

奥司他韦对肺炎幼鼠 ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴及肺损伤的影响*

黄蕊¹ 翟英辰² 陈煜¹ 林辰曦¹ 陈凌¹ 林兴盛³

(1. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361000; 2. 青岛妇女儿童医院, 山东 青岛 266011; 3. 福建省立金山医院, 福建 福州 350028)

【摘要】目的 研究奥司他韦对肺炎幼鼠 ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴、肺损伤及炎症水平的影响。**方法** SPF 级 SD 雄性幼鼠 50 只随机抽取 12 只作为健康组, 剩余 38 只幼鼠建立流感病毒模型。建模中意外死亡 2 只, 随机数字表法将建模成功的 36 只幼鼠分为模型组、奥司他韦组及对照组, 每组各 12 只。健康组与模型组幼鼠常规饲养, 奥司他韦组幼鼠给予 10 mg/kg 奥司他韦灌胃, 1 次/d, 持续 5 d; 对照组幼鼠经尾静脉注射 75 mg/mL 阿奇霉素, 1 次/d, 持续 1 周。另取 40 只 SPF 级幼鼠建立病毒性肺炎模型后分为激动剂组、抑制剂组、激动剂+奥司他韦组、抑制剂+奥司他韦组, 共诊治 7 d, 1 次/d。ELISA 检测各组 IL-6、IL-8、TNF- α 水平。小动物肺功能检测仪检测各组肺功能指标。HE 染色观察各组肺炎幼鼠肺组织病理形态。TUNEL 检测各组幼鼠肺组织细胞凋亡。免疫印迹检测各组幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、MasR、ACE、Ang II 蛋白表达水平。**结果** 与健康组相比, 模型组、奥司他韦组与对照组幼鼠血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 、肺组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 在经过奥司他韦干预后 IL-6、IL-8、TNF- α 、肺组织细胞凋亡率均降低 ($P < 0.05$)。与健康组相比, 模型组 FEF50、FEF75、MMF、PEF 水平降低 ($P < 0.05$), 肺系数升高 ($P < 0.05$), 在经过奥司他韦干预后 FEF50、FEF75、MMF、PEF 水平升高 ($P < 0.05$), 肺系数降低 ($P < 0.05$)。各组肺组织病理形态对比明显。与健康组相比, 模型组、奥司他韦组、对照组、抑制剂组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组与抑制剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平降低 ($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 奥司他韦组、对照组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高 ($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平降低 ($P < 0.05$), 抑制剂组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平降低 ($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平升高 ($P < 0.05$); 模型组与抑制剂+奥司他韦组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 奥司他韦组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高 ($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平降低 ($P < 0.05$); 奥司他韦组与激动剂组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与奥司他韦组相比, 激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高 ($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** 奥司他韦通过提高 ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴水平及降低炎症因子水平, 改善肺炎幼鼠肺功能。

【关键词】 奥司他韦; 肺炎; ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴; 肺损伤; 炎症水平

【中图分类号】 R-332; R563 **【文献标志码】** A **DOI:** 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 04. 006

Effects of oseltamivir on ACE2/Ang (1-7) /Mas receptor axis, lung injury and inflammation levels in young pneumonia mice

HUANG Rui¹, ZHAI Yingchen², CHEN Yu¹, LIN Chenxi¹, CHEN Ling¹, LIN Xingsheng³

(1. Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian, China;

2. Qingdao Women's and Children's Hospital, Qingdao 266011, Shandong, China;

3. Fujian Jinshan Hospital, Fuzhou 350028, China)

【Abstract】Objective To study the effects of oseltamivir on ACE2/Ang (1-7) /MasR axis, lung injury and inflammation in young mice with pneumonia. **Methods** Fifty SPF male SD pups were purchased from Guangzhou Genio Biotechnology Co., LTD., and 12 of the 50 healthy pups were randomly selected as the healthy group for control. The

基金项目:福建省卫生健康科研人才培养项目(2019-CX-12)

