

芒果三芪肺纤方对博莱霉素致小鼠肺纤维化作用研究

张 帅¹, 黄思诗², 覃文慧³, 杨 柯³, 邓家刚^{3*}

1. 防城港市中医医院, 广西 防城港 538021

2. 广西卫生职业技术学院, 广西 南宁 530000

3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000

摘要: **目的** 观察芒果三芪肺纤方对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化的改善作用。**方法** 昆明小鼠随机分为对照组, 模型组, 地塞米松(阳性药, 1 mg/kg)组, 芒果三芪肺纤方高、中、低剂量(以生药计 5.00、3.30、1.65 g/kg)组, 通过鼻腔 1 次性滴入 6 mg/kg 盐酸博莱霉素制备小鼠肺纤维化模型, 对照组滴入等体积的生理盐水。于造模后第 14 天开始 ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 14 d 后处死小鼠, 试剂盒法测定肺组织匀浆中的羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)、白介素-1 β (IL-1 β)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活力; HE 染色观察肺组织病理切片, Masson 染色观察胶原纤维的分布情况。**结果** 与模型组比较, 芒果三芪肺纤方高、中、低剂量组小鼠 HYP 和 IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.01$), SOD 活力显著提高($P < 0.05$ 、0.01), 高和中剂量组小鼠 MDA 水平显著降低($P < 0.05$ 、0.01); HE 和 Masson 染色显示, 芒果三芪肺纤方组肺泡炎损伤和肺纤维化病变程度明显减轻($P < 0.01$), 高剂量组效果最好。**结论** 芒果三芪肺纤方通过提高 SOD 活力、降低 MDA 水平, 发挥抗自由基损伤作用; 降低 HYP 的水平, 减少纤维蛋白的形成; 降低 IL-1 β 水平, 发挥抗炎作用; 显著减轻肺泡炎症损伤、抑制肺纤维化病变程度, 对博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化具有很好的改善作用。

关键词: 芒果三芪肺纤方; 芒果苷; 黄芪多糖; 三七总皂苷; 博莱霉素; 肺纤维化

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)05-0758-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.010

Effect of Mangguosanqi Feixian Prescription on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

ZHANG shuai¹, HUANG Si-shi², QIN Wen-hui³, YANG ke³, DENG Jia-gang³

1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Fang Chenggang, Fang Chenggang 538021, China

2. Gungxi Medical College, Nanning 530000, China

3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Mangguosanqi Feixian Prescription on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** Kunming mice were randomly divided into six groups: control group, model group, dexamethasone (1 mg/kg, positive drug) group, Mangguosanqi Feixian Prescription low, medium and high dose (5.00, 3.30, and 1.65 mg/kg) groups. Mice were prepared with intranasal instillation infusion with 6 mg/kg bleomycin, control group treated with the same volume of physiological saline. Mice in each treatment group were given appropriate intervention 14 d after modeling, and were sacrificed after 14 d. Reagent kit method was used to determine the levels of homogenate (HYP), malondialdehyde (MDA), and interleukin-1 β (IL-1 β), and the activity of superoxide enzyme (SOD) in lung tissue homogenate. Pathological sections were stained with haematoxylin-eosin and Masson dyeing for pathological diagnosis. **Results** Compared with model group, the level of HYP, IL-1 β in Mangguosanqi Feixian Prescription low, medium, and high dose groups was decreased significantly, the activity of SOD was increased significantly, and the levels of MDA in medium and high dose groups were decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01). Mangguosanqi Feixian Prescription group could significantly relieve inflammation and restrain the degree of pulmonary fibrosis ($P < 0.01$).

