

人参皂甙 Rb1 对机械通气大鼠肺组织 NF- κ B 和 iNOs 表达的影响

单驾露 王良荣 叶玉柱 胡正杨

【摘要】目的 观察人参皂甙 Rb1 对机械通气肺损伤(VILI)大鼠炎症信号通路蛋白 NF- κ B 及诱导型一氧化氮合酶(iNOs)的影响。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组(C 组)、VILI 组和人参皂甙 Rb1 预处理组(Rb1 组),每组 10 只。后两组大鼠潮气量 40ml/kg 机械通气 4h 建立大鼠 VILI 模型,Rb1 组在通气前 30min 尾静脉注射 40mg/kg 人参皂甙 Rb1,其他两组予等容量 0.9%氯化钠溶液。观察各组大鼠肺组织病理改变,肺组织湿/干重比(W/D),收集肺泡灌洗液(BALF),采用 ELISA 法测定 BALF 中 TNF- α 、IL-6 水平,硝酸盐还原酶法检测一氧化氮(NO)水平;RT-PCR 测定肺组织中 iNOs mRNA 的表达水平,Western blot 检测肺组织的 NF- κ B 蛋白水平。**结果** 与 C 组相比,VILI 组肺组织病理损伤严重,肺组织 W/D 显著增加,BALF 中 TNF- α 、IL-6、NO 水平增加,iNOs mRNA 表达增加,NF- κ B 蛋白表达上调;与 VILI 组比较,Rb1 组肺组织病理损伤程度减轻,肺组织 W/D 降低,BALF 中 TNF- α 、IL-6、NO 水平降低,iNOs mRNA 表达降低,NF- κ B 蛋白表达下调。**结论** 人参皂甙 Rb1 可下调机械通气大鼠 NF- κ B 及 iNOs 活性,降低促炎因子 TNF- α 、IL-6、NO 释放,减轻肺损伤。

【关键词】 人参皂甙 Rb1 机械通气肺损伤 细胞因子 NF- κ B 诱导型一氧化合酶

Effects of ginsenoside Rb1 on expression of NF- κ B and iNOs in lung tissue of rats with ventilator-induced lung injury SHAN Yuanlu, WANG Liangrong, YE Yuzhu, et al. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of ginsenoside Rb1 on expression of NF- κ B and iNOs in lung tissue of rats with ventilator-induced lung injury. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (C group), ventilator-induced lung injury group (VILI group) and ginsenoside Rb1 pretreatment group (Rb1 group). The lung injury was induced by mechanical ventilation with a high tidal volume of 40 ml/kg for 4 h. The Rb1 group was given 40 mg/kg ginsenoside Rb1 by tail vein injection 30 min before mechanical ventilation. The other two groups were given equal volume of normal saline. After 4h of mechanical ventilation, the pathological changes of lung tissue and lung wet/dry weight ratio (W/D) were observed. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected, TNF- α and IL-6 in BALF were determined by ELISA; the concentration of nitric oxide (NO) was measured by nitrate reductase method. The expressions of iNOs mRNA and NF- κ B protein in lung tissue were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with group C, the pathological damage of lung tissue in VILI group was severe, the W/D of lung was increased significantly, the concentrations of TNF- α , IL-6 and NO in BALF were increased, the expression of iNOs mRNA and NF- κ B protein in lung tissue was increased. Compared with VILI group, the pathological damage of lung tissue was attenuated in Rb1 group, the W/D of lung was decreased, the concentrations of TNF- α , IL-6 and NO in BALF were decreased, the expression of iNOs mRNA and NF- κ B protein in lung tissue was also decreased. **Conclusion** Ginsenoside Rb1 can down-regulate the expression of NF- κ B and iNOs in the inflammatory pathway, decrease the concentrations of pro-inflammatory factors TNF- α , IL-6 and NO, and attenuate the lung injury in rats with ventilator-induced lung injury.