通讯作者:陈凌,副主任医师,E-mail:huangrui202205@163.com

引用本文:黄蕊,翟英辰,陈煜,等.奥司他韦对肺炎幼鼠 ACE2/Ang(1-7)/Mas 受体轴及肺损伤的影响[J].西部医学,2023,35(4):495-500.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 04. 006

remaining 38 mice were modeled with influenza virus, and 2 mice died accidentally during the modeling. The 36 successfully modeled mice were divided into model group, oseltamivir group and control group by random number table method, with 12 mice in each group. Young mice in the healthy group and model group were routinely fed, and the young mice in the oseltamivir group were given 10mg/kg oseltamivir orally, once a day, for 5 days. Rats in control group were injected with azithromycin 75mg/mL once a day for 1 w. **Results** Compared with healthy group, the serum LEVELS of IL-6, IL-8, TNF- α and apoptosis rates in model group, oseltamivir group and control group were increased ($P < 0.05$), and the levels of IL-6, IL-8, TNF- α and apoptosis rates were decreased after oseltamivir intervention ($P < 0.05$). Compared with healthy group, FEF50, FEF75, MMF and PEF levels in model group were decreased ($P < 0.05$), and lung coefficient was increased ($P < 0.05$). After oseltamivir intervention, FEF50, FEF75, MMF and PEF levels were increased ($P < 0.05$), and lung coefficient was decreased ($P < 0.05$). The lung tissue structures of the mice were different. Compared with healthy group, the levels of ACE2, Ang (1-7) and MasR in model group, oseltamivir group, control group, inhibitor group, agonist group, agonist + oseltamivir group and inhibitor + oseltamivir group were decreased ($P < 0.05$), while the levels of ACE and Ang II were increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the levels of ACE2, Ang (1-7) and MasR in oseltamivir group, control group, agonist group and agonist + oseltamivir group were increased ($P < 0.05$), while the levels of ACE and Ang II were decreased ($P < 0.05$). The levels of ACE2, Ang (1-7) and MasR in inhibitor group were decreased ($P < 0.05$). The levels of ACE and Ang II increased ($P < 0.05$). There was no significant difference between model group and inhibitor + oseltamivir group ($P > 0.05$). Compared with control group, the levels of ACE2, Ang (1-7) and MasR in oseltamivir group, agonist group and agonist + oseltamivir group were increased ($P < 0.05$), while the levels of ACE and Ang II were decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between oseltamivir group and agonist group ($P > 0.05$). Compared with oseltamivir group, the levels of ACE2, Ang (1-7) and MasR in agonist + oseltamivir group were increased ($P < 0.05$), while the levels of ACE and Ang II were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Oseltamivir improves lung function in young pneumonia mice by increasing ACE2 /Ang-(1-7) / Mas receptor axis and decreasing inflammatory factors.

【Key words】 Oseltamivir; Pneumonia; ACE2/Ang (1-7) /Mas receptor axis; Lung injury; Inflammation levels

近年来儿童肺炎发病率逐渐升高^[1],死于肺炎的 5 岁以下儿童占所有肺炎患儿死亡人数的 12%左右,其中由流感病毒所致的肺炎患儿近 40%^[2]。儿童肺炎主要特征是可在所有季节频繁发生,易传染、易变异。奥司他韦是神经氨酸酶抑制剂,可使病毒从宿主细胞分离,从而抑制其传播,控制患者病情发生和发展^[3]。IL-6、IL-8 和 TNF- α 常用于反映肺炎的炎症程度^[4]。血管紧张素转化酶 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)/血管紧张素 [Angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)]/Mas 受体 (Masreceptor, MasR) 轴是新的血管紧张素系统调节途径,ACE2 催化 Ang II 转化 Ang(1-7),催化 AngI 转化 Ang(1-9),Ang(1-9) 通过 ACE 转化为 Ang(1-7),而 ACE2 对 Ang II 的亲合力是 AngI 的 400 倍,因此 ACE2 催化 Ang II 比 AngI 更有效,由此可知 ACE2 主要催化 Ang II 转化为 Ang(1-7)^[5]。Ang(1-7) 通过与 MasR 结合,促使血管疏松,抑制肺泡上皮细胞凋亡,抑制炎症反应。研究显示,ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴对心、肺和肾损伤具有保护作用^[6-8]。另有研究报道 ACE2 对肺纤维化具有保护作用,其表达水平在肺纤维化中降低^[9]。目前有关文献报道 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴在肺炎中的具体作用机制鲜少。因此,本实验研究奥司他韦对肺炎幼

鼠 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴、肺损伤及炎症水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性幼鼠 90 只购自广州吉妮欧生物科技有限公司,许可证号:SCXK(粤)2020-0124,幼鼠鼠龄为 3 周,体质量(11.50 ± 0.50)g,自由饮食、水,适应饲养 1 周后进行实验。本研究已通过我院医学伦理委员会审批(批号:Y20200205)。

