

基于 ROS/Nrf2/HO-1 信号通路探讨清金通络方对肺炎支原体肺炎幼龄大鼠氧化应激和炎症反应的影响

魏晨浩¹, 张秀英^{2*}, 王雪峰², 张 来¹, 王 蕊¹, 李兆洋¹, 刘鑫雄¹, 王书钰¹, 吴依师¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学第一附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: **目的** 探讨清金通络方对肺炎支原体肺炎 (MPP) 幼龄大鼠氧化应激和炎症反应的影响。**方法** 60 只幼龄大鼠随机分为正常组、模型组、阿奇霉素组 (0.18 g/kg) 和清金通络方低、中、高剂量组 (3.1、6.2、12.4 g/kg), 每组 10 只, 除正常组外, 其余各组采用 100 μ L 肺炎支原体 (MP) 菌液 (1×10^7 CCU/mL) 滴鼻建立 MPP 模型。给药干预 5 d 后, 取肺组织, 计算肺指数; HE 染色观察肺组织病理学变化; 采用试剂盒检测肺组织 SOD 活性和 MDA 水平; 共聚焦荧光定位法检测肺组织 ROS 荧光表达强度; ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平; RT-qPCR 法检测肺组织中 MP 病原载量, 以及 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达; Western blot 法检测肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺指数降低 ($P<0.05$); 肺组织损伤均有不同程度的减轻, 炎性细胞浸润减少, 肺组织炎症评分降低 ($P<0.05$); 肺组织 SOD 活性升高 ($P<0.05$), MDA 水平降低 ($P<0.05$); 肺组织 ROS 荧光信号强度减弱 ($P<0.05$); 血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$); MP 病原载量降低 ($P<0.05$); 肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA、蛋白表达升高 ($P<0.05$)。**结论** 清金通络方可通过抑制 ROS/Nrf2/HO-1 信号通路活化, 进而抑制氧化应激反应, 减少相关炎症细胞因子的释放, 达到减轻 MPP 幼龄大鼠肺炎性损伤的作用。

关键词: 清金通络方; 肺炎支原体肺炎; 氧化应激; 炎症反应; ROS/Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2377-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.040

肺炎支原体 (mycoplasma pneumoniae, MP) 是儿童社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 常见的病原体之一, 通常存在于呼吸道中^[1-2]。肺炎支原体肺炎 (mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP) 常见的临床表现包括咽痛、发热、咳嗽, 甚则出现呼吸困难、喘憋等症状^[3-5]。近年来, 随着阿奇霉素等大环内酯类抗生素的临床应用不断增加, 其耐药率上升的问题也逐步显现。中医药在 MPP 早期干预、预后改善方面具有低耐药、低副作用的优势。清金通络方是依据清肺通络法由《伤寒论》中的麻黄杏仁甘草石膏汤化裁而来, 主要用于治疗儿童 MPP 热邪闭肺证。课题组前期临床研究结果显示, 清肺通络膏辅助治疗可缩短患儿咳痰消失时间, 并降低支气管炎的发生率^[6]。

氧化应激是指机体内氧化作用与抗氧化作用的不平衡现象, 当细胞内的活性氧 (reactive oxygen, ROS) 水平超过抗氧化防御机制的负荷时, 会造成细胞氧化还原功能失衡, 导致炎性浸润并产生大量氧化中间产物^[7]。与其他病

原体不同, MP 不直接产生外毒素, 其合成的超氧自由基、过氧化氢与宿主细胞产生的内源性有毒氧分子具有协同作用, 能够诱导呼吸道上皮细胞的氧化应激反应^[8-10]。因此, 本研究探讨清金通络方对 MPP 氧化应激相关信号通路的影响, 为日后临床应用提供更充分的理论依据。

1 材料

1.1 病原体 MP 标准株 FH, 由辽宁中医药大学附属医院病毒室保存, 取第 3 代备用。以培养基变色时的最高稀释浓度为颜色改变单位 (color change unite, CCU), 依据 CCU/mL 法测定 MP 浓度, 最终采用 1×10^7 CCU/mL 菌液^[11]。

