

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.14.001
文章编号: 1005-8982 (2019) 14-0001-06

基础研究·论著

人参茎叶总皂苷对肾上腺素致家兔肺水肿的保护机制研究*

李福智¹, 侯阳²

(1. 锦州医科大学附属第三医院 胸外科, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学 生命科学研究院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 探讨人参茎叶总皂苷对家兔肾上腺素(AD)实验性肺水肿的作用。**方法** 随机将18只家兔分成对照组、模型组和治疗组。对照组等体积生理盐水灌胃;模型组等体积生理盐水灌胃,30 min后耳缘静脉注射AD(1 mg/只),复制AD肺水肿模型,观察30 min;治疗组以50 mg/kg灌胃人参茎叶总皂苷,连续7 d,末次给药30 min后耳缘静脉注射AD(1 mg/只)。记录不同时间点呼吸频率的变化,比较肺体系数、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量,并行肺组织病理学分析,采用免疫组织化学法检测C/EBP α 表达,采用流式细胞术与Western blotting检测mTOR、S6K1、SirT1、NLRP3蛋白的表达。**结果** 模型组肺体系数、MDA较对照组升高($P < 0.05$),SOD较对照组低($P < 0.05$),治疗组肺体系数、MDA较模型组降低($P < 0.05$),SOD较模型组升高($P < 0.05$)。病理学检查显示,模型组动物肺泡壁断裂,肺泡隔明显增宽,有尘细胞。模型组肺组织损伤评分较对照组升高($P < 0.05$),治疗组较模型组降低($P < 0.05$)。模型组mTOR和S6K1蛋白表达率较对照组升高($P < 0.05$),治疗组较模型组降低($P < 0.05$)。模型组NLRP3较对照组升高($P < 0.05$),SirT1较对照组降低($P < 0.05$),治疗组NLRP3较模型组降低($P < 0.05$),SirT1较模型组升高($P < 0.05$)。**结论** 人参茎叶总皂苷对AD所致肺水肿具有保护作用,可能与降低C/EBP α 、mTOR/S6K1及SirT1/NLRP3表达有关。

关键词: 肺水肿;肾上腺素;人参属

中图分类号: R563

文献标识码: A

Protective effect of ginsenosides on pulmonary edema induced by adrenaline in rabbits*

Fu-zhi Li¹, Yang Hou²

(1. Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Life Science Institute, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ginsenosides on the experimental pulmonary edema in rabbits. **Methods** A total of 18 rabbits were randomly divided into normal group, model group, ginsenosides group. In the ginsenosides group, rabbits received an intragastric administration of 50 mg/kg ginsenosides for 7 days, followed by injection of 1 mg adrenaline (AD) after 30 min. In the model group, 30 min after a corresponding bolus of normal saline, AD was administrated. Normal group were injected with a corresponding bolus of normal saline.

收稿日期: 2019-02-19

*基金项目: 辽宁省自然科学基金(No.: 20180550197); 辽宁省教育科学“十三五”规划立项课题(No.: JG18DB169)

[通信作者]侯阳, E-mail: 124011334@qq.com; Tel: 0416-4673073

The effect of ginsenosides was evaluated by light microscope, the indications of the animals as breathing and lung index, super oxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA). The expression levels of C/EBP α were detected by immunohistochemistry. The expression levels of mTOR and S6K1 detected by flow cytometry. Western Blot was used to detect the proteins expression of NLRP3 and SirT1 pathway. **Results** In the model group, lung index and MDA were significantly higher and SOD was lower compared with the normal group; in the ginsenosides group, lung index and MDA were significantly lower and SOD was higher compared with the normal group ($P < 0.05$). Histopathological alterations presented broken alveolar wall, edema thickened alveolar septum in alveolar spaces and dust cells. Light microscopic analysis disclosed that lungs were less deteriorated in the ginsenosides group than in the model group. Ginsenoside reduced the level of C/EBP α , mTOR, S6K1 and NLRP3 and increased SirT1. **Conclusions** The protective effect of ginsenosides on AD-induced pulmonary edema and remodeling might be partly regulated by C/EBP α expression, mTOR, SirT1/NLRP3 signaling.

