

# 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

刘迪<sup>1</sup>, 于子翔<sup>1</sup>, 张浩<sup>1</sup>, 张寒雪<sup>2</sup>, 孔繁利<sup>2</sup>, 冯宪敏<sup>1</sup>

(1. 吉林医药学院基础医学院, 吉林吉林 132013) (2. 北华大学医学技术学院, 吉林吉林 132013)

**摘要:** 本研究通过测定人参皂苷 F2 对凋亡细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放率和线粒体膜电位的影响, 运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 F2 对 NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路中 p65 蛋白的影响。发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞的 LDH 释放率较对照组的有明显提高 42.72%; 线粒体膜电位下降, 损伤组的相对荧光值较对照组降低 44.03%; NF- $\kappa$ B p65 的蛋白和 mRNA 表达量分别为 122.73%、1.66, 明显高于对照组( $p<0.05$ )。1.25、5、20  $\mu$ mol/L F2 预处理损伤细胞后, LDH 释放率较损伤组显著降低( $p<0.05$ ), 分别降至 82.71%、75.69%、69.61%; 线粒体膜电位较损伤组显著提高, 不同浓度 F2 的相对荧光值分别为: 60.22%、62.76%、70.96%, ( $p<0.05$ ); 随着 F2 浓度的升高, NF- $\kappa$ B 通路中 p65 的蛋白表达分别下降到 79.49%、71.92%、58.39%, ( $p<0.05$ ), mRNA 表达下调至 1.30、1.18、1.01, ( $p<0.05$ )。结果表明, 人参皂苷 F2 能通过降低凋亡细胞的 LDH 释放率、升高线粒体膜电位、抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路激活发挥抗凋亡作用, 为人参皂苷抗氧化应激诱导的细胞凋亡提供实验依据。

**关键词:** 人参皂苷; 抗凋亡; 人胚肾细胞 (HEK-293 细胞); 人参

文章编号: 1673-9078(2020)12-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0537

## Ginsenoside F2 Intervenes the NF- $\kappa$ B Pathway to Inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Apoptosis

LIU Di<sup>1</sup>, YU Zi-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, ZHANG Han-xue<sup>2</sup>, KONG Fan-li<sup>2</sup>, FENG Xian-min<sup>1</sup>

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

(2.College of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China)

**Abstract:** In this study, the effects of ginsenoside F2 on p65 protein in the NF- $\kappa$ B apoptosis signaling pathway were examined by qRT-PCR and Western blot techniques, and through measuring the effects of ginsenoside F2 on the release rate of lactate dehydrogenase (LDH) and mitochondrial membrane potential (MMP) of apoptotic cells. It was found that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injured cells had a significantly increased LDH release rate (by 42.72%), decreased mitochondrial membrane potential, and decreased relative fluorescence value (by 44.03%), and increased protein and mRNA expression of NF- $\kappa$ B p65 (as 122.73% and 1.66, respectively), compared with the control group ( $p<0.05$ ). After pretreatment of cells with 1.25, 5, and 20  $\mu$ mol/L F2, the LDH release rates of the injured group were significantly lowered ( $p<0.05$ ), to 82.71%, 75.69%, and 69.61% respectively, while the mitochondrial membrane potential values were significantly increased ( $p<0.05$ ) (with the corresponding relative fluorescence values as 60.22%, 62.76% and 70.96%, respectively). With the increase of F2 concentration, the protein expression of p65 in the NF- $\kappa$ B pathway decreased to 79.49%, 71.92% and 58.39%, respectively ( $p<0.05$ ), and the mRNA expression was down-regulated to 1.30, 1.18 and 1.01, respectively ( $p<0.05$ ). The results showed that ginsenoside F2 exhibited an anti-apoptotic effect through reducing the LDH release rate of apoptotic cells, increasing the mitochondrial membrane potential, and inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. This study

引文格式:

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

LIU Di, YU Zi-xiang, ZHANG Hao, et al. Ginsenoside F2 intervenes the NF- $\kappa$ B pathway to inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 1-6

收稿日期: 2020-06-09

基金项目: 吉林省卫生健康科技能力提升计划项目(20190031); 吉林省教育厅科学研究规划项目(JJKH20180352KJ)

作者简介: 刘迪(1988-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然活性物质的研究与开发

通讯作者: 孔繁利(1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 心脑血管疾病分子诊断; 冯宪敏(1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 病原体分子致病机制

provides an experimental basis for suppressing effect of ginsenosides on oxidative stress-induced apoptosis.

