

脓毒症大鼠肺损伤时基质金属蛋白酶 9 的变化及乌司他丁的干预作用

张玉想 杨龙

【关键词】 乌司他丁； 基质金属蛋白酶 9； 脓毒症； 盲肠结扎穿孔术； 逆转录-聚合酶链反应

急性肺损伤(ALI)是严重脓毒症的常见并发症,病理上表现为肺部大量炎性细胞浸润和肺水肿的形成。基质金属蛋白酶(MMPs)可由多种基质细胞和炎性细胞产生,是一类高度保守的依赖 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的内切蛋白水解酶家族^[1],几乎能降解细胞外基质(ECM)的所有成分,在 ALI 发病机制中起着重要作用。其中 MMP-9 能降解肺毛细血管基底膜中的 ECM 成分,使肺毛细血管通透性增加和炎性细胞进一步浸润,在 ALI 中发挥关键作用而倍受关注^[2-3]。

乌司他丁(UTI)是从男性尿液中分离纯化的蛋白酶抑制剂,是一种糖蛋白,能够同时抑制胰蛋白酶、磷脂酶 A_2 、透明质酸酶、弹性蛋白酶、MMPs 等多种水解酶的活性。在日本和中国已广泛应用于临床,如胰腺炎、休克、弥散性血管内凝血(DIC)等,有抑制炎症介质过度释放^[4-6]、保护器官功能^[7-9]的作用,对肺损伤的保护作用也已有报道^[10-11],但确切的作用机制和通路尚未完全明了。本研究中通过盲肠结扎穿孔术(CLP)诱导脓毒症复制大鼠 ALI 模型,观察脓毒症 ALI 时血和肺组织中 MMP-9 的表达及肺组织超微结构的变化,探讨 UTI 对脓毒症肺的保护作用及其机制,为临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型复制:90 只雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:807145。按随机数字表法分为假手术组、

模型组、UTI 治疗组,每组 30 只。假手术组只开腹,不结扎盲肠也不穿孔;模型组行 CLP 后给予生理盐水 10 ml/kg 腹腔注射;UTI 治疗组制模后给予 UTI(广东天普生化股份有限公司)100 kU/kg 腹腔注射。本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 观察指标及检测方法

1.2.1 一般情况:观察 CLP 后大鼠有无精神萎靡、嗜睡、寒颤、竖毛、眼角分泌物和腹水,以及各主要器官的外观情况。

1.2.2 肺组织病理学观察:按时间点采血后放血处死动物,剪取右肺下叶,一部分肺组织用多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色后,普通光镜下观察;另一部分肺组织用戊二醛固定后制备电镜切片并观察。

1.2.3 肺组织湿/干重比值(W/D 比值)检测:术后 6 h 处死动物,开胸取右肺中叶,吸干表面水分称湿重,再置于 85 °C 烤箱中 24 h 至恒重,称干重,计算肺 W/D 比值。

1.2.4 血浆 MMP-9 检测:在 CLP 术后 0.5、1.5、3、6、12 h 采集静脉血 2 ml,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆 MMP-9 含量,操作严格按试剂盒(购自美国 R&D 公司)说明书进行。

1.2.5 肺组织 MMP-9 mRNA 表达:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法。按时间点采血后放血处死动物,取左肺组织,提取肺组织 RNA,反转录成 cDNA 并扩增, β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,进行电泳后将凝胶在 Eagle Eye-11 型图像处理系统上进行分析、计算,得出 MMP-9、 β -actin 的吸光度(A)值,并计算 MMP-9 与 β -actin 的 A 值相对值,得到 MMP-9 mRNA 表达的结果。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件进行数据统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全单因素的方差分析,方差不齐时采用非参数的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠术后一般情况:假手术组动物一般情况无异常。模型组动物术后苏醒延迟,逐渐出现精神萎靡、竖毛、寒颤、呼吸急促、呼吸困难及眼角分泌物等表现,濒死前出现呼吸困难、寒颤、四肢僵硬等表现,剖腹可见浑浊脓血性渗液、肠管水肿、肝肾充血和水肿。UTI 治疗组动物术后表现较模型组轻。

