

人参皂苷 Rg1 对大鼠海水淹溺性肺损伤的保护作用及其机制

田 冶¹, 葛帅娜¹, 李 军¹, 陶天柱²

【摘要】 目的 探讨人参皂苷 Rg1 对海水淹溺性肺损伤的保护作用及其机制。**方法** 128 只雄性 SD 大鼠随机均分为 4 组:空白对照组(C 组)、生理盐水组(S 组)、20 mg/kg 低剂量人参皂苷 Rg1 组(L 组)、100 mg/kg 高剂量人参皂苷 Rg1 组(H 组)。L 组和 H 组分别经尾静脉注射人参皂苷 20 或 100 mg/kg, S 组尾静脉注射等容的生理盐水, 给药 2 h 后建立海水淹溺性肺损伤模型。分别于吸入海水前(基础值 T₀)、吸入海水后 30 min(T₁)、1 h(T₂)、2 h(T₃) 和 4 h(T₄) 各时间点检测动脉血 PaO₂ 和 PaCO₂ 的动态变化;于建模后 2 h 和 4 h 取出肺组织和外周血标本,检测肺湿干重比(W/D)、肺泡灌洗液蛋白定量(BALF)、超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)和细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度,取建模后 4 h 的右肺下叶组织行 HE 病理检查。**结果** T₀ 时 4 组的动脉血 PaO₂、PaCO₂ 差异均无统计学意义。T₁~T₄ 时 S 和 L 组 PaO₂ 明显低于 H 组($P<0.05$),S 和 L 组 PaCO₂ 明显高于 H 组($P<0.05$)。T₃ 和 T₄ 时,S、L 和 H 组肺组织 W/D 比值均明显高于 C 组($P<0.05$),H 组肺组织 W/D 明显低于 S 组和 L 组($P<0.05$)。H 组 MDA 浓度和 MPO 活性明显低于 S 组和 L 组($P<0.05$),H 组 SOD 活性明显高于 S 组和 L 组($P<0.05$)。H 组血清中炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平明显低于 S 组和 L 组。HE 病理染色显示 H 组肺泡塌陷、水肿及炎性细胞浸润较 S 组明显减轻。**结论** 预防性使用人参皂苷 Rg1 (100 mg/kg)能显著减轻海水淹溺导致的早期(4 h 内)肺损伤,其保护机制与减轻肺内的炎性反应和氧化应激相关。

【关键词】 人参皂苷 Rg1;海水淹溺;肺损伤;氧化应激

【中国图书分类号】 R563

Protective effects of ginsenoside Rg1 on sea water drowning induced lung injury in rats

TIAN Ye¹, GE Shuaina¹, LI Jun¹, and TAO Tianzhu². 1. Department of Anesthesiology, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China; 2. Department of Anesthesiology, Air Force Medical Center, Beijing 100142, China

【Abstract】 Objective To determine the protective effects and potential mechanisms of ginsenoside Rg 1 on lung injury induced by sea water drowning. **Methods** One hundred and twenty-eight male SD rats were randomly divided into four groups: the control group (group C), sea water + saline group (group S), sea water group + 20 mg/kg Rg1 (group L) and sea water group + 100 mg/kg Rg1 (group H). Rats were intravenously injected with different doses of Rg 1 or saline before a standard model of sea water drowning was established in group S, L and H. The arterial PaO₂, PaCO₂, wet to dry weight ratio (W/D), protein concentrations of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), MDA, SOD and MPO activity, cytokines expressions and histological changes were measured at the following time points as designated: before drowning (T₀) and 30 min (T₁), 1 h (T₂), 2 h (T₃) and 4 h (T₄) after drowning. **Results** PaO₂ at T₁, T₂, T₃ and T₄ in group S and L was significantly lower than in group H ($P<0.05$), but PaCO₂ was significantly higher ($P<0.05$). No significant difference was observed between group S and group L. The W/D ratio, BALF protein concentration, MDA and MPO activity were significantly higher in group S and L than in group H at T₃ and T₄ ($P<0.05$). The activity of SOD in group S and L was significantly lower than in group H ($P<0.05$). Compared with group S, the expressions of such cytokines as TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly decreased. HE staining showed severe alveolar rupture, edema, and inflammatory cell infiltration in group S. **Conclusions** Pretreatment with Rg1 can effectively protect rats from sea water drowning induced lung injury in the early stage (within 4 hours). The underlying mechanism is possibly associated with the suppression of inflammatory responses and oxidative stress.

