

文章编号 1006-8147(2022)01-0065-05

论著

盐酸右美托咪定对脓毒症急性肺损伤小鼠基质金属蛋白酶7抑制作用研究

齐颖, 陈兵

(天津医科大学第二医院 ICU, 天津 300211)

摘要 目的:探讨右美托咪定对脓毒症急性肺损伤(ALI)小鼠基质金属蛋白酶7(MMP7)的抑制作用。方法:制备脓毒症致ALI模型,将昆明小鼠随机分为对照组和ALI组及治疗组,每组32只;损伤组及治疗组腹腔注射大肠杆菌脂多糖10 mg/kg,治疗组在注射脂多糖后给予腹腔注射右美托咪定25 μ g/kg,对照组仅注射等剂量生理盐水,并按损伤时间点分为1、3、5、8 h。到达相应时间点后,待小鼠麻醉完全后从内眦取血,低温离心留取血清备用,待测定血MMP7浓度的变化,留取右肺下叶行苏木素伊红染色,取下的肺组织放置在10%福尔马林溶液中。右肺中叶和上叶组织进行肺组织匀浆提取蛋白,左肺组织浸泡在2.5%戊二醛中待行染色。结果:治疗组炎性细胞渗出减少,ALI组肺结构破坏严重,炎性细胞渗出增多;电镜下观察肺血管内皮细胞损伤程度,治疗组血管内皮细胞损伤程度较ALI组减轻;治疗组MMP7血清浓度较ALI组降低,对照组及治疗组血清MMP7浓度均低于ALI组,各组间差异有统计学意义($P < 0.01$);Western结果显示,在损伤3 h时,ALI组MMP7表达较高,治疗组较ALI组相比MMP7表达下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论:右美托咪定在一定程度上能抑制脓毒症ALI小鼠血清MMP7的产生。

关键词 右美托咪定;基质金属蛋白酶;脓毒症;急性肺损伤

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Inhibitory effect of dexmedetomidine on serum matrix metalloproteinase 7 in mice with septic acute lung injury

QI Ying, CHEN Bing

(Department of Critical Care Medicine, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the inhibitory effect of dexmedetomidine on matrix metalloproteinase 7 (MMP7) in mice with septic acute lung injury. **Methods:** The sepsis-induced acute lung injury animal model was established, and KM mice were randomly divided into control group, acute lung injury (ALI) group, and treatment group, with 32 mice in each group. The mice in injury group and treatment group were injected *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) 10 mg/kg through intraperitoneal administration, the treatment group was given intraperitoneal injection of dexmedetomidine 25 μ g/kg after lipopolysaccharide injection, and the control group was injected with the same dose of normal saline, and each group were divided into 4 subgroups according to different injury time points: 1 h, 3 h, 5 h, 8 h. After reaching the corresponding time point, when the mice were completely anesthetized, blood was taken from the inner canthus, and the serum was centrifuged at low temperature for reserve, the changes of MMP7 was measured. The lower lobe of the right lung was left for hematoxylin and eosin (HE) staining, and the lung tissue was removed and placed in 10% formalin solution. The middle and upper lobe tissues of the right lung were homogenized to extract protein, and the left lung tissue was immersed in 2.5% glutaraldehyde for electron staining. **Results:** In the treatment group, inflammatory cell exudation decreased, while in the ALI group, lung structure was severely damaged and inflammatory cell exudation increased. The injury of pulmonary vascular endothelial cells was observed by electron microscopy, and the injury degree of vascular endothelial cells in the treatment group was less than that in the ALI group. The serum concentration of MMP7 in the treatment group was lower than that in the ALI group. The concentration of serum MMP7 in control group and treatment group was lower than that in ALI group. There was statistically significant difference among each group ($P < 0.01$). Western blotting showed that the expression of MMP7 was higher in ALI group at 3 h after injury. The expression of MMP7 in the treatment group was lower than that in the ALI group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Dexmedetomidine can suppress the expression of serum MMP7 in mouse model of ALI caused by sepsis to a certain extent.