1.2 实验试剂与仪器 IL-6、IL-8、TNF- α 试剂盒(武汉赛培生物科技有限公司,货号分别为 SP12279、SP12278、SP12250),小动物肺功能检测仪(广州市科之蓝仪器有限公司,型号:FinePointe™ PFT),奥司他韦(上海脉铂医药科技有限公司,纯度:98%),阿奇霉素(武汉鑫佳灵医药化学有限公司,货号:4456874),苏木素-伊红染色液(南昌雨露实验器材有限公司,货号:ncyl2016120802),TUNEL 工作液(北京百奥莱博科技有限公司,货号:GS0248),ACE2、Ang (1-7)、MasR、ACE、Ang II 一抗(北京义翘神州科技股份有限公司,货号分别为 80031-R001、90025-C01HL、HG18978-UT、206257-T08、10691-H08H),辣根过氧化物酶二抗(上海李记生物科技有限公司,货号:AP31L025)。

1.3 模型建立及分组 于 50 只健康幼鼠中随机抽取 12 只作为健康组。剩余 38 只幼鼠建立流感病毒模型:解冻后接种 H1N1,在 9 日龄鸡胚尿囊腔内培养传代。根据文献^[10],将增毒后的尿囊液按 10 倍稀释至 6 个浓度。40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉幼鼠,将 0.05 mL 病毒接种到鼻腔,观察 2 周。幼鼠发生惊厥、昏迷、严重喘息等提示建模成功。建模中意外死亡 2 只,随机数字表法将建模成功的 36 只幼鼠分为模型组、奥司他韦组及对照组,每组各 12 只。健康组与模型组幼鼠常规饲养,奥司他韦组幼鼠给予 10 mg/kg 奥司他韦灌胃,1 次/d,持续 5 d;对照组幼鼠经尾静脉注射 75 mg/mL 阿奇霉素,1 次/d,持续 1 周。另取 40 只 SPF 级幼鼠建立病毒性肺炎模型后,分为激动剂组(皮下注射 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴激动剂 DIZE15 mg/kg)、抑制剂组(皮下注射 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴抑制剂 A779 200 ng/kg/min)、激动剂+奥司他韦组(在激动剂组的基础上给予奥司他韦)、抑制剂+奥司他韦组(在抑制剂的基础上给予奥司他韦),共治疗 7 d,1 次/d。

1.4 检测指标

1.4.1 酶联免疫法(ELISA)检测奥司他韦对肺炎幼鼠炎症相关炎症因子水平的影响 取各组幼鼠 2 mL 尾部静脉血,800 r/min 离心 5 min,离心半径 10 cm,取上清,按照试剂盒说明检测 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平。在相应孔板中加入 100 μ L 工作液,常规孵育 1.5 h,取出孔板中的液体后加入 100 μ L 生物素抗体工作液,常规孵育 1 h,取出孔板中的液体 PBS 冲洗后加入 100 μ L HRP 酶结合物工作液,常规孵育 0.5 h 取出孔板内液体,PBS 清洗后加入 90 μ L 底物溶液,常规孵育 15 min,加入 50 μ L 终止液,400 nm 波长处检测 OD 值并计算 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平。

1.4.2 检测奥司他韦对肺炎幼鼠肺功能的影响 取各组治疗完毕的幼鼠,麻醉后行气管插管,将幼鼠放在体描箱中与呼吸机相连,加压使幼鼠深呼吸,机械通气后用小动物肺功能检测仪检测肺功能指标:50% 用力呼气流量(FEF50)、75% 用力呼气流量(FEF75)、最大呼气中段流量(MMF)、呼气峰流速值(PEF)。幼鼠麻醉 30 min 后,固定在手术台,取股动脉血于零下 20 $^{\circ}$ C 保存。将幼鼠处死,取肺称质量,计算肺系数。

1.4.3 HE 染色观察奥司他韦对肺炎幼鼠肺组织病理形态的影响 取各组幼鼠,戊巴比妥钠(20 mg/kg)麻醉后处死,取肺组织与多聚甲醛中固定,并于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。取肺组织石蜡组织,二甲苯及酒精脱蜡至水,PBS 清洗后与苏木素中染色 10 min,

