

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.15.013

定喘颗粒对呼吸道合胞病毒肺炎模型大鼠肺组织氧化应激及Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1信号通路的影响

张来¹, 张秀英^{2✉}, 魏晨浩¹, 张诗瑶¹, 李兆洋¹, 王蕊¹, 赵航宇¹

1. 辽宁中医药大学第一临床学院, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路79号, 116600; 2. 辽宁中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 探讨定喘颗粒治疗呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎的可能作用机制。**方法** 将60只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、利巴韦林组和定喘颗粒低、中、高剂量组, 每组10只。除对照组外, 其余各组大鼠进行呼吸道合胞病毒滴鼻建立RSV肺炎模型。造模成功后定喘颗粒低、中、高剂量组分别给予定喘颗粒3.47、6.93、13.86 g/(kg·d)灌胃, 利巴韦林组给予利巴韦林颗粒15.75 mg/(kg·d)灌胃, 各组均每天灌胃1次, 连续灌胃1周; 对照组、模型组大鼠仅做抓取给药动作。于末次给药24 h后, 采用HE染色法观察肺组织病理变化并进行病理评分, 比色法检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6 (IL-6) 炎症因子水平, Western Blot法检测肺组织核因子相关因子2 (Nrf2)、Kelch样ECH相关蛋白1 (Keap1)、血红素加氧酶1 (HO-1)、NAD(P)H脱氢酶1 (NQO1) 蛋白水平, qRT-PCR法检测肺组织RSV载量、Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1基因表达水平, 化学荧光法检测大鼠肺组织活性氧(ROS)水平, 微量法检测大鼠肺组织谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平。**结果** 与对照组比较, 其余各组大鼠肺组织病理评分、RSV载量、ROS、MDA水平及血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均明显升高, GSH水平降低, 肺组织Keap1蛋白及其mRNA表达水平升高, Nrf2、HO-1、NQO1蛋白及其mRNA表达水平明显降低($P<0.05$)。与模型组比较, 定喘颗粒低、中、高剂量组及利巴韦林组上述各指标均有不同程度改善($P<0.05$)。定喘颗粒各剂量组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平呈剂量依赖性, 以定喘颗粒高剂量效果最佳($P<0.05$)。定喘颗粒高剂量组在降低肺组织ROS、MDA水平和升高GSH水平方面优于定喘颗粒低、中剂量组($P<0.05$)。定喘颗粒高剂量组和利巴韦林组在降低RSV载量方面优于定喘颗粒中剂量组($P<0.05$)。定喘颗粒高剂量组在改善Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1蛋白水平方面优于利巴韦林组($P<0.05$)。**结论** 定喘颗粒可能通过调控Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1信号通路, 抑制氧化应激, 达到改善肺部炎症、治疗RSV肺炎的作用, 且以高剂量效果最好。

[关键词] 呼吸道合胞病毒; 肺炎; 氧化应激; 核因子相关因子2; 定喘颗粒

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是一种单链RNA病毒, 属于肺病毒科的正肺病毒属, 是婴幼儿肺炎、细支气管炎的主要病原体之一^[1]。RSV与全球每年约3300万例下呼吸道感染、300万例住院治疗、超过10万例5岁以下儿童的死亡有关^[2]。目前利巴韦林制剂可有效降低

RSV感染的死亡率, 然而因其毒性及不良反应并不推荐应用于儿童^[3-4]。RSV感染以发热、咳嗽、痰壅、气促等为主要症状, 中医学称之为“肺炎喘嗽”, 其基本病机为肺失宣降、肺气郁闭、痰热闭肺^[5]。定喘颗粒由定喘汤(《摄生众妙方》)化裁而来, 全方具有宣肺化痰、降气平喘功效。课题组前期临床研究发现, 定喘颗粒能有效治疗儿童病毒性肺炎且安全性好^[6]。现代研究^[7]证实, RSV感染能够诱导活性氧(ROS)的生成及核因子相关因

基金项目: 国家自然科学基金(81973906); 辽宁省教育厅平台建设项目(2024-JYTCB-100)

✉ 通讯作者: pextcm@163.com

子 2 (Nrf2) 脱乙酰化、泛素化和降解, 导致氧化应激损伤及炎症反应。在正常生理条件下, Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 结合使 Nrf2 泛素化而失去活性; 当受到 ROS 等刺激时 Keap1 发生构象变化释放 Nrf2。Nrf2 可调控下游血红素加氧酶 1 (HO-1)、NAD(P)H 醌脱氢酶 1 (NQO1) 等基因^[8]。本研究从 Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1 信号通路及氧化应激角度, 探讨定喘颗粒治疗 RSV 肺炎的可能作用机制。本实验已获得辽宁中医药大学动物伦理委员会批准, 伦理审查批准编号: 21000062024099。

1 材料与方法

1.1 动物及病毒

SPF 级雄性 SD 大鼠 65 只, 3~4 周龄, 体质量 65~80 g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。大鼠饲养于辽宁中医药大学动物实验中心, 温度 (22±1) °C, 湿度 (50±5) %, 饲养过程中提供大鼠标准饲料及水。RSV 由辽宁中医药大学附属第一医院康复中心病毒实验室提供, 半数大鼠病毒致死感染量为 10⁻²/ml。

1.2 药物

定喘颗粒组成: 浙贝母 6 g、桑白皮 9 g、黄芩 9 g、苦杏仁 6 g、麻黄 3 g、炙甘草 5 g、茯苓 9 g、牡丹皮 6 g、炒葶苈子 6 g、炒紫苏子 6 g。中药饮片由安徽普仁中药饮片有限公司提供, 加入 11 倍水, 煮沸 40 min, 重复煎煮 3 次, 混合 3 次得到的药液过滤后倒入烧杯中进行浓缩, 浓缩后生药浓度为 6.93 g/ml, 冷藏备用。利巴韦林颗粒 (四川百利药业有限责任公司, 批号: 230608), 加入蒸馏水配置成浓度为 15.75 mg/ml 溶液, 冷藏备用。