【Key words】 ginsenoside Rg1; sea water drowning; lung injury; oxidative stress

全世界每年因淹溺死亡的人数达 40 万以上,因

海水淹溺而死亡的人数居意外死亡人数的第三位^[1]。人体吸入海水后,可迅速导致剧烈的肺部炎症反应,由此产生海水吸入性肺损伤(seawater induced acute lung injury, SW-ALI),其病情危重,进展快,病死率高^[2]。尽管器官保护治疗技术取得不断进步,但目前临床上对 SW-ALI 的救治仍然缺乏有

基金项目:解放军总医院第六医学中心创新培育基金 CXPY201523

作者简介:田 冶,硕士研究生,主治医师。

作者单位:1. 100048 北京,解放军总医院第六医学中心麻醉科;

2. 100142 北京,空军特色医学中心麻醉科

通讯作者:陶天柱, E-mail: ttz887@126.com

针对性的有效措施,其死亡率仍居高不下^[3]。人参皂苷 Rg1 是从人参中提取的一种主要有效成分,在多种炎症疾病中发挥抗炎、抗氧化、调节细胞凋亡等保护作用^[4]。本研究以大鼠建立海水淹溺性肺损伤模型,通过呼吸功能、氧化应激和炎症指标的测定,探讨人参皂苷 Rg1 对海水淹溺性肺损伤的保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料 健康 6 周龄雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 240 g(解放军总医院第六医学中心实验动物中心)。实验海水(海南三亚,东经 109°,北纬 18°) Na⁺ 310 mmol/L, K⁺ 7.1 mmol/L, Mg²⁺ 9.16 mmol/L, Ca²⁺ 9.0 mmol/L, Cl⁻ 365 mmol/L, pH 8.2) Bradford 试剂盒和 MPO 试剂盒(南京建成),ELISA 试剂盒(美国 R&D)。

1.2 动物分组和动物模型制备 128 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为 4 组,每组 32 只:空白对照组(C 组)、生理盐水对照组(S 组)、低剂量人参皂苷 Rg1 (20 mg/kg) 治疗组(L 组)、高剂量人参皂苷 Rg1 (100 mg/kg) 治疗组(H 组)。吸入海水前 2 h, L 组和 H 组经尾静脉注射人参皂苷 Rg1 (20 mg/kg 或 100 mg/kg) 200 μl, S 组注射等容生理盐水 200 μl。实验大鼠禁食水 12 h, 采用腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,仰卧位固定。颈前区暴露气管后切开,插入气管导管,分离股动脉插入连接三通的套管针以备取血。以 4 ml/kg 剂量在气管内滴注海水, 4 min 内完成。灌注后大鼠即刻出现呼吸困难,口唇发绀,经气管插管喷出粉红色泡沫样液体,双肺满布湿啰音,动脉血气 PaO₂ < 60 mmHg 提示造模成功。80 只大鼠(每组 20 只)用于检测血气、生化及病理等指标,48 只(每组 12 只)大鼠单独用于观察生存期。

1.3 观察指标 分别于吸入海水前(T₀),吸入海水后 30 min(T₁)、1 h(T₂)、2 h(T₃)和 4 h(T₄)抽取股动脉血 0.3 ml 检测动脉氧分压(PaO₂)、动脉二氧化碳分压(PaCO₂);肺泡灌洗液离心后取上清,蛋白测定按照 Bradford 试剂盒严格操作,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定按照试剂盒说明操作,比色法计算结果;吸入海水后 2 h 和 4 h 每组各取 5 只大鼠,心脏采血处死后取出肺组织标本,用 ELISA 试剂盒测定血浆中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量和左肺上叶肺组织匀浆 MDA、SOD 浓度;左肺下叶经甲醛溶液固定 48 h 后,石蜡包埋后切片,苏木精-