PBS 清洗后盐酸酒精分色数秒,PBS 清洗,伊红染色液复染,PBS 清洗,乙醇脱水,二甲苯透明,封片后显微镜下观察病理改变。

1.4.4 TUNEL 检测奥司他韦对肺炎幼鼠肺组织细胞凋亡的影响 取各组大鼠肺组织,石蜡包埋,常规切片。TUNEL 法检测肺组织细胞凋亡情况。各组肺组织脱蜡后蛋白酶 K 消化,PBS 清洗,甲醛固定,Buffer 缓冲液孵育 10 min 后加 rTDT 混合液水浴 1 h。将玻片放入 2 $\times$ SSC 溶液中反应 15 min,后在放入过氧化氢溶液中,加入链霉亲和素溶液室温放置 0.5 h,PBS 清洗后,DAB 显色,封片。记录阳性数并计算细胞凋亡率。

1.4.5 免疫印迹检测奥司他韦对肺炎幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、MasR、ACE、Ang II 蛋白表达的影响 取各组幼鼠肺组织剪碎、研磨,裂解后匀浆,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜上,脂奶粉封闭 1 h,加入 ACE2、Ang(1-7)、MasR、ACE、Ang II 一抗(1:200)孵育过夜,加入辣根过氧化物酶二抗(1:500)孵育 1 h,PBS 清洗,DAB 显色后拍照,Image 软件分析。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;若 $P < 0.05$,采用 SNK- q 法进行两组间对比。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 奥司他韦对肺炎幼鼠炎症水平的影响 与健康组相比,模型组、奥司他韦组与对照组幼鼠血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 水平升高($P < 0.05$);与模型组相比,奥司他韦组与对照组 IL-6、IL-8、TNF- α 水平降低($P < 0.05$);奥司他韦组 IL-6、IL-8、TNF- α 水平低于对照组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组幼鼠 IL-6、IL-8、TNF- α 水平对比($\bar{x} \pm s$,pg/mL)
Table 1 Comparison of IL-6, IL-8, TNF- α

组别	<i>n</i>	IL-6	IL-8	TNF- α
健康组	12	48.52 $\pm$ 4.17	102.48 $\pm$ 3.35	67.85 $\pm$ 7.26
模型组	12	119.68 $\pm$ 9.13 ^①	241.72 $\pm$ 2.41 ^①	204.39 $\pm$ 10.74 ^①
奥司他韦组	12	60.08 $\pm$ 7.22 ^{②③}	118.65 $\pm$ 7.36 ^{②③}	79.92 $\pm$ 5.64 ^{②③}
对照组	12	74.35 $\pm$ 6.19 ^{②③}	135.28 $\pm$ 5.59 ^{②③}	126.47 $\pm$ 8.42 ^{②③}
<i>F</i>		244.300	1854.000	678.900
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康组相比,① $P < 0.05$;与模型组相比,② $P < 0.05$;与奥司他韦组相比,③ $P < 0.05$ 。

2.2 奥司他韦对肺炎幼鼠肺功能的影响 与健康组相比,模型组 FEF50、FEF75、MMF、PEF 水平降低($P < 0.05$),肺系数升高($P < 0.05$);与模型组相比,奥

司他韦组与对照组 FEF50、FEF75、MMF、PEF 水平升高($P<0.05$),肺系数降低($P<0.05$);与奥司他韦

组相比,对照组 FEF50、FEF75、MMF、PEF 水平降低($P<0.05$),肺系数升高($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组幼鼠肺功能相关指标水平对比($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of lung function related indexes in each group

组别	n	FEF50(mL/s)	FEF75(mL/s)	MMF(mL/s)	PEF(L/s)	肺系数(%)
健康组	12	40.25±4.13	42.38±4.76	30.11±1.25	40.85±2.13	2.54±0.41
模型组	12	24.23±2.45 ^①	20.18±2.74 ^①	28.43±4.12 ^①	28.62±2.45 ^①	4.62±0.58 ^①
奥司他韦组	12	36.46±3.47 ^{①②}	37.85±3.12 ^{①②}	35.12±3.71 ^{①②}	36.22±1.31 ^{①②}	3.15±0.32 ^{①②}
对照组	12	27.38±2.29 ^{①②③}	26.71±2.35 ^{①②③}	31.62±3.28 ^{①②③}	31.47±1.26 ^{①②③}	3.94±0.47 ^{①②③}
F		67.280	109.000	9.047	172.800	47.87
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康组相比,① $P<0.05$;与模型组相比,② $P<0.05$;与奥司他韦组相比,③ $P<0.05$ 。