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 广西“八桂学者”工程专项经费资助(厅发【2013】3号)

作者简介: 张 帅(1989—), 男, 山东菏泽人, 中药师, 硕士学位, 研究方向是中药药效物质筛选, 新药开发和京族医药的发掘整理。

Tel: 15077166963 E-mail: yimingsir@163.com

*通信作者 邓家刚(1953—), 男, 广西北海人, 教授, 博士生导师, 主要从事中药理论与药效物质筛选研究。

High-dose group is the best. **Conclusion** Mangguosanqi Feixian Prescription can increase SOD activity, decrease MDA levels play against free radical injury, reduce the content of HYP, reduce the formation of fibrin, and regulate the expression of IL-1 β to exert anti-inflammatory effects. It can also significantly reduce damage alveolitis and inhibition of pulmonary fibrosis disease. It has a very good therapeutic effect on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

Key words: Mangguosanqi Feixian Prescription; mangiferin; *Astragalus polysaccharide*; *Panax notoginseng* saponins; bleomycin; pulmonary fibrosis

肺纤维化(PF)是肺间质弥漫性渗出、浸润和纤维化为主要病变的一类疾病,其主要症状包括呼吸困难、气短、干咳和喘憋,严重时会导致患者呼吸衰竭而死亡^[1]。目前对其发病机制仍不太清楚,随着环境污染的不断恶化,发病率正在逐年增加。目前西医的传统治疗手段主要是采用激素和免疫抑制剂类药物,但是疗效不理想而且还有副作用^[2]。中医文献没有关于肺纤维化的疾病名称,根据其症状可归属于“肺痹”“肺痿”“咳嗽”等,临床与实践表明,中医药治疗肺纤维化具有一定优势^[3-4]。邓家刚教授认为,肺纤维化形成的中医病机主要涉及正虚痰瘀等,并依据中医理论和多年的行医经验,组成“芒果三芪肺纤方”(原处方为:芒果叶、黄芪、三七)进行治疗肺纤维化的研究。

本研究主要是通过对此方中三味药的主要药效成分芒果苷、黄芪多糖、三七总皂苷进行中药组分配伍,应用中药药理学和分子生物学方法,对抗肿瘤药博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化进行药效及初步机制研究。肺纤维化是一种渐进的不可逆的疾病,大量的实验和前期的预实验研究表明^[5-6],博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化于14 d开始出现症状,28 d已可以确诊。本研究从小鼠开始出现肺纤维化症状时给予药物干预,观察药物对肺纤维化的阻抑作用,以期寻找一种安全有效的中药组分配伍方剂提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级昆明种雄性小鼠,18~22 g,由广西医科大学实验动物中心提供,生产许可证号SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物与主要试剂

黄芪,批号130901,购自广西玉林参宝堂中药饮片有限公司,经广西中医药大学中药教研室覃文慧鉴定为豆科植物黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.的根;三七,批号130902,购自广西玉林参宝堂中药饮片有限公司,经广西中医药大学中药教研室覃文慧鉴定为五加科植物三七 *Panax*

notoginseng (Burk.) F. H. Chen 的干燥根;芒果叶,自采,经广西中医药大学中药教研室覃文慧鉴定为漆树科植物芒果 *Mangifera indica* L.的树叶。

地塞米松磷酸钠注射液(规格1 mL、5 mg,广州白云山天心制药股份有限公司,批号130608);注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社,批号120901);注射用黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,批号120901);三七总皂苷(血塞通注射液,昆明制药集团股份有限公司,批号12EL02);芒果苷(广西中医药大学中药药效筛选重点实验室提供,质量分数达98.39%以上)。

超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)试剂盒、考马斯亮兰(南京建成生物工程研究所);IL-1 β ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 主要仪器

BX60显微镜(日本OLYMPUS公司);LG16-W高速低温离心机(德国Heraeus公司);全波长酶标仪(美国Epoch Biotek公司);TGL-16B和TGL-16C型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TU-1901/1900紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);EL204电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);HM355 S型全自动石蜡切片机(德国MICROM公司)、电热恒温培养箱、电热恒干燥箱(上海跃进公司);D700型单反照相机显微摄像(日本尼康公司);YQ-3匀浆器(广西医科大学科学实验中心)。