Keywords: pulmonary edema; adrenaline; panax

近年来国内学者确认了人参具有改善糖尿病、保护心肌组织等作用^[1-2]。有实验证实人参茎叶总皂苷能改善小鼠实验性肺纤维化,对博来霉素所致的小鼠肺纤维化具有保护作用,其作用机制可能与其抑制氧化损伤有关^[3]。本课题探讨人参茎叶总皂苷对肾上腺素(Adrenaline, AD)致家兔肺水肿的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

普通级家兔,体重 2 ~ 3 kg,雌雄各半,由锦州医科大学提供[SXK(辽)2017-0002]。人参茎叶总皂苷(纯度 82%,辽宁新宾制药有限公司),AD(上海禾丰制药有限公司),氨基甲酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,C/EBP α 、mTOR 及 S6K1 抗体均购自上海生工生物工程股份有限公司,SirT1、NLRP3 抗体购自沈阳万类生物科技有限公司,兔二步法检测试剂盒、二氨基联苯胺均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。BL-420 生物机能实验系统、张力换能器购自成都泰盟软件有限公司,石蜡切片机(德国莱卡公司),FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 药物干预及取材

将 18 只家兔随机分成对照组、模型组和治疗组,每组 6 只。家兔称重后,常规麻醉(质量分数 25% 氨基甲酸乙酯 4 ml/kg 耳缘静脉注射)、固定,行气管插

管,并与 BL-420 生物信号采集系统连接,记录呼吸变化。对照组:灌胃等体积生理盐水。模型组:灌胃等体积生理盐水,30 min 后耳缘静脉注射 AD 1 mg/只,复制 AD 肺水肿模型,观察 30 min。治疗组:以 50 mg/kg 灌胃人参茎叶总皂苷,连续 7 d,末次给药 30 min 后耳缘静脉注射 AD 1 mg/只,并观察 30 min。观察完毕,处死家兔,取肺脏观察并称量其湿重,计算肺系数 = 肺湿重(g) / 体重(kg) \times 100%。取肺组织,按照试剂盒说明书检测 SOD、MDA。

1.3 病理学观察

常规石蜡切片和苏木精-伊红染色。参照王宝娟等^[4]的方法对肺组织进行病理损伤评分。采用免疫组织化学 SP 检测 C/EBP α 蛋白在石蜡包埋标本的表达情况。按试剂盒说明书进行操作,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.4 流式细胞术

取肺组织,用眼科剪将组织剪碎、匀浆,使用移液枪反复吹散,直至无明显的组织块,经 100 目筛网过滤后,1 500 r/min 离心 3 min,除去上清,连续 3 次后弃上清。按 1 : 100 稀释 mTOR 和 S6K1 一抗,每管加入 75 μ l,室温孵育 30 ~ 60 min。加入 500 μ l PBS 洗涤 2 次,所有管内加入 1 : 100 稀释的 75 μ l Cy3 标记的荧光二抗,室温孵育 20 ~ 30 min。加入 500 μ l PBS 洗涤 2 次待测。流式细胞仪激光管预热 30 min,用荧光微球调整仪器。以对照管为空白定标,计算 1×10^4 个细胞,采用流式细胞仪配套软件进行数据读取和分析,记录标本 mTOR 和 S6K1 蛋白的表达。

1.5 Western blotting

取肺组织放入液氮研磨, 加入 500 μ l 裂解液与磷酸酶抑制剂混合液 (100 : 1) 充分裂解。用聚氧基丙烯酸正丁酯试剂盒检测样品蛋白浓度。转膜后 Western blotting 封闭液封闭 30 min。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗孵育 2 h, 曝光显影检测蛋白质。依据刘梅梅等^[5]的方法计算条带与 β -actin 的平均光密度比值

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素或重复测量设计的方差分析, 进一步的两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺系数、MDA 和 SOD 含量比较

各组肺系数、MDA 和 SOD 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 模型组肺系数、MDA 较对照组升高 ($P < 0.05$), SOD 较对照组降低 ($P < 0.05$); 治疗组肺系数、MDA 较模型组降低 ($P < 0.05$), SOD 较模型组升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组静脉注射 AD 后呼吸频率比较

各组静脉注射 AD 后呼吸频率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的呼吸频率比较, 差异有统计学意义 ($F = 423.976$, $P = 0.000$); ②各组呼吸频率比较, 差异有统计学意义 ($F = 1229.138$, $P = 0.000$), 模型组家兔静脉注射 AD 后 10、20 及 30 min 的呼吸频率高于对照组和治疗组,

