

基质金属蛋白酶-9 抑制剂 SB-3CT 对心肺复苏大鼠血脑屏障作用的研究

何志捷 邹子俊 陈晓彤

【摘要】 目的 观察心肺复苏(CPR)早期大鼠脑组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和血脑屏障的变化及 MMP-9 抑制剂 SB-3CT 对其的作用。**方法** 将动物随机分为假手术组、复苏对照组和复苏治疗组,夹闭气管插管致大鼠心搏骤停,1 min 后进行 CPR,复苏治疗组于自主循环恢复(ROSC)后立即腹腔注射 MMP-9 抑制剂 SB-3CT 25 mg/kg。各组于 ROSC 0、3、9、24 和 48 h 分别处死 8 只大鼠后,观察血脑屏障变化;测定脑组织 MMP-9 的蛋白和 mRNA 表达;电镜下观察超微结构改变。**结果** 假手术组各时间点脑含水量、伊文思蓝含量、脑组织 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达和电镜观察均无明显变化。复苏对照组各指标于 3 h 起明显升高,24 h 达高峰,与假手术组比较差异均有统计学意义;血脑屏障明显改变。复苏治疗组 ROSC 后上述指标变化趋势与复苏对照组相似,但损伤程度较复苏对照组轻($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** MMP-9 抑制剂 SB-3CT 可明显减少 MMP-9 表达,减轻血脑屏障损伤,减轻脑水肿,对 CPR 后脑缺血/再灌注损伤有明显保护作用。

【关键词】 心肺复苏; 血脑屏障; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶-9 抑制剂

Exploration of the effect of inhibitor of matrix metalloproteinase-9 on blood brain barrier in cardiopulmonary resuscitation in rats HE Zhi-jie, ZOU Zi-jun, CHEN Xiao-tong. Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9, SB-3CT) on blood brain barrier (BBB) after cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **Methods** Rats were randomly divided into three groups: the sham-operated group, the resuscitation control group, and the resuscitation treatment group. Cardiac arrest was produced by clamping the endotracheal intubation, and CPR was executed 1 minute later. In the resuscitation treatment group, SB-3CT (25 mg/kg) was injected intraperitoneally after the restoration of spontaneous circulation (ROSC). The rats were executed immediately, and 0, 3, 9, 24 and 48 hours after the treatment. BBB was examined, and the expression of MMP-9 protein and MMP-9 mRNA in brain tissue were detected, and the ultramicrostructure of brain tissue was studied with electron microscopy. **Results** In the sham-operated group, the water content, Evans blue content, MMP-9 protein, and MMP-9 mRNA did not change significantly, and there was no obvious change in microstructure of brain tissue. The expression of MMP-9 protein and MMP-9 mRNA in the resuscitation control group were obviously up-regulated at 3 hours after CPR, peaking at 24 hours. There was also significant change in BBB. The differences were significant statistically compared with sham-operated group. The changes in the resuscitation treatment group were similar to the resuscitation control group, but the levels were lower than those of the resuscitation control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The specific inhibitor of MMP-9 (SB-3CT) could decreased the expression of MMP-9, the injury of BBB, and cerebral edema in the cerebral ischemia model with CPR rats, and the protection of cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury after CPR is obvious.

【Key words】 cardiopulmonary resuscitation; blood brain barrier; matrix metalloproteinase; matrix metalloproteinase-9 inhibitor

心肺复苏(CPR)后的脑组织缺血、缺氧可使脑血管完整性破坏,血脑屏障损伤,在血脑屏障损伤的发生机制中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)起了重要作用。本研究通过使用特异性 MMP-9 抑制剂 SB-3CT 阻断 CPR 早期大鼠脑组织 MMP-9 的表达和活性,探讨其对血脑屏障的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:健康雄性 SD 大鼠 120 只,体重(450±50)g,由中山大学北校区动物实验中心提供。按随机数字表法将动物分为假手术组、复苏对照组和复苏治疗组,每组 40 只。假手术组仅行麻醉和气管插管、血管穿刺,不进行窒息;复苏治疗组于自主循环恢复(ROSC)后立即腹腔注射 MMP-9 抑制剂 SB-3CT 25 mg/kg;复苏对照组行 CPR,但不注射 SB-3CT。

