

# 基于 TGF-β/Smad 信号通路探讨麻杏苦甘汤对急性肺损伤大鼠肺纤维化的影响

韩兴稷<sup>1,2</sup>, 焦太强<sup>3</sup>, 高晨曦<sup>1,2</sup>, 范春阳<sup>2,4</sup>, 王宁<sup>1,2</sup>, 牛阳<sup>2,4,5\*</sup>

(1. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学, 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室, 宁夏银川 750004; 3. 南京中医药大学第一临床学院, 江苏南京 210023; 4. 宁夏医科大学, 宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室, 宁夏银川 750004; 5. 广州中医药大学, 广东广州 510006)

**摘要:** 目的 探究麻杏苦甘汤 (MKD) 对油酸 (OA) 诱导的急性肺损伤 (ALI) 大鼠肺纤维化的作用。方法 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、地塞米松 (DEX) 组 (2 mg/kg) 及 MKD 低、中、高剂量组 (3.1、6.2、12.4 g/kg), 每组 6 只。各组大鼠提前给药 7 d 后尾静脉注射 OA (0.2 mL/kg) 以建立 ALI 模型, 通过观察大鼠一般状态和血气分析综合判定 ALI 模型是否建立成功。采用 ELISA 法检测大鼠血清白细胞介素 (IL)-6、IL-1β、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和Ⅲ型前胶原 (PCⅢ) 水平; HE 染色观察肺组织病理改变; Masson 染色分析肺纤维化程度; 免疫荧光法和 Western blot 法检测肺组织 α-SMA、Collagen I (COL-1)、Fibronectin (FN1)、TGF-β1、Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠血氧饱和度 ( $SaO_2$ )、氧分压 ( $PaO_2$ )、氧合指数 ( $PaO_2/FiO_2$ ) 降低 ( $P < 0.01$ ); 血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 PCⅢ 水平升高 ( $P < 0.01$ ); 肺组织结构紊乱, 肺泡壁增厚, 肺泡内有明显炎症细胞和液体渗出, 有明显的胶原纤维沉积; 肺组织 α-SMA、COL-1、FN1、TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, DEX 组和 MKD 各剂量组  $SaO_2$ 、 $PaO_2$  和  $PaO_2/FiO_2$  升高 ( $P < 0.01$ ); 血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 PCⅢ 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 肺组织结构损伤、肺泡壁增厚、组织水肿和炎性浸润减轻; 肺组织 α-SMA、COL-1、FN1、TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 MKD 可有效缓解 ALI 后期纤维化进程, 其作用机制可能与调控 TGF-β1/Smad 信号通路抑制炎症反应有关。

**关键词:** 麻杏苦甘汤; 急性肺损伤; 肺纤维化; 油酸; 炎症反应; TGF-β/Smad 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)12-3943-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.009

## Effects of Maxing Kugan Decoction on pulmonary fibrosis in a rat model of acute lung injury via TGF-β/Smad signaling pathway

HAN Xing-ji<sup>1,2</sup>, JIAO Tai-qiang<sup>3</sup>, GAO Chen-xi<sup>1,2</sup>, MAO Chun-yang<sup>2,4</sup>, WANG Ning<sup>1,2</sup>, NIU Yang<sup>2,4,5\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory for Modernization of Ningxia Ethnomedicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. The First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 4. Ningxia Regional Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Regional High-Prevalence Disease Control, Yinchuan 750004, China; 5. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the effects of Maxing Kugan Decoction (MKD) on pulmonary fibrosis in a rat model of acute lung injury (ALI) induced by oleic acid (OA). **METHODS** The SD rats were randomly assigned to the blank group, the model group, the dexamethasone (DEX) group (2 mg/kg), and the low-dose, medium-

收稿日期: 2025-06-19

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目 (U20A20404); 宁夏自然科学基金项目 (2023AAC03212); 国家名老中医药专家传承工作室建设项目 (中医药教育函〔2022〕75号)

作者简介: 韩兴稷 (1998—), 男, 硕士, 从事中医药防治西北地区肺系疾病的研究。E-mail: 1916410833@qq.com

\*通信作者: 牛阳 (1964—), 男, 硕士, 二级教授, 博士生导师, 从事中医药防治疫病的研究。E-mail: niuyang0227@163.com

dose, and high-dose MKD groups (3.1, 6.2 and 12.4 g/kg), with 6 rats in each group. Following 7 days of pretreatment, the ALI rat models were successfully induced by tail vein injection of OA (0.2 mL/kg), validated by behavioral assessment and blood gas analysis. The rat serum levels of interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and type III procollagen (PC III) were quantified by ELISA. The lung tissue pathology was evaluated by HE staining, while the severity of pulmonary fibrosis was analyzed by Masson staining. The pulmonary protein expressions of  $\alpha$ -SMA, Collagen I (COL-1), Fibronectin (FN1), TGF- $\beta$ 1, Smad2/3, and p-Smad2/3 was analyzed by immunofluorescence and Western blot. **RESULTS** Compared to the blank group, the model group exhibited significantly reduced blood oxygen saturation ( $SaO_2$ ), oxygen partial pressure ( $PaO_2$ ), and oxygenation index ( $PaO_2/FiO_2$ ) ( $P < 0.01$ ); elevated levels of serum IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and PC III ( $P < 0.01$ ); disordered lung tissue architecture with thickened alveolar walls, marked inflammatory cell infiltration and alveolar fluid exudation, and substantial collagen deposition; and increased pulmonary protein expressions of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, and p-Smad2/3 as well ( $P < 0.01$ ). Compared to the model group, all DEX group and MKD groups demonstrated significantly higher  $SaO_2$ ,  $PaO_2$ , and  $PaO_2/FiO_2$  ( $P < 0.01$ ); reduced serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and PC III ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); alleviated lung tissue damage including improved alveolar wall integrity, reduced edema, and diminished inflammatory infiltration; and downregulated pulmonary protein expressions of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, and p-Smad2/3 ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** MKD effectively mitigates late-stage ALI-induced pulmonary fibrosis, potentially through its regulatory effect on the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway to suppress inflammatory responses.