Key words dexmedetomidine; matrix metalloproteinases; sepsis; acute lung injury

脓毒症是重症医学科常见病,病死率较高且预后差,临床常见的感染源是肺部感染,此外有腹腔感染及泌尿系统等感染。脓毒症常累及呼吸系统,在机械通气患者中治疗效果欠佳,存在院内感染的高风险,适度的镇静、镇痛可有效缓解患者痛苦及焦虑,该类患者病情进展迅速常合并急性肺损伤(acute lung injury, ALI)甚至急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),即使康复后部分患者也可能出现肺组织纤维化,严重影响生活质量。基质金属蛋白酶(MMP)7是Wnt/ β 连环蛋白的靶基因产物,在脓毒症致ALI/ARDS的早期激活,它可破坏肺组织的正常结构,在部分病例中引起肺纤维化^[1]。右美托咪定是ICU常用的镇静药物,该药对患者呼吸抑制作用弱、无苏醒延迟,恰当应用该药物能减少患者机械通气时间及呼吸机相关性肺炎发生率,该药产生的镇静、镇痛及抗炎作用能减轻肺水肿程度^[2]。其治疗机制可能是通过抗氧化应激、改善巨噬细胞聚集从而抑制炎症因子的释放,起到脏器保护的作用。MMP7在肺损伤早期升高,具有一定程度致纤维化的作用,通过研究该酶在急性肺损伤小鼠的表达水平来进行早期肺损伤的诊断^[3]。本研究建立脓毒症致小鼠ALI模型,通过光镜和电镜下观察肺组织病理改变及检测不同时间点血清MMP7浓度变化,研究右美托咪定对急性肺损伤小鼠的肺保护作用。

1 材料及方法

1.1 材料 实验动物为雄性昆明小鼠,体重20~25g。大肠杆菌脂多糖购自Sigma(血清型055:B5),盐酸右美托咪定注射液(2 ml:0.2 mg)购自扬子江药业集团有限公司,部分试剂由天津医科大学第二医院心脏研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 将96只小鼠随机分为3组,分别为对照组、ALI组、治疗组,每组32只;每组各分为1、3、5、8 h 4个不同的损伤时间点。ALI组及治疗组腹腔注射脂多糖10 mg/kg。对照组注射等剂量生理盐水,治疗组在脂多糖注射结束后半小时经腹腔注射右美托咪定25 μ g/kg。小鼠在注射脂多糖40 min左右出现嗜睡、寒战、呼吸频率增快、进食及饮水减少,部分小鼠并出现腹泻等表现。光镜下观察病理改变,ALI组肺组织肺泡间隔增厚,血细胞及炎性细胞渗出到肺泡腔内,表示造模成功。

1.2.2 标本收集及处理 到达相应的处理时间点,将小鼠麻醉完全后从内眦取血低温3 000 r/min离心15 min保留上清至-20℃冰箱备用。右肺下叶组

织浸泡在10%福尔马林,保存至4℃冰箱,光镜下观察组织病理改变。右肺中上叶进行肺组织匀浆提取蛋白质。左肺组织保存在2.5%戊二醛进行电子染色,在透射电镜下观察肺血管内皮的变化。

1.2.3 Western印迹检测 小鼠肺组织匀浆提取蛋白样本保存于-80℃。提取的蛋白质按照试剂盒进行操作:(1)取20 μ g/孔蛋白质进行10%SDS-PAGE。(2)配胶上样(上层胶5%,下层胶10%)。电泳(上层胶60 V,下层胶120 V)。(3)切所需部分放入1×转膜缓冲液。将PVDF膜也放入转膜缓冲液。(4)取出PVDF膜做标记后,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h。(5)一抗(MMP-7 1:1 000 优宁维, β -actin 1:10 000)4℃孵育过夜。(6)1×TBST洗15 min,重复3次。(7)二抗(1:4 000 联科)室温孵育2 h。(8)1×TBST洗15 min×3次。(9)暗室显影:压片、曝光、显影、定影。(10)分析结果。