模型制备方法:大鼠称重,诱导麻醉,进行心电

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.06.006

基金项目:广东省自然科学基金项目(7001601)

作者单位:510120 广东广州,中山大学附属第二医院急诊科

Email:hezhijie2004@126.com

监护,经口气管插管,接动物呼吸机,于呼气末夹闭气管插管致呼吸停止。心搏骤停的判断标准为动脉搏动波形消失或收缩压 ≤ 25 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa);心电图示电-机械分离或是心搏停止。心搏骤停持续 1 min 后立即开始 CPR。ROSC 定义为恢复室上性心律,平均动脉压 ≥ 60 mm Hg 并维持 5 min 以上。

1.2 检测指标及方法:各组于 ROSC 0(即刻)、3、9、24 和 48 h 各处死 8 只动物,取样本,以检测下列指标。

1.2.1 复苏大鼠不同时间点血脑屏障变化:①脑含水量:测定复苏后大鼠各时间点脑组织湿、干重并计算脑组织含水量[含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$]。②脑组织伊文思蓝(EB)含量测定:于处死前 15 min 经股静脉注射 EB,断头活杀大鼠取脑组织,测定其吸光度(A)值,绘制标准曲线,根据标准曲线回归方程求得样品 EB 含量,并计算脑组织 EB 含量。

1.2.2 电镜观察:麻醉大鼠后断头取脑,取左右脑皮质标本,经固定液固定、戊二醛固定、乙醇脱水、Epon 包埋后制备超薄切片,在透射电镜下观察脑组织超微结构。

1.2.3 复苏大鼠脑组织 MMP-9 蛋白表达:处死大鼠后取脑组织,置于细胞裂解液中匀浆,离心取上清液,-80℃保存。根据大鼠 MMP-9 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒要求测定,根据标准曲线得到稀释样本中 MMP-9 浓度,将此浓度乘以稀释倍数 2 即得到 MMP-9 浓度($\mu\text{g/L}$)。

1.2.4 复苏大鼠脑组织 MMP-9 mRNA 检测:将组织匀浆进行反转录,MMP-9 上游引物为 5'-CT

TTGTAGGGTCGGTTCTG-3',下游引物为 5'-CC TGTGAGTGGGTTGGATT-3',扩增产物大小为 466 bp。内参照 β -肌动蛋白(β -actin)扩增产物大小为 330 bp。将逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,以凝胶成像系统拍照,进行吸光度分析。

1.3 统计学分析:用统计软件 SPSS 11.0 进行数据处理,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复苏后大鼠血脑屏障的变化(表 1):假手术组大鼠脑组织含水量及 EB 含量无明显变化。复苏对照组在 ROSC 3 h 脑含水量及 EB 含量均明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达高峰,均明显高于假手术组(P 均 <0.01)。复苏治疗组脑含水量及 EB 含量的变化与复苏对照组相似,但其升高水平明显低于复苏对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 复苏后脑组织 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达的变化(表 2;图 1):假手术组大鼠 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达均无明显变化。复苏对照组在 ROSC 3 h MMP-9 蛋白及 mRNA 表达均明显升高,9 h 进一步升高,24 h 达高峰,均明显高于假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。复苏治疗组大鼠 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达与复苏对照组相似,但其升高水平明显低于复苏对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 电镜下超微结构观察(图 2):假手术组 ROSC 后各时间点血脑屏障均未见明显改变。复苏对照组 ROSC 后 3、9、24 h 和 48 h 血脑屏障明显改变,以 24 h 和 48 h 最明显,主要表现为血管周围明显水肿、空泡,微血管基底膜可见增厚,细胞间隙有水肿

表 1 各组大鼠 ROSC 后不同时间点脑组织含水量及 EB 含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

