

金水缓纤方治疗肺纤维化的组分配伍研究

李建生^{1,2}, 董浩然^{1,2,3}, 郑万春^{1,2,3}, 刘学芳^{1,2,3}, 田燕歌^{1,2,3}, 李君子^{1,2,3}, 冯素香^{1,2}, 任周新^{1,2,3}, 赵鹏^{1,2,3}

1. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 河南 郑州 450046

3. 河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 采用正交设计结合疾病模型优化金水缓纤方组分配比、评价组分配伍的疗效, 获得金水缓纤组分方。方法 10 种中药组分作为金水缓纤方候选活性组分, 分为不同功效组包括补气组 (人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁)、补肾组 (淫羊藿苷和鲁斯可皂苷元)、活血组 (芍药苷和丹皮酚)、化痰组 (3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、川陈皮素和贝母素甲)、补肺组 (异甘草素), 以及采用组合法设置补气、补肾和活血组的不同浓度配比组, 采用正交设计设置化痰组不同浓度组; 基于肺泡上皮细胞评价其活性, 肺纤维化大鼠模型评价其疗效, 依次优化组内、组间配伍配比。结果 基于正交设计与细胞模型活性评价获得组内配伍: 补气组 (人参皂苷 Re)、补肾组 (淫羊藿苷)、化痰组 (川陈皮素-贝母素甲 2:12.5)、活血组 (芍药苷)、补肺组 (异甘草素); 组间配伍: 补肾组 (淫羊藿苷)-化痰组 (川陈皮素-贝母素甲 2:12.5)-活血组 (芍药苷)-补气组 (人参皂苷 Re)-补肺组 (异甘草素) 为 100:(2:12.5):6.25:80:8。金水缓纤组分 I 可显著改善大鼠肺纤维化症状, 并进一步优化了金水缓纤组分 I 的配伍配比, 获得了组分明确、疗效明显的金水缓纤组分 II, 即为淫羊藿苷-川陈皮素-贝母素甲-芍药苷-异甘草素为 100:2:6.25:6.25:8。结论 组分配伍研究可有效揭示中药复方疗效物质基础, 获得组分明确、疗效明显的金水缓纤组分方。

关键词: 肺纤维化; 金水缓纤方; 组分配伍; 中药复方; 肺泡上皮细胞间质化

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)13-3966-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.020

Effective component compatibility-based analysis of Jinshui Huanxian formula for treatment of pulmonary fibrosis

LI Jian-sheng^{1,2}, DONG Hao-ran^{1,2,3}, ZHENG Wan-chun^{1,2,3}, LIU Xue-fang^{1,2,3}, TIAN Yan-ge^{1,2,3}, LI Jun-zi^{1,2,3}, FENG Su-xiang^{1,2}, REN Zhou-xin^{1,2,3}, ZHAO Peng^{1,2,3}

1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To optimize the distribution ratio of Jinshui Huanxian formula (金水缓纤方, JHF) and evaluate the efficacy of component compatibility (ECC) by orthogonal design combined with disease model, in order to obtain the ECC. **Methods** Ten active components of JHF were identified and divided into tonifying qi (ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁), tonifying kidney (icariin, ruscogenin), activating blood (paeoniflorin, paeonol), resolving phlegm (3,29-dibenzoyl rarounitriol, nobiletin and verticine), and tonifying lung (isoliquiritigenin) groups. The different concentration ratio groups of tonifying qi, tonifying kidney and activating blood groups were set by the combination method, and the different concentration groups of the phlegm-reducing group were set by the orthogonal design. Its activities were evaluated based on alveolar epithelial cells, and its efficacy was evaluated based on pulmonary fibrosis (PF) rat model. Intra-group and inter-group compatibility ratio were optimized respectively. **Results** The compatibility in group was obtained based on orthogonal design combined with cell model: tonifying qi (ginsenoside Re), tonifying kidney (icariin), resolving

收稿日期: 2020-11-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673942); 国家自然科学基金面上项目 (81973822)

作者简介: 李建生, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治呼吸疾病。Tel: (0371)65676568 E-mail: li_js8@163.com

phlegm (nobiletin: verticine = 2 : 12.5), activating blood (paeoniflorin), tonifying lung (isoliquiritigenin); The compatibility among groups: tonifying kidney (icariin): resolving phlegm (nobiletin: verticine = 2 : 12.5): activating blood (paeoniflorin): tonifying *qi* (ginsenoside Re): tonifying lung (isoliquiritigenin) = 100:(2:12.5):6.25:80:8. Then, ECC of JHF I could significantly improve the symptom of PF rats. The active ingredients of effective-component compatibility of ECC-JHF I were optimized based on their therapeutic effect on rat and ECC-JHF II (icariin: nobiletin: verticine: paeoniflorin: isoliquiritigenin = 100:2:6.25:6.25:8) was obtained.

Conclusion The study of component compatibility can effectively reveal the material basis of the efficacy of traditional Chinese medicine compound, and the component prescription of JHF with clear components and obvious effect was obtained.

Key words: pulmonary fibrosis; Jinshui Huanxian formula; effective component compatibility; traditional Chinese medicine compound; alveolar epithelial-mesenchymal transition

弥漫性间质性肺疾病 (diffuse interstitial lung disease, DILD) 是以肺泡壁为主包括肺泡周围组织及其相邻支撑结构病变的一组非肿瘤、非感染异质性疾病组成的疾病谱, 其中以特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary disease, IPF) 最具代表性^[1]。IPF 是一种病因不明的慢性进展性间质性肺疾病, 以进行性呼吸困难和肺功能下降为特征, 且预后不良, 许多证据表明其与一些危险因素 (如遗传因素、吸烟、环境暴露、病毒感染等) 相关^[2]。该病进展迅速, 中位生存期仅为 2.9 年, 甚至比肺癌患者更短^[3]。IPF 发病率、致残率、死亡率逐年升高, 社会经济负担重^[4]。

本研究团队对中医治疗 IPF 进行文献挖掘、长期临床研究^[5], 提出“正虚络痹积损”为其主要病机^[6], 拟定了以补益肺肾、活血化痰通络为主要治法的金水缓纤方。其中人参可大补元气, 淫羊藿、麦门冬、熟地黄助阴精化生肾气, 瓜蒌、浙贝母、白果、陈皮、甘草可敛肺气、化痰、散结、渗湿、理气等, 丹皮可活血化瘀。临床实践表明, 该方可明显改善患者临床症状、减缓病情进展、提高生存质量等。动物实验显示, 金水缓纤方对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠疗效显著, 有效改善肺功能、肺组织病理损伤、胶原沉积, 抑制氧化应激等^[7]; 此外, 该方还可抑制肺泡上皮间质化、成纤维细胞活化等。但金水缓纤方疗效物质复杂、作用机制不清, 影响了方药的疗效稳定与临床应用及深度研发。

组分配伍是揭示方剂物质基础与配伍机制的有效途径。组分配伍是以中医药理论为基础, 遵循中药方剂的配伍理论与原则, 基于临床适应病相关体内外疾病模型, 获得方剂有效部位、一类成分或单体成分, 进行配伍、配比 2 个层次的优化设计, 得到最佳组合的组分配伍, 进而结合现代药理学研究方法, 从整体、细胞、分子水平深入揭示其配伍机制, 以期获得组分明确可控、机制清晰的组分配伍^[8-10]。

本研究将金水缓纤方所含中药分为 5 个功效

组: 补气组 (人参)、补肾组 (淫羊藿、麦门冬、熟地黄)、化痰组 (瓜蒌、浙贝母、白果、陈皮)、补肺组 (甘草) 及活血组 (丹皮)。文献调研获取各中药有效组分, 采用正交设计、全排列方法结合肺纤维化相关细胞模型活性评价优化各功效组内组分配比、功效组间配比, 采用博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型评价其疗效及优化其配伍, 获得了与金水缓纤方疗效相当的金水缓纤组方。

1 材料

1.1 细胞

肺癌 A549 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 动物

SPF 级 6~8 周龄 SD 大鼠 252 只, 雌雄各半, 体重 (200±20) g, 购自河南省实验动物中心 (SCXK [豫] 2017-0001), 动物许可证编号 41003100005603。本研究通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会审查批准 (DWLL16020025)。动物饲养室内以 12 h/12 h 昼夜循环照明, 温度维持在 26 ℃, 湿度 50%, 动物自由摄食及饮水。

1.3 药物

金水缓纤方组成为人参、熟地黄、麦冬、瓜蒌、浙贝母、牡丹皮、陈皮、炙甘草 (郑州瑞龙制药股份有限公司, 批次分别为 17110101、19080201、17040101、19110102、16120101、19100101、19120103、19120101), 炙淫羊藿 (江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 批号 1711005), 炒白果仁 (广东汇群中药饮片股份有限公司, 批号 20181101)。中药材经河南中医药大学药学院冯素香教授鉴定植物来源为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey., 地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 麦冬 *Phiopogon japonicus* (L. f) Ker. -Gawl., 栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim., 浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq., 牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr., 橘

