

- 7840-7851.
- [24] 王凤丽, 陈志强, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 35-38.
- [25] 李黎莉, 王凤丽, 李林林, 等. 陈志强治疗糖尿病肾病临床经验[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(9): 1743-1744.
- [26] 白璐, 霍贝贝, 郭倩, 等. Wnt/ β -catenin 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2017, 48(5): 946-950.
- [27] 刘利飞, 李雅纯, 国芳, 等. Notch 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1866-1870.
- [28] 吴燕燕, 孙煜, 王易. 丹参多酚酸盐活血化痰作用的多元化药理作用[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 975-979.
- [29] 左卫娟, 宋贝贝, 李开, 等. 川芎防治糖尿病肾病配伍探析[J]. 中医学报, 2012, 27(2): 196-198.
- [30] 石雕, 吴萍, 黄莺, 等. 全蝎纯化液对大鼠静脉血栓形成 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(6): 705-706.

红芪多糖、红芪黄酮和红芪皂苷抗博来霉素致大鼠肺间质纤维化的作用

王艺¹, 张毅¹, 李娟¹, 李雪燕¹, 刘永琦^{1,2}, 苏韞¹, 蔺兴遥^{1,2*}, 李金田^{1,2*}
(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: **目的** 研究红芪不同提取分离部位抗肺间质纤维化的作用。**方法** 提取分离红芪各有效部位, 采用喉镜引导下气管插管注入博来霉素复制肺间质纤维化大鼠模型并随机分组, 各组大鼠给予相应药物进行干预, 检测大鼠一般状况、体质量、肺系数、脾脏及胸腺指数, 肺组织中 HA、LN、HYP 水平, T 细胞亚群及肺组织病理形态学。**结果** 红芪有效部位均可一定程度改善模型大鼠的精神状态、食量、活动量、皮毛光泽等; 与模型组比较, 红芪黄酮低、中剂量组和红芪皂苷高剂量组大鼠肺系数均降低 ($P < 0.01$), 红芪多糖高剂量组大鼠在 7 d 和 14 d 的体质量均增加 ($P < 0.01$), 红芪黄酮低剂量组可同时降低肺组织中 HA、LN 的水平 ($P < 0.01$), 红芪黄酮各剂量组可降低 HYP 水平 ($P < 0.01$), 红芪黄酮低剂量组大鼠 CD3⁺CD4⁺CD8⁻ 细胞占比升高 ($P < 0.01$), 红芪黄酮各剂量组大鼠 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, HE 染色发现各治疗组中肺炎及肺纤维化程度均减轻, 其中红芪黄酮低剂量效果最好; Masson 染色发现各治疗组肺纤维化程度均减轻, 肺间隔略增宽, 间质内可见小灶状胶原纤维沉积, 病变范围较小, 其中红芪黄酮中剂量组大鼠肺组织胶原纤维沉积减少。**结论** 红芪提取物多糖、黄酮及皂苷均可不同程度改善大鼠肺间质纤维化, 其中红芪黄酮效果最佳。

关键词: 红芪多糖; 红芪黄酮; 红芪皂苷; 肺间质纤维化

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0573-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.045

间质性肺疾病是一组主要累及肺间质、肺泡和细支气管的肺部弥漫性疾病, 其中特发性肺间质纤维化疾病是较常见的类型^[1]。该病发病机制仍未明确^[2], 临床多表现为通气功能障碍及进行性的呼吸困难^[3], 伴有刺激性干咳, 双肺闻及 Velcro 啰音^[4-5], 常伴有杵状指(趾), 胸部 X 线示双肺弥漫性网状阴影, 肺功能为限制性通气功能障碍^[6]。病情一般进行性发展, 最终因呼吸衰竭而死亡^[7]。近年来, 该病的发病率逐年上升^[8], 预后差, 病死率高^[9]。研究结果显示, 肺间质纤维化患者年生存率低于

50%, 十年生存率低于 30%^[10]。目前, 临床上无特效疗法, 以糖皮质激素、细胞毒类药物、非特异性抗炎药为主, 仅在疾病早期或纤维化活动期可收到一定疗效, 其不良反应明显, 临床有效率^[11]。中医学多将其归为肺胀、肺萎、肺痹等范畴。中医药治疗以其不良反应小、无耐药性和药品依赖性等优点, 在治疗特发性肺间质纤维化上具有独特优势^[11-14]。本实验以博来霉素诱导肺纤维化模型, 以醋酸泼尼松片为阳性对照药, 通过对肺间质纤维化大鼠的一般状态及肺系数, 体质量, 脾胸指数, 肺组织中 HA、

