



人参皂苷Rg3对脂多糖诱导的胶质细胞-神经元 互作损伤模型的保护作用*

蔡星宇¹, 杨道锋², 卓雪瑞², 孙一鸣^{3, 4△}

1. 蚌埠医科大学 临床医学院 (蚌埠 233030); 2. 蚌埠医科大学 药学院 (蚌埠 233030); 3. 蚌埠医科大学 第一附属医院 药剂科
(蚌埠 233004); 4. 蚌埠医科大学 临床药学教研室 (蚌埠 233004)

【摘要】 目的 探究人参皂苷Rg3对脂多糖诱导的胶质细胞-神经元互作损伤模型的保护作用。**方法** 培养原代小胶质细胞及HT-22细胞株, 实验分为对照组(Control, CON)、100 ng/mL LPS组(LPS)、炎症模型组(CM)、人参皂苷Rg3组、炎症模型组+人参皂苷Rg3(CM+Rg3), 其中Rg3剂量分别为2.5、5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ 。CM组和CM+Rg3组制备胶质细胞-神经元互作模型。通过免疫荧光检测原代小胶质细胞纯度, CCK-8检测各组HT-22细胞活力, ELISA试剂盒检测各组细胞样本中炎症细胞因子[白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和IL-10]的水平变化。ROS试剂盒检测细胞氧化损伤程度, Western blot检测细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的表达, Caspase-3酶活试剂盒检测各组细胞Caspase-3酶活性。**结果** 培养的小胶质细胞纯度达95%以上, 可用于后续实验。不同剂量的人参皂苷Rg3刺激后HT-22存活率与CON组相差不大, 100 ng/mL LPS刺激后神经元细胞存活率为98%, 表明Rg3和LPS对神经元细胞的存活率无影响。与CON组相比, CM组HT-22细胞存活率降低($P<0.01$), 与CM组相比, CM+Rg3组神经细胞存活率增加($P<0.01$), 表明胶质细胞-神经元互作模型制作成功。其中Rg3剂量为10 $\mu\text{mol/L}$ 时, CM+Rg3组HT-22细胞存活率最高($P<0.05$), 因此选择10 $\mu\text{mol/L}$ Rg3用于后续实验。100 ng/mL LPS刺激后, HT-22细胞中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10浓度与CON组差异无统计学意义。100 ng/mL LPS刺激后, 小胶质细胞IL-1 β 、TNF- α 的浓度高于CON组($P<0.05$), 但LPS+Rg3组IL-1 β 、TNF- α 的浓度低于LPS组($P<0.05$)。CM+Rg3组活性氧浓度比CON略高, 但低于CM组($P<0.01$)。CM+Rg3组Bax的表达比CON高, 低于CM组; Bcl-2表达比CON组低, 高于CM组($P<0.01$)。CM组Caspase-3酶活性高于CON组($P<0.01$); CM+Rg3组Caspase-3酶活性低于CM组($P<0.01$)。**结论** 人参皂苷Rg3可能通过调控胶质细胞损伤, 减少炎症因子的分泌, 抑制神经元的凋亡, 发挥缓解神经元凋亡的作用。

【关键词】 人参皂苷Rg3 胶质细胞-神经元互作损伤模型 脂多糖 凋亡

Protective Effect of Ginsenoside Rg3 on Lipopolysaccharide-Induced Neuronal-Glial Interaction Injury Model

CAI Xingyu¹, YANG Daofeng², ZHUO Xuerui², SUN Yiming^{3, 4△}. 1. College of Clinical Medicine, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China; 2. College of Pharmacy, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China; 4. Department of Clinical Pharmacy, Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China