**KEY WORDS:** Maxing Kugan Decoction; acute lung injury; pulmonary fibrosis; oleic acid; inflammatory reaction; TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是临床常见的一种肺部疾病, 其典型的病理改变为肺部弥漫性炎症、肺组织结构破坏、肺组织水肿以及组织细胞损伤, 并极易发展成急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)<sup>[1]</sup>。然而 ALI 不论是否进一步发展成为 ARDS, 在 ALI 后期损伤修复的过程中均会出现成纤维细胞聚集、胶原纤维沉积等纤维化表现<sup>[2]</sup>。且肺纤维化也是 ALI 严重的后遗症, 严重影响患者的生存质量<sup>[3-6]</sup>。目前临幊上治疗 ALI 的措施以呼吸支持和激素干预为主, 疗效有限<sup>[7]</sup>。

中医药在防治 ALI 方面具有极大潜力, 但主要聚焦在如何防治 ALI 中炎症反应和组织损伤, 对 ALI 后期纤维化的研究较少<sup>[8-9]</sup>。麻杏苦甘汤 (Maxing Kugan Decoction, MKD) 可有效治疗宁夏及周边地区秋冬季呼吸道感染性疾病<sup>[10]</sup>。前期研究发现, SD 大鼠尾静脉注射油酸 (oleic acid, OA) 后给予 MKD 干预, 不仅能够有效减轻 ALI 早 (3~6 h)、中期 (12 h) 的炎症反应和肺组织损伤, 对于 ALI 后期的纤维化也有可能具备防治作用。目前, 已初步明确了 MKD 可防治 ALI 炎症反应、细胞凋亡的作用机制以及减少胶原纤维沉积<sup>[11-12]</sup>, 但其防治 ALI 后期纤维化的具体机制尚

不明确。因此, 本研究将结合肺纤维化经典信号通路——TGF- $\beta$ /Smad 信号通路, 从炎症反应以及肺纤维化关键病理特征 (胶原纤维沉积) 两方面来探讨 MKD 对 ALI 后期肺纤维化的保护作用。

## 1 材料

1.1 动物 36 只 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 (200±20) g, 购于宁夏医科大学动物实验中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (宁) 2020-0001], 饲养于宁夏医科大学动物屏障中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (宁) 2020-0001], 环境温度 20~25 ℃, 相对湿度 40%~60%。所有实验流程遵循实验动物伦理学规定, 所有实验方法遵循 ARRIVE 报告指南, 由宁夏医科大学医学伦理审查委员会批准通过 (伦理审查号 IACUC-2024014)。

1.2 药物 麻杏苦甘汤由麻黄 10 g、银柴胡 12 g、苦参 15 g、苦杏仁 12 g 和甘草 10 g 组成, 药材 (批号 2301110、220436、2211308、2301275、2211376) 购于宁夏明德中药饮片有限公司, 经宁夏医科大学药学院专家鉴定符合 2020 年版《中国药典》规定。将上述药材加纯水浸泡后煎煮取 2 次, 每次 30 min, 合并 2 次滤液, 浓缩至 1 g/mL, 采用 UPLC-TQ/MS 和 HPLC 法对 MKD 的化学成分进行定性和定量分析, 发现 MKD 主要成分有苦杏

仁苷 (14.56 mg/g)、甘草酸 (2.00 mg/g)、芹糖甘草苷 (1.10 mg/g)、麻黄碱 (0.89 mg/g)、伪麻黄碱 (0.89 mg/g)、甘草苷 (0.75 mg/g)、苦参碱 (0.56 mg/g)、银柴胡胺 B (0.54 mg/g)、氧化槐定碱 (0.46 mg/g)、氧化苦参碱 (0.42 mg/g)、槐定碱 (0.37 mg/g) 及槐果碱 (0.31 mg/g) 等。地塞米松 (DEX) 注射液 (批号 H42021492) 购自华中药业股份有限公司。

**1.3 试剂** OA (批号 O1383) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 大鼠 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PC III ELISA 检测试剂盒 (批号 ELK1158、ELK1272、ELK1396、ELK7301) 购自科鹿 (武汉) 生物科技有限责任公司; 全蛋白提取试剂盒、BCA 检测试剂盒、Trizol 总 RNA 提取试剂盒、一步法 RT-qPCR 试剂盒 (批号 KGB5303-100、KGB2101-500、KGF5101-100、KGF2106-100) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; HE 高清恒染试剂盒、Masson 染色试剂盒 (批号 G1076-500ML、G1006-20ML) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司;  $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、GAPDH 抗体 (批号 AF1032、AF7001、AF5335、AF1027、AF6367、AF3367、AF7021) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