【Key words】 Ginsenoside Rb1 Ventilator-induced lung injury Cytokines NF-kappa B Inducible nitric oxide synthase

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.6.2018-2432

作者单位:325035 温州医科大学附属第一医院麻醉科

通信作者:胡正杨,E-mail:huzhengyang@163.com

机械通气被广泛应用于临床,用于重症患者和手术患者的生命支持,但机械通气也会诱发加重肺损伤,即机械通气肺损伤(ventilator-induced lung injury, VILI)。研究表明,不合理的机械通气尤其是大潮气量机械通气引起肺泡过度膨胀,造成肺组织气压伤和容积伤,破坏肺屏障功能,最终致炎症介质的释放引起生物伤^[1-2]。人参皂甙 Rb1 是人参中有效单体成分之一,具有多种药理作用,包括抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用^[3]。本研究建立大鼠 VILI 模型,拟观察人参皂甙 Rb1 对大潮气量机械通气大鼠肺组织炎症和相关通路蛋白的影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 30 只,体重 300~350g[温州医科大学实验动物中心提供,许可证编号:SYXK(浙)2010-0150],动物实验前禁食 12h,自由饮水。采用随机数字法分为假手术组(C 组)、VILI 组和人参皂甙 Rb1 预处理组(Rb1 组),每组 10 只。

1.2 主要试剂及仪器 人参皂甙 Rb1(上海源叶生物科技有限公司);TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。Trizol 提取液(美国 Life technologies 公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(美国 Fermentas Life Science 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物技术研究所);兔抗大鼠 NF- κ B 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 IgG,细胞质内参 GAPDH(英国 Abcam 公司);HX-300 小动物呼吸机(成都泰盟有限公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);垂直电泳系统(美国 BIO-RAD 公司);显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 VILI 模型的建立 3 组大鼠予腹腔注射 20%乌拉坦 8ml/kg 麻醉,暴露左股静脉并置管用于输液和给药,暴露气管,切开气管。VILI 组及 Rb1 组大鼠静脉注射维库溴铵(浙江仙居药业)6mg/kg 阻断自主呼吸,并予气管内插入自制气管导管,接 HX-300 小动物呼吸机进行机械通气 4h,建立 VILI 模型。通气参数设定:潮气量 40ml/kg,呼吸频率 60 次/min,吸呼比 2:3。Rb1 组于机械通气前 30min 静脉注射人参皂甙 Rb1 40mg/kg,C 组和 VILI 组给予等容量 0.9%氯化钠溶液。C 组气管切开后保留自主呼吸,未予机械通气。

1.4 标本采集及指标检测 4h 后 3 组大鼠予颈动脉放血处死,迅速取出心脏和肺,结扎右肺门,4℃0.9%氯化钠溶液左肺支气管肺泡灌洗 3 次,收集肺泡灌洗液(BALF)5ml,并在 4℃下以 2 000r/min 离心 10min,取上清液-70℃冻存待测,采用 ELISA 法测定 BALF 中 TNF- α 、

IL-6 水平,硝酸盐还原酶法检测 NO 水平。

1.5 肺组织湿/干重比(W/D)测定 取右肺上叶,用滤纸吸干肺组织表面水分称重后为湿重(W),置于 70℃恒温电热鼓风干燥箱 72h 至恒重再称重为干重(D),计算肺组织 W/D,以反映肺水肿程度。

1.6 肺组织病理变化 右肺中叶于 10%多聚甲醛中固定,常规脱水,包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肺组织病理学变化,主要观察有无肺水肿、肺泡与肺间质炎症、肺泡及间质出血,肺泡隔增厚程度及透明膜的形成。