Citrus reticulata Blanco、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch、淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、银杏 *Ginkgo biloba* L.。金水缓纤方制备方法：取陈皮、浙贝母、炙淫羊藿、牡丹皮、白果适量，采用 70%乙醇回流提取；取麦冬、炙甘草、熟地黄、瓜蒌适量，采用水煎煮滤过，滤液与上述醇提液合并；人参粉碎为最细粉，与上述合并液减压干燥，粉碎成细粉，5%羧甲基纤维素钠充分混悬后备用。

人参皂苷 Re (批号 CHB170926)，成都克洛玛生物科技有限公司；人参皂苷 Rb₁ (批号 MUST-17060106)、淫羊藿苷 (批号 MUST-17051810)、鲁斯可皂苷元 (批号 MUST-16061703)、芍药苷 (批号 MUST-16041901)、丹皮酚 (批号 MUST-16071405)、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇 (批号 MUST-16121911)、川陈皮素 (批号 MUST-16070901)、贝母素甲 (批号 MUST-16031101)、异甘草素 (批号 MUST-17012503)，成都曼思特生物科技有限公司，以上成分质量分数均≥98%。硫酸博来霉素 (150 mg/瓶，批号 s1214-12, Selleck 公司)，使用生理盐水溶解为质量浓度 30 mg/mL 的液体。吡非尼酮胶囊 (艾思瑞，100 mg×54 粒/瓶，批号 150603，北京康蒂尼药业有限公司)。

1.4 试剂

RPMI 1640 培养基 (批号 20170718)、青链霉素双抗 (批号 20170519)，北京索莱宝科技有限公司；四季青胎牛血清 (批号 18100505)，浙江天杭生物科技股份有限公司；转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)-β1 (批号 HY-P70433)，MedChemExpress Co. Ltd.；羟脯氨酸检测试剂盒 (批号 BC0255) 由北京索莱宝科技有限公司提供；E-钙黏素 (E-cadherin, E-cad) 酶联免疫试剂盒 (批号 UFKA99Y405)、α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA) 酶联免疫试剂盒 (批号 61G3R8SP7R)、纤连蛋白酶联免疫试剂盒 (批号 C4HP6WGQAG)、I 型胶原 (collagen 1, COL1) 酶联免疫试剂盒 (批号 B2R6AQ4YV4)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)-β 酶联免疫试剂盒 (批号 7EAX33B53N)、白细胞介素 (interleukin, IL)-13 酶联免疫试剂盒 (批号 5GXY39Z68R)，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 20180603)、Masson 三色染色试剂盒 (批号 20180708)，北京索莱宝科技有限公司；COL1 抗体 (批号 GR3244041-

2)、III 型胶原 (collagen 3, COL3) 抗体 (批号 GR3272398-8)、α-SMA 抗体 (批号 GR282976-24)，Abcam 公司；0.25%胰酶 (批号 20170427)、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, 批号 20170912)、高效 RIPA 细胞蛋白提取裂解液 (批号 20170815)，北京索莱宝生物技术有限责任公司。

1.5 仪器

WBP 无束缚小动物全身体积描记系统、FinePointe™ Series PFT System (BUXCO®公司，美国)，低温高速离心机 (Eppendorf 公司，德国)，ELX800UV 型酶标仪 (Bio Tek 公司，美国)，RM2145 型自动切片机 (Leica 公司，德国)，TissueLyser II 样品破碎系统 (Qiagen 公司，德国)，CK40 倒置相差显微镜 (Olympus 公司，日本)，生化培养箱 (上海精宏实验设备责任有限公司)，Milli Q Synthesls 超净纯水机 (Millipore 公司，美国)，IVC-II 型动物饲养笼具 (冯氏实验动物设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞模型建立及指标检测

A549 细胞采用 RPMI 1640 完全培养基 (含 10%胎牛血清) 培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。A549 细胞以 3×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中，24 h 后分为对照组、模型组 (7.5 ng/mL TGF-β1)、给药组 (7.5 ng/mL TGF-β1+候选组分)，每组 3 复孔。继续培养 48 h，离心收集上清培养液，用 ELISA 法检测上清中 α-SMA、纤连蛋白 (fibronectin, FN) 含量。每孔加 300 μL RIPA 细胞裂解液收集细胞蛋白，用于检测 E-cad 水平。

2.2 金水缓纤方各功效组内组分配比优化

基于文献报道与前期研究，选取 10 种中药组分作为金水缓纤方候选活性组分，并依据其来源中药功效分为不同功效组：补肾组 (淫羊藿苷和鲁斯可皂苷元)，化痰组 (3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、川陈皮素和贝母素甲)，活血组 (芍药苷和丹皮酚)，补气组 (人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁)，补肺组 (异甘草素)。其中补气、补肾和活血组含 2 种成分，采用组合法结合细胞模型活性评价优化其配比；化痰组含 3 种成分，采用正交设计结合细胞模型活性评价优化其配比；而补肺组含 1 种成分则不再优化。采用二甲基亚砜分别配制 10 种候选组分储备液，质量浓度分别为人参皂苷 Re 100 mg/mL、人参皂苷 Rb₁ 100 mg/mL、淫羊藿苷 100 mg/mL、鲁斯可皂苷元 50 mg/mL、芍药苷 100 mg/mL、丹皮酚 100 mg/mL、

3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇 100 mg/mL、川陈皮素 64 mg/mL、贝母素甲 100 mg/mL、异甘草素 20 mg/mL, 保存于-20 ℃备用。

2.3 金水缓纤方各功效组间配比优化

在各功效组内配比确定的基础上, 进一步优化组间配比, 采用正交设计结合细胞模型活性评价, 综合评分优化功效组间配比。

$$F(\alpha\text{-SMA}/\text{FN})=(M/X_n)/\max(M/X_1:M/X_{25})\times 100$$

$$F(\text{E-cad})=(X_n/M)/\max(X_1/M:X_{25}/M)\times 100$$

$$\text{综合评分}=[F(\alpha\text{-SMA})+F(\text{FN})+F(\text{E-cad})]/3$$

M 为模型组值, X_n 为药物干预值, $\max(X_1/M:X_{25}/M)$ 为 X_1/M 至 X_{25}/M 的最大值

2.4 肺纤维化大鼠模型建立、分组与给药

采用一次性气管内滴注博来霉素法建立肺纤维化大鼠模型。大鼠麻醉后, 对照组气管插管注射给

予生理盐水, 其余各组气管滴注给予博来霉素 (5 mg/kg), 随即轻旋大鼠, 置于恒温环境保持大鼠体温恒定, 待完全苏醒后回笼。将造模日定为第 0 天, 自第 29 天起 ig 给予相应药物。金水缓纤组分方 I 疗效评价: 对照组及模型组 ig 给予生理盐水 (2 mL/只); 吡非尼酮组 ig 给予吡非尼酮溶液 (108 mg/kg); 金水缓纤组分方 I 组给药剂量为 24.14、12.07、8.04、6.03、4.83 mg/kg。每组 6 只大鼠。

金水缓纤组分方 I 优化实验分组及给药: 对照组及模型组 ig 给予生理盐水 (2 mL/只); 吡非尼酮组 ig 给予吡非尼酮溶液 (108 mg/kg); 金水缓纤组分方 I 给予金水缓纤方 (3.18 g/kg); 金水缓纤组分方 I 及其各优化组药物配比见表 1, 按各组分方配比称取各组分, 按照 6 mL/kg 给药体积采用 5%羧甲基纤维素钠充分混悬各组分方。每组 6 只大鼠。

表 1 金水缓纤组分方 I 及其优化组的组分与给药剂量

Table 1 Composition and dosage of Jinshui Huanxian component formula I and its optimization group

组别	人参皂苷 Re/mg	淫羊藿苷/mg	异甘草素/mg	川陈皮素/mg	贝母素甲/mg	芍药苷/mg	剂量/(mg·kg ⁻¹)
组分方 I	3.082	3.85	0.308	0.077	0.482	0.241	8.04
优化组 1	0	3.85	0.308	0.077	0	0.241	4.48
优化组 2	0.385	3.85	0.308	0.077	0	0.241	4.86
优化组 3	0.771	3.85	0.308	0.077	0	0.241	5.25
优化组 4	0	3.85	0.308	0.077	0.241	0.241	4.72
优化组 5	0	3.85	0.308	0.077	0.482	0.241	4.96
优化组 6	0.385	3.85	0.308	0.077	0.241	0.241	5.10
优化组 7	0.771	3.85	0.308	0.077	0.241	0.241	5.49
优化组 8	0.385	3.85	0.308	0.077	0.482	0.241	5.34

2.5 肺指数及肺组织羟脯氨酸检测

给药至第 42 天, 各组大鼠 ip 1%戊巴比妥钠 (35 mg/kg), 腹主动脉放血处死大鼠。取大鼠全肺, 于生理盐水中洗净, 吸水纸吸净后称其湿质量, 计算肺指数 (肺质量/体质量)。

