoside Rk3 ameliorates obesity-induced colitis

by regulating of intestinal flora and the TLR4/NF-κB signaling pathway in C57BL/6 mice [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(10):3082-3093.

- [16] LIU Z, LIU T, LI W, et al. Insights into the antitumor mechanism of ginsenosides Rg3 [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(3):2639-2652.

(收稿日期: 2022-08-17 修回日期: 2022-11-28)