

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

钟京霖, 曹惠敏, 潘亚茹, 简文轩, 王 奇

<https://doi.org/10.12307/2022.1007>

投稿日期: 2022-02-07

采用日期: 2022-03-02

修回日期: 2022-04-22

在线日期: 2022-05-11

中图分类号:

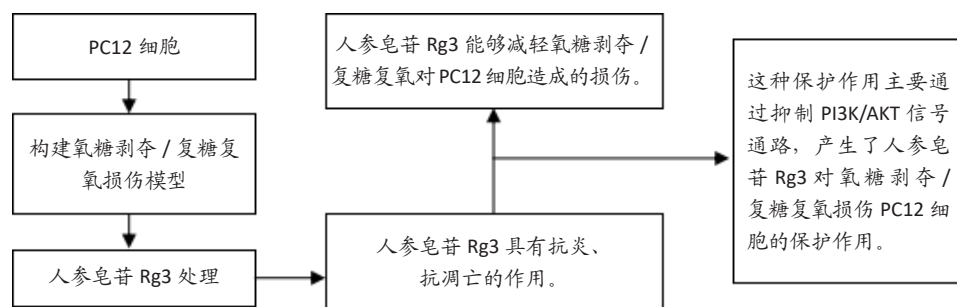
R459.9; R363; R543

文章编号:

2095-4344(2023)02-00177-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的保护



文题释义:

人参皂苷Rg3: 是一种原人参二醇, 具有显著的抗肿瘤功效, 但在神经系统相关疾病方面的研究很少。有研究指出人参皂苷Rg3与多种人参皂苷相比, 神经保护作用更强, 能够促进神经功能的恢复, 但是其具体保护作用以及相关机制尚不明确。

氧糖剥夺/复糖复氧损伤: 脑缺血再灌注损伤是中枢神经系统最常见的病理损伤之一, 而氧糖剥夺/复糖复氧损伤是缺血再灌注损伤的经典体外模型, 通过让细胞缺氧再复糖复氧, 模拟缺血再灌注导致的细胞凋亡、氧化应激、炎症反应、线粒体功能障碍等多种病理损伤。

摘要

背景: 人参皂苷Rg3在脑缺血疾病中具有一定的神经保护作用, 但其对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的PC12细胞是否也有保护作用, 目前尚不明确。

目的: 研究人参皂苷Rg3对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的PC12细胞是否有保护作用以及相关机制。

方法: 构建高分化PC12细胞的氧糖剥夺/复糖复氧损伤模型, 采用MTT、乳酸脱氢酶、Calcein-AM/PI染色、Western blot、流式检测氧糖剥夺/复糖复氧损伤后对PC12细胞的影响, 以及不同浓度人参皂苷Rg3处理PC12细胞后的保护作用, 并且使用PI3K/AKT通路抑制剂LY294002和AKT激活剂SC79从PI3K/AKT信号通路研究其作用机制。

结果与结论: ①氧糖剥夺/复糖复氧损伤模型能随着缺氧时间的延长从而降低PC12细胞的存活率, 促进细胞凋亡, 上调p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT蛋白比值, 促进NLRP3炎症小体、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、BAX蛋白的表达, 促进乳酸脱氢酶的释放; ②人参皂苷Rg3在一定浓度范围内能提高氧糖剥夺/复糖复氧损伤的PC12细胞存活率、减少乳酸脱氢酶的释放, 抑制细胞凋亡, 降低p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT蛋白比值, 下调NLRP3炎症小体、白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α 、BAX蛋白的表达, 还会降低活化的caspase-9蛋白表达, 促进活化的caspase-3蛋白表达; ③LY294002对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的PC12细胞的保护作用与人参皂苷Rg3相当, 而SC79可以减轻人参皂苷Rg3对PC12细胞的保护效果。因此, 人参皂苷Rg3可以通过抑制PI3K/AKT信号通路, 抑制PI3K和AKT的磷酸化, 发挥抗炎、抗凋亡的作用, 减轻氧糖剥夺/复糖复氧对PC12细胞造成的损伤。

关键词: 人参皂苷Rg3; 氧糖剥夺; 复糖复氧; PC12细胞; PI3K/AKT信号通路

Ginsenoside Rg3 protects PC12 cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced damage

Zhong Jinglin, Cao Huimin, Pan Yaru, Jian Wenxuan, Wang Qi

Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Zhong Jinglin, Master candidate, Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wang Qi, Master, Professor, Doctoral supervisor, Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Ginsenoside Rg3 can protect the brain from ischemia injury. However, it is unclear whether ginsenoside Rg3 can protect PC12 cell against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury.

广州中医药大学科技创新中心, 广东省广州市 510000

第一作者: 钟京霖, 男, 1995年生, 广东省廉江市人, 汉族, 广州中医药大学在读硕士, 主要从事中医药治疗脑病的研究。**通讯作者:** 王奇, 硕士, 二级教授, 博士生导师, 广州中医药大学科技创新中心, 广东省广州市 510000<https://orcid.org/0000-0002-6001-2690> (钟京霖)**基金资助:** 广东省高等学校重点实验室项目(2019KSYS005), 项目负责人: 王奇; 广东省科技计划国际合作项目(2020A0505100052),

项目负责人: 王奇

引用本文: 钟京霖, 曹惠敏, 潘亚茹, 简文轩, 王奇. 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.



OBJECTIVE: To investigate the protective role and underlying mechanism of ginsenoside Rg3 in OGD/R-injured PC12 cells.

