

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20240930002

# 荆防败毒散减轻小鼠拟病毒性肺炎模型肺损伤的作用机制

崔白梅<sup>1</sup>, 朱紫陌<sup>1</sup>, 赵显芳<sup>2</sup>, 吴佩<sup>1</sup>, 李秀芳<sup>1</sup>

1. 云南中医药大学中药学院(云南 昆明 650500); 2. 云南经济管理学院医学院(云南 昆明 650033)

**【摘要】** 目的 探讨多肌胞苷酸[poly(I:C)]滴鼻刺激诱导小鼠拟病毒性肺炎模型的损伤机制,并利用该模型研究荆防败毒散减轻肺损伤的作用机制。方法 ①选用雄性 C57BL/6 小鼠,随机分为对照(Control)组、模型[poly(I:C)]组。Control 组缓慢滴鼻磷酸盐缓冲液(PBS, 2 000  $\mu$ L/kg), poly(I:C)组滴鼻等体积的 poly(I:C),连续 5 d。分别于滴鼻后 1 d、3 d、5 d 对各组动物损伤情况进行分析;②雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 Control 组、poly(I:C)组(10 g/L)、利巴韦林组(LBWL, 0.15 g/kg)、荆防败毒散低剂量组(JFBDS-L, 24 g/kg)和高剂量组(JFBDS-H, 48 g/kg)。动物于滴鼻 poly(I:C)6 h 后灌胃给予相应干预,连续滴鼻刺激加药物干预 3 d 后考察药物是否具有减轻炎症作用。采用酶联免疫吸附分析试剂盒(ELISA)法检测炎症因子水平;苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理形态变化;转录组测序法分析 poly(I:C)滴鼻刺激 3 d 时小鼠肺组织差异表达基因;Western blot 法对核苷酸结合寡聚化结构域蛋白(NOD)样受体信号通路的关键蛋白进行验证。结果 ①与 Control 组相比,随着 poly(I:C)滴鼻次数的增加, poly(I:C)组滴鼻 3 d、5 d 后鼻腔灌洗液中的促炎性细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )和肺泡灌洗液中的 TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),白细胞介素-6(IL-6)水平变化不明显( $P>0.05$ ),抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)水平先升高后降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ );血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平呈逐渐升高趋势( $P<0.01$ ),抗炎细胞因子 IL-10 水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。在 poly(I:C)刺激 1 d、3 d、5 d 时,肺泡壁间隔出现了不同程度的增厚、水肿,滴鼻 3 d、5 d 造成的损伤较为严重。转录组学分析显示, poly(I:C)刺激后 3 d 肺组织差异表达基因有 543 个上调基因, 37 个下调基因,主要涉及 NOD 样受体信号通路等。②poly(I:C)滴鼻同时给予荆防败毒散干预 3 d 后,肺泡灌洗液中的 TNF- $\alpha$  水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),抗炎细胞因子 IL-10 的水平有上升趋势( $P>0.05$ );小鼠肺泡壁间隔增厚得到改善;NOD 样受体信号通路关键蛋白的表达水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。结论 poly(I:C)滴鼻刺激小鼠可较好模拟病毒性肺炎病理损伤,其病理学机制主要涉及 NOD 样受体信号通路的过度激活。荆防败毒散能抑制 poly(I:C)诱导小鼠拟病毒性肺炎感染炎症因子的释放,保护肺组织结构完整性,调控 NOD 样受体信号通路蛋白表达,从而发挥减轻小鼠病毒性呼吸道感染所致肺损伤的作用。

**【关键词】** 病毒性肺炎;荆防败毒散;炎症因子;差异表达基因;经典名方;小鼠模型

## Mechanism of Jingfang Baidu Powder in alleviating lung injury in a mouse model of viral pneumonia

CUI Baimei<sup>1</sup>, ZHU Zimo<sup>1</sup>, ZHAO Xianfang<sup>2</sup>, WU Pei<sup>1</sup>, LI Xiufang<sup>1</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650500, China;

2. Medical College of Yunnan University of Economics and Management, Kunming, Yunnan 650033, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the injury mechanism of polyinosinic acid-polycytidylic acid [poly(I:C)] nasal drip stimulation-induced mouse model of viral pneumonia, and to study the mechanism of Jingfang Baidu Powder in alleviating lung injury. **Methods** ① C57BL/6 mice were randomly divided into Control group, Model [poly(I:C)] group. The Control group was given phosphate buffer (PBS, 2 000  $\mu$ L/kg) by nasal drip, and the poly(I:C) group was given poly(I:C) of the same volume by nasal drip for 5 consecutive days. The injury of the animals in each group was analyzed at 1 d, 3 d and 5 d after nasal drip. ② Male C57BL/6 mice were randomly divided into Control group, poly(I:C) (10 g/L) group, ribavirin (LBWL, 0.15 g/kg) group, low-dose (JFBDS-L, 24 g/kg) and high-dose Jingfang Baidu Powder

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82360803);云南省科技厅中青年学术和技术带头人后备人才项目(202305AC160043);云南省科技厅科技计划项目(202001AZ070001-001);云南省教育厅科学研究基金项目(2024Y358)

[作者简介] 崔白梅,女,硕士研究生,主要从事中药药理及应用研究

[通信作者] 李秀芳,教授,博士研究生导师;E-mail:sofinelxf@163.com

(JFBDS-H, 48 g/kg) groups. After intranasal poly(I:C) administration for 6 h, the animals were given corresponding interventions by intragastric administration. After continuous nasal stimulation and drug intervention for 3 d, whether the drug had the effect of reducing inflammation was investigated. The contents of inflammatory factors was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue in mice. Transcriptome sequencing method was used to analyze the differentially expressed genes in lung tissues of mice after poly(I:C) nasal stimulation for 3 d. The key proteins of nucleotide-binding oligomerization domain protein (NOD) like receptor signaling pathway were investigated by Western blot. **Results** ① Compared with the Control group, with the frequency of poly(I:C) nasal drops increased, the levels of pro-inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in nasal lavage fluid and TNF- $\alpha$  in alveolar lavage fluid increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the level of interleukin-6 (IL-6) did not change obviously ( $P > 0.05$ ), and the level of anti-inflammatory factor interleukin-10 (IL-10) increased first and then decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum increased gradually ( $P < 0.01$ ), and the level of anti-inflammatory factor IL-10 decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). After poly(I:C) stimulation at 1 d, 3 d and 5 d, the alveolar septum thickened to different degrees, and the injury was more serious by nasal drops for 3 d and 5 d. Transcriptomic analysis showed that 543 genes were up-regulated and 37 genes were down-regulated in lung tissue 3 d after poly(I:C) stimulation, which were mainly involved in NOD-like receptor signaling pathway. ② The level of TNF- $\alpha$  in alveolar lavage fluid was significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the level of anti-inflammatory factor IL-10 was gradually increased ( $P > 0.05$ ) after poly(I:C) nasal drip and Jingfang Baidu Powder intervention for 3 d; The thickening of alveolar wall septum in mice was improved; and the expression levels of key proteins in NOD-like receptor signaling pathway were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusions** Poly(I:C) intranasal stimulation can mimic viral pneumonia model well. The pathological mechanism is mainly involved in the overactivation of NOD-like receptor signaling pathway. Jingfang Baidu Powder can inhibit the release of inflammatory factors induced by poly(I:C) in mice with viral pneumonia infection, protect the lung tissue structural integrity, regulate the protein expression in the NOD-like receptor signaling pathway, thereby play a role in reducing the lung injury caused by viral respiratory tract infections in mice.

**Keywords:** viral pneumonia; Jingfang Baidu Powder; inflammatory factors; differentially expressed genes; classic famous formula; mouse model

病毒性肺炎(viral pneumonia, VP)是常见的呼吸系统疾病,常由上呼吸道病毒感染向下蔓延侵犯终末气道、肺泡和肺间质而引起。该病好发于冬春季节,可暴发或散发流行<sup>[1]</sup>。流行病学研究<sup>[2]</sup>显示,当病毒入侵机体时,会对机体免疫功能和呼吸道黏膜系统造成损害,导致机体内炎症因子过度表达,造成“细胞因子风暴”,加速疾病的进程。急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征是VP患者死亡的主要原因<sup>[3]</sup>。目前,临床上针对VP主要采取疫苗接种、对症治疗、改善氧合及预防继发细菌感染等措施,尚缺乏针对VP的专属性强的特效治疗药物,因此VP仍是临床上难攻克的疾病之一。在抗VP药物研究中,VP动物模型是必不可少的工具。目前常用的VP动物模型大多数采用甲型H1N1流感(H1N1)病毒FM1株<sup>[4]</sup>、呼吸道合胞病毒(RSV)<sup>[5]</sup>、肠道病毒71型(EV71)<sup>[6]</sup>、乙型肝炎病毒(HBV)<sup>[7]</sup>等进行诱导,对实验环境要求极高,限制了研究的进一步发展。多肌胞苷酸[poly(I:C)]是一种模拟病毒双链RNA的合成多聚核苷酸,可作为病毒模拟物,诱导动物出现病毒感染的一系列特征,如产生大量干扰素<sup>[8]</sup>,造成黏膜上皮完整性的丧失和炎症因子的产生等<sup>[9]</sup>。目前poly(I:C)刺激小鼠导致的VP模型是研究中较为常用的模型之一<sup>[10-11]</sup>,但是关于该模型本身的病理生理动态变化特点,尚无深入的研究报道。因此,本研究采用poly(I:C)滴鼻刺激C57BL/6小鼠后,对呼吸道局部免疫和全身免疫的变化情况进行了动态考察,揭示其病理生理动态