△ Corresponding author, E-mail: 15951977608@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of ginsenoside Rg3 on lipopolysaccharide-induced glial-neuronal interaction injury model. **Methods** Primary microglia cells and HT-22 cell lines were cultured, and the cells were divided into the control group (CON), the 100 ng/mL LPS group (LPS), the control inflammation model group (CM), the ginsenoside Rg3 group, and the inflammation model plus ginsenoside Rg3 treatment group (CM+Rg3). Ginsenoside Rg3 was administered in the ginsenoside Rg3 group and the CM+Rg3 group at the doses of 2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$. Glial-neuronal interaction modeling was performed in the CM group and the CM+Rg3 group. The purity of the primary microglia cells was assessed by immunofluorescence, the viability of the HT-22 cells in each group was assessed by CCK-8, and changes in the levels of inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor α (TNF- α), and IL-10, in the cell samples of each group were assessed with the ELISA kits. The level of cellular oxidative damage was measured with a ROS kit, and the expression of apoptosis-related proteins, including Bax and Bcl-2, was assessed by Western blot. The activity of Caspase-3 enzyme in each group was measured with a Caspase-3 enzyme activity kit. **Results** The purity of the microglia cultured reached over 95% and was suitable for subsequent experiments. After ginsenoside Rg3 stimulation at different doses, the survival rate of HT-22 was not much different from that of the CON group. The survival rate of neurons after 100 ng/mL LPS stimulation was 98%, indicating that Rg3 and LPS had no effect on the survival of neurons. Compared with that of the CON group, the survival rate of HT-22 cells in the CM group was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the CM group, the CM+Rg3 group showed a significant increase in the viability of neurons ($P<0.01$), indicating that the glia-neuron interaction model was successfully

* 国家自然科学基金(No. 82104152)和蚌埠医学院大学生创新项目(No. S202310367122)资助

△ 通信作者, E-mail: 15951977608@163.com

出版日期: 2024-11-20

constructed. When Rg3 dose was 10 $\mu\text{mol/L}$, the HT-22 cells in CM+Rg3 group showed the highest viability ($P<0.05$). Hence, 10 $\mu\text{mol/L}$ Rg3 was selected for further experiments. After 100 ng/mL LPS stimulation, the concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10 in HT-22 cells were not significantly different from those in the CON group. After 100 ng/mL LPS stimulation, the concentrations of IL-1 β and TNF- α in microglia were higher than those in the CON group ($P<0.05$), but the concentrations of IL-1 β and TNF- α in the LPS+Rg3 group were lower than those in the LPS group ($P<0.05$). The concentration of reactive oxygen species in the CM+Rg3 group was slightly higher than that in the CON group, and significantly lower than that in the CM group ($P<0.01$). The expression of Bax in the CM+Rg3 group was higher than that in the CON group, and lower than that in the CM group. The expression of Bcl-2 was lower in the CON group, and higher than that in the CM group ($P<0.01$). The Caspase-3 enzyme activity in the CM group was significantly higher than that in the CON group ($P<0.01$). The Caspase-3 enzyme activity in the CM+Rg3 group was significantly lower than that in the CM group ($P<0.01$). **Conclusion** Ginsenoside Rg3 may play a role in the alleviation of neuronal apoptosis by regulating glial cell damage, reducing the secretion of inflammatory factors, and inhibiting neuronal apoptosis.

【Key words】 Ginsenoside Rg3 Glial-neuronal interaction injury model Lipopolysaccharide Apoptosis

炎症与自身免疫性肝病、衰老和年龄相关疾病等多种疾病有关^[1-2]。人參中重要的活性成分人參皂苷Rg3有诱导肿瘤凋亡、减少脂质累积、抗动脉粥样硬化、抗炎等作用^[3-6]。有文献显示,在小胶质细胞中,人參皂苷的抗炎机制有对促炎细胞因子的表达〔肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6〕的调控、对诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)的负调控等^[6]。

活化的小胶质细胞能够分泌大量的促炎细胞因子,如TNF- α 和IL-1 β ,产生神经炎症并导致神经元凋亡或死亡^[7]。有资料显示,在受伤或疾病时,部分小胶质细胞通过受伤神经元启动的信号被激活^[8]。持续的小胶质细胞激活会引发慢性神经炎症反应,破坏神经元和小胶质细胞之间的通信。由于大多数研究都集中在神经元和小胶质细胞在神经创伤期间如何孤立地发挥作用,因此有必要了解这些细胞在脑病理生理学中的相互作用。本实验主要研究的是人參皂苷Rg3对胶质细胞-神经元互作损伤模型的保护作用。

本实验通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导制作胶质细胞-神经元互作损伤模型,从胶质细胞-神经网络的角度验证人參皂苷对神经元的保护作用,为相关新药的开发提供实验学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物和细胞株