1.3 主要试剂及仪器

HE 染色试剂盒、中性树脂、RIPA 裂解液、ROS 检测试剂盒、丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒 (批号分别为 G1120、G8590、R0010、CA1410、BC0025), 北京索莱宝科技有限公司; Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1、 β -actin 抗体 (批号分别为 AF0639、AF5266、AF5393、DF6437、AF7018), 江苏亲科生物研究中心有限公司; Total RNA 提取试剂、Primex 型反转录试剂 PrimeScript RT Master Mix、高特异性 qPCR 试剂 TB Green Premix Ex Taq II (批号分别为 9108、RR036A、RR820A), TaKaRa 公司; 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0015L), 上海碧云天生物技术股份有限公司; BCA 蛋白定量

试剂盒 (批号 WB6501), 苏州新赛美生物科技有限公司; Omni-ECL™ 增强型化学发光检测试剂盒 (批号 SQ101), 上海雅酶生物医药科技有限公司; 羊抗兔二抗 (批号 YP848537-H), 广州优品生物科技有限公司; GSH 检测试剂盒 (批号 A006-2-1), 南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 检测试剂盒 (批号分别为 SEA133Ra、SEA563Ra、SEA079Ra), 武汉优尔生科技股份有限公司; 异氟烷 (批号 21011401), 深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

石蜡包埋机 (JB-L5 型), 武汉俊杰电子有限公司; 酶标仪 (infinite F50 型), 帝肯上海实验器材有限公司; 凝胶成像系统 (WD9413B 型), 北京六一生物科技有限公司; 紫外分光光度计 (NANODROP 2000 型), 赛默飞世尔科技公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7500 型), 美国 ABI 公司; 倒置显微镜 (IX73 型)、激光共聚焦显微镜 (FV10i 型), 日本奥林巴斯株式会社。

1.4 动物造模与干预

适应性喂养 3 天后采用随机数字表法选取 55 只大鼠建立 RSV 肺炎模型^[9]: 将大鼠放入装有异氟烷 (浓度为 2%) 的麻醉罐中进行麻醉, 大鼠出现昏迷后立即取出, 并进行呼吸道合胞病毒 20 μ l 滴鼻操作, 每日 1 次, 持续滴鼻 3 天。大鼠出现行动缓慢、呼吸急促且体温升高, 随机抽取 5 只大鼠制作肺部组织病理切片, 观察肺部病理变化, 出现肺泡病变、炎症细胞浸润等现象为造模成功^[10]。将剩余 50 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组, 定喘颗粒低、中、高剂量组, 利巴韦林组, 每组 10 只。另设对照组大鼠 10 只, 造模期间给予生理盐水 20 μ l 滴鼻, 每日 1 次, 持续 3 天。

造模成功后, 于当日滴鼻完成 2 h 后进行干预, 根据表面积比值计算大鼠与成人 (60 kg) 用药等效剂量比为 6.3 : 1^[11], 计算可得定喘颗粒生药等效剂量为 6.93 g/kg。定喘颗粒低、中、高剂量组分别给予定喘颗粒 3.47、6.93、13.86 g/(kg·d) 灌胃, 利巴韦林组给予利巴韦林颗粒 15.75 mg/(kg·d) 灌胃, 各组均每天灌胃 1 次, 连续 1 周。对照组、模型组大鼠仅做抓取给药动作, 于末次给药 24 h 后处死并收集大鼠血液及肺组织保存备用。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 HE 染色法观察肺组织病理变化并进行病理评分 按照随机数字表法选取各组 3 只大鼠的肺脏

组织,经脱水机进行组织脱水后,石蜡包埋,切片(切片厚度为 5 μm)。并对切片进行烘干、脱蜡、HE 染色操作,显微镜下观察肺组织病理变化。依据文献 [12] 对肺组织进行病理评分,以 0~4 分的等级分别对肺泡充血、出血,炎性细胞浸润,肺泡壁的厚度病理改变进行评分。0 分:无病变,1 分:病变范围<25%,2 分:25%≤病变范围<50%,3 分:50%≤病变范围<75%,4 分:病变范围≥75%。最终的肺组织病理评分为以上各项病理学评分之和,病理评分越高表示肺组织损伤越严重。

1.5.2 比色法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 炎症因子水平 大鼠取血后离心机离心(4℃、3000 r/min, 15 min, r=8.5 cm),抽取上清液待测。各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠的血清,按照试剂盒说明书步骤检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平,酶标仪在 450 nm 波长测量各孔 OD 值,并根据标准孔数值绘制标准曲线。

1.5.3 qRT-PCR 法检测肺组织 RSV 载量及 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达水平 各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠的肺脏组织,准确称量 50mg 肺组织并置于冰上研磨至粉末状。每管分别加入 1ml RNAiso Plus 充分匀浆,使用氯仿、异丙醇、酒精提取组织总 RNA。随后以紫外分光光度计测定 RNA 浓度,每组单次管中加入 5×Prime-Script RT Master Mix 2 μl,并用 RNase Free dH₂O 定容至 10 μl,设置 37℃ 15 min、85℃ 5 s、4℃ 进行反转录反应,待反转录仪冷却至 4℃ 取出并配置 PCR 反应体系,并加入引物于 PCR 仪中进行扩增,根据 CT 值计算各指标 mRNA 表达水平。用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达水平,引物序列如表 1 所示,引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.5.4 Western Blot 法检测肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白水平 各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠的肺脏组织,称取 25 mg 肺组织剪碎,加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂进行研磨、匀浆,静置离心后抽取上清液,并采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,煮沸冻存备用。制备凝胶后依次进行电泳、转膜、封闭, TBST 清洗 3 次(每次 10 min),使用 TBST 溶液稀释一抗配置一抗孵育液 10 ml,其中 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 抗体稀释比例为 1:1000,β-actin 抗体稀释比例为 1:10000,一抗孵育 4℃ 过夜, TBST 清洗 3 次(每次 15 min),二抗孵育 2 h,

