

利多卡因抑制基质金属蛋白酶活性改善脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的机制研究

郑彬彬, 张嘉男, 范轶鑫, 胡亮, 刘文涛, 王雪融*

(南京医科大学基础医学院, 南京 210029)

摘要 考察利多卡因对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导急性肺损伤(ALI)小鼠模型血浆中基质金属蛋白酶MMP-9和MMP-2活性的影响,并探讨其改善LPS诱导的急性肺损伤的作用机制。小鼠尾静脉注射不同浓度的利多卡因(2,4,8 mg/kg, iv)预处理30 min,再腹腔注射LPS 10 mg/kg刺激12 h建立小鼠ALI模型,测定小鼠7 d存活率及肺组织湿/干重比;Western blot法检测肺组织中p38 MAPK的磷酸化水平;明胶酶谱法测定血浆中MMP-9和MMP-2活性。实验结果发现,利多卡因预处理可剂量依赖性提高ALI小鼠存活率,降低肺组织湿/干重比,抑制血浆中MMP-9和MMP-2活性,并下调肺组织中p38的磷酸化水平。研究结果表明,利多卡因改善LPS诱导的小鼠急性肺损伤,其机制可能与抑制基质金属蛋白酶的活化有关。

关键词 利多卡因; 脂多糖; 急性肺损伤; 基质金属蛋白酶

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)02-0180-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200208

引用本文 郑彬彬, 张嘉男, 范轶鑫, 等. 利多卡因抑制基质金属蛋白酶活性改善脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(2):180–184.

Cite this article as: ZHENG Binbin, ZHANG Jianan, FAN Yixin, et al. Lidocaine attenuates LPS-induced acute lung injury in mice via an inhibition on matrix metalloproteinases[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(2):180–184.

Lidocaine attenuates LPS-induced acute lung injury in mice via an inhibition on matrix metalloproteinases

ZHENG Binbin, ZHANG Jianan, FAN Yixin, HU Liang, LIU Wentao, WANG Xuerong*

School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract The aim of the present study was to investigate the effects and mechanisms of lidocaine on lipopolysaccharide (LPS)-induced matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 activity in plasma, and the effects of lidocaine on LPS-induced acute lung injury (ALI). Mice were pretreated with lidocaine (2, 4, 8 mg/kg) for 30 minutes, and then treated with 10 mg/kg LPS (ip) for 12 h to induce ALI. The 7-day survival rate and lung wet/dry weight ratio of mice were monitored. Phosphorylation level of p38 was measured by western blot. The activity of MMP-9 and MMP-2 in plasma was evaluated by gelatin zymography. The results showed that pretreatment with lidocaine could significantly reduce the death rate of ALI mice as well as the lung wet/dry weight ratio in a dose-dependent manner and suppress the activity of MMP-9 and MMP-2 in plasma. Moreover, lidocaine also markedly inhibited LPS-induced upregulation of p-p38 in a dose-dependent manner. In conclusion, lidocaine alleviated LPS-induced acute lung injury by suppressing MMP-9 and MMP-2 activity.

Key words lidocaine; lipopolysaccharide; acute lung injury; matrix metalloproteinases

This study was supported by the Major Project of "Science and Technology Innovation Fund" of Nanjing Medical University (No. 2017NJMUCX004), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161033).

脓毒症是一种由感染引起的全身性炎症反应综合征, 可导致多器官损害并危及生命。而脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为革兰阴性菌细胞壁外壁的组成成分, 是诱导脓毒症产生的关键因素之一^[1]。其中, 急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是脓毒症患者最常见的并发症及主要死亡原因^[2], 病死率高达 30% ~ 50%^[3], 是 ALI 患者需要重症监护住院和死亡的主要原因^[4]。因此, 寻找有效的治疗策略具有重要临床意义。

目前 ALI 的发病机制因其复杂性还未完全阐明。研究发现, ALI 在分子水平上表现为多种炎性因子和炎症介质的过度释放、促炎-抗炎反应失衡, 导致全身过度失控的炎症反应聚集在肺部^[5]。研究证实, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在肺损伤的发病过程中发挥了重要的作用^[6]。