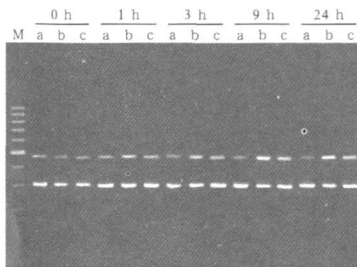
组别	脑组织含水量(%)					脑组织 EB 含量($\mu\text{g/g}$)				
	ROSC 0 h	ROSC 3 h	ROSC 9 h	ROSC 24 h	ROSC 48 h	ROSC 0 h	ROSC 3 h	ROSC 9 h	ROSC 24 h	ROSC 48 h
假手术组	76.9 $\pm$ 2.5	78.4 $\pm$ 3.1	77.7 $\pm$ 2.2	78.4 $\pm$ 1.6	78.3 $\pm$ 2.8	4.30 $\pm$ 2.51	3.94 $\pm$ 1.59	4.26 $\pm$ 2.61	4.29 $\pm$ 1.88	4.12 $\pm$ 2.65
复苏对照组	77.5 $\pm$ 2.9	83.4 $\pm$ 2.4 ^a	86.7 $\pm$ 2.5 ^b	93.6 $\pm$ 2.5 ^b	89.2 $\pm$ 2.0 ^b	5.98 $\pm$ 2.20	10.54 $\pm$ 4.77 ^b	11.12 $\pm$ 4.58 ^b	11.94 $\pm$ 3.46 ^b	11.61 $\pm$ 3.30 ^b
复苏治疗组	78.9 $\pm$ 5.2	82.0 $\pm$ 2.7 ^{bc}	85.6 $\pm$ 2.9 ^{bc}	89.8 $\pm$ 3.0 ^{bd}	86.7 $\pm$ 2.7 ^{bc}	3.92 $\pm$ 1.85	5.54 $\pm$ 1.40 ^{bd}	7.20 $\pm$ 3.24 ^{bc}	7.94 $\pm$ 2.35 ^{bc}	7.34 $\pm$ 1.71 ^{bc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与复苏对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

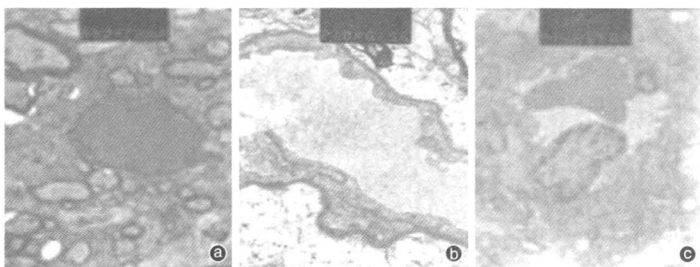
表 2 各组大鼠 ROSC 后不同时间点 MMP-9 的蛋白及 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	MMP-9 蛋白($\mu\text{g/L}$)					MMP-9 mRNA				
	ROSC 0 h	ROSC 3 h	ROSC 9 h	ROSC 24 h	ROSC 48 h	ROSC 0 h	ROSC 3 h	ROSC 9 h	ROSC 24 h	ROSC 48 h
假手术组	81.5 $\pm$ 32.9	79.6 $\pm$ 76.8	81.8 $\pm$ 40.0	82.7 $\pm$ 54.7	82.4 $\pm$ 37.6	0.25 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.07
复苏对照组	82.1 $\pm$ 37.5	106.1 $\pm$ 24.0 ^a	112.8 $\pm$ 53.1 ^a	130.2 $\pm$ 46.4 ^a	118.1 $\pm$ 52.2 ^b	0.24 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.12 ^a	0.79 $\pm$ 0.14 ^a	1.06 $\pm$ 0.28 ^b	0.96 $\pm$ 0.25 ^b
复苏治疗组	80.7 $\pm$ 30.1	93.0 $\pm$ 44.9 ^{ad}	101.8 $\pm$ 25.0 ^{ac}	118.1 $\pm$ 27.3 ^{ad}	109.5 $\pm$ 20.7 ^{bc}	0.27 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.11 ^{ad}	0.54 $\pm$ 0.15 ^{ad}	0.65 $\pm$ 0.15 ^{bc}	0.55 $\pm$ 0.15 ^{bc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与复苏对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$



M: Marker; a: 假手术组; b: 复苏对照组; c: 复苏治疗组
图 1 RT-PCR 检测各组大鼠 ROSC 后不同时间点
脑组织 MMP-9 mRNA 表达



