

四组化痰类方剂对LPS致小鼠急性肺损伤的作用研究

兰爱琳^{1,2}, 张颖^{1,2}, 汪思齐^{1,2,3}, 楼迪栋^{1,2,3*}

¹贵州省法医中药毒理学特色重点实验室, 贵州 贵阳

²贵州中医药大学司法鉴定所, 贵州 贵阳

³贵州中医药大学基础医学院法医学教研室, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年4月28日; 录用日期: 2023年5月21日; 发布日期: 2023年5月30日

摘要

为研究四组化痰类中药方剂对LPS致小鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的疗效, 本实验拟通过脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)刺激KM小鼠模拟肺部损伤, 模型建立后采用桔梗甘草汤、贵州新冠痰湿质推荐方、五苓散、小柴胡汤进行灌胃处理, 结果显示, 通过LPS雾化处理成功构建小鼠ALI模型, 四组方剂均可改善LPS诱导的小鼠ALI和肺部炎症反应情况。

关键词

LPS, ALI, 桔梗甘草汤, 贵州新冠痰湿质推荐方, 五苓散, 小柴胡汤

Study on the Effect of Four Groups Dissipating Phlegm Prescriptions on Acute Lung Injury by LPS in Mice

Ailin Lan^{1,2}, Ying Zhang^{1,2}, Siqi Wang^{1,2,3}, Didong Lou^{1,2,3*}

¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Forensic Medicine Toxicology, Guiyang Guizhou

²Judicial Appraisal Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

³Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Apr. 28th, 2023; accepted: May 21st, 2023; published: May 30th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 兰爱琳, 张颖, 汪思齐, 楼迪栋. 四组化痰类方剂对 LPS 致小鼠急性肺损伤的作用研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(5): 8675-8681. DOI: 10.12677/acm.2023.1351213

Abstract

In order to study the efficacy by four groups of phlegm-reducing prescriptions on LPS-induced acute lung injury (ALI) in mice, this experiment was designed to simulate lung injury in KM mice stimulated with Lipopolysaccharides (LPS), and the model was established by gavage treatment with JieGengGanCao decoction, Guizhou Xinguan Phlegm-Dampness Recommended prescription, Wu-LingSan and Xiao Chaihu decoction. The results revealed that the ALI model in mice was successfully constructed by LPS nebulization treatment, and all four groups prescriptions could improve the LPS-induced ALI and lung inflammatory response in mice.

Keywords

LPS, ALI, JieGengGanCao Decoction, Guizhou Xinguan Phlegm-Dampness Recommended Prescription, Wu Ling San, Xiao Chaihu Decoction

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在临床治疗中,呼吸系统的急性炎症极为常见,且易发展为重症,也是实验研究的热点[1]。ALI是一种严重威胁生命的呼吸系统疾病,病程进展快速,病死率高达50%,极大地增加了个人及社会医疗压力[2][3]。ALI是肺泡上皮细胞遭受损伤后炎症反应增强[4],会导致呼吸急促、咳嗽、胸闷等临床表现[5],中医认为“肺为贮痰之器”,治疗原则中“急则以祛邪为先”,故上述症状的治疗与“化痰”密不可分。本实验本项目拟通过LPS雾化刺激小鼠模拟ALI,使用中药灌胃化痰清肺,观察动物的肺组织病理改变情况,为临床治疗提供一定的理论依据。

2. 材料和方法

2.1. 动物和主要试剂、设备

72只雄性KM小鼠,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,8周龄,平均体重37.79g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,生产许可证号为Scxk2019-0013。LPS、苏木素伊红(HE)染色试剂盒、阿尔辛蓝过碘酸雪夫(AB-PAS)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;桔梗甘草汤:桔梗、甘草(炙)、半夏、旋覆花、大腹皮、枳壳、赤茯苓、芍药、前胡;新冠痰湿质方:陈皮、茯苓、藿香、豆蔻、薏苡仁、法半夏;五苓散:猪苓、茯苓、白术、泽泻、桂枝;小柴胡汤:柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣均购置于北京同仁堂(贵州省贵阳市中华南路128号荔星店)。医用压缩空气式雾化器(YS-06)购自合肥雅美娜环境医疗设备有限公司;电子天平(JE203Max)购自上海浦春计量仪器有限公司;组织包埋盒(REF31050102W)购自江苏世泰实验器材有限公司;石蜡包埋机(EG1150H)、组织切片机(RM2265)、摊片机(HI1210)、光学显微镜(DM750)均购于德国LEICA;石蜡包埋机、冷冻台(KD-BL)购于浙江省金华市科迪仪器设备有限公司。