METHODS: A model of OGD/R-injured PC12 cells was constructed. Protective effects of ginsenoside Rg3 at different concentrations on OGD/R-injured PC12 cells were detected using MTT, lactic dehydrogenase, Calcein-AM/PI cell apoptosis double staining assay, western blot assay, and flow cytometry. PI3K/AKT pathway inhibitor LY294002 and AKT activator SC79 were involved to reveal the potential mechanisms of ginsenoside Rg3.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) In this study, OGD/R exposure successfully induced cell injury, which reduced cell survival and promoted cell apoptosis in a time-dependent manner, up-regulated p-AKT/AKT and p-PI3K/PI3K ratio, increased the levels of NLRP3 inflammasomes, tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and BAX, and promoted the release of lactic dehydrogenase. (2) Ginsenoside Rg3 at a certain range enhanced the viability and reduced apoptosis and lactic dehydrogenase release of OGD/R-injured PC12 cells. Ginsenoside Rg3 down-regulated the ratio of p-AKT/AKT and p-PI3K/PI3K, reduced NLRP3, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and BAX levels. Ginsenoside Rg3 also suppressed the expression of activated caspase-9 and up-regulated the expression of activated caspase-3. (3) LY294002 shared the same protective effect as ginsenoside Rg3 whereas SC79 reversed this outcome. Therefore, ginsenoside Rg3 protects PC12 cells from OGD/R injury mainly through inhibiting the PI3K/AKT pathway and phosphorylation of PI3K and AKT, which may exert an anti-inflammatory and anti-apoptotic effect.

Key words: ginsenoside Rg3; oxygen-glucose deprivation; reoxygenation; PC12 cell; PI3K/Akt signaling pathway

Funding: the Key Laboratory Project of Colleges and Universities in Guangdong Province, No. 2019KSYS005 (to WQ); Guangdong Province Science and Technology Plan International Cooperation Project, No. 2020A0505100052 (to WQ)

How to cite this article: ZHONG JL, CAO HM, PAN YR, JIAN WX, WANG Q. Ginsenoside Rg3 protects PC12 cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced damage. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(2):177-183.

0 引言 Introduction

脑卒中是危害人类健康的主要疾病之一,具有高致残率、高死亡率的特点^[1]。脑卒中严重影响患者日常生活能力和社会功能^[2],因中风而导致的身体功能障碍可能会伴随患者终身^[3]。脑缺血引起的神经元不可逆性损伤,是脑卒中导致患者残疾、死亡的重要原因,而缺血再灌注引起的神经细胞损伤是导致神经功能障碍的主要原因^[4],因此研究保护神经细胞免受缺血再灌注损伤具有重要意义。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路是参与细胞增殖调控的重要通路,是一条经典的调节细胞存活、分化以及凋亡的细胞信号传导通路,它通过调节下游相关蛋白的活化过程发挥重要的生物学效应,在生理和病理过程中发挥关键作用^[5]。研究发现,PI3K/AKT 信号通路在神经系统中广泛存在,与神经细胞的存活、分化以及凋亡密切相关^[6-7]。近年相关研究表明,PI3K/AKT 信号通路与脑缺血损伤有关,在因脑缺血发生细胞凋亡时,缺血前处理、缺血后处理、神经营养因子等可以通过调节 PI3K/AKT 信号通路抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用^[8]。除此之外,也有研究表明抑制 PI3K/AKT 信号通路能够减轻炎症反应^[9],还能够抑制小胶质细胞的活化,从而控制神经炎症递质的表达^[10]。

人参已在传统医学中广泛使用了 2 000 多年^[11]。人参皂苷是人参的重要活性成分,目前能从各类人参中分离得到 60 多种人参皂苷,如 Rg1、Rg2、Rg3、Rb1、Rb2、Re、Rk1 等^[12]。人参皂苷 Rg3 是一种原人参二醇,具有抗炎、抗氧化和神经保护作用^[13-15]。人参皂苷 Rg3 在人参的人参皂苷中比例非常低,不到 0.1%^[16],与多种人参皂苷相比,可以有效保护大脑免受缺血性损伤,具有很强的治疗活性^[17]。但总体而言,关于人参皂苷 Rg3 的研究并不多,且其潜在作用机制也尚不明确。

该研究构建了 PC12 细胞的氧糖剥夺/复糖复氧损伤模型来模拟体外缺血再灌注的环境,探讨人参皂苷 Rg3 在氧糖剥夺/复糖复氧损伤模型中对 PC12 细胞的保护作用,并通过研究 PI3K/AKT 信号通路进一步探索其潜在机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验观察。对实验获得的数据进行方差齐性检测与正态性检验,若实验数据方差齐、符合正态分布则两组间采用 *t* 检验,多组间采用单因素方差分析;如果数据不符合正态分布,则采用非参数检验的秩和检验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 11 月至 2021 年 12 月在广州中医药大学科技创新中心完成。

1.3 材料 PC12 细胞系购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞库;人参皂苷 Rg3 标准品购自北京索莱宝科技有限公司 (SG8360);细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司;EBSS 平衡盐溶液购自上海贝博生物科技公司;流式凋亡试剂盒购自江苏凯基生物技术公司;RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、乳酸脱氢酶试剂盒、Calcein-AM/PI 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;LY294002 抑制剂、SC79 激活剂购自德国 Sigma 公司;抗体见表 1。

表 1 | 抗体来源及实验稀释比

Table 1 | Antibody sources and dilution ratios

抗体	种属	公司	稀释比
NLRP3	兔	Abclonal(A5652)	WB 1 : 1 000
p-PI3K	兔	Affinity(AF3242)	WB 1 : 500
PI3K	兔	Affinity(AF6241)	WB 1 : 500
p-AKT	兔	Affinity(AF0016)	WB 1 : 1 000
AKT	兔	Affinity(AF6261)	WB 1 : 1 000
白细胞介素 1 β	兔	Affinity(AF5103)	WB 1 : 500
肿瘤坏死因子 α	兔	Affinity(AF7014)	WB 1 : 200
Caspase-3	兔	CST(#14220)	WB 1 : 1 000
Caspase-9	鼠	CST(#9508)	WB 1 : 1 000
BAX	鼠	Santa Cruz(SC7480)	WB 1 : 500
GAPDH	兔	Affinity(AF7021)	WB 1 : 4 000
β -actin	鼠	SIGMA(A5441)	WB 1 : 4 000