收稿日期: 2020-11-02

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(30960037/C020409)

作者简介: 王艺(1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中西医结合基础专业。Tel: 13783522369, E-mail: 852066283@qq.com

* **通信作者:** 蔺兴遥(1975—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: 878104134@qq.com

李金田(1964—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治肺系疾病。E-mail: lj@gszy.edu.cn

LN、HYP水平, T细胞亚群, 大鼠形态, HE染色及Masson观察等指标, 探讨红芪有效部位对肺间质纤维化的防治作用及其机制, 筛选红芪最佳有效部位, 为临床防治特发性肺间质纤维化疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 药材 中药红芪购于定西市陇西药材市场, 经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师、甘肃省药品检验所朱俊儒主任药师鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. - Mazz. D的干燥根。

1.2 动物 SPF级Wistar大鼠144只, 雌雄各半, 体质量(200±20)g, 由甘肃中医药大学科研实验中心提供, 实验动物生产许可证号SCXK(甘)2004-0006-0001588, 实验动物使用许可证号SYXK(甘)2004-0006-0000284。SPF级常规饲养, 充足饲料喂养, 饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供, 自由饮水经MF-RO-10型实验动物饮用水处理器, 由甘肃中医药大学SPF级实验动物中心提供, 预备饲养3d后进行实验。

1.3 试剂与药物 黄芪甲苷对照品(成都普思生物科技股份有限公司, 批号PSO10428); 芦丁对照品(批号100080-201610)、葡萄糖对照品(批号110833-201205)均购自中国食品药品检定研究院; 醋酸泼尼松片(5mg/片, 浙江仙琚制药股份有限公司, 国药准字H33021207)。注射用盐酸博来霉素(海正辉瑞制药有限公司, 批号110424); 戊巴比妥钠(北京化学试剂公司, 批号101021); 羧甲基纤维素钠(天津市凯通化学试剂有限公司, 批号20101209); 明质酸(HA)免疫放射免疫分析药盒(批号111220)、层黏连蛋白(LN)放射免疫分析药盒(批号111220)均购自北京北方生物技术研究所; 羟脯氨酸(HYP)测试盒(南京建成生物工程研究所, 批号20111210); CD3-FITC试剂盒、CD4-PE试剂盒、CD8-PE均购自杭州联科生物技术有限公司。95%乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、乙醚均为分析纯。

2 方法

2.1 红芪各有效部位的提取分离

2.1.1 红芪总黄酮 取红芪药材, 润湿后切成厚度为2~3mm的饮片, 晾干, 称取6.5kg, 加入70%乙醇, 回流提取3次, 每次1h, 第1次加8倍量的乙醇, 后2次加6倍量乙醇, 合并3次提取液, 滤过(药渣用于提取分离总多糖), 滤液静置24h, 滤去沉淀, 滤液减压回收乙醇至无醇味, 放冷, 用蒸馏水稀释至1:2。然后上聚酰胺柱, 上柱液质量浓度为1g/mL; 上柱速度为2BV/h。然后水洗, 再用70%乙醇洗, 洗脱液回收乙醇后, 用等体积水饱和的乙酸乙酯萃取5次, 合并乙酸乙酯萃取液, 回收乙酸乙酯, 残留物减压干燥, 得红芪总黄酮。

2.1.2 红芪总皂苷 将“2.1.1”项下上聚酰胺柱的流出液继续上D-101大孔树脂, 上柱液质量浓度为1g/mL, 上柱速度为2BV/h, 然后水洗, 再用70%乙醇洗, 洗脱液回收乙醇后, 用等体积水饱和的正丁醇萃取5次, 合并正丁醇萃取液, 回收正丁醇, 残留物减压干燥, 得红芪总

皂苷。

2.1.3 红芪总多糖 将“2.1.1”项下乙醇提取后的红芪药渣挥干乙醇后加水煎煮3次, 每次1h, 第1次加8倍量的水, 后2次加6倍量水, 合并3次水煎液, 滤过, 滤液减压浓缩至相对密度为1.15(20℃)的浸膏, 离心分离, 弃去沉淀, 上清液搅拌下缓缓加入95%乙醇, 使溶液的含醇量达到70%, 充分搅匀, 密闭, 静置24h, 滤过, 沉淀用适量70%乙醇洗涤沉淀2次后, 用蒸馏水溶解, 离心分离(2500r/min, 15min), 弃去沉淀, 上清液搅拌下缓缓加入95%乙醇, 使溶液的含醇量达到70%, 充分搅匀, 密闭, 静置24h, 滤过离心, 沉淀用70%乙醇洗涤沉淀2次后, 50℃以下减压干燥。干燥物用水溶解, 将氯仿-正丁醇(5:1)按0.2倍体积加入干燥物的水溶液中, 萃取(1倍体积, 5次)除去多糖中的蛋白, 将脱蛋白后的多糖水溶液加入活性炭加热回流0.5h(加入3%活性炭), 趁热过滤, 滤液蒸干, 残渣减压干燥, 得红芪总多糖。