2.2. 动物处理

72只小鼠随机分为12组,第一批为LPS处理7天后边中药+LPS灌胃处理7天,按照空白对照、

LPS、桔梗甘草汤、新冠痰湿质方、五苓散、小柴胡汤分为6组，每组6只；第二批为LPS处理14天后中药灌胃7天；按照空白对照、LPS、桔梗甘草汤、新冠痰湿质方、五苓散、小柴胡汤分为6组，每组6只。对照组：清洁条件下喂养，未作处理；LPS组：雾化吸入[6] $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS，雾化速率 $\geq 0.2 \text{ mL/min}$ ，气体流量 $\geq 5 \text{ L/min}$ ，耗时30 min；药物组小鼠给药量根据人和小鼠表面积比率换算：桔梗甘草汤 12.37 g 药材/kg/d；新冠痰湿质方 7.11 g 药材/kg/d；五苓散 5.13 g 药材/kg/d；小柴胡汤 10.40 g 药材/kg/d，熬煮后每天灌胃一次。

2.3. HE 和 AB-PAS 染色

结束处理后一天，称重，取肺组织，4%多聚甲醛固定过夜，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，浸蜡后包埋、切片。脱蜡复水，进行HE和AB-PAS染色，中性树脂封片，显微镜下观察并拍照，统计炎症细胞渗出区域面积及粘液分布面积。

2.4. 统计学分析

使用SPSS 26.0软件对所有数据进行正态性检验，GraphPad Prism 8绘图。符合正态性分布数据使用t检验，偏态分布数据用非参数检验。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

3. 结果

3.1. LPS 7 d 后中药 + LPS 7 d 灌胃对小鼠肺脏的影响

3.1.1. 小鼠体重、肺重量及肺指数

根据前期预实验及文献查阅，本实验选择LPS进行小鼠肺部炎症模型的构建。

由图1(A)可知，与对照组相比LPS处理后的小鼠体重下降，有显著统计学差异(** $P < 0.01$)；与模型组相比，经中药灌胃的小鼠体重有上升，其中，桔梗甘草汤组、新冠痰湿质方组有统计学差异(* $P < 0.05$)。肺指数为肺重量与总体重的比值，当肺部疾病引起炎性渗出，可能会使肺重量增加，因此肺指数可作为肺部病变及治疗效果的评价指标[7]。图1(C)中，与对照组相比，LPS组肺指数显著升高，有显著统计学差异(** $P < 0.01$)；除五苓散组外，桔梗甘草汤组、新冠痰湿质方组、小柴胡汤组均比LPS组降低，且新冠痰湿质方组有显著统计学差异(** $P < 0.01$)。

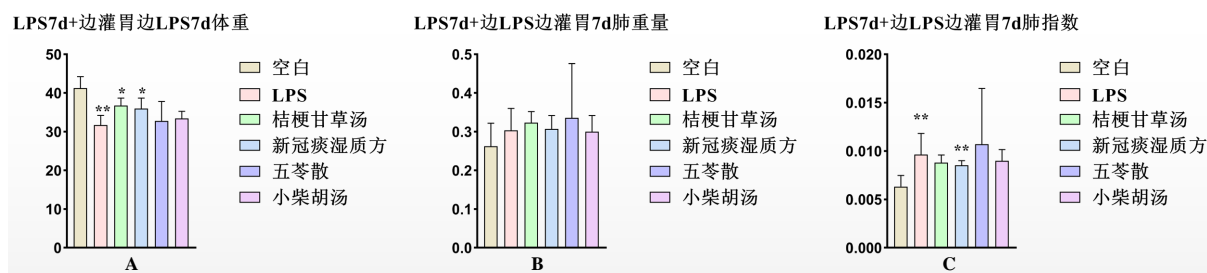


Figure 1. Body weight, lung weight and lung index of mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1. 各组小鼠体重、肺重量及肺指数。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