变化特点;结合转录组测序分析,探讨poly(I:C)滴鼻刺激诱导小鼠拟VP的损伤机制。

荆防败毒散记载于明代张时彻的《摄生众妙方》<sup>[12]</sup>,由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、枳壳、茯苓、桔梗、川芎、甘草组成,具有疏风解表、败毒消肿、去痰止咳的功效,主要用于外感风寒邪客肌表、肺卫功能失调之证,是治疗中医风寒感冒的代表方剂<sup>[13]</sup>。在新型冠状病毒感染(COVID-19)期间,在《儿童新型冠状病毒感染诊断、治疗及预防专家共识(第一版)》及多个省份的儿童中医治疗方案中,荆防败毒散及荆防颗粒均为早期疫毒袭表证的推荐处方<sup>[14-16]</sup>。本研究以poly(I:C)滴鼻刺激诱导小鼠拟VP模型,对荆防败毒散减轻肺部炎症的作用进行考察,拓宽荆防败毒散的应用,也为阐明荆防败毒散防治病毒性呼吸道感染的科学内涵奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 170只SPF级雄性C57BL/6小鼠,8周龄,体质量20~22g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010]。动物饲养于云南中医药大学动物实验室[动物使用许可证号:SYXK(滇)K2022-0004],饲养期间各组小鼠自由饮水和进食。12h明/12h暗的昼夜各半循环照明环境,湿度恒定(40%~60%),温度控制在22~25℃。所有操作均符合云南中医药大学动物实验伦理要求,由云南中医药大学伦理委员会审批通过(伦理批号:R-062022051)。

1.1.2 药物与试剂 荆防败毒散组方及制备工艺参考《方剂学》<sup>[17]</sup>,由羌活、独活、柴胡、前胡、枳壳、茯苓、荆芥、防风、桔梗、川芎、甘草组成,药材均购自云南慈慧药业有限公司(批号分别为 C180102、C180401、C180201、C181201、C180601、C180401、C190601、C180601、C181001、C191201、C180602)。上述药材按常规方法煎煮并浓缩为稠浸膏,临用时用蒸馏水稀释,以成人临床等效量的 4 倍量(即生药 24 g/kg)为低剂量,8 倍量(即生药 48 g/kg)为高剂量。

磷酸盐缓冲液(PBS)、poly(I:C)(批号分别为 C3580-0500、42424-50-0),美国 Sigma-Aldrich 公司;肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(批号分别为 H052-1-2、H007-1-1、H009-1-2、H025-1-1),南京建成生物工程研究所;核苷酸结合寡聚化结构域蛋白1(NOD1)抗体、核因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )抗体(批号:ab-217798、Ab133462),英国 Abcam 公司;核苷酸结合寡聚化结构域蛋白2(NOD2)抗体、磷酸化受体相互作用蛋白激酶2(p-RIPK2)抗体(批号分别为 PA5-104317、PA5-104447),美国 Invitrogen 公司;受体相互作用蛋白激酶2(RIPK2)抗体、磷酸化核因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (p-I $\kappa$ B $\alpha$ )抗体、细胞核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)亚基蛋白(p65)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、微管蛋白(Tubulin)抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(批号分别为 15366-1-AP、10268-1-AP、80979-1-RR、60004-1-Ig、66031-1-Ig、10021781),美国 Proteintech 公司;磷酸化 NF- $\kappa$ B 亚基(p-p65)抗体(批号:3033S),美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.3 主要仪器 酶标仪(型号:Infinite M200 PRO),瑞士 Tecan 公司;分析天平(型号:XS125A),瑞士 Precisa 公司;-80℃超低温冰箱、石蜡切片机(型号分别为 995、Microm HM),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;旋涡混合器(型号:MixMax),合肥艾本森科学仪器有限公司;低温高速离心机(型号:cf16RX),日本 Hitachi Koki 公司;玻片扫描影像系统(型号:SQS-1000SQS-1000),昆明纳瑞科技有限公司;超纯水机(型号:UPH-III-20T),云南优普科技有限公司;旋转蒸发器(型号:RE-2000A),上海亚荣生化仪器厂;转移脱色摇床(型号:TS-8),海门市其林贝尔仪器制造有限公司;石蜡包埋机(型号:EG1150),德国 Leica 公司;转膜仪、电泳仪、湿转仪(型号:Mini P-4),美国 Bio-Rad 公司;全自动化学发光图像分析系统(型号:Bio Spectrum),上海天能科技有限公司。

## 1.2 分组、造模与干预

1.2.1 poly(I:C)诱导小鼠拟 VP 模型的损伤机制 参考文献方法<sup>[9]</sup>稍作修改进行造模。将 70 只雄性 C57BL/6

小鼠随机分为对照组(Control 组)、模型组[poly(I:C)组],每组 35 只。对照组缓慢滴鼻 PBS,模型组滴鼻 10 g/L 的 poly(I:C),滴鼻体积均为 2 000  $\mu$ L/kg(体质量),每天滴鼻 1 次,连续滴鼻 5 d。分别于滴鼻结束后 1 d、3 d、5 d 的时间点取血并对动物进行安乐死。取鼻腔灌洗液检测 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6、IFN- $\gamma$  的变化情况;取肺泡灌洗液检测 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的变化情况;制备血清检测 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的变化情况;取左肺上叶检测肺组织湿质量/干质量(W/D)比值;取右肺组织进行苏木精-伊红(HE)染色;观察肺组织病理学特征;取肺组织进行转录组测序。

1.2.2 荆防败毒散对 poly(I:C)诱导小鼠拟 VP 模型的影响 将 100 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 Control 组、poly(I:C)组、利巴韦林组(LBWL 组)、荆防败毒散低剂量组(JFBDS-L 组)和高剂量组(JFBDS-H 组),每组 20 只。按“1.2.1”项下方法连续滴鼻 3 d。

小鼠滴鼻 poly(I:C)6 h 后进行干预:Control 组、poly(I:C)组灌胃给予双蒸水(0.02 mL/g);药物剂量参照人和小鼠体表面积折算的等效剂量比计算,LBWL 组(0.15 g/kg)、JFBDS-L 组(24 g/kg)、JFBDS-H 组(48 g/kg)分别灌胃给予相应药物,各组在取材前 2 h 再给予相应干预,连续滴鼻刺激加药物干预 3 d。末次滴鼻后 24 h 取血并对动物进行安乐死。取左肺上叶检测肺组织 W/D 值;取肺泡灌洗液检测 TNF- $\alpha$ 、IL-10 的变化情况;取右肺组织进行 HE 染色;观察肺组织病理学特征;取全肺检测小鼠肺组织核苷酸结合寡聚化结构域蛋白(NOD)样受体信号通路关键蛋白表达水平。

## 1.3 检测指标与方法

1.3.1 鼻腔灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6、IFN- $\gamma$  的水平 将 0.8 mL 预冷的 PBS 经导管注入小鼠鼻咽部,经双侧前鼻孔流出,用离心管收集,得到鼻腔灌洗液,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于-80℃冰箱中保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6、IFN- $\gamma$  的水平。

1.3.2 肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的水平 结扎小鼠左肺上叶、右肺中叶,将 0.5 mL 灭菌 PBS 经气管插管灌洗肺 2 次,用离心管收集,得到肺泡灌洗液,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于-80℃冰箱中保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的水平。

1.3.3 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的水平 小鼠进行心脏取血,用离心管收集,4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于-80℃冰箱中保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 的水平。

1.3.4 肺组织 W/D 值检测 取小鼠左肺上叶,在预冷的 PBS 液中清洗干净,进行称量。于 70℃烘 48 h,称量烘

干的肺组织,计算 W/D 值,评估小鼠肺组织水肿程度。

1.3.5 HE 染色检测肺组织病理形态 取出小鼠右肺中叶组织,采用 4% 多聚甲醛固定 24 h,切片,进行 HE 染色,在显微镜下观察肺组织病理学特征。

1.3.6 肺组织转录组测序 取 Control 组及 poly(I:C) 组中造模第 3 天[poly(I:C)-3 d]的小鼠肺组织(每组各 5 只),送至上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组测序。

差异表达基因筛选与功能富集分析:运用 fastp 软件对测序获得原始读段和经过质控之后的读段进行统计。基于基因表达定量结果,进行组间差异基因分析,获得两组间发生差异表达的基因。采用 DESeq2 软件进行差异分析,筛选阈值为:  $|\log_2FC| \geq 1$  和  $padjust < 0.05$ 。使用 Omicshare 云平台(<https://www.omicshare.com/>)对差异基因进行基因本体论(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络的构建:使用 String 数据库(<https://string-db.org>)分析蛋白质相互作用,将数据导入 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络图,分析基因所对应的蛋白之间的关系。

1.3.7 Western blot 法检测肺组织 NOD 样受体信号通路关键蛋白表达 将精密称量后的小鼠肺组织置于离心管中,加入细胞裂解液(RIPA 裂解液:蛋白酶抑制剂=100:1),进行肺组织匀浆。肺组织混匀,冰上裂解 30 min, 4 °C、14 000 r/min 离心 5 min,取上清液。采用二辛可酸(BCA)法进行总蛋白浓度测定,加入含二硫苏糖醇(DTT)的蛋白上样缓冲液进行配平,煮沸 10 min。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)