表 1 各组肺系数、MDA 和 SOD 含量比较 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺系数	MDA/ (nmol/mg)	SOD/ (u/ml)
对照组	4.9 \pm 0.9	0.9 \pm 0.1	8.6 \pm 1.3
模型组	11.5 \pm 1.4	3.1 \pm 0.3	4.5 \pm 0.6
治疗组	8.8 \pm 1.2	1.5 \pm 0.1	7.8 \pm 1.1
F 值	7.266	35.219	4.166
P 值	0.006	0.000	0.036

呼吸急促表浅; ③各组呼吸频率变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 213.900$, $P = 0.000$)。见表 2 和图 1。

表 2 各组静脉注射 AD 后不同时间呼吸频率比较 ($n = 6$, 次/min, $\bar{x} \pm s$)

组别	10 min	20 min	30 min
对照组	40.0 \pm 4.7	39.2 \pm 4.3	39.7 \pm 5.1
模型组	99.6 \pm 5.5	133.9 \pm 6.2	159.3 \pm 6.1
治疗组	82.0 \pm 3.3	119.0 \pm 4.2	112.6 \pm 4.9

2.3 人参茎叶总皂苷对各组 AD 所致肺水肿病理学变化的影响

对照组肺组织肺泡无萎陷, 无毛细血管扩张、充血及白细胞附壁, 肺泡和肺间质无炎症细胞浸润, 肺泡壁无增厚现象; 模型组见肺泡壁断裂, 肺泡隔明显增宽, 有尘细胞。治疗组肺组织上述改变明显减轻。C/EBP α 在细胞质和细胞核中均表达, 阳性染色呈现粗大棕黄色颗粒。对照组阳性细胞少。模型组与对照组比较, 阳性细胞表达增加。治疗组较模型组阳性细胞表达减少。见图 2、3。

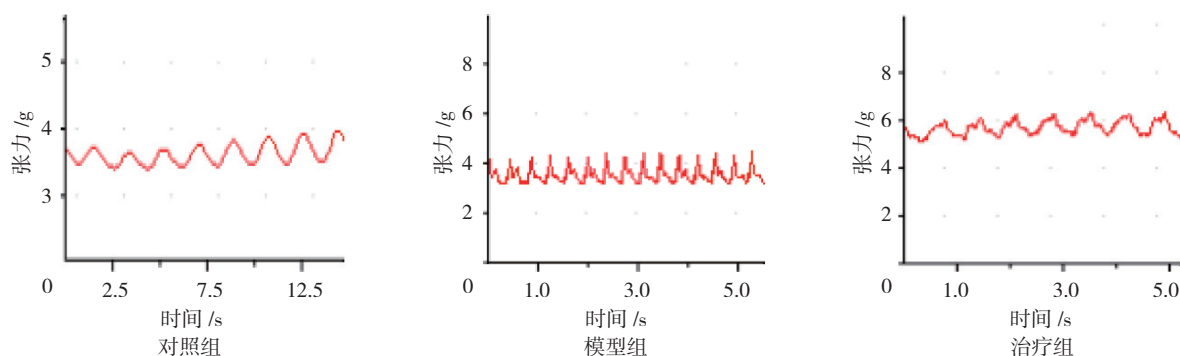


图 1 各组静脉注射 AD 30 min 后呼吸曲线变化

2.4 各组肺组织损伤评分比较

对照组、模型组和治疗组肺组织损伤评分分别为 (0.7 ± 0.1) 、 (4.3 ± 0.9) 和 (2.6 ± 0.6) 分, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=5.123, P=0.020$); 模型组较对照组升高 ($P<0.05$), 治疗组较模型组降低 ($P<0.05$)。

2.5 各组 mTOR 和 S6K1 蛋白表达率比较

对照组、模型组和治疗组 mTOR 蛋白表达

率分别为 $(3.05 \pm 0.98)\%$ 、 $(8.02 \pm 0.98)\%$ 和 $(4.36 \pm 1.00)\%$, 对照组、模型组和治疗组 S6K1 蛋白表达率分别为 $(3.03 \pm 0.96)\%$ 、 $(12.44 \pm 1.08)\%$ 和 $(5.05 \pm 0.99)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=6.904$ 和 $25.708, P=0.007$ 和 0.000), 模型组较对照组升高 ($P<0.05$), 治疗组较模型组降低 ($P<0.05$)。见图 4。