2.2 红芪有效部位的含量测定 分别选取葡萄糖、芦丁、黄芪甲苷作为对照品, 利用紫外分光光度计测定红芪中总黄酮、总皂苷和总多糖含量。分别绘制葡萄糖、芦丁、黄芪甲苷的标准曲线; 通过精密度试验得红芪总多糖RSD为2.92%, 红芪总黄酮RSD为2.52%, 红芪总皂苷RSD为3.08%; 稳定性试验结果表明1h内红芪中总黄酮、总皂苷和总多糖显色均稳定, 可进行含量测定; 回收率测定得葡萄糖平均回收率为98.3%, RSD为2.19%(n=5), 芦丁平均回收率为95.8%, RSD为2.96%(n=5), 黄芪甲苷平均回收率为92.5%, RSD为3.21%(n=5); 样品含量测定得提取部位中总多糖、总黄酮、总皂苷的含量分别为0.718、0.526、0.517g/g, 总多糖、总黄酮、总皂苷的得率分别为71.8%、52.6%、51.7%。

2.3 红芪有效部位抗肺间质纤维化作用的筛选实验

2.3.1 动物分组 将144只大鼠适应性喂养3d后, 按照随机数字表法随机分为假手术组, 模型对照组, 阳性药对照组(强的松组), 红芪多糖、黄酮、皂苷高、中、低剂量组, 共12组, 每组12只。统一造模后, 按性别分笼饲养, 3%苦味酸溶液标记编号。

2.3.2 动物模型制备 大鼠适应性饲养3d后, 以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 待夹尾无疼痛反应后, 将大鼠仰卧位固定于鼠板上, 固定四肢及头部, 使头部略向后仰。助手橡皮筋勒在大鼠上齿和下齿拉开大鼠口腔, 术者左手持小动物专用喉镜, 伸入大鼠口腔内, 轻轻顶起舌根, 暴露声门, 趁大鼠吸气瞬间, 右手将自制的气管套管(一次性使用静脉留置针22G×25mm/Y-G, 剪去针头部分, 余下塑料胶管的长度以6~7cm为宜, 用细铁丝把尾端做成圆环状插入胶管内作为针芯, 长度与塑料胶管相等, 不可超出胶管, 以免刺伤大鼠喉部)顺势插入大鼠气管内。预先在套管内注入2~3节小水柱, 若套管内水柱随大鼠呼吸频率有节奏的上下运动, 说明插入气管。迅速拔出针芯, 将事先抽好博来霉素(5mg/kg)的1mL注射器连接在气

管套管上，一次性推入气管。注入药物后立即拔出套管，将大鼠直立旋转约1 min，使药物在肺内均匀分布。假手术组大鼠气管内推注等体积的生理盐水。待大鼠清醒后，常规SPF环境饲养。

2.3.3 给药方法及剂量 从造模第2天起，进行干预治疗，红芪多糖、黄酮、皂苷各剂量组灌胃相应药物，灌胃药液以0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制，每天给药1次，连续28 d，灌胃容量为1 mL/100 g体质量；强的松组给予醋酸泼尼松片，给药剂量为4 mg/kg，用0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制，灌胃容量为1 mL/100 g体质量；假手术组、模型组分别灌胃等容量的0.5%羧甲基纤维素钠溶液。

根据理论及文献并结合各组间的可比性原则确定，按照大鼠与人的体表面积折算法，大鼠每天给药剂量为人临床等效剂量。根据6.5 kg红芪生药中提取出红芪多糖、红芪皂苷、红芪黄酮的不同含量，本实验红芪多糖、皂苷实际给药低、中、高剂量分别为15、30、60 mg/kg；红芪黄酮实际给药低、中、高剂量分别为7.5、15、30 mg/kg。