3.1.2. 肺部炎症影响

图2所示，对照组小鼠肺组织结构完整，肺泡结构明显，未见明显炎性浸润；经LPS处理后，小鼠肺组织出现病理改变，如：肺泡壁增厚、水肿，肺泡腔狭窄，肺组织可见明显炎性细胞浸润；桔梗甘草汤组、新冠痰湿质方组较LPS组损伤程度减轻，肺泡增厚、炎性浸润均改善；五苓散组较LPS组肺组织

结构完整、肺泡结构清晰，未见明显炎性浸润；小柴胡汤组较 LPS 组，肺泡结构完整，炎性浸润较大改善。

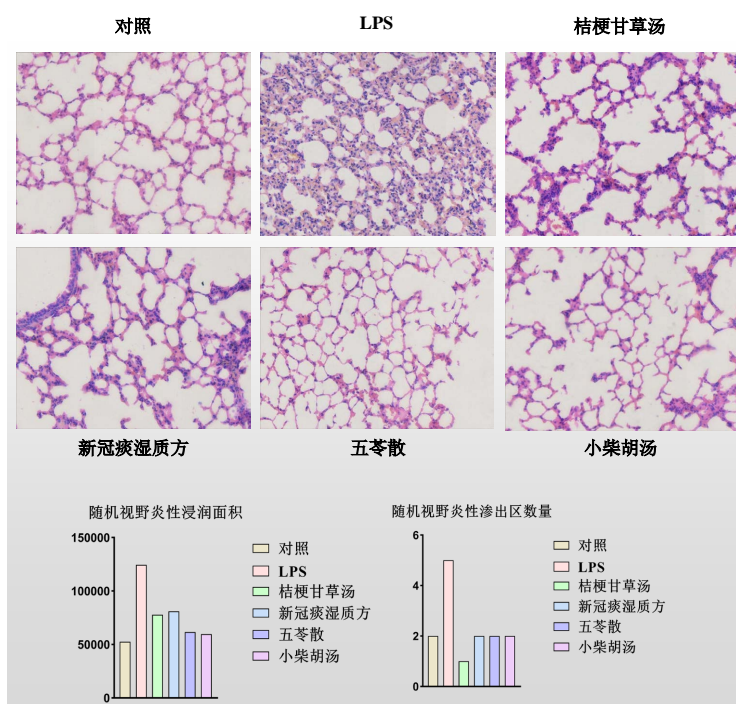


Figure 2. HE staining of lung tissues from various groups in mice
图 2. 各组小鼠肺组织 HE 染色

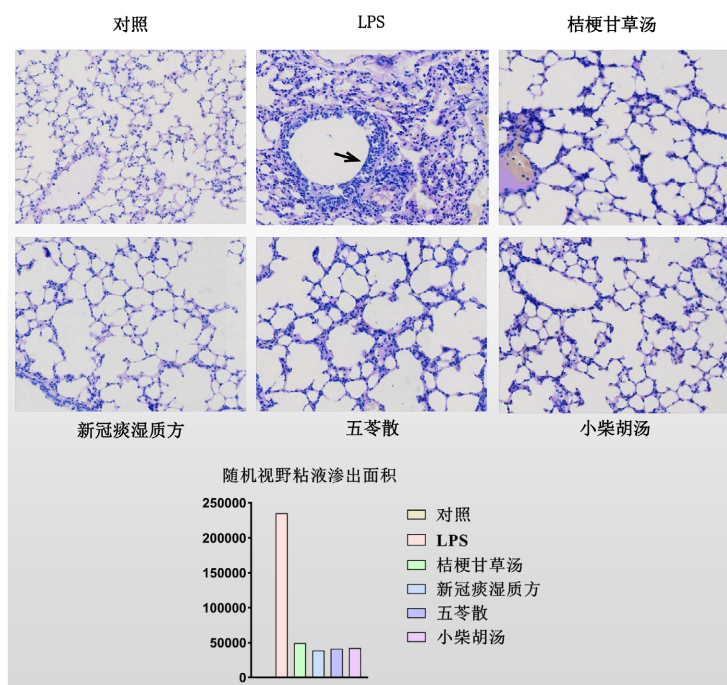


Figure 3. AB-PAS staining of lung tissue from various groups of mice
图 3. 各组小鼠肺组织 AB-PAS 染色