1.2 动物 SPF 级 SD 幼龄大鼠 60 只, 4~6 周龄, 雄性, 体质量 60~80 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001], 饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (辽) 2024-0006], 饲养室自然采光, 室内温度 (21 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 每天投喂饲料 1 次。本研究获得辽宁中医药大学

收稿日期: 2025-03-31
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (8197152087); 辽宁省教育厅高校基本科研项目储备项目 (2024-jytcb-100)
作者简介: 魏晨浩 (2000—), 男, 硕士生, 从事中医药防治儿童呼吸系统疾病研究。Tel: 18940112692, E-mail: lnzywh@163.com
* 通信作者: 张秀英 (1978—), 女, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治儿童呼吸系统疾病研究。Tel: 13898158846, E-mail: Zxy0909Y@163.com

动物伦理委员会批准（伦理号 21000062024099）。

1.3 药材与药物 清金通络方由煨苦杏仁 5 g、蜜麻黄 3 g、石膏 6 g、炙甘草 5 g、蜜桑白皮 6 g、黄芩 6 g、酒大黄 3 g、瓜蒌 5 g、橘红 5 g、百部 5 g、赤芍 5 g、茯苓 5 g 组成，以上药材均购自辽宁中医药大学附属医院中药房，经辽宁中医药大学褚春梅主任中药师鉴定为正品，一煎加入 10 倍量蒸馏水，加热至微沸腾状态 1.5 h 后过滤药渣；二煎加入 8 倍量蒸馏水，加热至微沸腾状态 1 h，过滤后收集滤液，质量浓度为 0.3 g/mL，待其恢复常温后放入 4 ℃ 冰箱中冷藏。阿奇霉素干混悬剂（美国辉瑞公司，货号 8179097）。

1.4 试剂 苏木素伊红（HE）染色试剂盒、丙二醛（MDA）水平检测试剂盒、超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号 G1120、BC0025、BC5165）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，货号 P0010）；DCFH-DA、TRIzol 试剂盒、逆转录试剂盒 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司，货号 D399、I2183555、K1622]；IL-6、IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒 [安迪生物科技（上海）有限公司，货号 AD3249Ra、AD3023Ra、AD3238Ra]； β -actin 抗体（北京博奥森生物技术有限公司，货号 bs-0061R）；核转录因子红系 2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2）、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1（Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1）、血红素加氧酶-1（heme oxygenase 1, HO-1）、NAD（P）H 醌氧化还原酶 1 [NAD（P）H quinone dehydrogenase, NQO1]、羊抗兔 IgG-HRP 抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司，货号 AF0639、AF5266、AF5393、DF6437、S0001）。

1.5 仪器 FV10i 型光谱型激光共聚焦显微镜（日本 Olympus 公司）；WD-9405B 型水平摇床、DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；WD-9405B 型超速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；DH36001B 型电热恒温培养箱（天津泰斯特仪器有限公司）；ELX-800 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；7500 型实时定量荧光 PCR 扩增仪（美国 Applied Biosystems 公司）；JB-L5 型石蜡包埋机（武汉俊杰电子有限公司）；RM2016 型精密轮转切片机（上海徕卡仪器有限公司）；NW10LVF 型超纯水系统（力康生物医疗科技控股有限公司）。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 幼龄大鼠适应性饲养 3 d 后，按照随机数字表法分为正常组、模型组、阿奇霉素组和清金通络方低、中、高剂量组，每组 10 只，除正常组外，其余各组幼龄大鼠均用乙醚轻度麻醉后经鼻腔接种 100 μ L MP 菌液，每天 1 次，连续 3 d。根据大鼠和人用药剂量换算^[12]，幼龄大鼠清金通络方的等效剂量为 6.2 g/kg，即中剂量。清金通络方低、中、高剂量组在滴鼻造模 3 d 后，

分别灌胃给予 3.1、6.2、12.4 g/kg 清金通络方，连续 5 d；阿奇霉素组在滴鼻造模 3 d 后，灌胃给予 0.18 g/kg 阿奇霉素，连续 5 d；正常组和模型组同步正常喂养，不作任何处理。