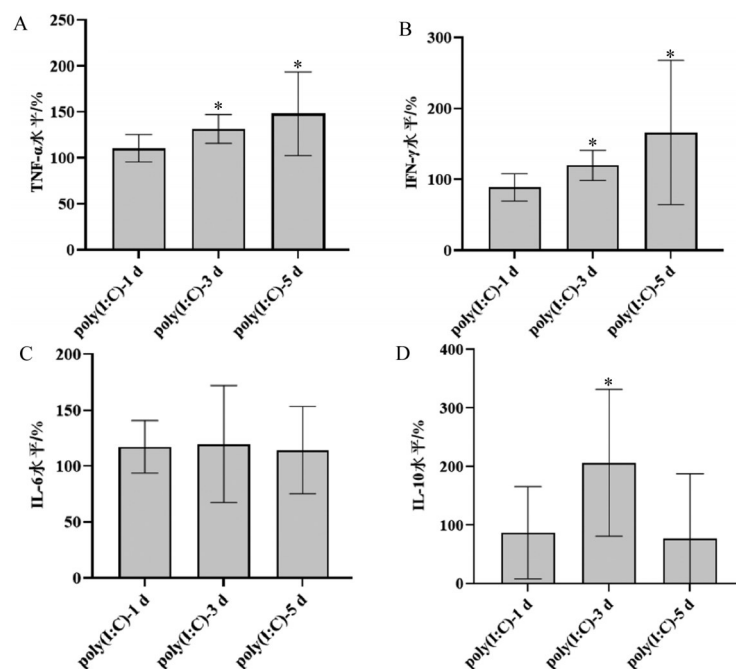
进行蛋白分离(浓缩胶 75 V, 25 min; 分离胶 115 V, 90 min)后,转膜(200 mA, 90 min)至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。加入 5% 脱脂牛奶封闭液,于摇床上封闭 2 h。分别加入一抗(NOD1、I $\kappa$ B $\alpha$ 、NOD2、p-RIPK2、RIPK2、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、GAPDH、Tubulin、 $\beta$ -actin、p-p65) 4 °C 过夜,用含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗涤 PVDF 膜 4 次,每次 5 min,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h。用 TBST 洗涤 PVDF 膜 4 次,每次 5 min,滴加化学发光显色液显影。利用 Photoshop 和 ImageJ 软件处理图像和分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。数据符合正态分布和方差齐性,则进行单因素方差分析,采用 LSD 分析组间差异;若方差不齐或不符正态,则采用非参数检验的 Kruskal-Wallis 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 poly(I:C)诱导的小鼠拟 VP 模型的损伤机制

2.1.1 对小鼠鼻腔灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6、IFN- $\gamma$  水平的影响 ELISA 检测结果显示,与 poly(I:C) 组造模第 1 天时[poly(I:C)-1 d]相比,随着滴鼻刺激时间的延长,采用 poly(I:C) 刺激小鼠 3 d[poly(I:C)-3 d]、5 d[poly(I:C)-5 d]时鼻腔灌洗液中的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平明显升高( $P < 0.05$ ),IL-6 水平变化不明显( $P > 0.05$ );与 poly(I:C) 组造模第 1 天[poly(I:C)-1 d]相比,采用 poly(I:C) 刺激小鼠 3 d[poly(I:C)-3 d]时 IL-10 水平升高( $P < 0.05$ )。见图 1。

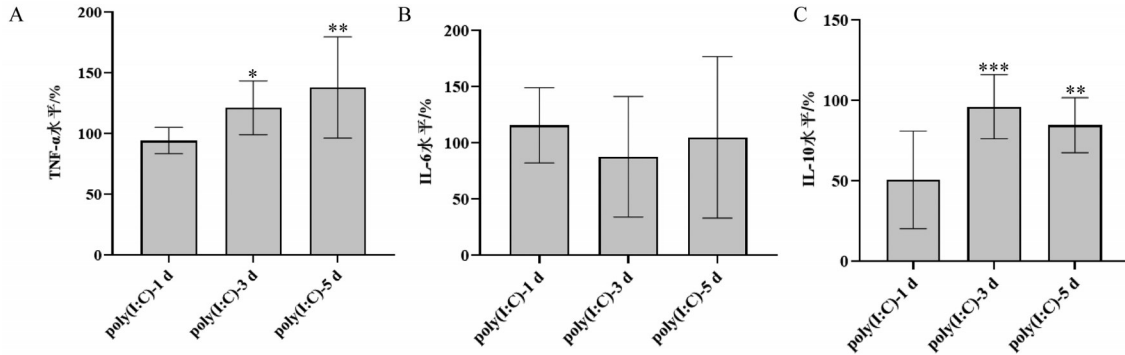


注:poly(I:C)-1 d 为模型组第 1 天,poly(I:C)-3 d 为模型组第 3 天,poly(I:C)-5 d 为模型组第 5 天。A 为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,B 为  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )水平,C 为白细胞介素-6(IL-6)水平,D 为白细胞介素-10(IL-10)水平。与 poly(I:C)-1 d 相比,\* $P < 0.05$ ;  $n = 8 \sim 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图 1 各组小鼠鼻腔灌洗液中生化指标的变化

2.1.2 对小鼠肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 水平的影响 ELISA 检测结果显示,与 poly(I:C) 组造模第 1 天 [poly(I:C)-1 d] 相比,采用 poly(I:C) 刺激小鼠 3 d [poly(I:C)-3 d]、5 d [poly(I:C)-5 d] 时肺泡灌洗液中的

TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而 IL-6 水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), IL-10 的水平显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。见图 2。

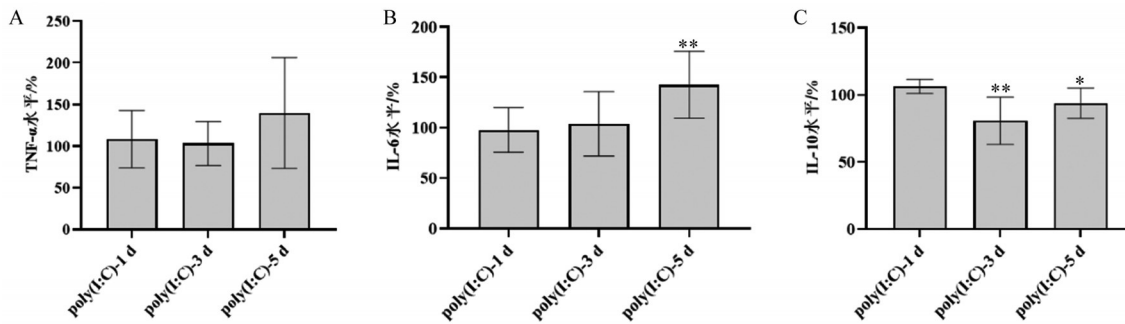


注: poly(I:C)-1 d 为模型组第 1 天, poly(I:C)-3 d 为模型组第 3 天, poly(I:C)-5 d 为模型组第 5 天。A 为肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, B 为白细胞介素-6 (IL-6) 水平, C 为白细胞介素-10 (IL-10) 水平。与 poly(I:C)-1 d 相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n = 7-9$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图 2 各组小鼠肺泡灌洗液中生化指标的变化

2.1.3 对小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 水平的影响 结果显示,与 poly(I:C) 组造模第 1 天 [poly(I:C)-1 d] 相比,采用 poly(I:C) 刺激小鼠 3 d [poly(I:C)-3 d]、5 d [poly(I:C)-5 d] 时血清中的 TNF- $\alpha$  水平呈逐渐升高趋

势,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 小鼠血清中 IL-6 水平随时间变化,呈逐渐升高趋势,至第 5 天时明显升高 ( $P < 0.05$ ); 抗炎细胞因子 IL-10 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。

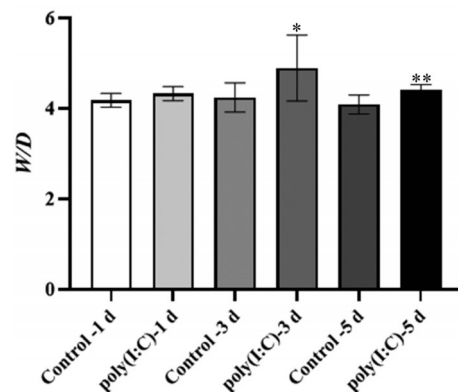


注: poly(I:C)-1 d 为模型组第 1 天, poly(I:C)-3 d 为模型组第 3 天, poly(I:C)-5 d 为模型组第 5 天。A 为肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, B 为白细胞介素-6 (IL-6) 水平, C 为白细胞介素-10 (IL-10) 水平。与 poly(I:C)-1 d 相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 6-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图 3 各组小鼠血清中生化指标的变化

2.1.4 对小鼠肺组织 W/D 值的影响 结果显示,与 PBS 刺激 1 d (Control-1 d) 相比, poly(I:C) 刺激 1 d [poly(I:C)-1 d] 时小鼠肺组织 W/D 值无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 与 PBS 刺激 3 d (Control-3 d) 相比, poly(I:C) 刺激 3 d [poly(I:C)-3 d] 时肺组织 W/D 值明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 PBS 刺激 5 d (Control-5 d) 相比, poly(I:C) 刺激 5 d [poly(I:C)-5 d] 时肺组织 W/D 值显著升高 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