2.3 奥司他韦对肺炎幼鼠肺组织病理形态的影响

健康组幼鼠肺部组织结构完整(图 1A);模型组幼鼠肺泡细胞壁变宽,有水肿产生且肺泡间隔增加,有大量炎性及淋巴细胞浸润,纤维结缔组织增生(图 1B);与模型组相比,奥司他韦组(图 1C)与对照组(图 1D)幼鼠炎性细胞浸润明显减少,支气管平滑肌厚度降低。

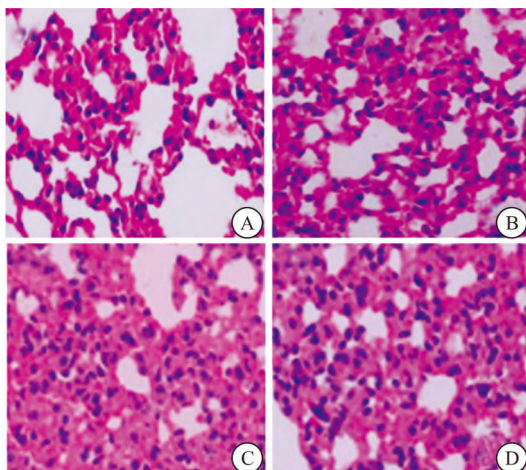


图 1 各组幼鼠肺组织病理形态对比(HE 染色, 200×)

Figure 1 Comparison of pathological morphology of lung tissue in each group

注:A.健康组;B.模型组;C.奥司他韦组;D.对照组。

2.4 奥司他韦对肺炎幼鼠肺组织细胞凋亡的影响

与健康组相比,模型组、奥司他韦组与对照组幼鼠肺组织细胞凋亡率增加($P<0.05$);与模型组相比,奥司他韦组与对照组细胞凋亡率降低($P<0.05$);奥司他韦组细胞凋亡率较对照组降低($P<0.05$),见图 2、3。

2.5 奥司他韦对肺炎幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、MasR、ACE、Ang II 蛋白表达的影响

与健康组相比,模型组、奥司他韦组、对照组、抑制剂组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组与抑制剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、

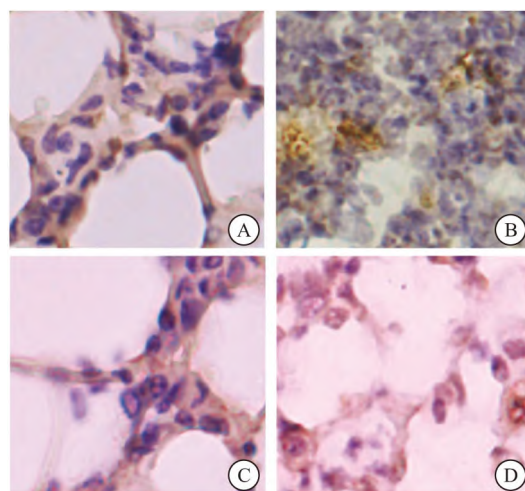


图 2 各组幼鼠肺组织细胞凋亡率对比(TUNEL 染色, 200×)

Figure 2 Comparison of apoptosis rate of lung tissue cells in each group

注:A.健康组;B.模型组;C.奥司他韦组;D.对照组。

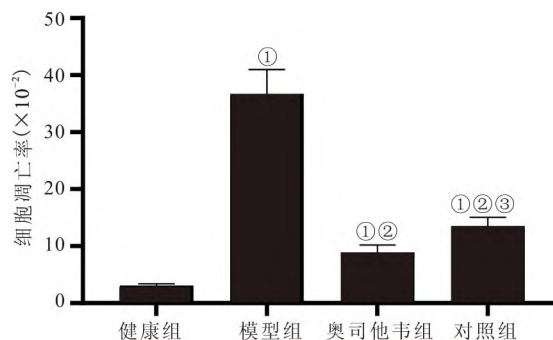


图 3 各组幼鼠肺组织细胞凋亡率对比

Figure 3 Comparison of apoptosis rate of lung tissue cells in each group

注:与健康组相比,① $P<0.05$,与模型组相比,② $P<0.05$,与奥司他韦组相比,③ $P<0.05$ 。

MasR 水平降低($P<0.05$),ACE、Ang II 水平升高($P<0.05$);与模型组相比,奥司他韦组、对照组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高($P<0.05$),ACE、Ang II 水平降低($P<0.05$),抑制剂组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平降低