2.2 取材 药物干预 5 d 后进行取材，取材前禁食、水 12 h。将各组幼龄大鼠称定质量后注射水合氯醛进行麻醉，打开腹腔，腹主动脉取血，全血室温静置 2 h 后在 4 ℃、3 500 r/min 条件下离心 15 min，取上层血清，放入-80 ℃ 冰箱中保存。无菌操作打开胸腔，暴露气管和肺组织，摘取后者，用滤纸吸干表面水分并称定质量，剪取左肺组织，生理盐水冲洗后放入 4% 多聚甲醛中固定；剪取右肺组织，一部分于-80 ℃ 冰箱中保存，另一部分直接制备单细胞悬液，并进行共聚焦荧光定位检测。

2.3 肺指数测定 以肺指数来评估幼龄大鼠肺水肿程度，公式为肺指数=（肺质量/体质量） $\times$ 100%。

2.4 HE 染色观察肺组织病理变化 取于 4% 多聚甲醛中固定的左肺组织，经梯度脱水后石蜡包埋，连续切片，脱蜡复水后进行 HE 染色，树胶封片，于光学显微镜下观察病理学变化。参照 Wzapiel 法^[13]评估幼龄大鼠肺泡腔炎症程度，评分标准为肺泡组织正常无炎症渗出，计 0 分；局部肺泡间隔增宽，肺泡内有炎性细胞浸润，肺间质病变范围 $\leq$ 20%，计 1 分；肺泡内有较多炎性细胞浸润，肺间质病变范围 20% < 病变范围 $\leq$ 50%，计 2 分；肺泡腔内有大量炎性细胞浸润，肺间质病变范围 $>$ 50%，计 3 分。

2.5 肺组织 SOD 活性和 MDA 水平检测 称取肺组织适量，加入提取液进行冰浴匀浆，匀浆液在 4 ℃、3 000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液至冰上，严格按照试剂盒说明书检测 SOD 活性和 MDA 水平。

2.6 共聚焦荧光定位法检测肺组织 ROS 荧光表达 取右肺组织适量，用预冷的 PBS 洗去血污，剪成小块，加入酶消化液，在 37 ℃ 下消化 30 min，采用 300 目尼龙网过滤收集细胞，去除杂质，500 $\times$ g 离心 10 min，弃上清液，保留沉淀，分别加入 0.01 mol/L PBS 及稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀，在 37 ℃ 下孵育 1 h 以使探针与细胞充分接触。收集孵育后的单细胞悬液，1 000 $\times$ g 离心 10 min，收集细胞沉淀，加入 PBS 重悬后在光谱型激光共聚焦显微镜下进行荧光检测，采用 Image J 软件对结果进行定量分析。

2.7 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平 取大鼠血清适量，按照 ELISA 试剂盒说明书，经包被孵育、封闭加样、加酶抗抗体后加入显色剂，采用酶标仪检测吸光度，标准曲线方程计算 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。

2.8 RT-qPCR 法检测肺组织中 MP 病原载量及 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达 在肺组织匀浆中加入 TRIzol 试剂提取 RNA，计算其含量，按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA，引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，序列见表 1。再进行 PCR 扩增，反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火延伸 30 s，共进行 45 次循环。采集荧光信号，以 β -actin 为内参，采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法

计算目的基因相对表达。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
MP	正向 5'-GAATCAAAGTTGAAAGGACCTG-3'	23
	反向 5'-CTCTAGCCATTACCTGCTAAAGTC-3'	24
β -actin	正向 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3'	20
	反向 5'-TCTGCATCCTGTCAGCAATG-3'	20
Nrf2	正向 5'-GCTCCGACTAGCCATTGACG-3'	20
	反向 5'-TCAAATCCATGTCCTGCTGGG-3'	21
Keap1	正向 5'-GAGATATGAGCCAGATCGAGACG-3'	23
	反向 5'-GGTGTAAATCATCCGCCACTCAT-3'	22
HO-1	正向 5'-AGAGTTTCTTCGCCAGAGGC-3'	20
	反向 5'-GGGAAAGCAGTCATGTCA-3'	20
NQO1	正向 5'-AAGGTTGGAAGAAGCGTCTG-3'	20
	反向 5'-CCTCTGCCCTAAACCACAG-3'	20