伊红(HE)染色后在显微镜下检查;取右肺称重后为湿重,置于 70 ℃ 电热恒温干燥箱中烤 48 h, 称重为干重,干重与湿重之比为肺干湿重比(W/D);记录各组大鼠 4 h 的存活率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间均数比较采用单因素方差分析,同组不同时间点的比较采用重复测量方差分析,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 海水淹溺大鼠氧合指标 与 C 组相比,海水淹溺大鼠在建模后 30 min 时 PaO₂ 显著降低, PaCO₂ 显著升高,随后 PaO₂ 轻度升高且 PaCO₂ 有所降低。T₀ 时 3 组的动脉血 PaO₂、PaCO₂ 差异均无统计学意义。T₁ ~ T₄ 时 S 和 L 组 PaO₂ 明显低于 H 组($P < 0.05$), S 和 L 组 PaCO₂ 明显高于 H 组($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 海水淹溺组和对照组大鼠不同时间 PaO ₂ 和 PCO ₂ 的变化 ($\bar{x} \pm s$; $n = 5$; mmHg)				
指标	C 组	S 组	L 组	H 组
PaO ₂				
0.5 h	102.0 ± 7.1	56.5 ± 5.6	60.2 ± 8.9	69.3 ± 12.8 ^{①②③}
1 h	104.0 ± 5.9	64.8 ± 6.8	70.3 ± 11.8	80.2 ± 16.5 ^{①②③}
2 h	107.0 ± 8.2	70.5 ± 6.1	74.9 ± 9.4	85.4 ± 14.2 ^{①②③}
4 h	105.0 ± 6.3	72.2 ± 7.5	78.8 ± 10.7	92.5 ± 13.3 ^{①②③}
PCO ₂				
0.5 h	35.2 ± 3.8	45.1 ± 4.6	44.1 ± 3.8	40.2 ± 3.6 ^{①②③}
1 h	36.4 ± 2.9	43.8 ± 4.2	42.6 ± 3.6	39.1 ± 2.9 ^{①②③}
2 h	34.5 ± 3.6	41.2 ± 3.5	40.5 ± 4.1	38.5 ± 3.3 ^{①②③}
4 h	35.1 ± 4.4	40.1 ± 4.2	39.3 ± 3.8	38.0 ± 2.2 ^{①②③}

注: C 组. 空白对照组; S 组. 肺损伤 + 生理盐水组; L 组. 肺损伤 + Rg1 (20 mg/kg); H 组. 肺损伤 + Rg1 (100 mg/kg); 与 C 组比较, ① $P < 0.05$; 与 S 组比较, ② $P < 0.05$; 与 L 组比较, ③ $P < 0.05$

2.2 肺泡灌洗液蛋白含量和肺组织湿干重比 与对照组相比,海水淹溺组大鼠的肺泡灌洗液蛋白定量(BALF)和肺组织湿干重比明显增高,2 h 和 4 h 时, H 组上述指标均明显低于 S 组和 L 组, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05 , 表 2)。

2.3 氧化应激反应和外周血炎症因子 与对照组相比,海水淹溺组大鼠肺组织中 MDA 和 MPO 浓度显著升高, SOD 活性则明显下降, 血清中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平表达显著升高, 提示肺组织内氧化应激损伤和全身的炎症反应激活。与 S 组相比, H 组肺组织中 MDA、MPO 和细胞因子的表达水

平均明显降低,而 SOD 的活性显著升高(P 均 < 0.05 ,表 2)。

表 2 各组大鼠肺泡灌洗液蛋白定量、湿/干比、氧化应激和外周血炎症因子指标的比较 ($\bar{x} \pm s; n = 5$)