MMPs 是一类锌依赖的肽链内切酶, 可由多种细胞产生并参与一系列生理过程, 其中 MMP-2 和 MMP-9 是研究最多的两种。MMP-2 和 MMP-9 目前已被发现在 ALI、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺纤维化、疼痛和心肌间质重构中发挥重要作用^[7-11]。有研究报道, 脓毒性休克继发 ARDS 的患者支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 MMP-9 水平高于正常对照组^[12]。此外多篇研究还发现, MMPs 抑制剂在肺损伤的实验模型中具有保护作用。例如, 在 LPS 诱发的 ALI 动物实验中, 多西环素可通过减弱 MMP-9 和 MMP-2 的活性改善肺损伤^[13]。Carney 等^[14]在内毒素诱发 ARDS 的猪模型中也发现, 预防性使用一种强效的 MMPs 抑制剂——化学修饰的四环素 3(COL-3), 通过降低 LPS 诱导的 BALF 中 MMP-9 和 MMP-2 浓度的增加减轻肺损伤。因此, MMP-9 和 MMP-2 成为极具吸引力的靶标。但目前 MMPs 抑制剂的研究还处于发展阶段, 其不良反应限制了它们的应用, 尚无安全的 MMPs 抑制剂可以用于临床。

利多卡因是临幊上常用的局麻药, 广泛应用于局部神经阻滞和抗心律失常, 价格便宜, 安全度高。许多研究表明, 利多卡因具有显著的抗炎作用。多项研究提示, 利多卡因在 ALI 的动物模型中具有较好的组织保护作用, 能够减轻高浓度氧和内毒素引起的肺损伤^[15], 但是机制不明。因

此, 本研究拟探讨利多卡因通过抑制血浆中 MMP-9 和 MMP-2 的活性而改善 LPS 诱导的 ALI 的可能性和作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

LPS(美国 Sigma 公司); 盐酸利多卡因注射液(湖北天药药业股份有限公司); β -actin 抗体(鼠源, 1: 1 000 稀释)(美国 Santa Cruz 公司); 兔源 p-p38 抗体(1: 1 000 稀释); 羊抗兔二抗(1: 4 000 稀释)、羊抗鼠二抗(1: 4 000 稀释)(美国 Cell Signaling Technology 公司); 一次性使用抗凝管(含 EDTA · K₂, 江苏新康医疗器械有限公司); 其他化学试剂均来源于上海沪试公司。

1.2 仪器

MiniProtean 4 电泳仪、Quantity One 4.6.5 分析软件、ChemiDoc XRS + 化学发光仪(美国 Bio-Rad 公司); 超纯水机(UPH-IV-10T, 成都超纯科技有限公司)。

1.3 动物

健康成年雄性 ICR 小鼠, 清洁级, 体质量(20 ± 2)g, 8 ~ 9 周龄, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号: 20180006007607, 使用许可证号: SCXK(沪)2018-0006。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将雄性 ICR 小鼠随机分为空白对照组、急性肺损伤模型组、模型利多卡因治疗组(2、4 和 8 mg/kg 3 种剂量)、单独给予利多卡因组(8 mg/kg, iv), 每组 8 只。空白对照组不作任何处理。急性肺损伤模型组: 腹腔注射 LPS 10 mg/kg; 模型利多卡因治疗组: 造模前 30 min 分别尾静脉注射 2、4 和 8 mg/kg 3 种剂量的利多卡因, 每 12 小时 1 次, 连续注射 3 d; 单独给予利多卡因组: 在基础情况下尾静脉注射 8 mg/kg 利多卡因, 每 12 小时 1 次, 连续注射 3 d。按照实验需求, 分别观察小鼠 7 d 生存率。

2.2 肺的湿重/干重比

为了进一步研究利多卡因在 ALI 中作用, 取 18 只 ICR 小鼠, 分组同上, 尾静脉注射不同剂量的

利多卡因(2、4 和 8 mg/kg)预处理 30 min 后,再腹腔注射 LPS 刺激 12 h 诱导 ALI^[16]。小鼠经颈动脉采血处死后,开胸取左右两肺,吸干表面水分,去除支气管后称湿重,再置 60 ℃烘箱中干燥 72 h 至重量不再变化,称干重,计算肺组织湿重/干重比,估计肺组织的水肿程度。