表 1 大鼠肺组织 RSV、Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 引物序列
Table 1 Primer sequence of RSV, Nrf2, Keap1, HO-1, and NQO1 in lung tissues of rats

基因	引物序列	平均长度/bp
RSV	上游: AACTAATGCATTGGCTAAGG	548
	下游: TTGTAACACTGGCATTGTTG	
Nrf2	上游: GCTGTGATCTGTCCCTGTGT	234
	下游: GCTGTGCTTTAGGTCCATTCTG	
Keap1	上游: AGCGTGGAGAGATATGAGCC	185
	下游: ATCATCCGCCACTCATTCTT	
HO-1	上游: GCCACCAAGGAGGTACACAT	170
	下游: GGGGCATAGACTGGGTTCCTG	
NQO1	上游: TGTGAGTCATCTCTGGCG	173
	下游: AGGCGAATCCTGCTACAAG	
β-actin	上游: CTGAGAGGGAATCGTGCGT	208
	下游: CCACAGGATTCCATACCCAAGA	

注: RSV, 呼吸道合胞病毒; Nrf2, 核因子相关因子 2; Keap1, Kelch 样 ECH 相关蛋白 1; HO-1, 血红素加氧酶 1; NQO1, NAD(P)H 醌脱氢酶 1。

TBST 清洗 3 次(每次 15 min),清洗后加入显影液进行显影,采用 Image J 1.54 软件读取灰度值。

1.5.5 化学荧光法检测肺组织 ROS 水平 取材当日各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠的新鲜肺脏组织,称取 25 mg 用手术剪剪碎成小块,全程在冰上进行,加入适量酶消化液,37℃ 恒温箱培育 30 min,加入适量 DMEM 基础培养基中止消化,过 300 目筛网,收集细胞混悬液,离心机离心(4℃、1500 r/min, 6 min, r=8.5 cm)后收集细胞沉淀,使用 ROS 试剂盒中的 DCFH-DA 试剂用 PBS 溶液按照 1:1000 稀释后,加入细胞沉淀中配置成细胞悬液,37℃ 细胞培养箱培养 30 min,离心后去除上清液,加入 PBS 清洗 2 次后并重悬,接种到共聚焦小皿中,于激光共聚焦显微镜下观察记录,使用 ImageJ 1.54d 软件计算荧光强度。

1.5.6 微量法检测肺组织 MDA、GSH 水平 取材当日采用随机数字表法各组选取 3 只大鼠的新鲜肺脏组织,按照 MDA、GSH 含量检测试剂盒说明书配置各工作液,称取 0.1 g 肺组织放入各 EP 管,分别加入 1 ml GSH、MDA 检测提取液置于冰上进行匀浆,离心(4℃、8000 r/min, 10 min, r=8.5 cm)后收集上清液,分别加入 GSH、MDA 工作液充分混匀,其中 GSH 组室温孵育 2 min,酶标仪 412 nm 下检测 OD 值,计算 GSH 含量。MDA 组 100℃ 水浴 60 min,冰浴冷却至室温,离心机(4℃、10 000 r/min,

10 min, r=8.5 cm) 离心后吸取上清液, 酶标仪分别检测 532 nm、600 nm 时的 OD 值, 计算 MDA 含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 29.0 软件进行统计分析, 计量资料均满足正态分布, 以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法检验, 方差不齐时采用 Welch 和 Tamhane's T^2 法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织 HE 染色结果

图 1 示, 对照组大鼠的肺泡组织纹理清晰、形态结构完整, 无渗出, 无出血, 无炎性细胞浸润; 模型组肺泡组织出现肺泡融合、肺泡间隔增宽、大量炎性细胞浸润、肺间质充血、上皮细胞出血渗出; 定喘颗粒低、中、高剂量组及利巴韦林组肺泡融合、炎性细胞浸润、出血渗出现象减轻。表 2 示, 与对照组比较, 其余各组大鼠肺组织病理评分均升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组大鼠肺组织病理评分均降低 ($P<0.05$); 各药物干预组大鼠肺组织病理评分差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较

表 3 示, 与对照组比较, 其余各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水

表 2 各组大鼠肺组织病理评分比较
Table 2 Comparison of pathological scores of lung tissues of rats in each group