2 方法

2.1 芒果三芪肺纤方中药有效组分配伍处方筛选

分别取原处方量的黄芪60 g、芒果叶30 g、三七10 g药材各3份,按以下方法进行提取,黄芪多糖:加30倍的水,70℃恒温提取15 min,提取3次,质量浓度分别为217.01、216.52、216.73 mg/g,平均216.73 mg/g^[7];芒果苷:75%乙醇10倍用量,在640 W微波下提取10 min,质量浓度分别为132.78、132.72、132.79 mg/g,平均132.76 mg/g^[8];三七总皂苷:75%乙醇超声波高频(50 kHz)提取3

次、每次 30 min、提取温度 40 °C，质量浓度分别为 500.02、500.05、500.03 mg/g，平均 500.03 mg/g^[9]。因此将芒果三芪肺纤方中药组分量定为黄芪多糖 13.0 g、芒果苷 4.0 g、三七总皂苷 5.0 g。分别用购买的注射用黄芪多糖、芒果苷、三七总皂苷按处方制作成 3 种不同浓度的药液：芒果三芪肺纤方高、中、低浓度 0.075、0.05、0.025 g/mL 组。

2.2 肺纤维化小鼠模型的制备及分组给药

小鼠乙醚吸入麻醉后，保持直立状，根据小鼠的呼吸，自鼻腔缓慢滴入 6 mg/kg 盐酸博来霉素溶液，对照组滴入等量的无菌生理盐水，滴完后保持直立 30 s，待其苏醒后给予水和饲料，肺纤维化小鼠模型制备完成。

60 只昆明种雄性小鼠，随机分为 6 组：对照组、模型组、地塞米松（阳性药，1 mg/kg）组、芒果三芪肺纤方高、中、低剂量（以生药计 5.0、3.3、1.65 mg/kg，分别取“2.1”项中质量浓度为 0.075、0.05、0.025 g/mL 的芒果三芪肺纤方给药）组，每组 10 只。模型建立 14 d 后，小鼠开始出现咳嗽、挠鼻现象，研究表明^[10-11]，造模后第 14 天小鼠肺组织病理切片观察开始出现肺泡炎症和轻微的肺纤维化。造模 14 d 后开始每天 ig 给药一次，连续给药 14 d，对照组和模型组 ig 等量纯净水。

2.3 观察指标

各组小鼠分别于给药 14 d 后处死，打开胸腔，取出肺脏，肺左大叶固定于 4% 多聚甲醛溶液中，常规石蜡包埋、切片，采用 HE 和 Masson 染色观察肺组织病理改变以及肺纤维化程度。

HE 染色的病理切片，根据 Szapiel 方法将肺泡炎分为 4 级：I 级，无肺泡炎症（0 分）；II 级，轻度肺泡炎症（1 分）：单核细胞浸润使肺泡隔增宽，仅限于局部和近胸膜部，面积小于全肺的 30%，肺泡结构一般正常；III 级，中度肺泡炎症（2~3 分）：受累面积占全肺的 30%~70%，近胸膜部比较严重；IV 级，重度肺泡炎症（4 分）：受累面积大于 70%，偶然会见到肺泡腔内有单核细胞和出血造成的实质性变化。

Masson 染色后的病理切片，根据肺纤维化判断方法将肺纤维化程度分 4 级：I 级，无肺纤维化（0 分）；II 级，轻度肺纤维化（1 分）：受累面积小于 20%；III 级，中度肺纤维化（2 分）：受累面积占全肺的 20%~50%；IV 级，重度肺纤维化（3 分）：受累面积大于 50%，肺泡结构比较紊乱。

取右肺中叶，在生理盐水中充分漂洗后，滤纸吸干表面水分，精密称取 30~50 mg，于 -80 °C 冰箱保存，待检测时，用生理盐水制备成 10% 肺组织匀浆，测定肺组织匀浆中的 SOD 活力和 MDA、IL-1 β 、HYP 水平，严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 SPSS 17.0 软件中单因素方差分析进行统计分析；Homogeneity 检验方差齐性，若方差齐时采用最小显著法（LSD）检验；若方差不齐时采用 Dunnett's U 检验；等级资料采用非参数检验法进行统计分析。