**Key words:** ginsenoside; anti-apoptosis; human embryonic kidney cells (HEK-293 cells); ginseng

细胞凋亡是指细胞受到刺激后导致的由基因调控的自发的细胞有序死亡, 又称程序性细胞死亡(PDF)<sup>[1]</sup>。细胞凋亡存在多种凋亡途径, 其中 NF- $\kappa$ B 通路具有十分重要的作用, 有研究表明, NF- $\kappa$ B 蛋白家族与细胞凋亡关系密切, 该蛋白家族的中的 p65 蛋白分布广泛, 几乎在所有的细胞中都有分布, 且多以 p65/p50 二聚体形式存在<sup>[2]</sup>。在细胞未受到刺激时, p65/p50 二聚体与 I $\kappa$ B 蛋白家族成员的蛋白结合在一起形成三聚体; 细胞在受到有效刺激后(如过氧化物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), I $\kappa$ B 蛋白激酶(IKK)激活导致 I $\kappa$ B 蛋白磷酸化, 后者再经泛素化后被水解酶降解, 导致大量的 p65/p50 二聚体释放, 释放出来的二聚体(即激活后的 NF- $\kappa$ B)可进入细胞核, 结合 DNA 上的  $\kappa$ B 位点调控蛋白的转录表达, 从而导致细胞凋亡<sup>[3]</sup>。当细胞凋亡发生时, 细胞因为细胞膜的损伤会释放乳酸脱氢酶(LDH); 同时因为刺激作用使线粒体膜上的 PT 通道打开, 导致线粒体膜电位变低。

人参是我国传统名贵中药材, 其活性成分复杂, 生物活性多样。人参皂苷是人参的主要有效物质, 具有抗氧化应激、抗凋亡、抗肿瘤、调节神经、内分泌、免疫等多种生物活性<sup>[4]</sup>。根据分子结构可将人参皂苷分为两大类即原人参二醇型皂苷(protopanaxadiol-type, PPD-type)和原人参三醇型皂苷(protopanaxatriol-type, PPT-type)。原人参二醇型皂苷经两次水解后可生成人参皂苷 F<sub>2</sub>。目前, 人参皂苷 F<sub>2</sub> 的生物活性主要集中在其抗癌活性和毛发生长因子诱导作用上<sup>[5,6]</sup>。研究表明, 人参皂苷 F<sub>2</sub> 的前体皂苷 Rb1 和 Rd 能有效预防外界刺激诱导的细胞凋亡<sup>[7,8]</sup>, 还有研究表明, 人参皂苷 Rb1 对过氧化氢诱导的细胞凋亡有很好的保护作用<sup>[9]</sup>, 以及人参皂苷 Rh3 能够很好的抑制凋亡过程中的 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[10]</sup>。

有关研究表明, 细胞凋亡与氧化应激关系密切, 引起氧化应激的主要物质活性氧(ROS)可以激活介导细胞凋亡的通路从而导致细胞凋亡<sup>[3,11]</sup>。课题组前期建立了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤模型, 试验结果表明人参皂苷 F<sub>2</sub> 能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞氧化应激<sup>[12]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 广泛用于诱导细胞凋亡, 有研究证实 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可通过 NF- $\kappa$ B 通路诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体外诱导人胚肾 293 (HEK-293) 细胞凋亡, 基于比较不同组之间细胞膜损伤和线粒体膜电位水平考察人参皂苷 F<sub>2</sub> 对凋亡细胞的保护作用, 以及通过 NF- $\kappa$ B 通路探讨其抗凋亡作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人胚肾细胞(HEK-293), 中国科学院细胞库; 人参皂苷 F<sub>2</sub> ( $\geq 98\%$ ), 中国药品生物制品检定所; 胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素(PSS)、DMEM 培养基非必需氨基酸, Gibco 美国; TRIzol, Invitrogen 美国; MTS 试剂盒、PCR 试剂盒, Promega 美国; 反转录试剂盒、SYBR premix, Takara 日本; 乳酸脱氢酶(LDH)、试剂盒, 南京建成; 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法), 碧云天; 抗体 NF- $\kappa$ B p65、GAPDH、HRP 标记山羊抗兔 IgG, 武汉博士德。