2.2 肺组织病理学改变

2.2.1 光镜下观察(图 1):假手术组肺泡结构较完整,肺泡腔清晰。模型组大鼠肺泡、肺间质充血、水肿,肺泡腔可见大量中性粒细胞浸润,有不同程度的肺不张、代偿性肺气肿及类似透明膜形成以及肺泡结构破坏。UTI 治疗组肺泡结构较完整,肺泡腔清晰,炎症改变相对较轻,水肿及出血少,病理损害明显减轻。

2.2.2 电镜检查结果(图 2):假手术组肺泡 I 型上皮细胞结构正常。模型组可见肺泡上皮及肺泡毛细血管内皮基底膜肿胀、加宽,肺泡腔变小,中性粒细胞向血管外游走,在肺泡隔间质及肺泡腔内浸润,肺泡腔内可见巨噬细胞,肺泡 I 型上皮细胞胞质呈不规则突起,线粒体等细胞器空泡化,肺泡 I 型上皮细胞表面微绒毛变短、倒状或脱落、稀少,线粒体部分空泡化,板层小体有排空现象。UTI 治疗组肺组织超微结构病理学损伤均明显减轻,肺泡 I 型上皮细胞游离面,微绒毛有序排列,线粒体轻度肿胀,板层小体空泡化明显减轻。

2.3 肺组织 W/D 比值(表 1):与假手术组比较,模型组大鼠 CLP 术后 6 h 肺组织 W/D 比值显著增加($P < 0.01$);UTI 治疗组术后 6 h 肺组织 W/D 比值较模型组显著减少($P < 0.01$)。

2.4 血浆 MMP-9 检测结果(表 1):模型组术后各时间点血浆 MMP-9 水平均较假手术组明显升高(均 $P < 0.01$);UTI 治疗组术后各时间点血清 MMP-9 水平均较模型组明显下降($P < 0.05$ 或

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2011.11.013

基金项目:留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2004]527号)

作者单位:100091 北京,解放军第三〇九医院 ICU(张玉想),沧州市中心医院 ICU(杨龙)

通信作者:张玉想,Email:zhyux38@yahoo.com.cn

图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 假手术组(a)肺泡结构较完整,肺泡腔清晰;模型组(b)肺泡、肺间质充血、水肿、肺泡腔可见大量中性粒细胞浸润,可见不同程度的肺不张,代偿性肺气肿及类似透明膜形成以及肺泡结构破坏;乌司他丁(UTI)组(c)病理改变明显减轻,肺泡结构较完整,肺泡腔清晰,炎症改变相对较轻,水肿及出血少 HE ×100(右下角 ×400)

图 2 电镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 模型组(a, ×16 000; b, ×14 000)肺泡内可见红细胞、游离细胞器、肺泡 I 型上皮细胞水肿,线粒体肿胀,嵴断裂或消失,绒毛消失(a, 箭头所示),基底膜破坏(b, 箭头所示);乌司他丁(UTI)组(c, ×16 000; d, ×14 000)肺泡 I 型上皮细胞水肿减轻,线粒体肿胀,嵴部分好转,绒毛整齐、完整(c, 箭头所示),基底膜完整(d, 箭头所示) 醋酸铀-枸橼酸铅

表 1 UTI 对脓毒症大鼠肺 W/D 比值及血浆中 MMP-9 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	6 h 肺 W/D 比值	MMP-9 (ng/L)				
		0.5 h	1.5 h	3 h	6 h	12 h
假手术组	4.54 ± 0.16	2 090.8 ± 282.1	2 292.4 ± 157.0	2 191.4 ± 348.8	1 957.3 ± 286.5	1 887.5 ± 176.0
模型组	5.15 ± 0.11 ^a	2 895.8 ± 268.4 ^a	2 884.7 ± 176.9 ^a	2 986.7 ± 144.5 ^a	3 096.3 ± 384.9 ^a	2 993.1 ± 208.2 ^a
UTI 组	4.74 ± 0.08 ^{bd}	2 428.9 ± 166.7 ^c	2 437.5 ± 375.4 ^c	2 520.4 ± 213.1 ^c	2 616.4 ± 182.5 ^{bc}	2 748.7 ± 148.7 ^{cd}