1.2.4 血清MMP-7浓度的测定 采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)分别测定损伤1、3、5、8 h血清MMP-7浓度,严格参照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 数据由SPSS21.0及Graphpad prism7、ImageJ软件进行分析及作图。正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

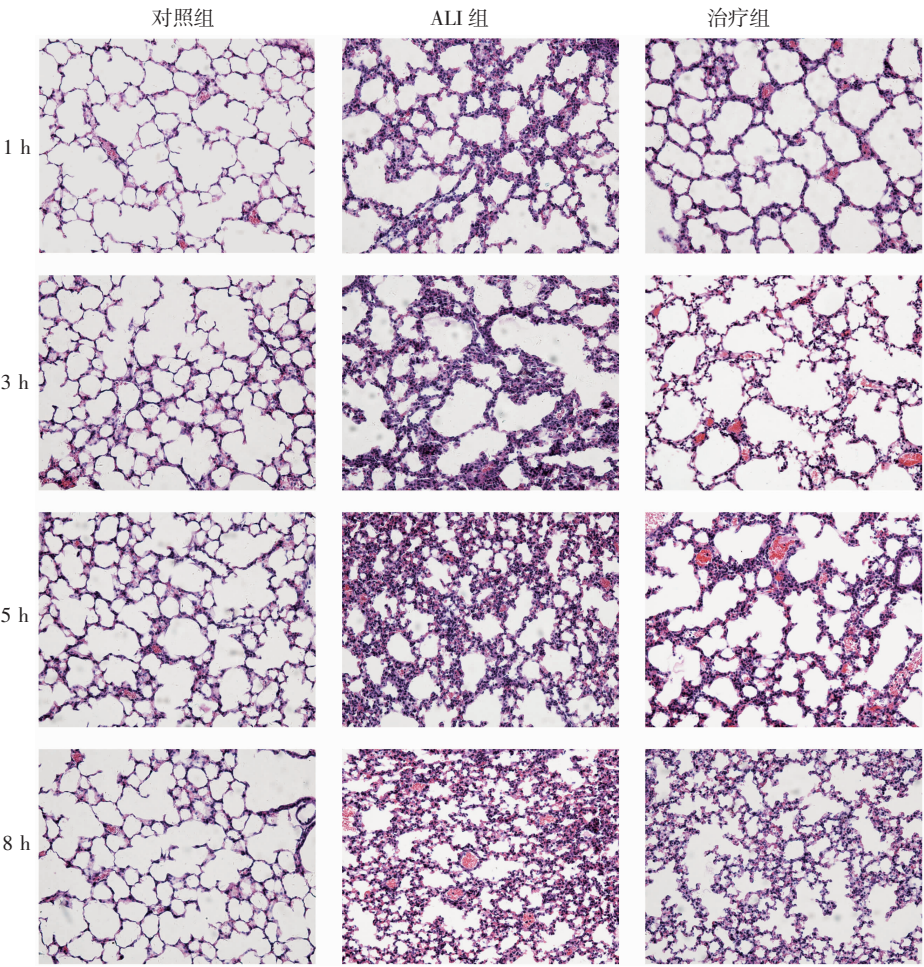
2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理改变 对照组肺组织结构清晰,肺泡壁无增厚,肺泡腔无液体及血细胞渗出,随着损伤时间的延长,损伤组肺组织的结构逐渐破坏加重,肺泡壁增厚明显,肺泡皱缩,肺泡腔内血细胞渗出,炎性细胞渗出,到损伤5 h时,肺泡的结构几乎塌陷,炎性细胞浸润,甚至形成透明膜。与同时时间点损伤组相比较,治疗组肺组织炎症缓解,炎性细胞渗出减少,肺组织病变程度减轻(图1)。