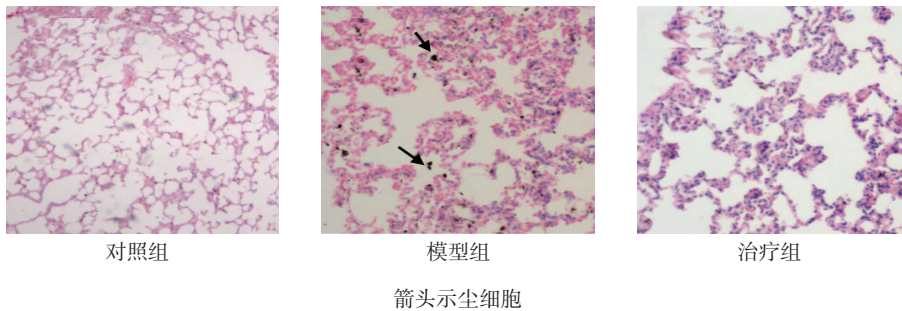


图 2 肺组织切片光镜图 (HE × 100)

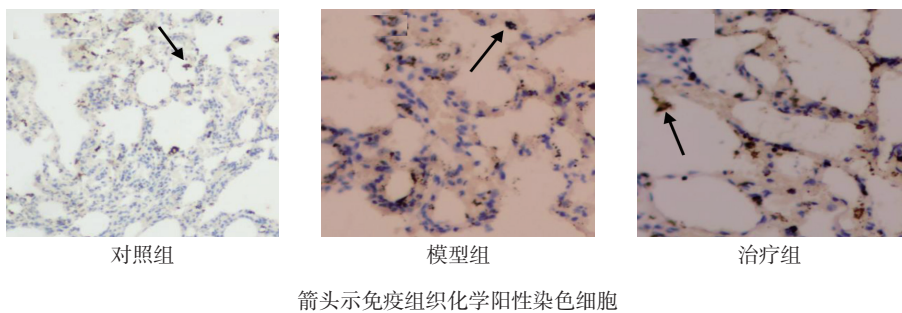


图 3 肺组织 CCAAT 增强子结合蛋白 α 的切片光镜图 ($\times 200$)