取肺组织 50 mg, 加 500 μL 提取溶液匀浆, 煮沸 3 h, 离心 (25 ℃、12 000×g、10 min), 使用滤头滤过杂质, 蒸馏水定容至 4 mL, 取上清, 检测 560 nm 处吸光度, 计算肺组织羟脯氨酸的含量。操作严格按照羟脯氨酸检测试剂盒说明书进行。

2.6 HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理变化

肺组织石蜡切片行常规 HE 染色和 Masson 染色, 光镜下观察肺组织病理学变化。依据 Szapiel 法针对肺泡炎及肺纤维化进行病理评分。HE 染色评分: 0 级, 无肺泡炎; I 级, 轻度肺泡炎, 肺泡间隔因细胞浸润增宽, 病变范围占全肺的 20%以下; II 级, 中度

肺泡炎, 病变范围超过全肺的 20%~50%; III 级, 弥漫性肺泡炎, 病变范围超过全肺 50%。MASSON 染色评分: 0 级, 无肺间质纤维化; I 级, 轻度肺间质纤维化, 受累范围少于全肺的 20%; II 级, 中度肺间质纤维化, 受累范围占全肺的 20%~50%, 肺泡结构紊乱; III 级, 重度肺间质纤维化, 受累范围超过全肺的 50%, 肺泡融合, 肺实质结构紊乱。

2.7 酶联免疫法检测 TGF-β、IL-13 和 COL1 水平

大鼠腹主动脉采血, 离心取上清, -80 ℃保存备用。采用 ELISA 试剂盒检测按操作说明书检测血清中 TGF-β、COL1、IL-13 水平。

2.8 免疫组化法检测 COL1、COL3 和 α-SMA 水平

肺组织石蜡切片行常规免疫组织化学染色, 检测 COL1、COL3 和 α-SMA, 采用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像采集及分析系统 (Media Cybernetics. Inc) 计算图像积分光密度 (integral optical density, IOD) 值。

2.9 R 值综合评价

采用 R 值综合评价法对羟脯氨酸含量, 肺组织病理 (HE 染色、MASSON 染色), 肺组织免疫组化 COL1、COL3 和 α -SMA 等指标进行 R 值计算。筛选与金水缓纤组分 I 等效的金水缓纤组分 II。

$$dM = (x_2 - x_1) / Z$$

$$Z = (s_1 + s_2) / 2$$

$$dMen = (x_n - x_2) / Z_n$$

$$Z_n = (s_n + s_2) / 2$$

$$R_n = dMen / dM$$

dM 表示疾病影响, x_1 为对照组平均值, x_2 为模型组平均值, s_1 为对照组标准差, s_2 为模型组标准差; dMen 表示药物作用, x_n 为第 n 个药物组平均值, s_n 为第 n 个药物组标准差; R_n 为第 n 个药物组 R 值

2.10 统计分析

采用 IBM SPSS22.0 统计软件进行数据分析。计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料重复测量数据采

用重复测量方差分析; 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 方差齐者采用最小显著差法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法, 显著性水准取 $\alpha = 0.05$, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 金水缓纤方的功效组内配伍优化

采用组合法设置补气组分 (人参皂苷 Re、Rb₁)、补肾组分 (淫羊藿苷和鲁斯可皂苷元)、活血组分 (芍药苷和丹皮酚) 的配比。活性评价结果显示, 补气组、补肾组、活血组及其各自配伍可不同程度抑制上皮细胞间质化。采用 R 值综合评价法评价各药物疗效强度, 结果显示, 补肾组淫羊藿苷、活血组芍药苷作用最优。补气组以人参皂苷 Re 80 $\mu\text{g/mL}$ 、Rb₁ 5 $\mu\text{g/mL}$ 组合作用最优, 人参皂苷 Re 20 $\mu\text{g/mL}$ 作用次之, 但两者之间无差异, 单体成分易于后续研究且成本较低, 因此选择人参皂苷 Re 作为补气组代表组分 (表 2~4)。

表 2 补气组分人参皂苷 Re、Rb₁ 不同配比对肺泡上皮细胞间质化影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of different proportions of ginsenoside Re and Rb₁ in tonifying qi components on interstitial differentiation of alveolar epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	人参皂苷 Re/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	人参皂苷 Rb ₁ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E-cad/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α -SMA/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FN/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	R 综合
对照	0	0	15.85 $\pm$ 0.38	0.45 $\pm$ 0.17	131.64 $\pm$ 17.20	
模型	0	0	1.25 $\pm$ 0.14 ^{##}	2.01 $\pm$ 0.20 ^{##}	491.39 $\pm$ 17.73 ^{##}	2.50 $\pm$ 0.00
1	160	0	1.40 $\pm$ 0.15	1.95 $\pm$ 0.24	488.67 $\pm$ 43.76	2.48 $\pm$ 0.01
2	80	0	1.42 $\pm$ 0.23	2.56 $\pm$ 0.28*	414.13 $\pm$ 16.33*	2.51 $\pm$ 0.25
3	40	0	1.30 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.10*	412.74 $\pm$ 22.25*	2.06 $\pm$ 0.60
4	20	0	1.09 $\pm$ 0.06	1.40 $\pm$ 0.17	147.02 $\pm$ 8.78**	1.96 $\pm$ 0.66
5	10	0	1.42 $\pm$ 0.003	2.30 $\pm$ 0.20*	169.17 $\pm$ 11.15**	2.18 $\pm$ 0.67
6	0	80	1.26 $\pm$ 0.07	1.64 $\pm$ 0.06**	320.29 $\pm$ 19.31*	2.24 $\pm$ 0.23
7	0	40	1.92 $\pm$ 0.06**	1.47 $\pm$ 0.05	671.71 $\pm$ 19.78*	2.45 $\pm$ 0.49
8	0	20	1.63 $\pm$ 0.21	3.58 $\pm$ 0.18*	288.29 $\pm$ 13.02**	2.60 $\pm$ 0.82
9	0	10	1.42 $\pm$ 0.17	2.43 $\pm$ 0.27**	196.88 $\pm$ 18.76**	2.30 $\pm$ 0.52
10	0	5	1.44 $\pm$ 0.02	2.90 $\pm$ 0.04**	202.93 $\pm$ 8.39**	2.42 $\pm$ 0.98
11	80	40	1.25 $\pm$ 0.04	1.73 $\pm$ 0.13*	478.56 $\pm$ 29.58	2.42 $\pm$ 0.11
12	80	20	1.45 $\pm$ 0.04	1.33 $\pm$ 0.16	393.12 $\pm$ 43.77	2.29 $\pm$ 0.21
13	80	10	1.39 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.14	346.05 $\pm$ 25.07*	2.27 $\pm$ 0.18
14	80	5	1.43 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.07	371.34 $\pm$ 8.63**	1.90 $\pm$ 0.67
15	40	40	1.56 $\pm$ 0.14	1.18 $\pm$ 0.28	473.23 $\pm$ 13.07	2.33 $\pm$ 0.21
16	40	20	1.53 $\pm$ 0.20	1.06 $\pm$ 0.03	715.77 $\pm$ 19.84**	2.36 $\pm$ 0.79
17	40	10	1.29 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.11**	473.23 $\pm$ 22.99	2.38 $\pm$ 0.17
18	40	5	1.37 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.18**	615.73 $\pm$ 60.69	2.34 $\pm$ 0.40
19	20	40	1.20 $\pm$ 0.08	1.71 $\pm$ 0.02*	596.28 $\pm$ 24.04*	2.48 $\pm$ 0.28
20	20	20	1.10 $\pm$ 0.06	1.39 $\pm$ 0.01	432.05 $\pm$ 37.44	2.24 $\pm$ 0.39
21	20	10	1.11 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.13*	351.79 $\pm$ 37.82*	2.13 $\pm$ 0.48
22	20	5	1.16 $\pm$ 0.07**	1.03 $\pm$ 0.08	419.33 $\pm$ 20.07	2.17 $\pm$ 0.44
23	10	40	1.24 $\pm$ 0.09	2.51 $\pm$ 0.14	419.81 $\pm$ 30.47	2.57 $\pm$ 0.25
24	10	20	1.40 $\pm$ 0.05**	2.79 $\pm$ 0.12	439.95 $\pm$ 32.09	2.65 $\pm$ 0.37
25	10	10	1.31 $\pm$ 0.08	1.80 $\pm$ 0.56	382.75 $\pm$ 18.51	2.38 $\pm$ 0.15
26	10	5	1.03 $\pm$ 0.08	2.08 $\pm$ 0.75	404.68 $\pm$ 7.04	2.40 $\pm$ 0.21