本实验选用刚出生72 h内的C57BL/6新生小鼠(购于杭州子源实验动物科技有限公司),生产许可证号[SCXK(浙)2019-0004]。实验动物的使用由蚌埠医科大学动物研究委员会批准(伦动科批字[2021]第105号),本实验程序符合动物实验指南。

细胞株: HT-22购自武汉塞维尔有限公司,和原代胶质细胞分别培养于DMEM和DMEM-F12培养基中。所有细胞都置于37 $^{\circ}\text{C}$ 下含有5%CO₂的环境中生长。

1.1.2 试剂和耗材

本实验所使用试剂包括: LPS、TLR4激活剂、DMEM-F12培养基、ROS Assay Kit(上海碧云天生物技术有限公司), PBS缓冲液(干粉)(合肥志宏泰克生物技术有限公司), Western一抗稀释液、Western二抗稀释液、Western封闭液(Biosharp公司), 胰酶、染色剂DAPI、抗Iba-1(1:3000, 10904-1-AP, Protrintech), 人參皂苷Rg3(Med ChemExpress), CCK-8(安徽华晓基因科技有限公司), 荧光二抗、Bcl-2、Bax(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.1.3 实验仪器

本实验所采用仪器包括细胞培养箱(上海赛默飞世尔科技有限公司)、荧光显微镜(日本OLYMPUS公司)、无菌超净工作台(济南千司生物技术有线公司)、高压灭菌锅(日本SANYO公司)、恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、磁力搅拌器(大龙兴创实验仪器股份有限公司)、脱色摇床(上海捷呈实验仪器有限公司)、离心机(美国SCILOGEX公司)、离心管、冻存管、KZ-III-FP研磨仪(武汉塞维尔有限公司)以及流式细胞仪(美国BECTON AND DICKINSON公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组

本实验分为对照组(Control, CON)、100 ng/mL LPS组(LPS)、人參皂苷Rg3组(Rg3)、炎症模型组(CM)、人參皂苷Rg3+炎症模型组(Rg3+CM)。其中Rg3组和Rg3+CM组中人參皂苷Rg3的剂量分别为2.5、5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 小胶质细胞的培养

小胶质细胞的提取在无菌手术超净台下进行,手术器械进行灭菌处理。将出生72 h内的C57BL/6新生小鼠,

酒精消毒2遍,断头处死后沿着小鼠脑矢状缝剪开脑部皮肤和颅骨,剥离软脑膜及血管,留取脑组织。PBS清洗大脑组织标本2~3次,置脑组织于离心管内,加入适量0.25%胰酶,采用组织研磨仪对脑组织进行匀浆,混匀匀浆液,置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱消化15~20 min。采用配置好的DMEM-F12培养基终止消化,200目筛网过滤,4℃下1000 r/min离心5 min,弃上清。用DMEM-F12重悬细胞沉淀,接种于培养瓶,置于培养箱中。24 h后更换DMEM-F12,每隔3 d更换一次培养基,细胞生长至所需密度,无菌条件下置于摇床进行小胶质细胞的分离纯化。将纯化后的小胶质细胞接种于大皿或板中,进行后续实验。

1.2.3 Iba-1染色检测小胶质细胞的纯度

待接种的小胶质细胞长成,取一定量细胞用PBS洗涤两次后制成细胞涂片;固定细胞后用PBS洗涤3次,每次5 min;接着对细胞进行通透处理,保证抗体能够达到抗原部位。处理结束后用PBS洗涤3次,每次5 min;封闭细胞,与一抗和二抗结合孵育并用PBS洗涤;最后封片及检测:将细胞核和Iba-1蛋白染色,在荧光显微镜下观察,用Image J v1.8.0软件进行定量分析。

1.2.4 建立小胶质细胞-神经元互作损伤模型

对CM组和Rg3+CM组HT-22细胞进行小胶质细胞-神经元互作损伤模型建立。CM组用100 ng/mL LPS刺激小胶质细胞24 h,弃上清,加入新鲜培养基培养24 h,留取本次培养基上清作为条件培养基刺激HT-22细胞。Rg3+CM组先采用100 ng/mL LPS和剂量分别为2.5、5、10和20 μmol/L的人参皂苷Rg3作用于小胶质细胞^[9],培养24 h后,弃培养基上清,将小胶质细胞转入新的条件培养基培养,再次培养24 h后,留取本次培养基上清,加入培养有HT-22细胞的培养基培养,24 h后检测HT-22细胞的细胞存活率^[10](图1)。

