

五种中药方药对小鼠急性肺损伤的治疗作用

许月游¹, 钞时佳¹, 刘继远¹, 许峰源¹, 李远远², 张勇^{2ab}

(1. 桂林医学院附属医院 桂林 541001; 2. 桂林医学院 a. 广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室,
b. 广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室 桂林 541199)

摘要 目的 探讨新冠治疗中使用的五种中药方药—湿毒郁肺方、内闭外脱方、气阴两虚方、银翘藿朴方、荆防藿朴方在小鼠急性肺损伤模型中的治疗效果及其潜在作用机制。方法 实验小鼠分为 7 组, 分别为正常组、急性肺损伤组以及五个中药方药治疗组。采用脂多糖滴鼻法建立小鼠的急性肺损伤模型。治疗组小鼠分别予以相应的中药方剂进行灌胃治疗, 而急性肺损伤组和对照组给予等量 0.9% 氯化钠注射液。治疗 1 周后, 处死小鼠, 收集肺组织进行苏木精-伊红染色和 q-PCR 检测, 以评估肺组织损伤及炎症因子表达情况。结果 与正常对照组比较, 急性肺损伤组小鼠的肺组织出现明显的病理损伤, 五种中药方药治疗组的小鼠在苏木精-伊红染色中显示出肺组织病理损伤有明显减轻。通过 q-PCR 分析发现, 与急性肺损伤组比较, 五种中药方药治疗组 IL-6 mRNA 含量均有所降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 五种中药方药均能有效减轻小鼠急性肺损伤症状, 其作用机制可能与其对炎症因子表达的抑制作用有关。这些结果为中药在新冠肺炎及相关肺部疾病治疗中的应用提供一定的实验依据, 并展示中药在治疗急性肺损伤中的潜在价值。

关键词: 急性肺损伤; 湿毒郁肺方; 内闭外脱方; 气阴两虚方; 银翘藿朴方; 荆防藿朴方

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)05-0023-06

Therapeutic effects of five traditional Chinese medicine prescriptions on acute lung injury in mice

XU Yueyou¹, CHAO Shijia¹, LIU Jiyuan¹, XU Fengyuan¹, LI Yuanyuan², ZHANG Yong^{2ab}

(1. College of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541001, China; 2. a. Guangxi Key Laboratory of Liver Injury and Repair Molecular Medicine, b. Guangxi Health commission Key Laboratory of Basic Research in Sphingolipid Metabolism Related Diseases, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(82360390); 广西科技厅中央财政引导地方科技发展专项资金项目(桂科 ZY21195024); 广西自然科学基金项目(2021GXNSFBA196016); 自治区级大学生创新创业训练计划项目(S202010601059)。

第一作者: 许月游, 硕士研究生, 研究方向为乙肝病毒与宿主相互作用。

通信作者: 张勇 814584806@qq.com。

Abstract Objective To explore the treatment effects and potential mechanisms of five traditional Chinese medicine prescriptions including Shidu Yufei formula , Neibi Waidao formula , Qiyin Liangxu formula , Yin Qiao Huo Po formula and Jing Fang Huo Po formula , used in the treatment of COVID-19 , on a mouse model of acute lung injury. **Methods** Experimental mice were divided into seven groups: normal control , acute lung injury model , and five traditional Chinese medicine treatment groups. The acute lung injury model in mice was established using lipopolysaccharide nasal drops. Mice in the treatment groups were administered the respective Chinese medicine prescriptions via gavage , while the model and control groups received an equivalent volume of saline. One week after treatment , the mice were euthanized , and lung tissues were collected for hematoxylin-eosin staining and q-PCR analysis to evaluate lung tissue damage and the expression of inflammatory factors. **Results** Compared to the normal control group , significant pathological damage was observed in the lung tissues of the model group. The mice in the traditional Chinese medicine treatment groups showed a significant reduction in lung tissue pathology as indicated by hematoxylin-eosin staining. q-PCR analysis revealed that , compared to the acute lung injury model group , all five traditional Chinese medicine treatment groups showed a decrease in IL-6 mRNA levels and an increase in IL-10 levels , with statistically significant differences ($P < 0.05$) . **Conclusion** This study demonstrates that the five traditional Chinese medicine prescriptions effectively alleviate symptoms of acute lung injury. The mechanism may be related to their inhibitory effects on the expression of inflammatory factors. These results provide experimental evidence for the application of traditional Chinese medicine in the treatment of COVID-19 and related pulmonary diseases , demonstrating the potential value of traditional Chinese medicine in treating acute lung injury.