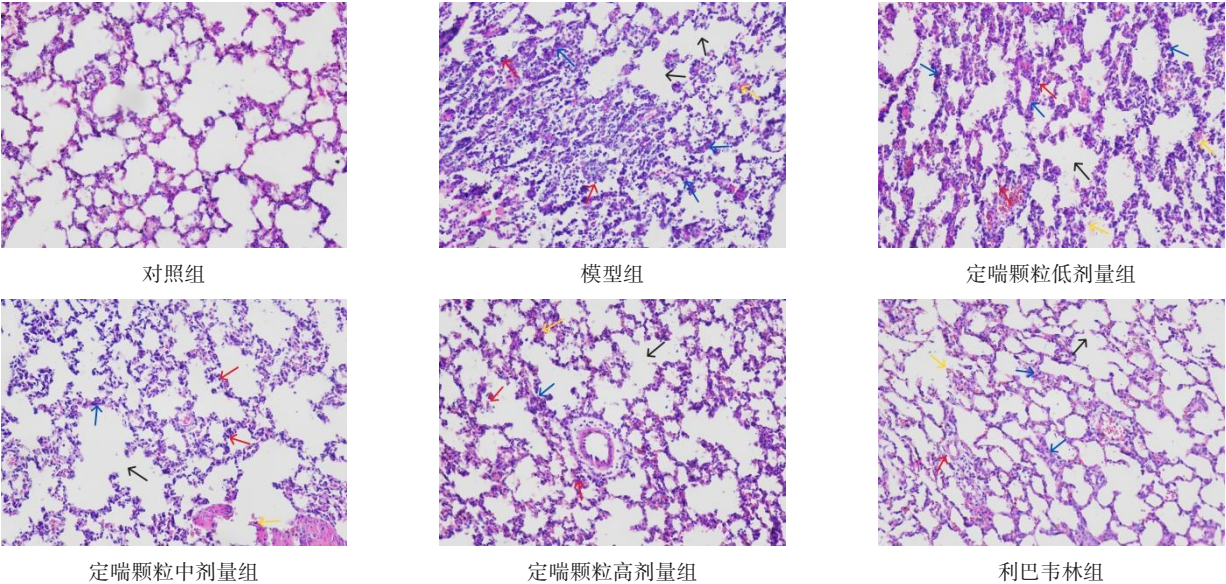
组别	鼠数	肺组织病理评分/分
对照组	3	0.90±0.74
模型组	3	6.20±1.55 ^{a)}
定喘颗粒低剂量组	3	4.30±1.16 ^{a) b)}
定喘颗粒中剂量组	3	4.00±0.82 ^{a) b)}
定喘颗粒高剂量组	3	3.80±0.92 ^{a) b)}
利巴韦林组	3	3.50±0.85 ^{a) b)}

注: a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

平显著降低 ($P<0.05$); 定喘颗粒各剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平呈剂量依赖性, 以定喘颗粒高剂量效果最佳 ($P<0.05$); 定喘颗粒高剂量组与利巴韦林组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠肺组织 RSV 载量及 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平比较

表 4 示, 与对照组比较, 其余各组大鼠肺组织 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平显著降低, *Keap1* mRNA 表达水平、RSV 载量明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组 *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平明显升高, *Keap1* mRNA 表达水平、RSV 载量明显降低 ($P<0.05$)。与定喘颗粒低剂量组比较, 定喘颗粒中、高剂量组 *Keap1*



注: 图中黑色箭头指示为肺泡融合; 蓝色箭头指示为肺泡间隔增宽; 红色箭头指示为炎性细胞 (淋巴细胞、中性粒细胞等); 黄色箭头指示为出血渗出。

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色结果 (×200)
Figure 1 HE staining results of lung tissues of rats in each group (×200)

表 3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较Table 3 Comparison of serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 of rats in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	3	213.29 $\pm$ 26.62	31.47 $\pm$ 2.78	41.26 $\pm$ 5.77
模型组	3	526.77 $\pm$ 50.81 ^{a)}	98.94 $\pm$ 5.62 ^{a)}	125.63 $\pm$ 10.55 ^{a)}
定喘颗粒低剂量组	3	464.68 $\pm$ 37.97 ^{a) b)}	80.66 $\pm$ 5.10 ^{a) b)}	85.21 $\pm$ 9.00 ^{a) b)}
定喘颗粒中剂量组	3	356.40 $\pm$ 29.28 ^{a) b) c)}	72.35 $\pm$ 4.87 ^{a) b) c)}	74.07 $\pm$ 9.32 ^{a) b) c)}
定喘颗粒高剂量组	3	308.61 $\pm$ 32.68 ^{a) b) c) d)}	50.54 $\pm$ 3.50 ^{a) b) c) d)}	58.08 $\pm$ 7.18 ^{a) b) c) d)}
利巴韦林组	3	296.35 $\pm$ 31.89 ^{a) b) c) d)}	49.19 $\pm$ 2.16 ^{a) b) c) d)}	56.80 $\pm$ 7.04 ^{a) b) c) d)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与定喘颗粒低剂量组比较, $P<0.05$; d) 与定喘颗粒中剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠肺组织 RSV 载量及 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平比较Table 4 Comparison of RSV load and expression levels of *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1*, and *NQO1* mRNA in lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	RSV 载量	<i>Nrf2</i> mRNA	<i>Keap1</i> mRNA	<i>HO-1</i> mRNA	<i>NQO1</i> mRNA
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.05
模型组	3	13.22 $\pm$ 0.74 ^{a)}	0.30 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.66 $\pm$ 0.10 ^{a)}	0.22 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.33 $\pm$ 0.02 ^{a)}
定喘颗粒低剂量组	3	9.52 $\pm$ 0.33 ^{a) b)}	0.45 $\pm$ 0.04 ^{a) b)}	1.48 $\pm$ 0.06 ^{a) b)}	0.44 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}	0.48 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}
定喘颗粒中剂量组	3	6.62 $\pm$ 0.56 ^{a) b) c)}	0.57 $\pm$ 0.05 ^{a) b) c)}	1.32 $\pm$ 0.13 ^{a) b) c)}	0.64 $\pm$ 0.12 ^{a) b) c)}	0.66 $\pm$ 0.06 ^{a) b) c)}
定喘颗粒高剂量组	3	4.56 $\pm$ 0.07 ^{a) b) c) d)}	0.67 $\pm$ 0.05 ^{a) b) c) d)}	1.29 $\pm$ 0.05 ^{a) b) c) d)}	0.68 $\pm$ 0.14 ^{a) b) c)}	0.68 $\pm$ 0.05 ^{a) b) c)}
利巴韦林组	3	4.74 $\pm$ 0.48 ^{a) b) c) d)}	0.72 $\pm$ 0.02 ^{a) b) c) d)}	1.38 $\pm$ 0.06 ^{a) b)}	0.64 $\pm$ 0.09 ^{a) b) c)}	0.71 $\pm$ 0.08 ^{a) b) c)}