2.2 不同时间点测定小鼠血清MMP7浓度 治疗组血清MMP-7浓度较同时时间点ALI组降低($P<0.01$)(表1)。

2.3 电镜下观察肺血管内皮细胞的变化 电镜下肺损伤3 h时血管内皮损伤的变化,对照组肺组织血管内皮细胞基质内空泡较少,无细胞的肿胀,基膜相对完整(图2A)。ALI组细胞基质内出现空泡,基膜完整性被破坏(图2B)。治疗组内皮基膜的病变程度较损伤组有所减轻(图2C)。

2.4 Western印迹检测 在损伤3 h时,与对照组相比,ALI组MMP-7的表达水平较高,治疗组MMP-7表达下降($P<0.01$)(图3)。



注:ALI:急性肺损伤

图 1 3 组小鼠在不同时间点肺组织病理结构的改变

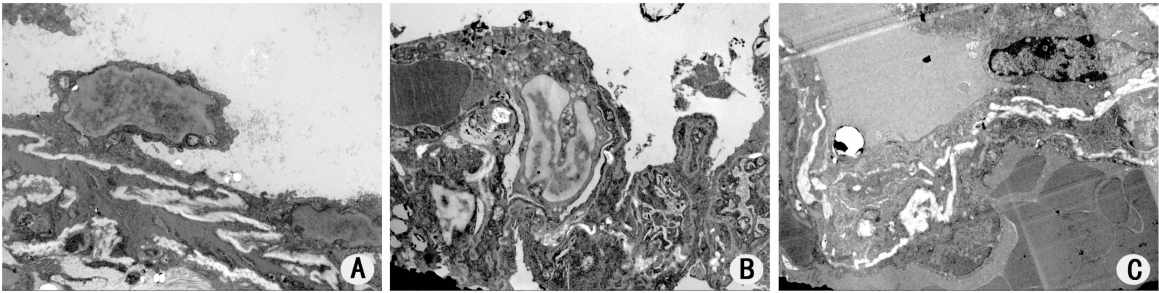
Fig 1 Changes of pathological structure of lung tissue in three groups of mice at different time

表 1 各组不同时间点血清 MMP7 浓度 (pg/mL)

Tab 1 Serum MMP7 concentration at different time in each group (pg/mL)

组别	例数	损伤时间点			
		1 h	3 h	5 h	8 h
对照组	32	178.66±8.34	199.01±16.18	192.66±7.95	189.21±6.68
ALI 组	32	201.03±10.30 ^a	206.51±19.02 ^a	219.91±13.12 ^a	218.59±14.90 ^a
治疗组	32	190.04±8.32 ^{bc}	191.76±13.43 ^c	204.26±13.49 ^{bc}	185.35±10.86 ^{bc}

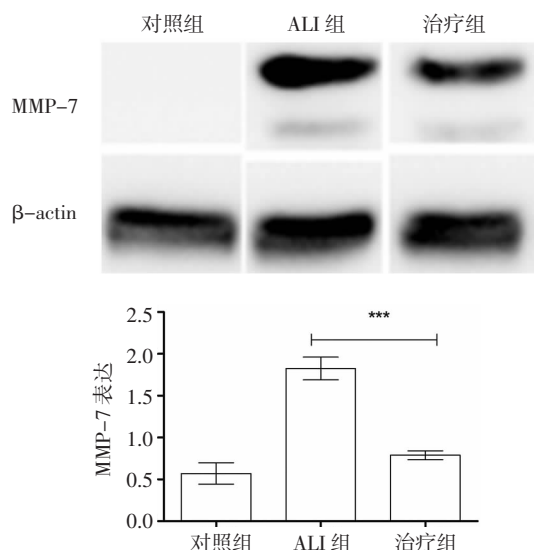
注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.01$;与 ALI 组比较,^c $P<0.01$;ALI:急性肺损伤;MMP7:基质金属蛋白酶 7