3.1.3. 肺部粘液影响

呼吸道粘液分泌过多是呼吸道炎症性疾病的重要特征[8]。为了检测小鼠肺组织中的黏蛋白，本实验选择 AB-PAS 对肺组织切片进行染色，此法可将酸性粘液质着蓝色，复合粘液质着紫蓝色。结果如图 3 所示，与未作处理的对照组相比，LPS 刺激引起了明显的粘液分泌，黑色箭头处其气管壁呈深度蓝染；在药物组小鼠中，与 LPS 处理小鼠相比，粘液高分泌程度显著减弱。

3.2. LPS 14 d 后中药灌胃 7 d 小鼠的影响

3.2.1. 小鼠体重、肺重量及肺指数

由图 4(A)可知，与对照组相比 LPS 处理后的小鼠体重显著下降，有显著统计学差异($**P < 0.01$)；与模型组相比，经中药灌胃的小鼠体重显著上升，有显著统计学差异($**P < 0.01$)。图 4(C)中，与对照组相比，LPS 组肺指数显著升高，有极显著统计学差异($**P < 0.01$)；与造模组相比，药物组体重均有下降；除五苓散组外，桔梗甘草汤组、新冠痰湿质方组、小柴胡汤组均比 LPS 组显著降低($**P < 0.01$)，且新冠痰湿质方组有统计学差异($*P < 0.05$)。

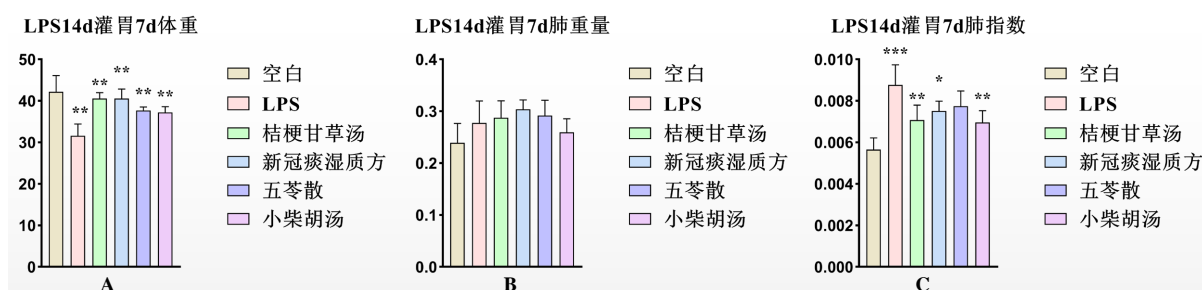


Figure 4. Body weight, lung weight and lung index of mice in each group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

图 4. 各组小鼠体重、肺重量及肺指数。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

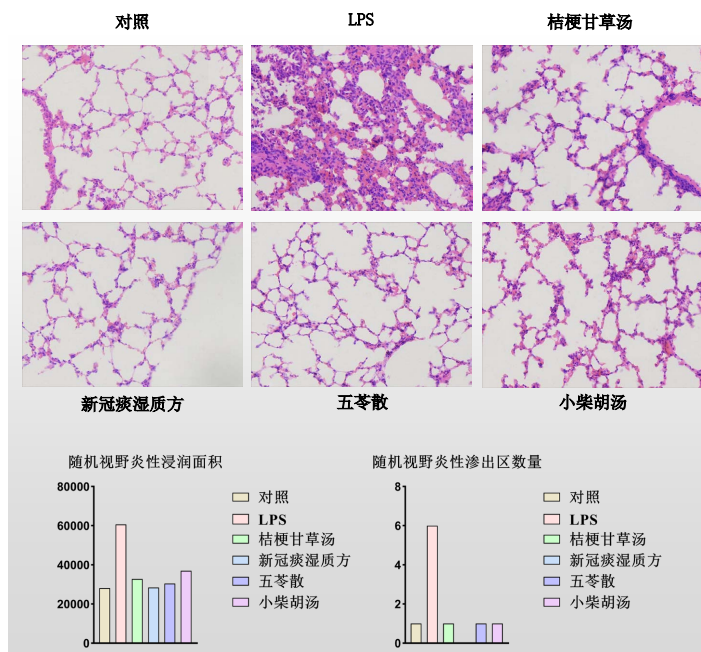


Figure 5. HE staining of lung tissues of various groups of mice

图 5. 各组小鼠肺组织 HE 染色

3.2.2. 肺部炎症影响

图 5 所示，对照组小鼠肺组织结构完整，肺泡结构明显，未见明显炎性浸润；经 LPS 处理后，小鼠肺组织出现病理改变，如：肺泡壁增厚、水肿，肺泡腔狭窄，肺组织可见大范围炎性细胞浸润；桔梗甘草汤组、小柴胡汤组仍有少量炎性浸润，但较模型组损伤程度较大改善；新冠痰湿质方组、五苓散组较 LPS 组损伤程度大大改善，未见肺泡增厚及明显炎性浸润。