注: RSV, 呼吸道合胞病毒; *Nrf2*, 核因子相关因子 2; *Keap1*, Kelch 样 ECH 相关蛋白 1; *HO-1*, 血红素加氧酶 1; *NQO1*, NAD(P)H 醌脱氢酶 1。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与定喘颗粒低剂量组比较, $P<0.05$; d) 与定喘颗粒中剂量组比较, $P<0.05$ 。

mRNA 表达水平下降, 定喘颗粒中、高剂量组及利巴韦林组的 RSV 载量下降, *Nrf2*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$); 与定喘颗粒中剂量组比较, 定喘颗粒高剂量组 RSV 载量、*Keap1* mRNA 表达水平降低, *Nrf2* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), 利巴韦林组 RSV 载量降低, *Nrf2* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$); 定喘颗粒高剂量组和利巴韦林组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白水平比较

表 5 示, 与对照组比较, 其余各组大鼠肺组织 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白水平降低, Keap1 蛋白水平升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白水平升高, Keap1 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 与定喘颗粒低剂量组比较, 定喘颗粒中、高剂量组和利巴韦林组肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白水平差异均有统计学意

表 5 各组大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白水平比较

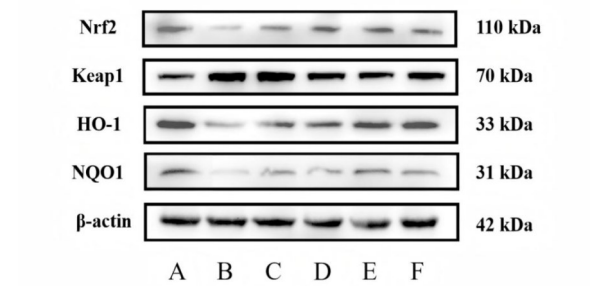
Table 5 Comparison of Nrf2, Keap1, HO-1, and NQO1 protein levels in lung tissues of rats in each group (/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	Keap1	HO-1	NQO1
对照组	3	0.60 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.02
模型组	3	0.19 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.13 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.32 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.09 $\pm$ 0.01 ^{a)}
定喘颗粒低剂量组	3	0.35 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}	1.01 $\pm$ 0.04 ^{a) b)}	0.52 $\pm$ 0.02 ^{a) b)}	0.22 $\pm$ 0.01 ^{a) b)}
定喘颗粒中剂量组	3	0.48 $\pm$ 0.03 ^{a) b) c)}	0.84 $\pm$ 0.06 ^{a) b) c)}	0.67 $\pm$ 0.04 ^{a) b) c)}	0.19 $\pm$ 0.02 ^{a) b) c)}
定喘颗粒高剂量组	3	0.50 $\pm$ 0.03 ^{a) b) c)}	0.69 $\pm$ 0.04 ^{a) b) c)}	0.85 $\pm$ 0.01 ^{a) b) c) d)}	0.37 $\pm$ 0.02 ^{a) b) c) d)}
利巴韦林组	3	0.41 $\pm$ 0.03 ^{a) b) c) d) e)}	0.77 $\pm$ 0.04 ^{a) b) c) d) e)}	0.80 $\pm$ 0.03 ^{a) b) c) d) e)}	0.27 $\pm$ 0.02 ^{a) b) c) d) e)}

注: Nrf2, 核因子相关因子 2; Keap1, Kelch 样 ECH 相关蛋白 1; HO-1, 血红素加氧酶 1; NQO1, NAD(P)H 醌脱氢酶 1。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与定喘颗粒低剂量组比较, $P<0.05$; d) 与定喘颗粒中剂量组比较, $P<0.05$; e) 与定喘颗粒高剂量组比较, $P<0.05$ 。

义 ($P<0.05$)；与定喘颗粒中剂量组比较，定喘颗粒高剂量组 HO-1、NQO1 蛋白水平升高，利巴韦林组 Nrf2、Keap1 蛋白水平降低、HO-1、NQO1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)；与定喘颗粒高剂量组比较，利巴韦林组 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白水平降低、Keap1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。各组大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白电泳图见图 2。



注：Nrf2，核因子相关因子2；Keap1，Kelch样ECH相关蛋白1；HO-1，血红素加氧酶1；NQO1，NAD(P)H醌脱氢酶1；A，对照组；B，模型组；C，定喘颗粒低剂量组；D，定喘颗粒中剂量组；E，定喘颗粒高剂量组；F，利巴韦林组。

图2 各组大鼠肺组织Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoretic images of Nrf2, Keap1, HO-1, and NQO1 proteins in lung tissues of rats in each group

2.5 各组大鼠肺组织 ROS、GSH、MDA 水平比较

表 6 示，与对照组比较，其余各组大鼠肺组织 ROS、MDA 水平明显升高，GSH 水平明显降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，各药物干预组 ROS、MDA 水平显著降低，GSH 水平升高 ($P<0.05$)；与定喘颗粒低剂量组比较，定喘颗粒中剂量组 ROS 水平降低，定喘颗粒高剂量组和利巴韦林组 ROS、MDA 水平显著降低，GSH 水平升高 ($P<0.05$)；与定喘颗粒中剂量组比较，定喘颗粒高剂量组 ROS、MDA 水平降低，GSH 水平升高，利巴韦林