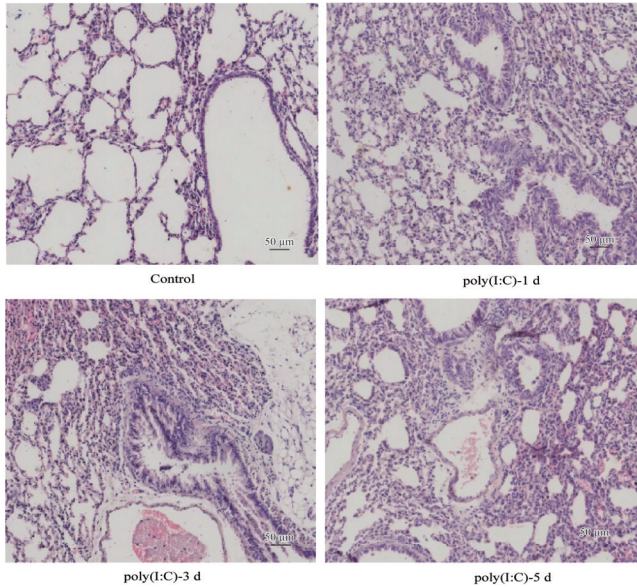
2.1.5 对小鼠肺组织病理形态影响 结果显示, Control 组小鼠肺泡结构完整, 未出现水肿, 支气管和血管周围未见明显炎症变化; 与 Control 比较, poly(I:C) 刺激 1 d、3 d、5 d 时 [poly(I:C)-1 d、poly(I:C)-3 d、poly(I:C)-5 d] 小鼠肺泡壁间隔明显增厚, 肺组织结构紊乱, 出现明显的红细胞浸润和间质水肿等病理现象; poly(I:C) 刺激 3 d、5 d 时 [poly(I:C)-3 d、poly(I:C)-5 d] 小鼠肺



注: poly(I:C)-1 d、Control-1 d 分别为模型组和对照组第 1 天, poly(I:C)-3 d、Control-3 d 分别为模型组和对照组第 3 天, poly(I:C)-5 d、Control-5 d 分别为模型组和对照组第 5 天。W/D 为肺湿质量/干质量比值。与 Control-3 d 相比, \* $P < 0.05$ ; 与 Control-5 d 相比, \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 9$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图 4 造模对小鼠肺组织 W/D 值变化的影响

泡壁间隔显著增厚,肺部毛细血管通透性增加,损伤更加明显。见图 5。



注:Control 为对照组, poly(I:C)-1 d 为模型组第 1 天, poly(I:C)-3 d 为模型组第 3 天, poly(I:C)-5 d 为模型组第 5 天。标尺: 50 μm。

图 5 各组小鼠肺组织病理形态(苏木精-伊红染色, ×20)

2.1.6 转录组测序数据质控和序列比对分析结果 对质控后测序数据进行质量评估, Q20 值均>98%, Q30 值均>95%; 测序碱基平均错误率, 均<0.1%。见表 1。结果表明, 测序样本的数量和质量均达到要求。

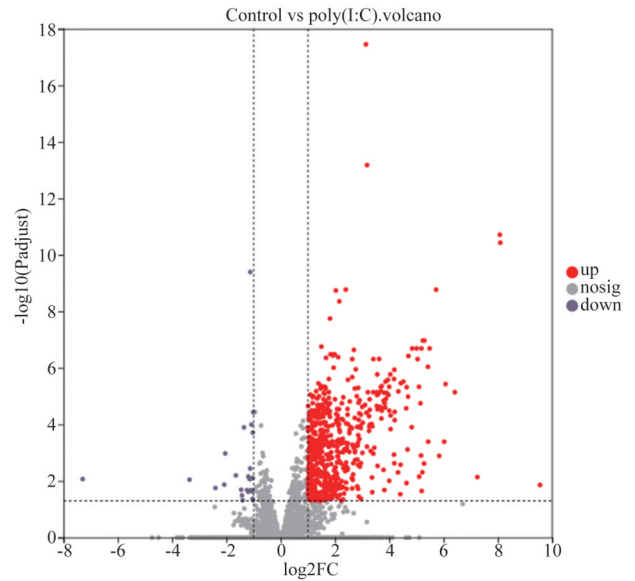
表 1 各组样本测序质控和序列比对结果

样本名称	原始序列	筛选序列	Q20/%	Q30/%	错误率/%
Control-1	58 187 262	57 324 494	98.53	95.38	0.02
Control-2	51 521 996	51 100 622	98.74	95.89	0.02
Control-3	49 192 390	48 818 464	98.62	95.51	0.02
Control-4	49 826 028	49 094 018	98.47	95.21	0.02
Control-5	54 052 334	52 556 436	98.53	95.53	0.02
poly(I:C)-1	52 833 378	51 819 396	98.40	95.09	0.02
poly(I:C)-2	58 787 460	57 508 268	98.62	95.63	0.02
poly(I:C)-3	43 259 796	41 786 480	98.53	95.42	0.02
poly(I:C)-4	54 096 262	52 051 270	98.42	95.20	0.02
poly(I:C)-5	65 080 470	63 399 402	98.57	95.55	0.02

注:Control 为对照组, poly(I:C) 为模型组, Q20 为碱基质量值>20 所占百分比, Q30 为碱基质量值>30 所占百分比。

2.1.7 差异表达基因的筛选结果 Control 组和 poly(I:C) 组的数据通过 Omicshare 云平台筛选差异基因和绘制火山图, 结果发现共有 580 个差异基因。其中, 与 Control 组相比, poly(I:C) 组有 543 个上调基因, 37 个下调基因。见图 6。

2.1.8 差异表达基因的 GO 功能富集分析 对 Control 组与 poly(I:C) 组之间的差异基因进行 GO 功能富集分析, 结果发现两组的差异基因主要富集于 5 426 个生物学过程(BP)、575 个细胞组分(CC)和 962 个分子功能



注:Control 为对照组, poly(I:C) 为模型组。

图 6 差异表达基因火山图

(MF)。与 Control 组相比, poly(I:C) 组差异基因的 BP 主要富集于防御应答 (defense response)、免疫反应 (immune response)、免疫系统过程 (immune system process) 等; 差异基因的 CC 主要富集于胞外区 (extracellular region)、MHC I 类肽负载复合体 (MHC class I peptide loading complex)、质膜外侧面 (external side of plasma membrane) 等; 差异基因的 MF 主要富集于 TAP 结合蛋白 (TAP binding)、趋化因子受体结合 (chemokine receptor binding)、细胞因子活性 (cytokine activity) 等。见图 7。

2.1.9 差异表达基因的 KEGG 功能富集分析 结果显示, Control 组与 poly(I:C) 组之间的差异基因主要富集于 69 个 KEGG 信号通路 (pvalue≤0.05), 主要包括 NOD 样受体通路 (NOD-like receptor signaling pathway)、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用 (viral protein interaction with cytokine and cytokine)、Toll 样受体信号通路 (toll-like receptor signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、细胞黏附分子 (cell adhesion molecules) 和趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway) 等。其中在 NOD 样受体通路中, 富集的差异基因 2'-5'-寡聚腺苷酸合成酶 3 基因 (*Oas3*)、干扰素调节因子 9 基因 (*Irf9*)、干扰素调节因子 7 基因 (*Irf7*)、NOD 样受体蛋白 6 炎症小体基因 (*Nlrp6*)、肿瘤坏死因子基因 (*Tnf*)、信号转导及转录活化因子 1 基因 (*Stat1*)、信号转导及转录活化因子 2 基因 (*Stat2*)、胱天蛋白酶-4 基因 (*Caspase4*)、CXC 趋化因子配体 3 基因 (*Cxcl3*)、C-C 趋化因子配体 12 基因 (*Ccl12*)、C-C 趋化因子配体 5 基因 (*Ccl5*)、C-C 趋化因子配体 2 基因 (*Ccl2*) 等在 poly(I:C) 诱导的小鼠肺组织中表达均显著上调。见

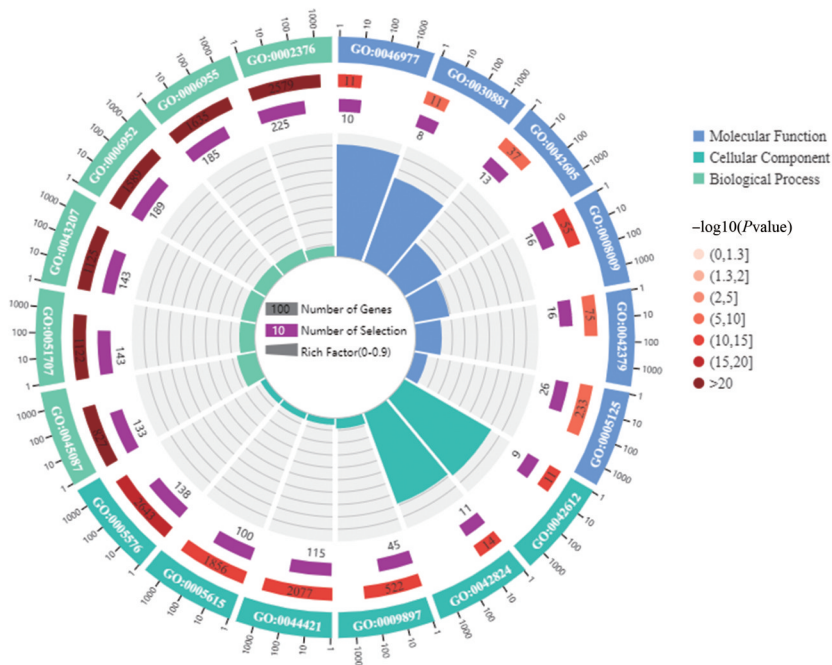
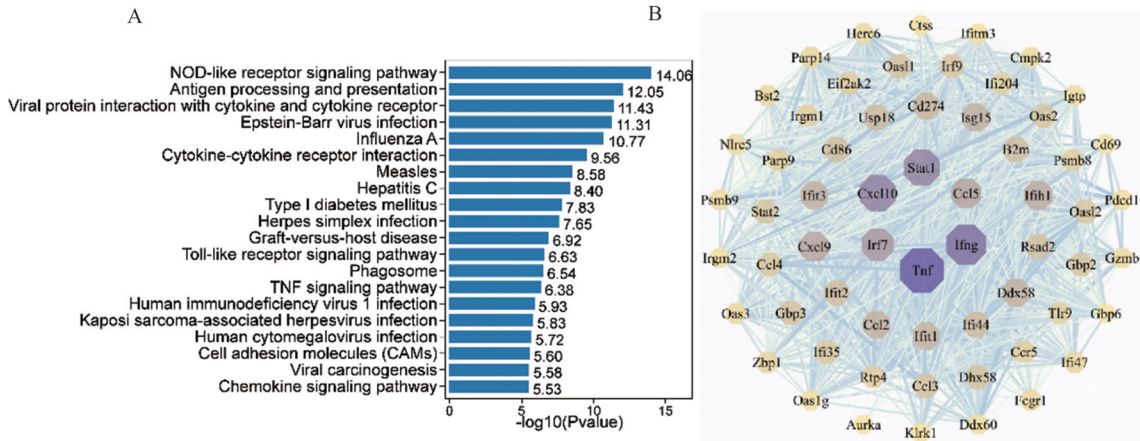