($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平升高($P < 0.05$); 模型组与抑制剂+奥司他韦组各指标对比差异无统计学意义($P > 0.05$); 与对照组相比, 奥司他韦组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平降低($P < 0.05$); 奥司他韦组与激动剂组各指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 与奥司他韦组相比, 激动剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高($P < 0.05$), ACE、Ang II 水平降低($P < 0.05$), 见图 4、表 3。

表 3 各组幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、MasR、ACE、Ang II 蛋白水平对比($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of ACE2, Ang(1-7), MasR, ACE, Ang II protein levels

组别	n	ACE2	Ang(1-7)	MasR	ACE	Ang II
健康组	12	2.57±0.28	2.64±0.31	2.61±0.34	0.75±0.06	0.83±0.07
模型组	12	0.67±0.05 ^①	0.71±0.06 ^①	0.69±0.07 ^①	2.68±0.29 ^①	2.74±0.32 ^①
奥司他韦组	12	1.93±0.26 ^{②③}	2.04±0.27 ^{②③}	1.96±0.24 ^{②③}	1.24±0.25 ^{②③}	1.29±0.17 ^{②③}
对照组	12	1.81±0.17 ^{①②③}	1.88±0.23 ^{①②③}	1.85±0.20 ^{①②③}	1.37±0.24 ^{①②③}	1.40±0.18 ^{①②③}
抑制剂组	10	0.54±0.03 ^{①②③④}	0.63±0.04 ^{①②③④}	0.58±0.06 ^{①②③④}	2.77±0.31 ^{①②③④}	2.85±0.33 ^{①②③④}
激动剂组	10	1.95±0.27 ^{①②④⑤}	2.07±0.26 ^{①②④⑤}	1.98±0.25 ^{①②④⑤}	1.21±0.26 ^{①②④⑤}	1.26±0.19 ^{①②④⑤}
激动剂+奥司他韦组	10	2.22±0.28 ^{①②③④⑤⑥}	2.29±0.32 ^{①②③④⑤⑥}	2.26±0.35 ^{①②③④⑤⑥}	0.98±0.07 ^{①②③④⑤⑥}	1.03±0.16 ^{①②③④⑤⑥}
抑制剂+奥司他韦组	10	0.65±0.06 ^{①③④⑤⑥⑦}	0.73±0.08 ^{①③④⑤⑥⑦}	0.72±0.07 ^{①③④⑤⑥⑦}	2.70±0.27 ^{①③④⑤⑥⑦}	2.76±0.31 ^{①③④⑤⑥⑦}
F		166.000	138.700	133.700	141.600	149.900
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康组相比,① $P < 0.05$;与模型组相比,② $P < 0.05$;与奥司他韦组相比,③ $P < 0.05$;与对照组相比,④ $P < 0.05$;与抑制剂组相比,⑤ $P < 0.05$;与激动剂组相比,⑥ $P < 0.05$;与激动剂+奥司他韦组相比,⑦ $P < 0.05$ 。

3 讨论

幼儿流感病毒肺炎病情持续发展后,患儿出现呼吸频率增加等症状,未及时治疗,将进一步感染,加重病情。奥司他韦可抑制流感病毒表面神经氨酸酶活性,防止病毒释放以及入侵周围细胞,对患儿具有显著疗效。目前阿奇霉素已广泛应用于临床,因此本研究运用阿奇霉素作为药物对照,进一步证实奥司他韦对肺炎幼鼠的治疗作用。研究显示,奥司他韦很容易被肠道吸收,更利其作用于肺部、支气管和肺泡等病毒感染处^[11]。本研究显示,给予奥司他韦干预后 FEF50、FEF75、MMF、PEF 升高,肺系数降低,提示奥司他韦可有效改善肺炎幼鼠的肺功能。另外, TUNEL 及 HE 染色结果显示,给予奥司他韦治疗后肺组织细胞凋亡率降低,肺炎幼鼠病理形态有所改善,炎性细胞浸润明显降低,进一步促进肺功能恢复。许斌等^[12]对流感病毒肺炎幼鼠的研究显示,奥司他韦的促肺功能恢复的作用被证实。