3.2.3. 肺部粘液影响

结果如图 6 所示，与对照组相比，LPS 刺激支气管粘液分泌，黑色箭头处其气管壁呈蓝染；在药物组小鼠中，与 LPS 处理小鼠相比，粘液高分泌程度明显减弱。

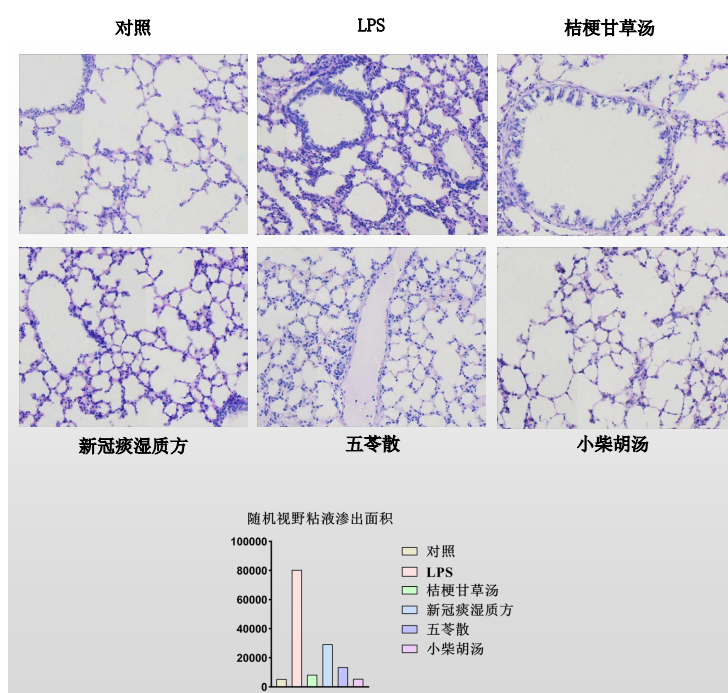


Figure 6. AB-PAS staining of lung tissue from various groups of mice

图 6. 各组小鼠肺组织 AB-PAS 染色

4. 讨论

肺炎主要指由细菌、病毒等病原体引起的肺部感染[9]。LPS，是一种内毒素，在革兰氏阴性菌感染时，细菌崩解后释放的一种物质，LPS 可引发强烈炎症反应，诱发小鼠肺组织内炎性细胞浸润[10]，常被用于建立肺部炎症反应模型[1]，本次实验以此为动物模型的建立方法。病理组织学结果显示，LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型肺组织的病理表现为肺泡水肿、炎性细胞浸润、肺泡壁增厚等急性肺炎特征，说明通过雾化吸入 LPS 成功建立了急性肺炎模型[10]。在两组模型中，LPS 处理 7 d 后边中药灌胃边 LPS 处理 7 d 模拟了在治疗过程中持续接触致病原的情况；LPS 处理 14 d 中药灌胃 7 d 模型组中，LPS 组 14 天后未作处理，比较了机体自愈与药物治疗，说明药物治疗会加速机体 ALI 后的修复过程。

现代医学对 ALI 中的炎症反应治疗常使用抗生素，会导致一定的耐药现象。中医药在治疗肺部炎症性反应方面有独特优势，根据现代药理学研究可知，中药的活性成分丰富，且具有抗菌、抗炎、增强免疫力等作用[11]。桔梗甘草汤出自《圣济总录》卷二十五，主要用于伤寒咳嗽，胸膈壅闷。其中桔梗宣而能升，可清利咽喉，理气开胸，如“舟楫”载药上行；甘草生用凉而泻火兼顾脾胃[12]。四川省名中医何