2.3.4 标本采集与检测 所有动物均于实验第28天处死采集标本。末次给药后，各组大鼠禁食不禁水24 h，观察动物一般状况。对其进行股动脉采血，检测大鼠T细胞亚群。处死开胸，剥离胸腺及脾进行称定质量，计算脏器指数。完整分离出双肺，仔细去除周围结缔组织，经生理盐水洗涤后用滤纸吸干，电子天平称定肺湿重，计算肺脏系数，肺系数=(肺湿重/体质量)×100%。剪取左肺下叶组织约0.8~1 g，以1:9的比例加生理盐水进行匀浆，匀浆液在4℃冷冻离心机中离心(3 000 r/min, 10 min)，弃沉渣取上清，于-20℃保存备用，采用放射免疫分析法，按照试剂盒说明书进行操作，检测HA、LN水平；通过双光束紫外/可见分光光度法按照试剂盒说明书步骤检测肺脏组织HYP水平，由于HYP在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色，根据其颜色的深浅可推算出其水平。摘取右肺下叶，用4%多聚甲醛溶液固定1周，常规石蜡包埋制片，进行HE及Masson染色，以观察肺组织形态结构的改变。

2.3.5 肺组织形态结构的观察 肉眼整体观察肺组织外观形态、大小、质地、颜色、是否有坏死等，HE染色及Masson染色观察肺组织形态变化。

2.3.6 统计学分析 通过SPSS 17.0软件进行处理，结果以($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠一般状况及肺系数的影响 假手术组大鼠实验过程中无死亡，进食及精神状态良好，反应灵敏，皮毛光泽发亮，体质量逐渐增加，呼吸平稳；模型组大鼠精神状态差，食量及活动减少，皮毛稀疏，颜色变黄，失去光泽，多见倒竖现象，拱背蜷缩、反应迟钝、呼吸急促、身体消瘦等；其余各组动物在给药后的情况介于假手术组和模型组之间。在动物气管插管和麻醉过程中，因操作不当，个别动物出现了死亡，故导致样本量减少。

如表1所示，与假手术组比较，模型组大鼠肺系数升高(P<0.01)；与模型组比较，红芪多糖、红芪皂苷各剂量及红芪黄酮低、中剂量组大鼠肺系数均降低(P<0.05, P<0.01)。

表1 各组大鼠肺系数($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肺系数/%
假手术组	12	4.91±0.92
模型组	11	7.24±1.56 ^{△△}
强的松组	10	5.74±0.75
红芪多糖低剂量组	11	6.43±1.99
红芪多糖中剂量组	11	6.52±3.72
红芪多糖高剂量组	11	6.00±0.74
红芪黄酮低剂量组	12	5.34±0.66 ^{▲▲}
红芪黄酮中剂量组	10	4.94±1.79 ^{▲▲}
红芪黄酮高剂量组	12	6.01±0.93
红芪皂苷低剂量组	11	5.27±0.96 ^{▲▲}
红芪皂苷中剂量组	11	5.76±1.54 [▲]
红芪皂苷高剂量组	11	5.53±1.03 [▲]

注：与假手术组比较，^{△△}P<0.01；与模型组比较，[▲]P<0.05，^{▲▲}P<0.01。

3.2 红芪不同部位对大鼠第0、7、14、28天体质量的影响 造模前各组大鼠体质量无明显差异(P>0.05)，造模后模型组大鼠体质量在第7、14、28天呈下降趋势，与假手术组比较均无明显变化(P>0.05)；与模型组比较，红芪多糖高剂量组大鼠体质量在第7、14天增加(P<0.01)，红芪多糖低、中剂量组大鼠体质量在第14天增加(P<0.05)，其余各组均无明显变化(P>0.05)，见表2。

表2 各组大鼠第0、7、14、28天体质量的影响(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	第0天	第7天	第14天	第28天
假手术组	12	188.50±6.37	190.50±7.94	194.83±20.89	233.17±19.20
模型组	11	194.58±14.66	181.17±15.93	179.82±27.41	212.40±22.63
强的松组	10	185.67±3.82	190.08±24.67	186.92±26.59	202.67±17.28
红芪多糖低剂量组	11	189.08±8.14	196.58±26.91	202.33±24.99 [▲]	217.18±27.45
红芪多糖中剂量组	11	191.33±9.40	199.55±20.89	201.25±28.81 ^{▲▲}	212.00±22.69
红芪多糖高剂量组	11	189.33±7.85	205.58±28.49 ^{▲▲}	210.36±30.86 ^{▲▲}	232.45±26.65
红芪黄酮低剂量组	12	189.42±6.16	189.50±18.06	187.58±22.35	204.18±23.74
红芪黄酮中剂量组	10	188.17±19.93	194.25±20.74	188.33±15.74	208.57±21.52
红芪黄酮高剂量组	12	188.33±7.34	188.08±21.51	197.08±25.90	198.45±27.66
红芪皂苷低剂量组	11	183.67±12.69	198.92±21.67	198.00±23.36	218.00±34.49
红芪皂苷中剂量组	11	186.42±4.94	191.82±27.25	190.45±27.69	225.64±40.74
红芪皂苷高剂量组	11	188.25±7.09	187.42±17.94	191.09±14.86	210.40±18.66