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 补肾组分淫羊藿苷、鲁斯可皂苷元不同配比对肺泡上皮细胞间质化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effects of different proportions of icarin and ruscogenin in tonifying kidney components on interstitial differentiation of alveolar epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	淫羊藿苷/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	鲁斯可皂苷元/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E-cad/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α -SMA/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FN/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	R _{综合}
对照	0	0	8.72 $\pm$ 0.59	0.17 $\pm$ 0.03	126.15 $\pm$ 9.94	
模型	0	0	2.05 $\pm$ 0.03 ^{##}	5.29 $\pm$ 0.36 ^{##}	168.68 $\pm$ 8.68 ^{##}	2.50 $\pm$ 0.00
1	6.3	1.3	2.15 $\pm$ 0.15	3.93 $\pm$ 0.56 [*]	162.97 $\pm$ 11.12	2.40 $\pm$ 0.04
2	6.3	2.5	1.33 $\pm$ 0.19 ^{**}	3.58 $\pm$ 0.28 ^{**}	164.34 $\pm$ 29.09	2.52 $\pm$ 0.26
3	6.3	5.0	1.26 $\pm$ 0.05 ^{**}	4.48 $\pm$ 0.21 [*]	208.94 $\pm$ 13.21 [*]	3.04 $\pm$ 0.56
4	6.3	10.0	1.61 $\pm$ 0.05 ^{**}	4.30 $\pm$ 0.46 [*]	211.14 $\pm$ 24.61 [*]	2.83 $\pm$ 0.36
5	13.0	1.3	0.44 $\pm$ 0.04 ^{**}	4.64 $\pm$ 0.84	182.02 $\pm$ 21.68	3.26 $\pm$ 1.20
6	13.0	2.5	1.36 $\pm$ 0.16 ^{**}	3.65 $\pm$ 0.44 ^{**}	163.51 $\pm$ 6.38	2.51 $\pm$ 0.28
7	13.0	5.0	1.15 $\pm$ 0.13 ^{**}	3.11 $\pm$ 0.29 ^{**}	192.48 $\pm$ 11.82 [*]	2.76 $\pm$ 0.45
8	13.0	10.0	1.65 $\pm$ 0.26	3.04 $\pm$ 0.42 ^{**}	205.84 $\pm$ 27.58	2.62 $\pm$ 0.33
9	25.0	1.3	2.16 $\pm$ 0.26	4.05 $\pm$ 0.21 ^{**}	209.71 $\pm$ 11.77 ^{**}	2.73 $\pm$ 0.57
10	25.0	2.5	1.10 $\pm$ 0.06 ^{**}	3.03 $\pm$ 0.49 ^{**}	126.31 $\pm$ 12.47 ^{**}	2.47 $\pm$ 0.94
11	25.0	5.0	1.71 $\pm$ 0.09 ^{**}	4.18 $\pm$ 0.38 [*]	143.86 $\pm$ 18.30	2.42 $\pm$ 0.33
12	25.0	10.0	1.21 $\pm$ 0.35 [*]	2.63 $\pm$ 0.27 ^{**}	143.62 $\pm$ 7.31 [*]	2.23 $\pm$ 0.45
13	50.0	1.3	1.56 $\pm$ 0.09 ^{**}	3.07 $\pm$ 0.43 ^{**}	182.24 $\pm$ 36.95	2.60 $\pm$ 0.30
14	50.0	2.5	1.46 $\pm$ 0.13 ^{**}	2.82 $\pm$ 0.79 ^{**}	175.61 $\pm$ 33.93	2.58 $\pm$ 0.25
15	50.0	5.0	1.33 $\pm$ 0.03 ^{**}	3.21 $\pm$ 0.23 ^{**}	204.25 $\pm$ 26.15	2.93 $\pm$ 0.69
16	50.0	10.0	1.35 $\pm$ 0.17 ^{**}	2.72 $\pm$ 0.32 ^{**}	166.44 $\pm$ 22.52	2.50 $\pm$ 0.31
17	6.3	0	1.65 $\pm$ 0.10 ^{**}	4.51 $\pm$ 0.01	137.12 $\pm$ 9.01 [*]	2.28 $\pm$ 0.54
18	13.0	0	1.59 $\pm$ 0.45	5.39 $\pm$ 0.12	158.07 $\pm$ 33.41	2.50 $\pm$ 0.10
19	25.0	0	1.63 $\pm$ 0.21 [*]	5.01 $\pm$ 0.09	140.84 $\pm$ 4.93 ^{**}	2.24 $\pm$ 0.56
20	50.0	0	1.44 $\pm$ 0.18 ^{**}	4.45 $\pm$ 0.83	184.35 $\pm$ 13.57	2.67 $\pm$ 0.20
21	100.0	0	1.68 $\pm$ 0.29	2.40 $\pm$ 0.25 ^{**}	114.49 $\pm$ 1.82 ^{**}	1.66 $\pm$ 1.25
22	0	1.3	1.86 $\pm$ 0.14	5.96 $\pm$ 0.30	160.54 $\pm$ 10.92	2.50 $\pm$ 0.16
23	0	2.5	1.83 $\pm$ 0.29	4.38 $\pm$ 0.32	144.35 $\pm$ 31.23	2.40 $\pm$ 0.17
24	0	5.0	1.25 $\pm$ 0.10 ^{**}	4.63 $\pm$ 0.42	130.26 $\pm$ 9.48 ^{**}	2.36 $\pm$ 0.75
25	0	10.0	2.13 $\pm$ 0.14	4.49 $\pm$ 0.04	137.36 $\pm$ 13.51 [*]	2.23 $\pm$ 0.31
26	0	20.0	1.31 $\pm$ 0.31 [*]	4.26 $\pm$ 1.30	137.63 $\pm$ 9.42 [*]	2.30 $\pm$ 0.49

采用 6 因素 5 水平正交设计表 $L_{25}(5^6)$ 设置化痰组栝楼三醇、川陈皮素、贝母素甲的分组。结果显示,栝楼三醇、川陈皮素、贝母素甲及其配伍可有效抑制上皮细胞间质化(表 5);正交设计分析显示,化痰组最优组合方案为 $A_0B_2C_{12.5}$,即栝楼三醇 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、川陈皮素 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、贝母素甲 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 6)。

3.2 功效组间配伍优化

根据以上结果,将补肾组(淫羊藿苷)、化痰组[川陈皮素-贝母素甲(2:12.5)]、活血组(芍药苷)、益气组(人参皂苷 Re)、补肺组(异甘草素)共 5

组进行正交设计,采用 6 因素 5 水平正交设计表 $L_{25}(5^6)$,基于上皮细胞间质化模型优化各组间配比(表 7),从中优化获得金水缓纤组分方 I。结果显示,各组配伍可不同程度抑制上皮细胞间质化(表 8),各组最优组合方案为 $A_5B_2C_1D_5E_4$,即金水缓纤组分方 I 的各功效组最佳配比:补肾组(淫羊藿苷)-化痰组[川陈皮素-贝母素甲(2:12.5)]-活血组(芍药苷)-补气组(人参皂苷 Re)-补肺组(异甘草素)为 100:(2:12.5):6.25:80:8(表 8)。