## 2 方法

**2.1 分组、给药与造模** 将 36 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、DEX 组 (2 mg/kg) 和 MKD 低、中、高剂量组 (3.1、6.2、12.4 g/kg)。适应性喂养 1 周后, 各给药组灌胃给予相应剂量药物 7 d, 空白组和模型组灌胃给予生理盐水。末次给药后 1 h, 除空白组外, 其余各组大鼠均尾静脉注射 0.2 mL/kg OA 以制备 ALI 模型, 通过大鼠一般状态和血气分析结果判定造模是否成功<sup>[13]</sup>。

**2.2 麻醉与取材** 造模 24 h 后, 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液 (40 mg/kg) 进行麻醉, 腹主动脉取血 3 mL, 其中 0.5 mL 用于行血气分析, 2.5 mL 离心得到血清, 用于 ELISA 检测。取血后处死大鼠, 分离得到左肺, 于 4% 多聚甲醛中固定, 用于 HE、Masson 和免疫荧光等病理染色; 剪取右肺, 于液氮中保存备用。

**2.3 血气分析** 使用血气分析仪测定  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$  值, 并计算  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  值。

**2.4 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平** 将腹主动脉收集的血液于 4 ℃、2 000 r/min 条件下离心 15 min, 离心半径 8.3 cm, 分离

得到上层血清, 根据 ELISA 试剂盒说明书检测各组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平。

**2.5 HE 染色观察肺组织病理改变** 取左肺下叶组织, 经固定、包埋、切片后, 参照 HE 试剂盒说明书进行 HE 染色, 观察肺组织形态学改变, 并随机选取 5 个视野使用 Szapiel 评分表<sup>[14]</sup>评估肺泡炎症程度。无肺泡炎症, 计 0 分; 轻度肺泡炎, 局部及近胸部可见单核细胞浸润, 面积小于全肺 20%, 肺泡结构大致正常, 计 1 分; 中度肺泡炎, 病变面积占全肺的 20%~50%, 计 2 分; 重度肺泡炎, 病变面积大于全肺的 50%, 计 3 分。

**2.6 Masson 染色分析肺纤维化程度** 取肺组织石蜡切片, 参照试剂盒说明书进行 Masson 染色, 观察肺组织纤维化情况, 并随机选取 5 个视野, 使用 Ashcroft 评分表<sup>[15]</sup>按 0~8 级评估肺纤维化严重程度。0 级为肺组织正常; 1 级为肺泡或细支气管壁微小纤维增厚; 2~3 级为肺泡壁中度增厚, 肺组织结构无明显损害; 4~5 级为纤维化加重, 肺结构明显受损, 形成纤维带或小纤维团块; 6~7 级为肺组织结构严重破坏, 纤维面积大, 可伴有蜂窝肺形成; 8 级为满视野纤维组织, 整个肺组织全部闭塞坏死。

**2.7 免疫荧光染色检测肺组织  $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 蛋白表达** 将肺组织石蜡切片脱蜡后进行抗原修复, 室温封闭 1 h, 随后将切片与相应一抗混合 ( $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 和 p-Smad2/3, 稀释比均为 1:200), 4 ℃ 孵育过夜, PBS 清洗后滴加二抗室温孵育 1 h, 再次使用 PBS 清洗后, 使用 DAPI 复染细胞核, 室温避光孵育 10 min, 封片, 于倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

**2.8 Western blot 法检测肺组织  $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 蛋白表达** 剪取各组肺组织, 加入适量 RIPA 裂解后获取总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 定量后加入 Loading Buffer, 加热变性。经上样、电泳、转膜、封闭后, 加入一抗  $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 和 p-Smad2/3 (稀释比均为 1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜, 然后加入二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h; 最后滴加发光液, 于凝胶成像系统成像观察, 采用 Image J 软件进行灰度值分析。

**2.9 统计学分析** 通过 Excel 和 Graphpad Prism 8 软件进行处理, 计量资料以平均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析, 若存

在显著性差异，则使用 Tukey's HSD 进行事后检验，2 组间比较采用 Student-t 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 麻杏苦甘汤对 ALI 大鼠一般情况的影响** 空白组大鼠精神状态良好，呼吸平稳，活动正常；与空白组比较，模型组大鼠精神萎靡，呼吸困难，倦怠嗜卧；与模型组比较，DEX 组和 MKD 各剂量组大鼠精神状态改善，呼吸频率降低，行为活动恢复。

**3.2 麻杏苦甘汤对 ALI 大鼠血气指标的影响** 如表 1 所示，与空白组比较，模型组大鼠  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ 、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  值均降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，DEX 组和 MKD 各剂量组大鼠  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ 、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  值均升高 ( $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Tab. 2 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PC III levels of rats in each group (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	PC III
空白组	66.51±2.08	10.06±0.60	18.64±0.81	0.64±0.004
模型组	92.33±1.31 **	30.02±0.92 **	31.55±0.58 **	0.91±0.021 **
DEX 组	66.31±2.39 ##	11.93±0.23 ##	21.67±1.38 ##	0.84±0.002 #
MKD 低剂量组	81.20±3.03 ##	23.33±2.60 ##	26.43±0.36 #	0.77±0.004 ##
MKD 中剂量组	72.36±2.63 ##	10.13±1.08 ##	24.66±2.83 ##	0.72±0.036 ##
MKD 高剂量组	52.29±0.78 ##	9.31±1.75 ##	20.86±0.75 ##	0.70±0.012 ##