注：与模型组比较，[▲]P<0.05，^{▲▲}P<0.01。

3.3 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠脾、胸腺指数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脾、胸腺指数均有降低趋势,但无统计学差异 ($P>0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠脾、胸腺指数均有所变化,但无统计学差异 ($P>0.05$),见表3。

表3 对肺间质纤维化模型大鼠脾、胸腺指数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脾指数/%	胸腺指数/%
假手术组	12	0.200±0.037	0.108±0.031
模型组	11	0.196±0.039	0.084±0.018
强的松组	10	0.217±0.033	0.078±0.016
红芪多糖低剂量组	11	0.201±0.032	0.086±0.021
红芪多糖中剂量组	11	0.238±0.033	0.090±0.027
红芪多糖高剂量组	11	0.223±0.035	0.093±0.030
红芪黄酮低剂量组	12	0.233±0.062	0.099±0.045
红芪黄酮中剂量组	10	0.196±0.045	0.081±0.024
红芪黄酮高剂量组	12	0.224±0.066	0.094±0.026
红芪皂苷低剂量组	11	0.212±0.040	0.091±0.021
红芪皂苷中剂量组	11	0.214±0.035	0.103±0.034
红芪皂苷高剂量组	11	0.234±0.149	0.085±0.022

3.4 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠肺组织中 HA、LN 水平的的影响 如表4所示,与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 HA、LN 水平升高 ($P<0.05$);与模型组比较,红芪多糖高剂量、红芪黄酮各剂量和红芪皂苷高剂量组大鼠肺组织中 HA 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),红芪多糖高剂量组、红芪黄酮和红芪皂苷低、中剂量组鼠肺组织中 LN 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表4 对肺间质纤维化模型大鼠肺组织中 HA、LN 水平的的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HA/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LN/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
假手术组	12	359.03±55.52	42.31±7.22
模型组	11	435.85±132.01 [△]	49.31±9.06 [△]
强的松组	10	423.22±72.42	50.82±13.43
红芪多糖低剂量组	11	363.16±71.69	43.44±11.25
红芪多糖中剂量组	11	364.19±77.22	42.35±3.86
红芪多糖高剂量组	11	342.45±94.24 [▲]	38.99±4.51 ^{▲▲}
红芪黄酮低剂量组	12	321.29±38.19 ^{▲▲}	39.79±10.28 ^{▲▲}
红芪黄酮中剂量组	10	351.62±99.09 [▲]	42.29±5.87 [▲]
红芪黄酮高剂量组	12	359.82±85.31 [▲]	44.14±5.53
红芪皂苷低剂量组	11	420.40±98.16	38.87±12.26 ^{▲▲}
红芪皂苷中剂量组	11	363.92±79.54	39.34±4.28 ^{▲▲}
红芪皂苷高剂量组	11	303.80±102.24 ^{▲▲}	46.31±3.99

注:与假手术组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

表6 各组大鼠血液中 T 细胞亚群的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
假手术组	12	28.27±6.09	6.55±4.65	6.36±4.80
模型组	11	17.57±8.57 [△]	9.03±3.78	2.05±0.85 [△]
强的松组	10	25.50±13.06	8.65±3.46	3.84±2.79
红芪多糖低剂量组	11	27.22±9.19	8.45±4.91	4.67±3.57
红芪多糖中剂量组	11	23.68±9.57	8.25±3.77	4.52±5.15
红芪多糖高剂量组	11	16.50±3.09	8.50±3.90	2.36±1.33
红芪黄酮低剂量组	12	31.30±7.64 ^{▲▲}	5.65±2.77	7.14±4.14 [▲]
红芪黄酮中剂量组	10	26.53±9.92	5.07±2.85	6.69±4.72 [▲]
红芪黄酮高剂量组	12	25.33±14.06	5.48±1.80	7.63±5.00 [▲]
红芪皂苷低剂量组	11	20.93±13.63	8.35±2.85	3.11±3.35
红芪皂苷中剂量组	11	18.88±6.35	8.12±4.59	3.99±4.37
红芪皂苷高剂量组	11	17.77±9.26	9.48±2.49	1.88±0.66

注:与假手术组比较:[△] $P<0.05$;与模型组比较:[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