水套式 CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国); Multiskan Go 酶标仪 (Thermo, 美国); 伯乐电泳仪 (BIO-RAD, 美国); 三气培养箱 (YCP, 中国); 低温高速离心机 (Scilogex, 美国); Orbital shaker TS-1 摇床 (Kylin-bell, 中国); Transference decoloring shaker TS-8 摇床 (Kylin-bell, 中国); HH-1 数显恒温水浴锅 (国华, 中国); TS2-S-SM 倒置显微镜 (Nikon, 日本); 化学发光成像仪 (BIO-RAD, 美国); 徕卡显微镜 (Leica, 德国),

KGaA 流式细胞仪 (Merck, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 PC12 细胞培养 PC12 细胞使用 DMEM+ 体积分数为 10% 胎牛血清 +1% 青链霉素混合液配制而成的 DMEM 完全培养基进行常规培养。细胞培养的条件: 37 °C, 体积分数为 5% CO₂。

1.4.2 构建氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤模型 传两三代 PC12 细胞种板 18–24 h 后, 弃去旧培养基, 加入同等体积的 EBSS 缓冲盐溶液, 然后将细胞置于 YCP 三气培养箱内, 将 YCP 三气培养箱的参数调节为体积分数为 94% N₂、5% CO₂、1% O₂, 待培养箱各项气体检测示数稳定, 开始计算细胞的氧糖剥夺时间。根据实验需要, 分别进行 0.5, 1, 1.5, 2 h 的氧糖剥夺处理, 随后将细胞从三气培养箱中取出, 小心吸除 EBSS 缓冲盐溶液, 沿着皿壁加入等体积的 DMEM 完全培养基, 然后将细胞置于普通细胞培养箱内进行复糖复氧处理 16 h。正常组细胞不进行氧糖剥夺处理, 其余操作均与模型组同步进行。

1.4.3 药物处理

(1) 人參皂苷 Rg3 的使用: PC12 细胞在氧糖剥夺时, 同时使用 1–100 nmol/L 的 Rg3 处理。

(2) PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 的使用: PC12 细胞在氧糖剥夺前, 分别使用 10, 20, 40 μmol/L LY294002 预处理 2 h。

(3) AKT 激活剂 SC79 与 Rg3 联合应用: 在氧糖剥夺损伤前, 将 AKT 激活剂 SC79 (20 μmol/L) 加入到培养基中预处理 1 h, 然后在氧糖剥夺时, 同时使用 100 nmol/L Rg3 处理 PC12 细胞。

1.4.4 MTT 检测 Rg3 毒性以及细胞活力 将 PC12 细胞接种在 96 孔板中, 每孔细胞约为 8 000 个, 进行相应的氧糖剥夺 / 复糖复氧处理后, 每孔加入 20 μL 的 MTT 工作液, 37 °C 孵育三四个小时, 然后弃去含有工作液的培养基, 沿着孔壁加入 200 μL 二甲基亚砜, 室温下摇床 60 r/min 摇动 10 min, 结束后使用酶标仪测定吸光度, 波长为 490 nm。以正常组 PC12 细胞的活力为参照, 计算相对细胞活力。

1.4.5 乳酸脱氢酶释放检测 在复糖复氧 15 h 时加入乳酸脱氢酶释放试剂, 随后吹打混匀, 继续在细胞培养箱内孵育 1 h, 使用细胞培养板专用的孔板离心机以 400×g 的条件离心 5 min, 再吸取每个孔内 120 μL 上清液转移到新的 96 孔板中, 此时在每孔内加入 60 μL 的乳酸脱氢酶工作液, 在摇床上室温避光孵育 30–40 min, 在 490 nm 波长处测量吸光度值, 并根据以下公式计算 PC12 细胞乳酸脱氢酶的释放率:

乳酸脱氢酶释放率 (%) = [吸光度值 (处理) - 吸光度值 (对照)] / [吸光度值 (最大值) - 吸光度值 (对照)] × 100%

吸光度值 (对照)、吸光度值 (处理)、吸光度值 (最大值) 均需减去背景空白吸光度值后才能用于计算乳酸脱氢酶释放率。

1.4.6 Calcein-AM/PI 细胞凋亡双染色 Calcein-AM/PI 染色试剂盒用于观察细胞凋亡, PC12 细胞按照 10 000 个 / 孔的密度接种在 96 孔板内, 经氧糖剥夺 / 复糖复氧处理后, 使用

真空泵吸干净旧培养基, 沿着孔壁加入 PBS 润洗细胞 1 次, 去除 PBS 后, 每孔加入 100 μL Calcein-AM/PI 染色工作液, 在 37 °C 的细胞培养箱内避光孵育 30–40 min, 随后使用荧光显微镜进行图像的拍摄, 并通过 LAS X 软件进行图像分析。

1.4.7 Western blot 蛋白检测 经氧糖剥夺 / 复糖复氧处理后, 使用 RIPA 裂解液提取 PC12 细胞的总蛋白, 然后用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度, 随后使用 5×Loading Buffer 将蛋白样品稀释至合适浓度; 上样前将蛋白样品进行加热煮沸处理, 然后进行蛋白电泳: 80 V 恒压电泳浓缩胶, 120 V 恒压电泳分离胶; 电泳结束后进行电转: 200–250 mA 恒流转膜一到两个小时。转膜结束后使用 5% BSA 室温封闭一到两个小时, 随后使用 TBST 洗涤 3 次, 10 min/ 次, 然后使用相应一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 10 min/ 次, 接着使用对应二抗室温孵育一到两个小时, TBST 洗涤 3 次, 10 min/ 次, 最后进行显影曝光; 使用 Image Lab 图像采集软件进行拍摄, 使用 Image J 分析软件进行蛋白条带的灰度分析。蛋白条带的分析方法: 将每条泳道的目的蛋白条带的灰度值分别除以对应泳道的蛋白内参照, 得到目的蛋白 / 内参照的比值, 因至少重复 3 次实验, 所以至少有 3 组比值, 将全部数值的比值进行归一化处理, 再进行统计分析。