注:UTI,乌司他丁,W/D 比值,湿/干重比值,MMP-9,基质金属蛋白酶 9;与假手术组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

$P < 0.01$ 。

2.5 肺组织 MMP-9 mRNA 表达结果 (表 2; 图 3): 模型组术后 3、6、12 h MMP-9 mRNA 表达均较假手术组明显升高(均 $P < 0.01$); UTI 治疗组 MMP-9 mRNA 表达均较模型组明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 UTI 对脓毒症大鼠肺组织 MMP-9 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MMP-9 mRNA		
	3 h	6 h	12 h
假手术组	0.435 ± 0.043	0.338 ± 0.035	0.253 ± 0.032
模型组	0.833 ± 0.115 ^a	0.883 ± 0.034 ^a	0.853 ± 0.023 ^a
UTI 组	0.610 ± 0.080 ^{bc}	0.470 ± 0.092 ^{bd}	0.468 ± 0.013 ^{cd}

注:UTI,乌司他丁,MMP-9,基质金属蛋白酶 9;与假手术组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

UTI,乌司他丁,MMP-9,基质金属蛋白酶 9,M,Marker,1~3,假手术组、模型组、UTI 组术后 3 h,4~6,假手术组、模型组、UTI 组术后 6 h,7~9,假手术组、模型组、UTI 组术后 12 h, β -actin, β -肌动蛋白

图 3 逆转录-聚合酶链反应检测 UTI 对脓毒症大鼠肺组织 MMP-9 mRNA 表达的影响

3 讨论

ALI 是以肺血管内皮细胞及肺泡上皮细胞广泛损伤为病理特征的一种失控性炎症反应。ALI 的病理机制至今虽然尚未完全阐明,但 ALI 的特征性病理改变,即肺泡-毛细血管膜损伤、通透性增高已成为医学界的共识^[12],反映了 ALI

发病过程中构成呼吸膜的间质成分基底膜发生破坏。基底膜是一种特殊的 ECM,主要由 IV 型胶原构成,位于上皮和内皮下,对于维持组织器官正常结构和功能有重要作用。ALI 时,肺泡上皮和毛细血管内皮的基底膜破坏可使肺泡-毛细血管膜通透性增强,促进肺间质和

肺泡水肿形成,进而引起气体交换障碍,导致顽固性低氧血症^[12]。

众多肺内外因素均可引起 ALI,其中脓毒症是重要的肺外因素。CLP 由肠源性感染诱导脓毒症致 ALI,能较好地模拟疾病的自然病理生理过程。本实验中大鼠 CLP 术后 6 h 肺脏病理变化以肺泡中隔变化为主,表现为肺间质充血水肿、大量中性粒细胞及少量巨噬细胞浸润、肺泡结构破坏,与国外的模型报道^[14]相符。

MMP-9 是 MMPs 家族中一种依赖 Zn²⁺的金属蛋白酶,又称为明胶酶 B,参与 ECM 的降解和重建,并可作为中性粒细胞的趋化因子引起中性粒细胞聚集。MMP-9 可降解由 IV 型胶原等组成毛细血管和肺泡上皮的基膜,导致肺毛细血管通透性增加,引起富含蛋白的血浆进入肺泡,产生肺水肿、肺内分流增加、低氧血症等,最终导致 ALI 甚至急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[15-17]。

本研究中模型大鼠血中及肺组织中 MMP-9 表达均较假手术组升高,6 h 时达峰值,同时,肺 W/D 比值升高,提示 MMPs 与 ALI 的严重程度相关,可能是导致肺泡-毛细血管通透性增高以及肺间质水肿的重要致病因素,其可能机制:①直接作用于 ECM 使其降解;②可作为中性粒细胞的趋化因子,引起中性粒细胞在肺内聚集;③通过增加弹性蛋白酶的活性而间接导致基底膜损伤;④MMP-9 通过水解紧密连接蛋白、黏附蛋白等破坏正常的内皮屏障,直接导致微血管通透性增加;⑤通过调节炎症因子的水平从而参与 ALI 的发生发展。