3.5 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠肺组织中 HYP 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中 HYP 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,红芪多糖高剂量组和红芪黄酮各剂量组大鼠肺组织中 HYP 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表5。

表5 各组鼠肺组织中 HYP 水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HYP/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
假手术组	12	3.39±0.95
模型组	11	7.25±2.22 ^{△△}
强的松组	10	7.77±2.31
红芪多糖低剂量组	11	5.69±2.39
红芪多糖中剂量组	11	5.73±1.58
红芪多糖高剂量组	11	5.56±2.15 [▲]
红芪黄酮低剂量组	12	5.08±1.21 ^{▲▲}
红芪黄酮中剂量组	10	3.17±0.75 ^{▲▲}
红芪黄酮高剂量组	12	4.61±1.85 ^{▲▲}
红芪皂苷低剂量组	11	7.28±2.55
红芪皂苷中剂量组	11	7.31±1.70
红芪皂苷高剂量组	11	8.43±2.80

注:与假手术组比较,^{△△} $P<0.01$;与模型组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

3.6 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠 T 细胞亚群的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 CD3⁺CD4⁺CD8⁻细胞占比、CD4⁺/CD8⁺比值降低 ($P<0.05$),CD3⁺CD4⁻CD8⁺细胞占比升高,但无统计学差异 ($P>0.05$);与模型组比较,红芪黄酮低剂量组大鼠 CD3⁺CD4⁺CD8⁻细胞占比增加 ($P<0.01$),红芪黄酮各剂量组大鼠 CD4⁺/CD8⁺比值升高 ($P<0.05$),各治疗组大鼠 CD3⁺CD4⁻CD8⁺细胞占比均无明显变化 ($P>0.05$),见表6。

3.7 红芪不同部位对肺间质纤维化大鼠肺组织形态结构的影响

3.7.1 大体形态观察 假手术组大鼠双肺呈淡粉色,表面光滑,质地均匀,弹性好;模型组大鼠肺组织颜色暗红,表面粗糙不平,有的可见小片状、凹凸不平的苍白灶,体积略缩小,质地变硬,弹性减弱;其余各组大鼠肺组织颜色深浅不一,多数略暗,表面稍粗糙,触之弹性尚好,体积或有缩小或有变大。

3.7.2 HE 染色观察 假手术组大鼠肺组织支气管及肺泡结构均正常,支气管黏膜上皮细胞排列整齐,支气管腔内偶有少量分泌物,没有水肿和增生现象,肺泡间隔无增厚,无明显胶原沉积,肺泡腔可见少量炎细胞浸润,肺泡壁薄,

肺泡腔完整无扩大，肺泡腔内没有渗出，无肺萎缩及血管壁增厚；模型组大鼠肺组织中肺泡破坏，结构紊乱，多数肺泡闭锁、裂隙、萎陷，部分融合成大泡状，肺泡腔及间质内有中性粒细胞，巨噬细胞等炎症细胞的渗出，胶原纤维大量增殖，肺间隔明显增宽增厚，间质内可见大片状或灶状弥漫性胶原组织沉积，病变范围大于全肺的50%，符合肺纤维化动物模型的要求；强的松组大鼠肺组织中肺间隔稍增宽，有成纤维细胞增生，胶原纤维较少，肺肺炎及肺纤维化程度均较模型组减轻，炎症细胞浸润较模型组减少，病变范围占全肺的21%~50%；各治疗组大鼠肺组织中肺炎及肺纤维化程度与模型组比较均明显减轻，肺泡腔未见明显炎症细胞浸润，肺间隔略增宽，间质内可见不同程度小灶状胶原组织沉积，部分肺泡融合，结构紊乱，病变范围占全肺的21%~50%。其中红芪黄酮低剂量组大鼠肺组织肺泡炎症相对较轻，见图1。

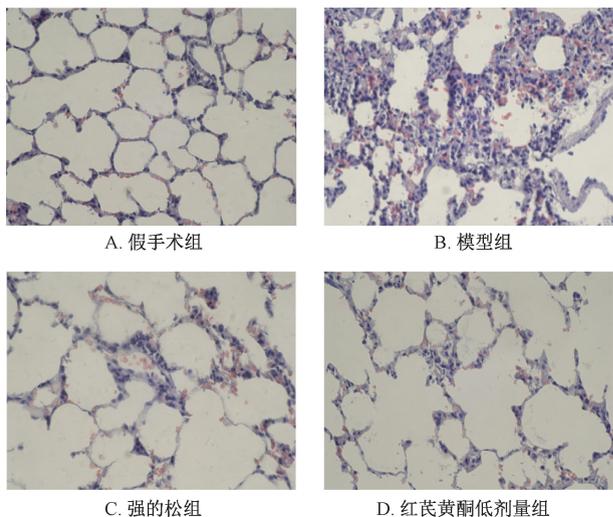


图1 各组大鼠肺组织形态结构的观察 (HE, ×40)