2.3 Western blot 法检测 p-p38 蛋白的变化情况

提前 30 min 尾静脉注射不同剂量的利多卡因(2、4 和 8 mg/kg)后,给予小鼠 LPS 造模 12 h,使用 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉(100 mg/kg),左肺上部切取一小块组织。按每 20 mg 肺组织加入 RIPA 强裂解液 150 μL,处理样品,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转移至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭液室温封闭 2 h,加入抗 p-p38 的一抗(1:1 000),4 ℃ 摆晃过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min,加入二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,显色。以 β-actin(1:5 000)为内参。采用 Quantity One 软件进行数据分析。

2.4 明胶酶谱法检测 MMP-9 和 MMP-2 的活力

利多卡因(2、4 和 8 mg/kg,iv)提前 0.5 h 给药后,小鼠腹腔注射 LPS,经 12 h 后,眼眶取血,3 000 r/min,4 ℃,离心 10 min 取上层血浆。用超纯水稀释 30 倍后,加上样缓冲液,涡旋混匀,在分离胶中加入 0.1% 明胶,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并对分离胶进行洗脱、孵育,用 1% 考马斯亮蓝染色,经脱色后,使用化学发光仪采集图像。

2.5 数据统计

采用 SPSS 12.0 统计学软件对研究数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以百分率(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 利多卡因对 LPS 介导的小鼠急性肺损伤生存率的影响

如图 1 所示,利多卡因能有效提高 ALI 小鼠生存率。LPS 组和 LPS + 2 mg/kg 利多卡因组小鼠 4 d 内全部死亡。但当小鼠分别接受 4 和 8 mg/kg 利多卡因处理时,7 d 生存率显著提高。其中 8 mg/kg 剂量组 7 d 生存率达到 37.5%,而单独给予利多卡因则不会引起小鼠死亡。

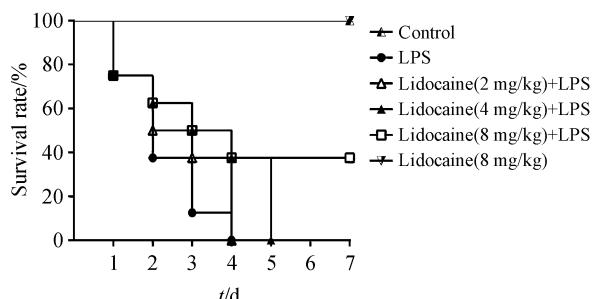


Figure 1 Effects of lidocaine on survival rate of acute lung injury (ALI) mice. Pretreatment with lidocaine could significantly increase the survival rate of ALI mice ($n=8$)

LPS:Lipopolysaccharide

3.2 利多卡因对肺组织湿/干重比的影响

各组小鼠 72 h 肺组织湿/干重比(W/D)变化如图 2 所示。与对照组相比,LPS 组小鼠的肺组织湿/干重比明显增大。与 LPS 组相比,利多卡因给药组的肺组织湿/干重比减小,其中利多卡因 8 mg/kg 剂量组的肺组织湿/干重比与 LPS 组相比显著降低($P < 0.05$)。

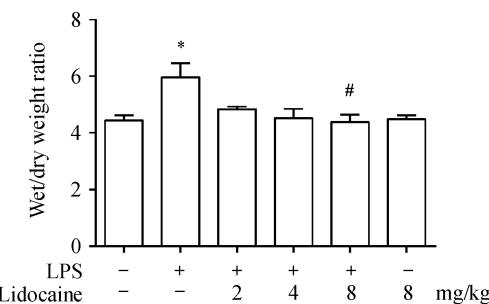


Figure 2 Effects of lidocaine on wet/dry (W/D) weight ratio of lung tissues. The lung W/D ratio was evidently reduced in lidocaine (8 mg/kg) treatment group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group

3.3 利多卡因对 ALI 小鼠肺组织 p38 磷酸化水平的影响

如图 3 所示,与对照组相比,LPS(给药后 12 h)能够显著增加 p38 的磷酸化水平,而利多卡因能够剂量依赖性地抑制急性肺损伤后小鼠肺部 p-p38 的高表达(与 LPS 组相比, $P < 0.05$),其中 8 mg/kg 利多卡因抑制作用最为显著。