①: 假手术组; ②: 复苏对照组; ③: 复苏治疗组
图 2 透射电镜下观察各组大鼠 ROSC 24 h 脑组织超微结构改变
铀-铅双染 ×13 000

现象、间隙增大,有的内皮细胞肿胀特别明显,有的发生凋亡。复苏治疗组的改变和复苏对照组的改变基本相似,但形态学方面的损伤程度较复苏对照组明显减轻。

3 讨论

CPR 后,脑组织由于缺血、缺氧可出现一定程度的损害,主要为脑复苏后脑水肿形成、脑缺血/再灌注(I/R)损伤^[1 2]。近年来研究发现,脑损伤后基质金属蛋白酶(MMPs)分泌增加,可加速血管基膜的降解,造成组织的损伤,在局灶性脑 I/R 损伤中,MMPs 尤其是 MMP-9 的作用日益受到重视^[3]。Abilleira 等^[4]发现脑出血患者发病 24 h 内血清 MMP-9 含量升高与血肿周围水肿体积和病情恶化有关,与深部出血的相对水肿体积相关;Rosenberg 等^[5]发现,MMP-9 在脑缺血后 3~4 h 表达开始增加,24~48 h 达高峰,表明 MMP-9 与急性期血脑屏障损伤有关。

基于上述研究,尤其在局灶性脑 I/R 中 MMP-9 的作用,我们在气管夹闭窒息法大鼠 CPR 后全脑 I/R 损伤模型实验中发现,大鼠复苏后出现了血脑屏障破坏,如 ROSC 3 h 脑组织含水量和 EB 含量明显升高,24 h 达高峰,表明大鼠 CPR 后血脑屏障被破坏,血管源性水肿可能在大鼠 CPR 所致脑水肿的机制方面起重要作用。这些变化在电镜超微结构观察中也得到证实。MMPs 是一组在降解细胞外基质(ECM)过程中起主要作用的锌、钙依赖性蛋白水解酶家族^[6]。本研究发现,ROSC 3 h MMP-9 表达明显升高,24 h 达高峰,说明被激活的 MMP-9 可能参与了脑缺血后细胞损伤,降解 ECM,破坏脑血管的完整性,从而导致更严重的血脑屏障损伤,加重脑水肿和脑损伤。MMPs 抑制剂可调控其活性^[7]。有研究发现,在局灶性大鼠脑缺血模型中,特异性 MMP-9 抑制剂 SB-3CT 对 MMP-9 的表达有明显的

抑制作用,能明显减轻脑水肿,有较好的脑保护作用^[8]。本研究中针对 SB-3CT 对 CPR 后全脑 I/R 损伤的保护作用进行了研究,发现 SB-3CT 可明显降低 CPR 后全脑 I/R 损伤所引起的 MMP-9 表达,脑组织含水量和 EB 含量与复苏对照组比较均明显降低,通过观察电镜超微结构也得到证实。有理由推测,通过使用 SB-3CT 阻断 MMP-9 的表达,能减轻脑 I/R 损伤,明显减轻脑水肿,有较好的脑保护作用,有望为临床提供一个新思路。

参考文献

[1] 李建生,刘轲,刘敬霞. 老龄大鼠脑缺血/再灌注致脑微血管基底膜损伤的变化及与明胶酶的关系. 中国危重病急救医学, 2008,20(11):656-659.
[2] 缪文丽,李海玲,王弘道,等. 神经元特异性烯醇化酶和 S100 蛋白评估心脏停搏患者复苏后脑损伤的研究. 中国危重病急救医学,2007,19(12):747-752.
[3] Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. Stroke,2003,34(8):2025-2030.
[4] Abilleira S, Montaner J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. J Neurosurg,2003,99(1):65-70.
[5] Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, et al. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab,1996,16(3):360-366.
[6] 张向峰,朱光发,刘双,等. 基质金属蛋白酶 2/9 及其组织抑制剂比例失调在高氧所致急性肺损伤中的作用. 中国危重病急救医学,2008,20(10):597-600.
[7] Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. Stroke, 2000,31(12):3034-3040.
[8] Gu Z, Cui J, Brown S, et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. J Neurosci,2005,25(27):6401-6408.