1.4.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 PC12 细胞进行氧糖剥夺 / 复糖复氧处理后, 完全弃去旧培养基, 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 收集细胞后以 2 000 r/min 离心 5 min, 再用无菌 PBS 洗涤一两次, 2 000 r/min 离心 5 min, 洗干净上清液后加入 250–500 μL Binding Buffer 重悬细胞并将细胞悬液转移到流式进样管中。流式上机前移动到避光环境, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL Propidium Iodide 到流式进样管内, 与细胞充分混匀, 室温避光反应 5–10 min, 随后调节 Merck KGaA 流式细胞仪至适当参数后进行上样检测。

1.5 主要观察指标 ①细胞活力; ②乳酸脱氢酶释放率; ③细胞凋亡染色与细胞凋亡率; ④炎症蛋白和凋亡蛋白表达水平; ⑤ PI3K/AKT 信号通路蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 25.0 数据统计软件和 GraphPad Prism 8.0 绘图分析软件进行数据的统计与分析, 两组间的比较使用 *t* 检验, 多组间的比较使用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有显著性意义, *P* < 0.01 为差异有非常显著性意义, *P* > 0.05 则认为差异无显著性意义。文章统计学方法已经通过广州中医药大学科技创新中心生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 人參皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的保护作用 图 1A 是人參皂苷 Rg3 的结构式, 使用 1–100 nmol/L 的 Rg3 处理受到不同时间氧糖剥夺损伤的 PC12 细胞, 如图 1B 所示, 在不同损伤时间内, Rg3 在 10–100 nmol/L 浓度范围时, 都可以不同程度地升高细胞活力。通过测定乳酸脱氢酶的释放来评估 PC12 细胞受损的程度, 如图 1C 所示, 在氧

糖剥夺 2 h 时, Rg3 在 25–100 nmol/L 时均可以明显减少乳酸脱氢酶的释放 ($P < 0.05$)。因为在 0.5, 1, 1.5, 2 h 时, 细胞活力都出现明显下降, 分别为 81%, 75%, 55%, 51%, 为保证模型的稳定性与损伤的效果, 后续实验使用氧糖剥夺 2 h, 复糖复氧 16 h 进行造模。

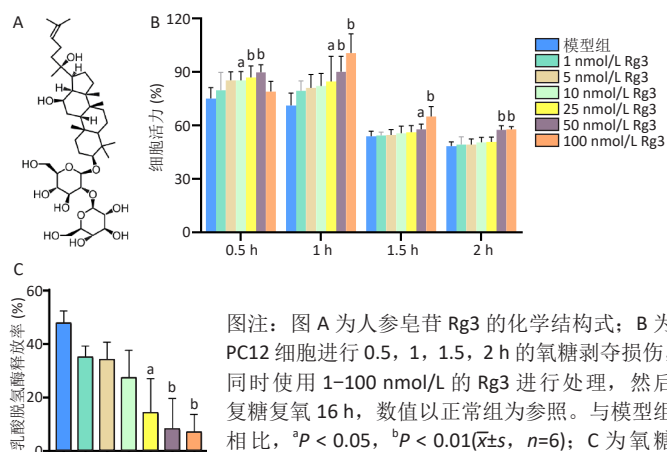


图 1 | 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的保护作用
Figure 1 | Protective effect of ginsenoside Rg3 on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-injured PC12 cells

2.2 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的细胞凋亡的影响 Calcein-AM/PI 双染色结果显示 Rg3 可以减少氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的细胞凋亡, 见图 2A。利用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 BAX、Pro-Caspase-3、Pro-Caspase-9、CleavedCaspase-3、Cleaved-Caspase-9 的表达水平, 与模型组相比, Rg3 在 100 nmol/L 时可以明显降低 BAX 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。意外的是, 与对照组相比, 模型组 Cleaved-Caspase-9 活性升高, Cleaved-Caspase-3 活性降低, 而 Pro-Caspase-9 和 Pro-Caspase-3 蛋白的活性无明显变化; 在使用不同浓度的 Rg3 处理后, Cleaved-Caspase-9 表达降低, Cleaved-Caspase-3 表达明显升高, 对 Pro-Caspase-9 和 Pro-Caspase-3 的表达无明显影响, 见图 2B。

2.3 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的炎症反应的影响 如图 3 所示, Western blot 结果表明, 使用 Rg3 处理细胞后, 与模型组相比, Rg3 在 100 nmol/L 时可以明显降低 NLRP3 ($P < 0.01$)、白细胞介素 1 β ($P < 0.0001$) 和肿瘤坏死因子 α ($P < 0.0001$) 的表达水平。

2.4 LY294002 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的保护作用 为明确 PI3K/AKT 信号通路在氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤模型中发挥的作用, 使用特异性 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 进行阳性对照实验。在氧糖剥夺 2 h 的条件下, 单独使用 LY294002 预处理细胞, 结果表明不同浓度的 LY294002 均能够减少乳酸脱氢酶的释放, 见图 4A。Calcein-AM/PI 染色和流式结果均表明, LY294002 能够抑制氧