2.9 Western blot 法检测肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达 取右肺组织适量，TBS 洗涤，眼科剪剪成小块，加入裂解液制成匀浆，离心，分离上清，得到蛋白质，检测其含量后确定上样量，经上样、SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭后，将 PVDF 膜与稀释好的一抗 Nrf2（1：1 000）、Keap1（1：1 000）、HO-1（1：1 000）、NQO1（1：1 000）、 β -actin（1：5 000）在4℃下孵育过夜，TBST 洗涤，将膜与稀释好的二抗羊抗兔 IgG-HRP（1：5 000）在 37℃下孵育 1 h，TBST 洗涤，加入 ECL 显影液显色，曝光，采用 Image J 软件分析目标条带光密度。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，若数据符合正态分布且方差齐性，则多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法；若数据呈现偏态分布或方差不齐性，则采用韦尔奇检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺指数的影响 与正常

组比较，模型组幼龄大鼠肺指数升高（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺指数降低（ $P<0.05$ ），见表 2。

表 2 各组幼龄大鼠肺指数比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=10$ ）

组别	肺指数
正常组	0.66±0.03
模型组	0.75±0.02 [*]
清金通络方低剂量组	0.72±0.04 [#]
清金通络方中剂量组	0.72±0.02 [#]
清金通络方高剂量组	0.70±0.04 [#]
阿奇霉素组	0.71±0.02 [#]

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ 。

3.2 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺组织病理变化及炎症评分的影响 正常组幼龄大鼠肺组织结构基本正常，肺泡大小均匀，未见明显炎性细胞浸润或实质病变；与正常组比较，模型组幼龄大鼠肺组织肺泡结构破坏，肺泡间隔增宽，肺泡壁充血水肿并可见炎性细胞浸润，肺组织炎症评分升高（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺组织结构均有所改善，肺泡壁充血水肿程度减轻，炎性细胞浸润减少，肺组织炎症评分降低（ $P<0.05$ ），见表 3、图 1。

表 3 各组幼龄大鼠肺组织炎症评分比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=10$ ）

组别	肺组织炎症评分/分
正常组	0.10±0.32
模型组	2.80±0.42 [*]
清金通络方低剂量组	2.20±0.63 [#]
清金通络方中剂量组	1.70±0.67 [#]
清金通络方高剂量组	1.20±0.63 [#]
阿奇霉素组	1.30±0.67 [#]

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ 。

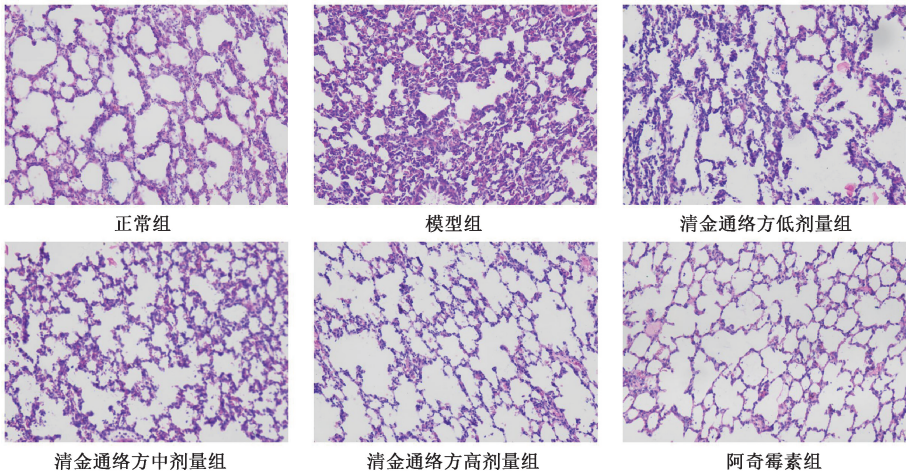


图 1 各组幼龄大鼠肺组织病理形态（HE 染色，×200）

3.3 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 与正常组比较，模型组幼龄大鼠肺组织 SOD 活性降低（ $P<0.05$ ），MDA 水平升高（ $P<0.05$ ）；与模型