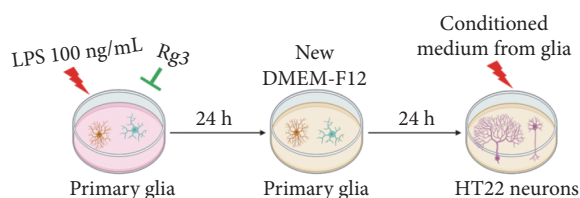


图1 细胞实验模型构建方法

Fig 1 Method for constructing cell experiment models

1.2.5 CCK-8法测量HT-22细胞的活力

将HT-22细胞接种于培养皿中,培养至适当的细胞数目。实验分组同1.2.1。LPS组在培养基中加入100 ng/mL LPS, Rg3组在培养基中分别加入2.5、5、10和20 μmol/L Rg3, CM组和CM+Rg3组处理方法见1.2.4。CON组HT-22细胞未接受任何处理。将各组细胞加入含有CCK-8试

剂的培养基中并放置在恒温恒湿的培养箱里孵育。孵育一定时间后,测定培养液的吸光度。

1.2.6 ELISA法检测炎症因子

将HT-22细胞分为CON组和100 ng/mL LPS组,小胶质细胞分为CON组、100 ng/mL LPS组、10 μmol/L Rg3组和LPS+Rg3组(100 ng/mL LPS+10 μmol/L Rg3)。加入相应条件培养基中培养24 h后,取各组细胞培养上清(4000 r/min, 4℃离心20 min),去除细胞颗粒和聚合物,上清液保存在-20℃以下,避免反复冻融。使用ELISA试剂盒分析各组细胞样本中炎症细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α和IL-10)的水平变化。加入样品和生物素抗原,混合物在37℃温箱内孵育0.5 h;洗板5次;加入亲和素HRP, 37℃温箱内孵育0.5 h,洗板5次;依次加入显示剂A、B液, 37℃温箱内孵育10 min;加入终止液;然后用酶标仪检测OD值,每个样本重复3次。利用标准曲线计算各组的炎症因子的质量浓度,单位是ng/L。

1.2.7 活性氧检测法

从CON组、CM组、Rg3组和CM+Rg3组中分别取样, Rg3组和CM+Rg3组中Rg3剂量均为10 μmol/L。将各组样品依次与活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒中的缓冲液、酶抑制剂等成分充分混合。向各组混合液中加入荧光探针,使其充分结合混合液中的ROS。最后对混合液进行荧光强度测量,计算各组待测样品中的活性氧浓度。

1.2.8 Western blot法检测蛋白表达

细胞蛋白提取:将6孔板取出,每孔加入0.3 mL胰酶,2 min后每孔加1 mL完全培养基终止消化,吹洗后收集细胞悬液至对应离心管内。常温1000 r/min 5 min,弃上清,每管加入适量PBS洗脱液重悬,配平离心,弃上清,再次加PBS重悬后离心。弃上清,加入裂解液PMSM重悬(RIPA:PMSF=100:1)重悬吹打后放入冰上静置30 min,4℃离心12000 r/min 15 min,取上清,测浓度与体积后用裂解液配平,加入1/4总体积的loading buffer后摇匀,离心机短暂离心混匀、95℃金属浴,5 min,进行蛋白变性。取30 μg蛋白样品进行上样。浓缩胶恒压80 V进行电泳,当样品跑至分离胶时将电压调至120 V电泳。电泳后,将蛋白质转移到PVDF膜上,室温下封闭30 min,封闭结束后TPBS洗膜3次,每次5 min。孵一抗4℃冰箱过夜。再次洗膜,室温下孵育二抗1 h,TPBS洗膜3次,每次5 min。然后用增强化学发光(ECL)对膜进行处理。使用Micro Chemi化学发光图像分析系统对信号进行采集, ImageJ软件对印迹进行量化。