多功能酶标仪, BioTek 美国; 二氧化碳培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; 激光扫描共聚焦显微镜, Olympus, 日本; qRT-PCR 仪、SDS-PAGE 电泳和转膜仪, Bio-Rad 美国, 图像采集仪, DNR 以色列。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及细胞凋亡模型的建立

培养细胞使用的培养基为含有 10% FBS、1% PSS 和 1% 非必需氨基酸的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。实验分组: 空白组, 对照组, 损伤组, 和三个不同浓度 F<sub>2</sub> 预处理后进行损伤的 F<sub>2</sub> 组。且为每组设三个平行, 并对所得数据进行平均处理。空白组内加入的是 2.5 mL 的完全培养基; 将 HEK-293 细胞接种到 6 孔板中, 对照组、损伤组和 F<sub>2</sub> 组中每孔加入 2 mL、 $5.6 \times 10^5$  个的细胞悬液, 培养 24 h; 再分别向三个 F<sub>2</sub> 组加入 250  $\mu$ L 浓度为 1.25  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L 的人参皂苷 F<sub>2</sub>, 此时对对照组和损伤组均加入 250  $\mu$ L 的完全培养基, 培养 24h; 后向损伤组和 F<sub>2</sub> 组中加入 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 致 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 400  $\mu$ mol/L, 对照组加入 250  $\mu$ L 完全培养基, 合计每孔内有 2.5 mL 的液体; 再培养 12 h, 以此建立损伤模型。

#### 1.2.2 LDH (乳酸脱氢酶) 释放率的测定

倒去各孔内的完全培养基, 用 PBS 清洗 2 遍, 向各孔内加 100  $\mu$ L 的裂解液置于冰上裂解 10 min。用 LDH 试剂盒测量 LDH 活性。在收集整理实验数据后, 运用公式算得各浓度下的 LDH 的释放率。并以损伤组的释放率为 100%(单位 1), 对各组数据进行处理。公式如下:

$$LDH \text{ 活性} = \frac{(\text{待测样品吸光度值} - \text{对照组吸光度值}) \times \text{标准品浓度}}{\text{标准品吸光度值} - \text{空白组吸光度值}}$$

$$LDH \text{ 释放率} = \left( \frac{\text{细胞培养基内的 LDH 活性}}{\text{细胞培养基内的 LDH 活性} + \text{细胞裂解液中的 LDH 活性}} \right) \times 100\%$$

### 1.2.3 线粒体膜电位的测定

利用 JC-1 荧光探针方法测量线粒体膜电位, JC-1 在正常细胞的线粒体中形成聚集体, 产生红色荧光; 在细胞凋亡中, 则以单体形式存在于细胞质内, 发出绿色荧光。细胞培养方法同 1.2.1, 培养后去除培养液, 加 5  $\mu\text{mol/L}$  JC-1 荧光探针处理, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 20 min。再用 PBS 清洗两次后加入新培养基, 激光共聚焦显微镜下观察并收集荧光图像。酶标仪测定荧光值, 测定波长为红色荧光 (发射光/吸收光: 525/590)、绿色荧光 (发射光/吸收光: 490/530), 用红色荧光/绿色荧光的比值间接反映膜电位变化。并以正常细胞的对照组荧光比值为单位 1, 计算各组的相对荧光比值。

### 1.2.4 Western Blot 检测 NF- $\kappa$ B p65 蛋白

培养后的细胞去除培养基后用 PBS 清洗 2 遍, 每个孔加入 100  $\mu\text{L}$  的裂解液, 置于冰上裂解 10 min, 搜集各组裂解后的成分。置于低温高速离心机内离心, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12000 r/min, 10 min, 后吸取上清液, 测定蛋白浓度, 加入 PBS 将各组浓度调一致, 使用 SDS-PAGE 电泳, 每个孔内上样 20  $\mu\text{L}$  的蛋白样品, 后进行转膜, 而后一抗孵育过夜, 使用 PBS 清洗 2 遍, 加二抗孵育 2 h 后 PBS 清洗 2 遍, 最后 ECL 成像, 结果使用 Image J 软件进行分析。