组比较，清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺组织 SOD 活性升高（ $P<0.05$ ），MDA 水平降低（ $P<0.05$ ），见表 4。

表 4 各组幼龄大鼠肺组织 SOD 活性和 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(pg·mL ⁻¹)
正常组	155.47±6.97	5.07±0.19
模型组	75.60±4.32 [*]	16.56±0.79 [*]
清金通络方低剂量组	84.85±5.45 [#]	12.39±0.41 [#]
清金通络方中剂量组	109.62±3.57 [#]	10.44±0.63 [#]
清金通络方高剂量组	124.42±5.07 [#]	8.24±0.56 [#]
阿奇霉素组	120.42±1.61 [#]	9.10±0.48 [#]

注：与正常组比较, ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

3.4 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺组织 ROS 荧光表达的影响 与正常组比较, 模型组幼龄大鼠肺组织 ROS 荧光信号强度增强 ($P<0.05$); 与模型组比较, 清金通络方各剂

量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺组织 ROS 荧光信号强度减弱 ($P<0.05$), 见表 5、图 2。

表 5 各组幼龄大鼠肺组织 ROS 荧光信号强度比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	ROS 荧光信号强度
正常组	12.31±0.85
模型组	23.28±0.61 [*]
清金通络方低剂量组	19.65±0.58 [#]
清金通络方中剂量组	15.60±0.58 [#]
清金通络方高剂量组	14.07±0.35 [#]
阿奇霉素组	14.34±0.54 [#]

注：与正常组比较, ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

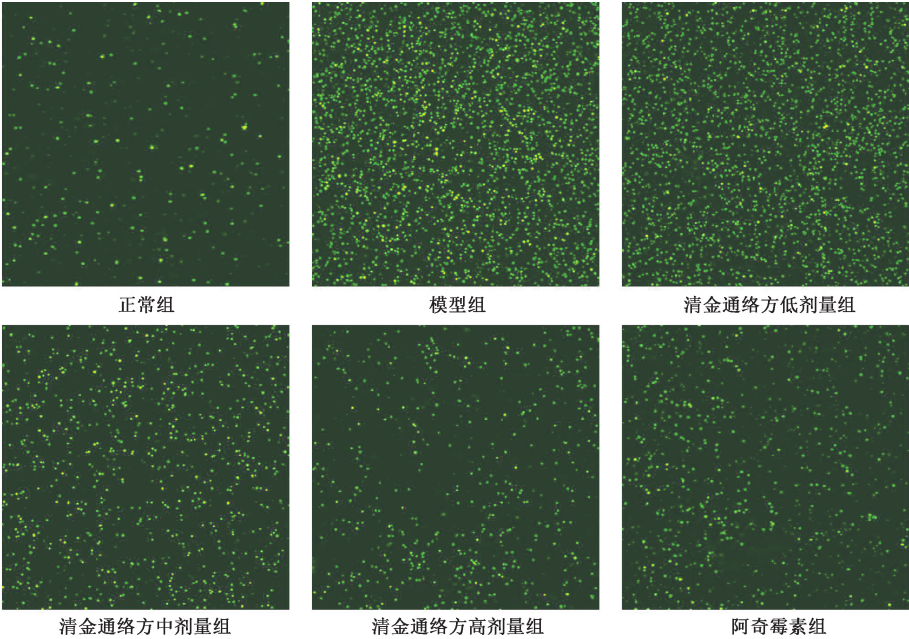


图 2 各组幼龄大鼠肺组织 ROS 荧光表达情况 (激光共聚焦显微镜, $\times 100$)

3.5 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 与正常组比较, 模型组幼龄大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$), 见表 6。

表 6 各组幼龄大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IL-6	IL-1 β	TNF- α
正常组	76.37±8.31	59.67±5.32	194.61±22.65
模型组	191.45±10.22 [*]	184.70±14.37 [*]	374.24±22.62 [*]
清金通络方低剂量组	157.73±11.85 [#]	148.33±10.84 [#]	300.43±17.51 [#]
清金通络方中剂量组	125.34±7.16 [#]	123.37±8.15 [#]	277.87±18.92 [#]
清金通络方高剂量组	111.09±7.01 [#]	112.39±7.30 [#]	258.68±12.88 [#]
阿奇霉素组	115.87±7.99 [#]	116.04±7.68 [#]	274.62±12.05 [#]