流感病毒进入机体后会使得炎症水平增加。研究表明,IL-6、IL-8、TNF- α 异常高表达与肺炎的产生及发展联系密切^[13]。在肺炎产生时,T 细胞等分泌 IL-6 增加,IL-6 水平升高,炎症损伤加重,形成恶性循环。IL-8 是前炎症介质,在肺炎中异常高表达。肺炎产生后,机体内会产生大量 TNF- α ,增加炎症水平,促进炎

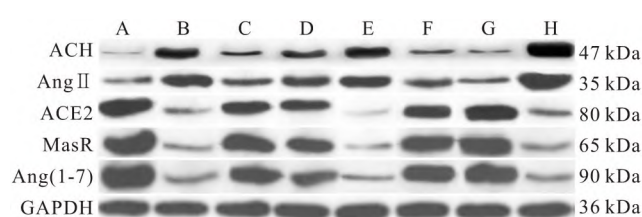


图 4 各组幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、Mas、ACE、Ang II 蛋白水平对比
Figure 4 Comparison of ACE2, Ang(1-7), Mas, ACE, Ang II protein levels
注:A.健康组;B.模型组;C.奥司他韦组;D.对照组;E.抑制剂组;F.激动剂组;G.激动剂+奥司他韦组;H.抑制剂+奥司他韦组。

症损伤。本实验结果显示,肺炎幼鼠 IL-6、IL-8、TNF- α 水平较健康幼鼠显著增加,在经过奥司他韦治疗后,上述炎症因子水平显著降低,提示奥司他韦发挥了抗炎作用,从而减轻炎症对幼鼠的损伤。陈永宏等^[14]在对肺炎的研究中提出,奥司他韦可抑制 IL-6、TNF- α 等炎症因子水平。本研究与上述研究结果相似。

当流感病毒进入呼吸道时,首先通过棘突糖蛋白与表达 ACE2 的 II 型肺泡上皮细胞表面 ACE2 结合,然后进入宿主细胞,细胞内吞作用使得 ACE2 水平降低,从而导致 ACE2 与 ACE 表达失衡,ACE2 水平降低,导致尤其转化的 Ang(1-7)表达降低,从而致使 Ang(1-7)与 MasR 结合后发挥的抗肺泡细胞凋亡、抗纤维化、抗炎等作用被削减^[15-16]。另外 ACE2 水平降低,Ang II 水平便会增加,促进炎症、纤维化等的发展,导致多器官病变、衰竭等^[17]。本实验结果显示,模型组幼鼠 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平降低,ACE、Ang II 水平升高,在经过奥司他韦干预后 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高,ACE、Ang II 水平降低。为了进一步证实奥司他韦可调控 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴,本研究另设立该轴的抑制剂组、激动剂组、激动剂+奥司他韦组与抑制剂+奥司他韦组,结果显示激动剂+奥司他韦组可进一步提高 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平,降低 ACE、Ang II 水平,与抑制剂组相比,抑制

剂+奥司他韦组 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平升高, ACE、Ang II 水平降低, 提示奥司他韦可逆转由 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴抑制剂所降低的 ACE2、Ang(1-7)、MasR 水平以及升高的 ACE、Ang II 水平。何诚等^[18]研究提示, 上调 ACE2/Ang-(1-7)/Mas 受体轴的表达可改善中毒大鼠肺损伤。张恒等^[19]在对新冠病毒肺炎的研究中提出, ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴受到抑制可因此机体炎症反应增加、肺上皮细胞凋亡、肺纤维化、靶器官损伤, 甚至会导致急性呼吸窘迫综合征, 提高 ACE2/Ang-(1-7)/Mas 受体轴的水平可改善上述损伤。本研究与上述研究结果相似。