3.4 利多卡因对 ALI 小鼠血浆中 MMP-9 和 MMP-2 活性的影响

由图 4 可知,LPS 组小鼠血浆中 MMP-9 和 MMP-2 的活性显著升高(与空白对照组相比, $P < 0.05$)。而尾静脉注射 8 mg/kg 利多卡因能够显著抑制小鼠血浆中 MMP-9 和 MMP-2 的活性(与 LPS

组相比, $P < 0.05$), 其对 MMP-9 和 MMP-2 的抑制率分别为 74% 和 30%。

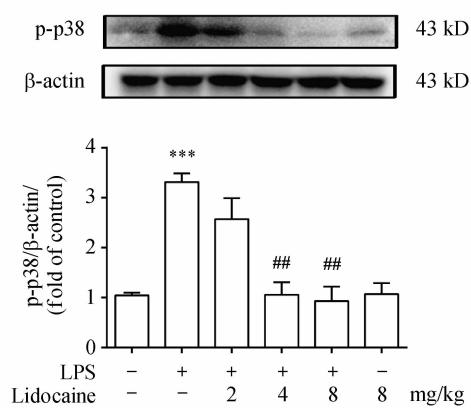


Figure 3 Effects of lidocaine on p38 phosphorylation in lung tissues of ALI mice. Lidocaine decreased LPS-induced upregulation of p38 in lung tissues of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

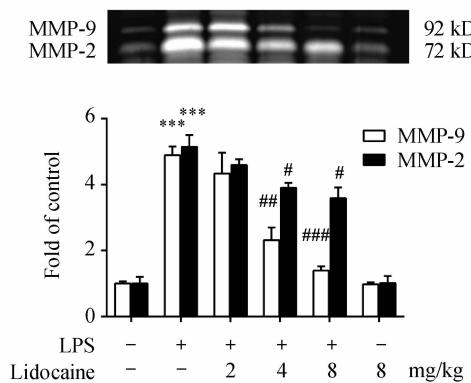


Figure 4 Effects of lidocaine on MMP-9 and MMP-2 activity in plasma. Lidocaine significantly attenuated LPS-induced the upregulation of MMP-9 and MMP-2 in plasma ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

4 讨 论

ALI 是脓毒症发病时出现最早、发生率最高的并发症, 可导致威胁生命的呼吸衰竭, 病死率极高。目前针对脓毒症肺损伤的主要治疗措施包括早期目标治疗、肺保护性通气治疗、小剂量糖皮质激素治疗、抗凝治疗、吸入一氧化氮等血管扩张剂治疗等, 但其病死率仍居高不下。有研究表明, 利多卡因预先给药能够减轻内毒素性急性肺损伤^[15], 但机制不明。在本研究中, 使用腹腔内注射 LPS 诱导 ALI 小鼠模型来研究利多卡因对 ALI 的影响。结果发现利多卡因显著提高了小鼠存活率, 减轻了

肺水肿, 并剂量依赖性地下调 p-p38、MMP-9 和 MMP-2 等促炎性介质的水平。结果表明, 利多卡因对 LPS 诱导的 ALI 小鼠具有保护作用。

过去的研究发现, 在脓毒症诱导的肺损伤中, 中性粒细胞大量浸润, 并显著激活 MMP-9^[17]。在本实验中, 给予 LPS 后能够显著提高小鼠血浆中 MMP-9 和 MMP-2 的活性。前期的研究表明, MMP-9 在肺组织中浓度越高, 肺损伤度也越严重, 而 MMPs 抑制剂在肺损伤的实验模型中具有保护作用^[13-14]。本课题组已经证明, 给予 MMP-9 抑制剂多西环素可以改善百草枯导致的急性肺损伤^[7]。这些研究均说明 MMP-9 和 MMP-2 与 ALI/ARDS 的发病机制密切相关。

本研究还发现, 利多卡因能够显著抑制 LPS 诱导的 MMP-9 和 MMP-2 的活性上升, 并且对 MMP-9 的抑制效果要优于 MMP-2。根据实验室之前的研究^[7], 推测 MMP-9 可能主要参与了 LPS 诱导的急性肺损伤期, 而 MMP-2 主要参与了之后的修复和纤维化期。以往的研究也发现, 利多卡因能够负性调节 LPS 介导的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 信号的激活, 而 TLR4 信号的激活是给予 LPS 后快速诱导 p-p38 表达水平增加的核心机制^[18]。本研究结果发现, 利多卡因能够剂量依赖性抑制 LPS 诱导的肺组织中 p-p38 的激活。提示利多卡因可能通过抑制 TLR4 信号, 进而抑制 MMP-9 和 MMP-2 的激活从而改善脓毒症诱导的急性肺损伤。