图7 基因本体(GO)数据库功能富集分析图

图8A。

2.1.10 PPI 网络的构建和核心基因的筛选 将Control组和poly(I:C)组筛选的差异表达基因导入String数据库,使用CytoScape软件构建PPI网络图,与Control相比,poly(I:C)组连接度较大的基因为*Tnf*、 $\gamma$ 干扰素基因

(*Ifng*)、CXC趋化因子配体10基因(*Cxcl10*)、*Stat1*、*Irf7*、抗黏液病毒基因1(*Mx1*)、CXC趋化因子配体19基因(*Cxcl19*)、*Ccl5*等,说明poly(I:C)滴鼻诱导病毒性呼吸道感染与这些基因相关度比较大。见图8B。



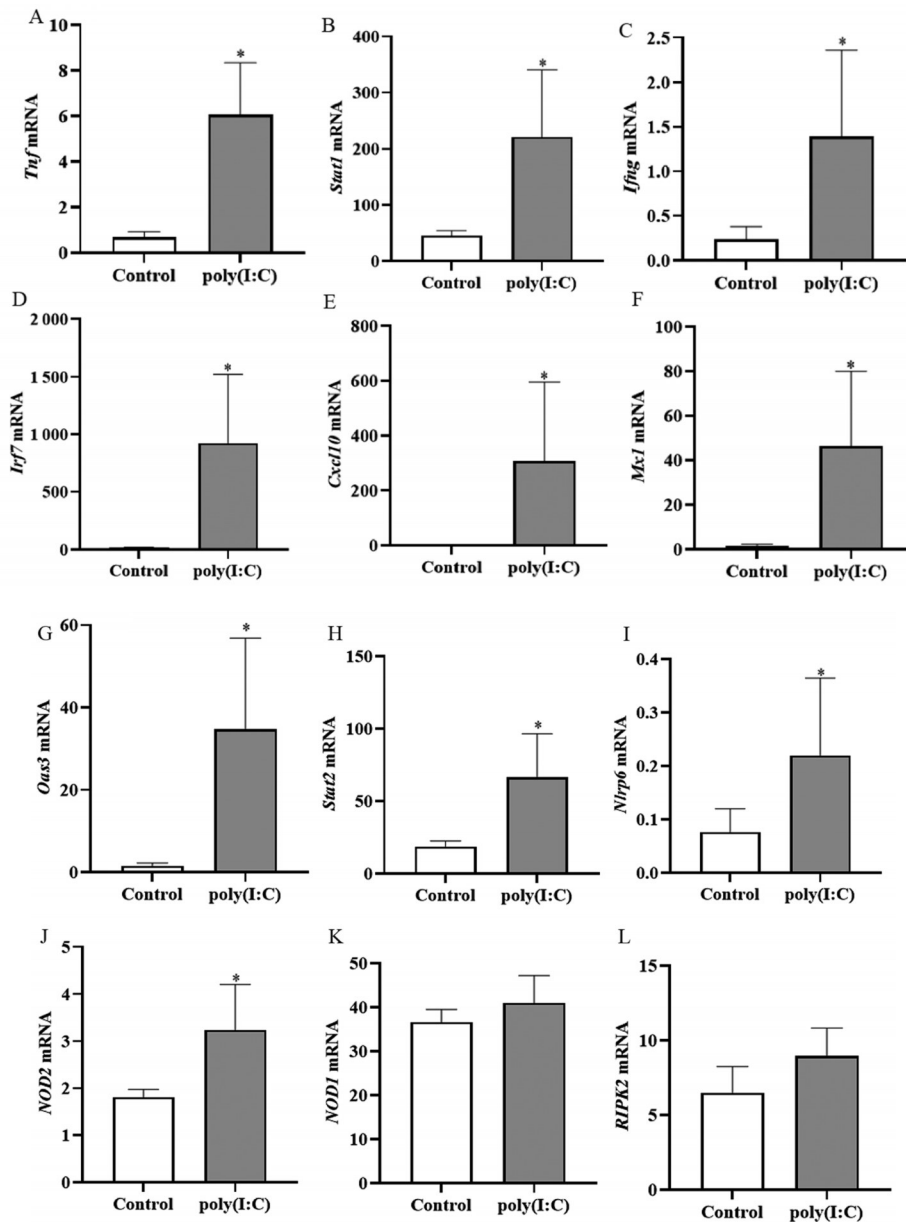
注:A为京都基因与基因组百科全书(KEGG)显著性柱状图(前20个富集信号通路),B为蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析图。

图8 KEGG功能富集分析图和PPI网络分析图

2.1.11 部分差异表达基因的mRNA表达量分析 根据PPI网络图核心基因的筛选,选择差异表达显著的9个差异基因进行mRNA表达量分析(图8B)。这些关键的差异表达基因都出现上调,结合这些指标发现其主要是抗病毒系统中的一些重要干扰素刺激基因,比如:*Ifng*、*Trf7*、*Oas3*、*Mx1*、*Tnf*等,以及*Nlrp6*、*Stat1*、*Stat2*、*Cxcl10*、*NOD1*、*NOD2*、*RIPK2*,这些指标都涉及了NOD样受体信号通路。见图9。

2.2 荆防败毒散对poly(I:C)诱导小鼠拟VP模型的影响

2.2.1 对小鼠肺泡灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-10水平的影响 结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组肺泡灌洗液中的TNF- $\alpha$ 水平明显升高( $P < 0.05$ ),IL-10无明显变化( $P > 0.05$ )。与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L组的TNF- $\alpha$ 水平明显降低( $P < 0.01$ ),而IL-10无明显变化( $P > 0.05$ );JFBDS-H组TNF- $\alpha$ 水平明显降低( $P <$



注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组。A为肿瘤坏死因子(*Tnf*)mRNA,B为信号传导子和转录活化子1(*Stat1*)mRNA,C为γ干扰素(*Irfg*)mRNA,D为干扰素调节因子7(*Irf7*)mRNA,E为CXC趋化因子配体10(*Cxcl10*)mRNA,F为抗黏液病毒基因1(*Mx1*)mRNA,G为2'-5'-寡聚腺苷酸合成酶3(*Oas3*)mRNA,H为信号传导子和转录活化子2(*Stat2*)mRNA,I为NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白6(*Nlrp6*)mRNA,J为核苷酸结合寡聚化域结构蛋白1(*NOD1*)mRNA,K为核苷酸结合寡聚化域结构蛋白2(*NOD2*)mRNA,L为受体相互作用蛋白激酶2(*RIPK2*)mRNA。与Control组相比,\* $P < 0.05$ ;  $n = 5, \bar{x} \pm s$ 。

图9 差异基因表达量分析

0.01), IL-10有上升趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图10。

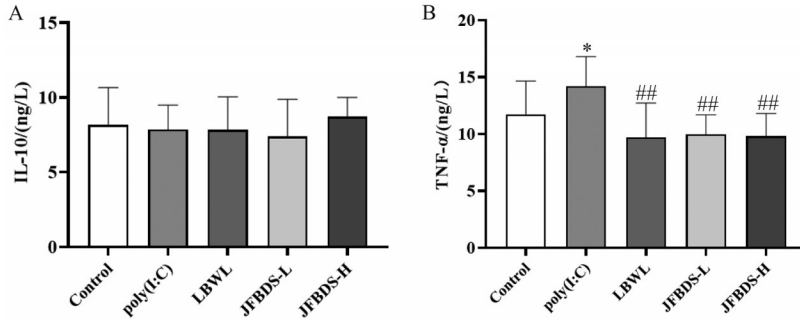
2.2.2 对小鼠肺组织W/D值的影响 结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组小鼠肺组织W/D水平明显升高( $P < 0.05$ ),与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L、JFBDS-H组W/D水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图11。

2.2.3 对小鼠肺组织病理形态影响 结果显示,Control组小鼠肺泡结构完整,支气管周围未见明显的炎症反应;poly(I:C)组小鼠肺组织结构紊乱,肺部水肿,肺泡壁间隔明显增厚,出现炎症损伤;与poly(I:C)