注：与正常组比较, ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

3.6 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺组织中 MP 病原载量以及 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达 与正常组比较, 模型组肺组织中 MP 病原载量升高 ($P<0.05$), Nrf2、

Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺组织 MP 病原载量降低 ($P<0.05$), Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 见表 7。

3.7 清金通络方对 MMP 幼龄大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组幼龄大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 清金通络方各剂量组及阿奇霉素组幼龄大鼠肺组织 Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 见表 8、图 3。

4 讨论

MPP 在中医中归属于“肺炎喘嗽”“外感热病”范畴, 主要经飞沫传播, 好发于 5 岁及以上儿童和青少年, 有低龄化趋势^[14], 其病因在外责之于风热之邪, 在内责之于小儿肺脏娇嫩、卫外不固, 病理因素涉及热、痰、毒、等方面, 总病机为肺气郁闭。清金通络方中君药麻黄宣肺止咳利水, 蜜桑白皮泻肺止咳, 苦杏仁止咳平喘、肃降肺气,

表 7 各组幼龄大鼠肺组织 MP 病原载量及 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

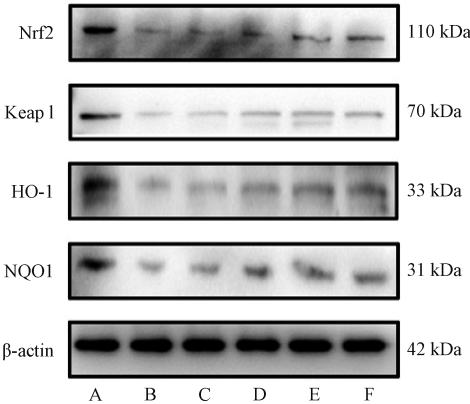
组别	MP/ β -actin	<i>Nrf2</i> / β -actin	<i>Keap1</i> / β -actin	<i>HO-1</i> / β -actin	<i>NQO1</i> / β -actin
正常组	1.01±0.03	1.00±0.01	1.00±0.02	0.98±0.02	0.97±0.04
模型组	3.74±0.12 [*]	0.43±0.05 [*]	0.25±0.04 [*]	0.32±0.04 [*]	0.44±0.03 [*]
清金通络方低剂量组	3.06±0.08 [#]	0.66±0.04 [#]	0.42±0.04 [#]	0.49±0.02 [#]	0.63±0.03 [#]
清金通络方中剂量组	2.48±0.06 [#]	0.80±0.04 [#]	0.69±0.03 [#]	0.63±0.04 [#]	0.73±0.02 [#]
清金通络方高剂量组	1.89±0.16 [#]	0.83±0.03 [#]	0.77±0.03 [#]	0.80±0.02 [#]	0.81±0.02 [#]
阿奇霉素组	1.92±0.14 [#]	0.82±0.01 [#]	0.71±0.04 [#]	0.74±0.04 [#]	0.75±0.03 [#]

注：与正常组比较,^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 8 各组幼龄大鼠肺组织 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	<i>Nrf2</i> / β -actin	<i>Keap1</i> / β -actin	<i>HO-1</i> / β -actin	<i>NQO1</i> / β -actin
正常组	0.87±0.01	0.73±0.01	0.76±0.01	0.83±0.03
模型组	0.14±0.01 [*]	0.10±0.01 [*]	0.13±0.01 [*]	0.14±0.02 [*]
清金通络方低剂量组	0.27±0.02 [#]	0.14±0.01 [#]	0.16±0.01 [#]	0.31±0.02 [#]
清金通络方中剂量组	0.67±0.02 [#]	0.21±0.02 [#]	0.25±0.01 [#]	0.45±0.02 [#]
清金通络方高剂量组	0.38±0.01 [#]	0.28±0.02 [#]	0.32±0.02 [#]	0.58±0.02 [#]
阿奇霉素组	0.45±0.01 [#]	0.22±0.01 [#]	0.37±0.02 [#]	0.46±0.01 [#]