3.7.3 Masson 染色观察 肺组织切片经 Masson 染色后显示，胶原纤维呈现亮绿色，肌肉、胞浆呈现红色，胞核呈现蓝黑色。假手术组大鼠肺组织结构清晰，肺泡隔不增厚，没有纤维化表现，肺泡壁薄，大小正常，肺泡腔内有少量炎症细胞渗出，支气管形态正常，上皮结构完整，没有水肿和增生现象；模型组大鼠肺泡萎陷明显，肺泡结构紊乱，肺泡壁破坏，肺泡腔及间质内有炎症细胞的渗出，可见有红细胞，气道周围有胶原纤维环绕，纤维素相互交织成网状，肺泡隔明显增厚，肺间质可见大量的胶原纤维增生、沉积，出现条索状、片状、灶状的纤维化区域；强的松组大鼠肺组织结构较清晰，肺泡隔增厚，肺泡腔及间质内可见胶原纤维增生及炎症细胞浸润；各治疗组大鼠肺纤维化程度与模型组比较均有明显减轻，肺间隔略增宽，间质内可见小灶状胶原纤维沉积，病变范围较小，其中红芪黄酮中剂量组大鼠肺组织胶原纤维沉积较模型组明显减少，见图2。

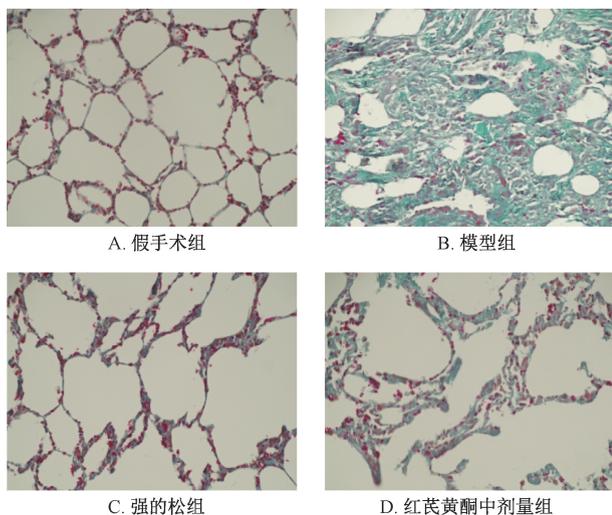


图2 各组大鼠肺组织形态结构的观察 (Masson, ×40)

4 讨论

本研究选取多指标考察红芪活性部位对肺间质纤维化大鼠的影响，并筛选出最佳活性部位。研究发现红芪活性部位对模型组大鼠的精神状态、食量、活动量、皮毛光泽等均具有一定程度的改善；与模型组比较，红芪黄酮低、中剂量组和红芪皂苷低剂量组大鼠肺系数均降低 ($P < 0.01$)。观察大鼠第0、7、14、28天体质量的变化，发现红芪多糖高剂量组大鼠体质量在第7、14天升高 ($P < 0.01$)。观察大鼠脾、胸腺指数的影响发现各给药组大鼠脾、胸腺指数或有降低或有增高，但均无统计学差异。采用放射免疫分析法观察大鼠肺组织 HA、LN 水平发现，红芪黄酮低剂量组可同时降低肺组织中 HA、LN 水平 ($P < 0.01$)。通过双光束紫外/可见分光光度法检测肺脏组织 HYP 水平，发现红芪黄酮个剂量可降低 HYP 水平 ($P < 0.01$)。观察大鼠 T 细胞亚群的影响发现，与模型组比较，红芪黄酮低剂量组大鼠 $CD3^+CD4^+CD8^-$ 细胞占比增加 ($P < 0.01$)，红芪黄酮各剂量组大鼠 $CD4^+/CD8^+$ 比值升高 ($P < 0.05$)。HE 染色观察发现各给药组中肺炎及肺纤维化程度与模型组比较均有明显减轻，其中红芪黄酮低剂量组效果最好。Masson 染色观察发现各给药组肺纤维化程度与模型组比较均有明显减轻，肺间隔略增宽，间质内可见小灶状胶原纤维沉积，病变范围较小。