利多卡因属于酰胺类局部麻醉药, 在种类繁多的抗心律失常药物分类中属于轻度阻滞 Na 离子通道的 I b 类药物。近年来由于对其药理作用的深入研究, 使其在临床许多学科中的应用有了新进展。例如治疗哮喘持续状态、癫痫、惊厥、脑缺血与脑保护、呃逆等。目前临床应用利多卡因抗心律失常的推荐剂量为首次剂量 1.0 ~ 1.5 mg/kg 静脉注射, 若需第 2 次给药, 剂量为 0.50 ~ 0.75 mg/kg^[19]。经过换算, 最高给药剂量在临床给药范围内, 具有较好的安全性。

综上所述, 利多卡因能够通过抑制血浆中 MMP-9 和 MMP-2 的活性减轻 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤, 提示其在临幊上可能具有抗急性肺损伤的作用, 为临幊预防和治疗 ALI 提供了新的思路。

參考文獻

- [1] Hung YL, Fang SH, Wang SC, et al. Corylin protects LPS-induced sepsis and attenuates LPS-induced inflammatory response [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46299.
- [2] Hirano Y, Aziz M, Yang WL, et al. Neutralization of osteopontin attenuates neutrophil migration in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2015, 19(1):53.
- [3] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2731–2740.
- [4] Rhee C, Dantes R, Epstein L, et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009–2014 [J]. *Jama*, 2017, 318(13):1241–1249.
- [5] Keck T, Balcom JH, Fernández-del Castillo C, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(1):188–201.
- [6] Sen AI, Foronjy RF, Shiomi T, et al. Loss of MMP-13 delays inflammatory response after acute hyperoxic lung injury [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(3):360–361.
- [7] Zhang F, Hu L, Wu YX, et al. Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 243–251.
- [8] Zinter MS, Delucchi KL, Kong MY, et al. Early plasma matrix metalloproteinase profiles. A novel pathway in pediatric acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(2):181–189.
- [9] Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology [J]. *Exp Lung Res*, 2005, 31(6):599–621.
- [10] Fan YX, Liu HJ, Li YX, et al. Quercetin ameliorates postoperative pain by suppressing matrix metalloproteinase in microglia [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, 48(3):343–347.
- [11] Xu XL, Ji H, Gu SY, et al. Effects of astragaloside IV on experimental ventricular remodeling in mice and its mechanism from matrix metalloproteinase aspect [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, 41(1):70–75.
- [12] Ricou B, Nicod L, Lacraz S, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(2 Pt 1):346–352.
- [13] Fujita M, Harada E, Ikegami S, et al. Doxycycline attenuated lung injury by its biological effect apart from its antimicrobial function [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20(6):669–675.
- [14] Carney DE, McCann UG, Schiller HJ, et al. Metalloproteinase inhibition prevents acute respiratory distress syndrome [J]. *J Surg Res*, 2001, 99(2):245–252.
- [15] Zhang Z, Zhou J, Liao C, et al. RAGE deficiency attenuates the protective effect of Lidocaine against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Inflammation*, 2017, 40(2):601–611.
- [16] Zhang H, Sha J, Feng X, et al. Dexmedetomidine ameliorates LPS induced acute lung injury via GSK-3β/STAT3-NF-κB signaling pathway in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74:105717.
- [17] Vassallo A, Wood AJ, Subburayalu J, et al. The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome [J]. *Br Med Bull*, 2019, 131(1):43–55.
- [18] Chen LJ, Ding YB, Ma PL, et al. The protective effect of lidocaine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through NF-κB and p38 MAPK signaling pathway and excessive inflammatory responses [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(7):2099–2108.
- [19] Shang N, Zhou RB. Interpretation of the updates in the use of antiarrhythmic drugs during resuscitation of patients with VF/pVT cardiac arrest or immediately after ROSC in 2018 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations [J]. *Chin General Practice* (中国全科医学), 2019, 22(20):2393–2397.