3 结果

3.1 各组小鼠肺组织中 SOD 活力和 MDA、HYP、IL-1 β 水平比较

模型组肺组织匀浆中 SOD 活力较对照组显著降低（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，各给药组 SOD 活力均显著升高（ $P < 0.05$ 、 0.01 ）；芒果三芪肺纤方高剂量组 SOD 活力升高较明显，与对照组比较差异不显著；中和低剂量组与对照组比较，差异显著（ $P < 0.05$ ）。

与对照组比较，模型组肺组织匀浆中 MDA、HYP、IL-1 β 水平均显著升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，地塞米松组、芒果三芪肺纤方高、中剂量组 MDA、HYP 和 IL-1 β 水平均显著降低（ $P < 0.05$ 、 0.01 ），低剂量组 HYP 和 IL-1 β 水平均显著降低（ $P < 0.01$ ）。高剂量组 MDA 和 HYP 水平与对照组比较，差异不显著；中和低剂量组与对照组比较，差异显著（ $P < 0.05$ 、 0.01 ）。高、中、低剂量组 IL-1 β 水平与对照组比较，差异均不显著。结果见表 1。

3.2 各组小鼠肺组织病理形态学观察

光学显微镜下观察，对照组肺结构清晰，肺泡上皮细胞、肺间质血管上皮细胞未见或少见炎症细胞浸润，支气管、肺泡、血管壁均未见胶原纤维明显增生；肺泡炎症与肺纤维化程度评分均为 0 分；模型组小鼠均有肺泡炎，表现为肺泡充血、水肿，部分肺泡有透明膜形成，肺泡上皮细胞有中至重度损伤，肺泡炎稍减轻；肺纤维化程度最重，多呈 III 级肺纤维化变化，胶原纤维组织增生、变厚，肺气肿严重；肺泡炎症与肺纤维化程度评分均为 3 分，与对照组比较，差异显著（ $P < 0.01$ ）。各给药组肺泡炎症与肺纤维化程度均有明显的改善，评分均为 2 分，与模型组比较，差异显著（ $P < 0.01$ ）。肺组织病理学分析结果见图 1、2 和表 2。

表 1 各组小鼠肺组织中 SOD 活力、MDA、HYP 和 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Comparison on activity of SOD, level of MDA, HYP, and IL-1 β in lung tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD 活力/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	HYP/(μ g·mg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	132.50 $\pm$ 2.75	2.13 $\pm$ 0.07	624.19 $\pm$ 28.44	43.84 $\pm$ 5.53
模型	—	104.30 $\pm$ 2.30**	2.50 $\pm$ 0.04**	782.03 $\pm$ 15.90**	72.07 $\pm$ 6.53**
地塞米松	0.001	117.47 $\pm$ 4.30 ^{##}	2.21 $\pm$ 0.09 ^{###}	701.02 $\pm$ 25.52 ^{***}	70.59 $\pm$ 2.25 ^{***}
芒果三芪肺纤方	5.00	129.18 $\pm$ 2.53 ^{##}	2.12 $\pm$ 0.08 ^{##}	630.24 $\pm$ 32.41 ^{##}	42.59 $\pm$ 2.31 ^{##}
	3.30	114.21 $\pm$ 1.34 ^{*#}	2.25 $\pm$ 0.05 ^{*#}	665.02 $\pm$ 21.13 ^{***}	42.89 $\pm$ 1.23 ^{##}
	1.65	110.08 $\pm$ 2.04 ^{*#}	2.29 $\pm$ 0.07 [*]	674.07 $\pm$ 20.05 ^{***}	43.82 $\pm$ 3.78 ^{##}