3.3 金水缓纤组分方 I 对肺纤维化大鼠的疗效评价

3.3.1 金水缓纤组分方 I 对肺纤维化大鼠肺组织病

表 4 活血组分丹皮酚、芍药苷对肺泡上皮细胞间质化影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effects of different proportions of paeonol and paeoniflorin in activating blood components on interstitial differentiation of alveolar epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	芍药苷/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	丹皮酚/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E-cad/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α -SMA/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FN/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	R _{综合}
对照	0	0	1.79 ± 0.04	0.19 ± 0.02	1.16 ± 0.54	
模型	0	0	$0.19 \pm 0.01^{##}$	$2.48 \pm 0.26^{##}$	$3.72 \pm 0.27^{##}$	2.50 ± 0.00
1	12.5	3.13	$0.34 \pm 0.03^{**}$	3.45 ± 0.32	$6.15 \pm 0.39^{**}$	2.92 ± 0.67
2	12.5	6.25	0.17 ± 0.02	$3.10 \pm 0.06^*$	$5.54 \pm 0.34^{**}$	2.90 ± 0.48
3	12.5	12.50	$0.15 \pm 0.01^*$	$2.97 \pm 0.12^*$	$6.05 \pm 0.41^{**}$	2.93 ± 0.56
4	12.5	25.00	$0.09 \pm 0.01^{**}$	2.51 ± 0.04	3.56 ± 0.09	2.51 ± 0.15
5	25.0	3.13	$0.11 \pm 0.004^{**}$	$3.22 \pm 0.21^*$	$5.31 \pm 0.11^{**}$	3.07 ± 0.66
6	25.0	6.25	$0.12 \pm 0.01^{**}$	$3.74 \pm 0.17^{**}$	$6.34 \pm 0.37^{**}$	3.09 ± 0.63
7	25.0	12.5	$0.09 \pm 0.001^{**}$	3.04 ± 0.30	$4.50 \pm 0.28^*$	2.79 ± 0.16
8	25.0	25.00	$0.09 \pm 0.002^{**}$	$2.95 \pm 0.13^*$	$5.49 \pm 0.62^{**}$	2.85 ± 0.25
9	50.0	3.13	0.24 ± 0.04	$3.70 \pm 0.08^{**}$	$5.53 \pm 0.12^{**}$	3.13 ± 0.77
10	50.0	6.25	$0.27 \pm 0.02^*$	$3.58 \pm 0.29^{**}$	$4.31 \pm 0.14^*$	2.71 ± 0.27
11	50.0	12.50	0.23 ± 0.06	$3.18 \pm 0.10^*$	3.96 ± 0.77	2.60 ± 0.13
12	50.0	25.00	$0.10 \pm 0.01^{**}$	2.75 ± 0.07	3.92 ± 0.39	2.61 ± 0.02
13	100.0	3.13	$0.09 \pm 0.01^{**}$	2.76 ± 0.23	$4.81 \pm 0.36^*$	2.76 ± 0.25
14	100.0	6.25	$0.10 \pm 0.02^{**}$	2.51 ± 0.03	3.90 ± 0.77	2.55 ± 0.04
15	100.0	12.50	$0.11 \pm 0.02^*$	2.54 ± 0.05	3.69 ± 0.12	2.53 ± 0.05
16	100.0	25.00	$0.11 \pm 0.01^{**}$	2.40 ± 0.15	3.73 ± 0.48	2.54 ± 0.08
17	13.0	0	$0.30 \pm 0.03^*$	$1.86 \pm 0.12^*$	$2.70 \pm 0.12^{**}$	2.13 ± 0.40
18	25.0	0	$0.31 \pm 0.03^*$	1.73 ± 0.44	$2.88 \pm 0.33^*$	2.28 ± 0.19
19	50.0	0	0.23 ± 0.02	2.12 ± 0.10	$2.67 \pm 0.31^*$	2.25 ± 0.29
20	100.0	0	0.24 ± 0.02	2.63 ± 0.17	$2.44 \pm 0.20^*$	2.21 ± 0.50
21	0	3.13	0.20 ± 0.05	$2.95 \pm 0.09^*$	$2.63 \pm 0.29^*$	2.35 ± 0.41
22	0	6.25	$0.10 \pm 0.01^{**}$	3.28 ± 0.84	3.00 ± 0.43	2.47 ± 0.26
23	0	12.50	0.11 ± 0.02	2.54 ± 0.09	3.45 ± 0.19	2.47 ± 0.14
24	0	25.00	0.11 ± 0.01	2.47 ± 0.09	2.81 ± 0.28	2.38 ± 0.36
25	0	50.00	$0.04 \pm 0.00^{**}$	4.92 ± 2.22	2.13 ± 0.11	2.23 ± 0.92

理和肺功能的影响 大鼠肺组织 HE 染色显示, 模型组大鼠可见肺泡结构破坏, 肺泡间隔增厚, 炎性细胞浸润; 与模型组比较, 金水缓纤组分方 I 可显著改善其病理变化, 肺泡结构较为完整, 炎症减轻; 吡非尼酮也可改善其病理变化。Masson 染色显示, 与对照组比较, 模型组肺泡隔胶原沉积明显; 与模型组比较, 金水缓纤组分方 I 肺胶原沉积明显减少; 吡非尼酮也可降低胶原沉积, 改善病理变化。与对照组比较, 模型组大鼠的肺指数明显升高 ($P < 0.01$), 而金水缓纤组分方 I 各剂量与吡非尼酮可明显降低肺指数 ($P < 0.05$) (图 1-A)。

3.3.2 金水缓纤组分方 I 对肺纤维化大鼠肺组织胶原、纤维化因子及血清炎症因子水平的影响 与

对照组比较, 模型组大鼠肺组织羟脯氨酸与 COL1 水平显著升高 ($P < 0.01$), 而高剂量金水缓纤组分方 I 与吡非尼酮可明显降低羟脯氨酸含量 ($P < 0.01$), 见图 1-B。各剂量金水缓纤组分方 I 均可降低 COL1 水平 ($P < 0.05$), 见图 1-C。此外, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TGF- β 和 IL-13 水平显著升高 ($P < 0.01$), 各剂量金水缓纤组分方 I 均可明显降低 TGF- β 和 IL-13 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 1-D、E。

3.4 基于肺纤维化大鼠疗效的金水缓纤组分方 I 的配伍优化

3.4.1 金水缓纤组分方 I 优化组对肺纤维化大鼠肺组织病理与肺功能的影响 HE 和 Masson 染色结果显示, 模型组大鼠可见肺泡结构破坏, 肺泡间隔增

表 5 化痰组不同配比对肺泡上皮细胞间质化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of different proportions of resolving phlegm components on interstitial differentiation of alveolar epithelial cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	栝楼三醇/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	川陈皮素/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	贝母素甲/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E-cad/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α -SMA/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FN/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	0	0	0	6.48 ± 0.26	0.10 ± 0.01	109.27 ± 6.51
模型	0	0	0	$1.66 \pm 0.28^{##}$	$6.01 \pm 0.36^{##}$	$139.05 \pm 3.48^{\#}$
1	0	0	0	1.88 ± 0.33	6.02 ± 0.19	138.75 ± 5.24
2	0	2	12.5	$2.34 \pm 0.16^*$	$0.60 \pm 0.07^{**}$	$112.12 \pm 8.88^{**}$
3	0	4	25.0	$2.13 \pm 0.05^*$	$0.93 \pm 0.13^{**}$	$106.29 \pm 8.42^{**}$
4	0	6	50.0	1.88 ± 0.38	$2.01 \pm 0.23^{**}$	$108.13 \pm 5.68^{**}$
5	0	8	100.0	$1.74 \pm 0.08^*$	$1.54 \pm 0.15^{**}$	$111.05 \pm 9.27^{**}$
6	6.25	0	12.5	2.12 ± 0.26	$3.41 \pm 0.49^{**}$	121.12 ± 12.23
7	6.25	2	25.0	1.90 ± 0.29	$2.00 \pm 0.33^{**}$	$120.68 \pm 6.66^*$
8	6.25	4	50.0	1.55 ± 0.18	$3.48 \pm 0.27^{**}$	$113.48 \pm 6.75^{**}$
9	6.25	6	100.0	$2.29 \pm 0.23^*$	$2.99 \pm 0.48^{**}$	$105.22 \pm 11.43^{**}$
10	6.25	8	0	1.83 ± 0.38	$1.56 \pm 0.18^{**}$	$113.20 \pm 13.74^*$
11	12.50	0	25.0	1.97 ± 0.04	$4.06 \pm 0.82^*$	$108.74 \pm 6.60^{**}$
12	12.50	2	50.0	2.05 ± 0.21	$3.51 \pm 0.16^{**}$	$111.29 \pm 3.92^{**}$
13	12.50	4	100.0	1.85 ± 0.54	$2.25 \pm 0.14^{**}$	$110.47 \pm 3.64^{**}$
14	12.50	6	0	1.46 ± 0.21	$2.57 \pm 0.46^{**}$	120.92 ± 14.36
15	12.50	8	12.5	1.56 ± 0.27	$3.39 \pm 0.36^{**}$	$102.92 \pm 4.82^{**}$
16	25.00	0	50.0	1.99 ± 0.57	$3.24 \pm 0.56^{**}$	$113.58 \pm 1.84^{**}$
17	25.00	2	100.0	2.00 ± 0.27	$3.81 \pm 0.13^{**}$	$110.70 \pm 6.24^{**}$
18	25.00	4	0	2.08 ± 0.17	$3.00 \pm 0.35^{**}$	$112.76 \pm 4.03^{**}$
19	25.00	6	12.5	1.57 ± 0.19	$3.70 \pm 0.44^{**}$	$114.66 \pm 5.84^{**}$
20	25.00	8	25.0	1.33 ± 0.35	$3.31 \pm 0.15^{**}$	$107.71 \pm 9.87^{**}$
21	50.00	0	100.0	1.43 ± 0.28	$3.85 \pm 0.27^{**}$	$106.67 \pm 3.28^{**}$
22	50.00	2	0	0.93 ± 0.52	$2.80 \pm 0.66^{**}$	124.47 ± 10.79
23	50.00	4	12.5	1.38 ± 0.15	$1.48 \pm 0.35^*$	147.97 ± 13.54
24	50.00	6	25.0	1.08 ± 0.60	$1.33 \pm 0.35^*$	125.85 ± 18.31
25	50.00	8	50.0	1.62 ± 0.14	$1.18 \pm 0.01^*$	109.31 ± 14.63

表 6 化痰组正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal test of resolving phlegm group

实验号	栝楼三醇/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (A)	川陈皮素/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (B)	贝母素甲/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (C)	空白 (D)	空白 (E)	空白 (F)	综合评分
1	0	0	0	1	1	1	51.93
2	0	2	12.5	2	2	2	97.27
3	0	4	25.0	3	3	3	84.22
4	0	6	50.0	4	4	4	68.32
5	0	8	100.0	5	5	5	68.59
6	6.25	0	12.5	3	4	5	64.36
7	6.25	2	25.0	4	5	1	65.36
8	6.25	4	50.0	5	1	2	57.95
9	6.25	6	100.0	1	2	3	71.87
10	6.25	8	0	2	3	4	69.16