1.2.9 Caspase-3酶试剂盒检测Caspase-3酶活性

取待测细胞进行匀浆后得到的蛋白上清。利用

Caspase-3活性检测试剂盒分析待测细胞中Caspase-3酶活性。Caspase-3组织上清液与底物Ac-YVAD-pNA反应孵育后生成pNA,混合物在37℃温箱内孵育1~2 h。再用酶标仪检测读取OD值,每个样本至少重复3次。计算Caspase-3的酶活性,单位为 $\mu\text{mol/mL}$ 。

1.3 统计学方法

应用Graphpad Prism 7.0软件对数据进行统计学分析并作图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有计量资料符合方差分析条件(独立、正态、方差齐性),组间比较采用One-Way ANOVA检验,后进行post hoc检验,多个样本均数的两两比较采用Turkey法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代小胶质细胞纯度的鉴定

免疫荧光结果表明本实验培养的小胶质细胞纯度达95%以上(图2),可用于后续实验。

2.2 人参皂苷Rg3缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元细胞死亡

不同剂量Rg3刺激后HT-22细胞存活率与对照组差异无统计学意义;100 ng/mL LPS刺激后HT-22细胞存活

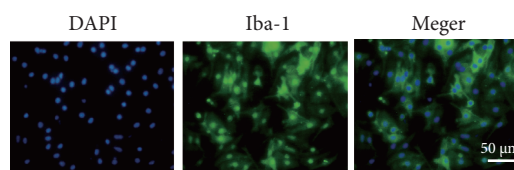


图2 免疫荧光检测小胶质细胞纯度

Fig 2 Immunofluorescence assessment of microglial cell purity

率为98%,表明Rg3和LPS对HT-22细胞的存活率无影响(图3左)。与CON组相比,CM组HT-22细胞存活率降低($P < 0.001$)。与CM组相比,各剂量Rg3+CM组神经元细胞存活率提高,其中Rg3剂量为10 $\mu\text{mol/L}$ 时,神经元细胞存活率最高($P < 0.01$),因此后续实验中,Rg3组和Rg3+CM组中Rg3的剂量均选择10 $\mu\text{mol/L}$ (图3右)。以上结果表明诱导神经元死亡的物质可能是小胶质细胞的上清而不是LPS,而人参皂苷Rg3可以缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元细胞死亡。

2.3 人参皂苷Rg3降低胶质细胞条件培养基炎症因子水平

ELISA检测结果显示:HT-22神经细胞中,与CON组相比,LPS组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10浓度无明显变化(图4A)。在小胶质细胞中,与CON组相比,LPS组IL-1 β 、

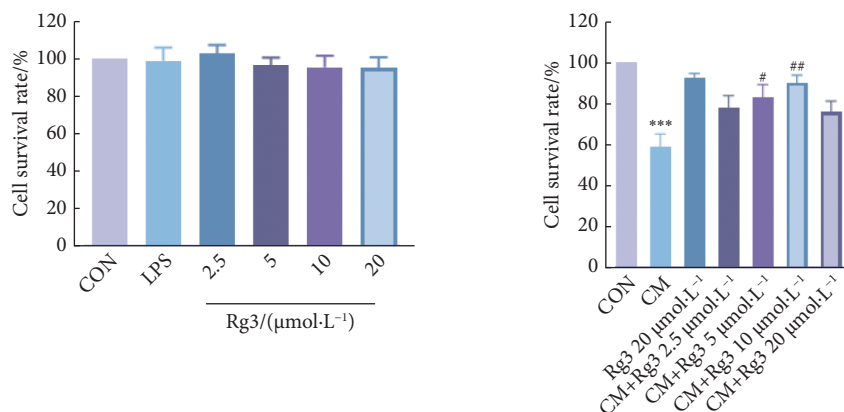


图3 CCK-8结果表明人参皂苷Rg3可以缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元死亡

Fig 3 CCK-8 results indicate that ginsenoside Rg3 can alleviate neuronal death induced by glial cell conditioned medium

$n=4$ in each group. *** $P < 0.001$, vs. CON group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, vs. CM group.