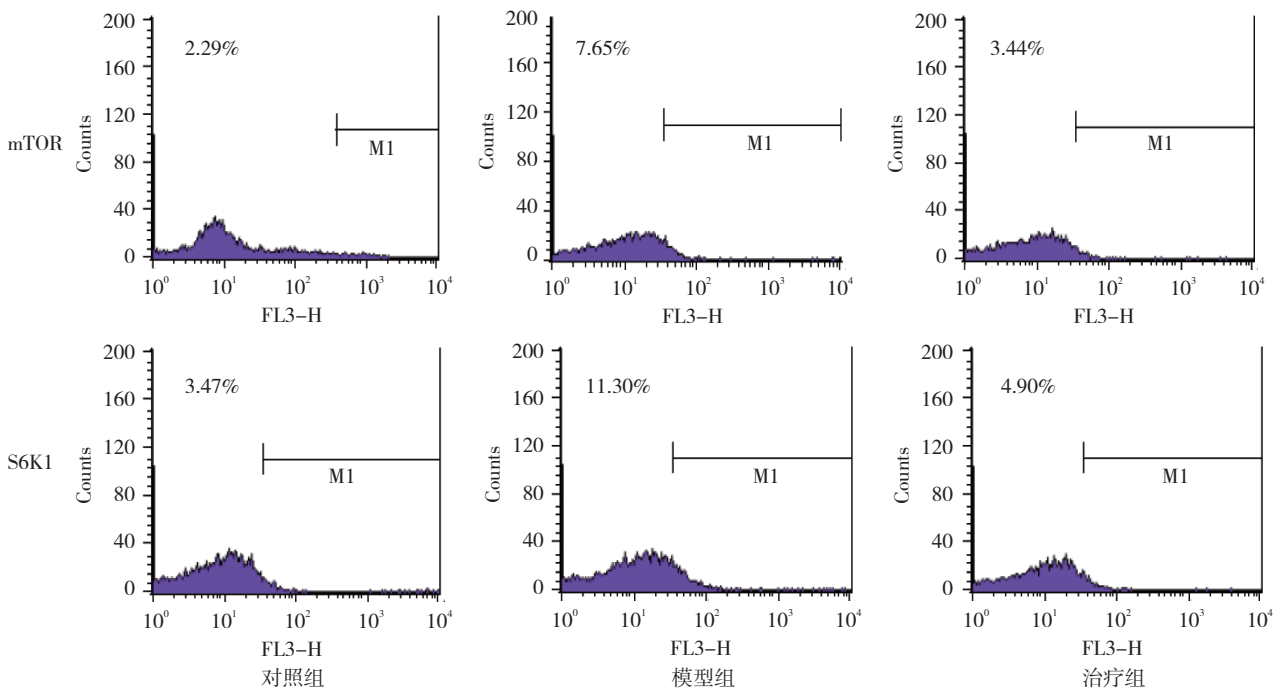


图 4 各组 mTOR 和 S6K1 蛋白的表达

2.6 各组 NLRP3 和 SirT1 蛋白相对表达量比较

对照组、模型组和治疗组 NLRP3 蛋白相对表达量分别为 (0.41 ± 1.01) 、 (0.83 ± 1.09) 和 (0.70 ± 0.98) , SirT1 蛋白相对表达量分别为 (0.51 ± 0.05) 、 (0.32 ± 0.02) 和 (0.55 ± 0.06) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=4.810$ 和 6.768 , $P=0.024$ 和 0.008), 模型组 NLRP3 蛋白相对表达量较对照组升高 ($P<0.05$), SirT1 蛋白相对表达量较对照组降低 ($P<0.05$), 治疗组 NLRP3 蛋白相对表达量较模型组降低 ($P<0.05$), SirT1 蛋白相对表达量较模型组升高 ($P<0.05$)。见图 5。

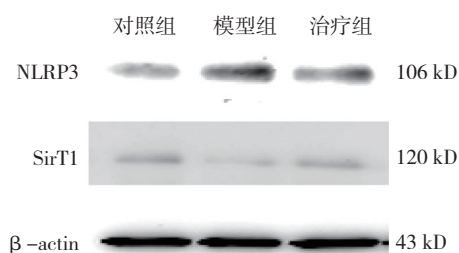


图 5 各组 NLRP3 和 SirT1 蛋白的表达

3 讨论

本实验复制 AD 致急性肺水肿家兔模型, 从肺系数变化、呼吸变化和组织学来探讨人参茎叶总皂苷对肺水肿的作用。本研究结果显示, 治疗组的肺系数较模型组减小, 家兔在静脉注射 AD 后 10、20 及 30 min 呼吸频率低于模型组, 在组织学方面也有改善作用, 表明人参茎叶总皂苷对家兔 AD 型肺水肿有一定治疗效果。同时, 本研究也考察了人参茎叶总皂苷对肺脏抗氧化的作用。人参茎叶总皂苷对 AD 所致的肺水肿具有保护作用, 其作用机制可能与其抑制氧化损伤有关。与文献[6-7]显示人参茎叶总皂苷抗氧化作用一致。

C/EBP α 是 CCAAT 增强子结合蛋白家族的重要成员, C/EBP α 对肺上皮细胞的发育和分化有重要作用^[8]。关于 C/EBP α 与肺相关疾病的研究更多是关于肺癌方面, 最近研究显示 C/EBP α 抑制肺腺癌细胞侵袭和迁移^[9]。本研究显示模型组 C/EBP α 表达增多, 而治疗组则显示 C/EBP α 减少, 因此笔者推测人参茎叶总皂苷是通过抑制 C/EBP α 的表达, 而降低急性肺损伤。

mTOR 可以协调许多合成代谢和分解过程, 也是调节细胞的增殖与分化及蛋白质合成关键信号中枢^[10]。有报道显示, 肺上皮中 mTOR 的活化促进脂多糖诱导的急性肺损伤^[11]。人参皂苷 Rh2 通过调节小

鼠 TLR4/PI3K/AKT/mTOR、Raf-1/MEK/Erk 和 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路, 改善脂多糖诱导的急性肺损伤^[12]。mTOR/p70S6K 信号通路与很多损伤研究有关。在体外氧化应激模型中, 柚皮素能降低细胞内氧自由基的积累, 提高细胞的存活率。其机制可能与激活 mTOR/p70S6K 信号通路、改善胰岛素有关^[13]。急性肺损伤病程中 mTOR 信号通路活化, 应用雷帕霉素可有效抑制 mTOR 信号通路过度活化, 并能部分缓解肺组织病理损伤程度^[14]。本研究提示人参茎叶总皂苷对 AD 所致家兔肺损伤有保护作用, 其机制可能与抑制 mTOR/S6K1 蛋白表达有关。

有学者报道 NLRP3 炎性蛋白肺损伤和肺组织炎症有关^[15-16]。SIRT1 抑制 NLRP3 炎症小体^[17]。另外, 人参皂苷对 NLRP3 炎性体激活有抑制作用^[18]。结合文献[16-18]与本研究结果提示, 人参茎叶总皂苷对 AD 所致家兔肺损伤有保护作用, 其机制可能与 SIRT1/NLRP3 蛋白表达有关。