Keywords: acute lung injury; Shidu Yufei formula; Neibi Waidao formula; Qiyin Liangxu formula; Yinqiao Houpu formula; Jingfang Houpu formula

新冠肺炎是 2019 年在人类中发现的新型冠状病毒引起的传染性疾病 ,目前仍在全球肆虐 ,严重危害人类的生命健康。感染者主要表现出高热、咳嗽、乏力等症状 ,严重病例可能导致呼吸窘迫综合征、低氧血症和代谢性酸中毒等严重后果。新冠病毒的致病机制主要与免疫系统功能紊乱和炎症风暴有关 ,这些因素导致肺组织中毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的损伤 ,进而引起肺间质和肺泡的弥漫性水肿^[1]。由于急性肺损伤极易恶化为危重症 ,目前的治疗方法效果有限 ,病死率高达 50%^[1-2]。尽管新冠肺炎现已进入常态化管理阶段 ,但病毒株的持续变异仍不容忽视。中医药在中国具有悠久的历史 ,是先人智慧的结晶。在对抗新冠肺炎的战斗中 ,新冠肺炎广泛采用中医药治疗的地区 ,患者的康复速

度更快 ,病毒转阴时间缩短^[2-3]。国家卫健委以及全国各省市根据地域特点和疾病阶段推出了超过 250 种中药方案 ,包括湿毒郁肺方、内闭外脱方、气阴两虚方、银翘藿朴方和荆防藿朴方等 ,在实践中得到广泛应用 ,并取得了良好的临床效果。鉴于此 ,本文旨在通过构建小鼠急性肺损伤模型 ,模拟新冠肺炎病理过程 ,探讨中药方药在治疗新冠肺炎中的作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康昆明小鼠 8 周龄 雄性 35 只 ,体质量(35 ± 5) g ,清洁级 ,购自桂林医学院动物实验中心。动物实验经桂林医学院动物伦理委员会审核批准 (批准

号: GLMC-IACUC-20241011)。

湿毒郁肺方: 花斑竹 20 g、橘红皮 15 g、生龙沙 6 g、细理石 30 g、南苍术 10 g、香蒿草 12 g、苦练草 30 g、大叶薄荷 15 g、木落子 15 g、干芦茅根 30 g、葶苈子 15 g、生薏苡仁 30 g、生甜根子 10 g 熬制。

内闭外脱方: 盐附子 10 g(先煎)、人参 15 g、山茱萸 15 g 熬制。

气阴两虚方: 金竹叶 10 g、红根 15 g、生石膏 15 g、沿阶草 15 g、五梅子 6 g、桑叶 10 g、芦根 15 g、花旗参 6 g、生甜根子 6 g、南北知母各 10 g 熬制。

银翘藿朴退热合剂: 大叶薄荷 15 g、黄寿丹 30 g、芦根 30 g、金银花 30 g、荆芥 15 g、葛仙子 15 g、薄荷 15 g、南扁豆 30 g、薏苡仁 30 g、苦桔梗 30 g、紫朴 15 g、松苓 30 g、紫蔻 15 g、羊眼斑夏 15 g、山里红 30 g、百草曲 15 g、木落子 15 g 熬制。

荆防藿朴解毒合剂: 炒于术 30 g、紫蔻 15 g、荆芥 15 g、建神曲 15 g、川芎 15 g、鱼香草 15 g、大叶薄荷 15 g、香苏叶 15 g、百枝 15 g、杏仁 15 g、厚朴 15 g、薏苡仁 30 g、松苓 30 g、山里红 30 g、芳香 15 g、法半夏 15 g、茶豆 30 g、苦桔梗 30 g、芦茅根 30 g 熬制^[4]。本研究所使用的五种中药方剂均由广西玉林市中医医院负责生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 昆明白小鼠 35 只随机分为 7 组, 分别为正常对照组、急性肺损伤组、湿毒郁肺组、内闭外脱组、气阴两虚组、银翘藿朴组、荆防藿朴组, 每组 5 只。正常喂养 5 d 以适应环境。5 组治疗组予相应中药灌胃(0.5 mL/只), 2 次/日 2 次灌胃给药后, 脂多糖(LPS 50 μ g/只)滴鼻建模^[5-6], 之后再继续进行 3 次灌胃给药。急性肺损伤组及正常对照组给予等体积 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 2 次/日。

1.2.2 肺组织 HE 染色 脂多糖建模 7 d 后处死小鼠, 多聚甲醛浸泡固定一侧肺组织。石蜡包埋切片后苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色。