1.7 肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的检测 剩余左肺组织取 50mg 置于研钵加液氮研磨,用 Trizol 萃取总 RNA,进行 RT-PCR 对扩增产物进行半定量分析,iNOS 引物序列正链 5'-TAG AGG AAC ATC TGG CCA GG-3'反链 5'-TGG CCG ACC TGA TGT TGC CA-3'扩增产物大小为 255bp,内参 GAPDH 引物序列正链 5' AAC CCA TCA CCA TAT TCC AGG AGC-3',反链 5' CAC AGT CTT CTG AGT GGC AGT GAT-3',扩增产物大小 350bp。RT-PCR 循环参数设置:预变性 95℃,5min;变性 95℃,30s;退火 57℃,30s;延伸 72℃ 30s;循环 33 次,1.5%琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶图像分析系统进行分析,以目的基因扩增产物灰度值与内参 GAPDH 扩增产物灰度值的比值来表示基因表达水平。

1.8 肺组织 NF- κ B 的测定 采用 Western blot 检测。依照试剂盒说明书提取胞核蛋白,采用 BCA 法测定浓度。蛋白在 10% SDS-PAGE 中室温电泳分离,300mA、70min 湿转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2h,加一抗 NF- κ B(稀释度 1:2000)抗体和 GAPDH(稀释度 1:500)抗体,4℃孵育过夜,加入生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1h,ECL 化学发光法进行检测,胶片扫描拍摄图像并进行半定量分析,采用 Image J 测定目的条带的吸光度值,并以目的蛋白和相应内参的吸光度比值表示目的条带相对强度。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单向方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐者采用 Dunnett'*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.13 组大鼠肺 BALF 中 TNF- α 、IL-6、NO 水平及肺组织 W/D 的比较 与 C 组相比,VILI 组和 Rb1 组 BLAF 中 TNF- α 、IL-6、NO 水平均升高(均 $P < 0.05$);与 VILI 组比较,Rb1 组 TNF- α 、IL-6、NO 水平均下降(均 $P < 0.05$)。与 C 组比较,VILI 组和 Rb1 组肺组织 W/D 比值升高

($P<0.05$); 与 VILI 组比较, Rb1 组肺组织 W/D 比值降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6、NO 水平及肺组织 W/D 的比较

组别	n	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	NO (μ mol/L)	W/D
C 组	10	18.5 $\pm$ 4.7	40.4 $\pm$ 4.8	7.2 $\pm$ 1.1	3.82 $\pm$ 0.40
VILI 组	10	106.1 $\pm$ 14.4*	143.1 $\pm$ 13.4*	49.4 $\pm$ 8.9*	8.54 $\pm$ 1.05*
Rb1 组	10	68.4 $\pm$ 12.1* Δ	96.6 $\pm$ 14.9* Δ	27.3 $\pm$ 4.6* Δ	6.43 $\pm$ 1.52 Δ

注: 与 C 组比较, * $P<0.05$; 与 VILI 组比较, $\Delta P<0.05$

2.2 3 组大鼠肺组织光镜下显微结构改变 光镜下 C 组无明显肺损伤, 肺部无水肿, 肺泡隔均一、结构清晰(图 1a, 见插页), VILI 组可见明显的肺间质及肺泡内渗出水肿, 肺间质内可见大量炎性细胞浸润, 肺泡隔增宽, 局灶的肺泡塌陷和肺不张, 部分出现肺大泡(图 1b, 见插页); Rb1 肺组织损伤程度较 VILI 组缓解, 肺泡隔轻度增宽, 炎性细胞浸润程度较 VILI 组明显减轻(图 1c, 见插页)。

2.3 3 组大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达情况 与 C 组相比, VILI 组和 Rb1 组肺组织 iNOS mRNA 表达增高($P<0.05$); 与 VILI 组比较, Rb1 组肺组织 iNOS mRNA 表达降低($P<0.05$)。见图 2。

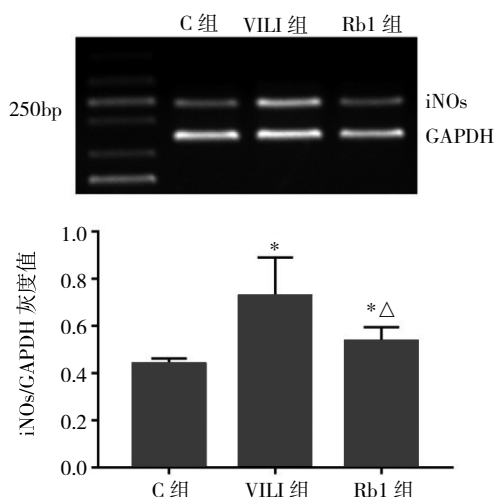


图 2 3 组大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达 (与 C 组比较, * $P<0.05$; 与 VILI 组比较, $\Delta P<0.05$)