指标	C 组	S 组	L 组	H 组
BALF($\mu\text{g/ml}$)				
2 h	20.3 \pm 5.1	418.2 \pm 49.4 ^①	363.7 \pm 47.8 ^①	212.6 \pm 35.8 ^{①②③}
4 h	22.2 \pm 5.9	52.4 \pm 68.8 ^①	376.5 \pm 51.6 ^①	245.3 \pm 37.6 ^{①②③}
MDA(mmol/ng)				
2 h	1.2 \pm 0.2	4.7 \pm 0.6 ^①	4.4 \pm 0.4 ^①	2.7 \pm 0.2 ^{①②③}
4 h	1.4 \pm 0.3	5.2 \pm 0.5 ^①	4.8 \pm 0.7 ^①	3.0 \pm 0.3 ^{①②③}
SOD(U/mg)				
2 h	6.2 \pm 0.8	4.1 \pm 0.6 ^①	4.3 \pm 0.6 ^①	5.2 \pm 0.7 ^{①②③}
4 h	6.4 \pm 0.9	3.8 \pm 0.5 ^①	3.9 \pm 0.5 ^①	5.0 \pm 0.8 ^{①②③}
MPO(U/l)				
2 h	9.5 \pm 1.8	39.5 \pm 4.4 ^①	36.6 \pm 4.8 ^①	25.0 \pm 4.6 ^{①②③}
4 h	10.1 \pm 2.1	45.7 \pm 6.7 ^①	42.3 \pm 5.4 ^①	28.0 \pm 5.1 ^{①②③}
W/D				
2 h	4.6 \pm 0.3	7.8 \pm 0.8 ^①	7.5 \pm 1.1 ^①	6.2 \pm 0.8 ^{①②③}
4 h	4.5 \pm 0.2	8.8 \pm 0.9 ^①	8.4 \pm 1.2 ^①	6.6 \pm 0.9 ^{①②③}
TNF- α (pg/ml)				
2 h	15.1 \pm 4.5	58.4 \pm 9.2 ^①	49.3 \pm 7.4 ^①	38.4 \pm 7.2 ^{①②③}
4 h	17.3 \pm 3.8	79.9 \pm 11.8 ^①	72.7 \pm 11.5 ^①	49.7 \pm 8.4 ^{①②③}
IL-1 β (pg/ml)				
2 h	22.3 \pm 4.5	107.9 \pm 18.1 ^①	96.2 \pm 13.6 ^①	80.5 \pm 10.6 ^{①②③}
4 h	24.6 \pm 4.1	134.4 \pm 16.3 ^①	120.1 \pm 14.9 ^①	88.9 \pm 8.2 ^{①②③}
IL-6(pg/ml)				
2 h	12.2 \pm 2.8	25.5 \pm 4.4 ^①	22.6 \pm 2.9 ^①	16.8 \pm 1.5 ^{①②③}
4 h	15.4 \pm 3.2	35.7 \pm 3.5 ^①	27.9 \pm 3.2 ^①	19.2 \pm 2.2 ^{①②③}

注:W/D. 肺湿干重比;BALF. 肺泡灌洗液蛋白定量;SOD. 超氧化物歧化酶;MPO. 髓过氧化物酶;MDA. 丙二醛;TNF- α . 肿瘤坏死因子 α ;IL-1 β . 白细胞介素 1 β ;IL-6. 白细胞介素 6;C 组. 空白对照组;S 组. 肺损伤 + 生理盐水组;L 组. 肺损伤 + Rg1 (20 mg/kg);H 组. 肺损伤 + Rg1 (100 mg/kg);与 C 组比较,① $P < 0.05$;与 S 组比较,② $P < 0.05$;与 L 组比较,③ $P < 0.05$

2.4 大鼠肺组织病理 吸入海水 4 h 后不同组大鼠肺组织病理切片,可见 S 组和 L 组肺间质水肿、出血,肺泡塌陷,并有大量炎性细胞浸润。H 组肺组织结构尚清晰,渗出明显减少,炎性浸润也较前两组有明显减轻(图 1)。

2.5 大鼠生存期 C 组、S 组、L 组和 H 组分别死亡 0、9、7、3 只,死亡率依次为 0、75.0%、58.3% 和 25.0% ($n = 12$ 只/组)。与 S 组相比,H 组大鼠死亡率明显降低($P < 0.05$),L 组与 S 组相比无统计学差异。