注:A:对照组;B:ALI 组;C:治疗组;ALI:急性肺损伤

图 2 电镜下肺血管内皮细胞的改变 (放大倍数 10 000×)

Fig 2 Changes of pulmonary vascular endothelial cells under electron microscope (magnification power 10 000×)



注: *** $P < 0.01$; MMP7: 基质金属蛋白酶 7; ALI: 急性肺损伤

图 3 Western 印迹检测 3 组 MMP-7 蛋白的表达

Fig 3 The expression of MMP-7 protein in three groups by Western blotting

3 讨论

脓毒症急性肺损伤(ALI/ARDS)是ICU的常见危重病,感染、创伤、缺血再灌注、胃内容物吸入呼吸道均可引起肺损伤的发生,引起脓毒症的感染源具有多样性,临床以肺部感染为主,其次为腹腔感染及泌尿系感染等。出现ARDS时预后极差,并且给患者带来较高的治疗费用^[4]。

脓毒症肺损伤发病机制较复杂,通过制备动物模型可再现损伤过程的病理机制,微血管内皮结构及功能的变化在急性肺损伤早期起核心作用,免疫系统会释放大量促炎和抗炎细胞因子,如IL-6、IL-8、IL-1 β 及TNF- α 等因子,循环中高水平的细胞因子可增强对组织器官的损害,内皮屏障破坏后富含蛋白质的液体渗出增加,部分大分子物质也会进入组织间隙和肺泡间隙从而引起肺水肿,有研究表明内皮损伤与中性粒细胞活化有关^[5];此外,内皮细胞能产生内皮素-1、血管紧张素-2及前列环素,它们可调节血管舒张及收缩功能,在肺损伤过程中起到重要作用。通过抑制炎症因子释放、免疫调节治疗可产生脏器保护作用^[6]。

右美托咪定是ICU常用的镇静剂,临床应用中患者的呼吸抑制作用较少,因此也常应用于围术期镇静,适当的镇静、镇痛不仅能使患者克服恐惧心理,还能减少呼吸机的使用时间,改善患者预后^[7]。右美托咪定作用于蓝斑核,有较高的蛋白结合率,容易穿过血-脑屏障,通过激活中枢神经系统和外周脊髓的 α_2 肾上腺素能受体而产生镇静和镇痛及抗交感作用,可抑制氧化作用及抑制细胞凋亡。研究

表明它能一定程度缓解脓毒症肺损伤的炎症反应。其机制可能是通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)活化,减轻TNF- α 等炎症因子的释放^[8],减轻肺脏炎症渗出的程度,延长小鼠的生存时间。应用右美托咪定的抗炎机制可能是通过Toll样受体4(TLR4)起作用,也有学者研究发现右美托咪定可改善线粒体功能从而抑制神经细胞凋亡^[11],可能和改善线粒体通透性相关,该药物能抑制下游炎症细胞因子的产生,对脏器产生保护作用,也能降低心肌缺血的并发症^[12]。

MMP是含锌的内肽酶家族。目前已研究出的有23种不同的MMP,这些酶作为无活性的前体形式进行分泌,需要激活才能形成有功能性活性酶^[9]。有学者研究发现在健康组织中,MMP活性常较低,在病理情况下如炎症、肺纤维化时该酶会升高。在一项比格犬特发性肺纤维化的实验研究中^[10],研究者发现MMP高表达,能破坏细胞间的机制及细胞间的连接,其作用可导致早期的肺纤维化,给临床治疗带来极大的困难,因此预防早期肺脏的纤维化有很必要的作用。通过测定循环中MMP7的表达可早期识别肺损伤并且进行早期干预^[13],早期观察到血管内皮损伤,采取恰当的治疗措施改善患者预后。MMPs的过度表达导致肺组织损伤和重塑,如果能抑制MMPs表达则可能作为治疗ALI/ARDS的一种新的潜在方法^[14]。右美托咪定能一定程度抑制MMP7的表达,但具体机制尚需进一步的实验证实^[15]。