注：与空白组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

**3.4 麻杏苦甘汤对 ALI 大鼠肺组织病理形态的影响** 如图 1、表 3 所示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织中可见明显炎性浸润、肺泡代偿性增大或萎缩、肺泡壁增厚、肺组织水肿等异常病理改变，Szapiel 评分升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，DEX 组和 MKD 各剂量组上述异常病理改变均有改善，炎性浸润、肺泡壁增厚、肺组织水肿的程度减轻，Szapiel 评分降低 ( $P < 0.01$ )。

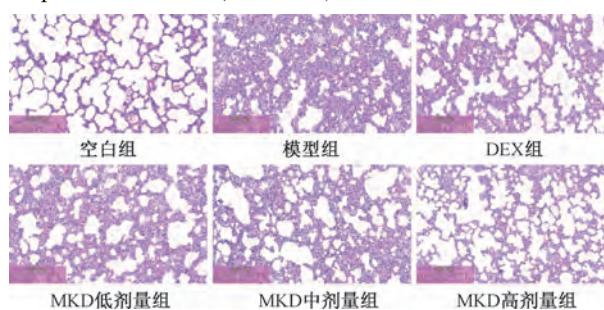


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色 ( $\times 100$ )

Fig. 1 HE staining of lung tissue of rats in each group ( $\times 100$ )

**3.5 麻杏苦甘汤对 ALI 大鼠肺组织胶原纤维沉积的影响** 如图 2、表 4 所示，与空白组比较，模型

表 1 各组大鼠血气指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 1 mmHg = 0.133 kPa)

Tab. 1 Comparison of blood gas indices of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=6, 1 mmHg = 0.133 kPa)

组别	$\text{PaO}_2/\text{mmHg}$	$\text{SaO}_2/\%$	$(\text{PaO}_2/\text{FiO}_2)/\text{mmHg}$
空白组	94.60±3.00	97.35±0.14	450.49±14.28
模型组	50.64±1.04 **	81.89±2.05 **	241.16±4.97 **
DEX 组	74.87±3.65 ##	95.44±0.29 ##	356.54±17.40 ##
MKD 低剂量组	64.62±1.90 ##	89.37±1.36 ##	307.73±9.06 ##
MKD 中剂量组	71.74±2.08 ##	93.34±1.83 ##	341.61±9.90 ##
MKD 高剂量组	83.32±1.59 ##	96.41±0.31 ##	396.77±7.55 ##

注：与空白组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，##  $P < 0.01$ 。

**3.3 麻杏苦甘汤对 ALI 大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平的影响** 如表 2 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平均升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，DEX 组和 MKD 各剂量组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PC III 水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Tab. 2 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and PC III levels of rats in each group (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	PC III
空白组	66.51±2.08	10.06±0.60	18.64±0.81	0.64±0.004
模型组	92.33±1.31 **	30.02±0.92 **	31.55±0.58 **	0.91±0.021 **
DEX 组	66.31±2.39 ##	11.93±0.23 ##	21.67±1.38 ##	0.84±0.002 #
MKD 低剂量组	81.20±3.03 ##	23.33±2.60 ##	26.43±0.36 #	0.77±0.004 ##
MKD 中剂量组	72.36±2.63 ##	10.13±1.08 ##	24.66±2.83 ##	0.72±0.036 ##
MKD 高剂量组	52.29±0.78 ##	9.31±1.75 ##	20.86±0.75 ##	0.70±0.012 ##

表 3 各组大鼠肺组织 Szapiel 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Tab. 3 Comparison of Szapiel score of lung tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	Szapiel 评分/分
空白组	0.2±0.40
模型组	2.6±0.49 **
DEX 组	1.2±0.40 ##
MKD 低剂量组	1.8±0.40 ##
MKD 中剂量组	1.4±0.49 ##
MKD 高剂量组	1.2±0.40 ##

注：与空白组比较，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较，##  $P < 0.01$ 。

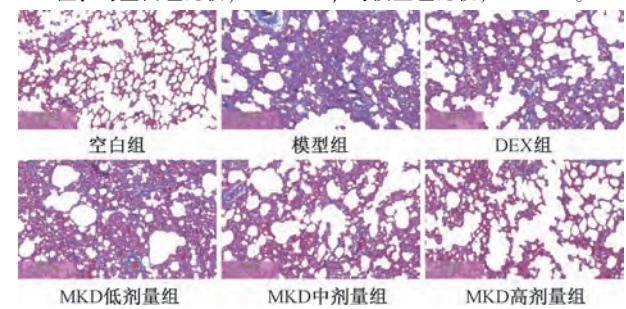


图 2 各组大鼠肺组织 Masson 染色 ( $\times 100$ )

Fig. 2 Masson staining of lung tissue of rats in each group ( $\times 100$ )