综上所述，红芪提取物对肺间质肺纤维化大鼠各项指标具有一定的改善作用，其中红芪黄酮的药效作用均优于红芪多糖和红芪皂苷。近年来中医学对于肺间质纤维化的病因病机、治法治则、临床治疗等研究较多，在辨证论治中显示出一定优势^[15]。不管是单味药还是多味复方药，实际发挥药效作用的本质是其中的化学成份。但是，中药一般是动植物的组成部分熬制成液体，其含有的有效部位有数十种甚至数百种之多，而且这些有效部位之间有着复杂且广泛的相互作用。因此，对于红芪多糖、红芪皂苷和红芪黄酮三者之间的协同作用或红芪黄酮干预肺间质纤维化大鼠的作用机制有待于进一步深入探究。

参考文献:

[1] Callahan S J, Xia M, Murray S, *et al.* Clinical characteristics in patients with asymmetric idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Med*, 2016, 119: 96-101.

[2] 陈 乾, 熊旭东. 免疫细胞在特发性肺纤维化中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1586-1590.

[3] 毕春宇. 高分辨率 CT 扫描在特发性肺间质纤维化诊断价值分析[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(24): 167-168.

[4] D'Andrea A, Stanziola A, D'Alto M, *et al.* Right ventricular strain: an independent predictor of survival in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 222: 908-910.

[5] 吕恒娟, 陈宝元, 王合荣, 等. 65 例间质性肺疾病临床特征分析[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(10): 1390-1392.

[6] Rabea A E M, Zidan M, Daabis R, *et al.* Prevalence of chronic hepatitis C virus (HCV) infection in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Egypt J Chest Dis Tuberc*, 2015, 64(4): 907-913.

[7] 闫 崑, 朱 翔, 王建丽, 等. 家族性特发性肺间质纤维化家系的临床特征及遗传学特点[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(11): 833-838.

[8] Enomoto N, Suda T, Kono M, *et al.* Amount of elastic fibers

predicts prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Med*, 2013, 107(10): 1608-1616.

[9] Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(2): e3-e19.

[10] 张云松, 朱晓林. 从解毒化痰扶正法论治重症特发性肺间质纤维化[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 61-62.

[11] 蔡后荣. 间质性肺疾病的临床治疗进展[J]. 临床内科杂志, 2005, 22(4): 223-226.

[12] 邢 玮, 高 鹏, 郑 心. 间质流膏对特发性间质性肺炎患者血清 TGF- β 1、TNF- α 水平变化的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(3): 72-73.

[13] 郑 心, 赵 粤. 特发性肺间质纤维化的中医病因病机及证治研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(18): 88-90.

[14] 郁万晓. 中西药三联法治疗肺间质纤维化临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2013, 13(6): 3-5.

[15] 赵改霞, 郑 心. 特发性肺间质纤维化的中西医结合疗法研究概况[J]. 山东中医杂志, 2017, 36(1): 78-81.

刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞增殖、凋亡的作用

金渭荃¹, 包晓玮^{1*}, 朱东亮², 白栋文¹, 刘晓禄¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆军区保障部药品仪器监督检验站, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 目的 研究刺山柑正丁醇部位对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 细胞增殖和凋亡的影响, 以及对 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达的影响。方法 采用 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖抑制率, 使用流式细胞术检测 MH7A 凋亡, 采用 Western blot 法检测 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达。结果 刺山柑正丁醇部位能抑制 MH7A 细胞增殖率 ($P < 0.01$), 并能诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$), 降低 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达。结论 刺山柑正丁醇部位可抑制 MH7A 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 可能通过 p-JNK 和 p-STAT3 信号通路进行调节。

关键词: 刺山柑; MH7A; 增殖; 凋亡; JNK; STAT3

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0578-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.046

刺山柑 *Capparis spinosa* L. 为山柑科山柑属植物, 俗称野西瓜^[1]。化学研究表明, 刺山柑中含有生物碱类^[2]、黄酮类^[3]、酚酸类^[4]等化学成分, 具有对关节软骨细胞的保护^[5]、抗炎镇痛^[6]、抑菌^[7]等作用。

类风湿关节炎是以慢性、进行性周身多关节炎为特征的一种自身免疫性疾病^[8], 其病理过程为滑膜慢性炎症、增生, 形成血管翳; 持续的炎症破坏关节软骨、韧带及肌腱, 最终导致关节畸形和功能丧失^[9]。关节软骨被破坏的

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81860766)

作者简介: 金渭荃 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为食品营养与安全。Tel: 15840012046, E-mail: 2352935040@qq.com

* 通信作者: 包晓玮 (1969—), 女, 副教授, 研究方向为食品营养与安全。Tel: 13899988973, E-mail: 408531623@qq.com