本实验中,治疗组小鼠血清MMP7表达降低,光镜下观察肺组织炎性渗出较对照组减少,电镜观察肺血管内皮细胞损伤程度减轻,表明在脓毒症急性肺损伤早期给以右美托咪定治疗后,能够抑制炎症因子的释放,减轻肺血管内皮损伤,有效抑制肺纤维化进展。

综上所述,右美托咪定降低脓毒症急性肺损伤MMP7表达,抑制炎症因子释放,对血管内皮细胞起保护作用。对于脓毒症急性肺损伤的治疗具有一定指导意义。但右美托咪定抑制MMP7产生的机制尚不明确,动物实验对于临床治疗的指导意义有待后续进一步探讨。

参考文献:

- [1] CABRAL-PACHECO G A, GARZA-VELOZ I, CASTRUITA-DE LA ROSA C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9739.
- [2] GHEIBI S, ALA S, HEYDARI F, et al. Evaluating the effect of dexmedetomidine on hemodynamic status of patients with septic shock admitted to intensive care unit: a single-blind randomized controlled trial[J]. *Iran J Pharm Res*, 2020, 19(4): 255-263.

(下转第 80 页)

前,且表达迷走活性的 SD2、DC 等指标略有升高。与生理盐水组入室相比,交感指标显著降低,迷走指标显著升高。总体上从自主神经系统的角度来看,DEX 通过抑制交感并提升迷走神经活动性,使自主神经系统的平衡更接近于生理状态,与生理盐水组相比对患者术前焦虑所致的应激状态从临床效果到各项指标均有明显的改善。由此可见,与常规的血压、心率指标相比,HRV 指标表现得更为敏感,且通过自主神经系统的角度所反映的患者状况更为全面。

综上所述,DEX 术前鼻喷具有较好的抗焦虑作用,且 HRV 分析作为一种客观、量化的手段,可对患者术前焦虑的评价进行有益的补充。

参考文献:

- [1] 宿丹. 术前焦虑水平对甲状腺手术全麻患者术中血流动力学及麻醉后并发症的影响[D]. 大连医科大学,2019.
- [2] ZEMLA A J, NOWICKA -SAUER K, JARMOSZEWICZ K, et al. Measures of preoperative anxiety[J]. *Anestezjol Int Ter*, 2019, 51(1): 64-69.
- [3] TASBIHGOU S R, BAREND S R M, ABSALOM A R. The role of dexmedetomidine in neurosurgery[J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2021, 35(2): 221-229.
- [4] SHAH U J, NGUYEN D, KARUPPIAAH N. Efficacy and safety of caudal dexmedetomidine in pediatric infra-umbilical surgery: a meta-analysis and trial-sequential analysis of randomized controlled trials[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2021, 46(5): 422-432.
- [5] 陈志勇. 术前焦虑与心率变异性的相关性研究[D]. 首都医科大学麻醉学, 2005.
- [6] 房桢, 申岱. 相位整序信号平均技术用于全麻中自主神经功能的评价[J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(1): 15-18.
- [7] 程长, 何嘉悦, 余吟吟, 等. 中文版状态-特质焦虑量表的测量等值性研究[J]. *中国临床心理学杂志*, 2021, 29(1): 68-73.
- [8] BROWN S B R E, BROSSCHOT J F, VERSLUIS A, et al. New methods to optimally detect episodes of non-metabolic heart rate variability reduction as an indicator of psychological stress in everyday life[J]. *Int J Psychophysiol*, 2018, 131: 30-36.
- [9] POZZATO I, TRAN Y, GOPINATH B, et al. The role of stress reactivity and pre-injury psychosocial vulnerability to psychological and physical health immediately after traumatic injury[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2021, 127: 105190.
- [10] 宫瑞松, 赵晶. 围术期焦虑研究进展[J]. *北京医学*, 2018, 40(6): 572-574.
- [11] 杨会芹, 杨丽, 陈君. 焦虑症患者的心率变异性研究[J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(11): 1003-1004.
- [12] 房桢, 张婷婷, 张文敬, 等. 围手术期迷走神经保护[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(12): 1128-1132.
- [13] JUN J H, KIM K N, KIM J Y, et al. The effects of intranasal dexmedetomidine premedication in children: a systematic review and meta-analysis[J]. *Can J Anaesth*, 2017, 64(9): 947-961.
- [14] 黎翠, 张军龙. 右美托咪定经鼻用药在监测麻醉管理中的应用进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2019, 40(6): 568-572.
- [15] YUEN V M, HUI T W, IRWIN M G, et al. A randomised comparison of two intranasal dexmedetomidine doses for premedication in children[J]. *Anaesthesia*, 2012, 67(11): 1210-1216.