俊安主任医师常使用桔梗甘草汤合涤痰汤加减兼顾驱邪与固本, 临床实践具有较好疗效[13]。贵州省中医药管理局关于新型冠状病毒肺炎痰湿质患者推荐方结合了地域和疾病的共同特点, 辨证施治, 也被采纳于本实验中。根据 2020 年 1 月 22 日国家卫健委所发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(第三版)》, “清肺排毒汤”为临床推荐用药, 其中五苓散、小柴胡汤为此方剂中的组成方剂, 两者同样出自“医圣”张仲景的《伤寒论》[14]。五苓散为祛湿剂, 主治痰饮病, 温阳化气、利湿行水, 也具有抗病毒及抗炎功效[14]。在中医理论中, 肺炎多以“外邪”致病, 《黄帝内经》“风邪上受, 首先犯肺”。小柴胡汤以“和解少阳, 扶正祛邪”著称, 在“外感”病中应用广泛[15]。

5. 总结

综上所述, 本实验结果显示, 中药灌胃各组小鼠肺组织肺泡水肿、炎性细胞浸润、肺泡壁增厚症状均较模型组减轻, 说明本次实验选取方剂对 LPS 诱导的 ALI 均有一定疗效。然而, 本实验为动物实验, 期望为治疗 ALI 提供理论依据及临床治疗思路参考, 后期还需要进行更多实验及临床研究。

基金项目

基于肺部粘液性渗出动物模型正压给氧和中药化痰干预的疗效快速评价, 贵州省科技支撑项目黔科合支撑[2020] 4Y209 号资助。

参考文献

- [1] Li, J.C., Lu, K.M., Sun, F.L., *et al.* (2021) Panaxydol Attenuates Ferroptosis against LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway. *Journal of Translational Medicine*, **19**, Article No. 96. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02745-1>
- [2] 丁薇, 汪文来, 何湛湛, 等. 基于 NF- κ B 通路探讨苓桂术甘汤对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的抗炎保护作用[J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1-8. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230902>, 2023-04-19.
- [3] Li, L., Chen, J., Lin, L., *et al.* (2020) Quzhou Fructus Aurantii Extract Suppresses Inflammation via Regulation of MAPK, NF- κ B and AMPK Signaling Pathway. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 1593. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58566-7>
- [4] 王小花, 林坚, 邢东文, 等. lncRNA MALAT1 调节 miR-22-3p/NLRP3 轴对 LPS 诱导的急性肺损伤的影响[J]. 广东医学, 2023, 44(3): 297-306.
- [5] 韩陈香. 中医治疗急性肺炎的临床疗效观察[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(16): 123-125.
- [6] 晋一帆, 李胜群, 孙竹筠, 等. 基于实时体温监测技术探讨酵母菌、脂多糖、2,4-二硝基酚对小鼠致热作用及呼吸功能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 454-462.
- [7] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选[J]. 中国实验方剂学杂志. 2018, 24(7): 82-88.
- [8] 唐希军, 雷丽敏. 桑白皮汤加减辅治慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(3): 548-550.
- [9] 林喜足, 黄共培, 陈族典. 布地奈德与硫酸沙丁胺醇雾化吸入治疗小儿急性肺炎的疗效及安全性对比[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(36): 35-37+41.
- [10] 武振帅, 纪鹏, 魏彦明, 等. 黄芩-连翘配伍对脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 800-809.
- [11] 司晓慧, 任晓敏, 刘静, 等. 中医辨证和中药方剂防治动物细菌性肺炎的研究进展[J]. 中国兽医杂志. 2023, 59(1): 116-119.
- [12] 丁一, 周燕萍, 黄志虎, 等. 吕文亮中医辨治新冠肺炎验案四则[J]. 湖北中医药大学学报, 2020, 22(6): 102-105.
- [13] 唐虎, 李睿, 赵远, 张永建, 何俊安. 中医涤痰开窍法治疗重症肺炎的理论探讨[J]. 四川中医, 2021, 39(6): 19-21.
- [14] 杜文琪, 梅鑫鑫, 李晋. 清肺排毒汤及其主要方剂治疗新型冠状病毒肺炎疗效解析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 12-16.
- [15] 王双玲, 黄宏, 韩文兵, 等. 小柴胡汤在老年性肺炎治疗中的应用[J]. 中国中医急症, 2020, 29(3): 539-541.