组 MDA 水平降低、GSH 水平升高 ($P<0.05$)；与定喘颗粒高剂量组比较，利巴韦林组 ROS 水平升高 ($P<0.05$)。各组大鼠肺组织 ROS 荧光图见图 3。

3 讨论

RSV 是引起儿童急性下呼吸道感染的主要病原体之一，目前临床上尚未发现治疗 RSV 感染的特效药物。我们认为，RSV 作为客邪，侵袭肺卫，而小儿肺脏娇嫩、卫外不固，易导致客邪入里，肺失宣降、肺气郁闭、郁而化热，进而出现发热、咳嗽、喘息、气急、鼻煽、喉间痰鸣等症状，治疗应以宣肺开闭、化痰平喘为基本法则。浙贝母 6 g、桑白皮 9 g、黄芩 9 g、苦杏仁 6 g、麻黄 3 g、炙甘草 5 g、茯苓 9 g、牡丹皮 6 g、炒葶苈子 6 g、炒紫苏子 6 g。定喘颗粒是由定喘汤化裁而来，方中麻黄宣肺散邪平喘，为君药；黄芩、桑白皮清热止咳平喘，共为臣药；苦杏仁、紫苏子降气平喘止咳，茯苓利水渗湿健脾，牡丹皮清热凉血，炒葶苈子泻肺平喘，浙贝母清热止咳化痰，俱为佐药；甘草调和诸药为使。诸药合用，使郁闭之肺气得以宣降、痰热得清，共奏宣肺化痰、止咳平喘之效。前期研究表明，定喘颗粒能有效降低小鼠肺组织病毒载量，抑制 RSV 的复制减轻肺损伤^[13]。现代研究显示，RSV 入侵可引起机体释放 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子并导致肺部病理改变，IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 在儿童 RSV 肺炎发病机制中起到重要作用^[14-15]。利巴韦林作为广谱抗病毒药物，在临床上常用于呼吸道合胞病毒肺炎的治疗且具有明确疗效^[16]。本研究结果显示，定喘颗粒各剂量组和利巴韦林组均能够降低大鼠肺组织炎症病理评分，缓解肺部炎症，且各药物干预组之间无明显差异。定喘颗粒各剂量组在抑制 RSV 载量以及 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 炎症因子水平上呈剂量依赖性，其中以高剂量效果