相比,LBWL组、JFBDS-L组、JFBDS-H组小鼠的肺泡损伤及炎症病理改变得到改善。见图12。

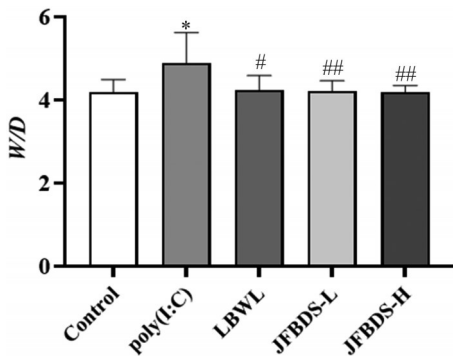
2.3 荆防败毒散对NOD样受体信号通路关键蛋白表达的影响

2.3.1 对小鼠肺组织NOD1和NOD2蛋白表达的影响 结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组小鼠肺组织中的NOD1蛋白表达水平无明显变化( $P > 0.05$ ),NOD2蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ );与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L组、JFBDS-H组中的NOD1蛋白表达水平均无明显变化( $P > 0.05$ ),而NOD2蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.01, P < 0.001$ )。见图13。



注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。A为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量,B为白细胞介素-10(IL-10)含量。与Control相比,\* $P < 0.05$ ;与poly(I:C)相比,## $P < 0.01$ ;  $n = 6 \sim 9, \bar{x} \pm s$ 。

图10 荆防败毒散对拟病毒性呼吸道感染小鼠模型肺泡灌洗液中各指标的影响

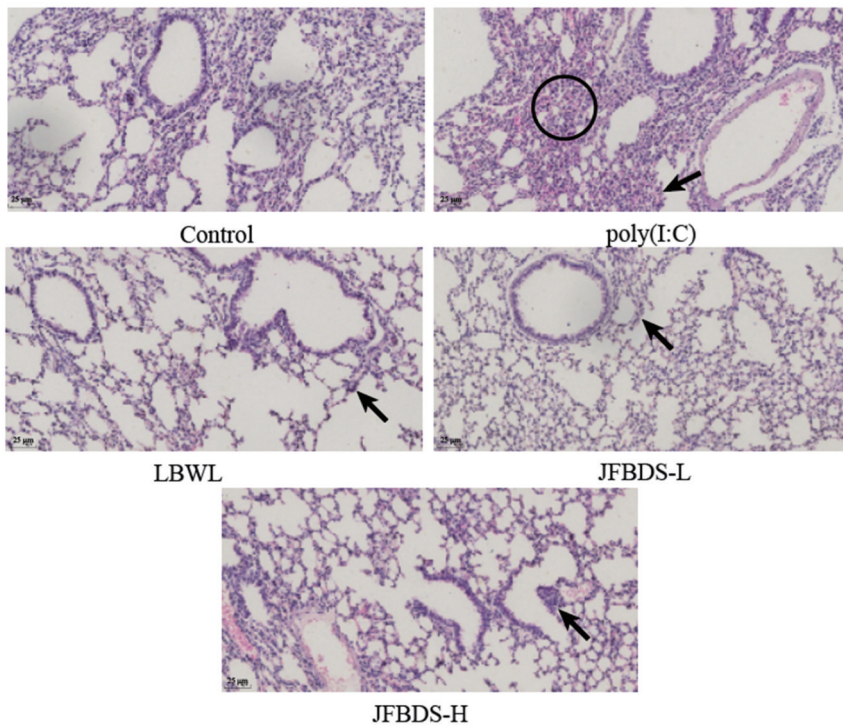


注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。W/D为肺湿质量/干质量比值。与Control组相比,\* $P < 0.05$ ;与poly(I:C)组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ;  $n = 8 \sim 9, \bar{x} \pm s$ 。

图11 各组小鼠肺组织W/D的比较

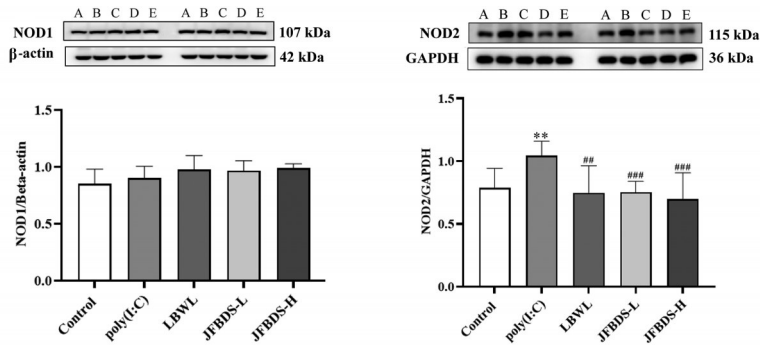
2.3.2 对小鼠肺组织 RIPK2 和 p-RIPK2 蛋白表达的影响 结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组小鼠肺组织中的RIPK2蛋白表达水平无明显变化( $P > 0.05$ ),p-RIPK2蛋白表达水平明显升高( $P < 0.001$ );与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L组、JFBDS-H组中的RIPK2和p-RIPK2蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。见图14。

2.3.3 对小鼠肺组织 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达的影响 结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组小鼠肺组织中的I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平无明显变化( $P > 0.05$ ),p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.001$ );与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L组、JFBDS-H组中的I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平均无明显变化( $P > 0.05$ ),p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.01$ )。见图15。



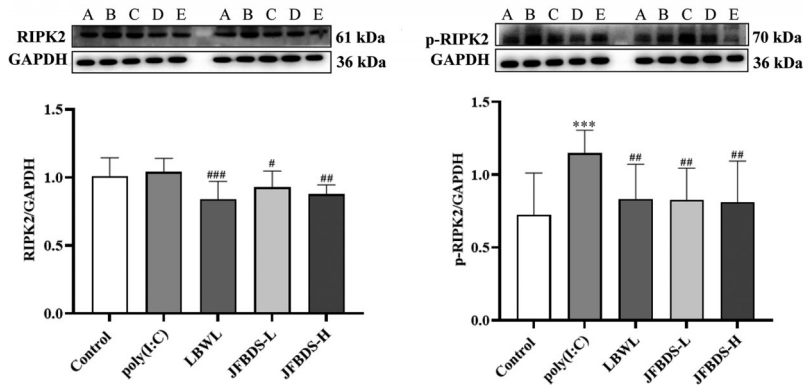
注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。黑色箭头为增厚的肺泡壁和浸润炎症细胞,黑色圈为肺泡腔萎陷。

图12 各组小鼠肺组织病理形态(苏木精-伊红染色, $\times 25$ )



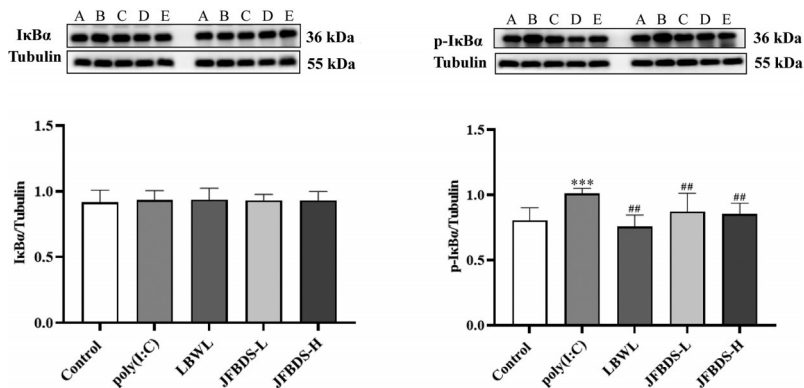
注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。A为对照组,B为模型组,C为利巴韦林组,D为荆防败毒散低剂量组,E为荆防败毒散高剂量组。NOD1为核苷酸结合寡聚化域结构蛋白1,NOD2为核苷酸结合寡聚化域结构蛋白2,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶, $\beta$ -actin为 $\beta$ -肌动蛋白。与Control组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与poly(I:C)组相比,### $P < 0.001$ ;  $n = 9 \sim 11, \bar{x} \pm s$ 。

图13 各组小鼠肺组织NOD1、NOD2蛋白表达的比较(Western blot法)



注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。A为对照组,B为模型组,C为利巴韦林组,D为荆防败毒散低剂量组,E为荆防败毒散高剂量组。RIPK2为受体相互作用蛋白激酶2,p-RIPK2为磷酸化受体相互作用蛋白激酶2,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与Control组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与poly(I:C)组相比,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ ;  $n = 9 \sim 11, \bar{x} \pm s$ 。

图14 各组小鼠肺组织RIPK2、p-RIPK2蛋白表达的比较(Western blot法)



注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。A为对照组,B为模型组,C为利巴韦林组,D为荆防败毒散低剂量组,E为荆防败毒散高剂量组。I $\kappa$ B $\alpha$ 为核因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ ,p-I $\kappa$ B $\alpha$ 为磷酸化核因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ ,Tubulin为微管蛋白。与Control组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与poly(I:C)组相比,## $P < 0.01$ ;  $n = 9 \sim 11, \bar{x} \pm s$ 。