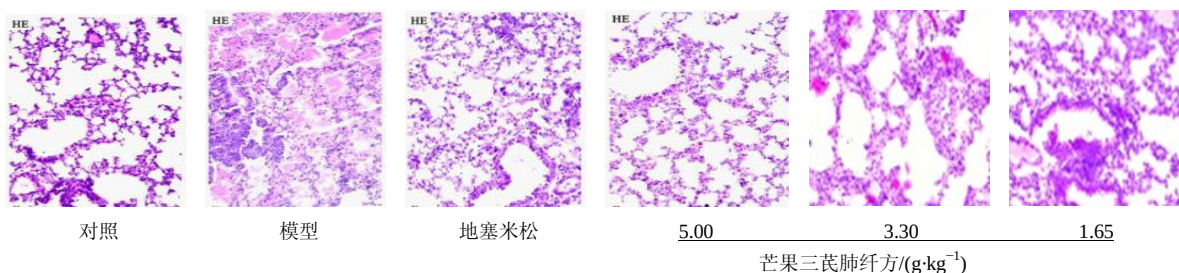
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色

Fig. 1 Pathological observation on HE staining of lung in mice

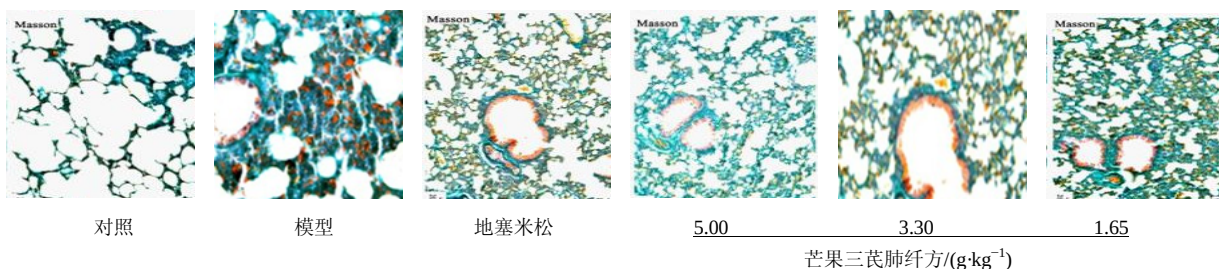


图 2 各组小鼠肺组织 Masson 染色

Fig. 2 Pathological observation on Masson staining of lung in mice

表 2 各组小鼠肺泡炎症、肺纤维化程度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Comparison on lung inflammation and pulmonary fibrosis in lung tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肺泡炎症 (HE)	肺纤维化 (Masson)
对照	—	0	0
模型	—	3**	3**
地塞米松	0.001	2**	2**
芒果三芪肺纤方	5.00	2**	2**
	3.30	2**	2**
	1.65	2**	2**

4 讨论

本实验芒果三芪肺纤方显著提高模型小鼠体内 SOD 活力、降低 MDA 水平, 说明本方能增加氧自由基清除能力, 降低氧自由基代谢产物的损害, 对博来霉素致小鼠肺损伤具有保护作用, 从而抑制肺纤维化。各组 HYP 测定结果表明, 给药组均能显著地降低 HYP 水平, 芒果三芪肺纤方组 HYP 水平甚至达到对照组水平, 表明其可以通过抑制胶原蛋白的形成, 减轻肺纤维化的程度。通过 ELISA 测定各组肺匀浆中 IL-1 β 水平, 可知模型组在疾病发展过程中 IL-1 β 水平始终偏高, 而给药组明显降低, 表明其可能通过抑制 IL-1 β 的表达而发挥抑制肺纤

维化形成的作用。实验结果表明此方可以抗氧化、抗自由基损伤；抑制炎症因子的释放，发挥抗炎性损伤作用；影响胶原的代谢而减少肺纤维蛋白的形成，进而发挥抑制肺纤维化的作用。