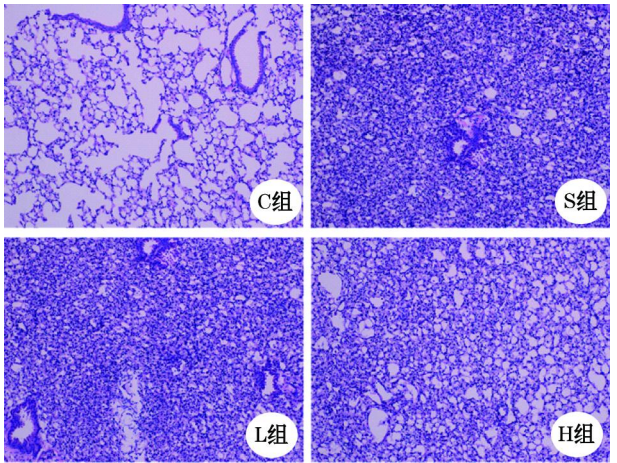


图 1 各组大鼠建模 4 h 后的肺组织病理表现 (HE, $\times 100$ 倍)

C 组. 空白对照组;S 组. 肺损伤 + 生理盐水组;L 组. 肺损伤 + Rg1 (20 mg/kg);H 组. 肺损伤 + Rg1 (100 mg/kg)

3 讨论

海水由于高渗与碱性的特点,其所造成的肺损伤更容易出现低氧血症和酸中毒,并可发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS),救治难度极大^[5]。海水吸入后可以直接损伤肺泡内皮细胞,破坏肺泡毛细血管屏障,导致肺泡和肺间质渗出水肿,同时激活炎症的级联放大效应,引起局部和全身的炎症反应综合征^[6]。目前针对 SW-ALI 的治疗方法主要有肺泡灌洗、糖皮质激素、吸入肺泡表面活性物质和器官功能支持治疗等,但整体的救治存活率仍然较低^[1, 7]。本研究发现,在气管内注入海水后,大鼠很快出现呼吸急促,气道内产生大量泡沫样痰,血气结果提示氧分压降低,CO₂ 分压明显升高,其原因可能是海水刺激引起气道痉挛,同时气道分泌物阻塞导致通气功能障碍,出现 II 型呼吸衰竭。随着气道分泌物逐渐减少,大鼠通气功能改善,CO₂ 分压进行性降低而氧分压逐渐升高。在大鼠肺脏病理检测中观察到肺间质的水肿、肺泡塌陷、炎性细胞浸润,提示肺内可能存在通气血流比例失调和分流存在,这与血气指标中持续性的低氧血症结果一致。

人参皂苷 Rg1 为四环三萜类衍生物,具有抗氧化应激、抗炎症反应、抗纤维化和神经保护作用等功效。Rg1 可以清除心脏、肾脏缺血再灌注损伤中产生自由基,保护内源性 SOD 的活性^[8, 9]。Rg1 还可通过阻断 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路减轻脂多糖诱导的新生大鼠心肌细胞和脓毒症小鼠的炎症反应和凋亡,恢复受损的心功能^[10]。笔者前期研究发现,

人参皂苷 Rg1 可以减轻小鼠脓毒症所致的肺组织损伤,抑制机体炎性反应,减少淋巴细胞的凋亡,显著改善脓毒症小鼠的生存期^[11]。在肝缺血再灌注模型中我们发现,Rg1 可以显著减少肝细胞的坏死和凋亡,抑制氧化应激反应,减轻肝脏局部和全身的炎症反应^[12]。