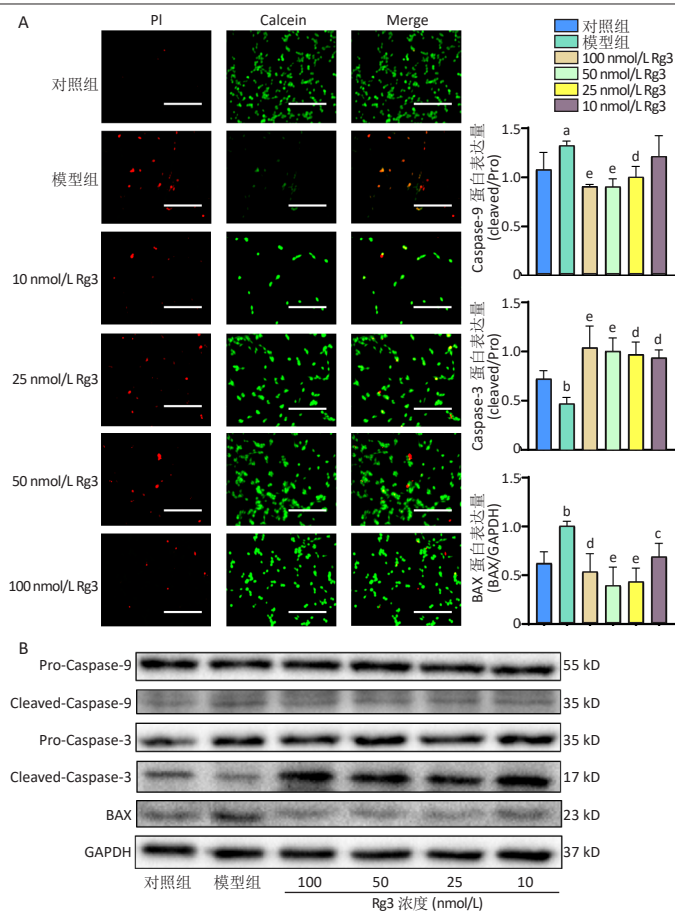
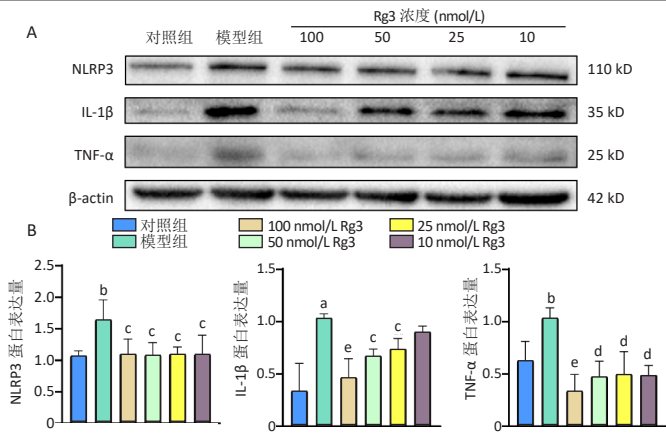


图 2 | 人参皂苷 Rg3 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的细胞凋亡的影响
Figure 2 | Effect of ginsenoside Rg3 on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis

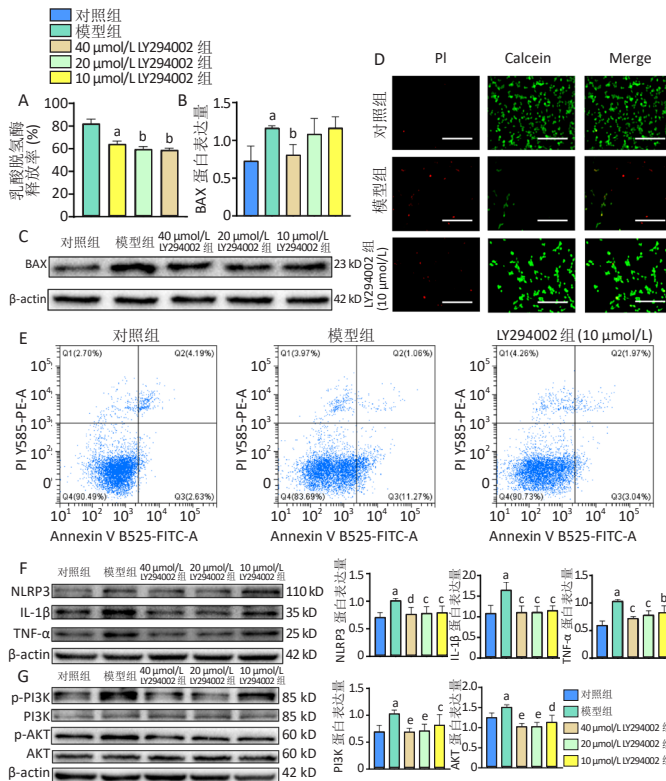
糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的细胞凋亡, Western blot 结果发现 LY294002 能够明显降低炎症相关因子 NLRP3、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和凋亡蛋白 BAX 的表达水平, 并且随着 LY294002 浓度的升高, 其对 PI3K 和 AKT 的磷酸化抑制程度逐渐增强, 见图 4B–F。

2.5 拮抗 Rg3 对 PI3K/AKT 信号通路调节作用后对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的影响 为进一步探索 Rg3 对 PI3K/AKT 信号通路的调节作用, 将 Rg3 与特异性 AKT 激活剂 SC79 联合使用。乳酸脱氢酶释放实验结果显示, 与模型组相比, 单独使用 SC79 的乳酸脱氢酶释放率无明显差异, 而 Rg3 和 SC79 联合使用与单独使用 Rg3 相比, 乳酸脱氢酶释放会增多, 但无统计学差异, 见图 5A。Calcein-AM/PI 染色和流式结果均表明, SC79 能够促进细胞凋亡, 升高细胞凋亡率, Western blot 结果表明 SC79 能恢复炎症相关因子 NLRP3、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和凋亡蛋白 BAX 的水平, 并且能够明显促进 AKT 的磷酸化, 图 5B–F。