2.4 3 组大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达情况 与 C 组相比, VILI 组和 Rb1 组肺组织 NF- κ B 蛋白表达增加, 与 VILI 组比较, Rb1 组肺组织 NF- κ B 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

本次研究参照前期研究采用 40ml/kg 大潮气量机

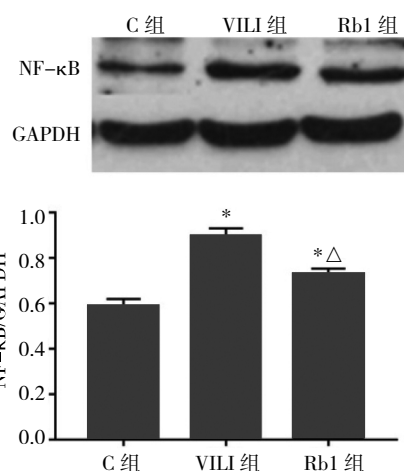


图 3 3 组大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达 (与 C 组比较, * $P<0.05$; 与 VILI 组比较, $\Delta P<0.05$)

械通气 4h 建立大鼠 VILI 模型^[4], 肺泡毛细血管通透性增加, 炎性细胞浸润, 肺组织含水量显著增加, 证实 VILI 模型制备成功。而人参皂甙 Rb1 处理后机械通气大鼠肺组织病理损伤明显缓解, 炎症因子释放减少, 肺部微循环通透性损伤和肺水肿减轻。

研究表明, 机械刺激(牵拉、剪切力)作用肺组织造成机械损伤, 通过各种信号传导途径, 触发促炎细胞因子释放和中性粒细胞的募集, 形成瀑布级联效应, 导致肺部炎症甚至全身炎症反应, 即“生物伤”^[5]。NF- κ B 作为炎症介质基因转录的核转录因子, 在炎症反应中起关键作用, 在氧化应激、细胞因子、脂多糖等多种刺激下, NF- κ B 的激活和 I κ B- α 的磷酸化, 促使 NF- κ B 从胞质转移至胞核, 调控多种促炎因子的转录, 炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)、细胞黏附分子等表达增加, 同时进一步刺激 NF- κ B 的活化^[6]。既往研究表明 NF- κ B 信号通路的激活在 VILI 的发病中起重要作用^[7-8], Held 等^[9]研究通过离体肺伤害性机械通气证实过度通气可刺激细胞因子和趋化因子产生诱导炎症反应, 导致 NF- κ B 活化。本研究也证明 VILI 大鼠肺组织 NF- κ B 活性较对照组明显增加, 炎症介质 TNF- α 、IL-6 表达也显著增加, 表明机械通气过程中 NF- κ B 活化可能参与机械通气后肺组织中致炎细胞因子合成释放的调控过程。人参皂甙 Rb1 具有抗炎、抗细胞凋亡等药理作用。研究证明, Rb1 通过抑制 NF- κ B 的活性, 改善肠缺血再灌注诱导的肝损伤^[10]。同样研究证实, 人参皂甙 Rb1 通过使炎症反应活性减弱和抑制 NF- κ B 易位可显著改善 TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤^[11]。本研究也发现 Rb1 预处理后, VILI 大鼠的 NF- κ B 活性降低, 提示人参皂甙 Rb1 可能通过降低 NF- κ B 活性, 降低炎症因子的表达,