注：与正常组比较,^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为清金通络方低、中、高剂量组，F 为阿奇霉素组。

图 3 各组幼龄大鼠肺组织 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* 蛋白印迹图

三药相合，辛开苦降，以复肺气之宣降；臣以黄芩、石膏清泄痰热，瓜蒌、橘红平喘祛痰；佐以大黄通腑清肺，百部润肺止咳，赤芍清热活血通络，茯苓健脾利湿祛痰，炙甘草调和诸药，诸药合用，共奏清热化痰、宣肺通络之功。

MP 作为一种自我复制的原核生物，其感染通常具有自限性，但在某些个体中下呼吸道感染可构成发病率和死亡率的重度风险^[15-16]。在初始阶段，MP 通过特殊的末端结构附着在支气管上皮并释放过氧化氢和超氧自由基，由于它缺乏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶，过氧化物分解减少会破坏细胞中的氧化还原稳态，导致氧化应激的产生，并攻击细胞的脂质、蛋白质和核酸，引发一系列的细胞损伤和病理反应^[17-19]。ROS 作为宿主对入侵微生物非特异性免疫防御的一部分，通过靶向细胞内脂质和蛋白质等生物成分作为直接抗菌剂发挥作用，同时作为先天免疫信号，它可激活免疫系统来对抗病原体^[20]，还能被机体内的抗氧化系统抵消，以维持细胞中的氧化还原稳态；超过细胞自由基

清除系统能力的超生理水平，引起氧化应激并激活促炎途径^[21]。MDA 是脂质过氧化的产物，常作为衡量氧化应激水平的标志物。SOD 作为一种抗氧化物酶，可催化超氧化物阴离子发生歧化反应，使 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂ 以减轻过氧化物对细胞造成的氧化应激损伤。

氧化应激的发生最终会导致炎症细胞因子的大量释放，在 MP 感染后机体通过 T 淋巴细胞参与免疫应答，TNF- α 作为前炎症因子，可促进 IL-2、IL-6、IL-1 β 等促炎因子大量释放，造成肺部广泛浸润性炎症及肺组织损伤^[22]。机体介导氧化应激反应的核心是通过 Keap1/*Nrf2*/*HO-1* 途径，该通路可通过上调抗氧化基因表达来清除过量的 ROS^[23-24]。Keap1 的 IVR 结构域是 Keap1 与亲电化合物和氧化剂发生反应的关键位点，其下游的 *HO-1* 能够将血红素分解、并通过调节游离铁代谢水平发挥抗氧化作用^[25]，并可通过其 Kelch 结构域与 *Nrf2* 的 N 端 Neh2 结构域结合形成 *Nrf2*-Keap1 二聚体，在正常情况下，*Nrf2*-Keap1 二聚体存在于细胞质中；在氧化还原失衡情况下，P62 与 *Nrf2* 竞争性结合 Keap1，导致 *Nrf2*-Keap1 二聚体解离，使 *Nrf2* 转入细胞核内与 P62 激活的 ARE 结合，上调抗氧化因子 *HO-1*、*NQO1* 表达，达到抗氧化应激、抑制炎症相关细胞因子释放的作用^[26-28]。本研究通过经鼻腔接种 MP 菌液诱导建立幼龄大鼠 MPP 模型，在给予不同剂量清金通络方干预后发现肺组织病变情况有不同程度的减轻，炎性细胞浸润减少，ROS 荧光信号强度降低，SOD 活性升高，MDA 水平降低，血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均有不同程度的降低，MP 病原载量降低，同时上调了肺组织 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1*、*NQO1* mRNA、蛋白表达。

综上所述，清金通络方可通过降低 ROS 表达，增强抗氧化酶活性，减少相关炎症细胞因子释放，最终达到减轻 MPP 肺炎性损伤的作用，其机制可能与激活 ROS/*Nrf2*/*HO-1* 信号通路、抑制氧化应激反应相关。

参考文献:

[1] Tsai T A, Tsai C K, Kuo K C, *et al.* Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2021, 54(4): 557-565.