1.2.3 定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)检测 mRNA 含量 取液氮速冻后的小鼠肺组织(25 mg/只), Trizol 裂解, 提取 mRNA 逆转录得 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 使用 CFX Connect Real-Time system(简称 CFX)仪器进行 PCR 反应检测 IL-6 mRNA 表达水平^[7]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析数据, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 进行 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色法分析小鼠肺组织损伤情况

本研究通过 LPS 滴鼻的方法构建小鼠急性肺损伤模型。肺组织病理切片显示, 正常对照组小鼠的肺泡表现出健康的半球状囊泡结构, 肺泡壁薄且清晰, 且未见出血或炎症细胞浸润, 显示出正常的肺泡结构和丰富的毛细血管, 没有变形、坏死或炎症迹象。然而, 急性肺损伤组展现出显著的病理改变, 包括肺泡上皮细胞和肺泡毛细血管内皮细胞的坏死脱落、肺泡壁的充血肿胀、大量肺泡塌陷, 以及大量炎性细胞浸润和红细胞的渗出, 这些都符合急性肺损伤的特征, 表明小鼠急性肺损伤模型构建成功。在中药治疗组中, 湿毒郁肺组显示出相对较好的改善, 肺泡形态结构较为正常, 肺泡壁较薄且清晰, 肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞的坏死不明显, 炎症细胞渗出和毛细血管内红细胞渗出明显减少, 支气管黏膜上皮细胞损伤水肿减轻。内闭外脱组、气阴两虚组、银翘藿朴组和荆防藿朴组相较于急性肺损伤组也表现出了一定程度的改善, 虽然仍可见炎性细胞浸润和肺泡结构损伤, 但较急性肺损伤组有所减轻。因而, 与急性肺损伤组比较, 中药治疗组在减轻肺泡组织炎症损伤、肺泡结构塌陷和细胞坏死方面表现出一定的正面效果。各组小鼠肺组织 HE 染色如图 1 所示。

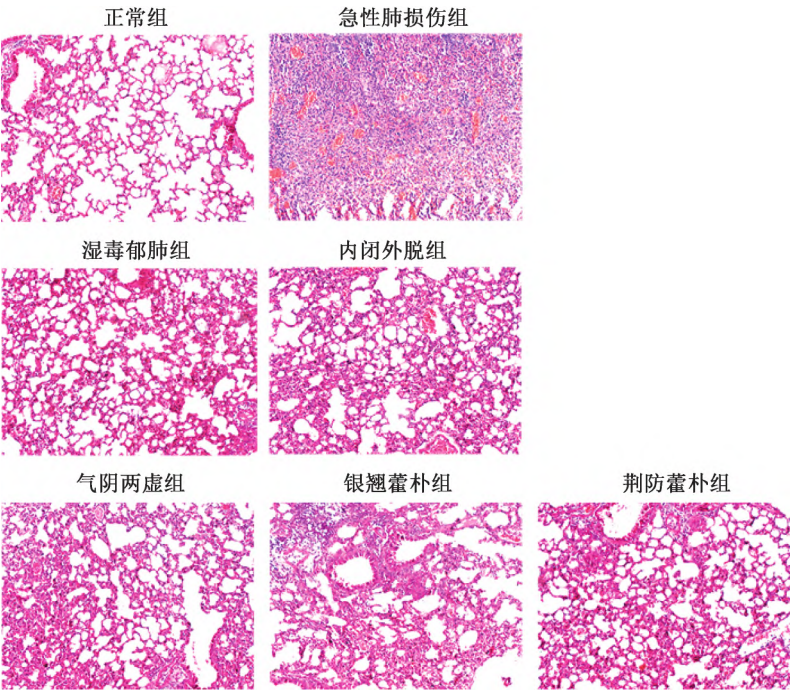


图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色(×50)

2.2 q-PCR 法检测小鼠肺组织 IL-6 mRNA 的表达

与正常对照组比较 急性肺损伤组小鼠IL-6 mRNA 含量显著增高 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。与急性肺损伤组比较 ,湿毒郁肺组、内闭外脱组、气阴两虚组、银翘藿朴组、荆防藿朴组的 IL-6 mRNA 含量均显著下降($P<0.05$) ,而尤以湿毒郁肺方、内闭外脱方、气阴两虚方组抑制 IL-6 mRNA 的效果更好 ,表明各中药方药对急性肺损伤小鼠促炎因子的表达有一定抑制作用。五种中药方药对小鼠肺组织 IL-6 mRNA 表达的影响如表 1 所示。