续表 6

实验号	栝楼三醇/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (A)	川陈皮素/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B)	贝母素甲/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (C)	空白 (D)	空白 (E)	空白 (F)	综合评分
11	12.50	0	25.0	5	2	4	64.51
12	12.50	2	50.0	1	3	5	65.63
13	12.50	4	100.0	2	4	1	66.18
14	12.50	6	0	3	5	2	56.89
15	12.50	8	12.5	4	1	3	60.56
16	25.00	0	50.0	2	5	3	64.59
17	25.00	2	100.0	3	1	4	64.70
18	25.00	4	0	4	2	5	66.65
19	25.00	6	12.5	5	3	1	57.64
20	25.00	8	25.0	1	4	3	56.74
21	50.00	0	100.0	4	3	2	57.61
22	50.00	2	0	5	4	3	47.94
23	50.00	4	12.5	1	5	4	56.26
24	50.00	6	25.0	2	1	5	57.70
25	50.00	8	50.0	3	2	1	71.25
K_1	74.07	60.60	58.53	60.49	58.57	62.47	
K_2	65.74	68.18	67.22	70.98	74.31	53.96	
K_3	62.77	66.25	65.71	68.30	66.85	77.18	
K_4	62.06	62.50	65.55	63.70	60.71	64.59	
K_5	58.15	65.26	65.79	59.33	62.36	64.59	
R	15.91	7.58	8.69	11.65	15.74	23.22	

表 7 各组间配比 $L_{25}(5^6)$ 正交设计Table 7 $L_{25}(5^6)$ orthogonal design of proportions between each group

水平	补肾组 淫羊藿苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (A)	化痰组 川陈皮素-贝 母素甲 (B)	活血组 芍药苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (C)	补气组 人参皂苷 Re/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (D)	补肺组 异甘草素/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (E)
1	6.25	1 : 6.25	6.25	5	0
2	12.50	2 : 12.5	12.50	10	1
3	25.00	4 : 25	25.00	20	2
4	50.00	8 : 50	50.00	40	3
5	100.00	16 : 100	100.00	80	4

表 8 各组间配比正交设计结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Results of orthogonal test of proportions between each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	补肾 (A)	化痰 (B)	活血 (C)	补气 (D)	甘草 (E)	空白 (F)	E-cad/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	α -SMA/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	FN/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	综合评分
对照							5.42 $\pm$ 0.32	3.95 $\pm$ 0.41	184.85 $\pm$ 6.49	
模型							1.14 $\pm$ 0.04 ^{###}	21.96 $\pm$ 0.64 ^{###}	284.09 $\pm$ 11.30 ^{###}	
1	1	1	1	1	1	1	2.16 $\pm$ 0.22 ^{**}	13.55 $\pm$ 0.50 ^{**}	190.36 $\pm$ 9.31 ^{**}	56.78
2	1	2	2	2	2	2	2.56 $\pm$ 0.17 ^{**}	9.58 $\pm$ 0.24 ^{**}	166.59 $\pm$ 3.46 ^{***}	70.89
3	1	3	3	3	3	3	1.59 $\pm$ 0.07 ^{**}	8.41 $\pm$ 0.26 ^{**}	205.08 $\pm$ 4.40 ^{**}	59.33
4	1	4	4	4	4	4	1.77 $\pm$ 0.11 ^{**}	7.58 $\pm$ 0.39 ^{**}	122.25 $\pm$ 3.44 ^{**}	71.75

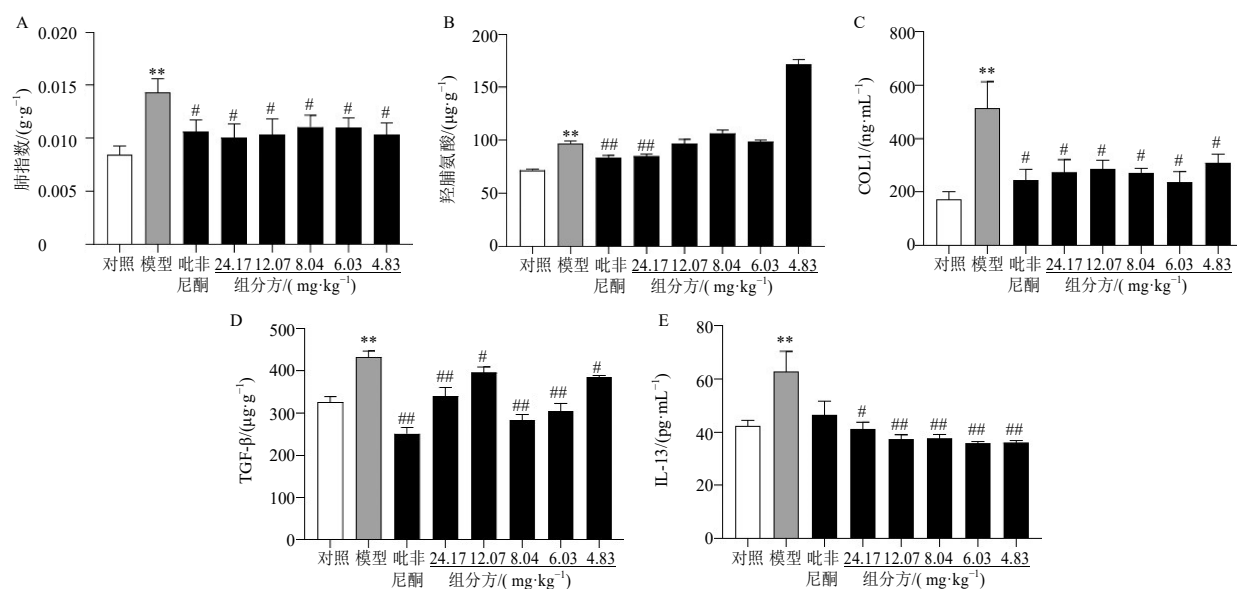
续表 8

组别	补肾 (A)	化痰 (B)	活血 (C)	补气 (D)	甘草 (E)	空白 (F)	E-cad/(ng·mL ⁻¹)	α -SMA/(pg·mL ⁻¹)	FN/(ng·mL ⁻¹)	综合评分
5	1	5	5	5	5	5	1.67±0.05**	9.16±0.47**	92.68±4.67**	70.53
6	2	1	2	3	4	5	1.44±0.12**	10.02±0.93**	94.46±5.02**	64.77
7	2	2	3	4	5	1	1.88±0.02**	8.30±1.05**	126.94±2.43**	69.79
8	2	3	4	5	1	2	1.62±0.03**	8.95±0.65**	90.84±15.45**	70.97
9	2	4	5	1	2	3	1.71±0.15**	9.25±0.50**	185.23±5.95**	59.51
10	2	5	1	2	3	4	1.95±0.13**	8.78±0.74**	120.46±5.51**	70.06
11	3	1	3	5	2	4	2.26±0.32**	9.54±0.53**	150.71±113.26	68.47
12	3	2	4	1	3	5	1.87±0.10**	8.63±0.62**	104.90±3.65**	72.06
13	3	3	5	2	4	1	1.93±0.06**	7.49±0.34**	99.27±4.31**	78.23
14	3	4	1	3	5	2	1.23±0.12	9.24±0.74**	86.68±6.02**	66.06
15	3	5	2	4	1	3	1.44±0.19	11.63±0.66**	106.19±36.11**	59.06
16	4	1	4	2	5	3	1.06±0.15	9.36±0.39**	111.28±3.45**	58.18
17	4	2	5	3	1	4	1.82±0.15**	7.99±0.99**	108.60±5.21**	72.97
18	4	3	1	4	2	5	1.78±0.02**	8.50±0.70**	97.35±3.86**	72.89
19	4	4	2	5	3	1	1.68±0.04**	7.68±0.20**	102.42±6.03**	73.51
20	4	5	3	1	4	3	1.68±0.37	7.54±0.25**	100.50±3.95**	74.53
21	5	1	5	4	3	2	1.68±0.27*	8.58±3.05**	97.90±12.48**	71.24
22	5	2	1	5	4	3	1.67±0.11**	7.18±0.51**	62.93±1.89**	88.44
23	5	3	2	1	5	4	1.57±0.22	8.93±0.39**	78.77±12.44	73.92
24	5	4	3	2	1	5	1.35±0.06*	10.36±0.60**	105.40±2.85**	60.58
25	5	5	4	3	2	1	1.80±0.00	8.16±1.67	91.97±14.28*	75.52
K ₁	65.856	63.888	70.846	67.360	64.072	70.766				
K ₂	67.020	74.830	68.430	67.588	69.456	55.832				
K ₃	68.776	71.068	66.540	67.730	69.240	79.810				
K ₄	70.416	66.282	69.696	68.946	75.544	71.434				
K ₅	73.940	69.940	70.496	74.384	67.696	68.166				
R	8.084	10.942	4.306	7.024	11.472	23.978				