图注：在氧糖剥夺 2 h 时，分别使用 10, 25, 50, 100 nmol/L 的 Rg3 处理 PC12 细胞，随后进行 16 h 的复糖复氧，提取蛋白利用 Western blot 检测 NLRP3、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达水平。以 β -actin 为内参照。与对照组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与模型组相比，^c $P < 0.01$ ，^d $P < 0.001$ ，^e $P < 0.0001$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

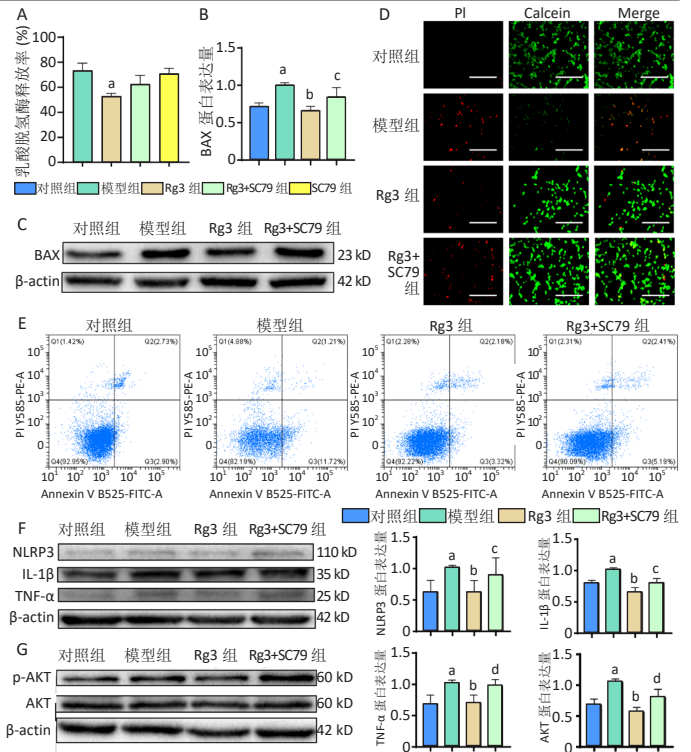
图 3 | 人皂苷 Rg3 能够减轻氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的炎症反应
Figure 3 | Effect of ginsenoside Rg3 on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced inflammatory responses



图注：图 A 为在氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤前，分别使用 10, 20, 40 μ mol/L 的 LY294002 预处理细胞 2 h，可以有效抑制乳酸脱氢酶的释放，与模型组相比，^a $P < 0.001$ ，^b $P < 0.0001$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)；B, C 为 LY294002 预处理对 BAX 蛋白表达水平的影响，与对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)；D 为 Calcein-AM/PI 染色 (比例尺：50 μ m)；E 为流式细胞仪检测细胞凋亡率；F, G 为在进行氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤前，使用 10, 20, 40 μ mol/L 的 LY294002 预处理细胞 2 h，氧糖剥夺后进行 16 h 的复糖复氧，提取蛋白用 Western blot 检测 NLRP3、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 的表达水平。以 β -actin 为内参照。与对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ，^c $P < 0.01$ ，^d $P < 0.001$ ，^e $P < 0.0001$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 4 | PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的保护作用

Figure 4 | Protective effect of LY294002, a PI3K/AKT pathway inhibitor, on PC12 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation



图注：图 A 为在氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤前，使用 20 μ mol/L 的 SC79 预处理细胞 1 h，结果表明 SC79 本身不会促进乳酸脱氢酶释放，但 SC79 与 Rg3(100 nmol/L) 联用时，可以减轻 Rg3 的保护作用。与模型组相比，^a $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)；B, C 为 SC79 预处理对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤后 BAX 蛋白表达的影响，与对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.01$ ；与 Rg3 组相比，^c $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)；D 为 Calcein-AM/PI 染色观察 PC12 细胞 (比例尺：50 μ m)；E 为流式细胞仪检测细胞凋亡；F, G 为在进行氧糖剥夺前，使用 20 μ mol/L 的 SC79 预处理细胞 1 h，在氧糖剥夺时，同时使用 100 nmol/L Rg3 处理细胞，然后进行 16 h 的复糖复氧，随后提取蛋白利用 Western blot 检测 NLRP3、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、p-AKT、AKT 的表达水平，以 β -actin 为内参照。与对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与模型组相比，^b $P < 0.01$ ；与 Rg3 组相比，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 5 | 拮抗 Rg3 对 PI3K/AKT 信号通路调节作用后对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤 PC12 细胞的影响

Figure 5 | Effect of antagonizing the regulation of ginsenoside Rg3 on PI3K/AKT signaling pathway on PC12 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

3 讨论 Discussion

缺血再灌注损伤是一种极其复杂的病理生理过程，能够激活细胞凋亡的内源性途径和外源性途径，促进细胞的凋亡^[18]，还能诱导炎症细胞因子的表达，促进炎症反应的发生，破坏抗炎和促炎反应的动态平衡，加重对脑组织的损伤^[19-20]。为便于体外研究，氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤经常被用作缺血再灌注损伤的模型^[21-23]。该研究发现，随着氧糖剥夺的时间延长，PC12 细胞损伤的程度逐渐加重，主要表现为 PC12 细胞的活力随着时间延长而下降。同时，氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤能够促进细胞凋亡，增加乳酸脱氢酶的释放，增强了炎症相关因子 NLRP3、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和凋亡相关蛋白 BAX、活化 Caspase-9 的表达。