表 1 五种中药方药对小鼠肺组织 IL-6 mRNA 表达的影响		
组别	n/只	IL-6 mRNA
正常对照组	5	0.77±0.22
急性肺损伤组	5	97.1±17.7 [*]
湿毒郁肺组	5	14.1±3.71 [#]
内闭外脱组	5	11.5±5.33 [#]
气阴两虚组	5	15.5±2.85 [#]
银翘藿朴组	5	34.4±6.31 [#]
荆防藿朴组	5	23.5±17.2 [#]

注: 与正常对照组比较 ,^{*} $P<0.05$; 与急性肺损伤组比较 ,[#] $P<0.05$

3 讨论

本研究通过 LPS 滴鼻建立小鼠急性肺损伤模型 ,使用五种中药方药灌胃的方法进行治疗。从肺组织 HE 染色情况、炎症因子表达量变化等方面进行探究 ,发现这五种中药方药对小鼠的急性肺损伤症状有一定缓解作用。急性肺损伤以引起免疫系统功能紊乱和炎症风暴为特点^[8] ,炎症反应在急性肺损伤发病的全过程有着不可小觑的作用。肺内急性炎症反应可使肺组织内、肺泡内的气体被渗出的大量液体、蛋白以及细胞所替代 ,加之患者的动态和静态肺顺应性降低 ,可引起胸痛、呼吸困难等症状 ,甚至可发展为严重低氧血症^[9]。尽管促炎症反应是一种防御反应 ,但在反应过度的情况下会引发严重问题 ,是当前多数重症患者发病和死亡的重要原因之一。促炎细胞因子主要有: 干扰素(interferon- γ ,IFN- γ)、白细胞介素-1(interleukin-1 ,IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6 ,IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8 ,IL-8)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor ,TNF) 等 ,密切存在于炎症反应的关键通路的环节中。抗炎细胞因子主要有: 白细胞介素-4(interleukin-4 ,IL-4)、白细胞介素-10(interleukin-10 ,IL-10)、白细胞介素-13(interleukin-13 ,IL-13) 等 ,通过拮抗炎性介质从而

发挥抑制炎症的作用^[10-11]。炎症反应时,单核-吞噬细胞系统激活,产生大量白细胞介素、TNF- α 等炎症介质。中性粒细胞通过一些炎症介质趋化聚集到损伤的组织周围,从而产生更多的炎症介质,同时还会产生大量自由基,使机体氧化和抗氧化的平衡能力紊乱,过量的氧自由基可以损伤组织,诱导细胞凋亡^[12]。正常情况下,炎症反应其实是机体的一种自我保护反应,通过清除坏死组织而有利于新生组织的修补。一旦机体免疫系统发生紊乱或长期抗原刺激,则会出现破坏大于修复的矫枉过正情况。如果此时急性肺损伤继续发展,极大可能进一步发展成为急性呼吸窘迫综合征。而如何有效遏制急性肺损伤的快速进展,降低演化为急性呼吸窘迫综合征的发生概率,成为当代危重病医学研究的重点学科命题^[13]。为此,需要寻求能够干预炎症进展的药物,从而打破这一循环,缓解或者治疗急性肺损伤。

本研究结果显示,治疗后,各中药方药治疗组均较急性肺损伤组小鼠肺病理损伤程度有所减轻,IL-6含量下降也提示各治疗组均有一定的抗炎作用,其中以湿毒郁肺方效果最好。中药是一个广泛的代名词,一剂中药药方是由多味天然中草药构成,其多成分、多药理靶点的特点使其在人体内的具体作用位点和作用途径往往难以精确界定^[14]。目前发现,中药能通过多种途径发挥抑制炎症的作用^[15-16]。首先,皮质醇作为一种关键激素,在减轻炎症反应和增强机体适应能力方面发挥着重要作用。众多中药通过作用于下丘脑-垂体-肾上腺轴,能有效促进内源性皮质醇的生成,从而展现出显著的抗炎效果。其次,中药在调节体内氧化与抗氧化平衡方面也表现突出,它通过提高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽水平,以及降低丙二醛含量,有效地清除过量氧自由基,减轻氧化应激的影响^[17]。此外,氧自由基的活化作用还能引发NF- κ B通路的激活^[18]。在炎症的刺激下,I κ B的磷酸化和降解,导致NF- κ B进入细胞核,从而激活各种细胞因子和趋化因子的编码。值得注意的是,某些中药能调控NF- κ B/p65的核内表达及其下游产物,有效地抑制炎症进程^[19]。在新冠肺炎治疗中,中药对病情的改善可能是通过降低体内炎症风暴,调节自身免疫功能,最终减轻肺乃至其他身体器官的损害。相关研究^[20]结果显示,中药具有抗病毒