4 结论

奥司他韦通过提高 ACE2/Ang-(1-7)/Mas 受体轴水平及降低炎症因子水平, 改善肺炎幼鼠肺功能。

【参考文献】

- [1] 李静, 杨静容, 李亚兰, 等. 小儿肺炎支原体肺炎血清 CRP PCT 及 ESR 水平与 MPP 病情严重程度的关系[J]. 西部医学, 2021, 33(9):1374-1378.
- [2] 廖芳宇, 黄小娟, 刘斌, 等. 先天性心脏病合并社区获得性肺炎患儿呼吸道病毒及特殊病原体相关分析[J]. 西部医学, 2021, 33(5):701-704, 708.
- [3] 吉亚芬, 郑晓璐, 罗冷, 等. 莲必治注射液联合奥司他韦治疗病毒性肺炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(9):1862-1865.
- [4] KIM D M, KIM Y, SEO J W, *et al.* Enhanced eosinophil-mediated inflammation associated with antibody and complement-dependent pneumonic insults in critical COVID-19[J]. Cell Rep, 2021, 37(1):109798.
- [5] MORGANSTEIN T, HAIDAR Z, TRIVLIDIS J, *et al.* Involvement of the ACE2/Ang-(1-7)/MasR Axis in Pulmonary Fibrosis: Implications for COVID-19[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23):12955.
- [6] 刘亚洋, 李鹤, 汪再舫, 等. 基于 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴探讨益气强心汤对心衰大鼠的作用机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9):43-46.
- [7] 李树民, 王泉鹰, 刘帆, 等. 血管紧张素转换酶 2 激动剂三氮肽减轻小鼠肢体缺血再灌注引发的肺损伤[J]. 生理学报, 2018, 70(2):175-183.
- [8] 金玉杰, 刘圣君, 赵自刚, 等. 肾素-血管紧张素系统在急性肾损伤发病机制中作用的研究进展[J]. 中国全科医学, 2018, 21(2):203-206.
- [9] 许驭, 韩莹. 血管紧张素转化酶 2/血管紧张素(1-7)信号轴与新型冠状病毒肺炎的关系探究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2020, 40(10):1414-1419.
- [10] 王超, 刘洋, 秦波音, 等. 甲型流感病毒 H1N1 pdm09 与 PR8 感染 C57BL/6 小鼠诱导特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5):561-570.
- [11] KOSITPANTAWONG N, SURASOMBATPATTANA S, SIRIPAITOON P, *et al.* Outcomes of early oseltamivir treatment for hospitalized adult patients with community-acquired influenza pneumonia[J]. PLoS One, 2021, 16(12):e0261411.
- [12] 许斌, 任春梅, 范贵荣, 等. 奥司他韦对流感病毒肺炎模型幼鼠的治疗效果及其对血清免疫球蛋白水平的影响[J]. 重庆医学, 2021, 50(1):17-21.
- [13] TIAN F, CHEN L P, YUAN G, *et al.* Differences of TNF- α , IL-6 and Gal-3 in lobar pneumonia and bronchial pneumonia caused by mycoplasma pneumoniae[J]. Technol Health Care, 2020, 28(6):711-719.
- [14] 陈永宏, 余海燕, 向江琳, 等. 奥司他韦对成人急性重症病毒性肺炎患者 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及免疫功能的影响[J]. 内蒙古医科大学学报, 2020, 42(3):307-310.
- [15] PAN H, HUANG W, WANG Z, *et al.* The ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis Modulates M1/M2 Macrophage Polarization to Relieve CLP-Induced Inflammation via TLR4-Mediated NF- κ B and MAPK Pathways[J]. J Inflamm Res, 2021, 14:2045-2060. doi: 10.2147/JIR.S307801.
- [16] ABDEL-FATTAH M M, ELGENDY ANAM, MOHAMED W R. Xanthone, ACE2 activator, counteracted gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on oxidative stress and ACE2/Ang-(1-7) signaling[J]. Life Sci, 2021, 275:119387. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119387.
- [17] WANG C, REN L, CHEN S, *et al.* Longdan Xiegan Tang attenuates liver injury and hepatic insulin resistance by regulating the angiotensin-converting enzyme 2/Ang (1-7)/Mas axis-mediated anti-inflammatory pathway in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274:114072. doi: 10.1016/j.jep.2021.114072.
- [18] 何诚, 陶宁, 胡建平, 等. 氯沙坦对百草枯中毒致大鼠肺损伤的改善作用及与 ACE2/Ang-(1-7)/Mas 受体轴表达的关系[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(6):572-576.
- [19] 张恒, 王晓, 周旭, 等. 基于 RAS 双轴探讨中药对新型冠状病毒肺炎的干预机制[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8):12-16, 259.

(收稿日期:2022-08-07;修回日期:2023-02-27;编辑:黎仕娟)