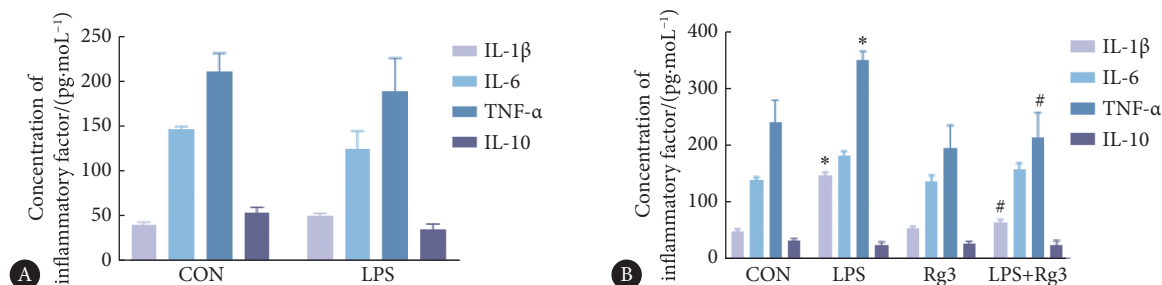


图4 ELISA法检测HT-22细胞(A)和小胶质细胞(B)的炎症因子水平

Fig 4 ELISA was performed to assess the inflammatory cytokine levels in HT-22 cells (A) and primary glia (B)

$n=4$ in each group. * $P < 0.05$, vs. CON group; * $P < 0.05$, vs. LPS group.

TNF- α 的浓度升高($P<0.05$, 图4B), 说明 LPS可诱导小胶质细胞产生IL-1 β 和TNF- α 。与LPS组相比, LPS+Rg3组IL-1 β 、TNF- α 的浓度降低($P<0.05$, 图4B)。ELISA结果证明LPS直接作用于HT-22细胞对其炎症因子浓度的变化不明显, 但是LPS会刺激小胶质细胞, 使其产生大量炎症因子, 但是Rg3可以减少小胶质细胞分泌炎症因子。因此, 促使HT-22细胞凋亡的原因可能是小胶质细胞被LPS作用后产生的炎症因子。

2.4 人参皂苷Rg3降低胶质细胞条件培养基ROS浓度

见图5。与CON组相比, CM组ROS浓度最高($P<0.01$)。与CON组相比, CM+Rg3组ROS浓度略高。与CM组相比, CM+Rg3组ROS浓度降低; 与Rg3组相比, Rg3+CM组ROS浓度升高($P<0.01$)。

2.5 人参皂苷Rg3缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元凋亡

见图6。与CON组相比, CM组Bcl-2表达降低, 而Bax的表达增高(P 均 <0.01); 与CON组相比, 人参皂苷Rg3组Bcl-2、Bax的表达无明显差异($P>0.05$); 与CM组相比, CM+Rg3组Bcl-2的表达增高, Bax的表达降低(P 均 <0.01), 且两个指标均接近于CON组的水平。与CON组相比, CM组Caspase-3酶活性升高($P<0.01$); 与CM组相比, Rg3+CM组Caspase-3酶活性降低($P<0.01$)。

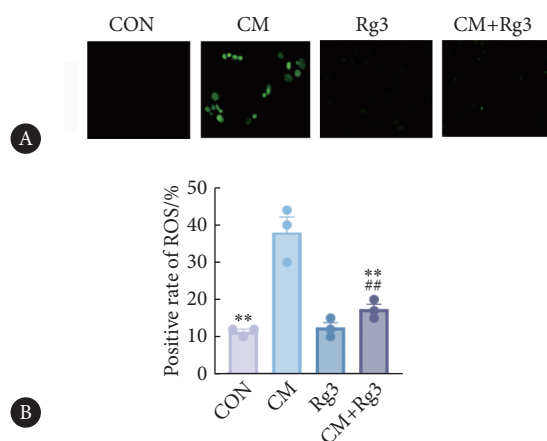


图5 各组HT-22细胞的ROS水平

Fig 5 ROS levels in different groups of HT-22 cells

A, ROS fluorescence staining results in each group (original magnification $\times 50$). B, ROS positivity rate in each group of samples. $n=3$ in each group. ** $P<0.01$, vs. CM group; ## $P<0.01$, vs. Rg3 group.