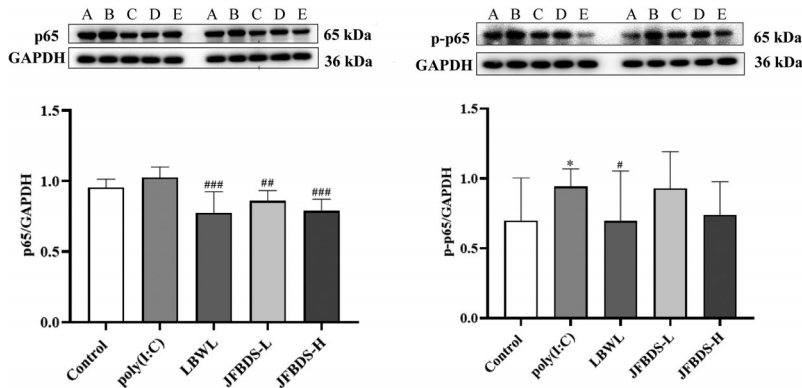
图15 各组小鼠肺组织I $\kappa$ B $\alpha$ 和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达的比较(Western blot法)

2.3.4 对小鼠肺组织 p65 和 p-p65 蛋白表达水平变化结果显示,与Control组相比,poly(I:C)组小鼠肺组织中的p65蛋白表达水平仅有升高的趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而p-p65蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ );与poly(I:C)组相比,LBWL组、JFBDS-L组、JFBDS-H组中的p65蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ ,

$P < 0.001$ ),LBWL组中的p-p65蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。见图16。

### 3 讨论

引起人类VP常见的病毒病原体有多种,包括流感病毒、RSV、冠状病毒等,其多通过飞沫传播、接触传



注:Control为对照组,poly(I:C)为模型组,LBWL为利巴韦林组,JFBDS-L为荆防败毒散低剂量组,JFBDS-H为荆防败毒散高剂量组。A为对照组,B为模型组,C为利巴韦林组,D为荆防败毒散低剂量组,E为荆防败毒散高剂量组。p65为细胞核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)亚基,p-p65为磷酸化细胞核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)亚基,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与Control组相比,\* $P < 0.05$ ;与poly(I:C)组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ ;n=9~11, $\bar{x} \pm s$ 。

图 16 各组小鼠肺组织 p65 和 p-p65 蛋白表达的比较(Western blot 法)

播。研究<sup>[18-19]</sup>表明,人类VP的发生导致肺组织中免疫细胞过度激活,引起炎症因子和炎症介质释放,引发炎症反应,出现细胞因子风暴,激活更多的免疫细胞,进一步可发展为严重的肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS),甚至导致死亡。同时,VP可造成肺水肿、肺组织功能下降及肺上皮细胞屏障破坏等病理生理改变<sup>[20-21]</sup>。目前,poly(I:C)常用于小鼠拟VP模型的复制,诱导动物出现病毒感染的一系列特征。经poly(I:C)滴鼻刺激诱导小鼠拟VP模型后,小鼠肺组织结构紊乱,肺部水肿,肺泡壁间隔明显增厚,炎症细胞浸润进而出现炎症损伤。poly(I:C)诱导小鼠拟VP模型与人类VP表现特征具有较大的相似性,吻合VP的病理生理变化。

3.1 poly(I:C)滴鼻刺激小鼠可较好模拟动物VP的病理变化过程 本研究采用poly(I:C)滴鼻刺激小鼠,对呼吸道局部免疫和全身免疫的变化情况进行了动态考察。结果显示,随着poly(I:C)滴鼻次数的增加,鼻腔灌洗液和肺泡灌洗液中的促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平明显升高,而抗炎细胞因子IL-10的水平逐渐降低,提示poly(I:C)在呼吸道局部诱导了明显的炎症反应。血清中的促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6水平呈逐渐升高趋势,抗炎细胞因子IL-10水平明显降低,从时效变化来看,全身炎症反应迟于呼吸道局部反应。其中,TNF- $\alpha$ 是poly(I:C)刺激后鼻腔灌洗液和肺泡灌洗液中变化最明显的指标。TNF- $\alpha$ 主要是由活化的单核/巨噬细胞产生,是重要的促炎性细胞因子,参与介导机体的急、慢性炎症过程<sup>[22-23]</sup>。IFN- $\gamma$ 可由T淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK)产生,IFN- $\gamma$ 可直接或通过活化 $\alpha$ 干扰素基因(IFN- $\alpha$ )和 $\beta$ 干扰素基因(IFN- $\beta$ ),发挥抗病毒的作用,其不仅仅是抗病毒剂,更是免疫系统的多功能哨兵<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,采用poly(I:C)刺激小鼠3 d、5 d时,鼻腔灌洗液中的IFN- $\gamma$ 水平随之增加,说明

poly(I:C)对IFN- $\gamma$ 的分泌具有促进作用,以及可激活巨噬细胞、中性粒细胞并使其在炎症部位聚集,进而释放大量的促炎性细胞因子。IL-6作为一种重要的炎症因子,与免疫炎症反应密切相关,可通过检测IL-6水平来衡量机体的损伤和炎症程度,作为判断感染的指标之一。在本研究的3个时间点(1 d、3 d、5 d)中,呼吸道局部IL-6水平均无明显变化,仅在血清中于poly(I:C)刺激5 d时IL-6水平明显升高,提示poly(I:C)刺激造成IL-6释放需要的时间相对较长,也标志着炎症反应已蔓延至全身。

小鼠肺组织病理形态和W/D值分析结果显示,poly(I:C)滴鼻刺激1 d、3 d、5 d时肺泡壁间隔出现了明显增厚及肺间质水肿,肺组织结构紊乱,毛细血管扩张;随着刺激时间的增加,肺泡壁间隔出现了不同程度的增厚,poly(I:C)滴鼻5 d造成的损伤较为严重,其中肺组织的W/D值及病理能客观反映毛细血管通透性的程度,同时也是反映肺水肿的重要指标,且根据肺水肿程度的大小能反映出poly(I:C)对肺组织造成损伤的严重程度<sup>[25]</sup>。基于上述研究结果,表明poly(I:C)滴鼻刺激3 d、5 d可诱导小鼠拟VP,造成局部上呼吸道和肺部损害、炎症因子过度表达,而全身的炎症反应还不明显。综上所述,poly(I:C)滴鼻刺激小鼠可较好地模拟病毒刺激动物后出现的肺组织病理变化及呼吸道局部和全身炎症反应的病理变化过程。

3.2 poly(I:C)滴鼻刺激诱导小鼠拟VP的主要病理学机制 根据poly(I:C)刺激后呼吸道局部免疫和全身免疫的变化情况,本研究选择poly(I:C)滴鼻刺激3 d作为观察点,采用转录组测序方法,研究了该时间点的小鼠肺组织病理损伤机制。结果显示,Control组和poly(I:C)组共有580个差异表达基因,其中有543个上调基因,37个下调基因,这些基因可能在poly(I:C)诱导拟VP中起着重要的作用。BP主要富集于防御应答、免疫反

应、免疫系统过程等 5 426 个项;CC 主要富集于胞外区、MHC I 类肽负载复合体等 575 个项;MF 主要富集于 TAP 结合蛋白、趋化因子受体结合等 962 个项,并且主要参与 NOD 样受体通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路等的表达。从 PPI 网络图中可以得出 *Tnf*、*Ifng*、*Irf7*、*Mx1* 等是与小鼠 VP 相关度较大的基因。*Irf7* 属于干扰素调节因子家族的一员,可通过诱导干扰素的产生,从而诱导机体发挥抗病毒的作用<sup>[26]</sup>。*Ifng* 是 II 型干扰素的一个成员,主要通过激活巨噬细胞、单核细胞和 Th1 细胞来抵抗病毒感染, $\gamma$  干扰素受体 1 (IFN- $\gamma$ R1) 为 *Ifng* 的受体,它们相结合后能够发挥清除病毒的作用<sup>[27]</sup>。*Mx1* 是最早发现的干扰素诱导的抗病毒基因之一,是由 I 型干扰素诱导宿主细胞所产生的抗病毒蛋白中的一类,具有广泛的抗病毒作用,能够抑制病毒的复制<sup>[28]</sup>。这些关键基因提示 poly(I:C) 通过影响干扰素调节因子、细胞因子、抗病毒基因等来诱导小鼠拟 VP。

通过对 Control 组和 poly(I:C) 组的差异表达基因以及 KEGG 信号通路分析,本研究发现差异表达基因发生了以 NOD 样受体信号通路激活为特征的功能转变,poly(I:C) 引起 NOD 样受体信号通路中 *Nlrp6*、*Stat1*、*Stat2*、*Irf9*、*Tnf*、*NOD2*、*RIPK2* 等 26 个基因显著上调。NOD 样受体 (NLRs) 是位于细胞质内的核苷酸结合和寡聚化结构域的一类模式识别受体,在先天免疫反应中起着重要的作用。目前,已知的 NOD 蛋白家族成员有 20 余种,其中尤为重要是 NOD1 和 NOD2<sup>[29]</sup>。NOD1 识别  $\gamma$ -D-谷氨酰-内消旋-二氨基庚二酸 (iE-DAP),这是一种仅在革兰氏阴性菌中发现的肽聚糖成分<sup>[30]</sup>。NOD2 识别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的胞壁酰二肽 (MDP)。NOD1 和 NOD2 都能激活核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路,该通路在调节宿主免疫反应中起着重要作用。具体而言,胞质肽聚糖配体的识别允许 NOD1/NOD2 与常见的下游衔接分子受体相互作用蛋白 2 (RIP2) 相互作用,RIP2 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以激活 NF- $\kappa$ B<sup>[31]</sup> 和 MAPK 信号通路<sup>[32]</sup>。激活的 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 可以移动到细胞核并增强促炎性细胞因子的转录<sup>[33]</sup>。与 NOD1/NOD2 相反,含 NLR 家族 CARD 域蛋白 3 (NLRC3) 和 NLRP2/4 通过修饰 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 充当 NF- $\kappa$ B 途径的负性调节因子<sup>[34]</sup>。NOD2 还可以感应病毒单链核糖核酸 (ssRNA),通过诱导干扰素在抗病毒免疫反应中发挥作用,NOD2 被进入细胞内的病毒 ssRNA 激活后转位至线粒体,与线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS) 相互作用,然后激活机体干扰素的产生和抗病毒防御作用<sup>[35-36]</sup>。炎性失调是肺损伤发生发展过程中的主要特征,NOD 样受体信号通路过度激活后,可调节其下游 NF- $\kappa$ B 信号通路中的蛋白,分泌多种