### 1.2.5 qRT-PCR 检测 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达

在 NCBI 搜索 p65 蛋白基因的全部目的基因序列, 使用 Primer Premier 6 设计引物 (F: 3'-TGTCTGCTCG GTAAGCGG-5', R: 3'-TCTCCTCGTGTCTATGGTGG TT-5'); GAPDH 引物序列 (F: 3'-CCTTCTACCACTAC CCTA-5', R: 3'-TTTGACACCGCACTACC-5')。已预处理的细胞去除完全培养基, 加入 100  $\mu\text{L}$  的裂解液置于冰上裂解 10 min, 待裂解完全后提取 RNA, 反转录成 DNA, 在荧光定量 PCR 仪中进行扩增检测。扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s (40 cycles), 59  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 结果用相对指数法计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 以对照组为 1。

### 1.2.6 数据分析

结果显示为  $\bar{x} \pm s$  的形式, 以矩形图的格式显示。使用 SPSS 软件进行差异显著性分析, 若  $p < 0.05$ , 则认为差异显著。使用 Excel 绘制表格, 结果如图所示。

## 2 结果和讨论

### 2.1 人参皂苷 F2 对凋亡细胞 LDH 释放率的影响

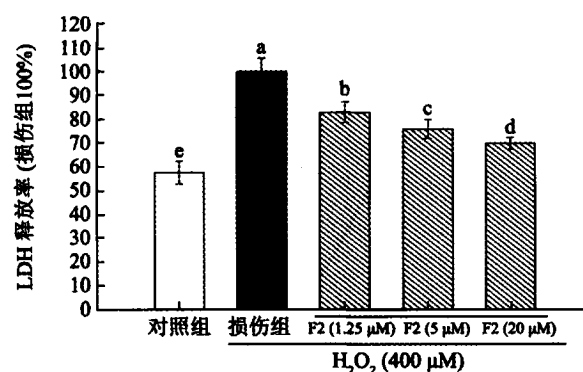


图 1 人参皂苷 F2 对损伤细胞 LDH 释放率的影响

Fig.1 Effects of ginsenoside F2 on LDH release in HEK-293 cells

注: 不同字母表示不同组间差异显著,  $p < 0.05$ ; 相同字母表示差异不显著,  $p > 0.05$ , 下同。

如图 1 所示, 比较了损伤组和对照组的数据后, 发现损伤组的 LDH 释放率 100% 明显大于对照组的释放率 57.28%, 二者差异显著 ( $p < 0.05$ )。在加入不同浓度人参皂苷 F2 的 F2 组中, 可见 LDH 释放率均低于损伤组, 差异显著 ( $p < 0.05$ ); 但仍明显大于对照组, 组间差异显著 ( $p < 0.05$ ); 随着 F2 浓度的增高, LDH 释放率逐渐减小, 1.25  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 F2 组的 LDH 释放率依次为 82.71%、75.69%、69.61%。彼此之间差异显著 ( $p < 0.05$ )。

$\text{H}_2\text{O}_2$  等损伤因素可以引起细胞凋亡通路的活化, 继而发生细胞凋亡。发生凋亡时, 损伤因素刺激活化多种凋亡途径, 激活级联反应, 造成细胞和细胞器的损伤。LDH 广泛存在于各种细胞内, 当细胞受到损伤导致细胞膜遭到破坏后, 存在于细胞胞质的 LDH 会释放到细胞外, 常通过 LDH 释放率的多少研究细胞凋亡中细胞膜的损伤程度。本实验  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤后的损伤组 LDH 释放率较正常细胞的对照组明显升高; 在 F2 预处理后的 F2 组, 可见 LDH 释放率较损伤组降低, 但仍高于正常的对照组。说明,  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导细胞凋亡后, 细胞膜遭到破坏, LDH 释放到细胞外; F2 组的细胞经过  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导后产生了细胞凋亡, F2 对细胞凋亡有一定的抑制作用, 此时细胞凋亡仍存在; 且随着 F2 浓度的升高, LDH 的释放率逐渐降低、膜损伤的程度