3 讨论

小胶质细胞在正常生理条件下处于静止状态, 当受到外部环境刺激时, 小胶质细胞会被迅速激活^[11-12], 释放损伤及保护因子, 包括促炎和抗炎细胞因子以及ROS, 这些因子可调节神经炎症和氧化应激^[13]。这为本实验采用LPS刺激小胶质细胞使其产生炎症上清诱导神经元凋亡

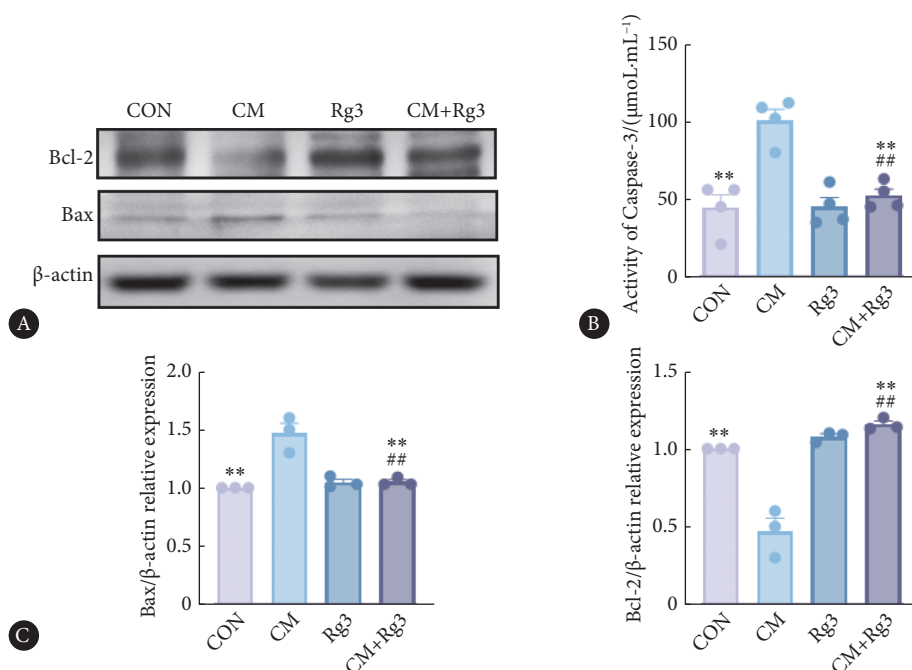


图6 Western blot检测凋亡相关蛋白的表达

Fig 6 Western blot was performed to assess the expression of apoptosis-related proteins

A, Expression of apoptosis-related proteins, $n=4$ in each group. B, The activity of Caspase-3 enzyme, $n=3$ in each group. C, Quantitative image of protein results, $n=3$ in each group. ** $P<0.01$, vs. CM group; ## $P<0.01$, vs. Rg3 group.

提供了理论基础。本研究结果显示在小胶质细胞中,与CON组相比,LPS组IL-1 β 、TNF- α 的浓度明显升高,说明LPS可诱导小胶质细胞产生IL-1 β 和TNF- α 因子。与LPS组相比,LPS+Rg3组IL-1 β 、TNF- α 的浓度明显降低,说明人参皂苷Rg3可以减少小胶质细胞分泌炎症因子。

Rg3在神经系统的相关研究有很多,除了缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元死亡外,Rg3还能通过其抗氧化特性在鱼藤酮诱导的帕金森病小鼠中发挥神经保护作用,改善帕金森小鼠的运动功能^[14]。对于大鼠局灶性脑缺血损伤,Rg3通过改善能量代谢、清除自由基等途径起到显著保护神经元的作用^[15]。当然,人参皂苷Rg3对于抑郁也有一定的治疗作用^[16]。

为了探究不同浓度的Rg3和LPS对HT-22细胞存活率的影响,本实验采用不同剂量的人参皂苷Rg3和100 ng/mL的LPS分别刺激HT-22细胞,结果表明Rg3和LPS对神经元的存活率无显著影响。与CON组相比,CM组HT-22细胞存活率明显降低。与CM组相比,当Rg3剂量为10 μ mol/L时,CM+Rg3组神经元细胞存活率明显提高,故选择10 μ mol/L Rg3用于后续实验。以上结果表明诱导神经元细胞死亡的物质可能是小胶质细胞的上清而不是LPS,而人参皂苷Rg3可以缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元细胞死亡。