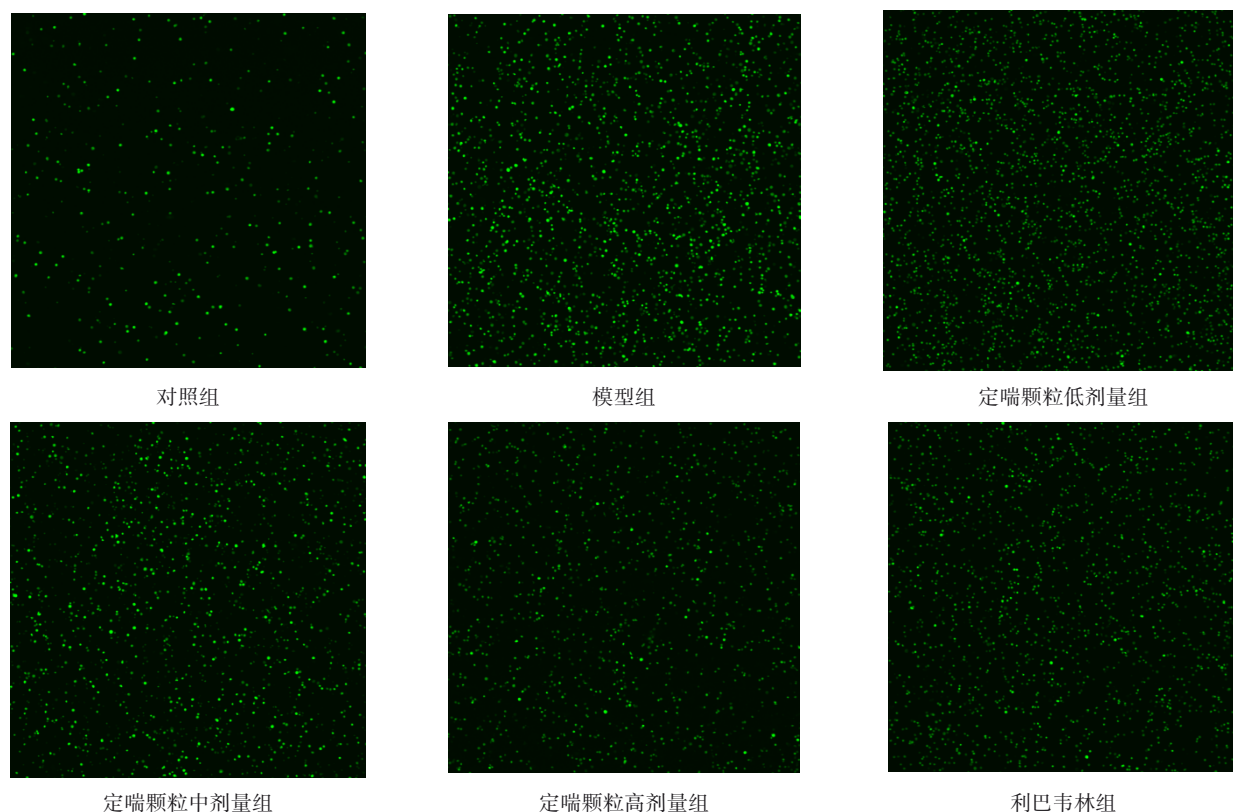
表 6 各组大鼠肺组织 ROS、GSH、MDA 水平比较

Table 6 Comparison of ROS, GSH and MDA levels in lung tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ROS/AU	GSH/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$
对照组	3	14.15 $\pm$ 0.28	159.49 $\pm$ 11.12	5.11 $\pm$ 0.31
模型组	3	22.08 $\pm$ 0.55 ^{a)}	58.78 $\pm$ 7.58 ^{a)}	16.13 $\pm$ 0.98 ^{a)}
定喘颗粒低剂量组	3	19.38 $\pm$ 0.95 ^{a) b)}	83.05 $\pm$ 5.56 ^{a) b)}	11.42 $\pm$ 0.51 ^{a) b)}
定喘颗粒中剂量组	3	17.90 $\pm$ 0.36 ^{a) b) c)}	92.75 $\pm$ 9.63 ^{a) b)}	10.75 $\pm$ 0.88 ^{a) b)}
定喘颗粒高剂量组	3	15.84 $\pm$ 0.47 ^{a) b) c) d)}	119.45 $\pm$ 11.70 ^{a) b) c) d)}	9.41 $\pm$ 0.69 ^{a) b) c) d)}
利巴韦林组	3	16.97 $\pm$ 0.55 ^{a) b) c) e)}	118.23 $\pm$ 13.12 ^{a) b) c) d)}	9.68 $\pm$ 0.44 ^{a) b) c) d)}

注：ROS，活性氧；GSH，谷胱甘肽；MDA，丙二醛。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与定喘颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与定喘颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与定喘颗粒高剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：ROS，活性氧；图中绿色荧光表示 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）探针被 ROS 氧化生成的 2',7'-二氯荧光素（DCF）。荧光强度与细胞内 ROS 水平成正比，可反映细胞内 ROS 水平。

图 3 各组大鼠肺组织 ROS 荧光图（×100）

Figure 3 Fluorescence images of ROS in lung tissues of rats in each group (×100)

最佳，且定喘颗粒高剂组与利巴韦林组并无明显差异，考虑原因可能是肺部病理修复过程滞后于炎症因子与病毒载量改变。

现有研究已表明，RSV 能够诱导肺部氧化应激反应而引起肺部氧化及炎症损伤^[17]。ROS、MDA、GSH 是氧化应激反应中重要标志物，其中 ROS 是细胞氧化还原稳态的重要参与者，过多的 ROS 会破坏氧化还原稳态而引起氧化应激反应及细胞损伤；MDA 是脂质过氧化的重要产物，能反映氧化应激水平；GSH 是重要的抗氧化剂，能有效减少 ROS 抑制氧化应激反应^[18]。本研究结果显示，在抗氧化方面，定喘颗粒各剂量组均能有效降低肺组织 ROS、MDA 水平，并提高 GSH 水平，以改善由 RSV 引起的氧化应激损伤，且在抑制 ROS 水平上与剂量呈现一定的正相关，其中高剂量的定喘颗粒在抑制 MDA 与促进 GSH 生成上与利巴韦林组无明显差异，而在抑制 ROS 生成上更具优势。

Nrf2 在抗氧化反应中起着至关重要的作用，在正常生理条件下，Nrf2 通常在胞质溶胶中与 Keap1 结合，这种结合通常会使 Nrf2 通过泛素-蛋白酶体

途径使其走向降解而失去活性；当 ROS 产生时，Keap1 发生构象变化会释放 Nrf2，释放后会转位到细胞核中激活抗氧化酶基因的表达，通过诱导 MDA、GSH 的形成调节超氧化物与过氧化物的水平，从而直接调控 ROS 水平以抑制氧化应激反应^[19]。Nrf2 进入细胞核中可与抗氧化反应元件（ARE）结合，随后激活抗氧化防御基因的转录，调控下游 HO-1、NQO1 等表达以减轻体内炎症反应及氧化应激水平；Nrf2/HO-1 通路可通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的表达来发挥抗炎作用^[20]。本研究结果显示，定喘颗粒各剂量组均可调控 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白水平及其 mRNA 表达，且以高剂量效果最好，在 mRNA 表达方面优于利巴韦林组。定喘颗粒在调控 *Nrf2*、*Keap1* mRNA 表达及 HO-1、NQO1 蛋白水平上与剂量呈正相关趋势，且定喘颗粒对 Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1 信号通路的调控作用在一定程度上优于利巴韦林。

综上所述，定喘颗粒可通过调控 Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1 信号通路，抑制由 RSV 引起的肺部氧化应激损伤及炎症，这可能是其治疗呼吸道合胞病

毒肺炎的机制之一。本实验仅在大鼠模型上进行实验,其在临床上的效果还需进一步探索与验证;另外,本实验中药组所设剂量梯度较少,定喘颗粒剂量与治疗效果的关系还待进一步完善与明确。