作用,且由于其成分复杂,目前尚无法确定具体的作用成分和机制,这需要进一步深入研究。

4 结论

本研究通过LPS滴鼻建立了小鼠急性肺损伤模型,探讨五种中药方药对急性肺损伤的治疗效果。结果显示,这些中药方药能显著缓解肺组织病理损伤,降低IL-6 mRNA的表达,其中湿毒郁肺方效果最为显著。

参考文献

- [1] 徐平,何亚荣,曹钰.急性呼吸窘迫综合征肺毛细血管内皮细胞损伤的生物标志物研究进展[J].中华急诊医学杂志,2022,31(4):564-567.
- [2] 刘莉,王娜,许迪魁,等.中药制剂治疗新冠肺炎的机制[J].生命的化学,2022,42(12):2222-2230.
- [3] ZHONG L L, WONG Y P, LEUNG C Y, et al. Effects of Chinese medicine for COVID-19 rehabilitation: a multicenter observational study[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 99.
- [4] 王文凭.四川三种中药医院制剂获批[J].中医药管理杂志,2020,28(4):206.
- [5] CHEN H, BAI C X, WANG X D. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine[J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(6): 773-783.
- [6] PALIKOV V A, PALIKOVA Y A, RUDENKO P A, et al. Modeling of chronic lung inflammation in rats by repeated intratracheal administration of LPS[J]. Bull Exp Biol Med, 2022, 173(6): 790-793.
- [7] SZOT P, FRANKLIN A, FIGLEWICZ D P, et al. Multiple lipopolysaccharide (LPS) injections alter interleukin 6 (IL-6), IL-7, IL-10 and IL-6 and IL-7 receptor mRNA in CNS and spleen[J]. Neuroscience, 2017, 355: 9-21.
- [8] 崔建斌,刘晓辉,扈丽媛,等.急性肺损伤药物治疗的研究进展[J].中外医疗,2023,42(10):194-198.
- [9] 张丽敏,祁亚锋,韩冰阁,等.白细胞介素-6和JAK2/STAT3信号通路在急性肺损伤中的作用[J].中国急救医学,2022,42(5):453-457.
- [10] 段立彬,何先弟.细胞因子与急性肺损伤的关系[J].蚌埠医学院学报,2010,35(2):208-210.
- [11] WU C L, LIN L Y, YANG J S, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment

- with IL-10[J]. *Respirology*, 2009, 14(4): 511-521.
- [12] ZARBOCK A, LEY K. Neutrophil adhesion and activation under flow [J]. *Microcirculation*, 2009, 16(1): 31-42.
- [13] 郑鹏, 杨径, 申群喜. 沐舒坦对急性肺损伤患者保护作用的研究[J]. *华夏医学*, 2002, 15(3): 285-287.
- [14] SONG D, DENG Q, CHEN H. What can traditional plant therapy do in the face of Covid-19? Examples from traditional Chinese medicine [J]. *Afr Health Sci*, 2023, 23(2): 56-66.
- [15] 罗仕华, 符诗聪. 中药抗炎作用机制研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2003, 3(1): 47-49.
- [16] 林斌, 李金鹏, 陈红, 等. 炎症信号通路在急性肺损伤中的作用及中医药干预研究进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37(11): 81-85.
- [17] 彭静, 李巧玲, 梅艳, 等. 基于 CiteSpace 的天然药物及中药治疗急性肺损伤机制研究中文文献可视化分析[J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32(11): 1296-1304.
- [18] 孟佳磊, 马宇慧, 李芸峰, 等. 中医药干预核因子- κ B 信号通路治疗急性肺损伤的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2023, 32(5): 925-928.
- [19] 孙淑萍, 杜云艳, 李胜利, 等. 中药主要抗炎机制研究进展[J]. *通化师范学院学报*, 2021, 42(4): 78-84.
- [20] XU H Y, LI S F, LIU J Y, et al. Bioactive compounds from Huashi Baidu Decoction possess both antiviral and anti-inflammatory effects against COVID-19 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(18): e2301775120.

[收稿日期: 2024-02-26]

[责任编辑: 杨建香 英文编辑: 李佳睿]