人皂苷是人参的主要活性成分，体内外模型表明人皂苷可以对大脑产生多种药理作用，包括减弱兴奋性毒性、抗氧化应激、调节神经炎症和抗凋亡等^[24-27]。在众多人参皂

昔中, 人参皂昔 Rg3 主要被用于癌症、代谢性疾病等的研究^[16, 28], 关于脑血管疾病的研究较少。最新的研究发现, 人参皂昔 Rg3 可以有效保护大脑免受缺血性损伤, 并且 Rg3 与其他多种人参皂昔相比, 具有最强的治疗活性^[17]。该研究利用氧糖剥夺 / 复糖复氧构建体外脑缺血再灌注损伤模型, 进一步探索 Rg3 的神经保护作用以及相关机制, 结果表明, 人参皂昔 Rg3 能够对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤的 PC12 细胞起保护作用, 主要表现在提高细胞活力, 减少乳酸脱氢酶的释放, 抑制炎症相关因子 NLRP3、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 的表达, 从而减轻氧糖剥夺 / 复糖复氧诱导的炎症损伤。除此之外, Rg3 还能够降低凋亡蛋白 BAX 和抑制活化的 Caspase-9 的表达, 发挥抗凋亡的作用。意外的是, 在氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤后, 活化的 Caspase-3 表达明显下降, 而使用 Rg3 治疗后, 会促进活化 Caspase-3 的表达。在凋亡相关途径中, Bax 是一种促凋亡基因, 其上调可以促进细胞凋亡^[29], 而 Caspase-3 和 Caspase-9 是细胞凋亡的重要标志蛋白。Caspase-9 作为细胞凋亡的起始蛋白, 激活后会切割并激活下游的 Caspase, 例如 Caspase-3、6 和 7 等, 从而启动细胞凋亡^[30], 但也有研究表明 Caspase-9 被激活后, 即使下游的效应 Caspase 因子不发挥促凋亡作用, 具有活性凋亡体的细胞仍会死亡^[31]。Caspase-3 作为细胞凋亡的主要执行者, 活化后可以降解细胞内结构蛋白和功能蛋白, 并诱导细胞死亡^[32]。除此之外, 也有研究表明 Caspase-3 对正常大脑发育极为重要^[33-34], 并且与 Caspase-7 的功能不同, Caspase-3 可以抑制活性氧的产生^[31], 发挥抗氧化应激损伤的作用。因此, Rg3 发挥抗凋亡作用与 BAX、Caspase-3、Caspase-9 蛋白密切相关, 但具体作用机制仍需进一步研究。

PI3K/AKT 通路是一条经典的调节细胞分化、代谢、炎症以及细胞凋亡的信号传导通路^[35-36]。目前研究发现, PI3K/AKT 信号通路在神经系统中广泛存在, 与神经细胞的存活与凋亡密切相关^[37-39]。1999 年, KITAGAWA 等^[40]首次发现, 脑缺血损伤时会激活 PI3K/AKT 通路。近年的研究也表明 PI3K/AKT 信号通路与脑缺血损伤密切相关^[41-43]。该研究观察到氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤模型会激活 PI3K/AKT 信号通路, 促进 PI3K、AKT 的磷酸化; 当使用特异性的 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 时^[44], p-PI3K 和 p-AKT 的表达被抑制, 并且还观察到乳酸脱氢酶释放的减少, NLRP3、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和 BAX 蛋白水平的降低, 表明 PI3K/AKT 通路可能调节氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤诱导的炎症因子和凋亡因子的表达, 影响炎症反应和细胞凋亡。当使用人参皂昔 Rg3 处理受到氧糖剥夺损伤的 PC12 细胞后, 同样观察到 p-PI3K 和 p-AKT 表达下调, 相关炎症因子和凋亡因子的表达下降, 炎症反应和细胞凋亡得到抑制。进一步研究发现, 使用 AKT 激活剂 SC79 后^[45], Rg3 下调 p-AKT 的作用减弱, 同时炎症相关因子 NLRP3、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 以及凋亡相关蛋白 BAX 表达水平回升, 乳酸脱氢酶的释放也有轻度

升高, 表明 Rg3 的保护作用被部分抵消, 证明 P-AKT 的上调至少部分抵消了 Rg3 对 PC12 细胞的保护作用。这些数据表明, 人参皂昔 Rg3 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 抑制 PI3K 和 AKT 的磷酸化, 从而发挥其抗炎、抗凋亡的神经保护作用。

因此, 人参皂昔 Rg3 可以改善氧糖剥夺 / 复糖复氧诱导的 PC12 细胞损伤, 主要通过抗炎和抗凋亡来发挥保护作用, 并且这与 PI3K/AKT 信号通路的抑制密切相关。该研究为后期进行 PI3K/AKT 信号通路上下游因子的深入研究提供了初步实验数据, 同时也为深入研究人参皂昔 Rg3 对缺血再灌注损伤的保护作用以及作用机制奠定基础。

作者贡献: 论文撰写、数据处理为钟京霖, 实验实施为曹惠敏和潘亚茹, 实验评估为简文轩, 实验设计为王奇 (通讯作者)。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] DONNAN GA, FISHER M, MACLEOD M, et al. Stroke. Lancet. 2008; 371(9624):1612-1623.
- [2] MENON BK, CAMPBELL BC, LEVI C, et al. Role of imaging in current acute ischemic stroke workflow for endovascular therapy. Stroke. 2015; 46(6):1453-1461.
- [3] ZHANG H, LIU X, YANG F, et al. Overexpression of HIF-1 α protects PC12 cells against OGD/R-evoked injury by reducing miR-134 expression. Cell Cycle. 2020;19(9):990-999.
- [4] LI S, SUN X, XU L, et al. Baicalin attenuates in vivo and in vitro hyperglycemia-exacerbated ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial function in a manner dependent on AMPK. Eur J Pharmacol. 2017;815:118-126.
- [5] REVATHIDEVI S, MUNIRAJAN AK. Akt in cancer: Mediator and more. Semin Cancer Biol. 2019;59:80-91.
- [6] GABBOUJ S, RYHÄNEN S, MARTTINEN M, et al. Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain- Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway. Front Neurosci. 2019;13:629.
- [7] KWON O, KIM KW, KIM MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. Cell Mol Life Sci. 2016;73(7):1457-1477.
- [8] ZHANG Z, YAO L, YANG J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). Mol Med Rep. 2018;18(4):3547-3554.
- [9] 蔡苏娜, 李强, 周慧, 等. 白杨素通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥抗炎和抗氧化作用: 基于蛋白质芯片方法 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(10):1554-1561.
- [10] LI C, ZHAO B, LIN C, et al. TREM2 inhibits inflammatory responses in mouse microglia by suppressing the PI3K/NF- κ B signaling. Cell Biol Int. 2019;43(4):360-372.