综上所述, 本研究通过动物模型实验探讨人参茎叶总皂苷对急性肺损伤的作用及 C/EBP α 、mTOR 信号通路机制。结果显示, 人参茎叶总皂苷对 AD 急性肺损伤异常病理状态有改善作用, 改善肺组织氧化指标和凋亡, 可能与 C/EBP α 、mTOR 信号及 SIRT1/NLRP3 通路有关。

参 考 文 献:

- [1] HAN X, LI M, ZHAO Z, et al. Mechanisms underlying the cardio-protection of total ginsenosides against myocardial ischemia in rats in vivo and in vitro: Possible involvement of L-type Ca²⁺ channels, contractility and Ca²⁺ homeostasis[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(3): 240-248.
- [2] ZHOU P, XIE W, HE S, et al. Ginsenoside Rb1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis[J]. Cells, 2019, 8(3): DOI: 10.3390/cells8030204.
- [3] 陈盼盼, 罗敏, 杨露, 等. 人参茎叶总皂苷对肺纤维化小鼠肺组织中 MMP-2, MMP-9 蛋白表达的抑制作用[J]. 神经药理学报, 2017, 7(3): 58.
- [4] 王宝娟, 崔利锋, 李冬霞, 等. 苓甘五味姜辛汤对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠免疫细胞和炎性细胞因子的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(02): 220-224.
- [5] 刘梅梅, 王齐, 杨珺, 等. 甘草酸二铵脂质配位体抑制内毒素引起的急性肺损伤中炎性细胞浸润及细胞间连接蛋白的降解[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2017, 26(6): 546-553.
- [6] 刘佳, 张敬敬, 李明明, 等. 人参茎叶总皂苷对 D-半乳糖致衰老小鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(18): 5087-5089.

- [7] 罗敏, 舒磊, 李映莹, 等. 人参茎叶总皂苷抑制肺纤维化小鼠血清氧化水平的研究 [J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(3): 260-265.
- [8] CHEN Y D, LIU J Y, LU Y M, et al. Functional roles of C/EBP α and SUMO-modification in lung development[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1037-1046.
- [9] LU J, DU C, YAO J, et al. C/EBP α suppresses lung adenocarcinoma cell invasion and migration by inhibiting β -Catenin[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5): 1779-1788.
- [10] MOLINA L, YANG H, ADEBAYO M A O, et al. mTOR inhibition affects Yap1- β -catenin-induced hepatoblastoma growth and development[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(15): 1475-1490.
- [11] HU Y, LOU J, MAO Y Y, et al. Activation of MTOR in pulmonary epithelium promotes LPS-induced acute lung injury[J]. *Autophagy*, 2016, 12(12): 2286-2299.
- [12] HSIEH Y H, DENG J S, CHANG Y S, et al. Ginsenoside Rh2 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR, Raf-1/MEK/ERK, and Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways in mice[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): DOI: 10.3390/nu10091208.
- [13] 成建璋, 茶喆, 向辉, 等. 柚皮素通过激活 mTOR/p70S6K 信号通路减轻胰岛素抵抗并改善 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤 [D]. 重庆: 重庆医科大学学报, 2018: 5-10.
- [14] 叶苑, 李丽玮, 李志强. 雷帕霉素干预 TRALI 大鼠肺组织 mTOR 信号通路下游蛋白 p70s6k/p-p70s6k 表达与肺病理变化研究 [J]. 中国输血杂志, 2016, 29(03): 251-254.
- [15] 龚妍竹. 机械通气相关性肺损伤中 NLRP3 蛋白与线粒体功能的变化 [D]. 济南: 山东大学, 2017: 17-20.
- [16] 吕洲, 董文文, 江来. Nod 样受体蛋白 3 炎性体抑制剂格列苯脲对机械通气致小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2016, 37(9): 809-813.
- [17] LI Y X, YANG X F, HE Y H, et al. Negative regulation of NLRP3 inflammasome by SIRT1 in vascular endothelial cells[J]. *Immunobiology: Zeitschrift fur Immunitatsforschung*, 2017, 222(3): 552-561.
- [18] 马瑞, 田金华, 姜君, 等. 人参皂苷对 NLRP3 炎性体激活的抑制作用 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(5): 614-618.

(李科 编辑)