逐渐降低, F2 可通过保护细胞膜帮助细胞抵抗凋亡。

## 2.2 人参皂苷 F2 对凋亡细胞线粒体膜电位的影响

通过 JC-1 探针检测从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到线粒体膜电位的变化, 从而可以用于早期的细胞凋亡检测。如图 2 所示, 内有正常细胞的对照组的红色荧光较其他几组都多, 绿色荧光相对较少, 红绿荧光合并后呈橘红色, 线粒体膜电位正常。而在损伤组中绿色荧光普遍多于红色荧光, 且合并后呈黄绿色。在 F2 组中, 加入不同浓度的人参皂苷 F2 产生的结果有所不同, 在加入 F2 浓度由 1.25  $\mu\text{mol/L}$  到 20  $\mu\text{mol/L}$  的变化中, 红色荧光逐渐增多, 绿色荧光逐渐减少; 合并后的黄绿色荧光逐渐加深。

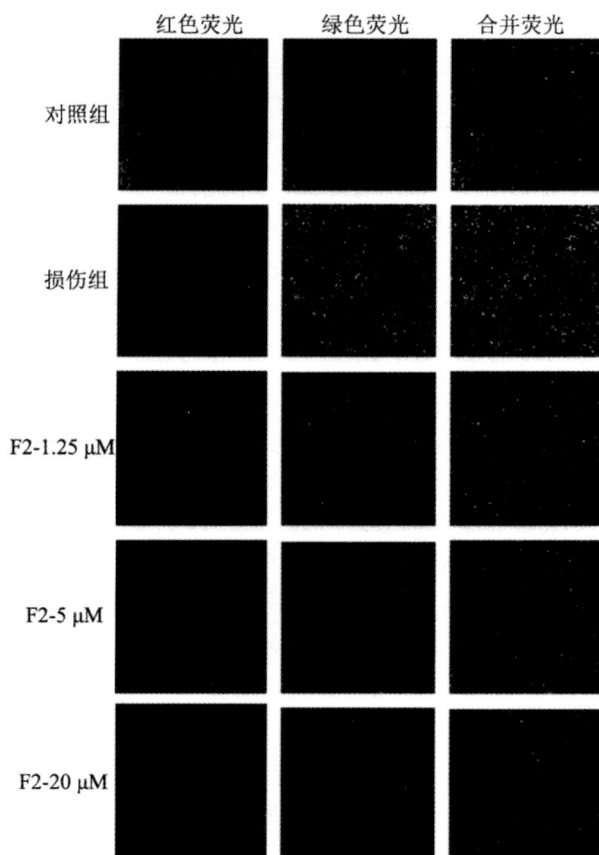


图 2 激光共聚焦采集的 HEK-293 细胞荧光图像

Fig.2 Confocal images of fluorescence in HEK-293 cells

酶标仪测得红绿荧光强度值, 用红/绿荧光比值来表示线粒体膜电位, 比值越高, 表明细胞越正常、线粒体膜电位越高。荧光比值如图 3 所示, 损伤组的荧光比值为 55.97%, 明显其低于对照组的 100%, 二者之间差异显著 ( $p<0.05$ )。不同浓度 F2 组的相对荧光比值均比损伤组高, 随着人参皂苷 F2 浓度的升高, 相对荧光比值也呈升高趋势: 60.22% (1.25  $\mu\text{mol/L}$ )、

62.76% (5  $\mu\text{mol/L}$ )、70.96% (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 且组间差异显著 ( $p<0.05$ )。