减轻 VILI。

NO 作为一种重要的炎症介质,参与多种疾病发病过程[哮喘,急性肺损伤(ALI)和循环休克],主要由一氧化氮合酶(NOS)催化产生。在病理状态下,由 iNO 催化产生大量的 NO,不仅直接损伤组织细胞,还易产生氧自由基,并生成过氧亚硝酸阴离子(ONOO⁻),导致硝化应激和组织损伤。Peng 等^[12]研究发现小鼠大潮气量机械通气后 iNOS 表达显著增加,iNOS 的表达改变及硝化应激的激活与肺毛细血管通透性增加相关,同时在 iNOS 基因敲除小鼠机械通气中,肺损伤加重,硝化应激和肺毛细血管通透性显著增加,更证明了 iNOS 在 VILI 中的直接作用。本研究结果表明大潮气量长时间通气后,大鼠肺组织 iNOS 转录活跃,NO 表达增加,与上述研究结果一致。人参皂甙 Rb1 干预后,大鼠 iNOS 表达显著降低。有研究表明 NF- κ B 的激活不仅可增加趋化因子和细胞因子,同样可增加 iNOS 的表达^[13]。由此推断,在机械通气肺损伤大鼠,人参皂甙 Rb1 也可能通过降低 NF- κ B 的活性,减少 iNOS 的表达,抑制促炎因子的释放。

综上所述,人参皂甙 Rb1 可降低 NF- κ B 和 iNOS 的活性,减少炎性介质释放,减轻机械通气诱导肺损伤。

4 参考文献

- [1] Kneyber MC, Zhang H, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury. Similarity and differences between children and adults[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(3): 258–265. DOI: 10.1164/rccm.201401-0168CP.
- [2] Ngiam N, Kavanagh BP. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation[J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18(1): 16–22. DOI: 10.1097/MCC.0b013e32834e7d00.
- [3] Park EK, Shin YW, Lee HU, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(4): 652–656. DOI: 10.1248/bpb.28.652.
- [4] 单鸳鸯,金立达,王良荣,等.环氧合酶-2 抑制剂对大鼠机械通气所致肺损伤细胞因子及氧化应激的影响[J].实用医学杂志,2013,29(16): 2616–2618.
- [5] Rocco PR, Dos SC, Pelosi P. Pathophysiology of ventilator-associated lung injury[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2012, 25(2): 123–130. DOI: 10.1097/ACO.0b013e32834f8c7f.
- [6] Vallabhapurapu Sivakumar, Karin Michael. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 693–733. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- [7] Dos SCC, Slutsky AS. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective[J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 89(4): 1645–1655. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.4.1645.
- [8] Shu Yu-Sheng, Tao Wei, Miao Qian-Bing, et al. Improvement of ventilation-induced lung injury in a rodent model by inhibition of inhibitory κ B kinase[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 76(6): 1417–1424. DOI: 10.1097/TA.0000000000000229.
- [9] Held H D, Boettcher S, Hamann L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1): 711–716. DOI: 10.1164/ajrccm.163.3.2003001.
- [10] Wang Jin, Qiao Lifeng, Li Yongsheng, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced liver injury by inhibiting NF- κ B activation[J]. Exp Mol Med, 2008, 40(6): 686–698. DOI: 10.3858/emmm.2008.40.6.686.
- [11] Zhou Ping, Lu Shan, Luo Yun, et al. Attenuation of TNF- α Induced Inflammatory Injury in Endothelial Cells by Ginsenoside Rb1 via Inhibiting NF- κ B, JNK and p38 Signaling Pathways[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 464. DOI: 10.3389/fphar.2017.00464.
- [12] Peng Xinqi, Abdulnour Raja-Elie E, Sammani Saad, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(4): 470–479. DOI: 10.1164/rccm.200411-1547OC.
- [13] Hatano E, Bennett B L, Manning AM, et al. NF- κ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF- α - and Fas-mediated apoptosis[J]. Gastroenterology, 2001, 120: 1251–1262. DOI: 10.1053/gast.2001.23239.

(收稿日期:2018-09-26)

(本文编辑:严玮雯)