本实验结果显示,与对照组比较,高剂量 Rg1 能显著提升 SOD 活性,并降低肺组织内 MDA 浓度和 MPO 活性,明显改善海水吸入后 30、60、120 min 的氧合功能,提示 Rg1 能抑制海水对肺组织的氧化应激损伤,减轻肺组织内渗出水肿,从而改善大鼠的生存期。SOD 是一种重要的抗氧化酶,可与过氧化物酶和催化酶一起可消除活性氧(ROS)^[13]。MPO 属于血红素蛋白,富含于中性粒细胞中,在杀灭微生物和调节炎性反应发挥作用。MDA 是生物体脂质过氧化的代谢产物,也是机体氧化应激的重要标志物^[14]。本研究中模型组内大量炎性细胞浸润与 MPO 表达升高相吻合,提示中性粒细胞募集活化释放氧自由基参与肺损伤的发生。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 是重要的促炎性细胞因子,主要由巨噬细胞和中性粒细胞产生。通过 Toll 样受体、RIG-I 受体或 NOD 样受体等模式识别受体,激活胞内的炎性反应信号通路,使细胞因子分泌增加。促炎性因子进一步活化肺内皮细胞、上皮细胞和白细胞,诱导肺内瀑布炎性反应的发生,因此抑制炎性因子的表达可以减轻肺组织损伤^[15]。与既往研究一致,本研究发现 Rg1 呈剂量依赖性抑制炎性因子的表达,从而减轻肺组织损伤,提高海水淹溺大鼠的存活率。

人参皂苷 Rg1 潜在的分子受体可能包括糖皮质激素受体和雌激素受体,抗炎抗氧化功能与 Nrf2/HO-1、NF- κ B 和 Ampk 等信号通路相关,具有抗炎抗氧化且不良反应小等特点,随着研究的不断深入,Rg1 的药物研发与临床应用将具有广阔的前景。

【参考文献】

[1] Parenteau M, Stockinger Z, Hughes S, *et al.* Drowning management[J]. Mil Med, 2018, 183(suppl_2):172-179.
[2] Haglund P, Favarel-Garrigues J C, Nicod J, *et al.* Biological disturbances during drowning in sea water [J]. Resuscitation, 1974, 3(2):121-127.
[3] Estella A A, Bello Fontañña L P. Sea drowning: a case report and review of the literature [J]. Monaldi Arch Chest dis, 2011, 75(2):135-137.

[4] Gao Y, Li J, Wang J, *et al.* Ginsenoside Rg1 prevent and treat inflammatory diseases: a review [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 87: 106805.
[5] Tyler M D, Richards D B, Reske-Nielsen C, *et al.* The epidemiology of drowning in low- and middle-income countries: a systematic review [J]. BMC Public Health, 2017, 17(1): 413.
[6] Michelet P, Dusart M, Boiron L *et al.* Drowning in fresh or salt water: respective influence on respiratory function in a matched cohort study [J]. Eur J Emerg Med, 2019, 26(5):340-344.
[7] Orlowski J P, Szpilman D. Drowning, rescue, resuscitation, and reanimation [J]. Pediat Clin North Am, 2001, 48(3):627-646.
[8] Li L, Pan C S, Yan L, *et al.* Ginsenoside Rg1 Ameliorates Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Modulating Energy Metabolism Pathways [J]. Front Physiol, 2018, 9: 78.
[9] Zhu M X, Ran B, Feng Z Q, *et al.* Effects of Rb1 and Rg1 on the expression of Bcl-2, Bax in apoptosis of HK-2 cells induced by the serum of kidney ischemia/reperfusion [J]. Chin J Applied Physiol, 2009, 25(4):496-499.
[10] Luo M, Yan D, Sun Q, *et al.* Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(4):2994-3004.
[11] Zou Y, Tao T, Tian Y, *et al.* Ginsenoside Rg1 improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis by suppressing the inflammatory response and apoptosis of lymphocytes [J]. J Surg Res, 2013, 183(2):760-766.
[12] Tao T, Chen F, Bo L, *et al.* Ginsenoside Rg1 protects mouse liver against ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-apoptosis properties [J]. J Surg Res, 2014, 191(1):231-238.
[13] McCord J M, Edeas M A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision [J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59(4):139-142.
[14] Lv H M, Liu Q M, Wen Z M, *et al.* Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 β -Nrf2 signal axis [J]. Redox Biol, 2017, 12(2):311-324.
[15] Antoine F, Simard J, Girard D. Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. Int Immunopharmacol, 2013, 17(4):1101-1107.

(2021-10-20 收稿 2021-12-15 修回)

(责任编辑 武建虎)