[2] 王雪峰, 尚云晓, 成焕吉, 等. 东北地区儿童肺炎支原体呼吸道感染中西医结合防治方案[J]. 中国中西医结合儿科学, 2023, 15(6): 461-466.

[3] Liu J, He R, Zhang X, *et al.* Clinical features and “early” corticosteroid treatment outcome of pediatric *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1135228.

[4] Ferwerda A, Moll H A, de Groot R. Respiratory tract infections by *Mycoplasma pneumoniae* in children; a review of diagnostic and therapeutic measures[J]. *Eur J Pediatr*, 2001, 160(8): 483-491.

[5] Chan E D, Welsh C H. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *West J Med*, 1995, 162(2): 133-142.

[6] 张秀英, 王雪峰, 尚云晓, 等. 清肺通络膏佐治儿童社区获得性肺炎 460 例临床疗效观察[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2017, 19(12): 2054-2057.

[7] 陶经纬, 周婧雅, 刘奕扬, 等. 川芎嗪对脊髓损伤大鼠 Nrf2/HO-1 通路及氧化应激的调控作用[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2575-2581.

[8] Waites K B, Talkington D F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 697-728.

[9] Almagor M, Kahane I, Yatziv S. Role of superoxide anion in host cell injury induced by *mycoplasma pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells[J]. *J Clin Invest*, 1984, 73(3): 842-847.

[10] Li H X, Wang T H, Wu L X, *et al.* Role of Keap1-Nrf2/ARE signal transduction pathway in protection of dexmedetomidine preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(9): BSR20221306.

[11] 吴振起, 齐兆东, 张天宇, 等. 高载量肺炎支原体感染小鼠重症肺炎模型的建立和评价[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 9-12; 259.

[12] 赵 伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.

[13] Lu Y, Zhang Y, Pan Z, *et al.* Potential “Therapeutic” effects of tocotrienol-rich fraction (TRF) and carotene “Against” bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats *via* TGF-β/Smad, PI3K/Akt/mTOR and NF-κB signaling pathways[J]. *Nutrients*, 2022, 14(5): 1094.

[14] 瞿圣岳, 穆婧雯, 杨建树, 等. 小儿咳喘灵口服液 (浓缩型) 治疗儿童肺炎支原体肺炎的临床疗效观察[J]. 中国中

西医结合儿科学, 2024, 16(5): 431-435.

[15] Zhang L, Lai M, Ai T, *et al.* Analysis of *Mycoplasma pneumoniae* infection among children with respiratory tract infections in hospital in Chengdu from 2014 to 2020[J]. *Transl Pediatr*, 2021, 10(4): 990-997.

[16] Kutty P K, Jain S, Taylor T H, *et al.* *Mycoplasma pneumoniae* among children hospitalized with community-acquired pneumonia[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(1): 5-12.

[17] Nakane D, Murata K, Kenri T, *et al.* Molecular ruler of the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(6): e1009621.

[18] Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress; pathological and toxicological implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(3): 376-393.

[19] Kensler T W, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses *via* the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89-116.

[20] Lee D, Lal N K, Lin Z D, *et al.* Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1838.

[21] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.

[22] 靳 超, 白艳香, 徐 利, 等. 不同严重程度肺炎支原体感染患儿血清 HO-1 和 NQO-1 表达及意义[J]. 中国医师杂志, 2024, 26(3): 408-412.

[23] Tu W, Wang H, Li S, *et al.* The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(3): 637-651.

[24] Amin N, Du X, Chen S, *et al.* Therapeutic impact of thymoquinone to alleviate ischemic brain injury *via* Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25 (7): 597-612.

[25] Ratcliffe N, Wieczorek T, Drabińska N, *et al.* A mechanistic study and review of volatile products from peroxidation of unsaturated fatty acids; an aid to understanding the origins of volatile organic compounds from the human body[J]. *J Breath Res*, 2020, 14(3): 034001.

[26] Georgakopoulou V E, Lempesis I G, Sklapani P, *et al.* Exploring the pathogenetic mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae* (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2024, 28(1): 271.

[27] He F, Antonucci L, Karin M. Nrf2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(4): 405-416.

[28] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang D D. Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.