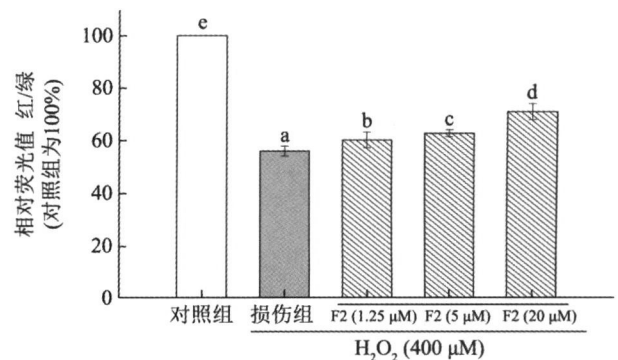


图 3 红绿荧光的相对比值

Fig.3 MMP loss was represented by relative red/green ratio of fluorescence

细胞线粒体膜内负外正的电位差对于维持线粒体正常功能有着重要作用, 在各种特定的凋亡诱导信号导致的细胞程序性死亡过程中, 各种因素导致线粒体膜的结构功能发生改变。在凋亡过程中, 某些物质可促进线粒体膜上有关膜通透性改变 (permeability transition, PT) 的孔 (PT 孔) 开放, 进而导致膜通透性增加, 离子的跨膜流动使得线粒体跨膜电位减小。JC-1 荧光探针在正常细胞内、线粒体膜电位高的时候可进入线粒体内, 以聚合体的形式存在, 呈现红色本荧光; 在细胞凋亡时, 线粒体膜电位降低, JC-1 则以单体的形式游离在胞质中, 呈现绿色荧光<sup>[14]</sup>。本实验用相对荧光比值表示线粒体膜电位, 损伤越严重, 绿色荧光越少、红色荧光越多。如图 3 所示, 损伤后的相对荧光比值明显下降, 说明此时线粒体膜受到破坏、PT 孔开放增多, 离子跨膜流动增多, 导致细胞膜电位降低。在加入人参皂苷 F2 的 F2 组, 可见相对荧光比值有所回升, 随着 F2 浓度的升高, 比值也随着升高。说明, F2 可能通过抑制细胞线粒体膜的损伤来抑制线粒体膜电位的降低, 且作用与其浓度呈正相关。有类似研究, 研究了人参皂苷对凋亡细胞 LDH 水平和线粒体膜电位的影响, 人参皂苷能很好的减低 LDH 水平、减轻线粒体膜电位的降低<sup>[15,16]</sup>。

## 2.3 人参皂苷 F2 对 NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路中 p65 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 在损伤组中 p65 蛋白表达量为 122.73%, 较正常对照组的 100% 明显上升, 差异显著 ( $p<0.05$ )。在经过 F2 干预的 F2 组中可见 p65 表达量较损伤组明显下降, 之间差异显著 ( $p<0.05$ ), 且 F2 组的 p65 蛋白表达量低于正常对照组, 二者之间差异

显著 ( $p<0.05$ ): 79.49% (1.25  $\mu\text{mol/L}$ )、71.92% (5  $\mu\text{mol/L}$ )、58.39% (20  $\mu\text{mol/L}$ ); F2 组内, 随着 F2 浓度的升高, p65 蛋白表达量逐渐下降, 1.25  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  之间差异不显著 ( $p>0.05$ )、5  $\mu\text{mol/L}$  和 20  $\mu\text{mol/L}$  浓度的蛋白表达量差异显著 ( $p<0.05$ )。

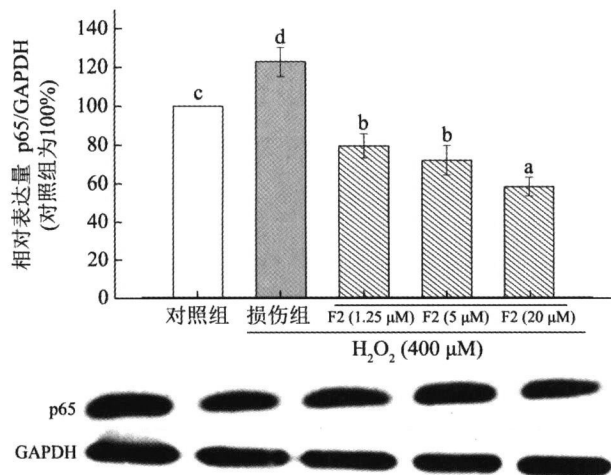


图4 人参皂苷 F2 对 HEK-293 细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of ginsenoside F2 on protein expression level of NF- $\kappa$ B p65