氧化应激是由活性氧自由基ROS和活性氮自由基RNS在体内产生的一种负面作用,近年来越来越多的研究表明,氧化应激参与了心血管系统疾病、中枢神经系统疾病、急性肺损伤等多种疾病的发病机制。本实验结果显示,与CON组相比,CM组ROS浓度最高($P<0.01$)。与CM组相比,CM+Rg3组ROS浓度明显低于CM组。说明人参皂苷Rg3可以通过降低ROS水平缓解胶质细胞条件培养基诱导的神经元死亡。

此外,本实验还可以利用细胞组学、蛋白组学等手段进行更详细的分析,这些不足之处有待进一步改进。

* * *

作者贡献声明 蔡星宇负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、验证、初稿写作和审读与编辑写作,杨道锋负责调查研究、研究方法和研究项目管理,卓雪瑞负责正式分析、调查研究、研究方法和验证,孙一鸣负责论文构思、经费获取、研究方法、研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution CAI Xingyu is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, writing--original draft, and writing--review and editing. YANG Daofeng is responsible for investigation, methodology, and project administration.

ZHUO Xuerui is responsible for formal analysis, investigation, methodology, and validation. SUN Yiming is responsible for conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] DELLA CORTE C, SARTORELLI M R, COMPARCOLA D, *et al.* Autoimmune liver diseases. *Pathologie*, 2020, 41(5): 444-456. doi: 10.1007/s00292-020-00807-7.
- [2] CHUNG H Y, CESARI M, ANTON S, *et al.* Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 2009, 8(1): 18-30. doi: 10.1016/j.arr.2008.07.002.
- [3] LIU Z, LIU T, LI W, *et al.* Insights into the antitumor mechanism of ginsenosides Rg3. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2639-2652. doi: 10.1007/s11033-021-06187-2.
- [4] LEE S, LEE M S, KIM C T, *et al.* Ginsenoside Rg3 reduces lipid accumulation with AMP-Activated protein kinase (AMPK) activation in HepG2 cells. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(5): 5729-5739. doi: 10.3390/ijms13055729.
- [5] LEE O H, LEE H H, KIM J H, *et al.* Effect of ginsenosides Rg3 and Re on glucose transport in mature 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 768-773. doi: 10.1002/ptr.3322.
- [6] IM D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of panax ginseng. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 444. doi: 10.3390/biom10030444.
- [7] JIN X, LIU M Y, ZHANG D F, *et al.* Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(5): 575-590. doi: 10.1111/cns.13086.
- [8] HAIDAR M A, IBEH S, SHAKKOUR Z, *et al.* Crosstalk between microglia and neurons in neurotrauma: an overview of the underlying mechanism. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(11): 2050-2065. doi: 10.2174/1570159X19666211202123322.
- [9] LIU Y, ZHANG Y, ZHENG X, *et al.* Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112. doi: 10.1186/s12974-018-1141-5.
- [10] LI Y, LI J, YANG L, *et al.* Ginsenoside Rb1 protects hippocampal neurons in depressed rats based on mitophagy-regulated astrocytic pyroptosis. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155083. doi: 10.1016/j.phymed.2023.155083.
- [11] ORIHUELA R, McPHERSON C A, HARRY G J. Microglial M1/M2

- polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665. doi: 10.1111/bph.13139.
- [12] ZHANG T, ZHANG M, CUI S, *et al.* The core of maintaining neuropathic pain: crosstalk between glial cells and neurons (neural cell crosstalk at spinal cord). *Brain Behav*, 2023, 13(2): e2868. doi: 10.1002/brb3.2868.
- [13] ROQUÉ P J, COSTA L G. Co-culture of neurons and microglia. *Curr Protoc Toxicol*, 2017, 74: 11.24. 1-11.24. 17. doi: 10.1002/cptx.32.
- [14] HAN Y, WANG T, LI C, *et al.* Ginsenoside Rg3 exerts a neuroprotective effect in rotenone-induced Parkinson's disease mice via its anti-oxidative properties. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174413. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174413.
- [15] TIAN J, FU F, GENG M, *et al.* Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 2005, 374(2): 92-97. doi: 10.1016/j.neulet.2004.10.030.
- [16] 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 Pharmacol Sci*, 2017, 134(1): 45-54. doi: 10.1016/j.jphs.2017.03.007.
- (2024-04-11收稿, 2024-10-13修回)
- 编辑 汤洁
-  **开放获取** 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。
- OPEN ACCESS** This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- © 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部
Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*