细胞因子,NF- $\kappa$ B 家族成员形成各种异源二聚体或者同源二聚体,并通过与启动子的  $\kappa$ B 位点结合来激活大量基因,从而增加了促炎性细胞因子的表达,增加了流感或其他病毒感染后继发细菌感染的风险,促进了肺损伤的发病进程<sup>[37-38]</sup>。综上所述,poly(I:C) 模拟病毒性肺炎的病理学机制主要是 NOD 样受体信号通路的激活。

3.3 荆防败毒散减轻小鼠拟病毒性肺炎模型肺损伤的作用及机制 利用 poly(I:C) 滴鼻刺激小鼠拟 VP 模型,本研究考察了常用于治疗呼吸道感染的经典名方荆防败毒散对 VP 的作用。结果显示,与 Control 组相比,poly(I:C) 组肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  表达升高,IL-10 表达无明显变化。当给予荆防败毒散干预后,肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  表达明显降低,IL-10 表达呈上升趋势,表明荆防败毒散能抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  表达,并促进抗炎细胞因子 IL-10 的表达,从而减轻炎症。小鼠肺组织病理形态和肺组织 W/D 值结果表明,poly(I:C) 组小鼠肺组织结构紊乱,肺部水肿,肺泡壁间隔明显增厚,出现炎症损伤;给予荆防败毒散干预后,减轻了肺水肿,改善了肺泡壁间隔增厚、肺组织结构紊乱、红细胞浸润和间质水肿等病理现象。机制研究结果表明,给予荆防败毒散干预后 NOD2、RIPK2、p-RIPK2、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白的表达水平均降低,说明荆防败毒散可以通过降低 NOD 样受体信号通路关键蛋白的表达而发挥减轻小鼠病毒性呼吸道感染所致肺损伤的作用。

上述实验结果表明,poly(I:C) 滴鼻 3 d 刺激小鼠可较好地模拟病毒性呼吸道感染,本研究成功构建了小鼠拟 VP 模型;从基因转录水平初步揭示了 poly(I:C) 刺激模拟 VP 模型的病理学机制主要涉及 NOD 样受体信号通路的过度激活。荆防败毒散干预小鼠拟 VP 模型后,可明显抑制炎症因子的释放,减轻呼吸道局部和肺部的损伤,降低 NOD 样受体信号通路关键蛋白的表达进而发挥对 poly(I:C) 诱导小鼠呼吸道感染肺损伤的保护作用。故本研究探讨了荆防败毒散对 poly(I:C) 滴鼻刺激诱导小鼠病毒性呼吸道感染所致肺损伤的作用,可为阐明荆防败毒散治疗急性肺损伤的科学内涵奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 武先奎. 扶正解毒化痰方及有效部位干预 RSV 肺炎小鼠的作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [2] KAGOYA R, TOMA-HIRANO M, YAMAGISHI J, et al. Immunological status of the olfactory bulb in a murine model of Toll-like receptor 3-mediated upper respiratory tract inflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 13.
- [3] QUISPE-LAIME A M, BRACCO J D, BARBERIO P A, et al. H1N1 influenza A virus-associated acute lung injury: response to

- combination oseltamivir and prolonged corticosteroid treatment [J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36(1): 33-41.
- [4] RIVERA-BENITEZ J F, DE LA LUZ-ARMENDARIZ J, SAAVEDRA-MONTANEZ M, et al. Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus[J]. *Vet Microbiol*, 2016, 184: 31-39.
- [5] KIPPER S, HAMAD S, CALY L, et al. New host factors important for respiratory syncytial virus (RSV) replication revealed by a novel microfluidics screen for interactors of matrix (M) protein[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(3): 532-543.
- [6] NG Q, HE F, KWANG J. Recent progress towards novel EV71 anti-therapeutics and vaccines[J]. *Viruses*, 2015, 7(12): 6441-6457.
- [7] DANDRI M, PETERSEN J. Animal models of HBV infection[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 273-279.
- [8] CHOI J P, KIM Y S, TSE Y M, et al. A viral PAMP double-stranded RNA induces allergen-specific Th17 cell response in the airways which is dependent on VEGF and IL-6[J]. *Allergy*, 2010, 65(10): 1322-1330.
- [9] MATSUMOTO M, SEYA T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C) [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(7): 805-812.
- [10] CHEN F, QU F, JIA Y U, et al. Xiao-Chai-Hu decoction ameliorates poly (I:C)-induced viral pneumonia through inhibiting inflammatory response and modulating serum metabolism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1240242.
- [11] CUI J, GAO J, LI Y, et al. Andrographolide sulfate inhibited NF- $\kappa$ B activation and alleviated pneumonia induced by poly I:C in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(4): 189-196.
- [12] 胡杰, 屈会化, 赵琰. 辛平之剂荆防败毒散与疫病防治[J]. *中国处方药*, 2021, 19(7): 21-22.
- [13] 赵琰, 胡杰, 张贵民, 等. 荆防败毒散的源流与应用[J]. *环球中医药*, 2020, 13(11): 1996-2002.
- [14] 万亚雄, 侯雯倩, 汪湛东, 等. 基于网络药理学探讨荆防败毒散防治儿童新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2021, 38(5): 27-36.
- [15] 高铭, 丁美灵, 雷紫琴, 等. 荆防败毒散及其中成药制剂研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(5): 112-118.
- [16] 中华中医药学会儿童肺炎协同创新共同体专家组, 国家中医临床研究基地儿科基地重点病种专家组. 《儿童新型冠状病毒感染诊断、治疗及预防专家共识》(第一版)中医治疗部分专家解读[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 1-3.
- [17] 李冀, 贾波. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2014: 38-39.
- [18] HUANG Q, WU X, ZHENG X, et al. Targeting inflammation and cytokine storm in COVID-19[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 105051.
- [19] FAJGENBAUM D C, JUNE C H. Cytokine storm[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255-2273.
- [20] 冰冰, 梁群. 化纤胶囊 II 号方治疗脓毒症急性肺损伤疗效及对患者血管内皮细胞功能、毛细血管渗漏指数的影响[J]. *陕西中医*, 2023, 44(1): 45-49, 50.
- [21] 张润娟, 向永红, 张钦哲, 等. 痰热清联合乌司他丁对脓毒症急性肺损伤病人呼吸功能及氧化应激指标的影响[J]. *安徽医药*, 2024, 28(11): 2291-2296.
- [22] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM2.5 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 33-39.
- [23] 熊程, 赵英政, 陶映君, 等. 壳聚糖对 PM (2.5) 所致小鼠急性肺损伤的干预作用[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(5): 600-605.
- [24] DILLINGER B, AHMADI-ERBER S, LAU M, et al. IFN- $\gamma$  and tumor gangliosides: Implications for the tumor microenvironment[J]. *Cell Immunol*, 2018, 325: 33-40.
- [25] XU N Y, CHU C J, XIA L, et al. Protective effects of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* extract on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(10): 767-775.
- [26] ERSING I, BERNHARDT K, GEWURZ B E. NF- $\kappa$ B and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 [J]. *Viruses*, 2013, 5(6): 1587-1606.
- [27] HE S, WANG B, ZHU X, et al. Association of IFNGR1 and IFNG genetic polymorphisms with the risk for pulmonary tuberculosis in the Chinese Tibetan population [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(58): 98417-98425.
- [28] CIANCANELLI M J, ABEL L, ZHANG S Y, et al. Host genetics of severe influenza: from mouse Mx1 to human IRF7 [J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 38: 109-120.
- [29] GRIEBEL T, MAEKAWA T, PARKER J E. NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(11): 562-570.
- [30] KIM Y K, SHIN J S, NAHM M H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(1): 5-14.
- [31] KOBAYASHI K, INOHARA N, HERNANDEZ L D, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems[J]. *Nature*, 2002, 416(6877): 194-199.
- [32] INOHARA N, OGURA Y, FONTALBA A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5509-5512.
- [33] OGURA Y, BONEN D K, INOHARA N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease[J]. *Nature*, 2001, 411(6837): 603-606.
- [34] SCHNEIDER M, ZIMMERMANN A G, ROBERTS R A, et al. The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- $\kappa$ B[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9): 823-831.
- [35] PASHENKOV M V, DAGIL Y A, PINEGIN B V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 385-400.
- [36] 杨熙, 叶菜英, 朱蕾. NOD2 介导的信号通路及其与自身炎症性疾病关系以及抑制剂研究进展[J]. *药科学报*, 2023, 58(4): 899-908.
- [37] SHIH V F, TSUI R, CALDWELL A, et al. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 86-102.
- [38] XIAO K, HE W, GUAN W, et al. Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- $\kappa$ B and Hedgehog pathways in LPS-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 863.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-09-30