应用 UTI 后大鼠血浆及肺组织中的 MMP-9 表达明显降低,同时肺 W/D 比值改善,病理学改变好转。ALI 主要病理特征为肺微血管通透性增高而导致的肺水肿及透明膜形成,并伴有肺泡萎陷和肺泡 I 型上皮细胞受损^[18-19]。肺泡 I 型上皮细胞中嗜银板层小体为其特征,板层小体数目和形态的相对稳定是肺泡 I 型上皮细胞发挥正常功能的基础^[20]。本研究中 UTI 应用后显著改善了肺的超微结构,肺泡 I 型上皮细胞损伤有不同程度减轻,其微绒毛排列较整齐,线粒体未见明显异常,微丝清晰,基膜较完整。

综上所述,本研究提示 UTI 对脓毒症导致的 ALI 具有保护作用,其可能是通过抑制 MMP-9 的表达,减少了肺泡-

毛细血管基底膜和肺间质的降解,减轻肺水肿。UTI 是否对 MMPs 内源性抑制剂(TIMPs)或者其他蛋白水解酶有影响,还有待更深入的研究。

参考文献

- [1] Massova I, Kotra LP, Fridaman R, et al. Matrix metalloproteinases, structures, evolution, and diversification. *FASEB J*, 1998, 12: 1075-1095.
- [2] Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*, 2003, 31: 536-542.
- [3] Sievers HH, Freund-Kaas C, Eleftheriadis S, et al. Lung protection during total cardiopulmonary bypass by isolated lung perfusion, preliminary results of a novel perfusion strategy. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74: 1167-1172.
- [4] Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol*, 2005, 67: 673-680.
- [5] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, et al. Protective effects of urinary trypsin inhibitor on systemic inflammatory response induced by lipopolysaccharide. *J Clin Biochem Nutr*, 2008, 43: 139-142.
- [6] Inoue K, Takano H. Urinary trypsin inhibitor as a therapeutic option for endotoxin related inflammatory disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19: 513-520.
- [7] 陈永权, 金孝炬, 柳兆芳, 等. 乌司他丁对胰肾联合移植幼猪肺脏的保护作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 676-678.
- [8] Park KH, Lee KH, Kim H, et al. The anti-inflammatory effects of ulinastatin in trauma patients with hemorrhagic shock. *J Korean Med Sci*, 2010, 25: 128-134.
- [9] Zhang YJ, Li M, Meng M, et al. The effect of ulinastatin on the small intestine injury and mast cell degranulation in a rat model of sepsis induced by CLP. *Exp Toxicol Pathol*, 2009, 61: 481-490.
- [10] Bao P, Gao W, Li S, et al. Effect of pretreatment with high-dose ulinastatin in preventing radiation-induced

pulmonary injury in rats. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603: 114-119.

- [11] Ito K, Mizutani A, Kira S, et al. Effect of ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes. *Injury*, 2005, 36: 387-394.
- [12] Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27: 337-349.
- [13] Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol*, 2005, 98: 1777-1783.
- [14] Öztürk E, Demirbilek S, Begec Z, et al. Does leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? *Pediatr Surg Int*, 2008, 24: 899-905.
- [15] Torii K, Iida K, Miyazaki Y, et al. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 43-46.
- [16] Fligiel SE, Standiford T, Fligiel HM, et al. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum Pathol*, 2006, 37: 422-430.
- [17] Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, et al. Effect of polymyxin B-immobilized fiber on blood metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in acute respiratory distress syndrome patients. *Blood Purif*, 2004, 22: 256-260.
- [18] Fehrenbach H, Brasch F, Uhlig S, et al. Early alterations in intracellular and alveolar surfactant of the rat lung in response to endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 1630-1639.
- [19] Song Y, Shi Y, Harken AH, et al. Induction of type alveolar epithelial cells apoptosis in mouse by lipopolysaccharide does not require TNF- α . *Chin Med J*, 2003, 116: 625-629.
- [20] Guy J, Dhanireddy R, Mukherjee AB. Surfactant-producing rabbit pulmonary alveolar type I cells synthesize and secrete an anti-inflammatory protein, uteroglobin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 662-669.

(收稿日期: 2011-01-29)

(本文编辑: 李银平)