厚, 炎性细胞浸润, 肺泡隔胶原沉积明显; 与模型组比较, 金水缓纤组分方 I 及其各优化组可不同程度改善其病理变化, 保护肺泡结构, 减轻炎症, 降低胶原沉积。病理评分结果显示, 金水缓纤组分方 I 优化组 1 和 4 可显著降低 HE 染色病理评分 (图 2-A); 优化组 4、7、8 可显著降低 Masson 染色病理评分 (图 2-B)。与对照组比较, 模型组大鼠的肺指数明显升高 ($P<0.05$), 而金水缓纤组分方 I 及其优化组 1、4、8 可明显降低肺指数 ($P<0.05$), 见图 3-A。

3.4.2 金水缓纤组分方 I 优化组对肺纤维化大鼠肺

组织胶原和纤维化因子水平的影响 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织中羟脯氨酸、COL1、COL3、 α -SMA 水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 金水缓纤方、金水缓纤组分方 I 和各优化组可不同程度地降低羟脯氨酸、COL1、COL3、 α -SMA 水平: 优化组分方 4、5 显著降低羟脯氨酸和 COL1 水平 ($P<0.05$ 、0.01); 金水缓纤方、金水缓纤组分方 I 和优化组分方 4、5、7 显著降低 COL3 水平 ($P<0.05$ 、0.01); 金水缓纤方、金水缓纤组分方 I 和优化组分方 1、3、4、7、8 显著降低 α -SMA 水平 ($P<0.05$ 、0.01), 见图 3-B 和图 4。

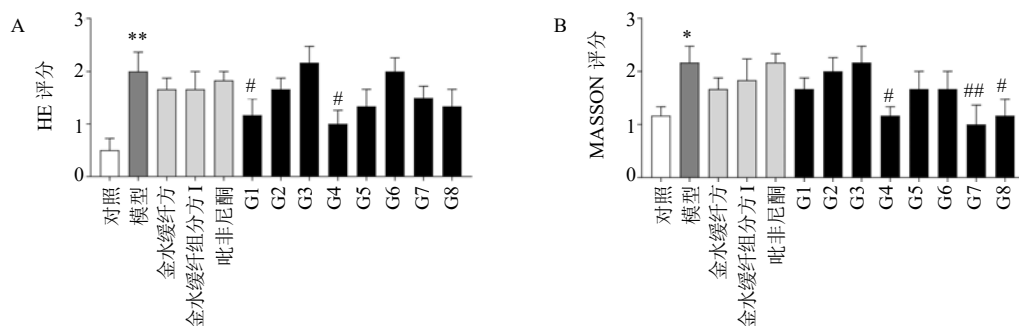


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 2~5 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below fig. 2~5

图 1 金水缓纤组分方 I 对肺纤维化大鼠肺指数 (A)、肺组织胶原蛋白及纤维化因子 (B、C) 及血清炎症因子 (D、E) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Jinshui Huanxian component formula I on lung index (A), lung tissue collagen and fibrosis factor (B, C) and serum inflammatory factor (D, E) levels of pulmonary fibrosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



G1~G8 分别表示金水缓纤组分方 I 的优化组分方 1~8, 下图同 A-HE B-Masson

G1—G8 represent the optimized components 1—8 of Jinshui Huanxian component formula I, respectively, same as below A-HE B-Masson

图 2 金水缓纤组分方 I 及其优化组分方对肺纤维化大鼠肺组织病理的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Jinshui Huanxian component formula I and its optimized component formula on lung histopathology of pulmonary fibrosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4.3 金水缓纤组分方 I 及其各优化组对肺纤维化大鼠疗效综合评价 采用 R 值综合评价法评价各优化组对 HE、Maason、胶原表达等疗效指标的影响。结果显示, 与模型组比较, 金水缓纤方、金水缓纤组分方 I 及其各优化组分方均可显著降低 R 值 (图 6)。其中优化组分方 4 的 R 值最低, 故选择优化组分方 4 作为金水缓纤组分 II。

4 讨论

“正虚络痹积损”为肺纤维化主要病机, 基于此

拟定的金水缓纤方具有补益肺肾、活血化痰的作用; 可明显改善患者临床症状、减缓病情进展、提高生存质量^[6]。本研究以金水缓纤方为示范, 建立了组分配伍方剂研究技术方法: 基于文献调研筛选金水缓纤方候选有效组分, 将有效组分按来源中药的功效进行分组, 采用组合、正交设计方法结合关键病理变化细胞模型的疗效评价, 依次优化各功效组内、组间配比; 基于肺纤维化大鼠模型进行疗效评价, 获得疗效明显的金水缓纤组分 I, 并进行组分配伍

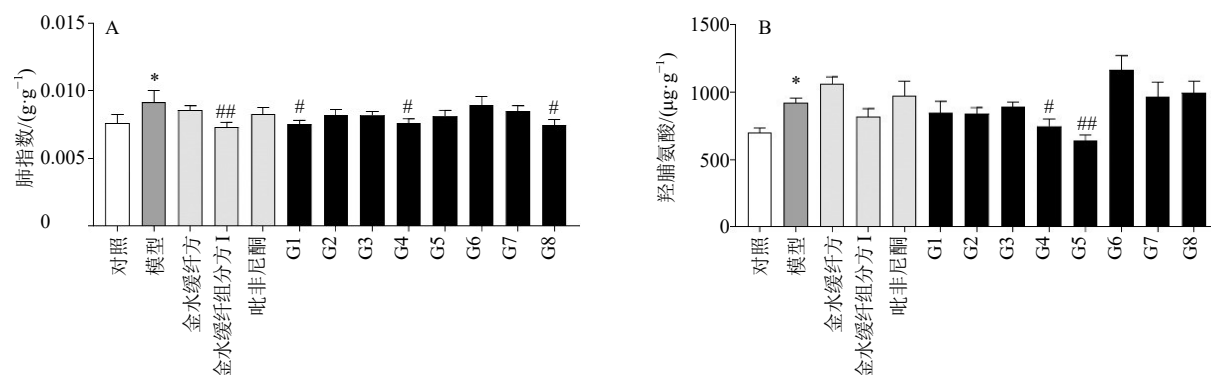


图 3 金水缓纤组分 I 及其优化组分方对肺纤维化大鼠肺指数 (A) 和羟脯氨酸含量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effect of Jinshui Huanxian component formula I and its optimized component formula on lung coefficient (A) and hydroxyproline (B) of pulmonary fibrosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

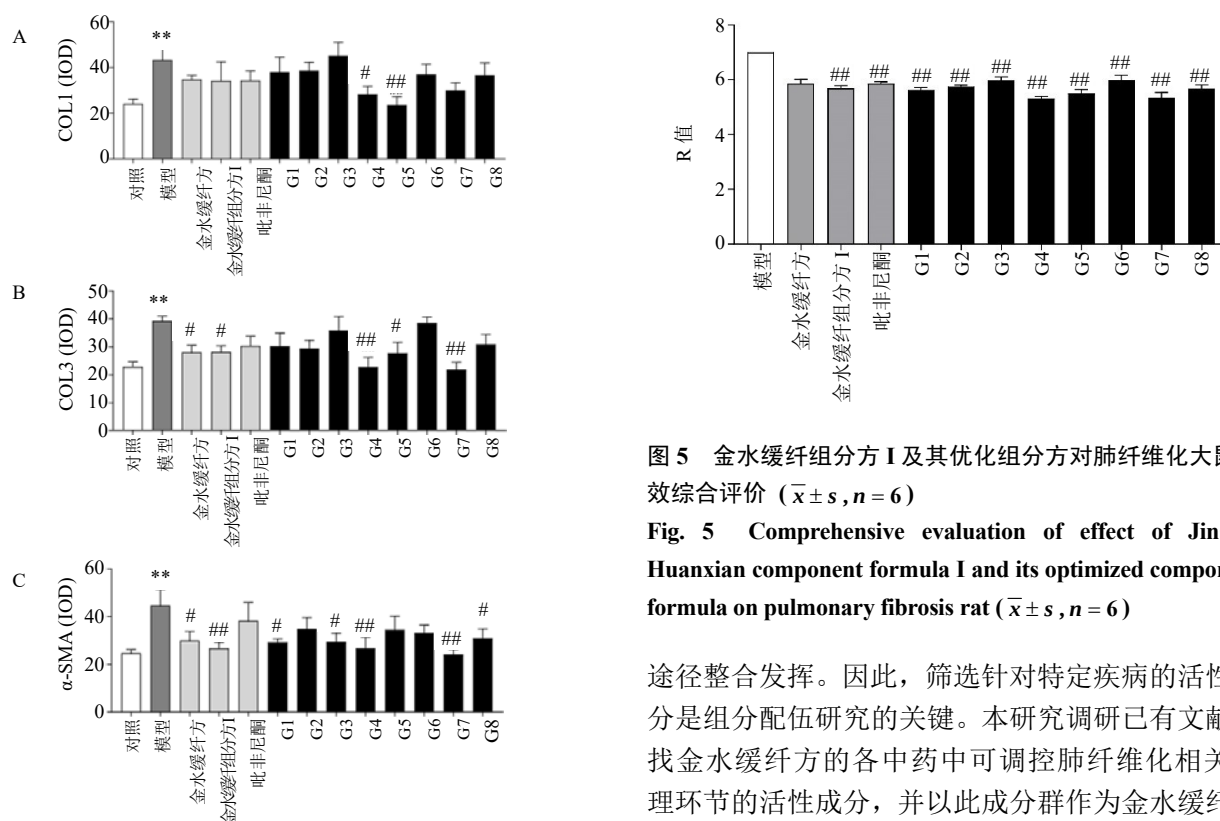


图 4 金水缓纤组分 I 及其优化组分方对肺纤维化大鼠肺组织胶原 (A、B) 与 α-SMA (C) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 4 Effect of Jinshui Huanxian component formula I and its optimized component formula on collagen (A, B) and α-SMA (C) of pulmonary fibrosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