- [11] WONG AS, CHE CM, LEUNG KW. Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: a functional and mechanistic overview. *Nat Prod Rep*. 2015;32(2):256-272.
- [12] WU W, SUN L, ZHANG Z, et al. Profiling and multivariate statistical analysis of Panax ginseng based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;107:141-150.
- [13] ATTELE AS, WU JA, YUAN CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(11):1685-1693.
- [14] HE B, CHEN P, YANG J, et al. Neuroprotective effect of 20(R)-ginsenoside Rg(3) against transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2012;526(2):106-111.
- [15] LIU H, LU X, HU Y, et al. Chemical constituents of Panax ginseng and Panax notoginseng explain why they differ in therapeutic efficacy. *Pharmacol Res*. 2020;161:105263.
- [16] LEE H, KONG G, TRAN Q, et al. Relationship Between Ginsenoside Rg3 and Metabolic Syndrome. *Front Pharmacol*. 2020;11:130.
- [17] CHENG Z, ZHANG M, LING C, et al. Neuroprotective Effects of Ginsenosides against Cerebral Ischemia. *Molecules*. 2019;24(6):1102.
- [18] BROUGHTON BR, REUTENS DC, SOBEY CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5):e331-e339.
- [19] CAMPANELLA M, SCIORATI C, TAROZZO G, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke*. 2002;33(2):586-592.
- [20] JIN R, LIU L, ZHANG S, et al. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(5):834-851.
- [21] GONG Z, PAN J, SHEN Q, et al. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):242.
- [22] WANG G, WANG T, ZHANG Y, et al. Schizandrin Protects against OGD/R-Induced Neuronal Injury by Suppressing Autophagy: Involvement of the AMPK/mTOR Pathway. *Molecules*. 2019;24(19):3624.
- [23] JIA Y, CUI R, WANG C, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway. *Redox Biol*. 2020;32:101534.
- [24] KIM S, KIM T, AHN K, et al. Ginsenoside Rg3 antagonizes NMDA receptors through a glycine modulatory site in rat cultured hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):416-424.
- [25] SUN ZG, CHEN LP, WANG FW, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 against hydrogen peroxide-induced injury in human neuroblastoma cells. *Neural Regen Res*. 2016;11(7):1159-1164.
- [26] FAN C, SONG Q, WANG P, et al. Neuroprotective Effects of Ginsenoside-Rg1 Against Depression-Like Behaviors via Suppressing Glial Activation, Synaptic Deficits, and Neuronal Apoptosis in Rats. *Front Immunol*. 2018;9:2889.
- [27] CHO M, CHOI G, SHIM I, et al. Enhanced Rg3 negatively regulates Th1 cell responses. *J Ginseng Res*. 2019;43(1):49-57.
- [28] SUN M, YE Y, XIAO L, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 (Review). *Int J Mol Med*. 2017;39(3):507-518.
- [29] QIN XY, WANG YN, LIU HF, et al. Anti-cancer activities of metal-based complexes by regulating the VEGF/VEGFR2 signaling pathway and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, and caspase-9 to inhibit angiogenesis and induce apoptosis. *Metallomics*. 2020;12(1):92-103.
- [30] BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-290.
- [31] BRENTNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA RL, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. 2013;14:32.
- [32] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, et al. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993;75(4):641-652.
- [33] PORTER AG, JÄNICKE RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104.
- [34] LOSSI L, CASTAGNA C, MERIGHI A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3999.
- [35] POMPURA SL, DOMINGUEZ-VILLAR M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *J Leukoc Biol*. 2018;103:1065-1076.
- [36] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci*. 2020;10(1):54.
- [37] ZHANG J, ZHANG JX, ZHANG QL. PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy in the development of autism spectrum disorder. *Brain Res Bull*. 2016;125:152-158.
- [38] MANTHARI RK, TIKKA C, OMMATI MM, et al. Arsenic induces autophagy in developmental mouse cerebral cortex and hippocampus by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: involvement of blood-brain barrier's tight junction proteins. *Arch Toxicol*. 2018;92(11):3255-3275.
- [39] GARABADU D, VERMA J. Exendin-4 attenuates brain mitochondrial toxicity through PI3K/Akt-dependent pathway in amyloid beta (1-42)-induced cognitive deficit rats. *Neurochem Int*. 2019;128:39-49.
- [40] KITAGAWA H, WARITA H, SASAKI C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain. *Neurosci Lett*. 1999;274(1):45-48.
- [41] ZHAO M, HOU S, FENG L, et al. Vinpocetine Protects Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting Astrocytic Connexin43 via the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Front Neurosci*. 2020;14:223.
- [42] JIN W, XU W, ZHANG X, et al. Ischemic Preconditioning Upregulates Decoy Receptors to Protect SH-SY5Y Cells from OGD Induced Cellular Damage by Inhibiting TRAIL Pathway and Agitating PI3K/Akt Pathway. *Mol Neurobiol*. 2020;57(9):3658-3670.
- [43] WANG HL, LIU FL, LI RQ, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation. *Neural Regen Res*. 2021;16(6):1011-1016.
- [44] CARPENTER CL, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(2):153-158.
- [45] MOREIRA JB, WOHLWEND M, ALVES MN, et al. A small molecule activator of AKT does not reduce ischemic injury of the rat heart. *J Transl Med*. 2015;13:76.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)