NF- $\kappa$ B 通路在凋亡中具有重要作用, 细胞在正常生理状态下, 细胞质中的 p50/p65 与抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合成三聚体损伤因素的刺激作用下, I $\kappa$ B 从三聚体中解离出去, p50/p65 入核结合 DNA 上相应位点发挥作用, 导致细胞凋亡发生。用 Western Blot 测得 NF- $\kappa$ B 通路中 p65 蛋白的表达量。观察结果, 损伤后的 p65 蛋白的表达量明显上升, 在 F2 组, p65 蛋白表达量大幅下降, 甚至降至低于对照组的水平。说明 F2 能显著抑制细胞凋亡过程中 NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路 p65 蛋白的表达。

## 2.4 人参皂苷 F2 对 NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路中

### p65 mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 在损伤组中 p65 的 mRNA 相对表达量为 1.66, 明显高于对照组的 1.00, 二者差异显著 ( $p<0.05$ ); 在经过 F2 干预的 F2 组中可见 p65 mRNA 表达量比损伤组有明显下降, 差异显著 ( $p<0.05$ ); 且 F2 组 p65 mRNA 表达量均高于对照组, 差异显著 ( $p<0.05$ ); 1.25  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度 F2 组的表达量分别为: 1.30、1.18、1.01; 随着 F2 组内 F2 浓度的升高, p65 mRNA 的表达量不断下降, 但 1.25  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度之间的表达量差异不显著 ( $p>0.05$ ), 5  $\mu\text{mol/L}$  和 20  $\mu\text{mol/L}$  浓度之间的表达量差异显著 ( $p<0.05$ )。

qRT-PCR 技术测得 NF- $\kappa$ B 通路中 p65 蛋白相关的 mRNA 的表达变化。qRT-PCR 和 Western Blot 的结果互相印证。损伤后的 p65 蛋白 mRNA 的表达量明显升高, 在 F2 组, 可见其 mRNA 的表达量有所下降, 但都高于对照组的表达量。结合 Western Blot 的结果中蛋白表达量的变化, F2 可能通过降低 p65 蛋白及相关的 mRNA 的表达, 来减少 NF- $\kappa$ B 通路的激活进而发挥抑制细胞凋亡、保护细胞的作用。此外, 有相似研究表明人参皂苷 Rg1 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路来减轻心肌细胞的凋亡反应<sup>[17]</sup>。

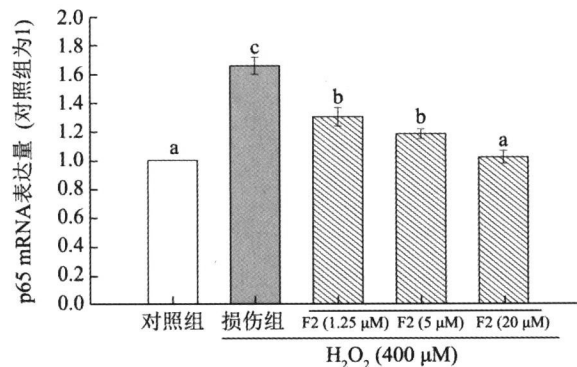


图5 人参皂苷 F2 对 HEK-293 细胞 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的影响

Fig.5 Effect of ginsenoside F2 on mRNA expression level of NF- $\kappa$ B p65

## 3 结论

本研究通过  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导凋亡模型, 发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导细胞凋亡的损伤组中 LDH 释放率升高、线粒体膜电位降低、NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路中 p65 蛋白及其 mRNA 的表达量升高。而人参皂苷 F2 预处理后能够减少凋亡细胞的 LDH 释放率、升高凋亡细胞的线粒体膜电位、保护线粒体膜免受损伤; Western blot 以及 qRT-PCR 结果显示 F2 干预后 NF- $\kappa$ B 凋亡信号通路中 p65 蛋白及其 mRNA 的表达量明显下降, 而 NF- $\kappa$ B 信号通路在细胞凋亡中非常重要。综上, 人参皂苷 F2 可以通过以上途径, 抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活, 实现抑制细胞凋亡的作用。