优化, 获得与金水缓纤方、金水缓纤组分 I 疗效相当的金水缓纤组分方 II。

现代中药研究表明, 中药成分化学成分众多, 其中包括生物活性成分和无效成分。而中药复方的疗效物质即是由生物活性成分群构成, 针对特定疾病的疗效可由特定生物活性成分介导的多靶点、多

图 5 金水缓纤组分 I 及其优化组分方对肺纤维化大鼠疗效综合评价 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 5 Comprehensive evaluation of effect of Jinshui Huanxian component formula I and its optimized component formula on pulmonary fibrosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

途径整合发挥。因此, 筛选针对特定疾病的活性成分是组分配伍研究的关键。本研究调研已有文献查找金水缓纤方的各中药中可调控肺纤维化相关病理环节的活性成分, 并以此成分群作为金水缓纤方治疗肺纤维化潜在活性成分。

中药组分活性评价方法是明确活性组分和优化组分配伍配比的重要手段。目前主要在分子、细胞和整体水平开展中药组分活性评价。从实验效率和性价比角度考虑, 细胞水平的活性评价更适宜于中药活性成分的筛选^[11]。上皮间质转化是上皮细胞逐渐向间充质样细胞转化, 丧失上皮细胞功能特性而获得间质细胞特性的过程。肺纤维化患者的 II 型肺泡上皮细胞增殖和分化为 I 型肺泡上皮细胞的能力降低, 并向间质细胞分化分泌多种促纤维化因子^[12-13]。本研究基于前期建立的肺泡上皮细胞间质化模型, 评价了金水缓

纤方对肺纤维化大鼠疗效综合评价。图 5 展示了金水缓纤方及其优化组分方对肺纤维化大鼠疗效的综合评价。从图中可以看出, 模型组的 R 值最高, 而金水缓纤方及其优化组分方 (G1-G8) 的 R 值均显著降低, 表明这些治疗方案对肺纤维化大鼠具有显著的疗效。其中, 金水缓纤方 (G1) 和吡非尼酮 (G2) 的 R 值最低, 表明它们的疗效最为显著。

纤方的潜在活性组分,包括淫羊藿苷、鲁斯可皂苷元、3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、川陈皮素、贝母素甲、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、芍药苷和丹皮酚、异甘草素。

中药方剂是在中医药理论指导下,通过辨证施治结合病因病机,充分考虑药物的性味归经及功效,依据“君、臣、佐、使”的根本原则最终确立的,具有极高的科学性。同样,组分配伍方剂是基于临床有效中药方剂形成的,也必须以中医药理论为基础,遵循中药方剂的配伍理论与原则^[11,14]。如研究者揭示了清开灵中主要组分治疗脑缺血的重要机制,形成了由黄芩苷、栀子苷、胆酸、珍珠母配伍而成的清开灵组分方^[15-16];Wang 等^[10]将复方黄黛片中雄黄的有效成分四硫四化砷、青黛有效组分靛玉红和丹参有效成分丹参酮 II_A 3 者组合成为组分方,成功揭示了各组分及其配伍抗白血病作用与机制。针对特发性肺纤维化的临床常见证候拟定的金水缓纤方具有补益肺肾、活血化瘀通络的功效。依据金水缓纤方组方可将其中药划分为补气组(人参)、补肾组(淫羊藿、麦门冬、熟地黄)、补肺组(甘草)、化痰组(瓜蒌、浙贝母、白果、陈皮)、活血组(丹皮)。因此,本研究依据活血成分归属中药,将活性成分分为补气组(人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁)、补肾组(淫羊藿苷和鲁斯可皂苷元)、补肺组(异甘草素)、化痰组(3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、川陈皮素和贝母素甲)、活血组(芍药苷和丹皮酚)作为功效组代表组分。正交试验设计是为寻求最优化水平组合的一种高效的多因素实验,可通过部分试验反映全面实验,便于数据分析,已被广泛应用于中药复方的组分配伍优化^[17]。李雪梅等^[18]利用均匀设计等多因素实验优化了扶正化痰胶囊有效组分虫草多糖、丹参酚酸 B 盐、苦杏仁苷和绞股蓝总皂苷,获得了以虫草多糖、苦杏仁苷和绞股蓝总皂苷为有效组分的最优配伍。本研究采用正交试验设计对功效组内、组间成分进行配伍配比优化,获得了成分明确、配比确定的金水缓纤组分方 I。

基于现代生物医学的方法技术建立的临床疾病相关动物模型,是临床前药理药效评价与作用机制研究的重要载体^[19]。周才秀等^[16]基于线栓法建立大鼠脑缺血/再灌注模型,明确了清开灵组分配伍具有脑保护作用,进一步优化了清开灵注射液原方药物组成。本研究采用博来霉素气管滴注诱导肺纤维

化大鼠模型,并在滴注 28 d 后,待大鼠肺纤维化发生后 ig 给予金水缓纤组分方 I,结果表明其可显著改善大鼠肺纤维化。金水缓纤组分方 I 由人参皂苷 Re、淫羊藿苷、异甘草素、川陈皮素、贝母素甲、芍药苷组成,其组分仍然较多,且人参皂苷 Re 等市场价格较高,不利于组分方的临床开发应用。本研究基于肺纤维化大鼠模型,对金水缓纤组分方 I 进行配伍优化,获得由淫羊藿苷、异甘草素、川陈皮素、贝母素甲、芍药苷组成的金水缓纤组分方 II,其疗效与金水缓纤方相当。

本研究以治疗肺纤维化有效方剂金水缓纤方为示范,开展了组分配伍研究,获得了疗效明显、成分清楚的金水缓纤组分方;同时形成了适宜于呼吸病有效方剂组分配伍研究的系列技术方法,构建了组分配伍研究平台,为中医药现代化提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and management [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32.
- [2] Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 795-806.
- [3] Hopkins R B, Burke N, Fell C, et al. Epidemiology and survival of idiopathic pulmonary fibrosis from national data in Canada [J]. *Eur Respir J*, 2016, 48(1): 187-195.
- [4] Collard H R, Chen S Y, Yeh W S, et al. Health care utilization and costs of idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(7): 981-987.
- [5] 李杭洁,白云苹,李建生. 中医古籍文献有关肺痿的证治概况 [J]. *中医学报*, 2018, 33(4): 545-548.
- [6] 李建生,宋建平. 正虚络痹积损为弥漫性间质性肺疾病的主要病机 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(1): 23-25.
- [7] Bai Y P, Li J S, Zhao P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2 [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 628.
- [8] 张俊华,樊官伟,张晗,等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4054-4058.
- [9] 王阶,郭丽丽,杨戈,等. 方剂配伍理论研究方法及其研究前景 [J]. *世界科学技术*, 2006, 8(1): 1-5.
- [10] Wang L, Zhou G B, Zhou G B, et al. Dissection of

- mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *PNAS*, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [11] Zhang J H, Zhu Y, Fan X H, *et al.* Efficacy-oriented compatibility for component-based Chinese medicine [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(6): 654-658.
- [12] Zhu Y, Tan J T, Xie H, *et al.* HIF-1 α regulates EMT via the snail and β -catenin pathways in paraquat poisoning-induced early pulmonary fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(4): 688-697.
- [13] Fernandez I E, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(3): 111-116.
- [14] 张伯礼, 王永炎, 商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方法 [J]. 继续医学教育, 2006, 20(19): 89-91.
- [15] 张占军, 王忠, 李澎涛, 等. 清开灵组分配伍干预局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 964-967.
- [16] 周才秀, 王忠, 荆志伟, 等. 清开灵有效组分药理通路的多样性分析 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(4): 547-551.
- [17] 肖纯, 刘姗姗, 向彬, 等. 组分中药的配比优化方法及应用进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(6): 82-84.
- [18] 李雪梅, 胡义扬, 段小华, 等. 基于均匀设计的抗肝纤维化中药有效组分配伍研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 58-63.
- [19] 杜冠华. 中药复方有效成分组学研究 [J]. 中成药, 2002, 24(11): 878-880.

[责任编辑 潘明佳]