肺纤维化难以用单一病机来解释，很多医家认为：肺纤维化当属本虚标实，以肺肾气虚为本，以痰浊、瘀血、热毒等邪实内阻为标^[12-13]。在本病的发生、发展的整个过程中，正气不足是本病之本，“虚”“痰”“瘀”一直贯穿于疾病的始终。单味中药对肺纤维化的作用具有局限性，难以完全治疗病机复杂的疾病，中药复方才是中药研究的重难点。目前中医用药多以补益药和活血药为主，以祛痰药为佐。芒果三芪肺纤方所选药物黄芪多糖、芒果苷、三七总皂苷分别是中药黄芪、芒果叶、三七中重要的有效成分，已有实验表明黄芪、芒果叶、三七对肺纤维化或呼吸系统疾病有一定的治疗作用^[14-17]。本实验采用方剂配伍中的有效组分配伍方法展开研究，其中黄芪多糖为补虚扶正之药，芒果苷为消炎止咳化痰之药，三七总皂苷为活血化瘀之药。此方是根据中医“辨证论治”的思想，合理用药，以求达标本皆治之效。而且此方组成药物较少，针对性强，有利于实验研究。

参考文献

- [1] 李 瑶, 刘新桥. 中医药治疗肺纤维化研究进展 [J]. 中医学报, 2015, 30(202): 340-342.
- [2] Raghu G, Collard H R, Egan J J, et al. An official STS/ERS/JRS/ALAT Statement: idiopathic; pulmonary fibrosis: evidenc; ebased guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.
- [3] 苏垠旭, 龚婕宁. 从叶天士“初病在经, 久病入络”理论论治肺纤维化 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(6): 1280-1284.
- [4] 吕晓东, 庞立健, 刘 创. 肺络结构和功能与特发性肺纤维化急性发作期“肺热络瘀”病机 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(9): 1980-1983.
- [5] 李 红, 王 胜, 沈明霞, 等. 黄芪甲苷对特发性肺纤维化模型大鼠肺组织碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响 [J]. 西部中医药, 2015, 28(12): 21-24.
- [6] 周 平, 王 磊, 何春香, 等. 博来霉素和油酸致大鼠肺纤维化病理模型的比较 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 87: 47-50.
- [7] Ding R. Study on the Extraction Processes of Polysaccharides from FOLIUMMORI [J]. *Medicinal Plant*, 2011, 2(12): 56-59.
- [8] 谢黎崖, 任 宽, 黄 鑫. 正交设计优选芒果苷的微波提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(15): 1331-1333.
- [9] 沈玉聪, 张红瑞, 张子龙, 等. 三七总皂苷提取工艺研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(3): 76-79.
- [10] Gao J, Huang Y, Li P, et al. Antifibrosis effects of total glucosides of Danggui-Buxue-Tang in a rat model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 21-26.
- [11] 李丽君, 范盎然, 葛东宇, 等. 黄芪当归对药对特发性肺纤维化小鼠生存状况及组织修复相关基因表达水平的影响 [J]. 环球中医药, 2015, 8(12): 1441-1445.
- [12] 杨露梅, 邢筱华, 李建设, 等. 中医药防治肺间质纤维化的研究进展 [J]. 河北中医, 2012, 34(7): 1097-1100.
- [13] 胡杨洋, 陈锐娥, 王胜鹏, 等. 中药药对的系统研究(VI)——黄芪当归药对研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 14(2): 1349-1356.
- [14] 易高众, 张贻秋, 贺兼斌, 等. 黄芪联合糖皮质激素治疗特发性肺纤维化的临床疗效 [J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(2): 291-292.
- [15] 李 娟, 张 毅, 刘永琦, 等. 黄芪多糖对肺纤维化大鼠细胞因子及肺组织病理结构的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1684-1685.
- [16] 郭宏伟, 邓家刚, 运晨霞, 等. 芒果苷抑制哮喘小鼠气道炎症的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 187-190.
- [17] 孙晓芳, 段 斐, 刘佳琳, 等. 三七总皂苷对博来霉素致小鼠肺组织蛋白酶 B 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1134-1136.