## 参考文献

- [1] Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease [J]. Journal of Internal Medicine, 2005, 258(6): 479-517
- [2] Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF-kappa B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses [J]. Annu Rev Immunol 1998, 16: 225-260

- [3] Li ZW, Chu W, Hu Y, et al. The IKK $\beta$  subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1999, 189(11): 1839-1845
- [4] Park J Y, Choi P, Kim T, et al. Protective effects of processed ginseng and its active ginsenosides on cisplatin-induced nephrotoxicity: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Agri Food Chem, 2015, 63(25): 5964-5969
- [5] Mai TT, Moon J, Song Y, et al. Ginsenoside F2 induces apoptosis accompanied by protective autophagy in breast cancer stem cells [J]. Cancer Letters, 2012, 319(2): 144-153
- [6] Shin H S, Park S Y, Hwang E S, et al. The inductive effect of ginsenoside F2 on hair growth by altering the WNT signal pathway in telogen mouse skin [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 730: 82-89
- [7] Cai BX, Jin SL, Luo D, et al. Ginsenoside Rb1 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(5): 837-841
- [8] Liu JF, Yan XD, Qi LS, et al. Ginsenoside Rd attenuates A $\beta$ 25-35-induced oxidative stress and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons [J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 239: 12-18
- [9] Ni N, Liu Q, Ren H, et al. Ginsenoside Rb1 protects rat neural progenitor cells against oxidative injury [J]. Molecules, 2014, 19(3): 3012-3024
- [10] Lee YY, Park JS, Lee EJ, et al. Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponin metabolite rh3 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(13): 3472-3480
- [11] 褚启龙,杨克敌,王爱国.氧化应激与细胞凋亡关系的研究进展[J].卫生研究,2003,32(3):276-279  
ZHU Qi-long, YANG Ke-di, WANG Ai-guo. Research progress on oxidative stress and apoptosis [J]. Journal of Hygiene Research, 2003, 32(3): 276-279
- [12] 刘迪,张聪,孙宏宇,等.人参皂苷 F2 对过氧化氢诱导细胞损伤的保护作用[J].卫生研究,2019,48(3):452-457  
LIU Di, ZHANG Cong, SUN Hong-yu, et al. Protective effects of ginsenoside F2 on hydrogen peroxide induced cell injury [J]. Journal of Hygiene Research, 2019, 48(3): 452-457
- [13] Zeng X, Zhou X, Cui L, et al. The fruits of wampee inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells via the NF-kappaB pathway and regulation of cellular redox status [J]. Molecules, 2014, 19(6): 7368-7387
- [14] Castedo M, Ferri K, Roumier T, et al. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis [J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 265(1): 39-47
- [15] Fan CL, Ma Q, Xu M, et al. Ginsenoside Rb1 Attenuates high glucose-induced oxidative injury via the NAD-PARP-SIRT axis in rat retinal capillary endothelial cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4936
- [16] Bi SC, Ma XD, Wang YM, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on oxidative damage induced by hydrogen peroxide in chicken splenic lymphocytes [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 3: 1-13
- [17] Luo M, Yan DS, Sun QS, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF-kB/NLRP3 pathway [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(4): 2994-3004

---

(上接第 160 页)

- [28] Tamon H, Ishizaka H, SAXS. Study on gelation process in preparation of resorcinol-formaldehyde aerogel [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 206(2): 577-582
- [29] 曹世阳,李宏升,尹秀华.淀粉凝胶老化工艺对鲜湿米粉断条率的影响[J].粮食与油脂,2017,30(4):46-50  
CAO Shi-yang, LI Hong-sheng, YIN Xiu-hua. Effect of aging process of starch gel on broken rate of fresh wet rice noodle [J]. Grain Oil and Grease, 2017, 30(4): 46-50
- [30] 李兴革,李娟,魏春红.复合改良剂对马铃薯淀粉粉丝断条率的影响[J].黑龙江八一农垦大学学报,2012,1:62-64,95  
LI Xing-ge, LI Juan, WEI Chun-hong. Composite modifier effects about break percent of vermicelli with potato starch [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2012, 1: 62-64, 95