参考文献

- [1] AGAC A, KOLBE SM, LUDLOW M, et al. Host responses to respiratory syncytial virus infection[J]. *Viruses*, 2023, 15(10): 1999.
- [2] ZHANG XL, ZHANG X, HUA W, et al. Expert consensus on the diagnosis, treatment, and prevention of respiratory syncytial virus infections in children[J]. *World J Pediatr*, 2024, 20(1): 11-25.
- [3] SIMÕES EAF, DEVINCENZO JP, BOECKH M, et al. Challenges and opportunities in developing respiratory syncytial virus therapeutics[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(suppl 1): S1-S20.
- [4] SIMÕES EAF, BONT L, MANZONI P, et al. Past, present and future approaches to the prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection in children[J]. *Infect Dis Ther*, 2018, 7(1): 87-120.
- [5] 胥会英, 韩新民. 肺炎喘嗽病因病机古今认识差异探讨[J]. *实用中医药杂志*, 2008, 24(12): 803-804.
- [6] 高媛媛, 王雪峰, 张秀英, 等. 小儿定喘颗粒治疗儿童病毒性肺炎(痰热闭肺证)的临床研究[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2023, 15(4): 351-355.
- [7] KOMARAVELLI N, ANSAR M, GAROFALO RP, et al. Respiratory syncytial virus induces NRF2 degradation through a promyelocytic leukemia protein-ring finger protein 4 dependent pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 113: 494-504. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.380.
- [8] SAMIMI F, BAAZM M, NADI Z, et al. Evaluation of antioxidant effects of coenzyme Q10 against hyperglycemia-mediated oxidative stress by focusing on Nrf2/Keap1/HO-1 signaling pathway in the liver of diabetic rats[J]. *Iran J Med Sci*, 2024, 49(10): 661-670.
- [9] SCHMIDT ME, OOMENS AGP, VARGA SM. Vaccination with a single-cycle respiratory syncytial virus is immunogenic and protective in mice[J]. *J Immunol*, 2019, 202(11): 3234-3245.
- [10] KULKARNI HS, LEE JS, BASTARACHE JA, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American Thoracic Society workshop report[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(2): e1-e14.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 202-203.
- [12] BELPERIO JA, KEANE MP, BURDICK MD, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(11): 1703-1716.
- [13] 周涛, 张秀英, 王雪峰, 等. 定喘颗粒对呼吸道合胞病毒肺炎幼鼠肺组织病毒载量及气道阻力的影响[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2014, 16(1): 26-30, 93.
- [14] TYLUTKA A, WALAS Ł, ZEMBRON-LACNY A. Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1330386. doi: 10.3389/fimmu.2024.1330386.
- [15] 李天萍, 黄霞飞, 杨蕉, 等. 呼吸道合胞病毒感染性肺炎患儿的 TNF- α 和 IL-1 β 水平及 TLR4 信号通路作用初步探究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 919-922.
- [16] KALER J, HUSSAIN A, PATEL K, et al. Respiratory syncytial virus: a comprehensive review of transmission, pathophysiology, and manifestation[J]. *Cureus*, 2023, 15(3): e36342.
- [17] HOSAKOTE YM, LIU T, CASTRO SM, et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(3): 348-357.
- [18] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR SY, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging[J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [19] GAROFALO RP, KOLLI D, CASOLA A. Respiratory syncytial virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities[J]. *Antioxid redox signal*, 2013, 18(2): 186-217.
- [20] SUN YY, ZHU HJ, ZHAO RY, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice[J]. *Redox biol*, 2023, 66: 102852. doi: 10.1016/j.redox.2023.102852.

Effect of *Dingchuan Granule* (定喘颗粒) on Lung Tissue Oxidative Stress and Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1 Pathway in Respiratory Syncytial Virus Pneumonia Model Rats

ZHANG Lai¹, ZHANG Xiuying², WEI Chenhao¹, ZHANG Shiyao¹, LI Zhaoyang¹, WANG Rui¹, ZHAO Hangyu¹

1. The First Clinical College of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 116600; 2. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanism of *Dingchuan Granule* (定喘颗粒, DG) in the treatment of respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia. **Methods** A total of 60 male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, model group, ribavirin group, DG low-dose group, DG middle-dose group, and DG high-dose group, with 10 rats in each group. Except for the control group, rats were administrated with RSV via intranasal drip. After model establishment, the DG low-, middle-, and high-dose groups were administrated via oral gavage with DG at 3.47, 6.93, and 13.86 g/(kg·d) respectively, while the ribavirin group was administrated via oral gavage with ribavirin at 15.75 mg/(kg·d). The drug was given once daily for one week. The rats in the control group and the model group were not given any drug, only subjected to the grasping action. Twenty-four hours after the last administration, the pathological changes of lung tissues were observed and scored using HE staining. The levels of serum inflammatory factors, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6), were detected by colorimetry. The protein levels of nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), heme oxygenase 1 (HO-1), and NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) in lung tissues were measured by Western Blot. The RSV load as well as the gene expression levels of *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1*, and *NQO1* in lung tissues were determined by qRT-PCR. The level of reactive oxygen species (ROS) in rat lung tissues was detected using chemiluminescence. The levels of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in rat lung tissues were measured by a microassay. **Results** Compared with the control group, other groups had significant increases in pathological score of lung tissue, RSV load, levels of ROS, MDA, serum TNF- α , IL-1 β , and IL-6; decrease in GSH level, increases in expression level of Keap1 protein and its mRNA in lung tissue, and significant decrease in levels of Nrf2, HO-1, expression level of NQO1 protein and its mRNA ($P < 0.05$). Compared with the model group, all the above-mentioned indicators in the DG low-, middle-, and high-dose groups and the ribavirin group were improved to varying degree ($P < 0.05$). The levels of serum TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in rats of DG dose groups showed a dose-dependent pattern, the DG high-dose group exhibiting the best effect ($P < 0.05$). The DG high-dose group was superior to the DG low- and middle-dose groups in reducing the levels of ROS and MDA, and increasing the level of GSH in lung tissues ($P < 0.05$). The DG high-dose group and the ribavirin group had better effect than the DG middle-dose group in reducing the RSV load ($P < 0.05$). The DG high-dose group was superior to the ribavirin group in improving the protein levels of Nrf2, Keap1, HO-1, and NQO1 ($P < 0.05$). **Conclusion** DG could inhibit oxidative stress by regulating the Nrf2/Keap1/HO-1/NQO1 signaling pathway to improve pulmonary inflammation and treat RSV pneumonia, with the DG high-dose group showing the best effect.

Keywords respiratory syncytial virus; pneumonia; oxidative stress; nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2; *Dingchuan Granule* (定喘颗粒)

(收稿日期: 2025-03-09; 修回日期: 2025-05-27)

[编辑: 邓媛]