(2021-07-19 收稿)

(上接第 68 页)

- [3] KUMAR P, SIRIPINI S, SREEDHAR A S. The matrix metalloproteinase 7 (MMP7) links Hsp90 chaperone with acquired drug resistance and tumor metastasis[J]. *Cancer Rep (Hoboken)*, 2020, 6: e1261.
- [4] 罗红敏. 右美托咪定对需机械通气的脓毒症患者病死率及呼吸机通气天数的影响: 一项随机对照试验 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(7): 632.
- [5] ZHENG D, ZHANG J, ZHANG Z, et al. Endothelial microvesicles induce pulmonary vascular leakage and lung injury during sepsis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 643.
- [6] LI L C, TIAN Y, XIAO J, et al. Dexmedetomidine promotes inflammation resolving through TGF- β 1 secreted by F4/80(+)Ly6G(+) macrophage [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107480.
- [7] MEI B, LI J, ZUO Z. Dexmedetomidine attenuates sepsis-associated inflammation and encephalopathy via central α 2A adrenoceptor[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 296-314.
- [8] 陈显峰, 胡军涛, 张驰, 等. 右美托咪定镇静对脓毒症并发 ARDS 患者肺保护作用的研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(2): 151-155.
- [9] SERRA R. Matrix metalloproteinases in health and disease [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(8): 1138.
- [10] MAATTA M, LAURILA H P, HOLOPAINEN S, et al. Matrix metalloproteinase -2, -7, and -9 activities in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis compared to healthy dogs and dogs with other respiratory diseases [J]. *J Vet Intern Med*, 2021, 35(1): 462-471.
- [11] 张延卓, 何绪雄, 叶茂英, 等. 右美托咪定神经保护作用机制的综述[J]. *中国继续医学教育*, 2021, 13(9): 195-198.
- [12] YANG T, FENG X, ZHAO Y, et al. Dexmedetomidine enhances autophagy via α 2-AR/AMPK/mTOR pathway to inhibit the activation of NLRP3 inflammasome and subsequently alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 790.
- [13] YADAV P K, GUPTA S K, KUMAR S, et al. MMP-7 derived peptides with MHC class-I binding motifs from canine mammary tumor tissue elicit strong antigen-specific T-cell responses in BALB/c mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(1): 311-320.
- [14] SOLUN B, SHOENFELD Y. Inhibition of metalloproteinases in therapy for severe lung injury due to COVID-19[J]. *Med Drug Discov*, 2020, 7: 100052.
- [15] ZHANG P, PENG J, REN Y Q, et al. Dexmedetomidine protects against endothelial injury in septic rats induced by cecal ligation and puncture by decreasing angiotensin 2 and increasing vascular endothelial cadherin levels[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(2): 111.

(2021-06-24 收稿)