组大鼠肺组织结构严重破坏，出现明显的胶原纤维增生沉积，Ashcroft评分升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，DEX组和MKD各剂量组肺组织结构损伤和胶原纤维沉积均有缓解，Ashcroft评分降低 ( $P<0.01$ )。

表4 各组大鼠肺组织Ashcroft评分比较 ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

Tab. 4 Comparison of Ashcroft score of lung tissue in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

组别	Ashcroft评分/分
空白组	0.6±0.49
模型组	6.6±0.49 **
DEX组	4.6±0.49##
MKD低剂量组	4.8±0.40##
MKD中剂量组	3.4±0.49##
MKD高剂量组	1.8±0.40##

注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，##  $P<0.01$ 。

### 3.6 麻杏苦甘汤对ALI大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3蛋白表达的影响

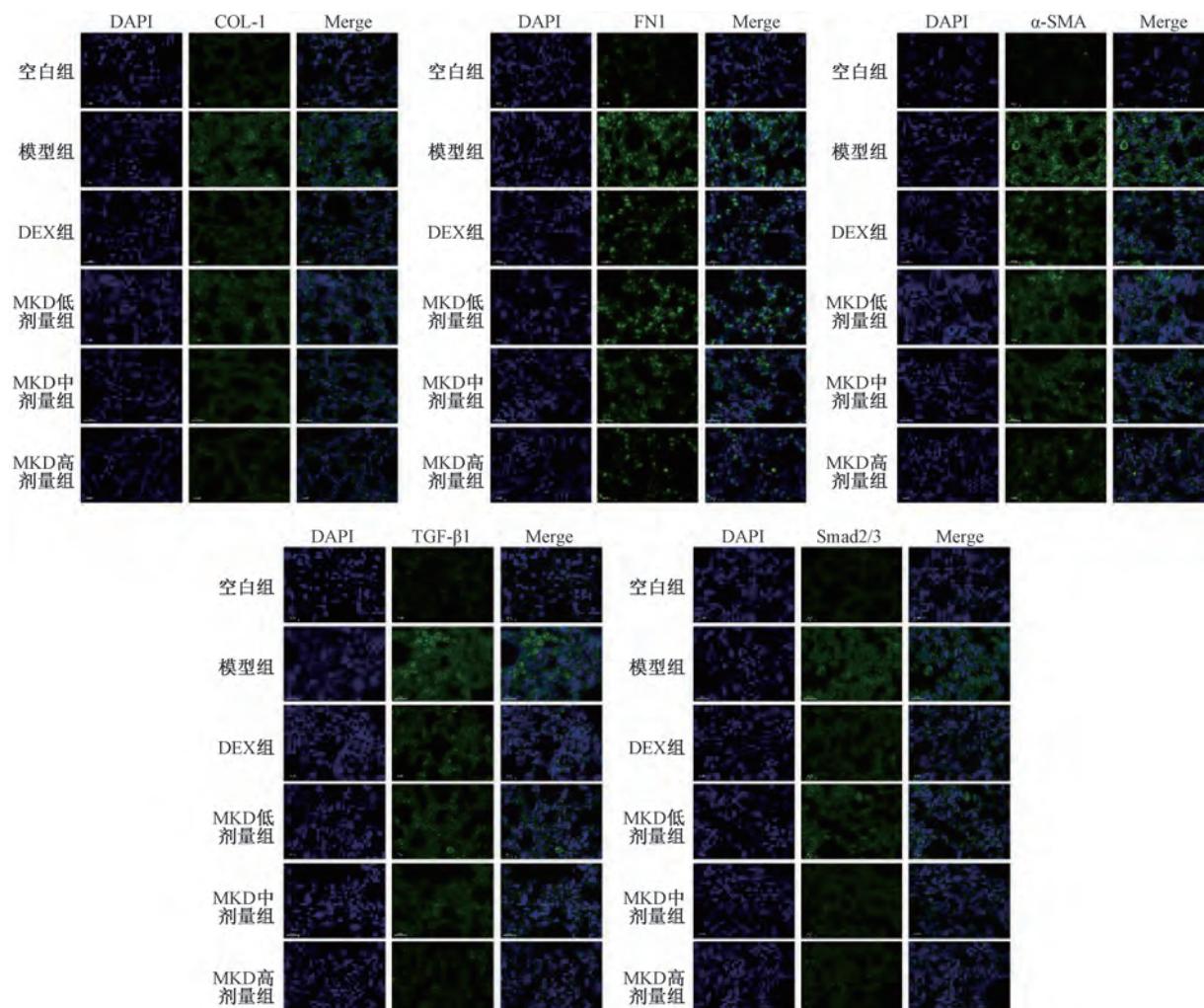


图3 各组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3蛋白免疫荧光染色 ( $\times 1000$ )

Fig. 3 Immunofluorescence staining of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1 and Smad2/3 proteins in lung tissue of rats in each group ( $\times 1000$ )

3.6.1 免疫荧光染色 如图3、表5所示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1和Smad2/3蛋白荧光表达量升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，DEX组和MKD各剂量组肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1和Smad2/3蛋白的荧光表达量降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

3.6.2 Western blot检测 如图4、表6所示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1蛋白表达及( $p$ -Smad2/3)/(Smad2/3)比值升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，DEX组和MKD各剂量组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )，DEX组和MKD中、高剂量组大鼠肺组织( $p$ -Smad2/3)/(Smad2/3)比值降低 ( $P<0.01$ )。

表5 各组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3蛋白平均荧光强度比较( $\bar{x}\pm s$ , n=6)Tab. 5 Comparison of average fluorescence intensity of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1 and Smad2/3 proteins in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

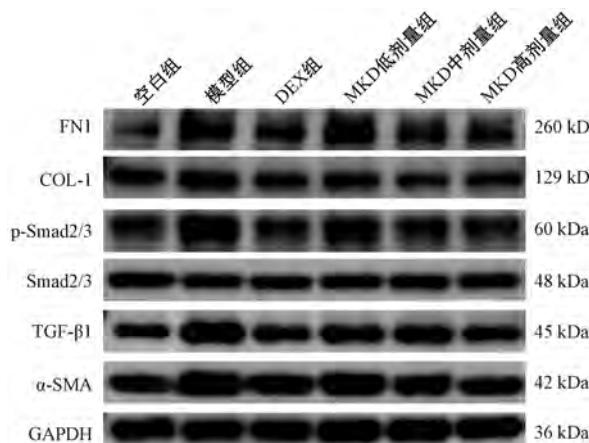
组别	$\alpha$ -SMA	COL-1	FN1	TGF- $\beta$ 1	Smad2/3
空白组	37.69±7.49	34.64±2.25	64.47±7.44	36.30±2.69	23.55±1.69
模型组	118.38±8.82 **	59.53±3.46 **	151.31±5.57 **	57.70±1.88 **	53.60±1.87 **
DEX组	61.70±18.23 ##	37.08±2.47 ##	110.01±7.71 ##	45.05±2.05 ##	37.90±3.33 ##
MKD低剂量组	73.03±20.23 ##	37.38±4.53 ##	133.46±6.86 #	48.91±1.73 ##	39.47±5.42 ##
MKD中剂量组	49.90±6.69 ##	36.30±3.55 ##	83.68±3.32 ##	44.77±4.12 ##	30.42±1.03 ##
MKD高剂量组	41.24±6.54 ##	34.81±4.39 ##	72.40±11.66 ##	32.87±2.54 ##	25.94±2.04 ##

注: 与空白组比较, \*\* P<0.01; 与模型组比较, # P<0.05, ## P<0.01。

表6 各组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、(p-Smad2/3) / (Smad2/3)蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ , n=6)Tab. 6 Comparison of protein expressions of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1 and (p-Smad2/3) / (Smad2/3) in the lung tissue of each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

组别	$\alpha$ -SMA/GAPDH	COL-1/GAPDH	FN1/GAPDH	TGF- $\beta$ 1/GAPDH	(p-Smad2/3)/(Smad2/3)
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.66±0.03 **	1.37±0.02 **	1.68±0.02 **	1.71±0.05 **	2.00±0.10 **
DEX组	1.27±0.03 ##	1.22±0.05 ##	1.20±0.02 ##	1.24±0.05 ##	1.50±0.12 ##
MKD低剂量组	1.44±0.06 ##	1.26±0.02 ##	1.51±0.05 ##	1.38±0.04 ##	1.92±0.08
MKD中剂量组	1.22±0.02 ##	1.18±0.04 ##	1.12±0.01 ##	1.21±0.03 ##	1.57±0.07 ##
MKD高剂量组	1.09±0.04 ##	1.04±0.02 ##	1.05±0.02 ##	0.95±0.13 ##	1.41±0.06 ##

注: 与空白组比较, \*\* P<0.01; 与模型组比较, ## P<0.01。

图4 各组大鼠肺组织 $\alpha$ -SMA、COL-1、FN1、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白条带图Fig. 4 Protein bands of  $\alpha$ -SMA, COL-1, FN1, TGF- $\beta$ 1, Smad2/3 and p-Smad2/3 in lung tissue of rats in each group

#### 4 讨论

ALI以呼吸困难、低氧血症为基本外在表现,以肺部弥漫性炎症细胞浸润、肺组织水肿以及损伤为基本病理改变<sup>[16]</sup>。临床常聚焦于ALI早中期炎症反应的抑制或肺组织的保护,而忽略了ALI后期修复过程中肺组织的纤维化。前期研究发现,MKD能明显抑制ALI模型中出现的胶原纤维沉积。现代药理研究发现,MKD中苦杏仁苷、甘草酸、苦参碱、氧化苦参碱等多种有效成分可通过调控

TGF- $\beta$ /Smad通路对肺纤维化起到一定的防治作用<sup>[17-21]</sup>。

OA诱导的ALI模型是目前常用的ALI模型之一,其症状和病理变化与临床非常相似<sup>[22]</sup>。本实验结果显示,模型小鼠PaO<sub>2</sub><60 mmHg、SaO<sub>2</sub><90%、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub><300 mmHg,符合ALI的诊断标准<sup>[23]</sup>,表明ALI造模成功。而给予DEX或MKD均能改善上述指标,且MKD高剂量组优于DEX组。IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 是经典的促炎性细胞因子,其水平可以反映炎症反应的严重程度<sup>[24-25]</sup>。本实验结果显示,模型组IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PC III水平及Szapiel、Ashcroft评分均升高,Masson染色可见明显胶原纤维沉积;而给予DEX或MKD均能降低IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PC III水平及Szapiel、Ashcroft评分,减轻肺组织胶原纤维沉积,表明抑制炎症反应能够有效改善ALI后期纤维化。其中MKD中剂量组在抑制炎症反应方面弱于DXE组,但在改善肺组织纤维化方面却优于DEX组,表明MKD除了通过抑制炎症反应外,还另有途径抑制ALI后期纤维化的发生发展。

TGF- $\beta$ 可通过调控Smad蛋白实现肺纤维化中胶原蛋白的转录和蛋白的表达<sup>[26-28]</sup>。其中TGF- $\beta$ 1介导的Smad2和Smad3更是能够促进成纤维细胞聚集并促使胶原纤维的合成<sup>[29]</sup>。而成纤维细胞的标志物 $\alpha$ -SMA、COL-1及FN1的水平同样反映肺

纤维化的程度<sup>[30-31]</sup>。本实验结果显示，模型组大鼠肺组织 TGF-β1、p-Smad2/3、α-SMA、COL-1 和 FN1 蛋白表达量均升高；而 DEX 或 MKD 均能降低以上蛋白表达，其中 MKD 中、高剂量的效果均优于 DEX 组，表明激活 TGF-β/Smad 信号通路会增加 FN1、COL-1 和 α-SMA 的表达，加重肺纤维化程度，而 MKD 能够通过 TGF-β1/Smad2/3 通路改善 ALI 后期纤维化的程度。

综上所述，MKD 可减轻 ALI 大鼠肺组织炎症反应，其还可能通过调控 TGF-β1/Smad2/3 信号通路改善 ALI 后期纤维化。本研究缺乏与传统抗纤维化药物的对比，同时对 MKD 防治肺纤维化的机制研究不够深入，后续本团队将对 MKD 防治肺纤维化的机制进一步完善，为实验研究与临床辨治提供更充实的理论基础。

## 参考文献：

- [1] Villar J, Blanco J, Kacmarek R M. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2016, 22(1): 1-6.
- [2] 任亦频, 周厚荣, 李亚骐, 等. 过表达 miR-203a-3p 对脂多糖致大鼠急性肺损伤后肺纤维化的影响及其机制[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(4): 563-568.
- [3] Zhang C, Wu Z, Li J W, et al. Discharge may not be the end of treatment: pay attention to pulmonary fibrosis caused by severe COVID-19[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(3): 1378-1386.
- [4] Michalski J E, Kurche J S, Schwartz D A. From ARDS to pulmonary fibrosis: the next phase of the COVID-19 pandemic? [J]. *Transl Res*, 2022, 241: 13-24.
- [5] Huang W J, Tang X X. Virus infection induced pulmonary fibrosis[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 496.
- [6] Pitre T, Lupas D, Ebeido I, et al. Prognostic factors associated with mortality in acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Respir Med*, 2024, 222: 107515.
- [7] Beitler J R, Thompson B T, Baron R M, et al. Advancing precision medicine for acute respiratory distress syndrome[J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(1): 107-120.
- [8] Zhang Y, Lu P, Qin H, et al. Traditional Chinese medicine combined with pulmonary drug delivery system and idiopathic pulmonary fibrosis: rationale and therapeutic potential[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111072.
- [9] An Y, Zhang H, Wang R, et al. Biomarkers, signaling pathways, and programmed cell death in acute lung injury and its treatment with traditional Chinese medicine: a narrative review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27 (21): 10157-10170.
- [10] 黄 灿. 基于数据挖掘和网络药理学探讨麻杏苦甘汤治疗西北肺系疫病的作用机制[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2023.
- [11] 焦太强, 南一, 袁玲, 等. 基于 p38 MAPK/NF-κB 信号通路探讨麻杏苦甘汤对油酸诱导的急性肺损伤大鼠炎症反应及细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(7): 108-116.
- [12] 焦太强, 韩兴稷, 李向阳, 等. 麻杏苦甘汤干预油酸诱导大鼠急性肺损伤的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(10): 2430-2439.
- [13] Mishra P, Pandey R, Pandey N, et al. Prevention of mortality in acute lung injury induced by oleic acid: application of polyherbal decoction (bronco T) [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1003767.
- [14] Jenkins R G, Moore B B, Chambers R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667-679.
- [15] Ashcroft T, Simpson J M, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467-470.
- [16] Mokrá D. Acute lung injury—from pathophysiology to treatment[J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366.
- [17] 赵鑫, 吕文良, 李娟梅, 等. 苦杏仁苷抗纤维化作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 109-112.
- [18] 高瑕, 李万成. 甘草酸制剂防治肺纤维化的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2020, 41(11): 718-723.
- [19] 李俸敏, 王火, 曹波, 等. 雾化吸入甘草酸减轻博莱霉素所致小鼠肺纤维化的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(13): 1-8.
- [20] 雷灵倩, 戴周丽. 基于 TGF-β1/Smad3 通路探究苦参碱对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的改善作用及机制[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(6): 1401-1406.
- [21] 梁语嫣, 刘绍欢, 罗梦晗, 等. 氧化苦参碱改善博来霉素诱导小鼠肺纤维化的作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(2): 755-760.
- [22] Koc K, Ozek N S, Aysin F, et al. Hispidulin exerts a protective effect against oleic acid induced-ARDS in the rat via inhibition of ACE activity and MAPK pathway[J]. *Int J Environ Health Res*, 2024, 34(2): 755-766.
- [23] Bernard G R, Artigas A, Brigham k L, et al. The American-European consensus conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149 (3 Pt 1): 818-824.
- [24] Hu X, Su J, Chen M, et al. Macrophage-derived exosomal TNF-α promotes pulmonary surfactant protein expression in PM2.5-induced acute lung injury[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 892: 164732.
- [25] Anwar F, Sparrow N A, Rashid M H, et al. Systemic interleukin-6 inhibition ameliorates acute neuropsychiatric phenotypes in a murine model of acute lung injury[J]. *Crit Care*, 2022, 26(1): 274.

- [26] 张灏杨, 范德生. TGF- $\beta$ 1/Smad3信号通路参与肺纤维化的病理过程[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(5): 464-466.
- [27] 王 岗, 岳仁宋, 杨启悦, 等. 基于TGF- $\beta$ 1/p-Smad3信号通路探究补肺通痹汤抑制糖尿病相关性肺纤维化的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(10): 176-184.
- [28] Wu Z, Song B, Peng F, et al. Zangsiwei prevents particulate matter-induced lung inflammation and fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$ /SMAD pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 1): 118752.
- [29] Du C, Ma C, Geng R, et al. Bruceine a inhibits TGF- $\beta$ 1/Smad pathway in pulmonary fibrosis by blocking gal3/TGF- $\beta$ 1 interaction[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156267.
- [30] Farouk H, Moustafa P E, Khattab M S, et al. Diaceterein ameliorates amiodarone-induced pulmonary fibrosis via targeting the TGF $\beta$ 1/ $\alpha$ -SMA/Smad3 pathway[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2025, 398(4): 4111-4122.
- [31] Mao C, Du Y, Niu K, et al. Investigation of the mechanism of action of qingzaojiufei decoction on idiopathic pulmonary fibrosis based on network pharmacology and experimental validation[J]. *Nat Prod Commun*, 2024, 19(3): 1934578X241242274.

## 基于 Bcl-2/Bax 通路探究芪地降糖汤对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞凋亡的影响

马雷雷<sup>1,2</sup>, 赵英捷<sup>2</sup>, 王祎彬<sup>3</sup>, 王静雅<sup>2</sup>, 田春雨<sup>1,2</sup>, 常 宏<sup>2</sup>, 喇孝瑾<sup>2</sup>, 张碧溦<sup>1,2</sup>, 孟 然<sup>4</sup>, 李继安<sup>1,2\*</sup>

(1. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210; 2. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063210; 3. 迁安市中医医院, 河北 唐山 064400; 4. 河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北 唐山 063200)

**摘要:** 目的 探究芪地降糖汤对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠胰岛细胞凋亡的作用。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍组 (200 mg/kg) 和芪地降糖汤组 (7.3 g/kg), 采用链脲佐菌素 (STZ) 结合高脂高糖喂养诱导建立大鼠 T2DM 模型, 给药干预 8 周。给药结束后, 测定大鼠空腹血糖 (FBG)、餐后 2 小时血糖 (PG2h)、口服葡萄糖耐量实验的曲线下面积 (OGTT-AUC) 和体质量; 采用生化试剂盒检测大鼠血清中糖化血清蛋白 (GSP)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、丙二醛 (MDA) 水平和总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性; 采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清胰岛素 (INS)、C 肽 (C-P) 并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); HE 染色观察胰岛形态结构变化; TUNEL 染色观察胰岛细胞凋亡情况; 免疫荧光法检测胰岛 cleaved-Caspase-3 蛋白表达; Western blot 法检测胰腺组织 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3 和 Caspase-7 蛋白表达; RT-qPCR 法检测胰腺组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达。结果 与模型组比较, 芪地降糖汤组 FBG、PG2h、OGTT-AUC、GSP、HbA1c、HOMA-IR 和 MDA 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 体质量、C-P、INS 水平和 T-SOD 活性升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 胰岛形态结构和细胞凋亡程度得到改善; 胰腺组织 Bcl-2 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ), Bax、cleaved-Caspase-3 和 Caspase-7 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Bcl-2 mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ ), Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 芪地降糖汤可通过调节内源性细胞凋亡途径改善胰岛细胞损伤。

**关键词:** 芪地降糖汤; 2 型糖尿病 (T2DM); 胰岛细胞; 凋亡; 氧化应激; Bcl-2/Bax 通路; Caspase-3

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2025)12-3950-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.12.010

收稿日期: 2025-05-27

**基金项目:** 国家科学技术部对发展中国家科技援助项目 (KY201904005); 河北省自然科学基金资助项目 (H2023209038); 河北省重大科技支撑计划项目 (24297701Z)

**作者简介:** 马雷雷 (1990—), 男, 博士生, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: (0315) 8805790, E-mail: mall@stu.ncst.edu.cn

\* 通信作者: 李继安 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治代谢性疾病。Tel: (0315) 8805790, E-mail: JianLi@ncst.edu.cn