闫祎炜,江莲,李梅,等. MMP-9、TIMP-1 水平变化参与 FIRS 早产儿心肌损伤的机制研究［J］. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 55-61.
Yan YW, Jiang L, Li M, et al. Study on the mechanism by which MMP-9 and TIMP-1 levels are involved in myocardial injury in premature infants with FIRS［J］. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 55-61.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2022.06.008

MMP-9、TIMP-1 水平变化参与 FIRS 早产儿心肌损伤的机制研究

闫祎炜[1],江　莲[1*],李　梅[1],张文浩[1],张文婷[1],王晓玲[2],张原苏[1],张会芬[1]

(1. 河北医科大学第四医院儿科,石家庄　050000;2. 河北医科大学第四医院病理科,石家庄　050000)

【摘要】　目的　通过临床研究及构建小鼠胎儿炎症反应综合征(fetal inflammatory response syndrome,FIRS)模型,探究早产儿 FIRS 体内 MMP-9/TIMP-1 表达水平变化参与 FIRS 引发心肌损害的可能机制及其潜在药物的发掘。**方法**　本研究分为临床观察和动物实验两部分。临床部分:纳入 2018 年 5 月至 2019 年 12 月于河北医科大学第四医院生产的全部早产儿 118 例作为研究对象,根据是否诊断 FIRS 分为 FIRS 组(n=61)和非 FIRS 组(n=57),比较两组患儿 IL-6、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1(M/T)比值水平及心肌损伤发生情况。动物部分:构建 FIRS 小鼠模型,根据不同药物干预方式,分为 FIRS 组、RA 组、对照组,留取 3 组小鼠心脏及胎盘组织,观察心脏及胎盘组织病理改变及心脏组织中 IL-6、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1(M/T)比值水平变化。**结果**　临床部分:FIRS 组 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值分别为(38.53±9.01)pg/L、(42.27±12.53)ng/L、(110.48±17.06)ng/L、(38.30±9.93)%,显著高于非 FIRS 组,差异具有统计学意义(P<0.05);FIRS 组心肌损伤率(27.87%)显著高于非 FIRS 组(5.26%),差异具有统计学意义(P=0.001)。动物部分:FIRS 组小鼠心肌组织明显水肿、心室壁变薄,RA 干预后心脏结构变化程度减轻。不同时间点 FIRS 组小鼠 IL-6、MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组(P<0.05);RA 干预后,相同时间节点 IL-6、MMP-9 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组(P<0.05),但是低于 FIRS 组(P<0.05)。**结论**　FIRS 可通过释放 IL-6,调节 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值水平,介导早产儿心肌损伤的发生,应用 MMP-9 抑制类药物可在心肌损伤过程中发挥保护作用,为发掘临床潜在治疗药物提供线索。

【关键词】　胎儿炎症反应综合征;心肌损伤;金属基质蛋白酶-9;金属蛋白酶组织抑制因子-1;白介素-6
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2022) 06-0055-07

Study on the mechanism by which MMP-9 and TIMP-1 levels are involved in myocardial injury in premature infants with FIRS

YAN Yiwei[1], JIANG Lian[1*], LI Mei[1], ZHANG Wenhao[1], ZHANG Wenting[1], WANG Xiaoling[2], ZHANG Yuansu[1], ZHANG Huifen[1]

(1. Department of Pediatrics, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China.
2. Department of Pathology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

[**基金项目**]2017 年河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(冀财社[2017] 46 号);2016 年河北省医学科学研究重点课题计划(20160163)。
[**作者简介**]闫祎炜(1990—),女,硕士研究生,研究方向:儿科学。E-mail:yanyiwei2012@126.com
[**通信作者**]江莲(1961—),女,主任医师,研究方向:儿科学。E-mail:jianglianerke@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore, by constructing a mouse fetal inflammatory response syndrome (FIRS) model, the possible mechanism by which MMP-9/TIMP-1 expression in premature infants with FIRS induces myocardial damage and potential drugs against this. **Methods** This study was divided into two parts: clinical observation and animal experiment. In part 1, a total of 118 premature infants who were in the Fourth Hospital of Hebei Medical University during the period from May 2018 to December 2019 were included as the study participants. According to whether FIRS was diagnosed, they were divided into the FIRS group ($n=61$) and control group ($n=57$). The levels of IL-6, MMP-9 and TIMP-1, the MMP-9/TIMP-1 (M/T) ratio, and the occurrence of myocardial injury were compared between the two groups. For part 2 (the animal experiment), FIRS mice were constructed and divided into the following three drug intervention groups: FIRS group, RA(retinoic acid)group, and control group. Heart tissue was collected from the mice in these groups and used to detect the IL-6, MMP-9 and TIMP-1 levels and the M/T ratio. **Results** The IL-6, MMP-9 and TIMP-1 levels and M/T ratio in the FIRS group were: (38.53±9.01) pg/L, (42.27±12.53) ng/L, (110.48±17.06) ng/L and (38.30±9.93)%, respectively; these values were significantly higher ($P<0.05$) than those in the non-FIRS group. The myocardial injury rate was significantly higher ($P=0.001$) in the FIRS group (27.87%) than in the non-FIRS group (5.26%). In the myocardial tissue of mice in the FIRS group, there were significant levels of edema, the ventricular wall became thinner, and the degree of cardiac structure changes was reduced by RA intervention. The IL-6, MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression levels and M/T ratios in the FIRS group at different timepoints were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), whereas the the mRNA expression of IL-6 ,MMP-9 levels and M/T ratios in the RA group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$) but were lower than those in the FIRS group ($P<0.05$). **Conclusions** FIRS can mediate the occurrence of heart injury in premature infants by releasing IL-6 and by regulating the levels of MMP-9 and TIMP-1 and the M/T ratio. The application of RA can play a protective role in the process of heart injury and could be a potential drug for providing clinical treatment of FIRS.

【Keywords】 FIRS; myocardial damage; MMP-9; TIMP-1; IL-6

心肌损害是胎儿炎症反应综合征(fetal inflammatory response syndrome, FIRS)的并发症之一,在成人研究中近 40%脓毒症患者可出现不同程度心肌损伤[1]。心肌损伤起病隐匿,临床表现多样,早期无特异性预测指标,容易漏诊,以致延迟治疗、预后不良。心肌损伤在早产儿中发病率约 30%左右,而在 FIRS 早产儿中可上升至 46.8%,严重者可并发心律失常(发生率约 4.28%),死亡率 0.6%~1%[2]。因此,FIRS 患儿心肌损伤的早期诊断尤为重要,部分学者积极探寻高诊断效能的心肌损伤标志物[3]。但是,FIRS 所致心肌损伤具体机制及特异性治疗药物尚无明确结论。既往文献表明,脓毒症大鼠模型中,可检测到心脏组织基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein 9, MMP-9)水平显著升高,并上调肌钙蛋白酶,过度降解肌钙蛋白,诱发心肌损伤[4]。虽然 FIRS 与全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的病程进展相近,但是 MMP-9 及其抑制剂金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的水平变化是否参与 FIRS 介导的心肌损伤尚不明确。本研究临床验证 MMP-9 及 TIMP-1 表达水平,并构建 FIRS 小鼠模型,探寻 FIRS 诱发心肌损害的具体机制,为临床诊治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

采用清洁级 10 周龄 KM 小鼠 45 只购自河北省实验动物中心[SCXK(冀)2018-004],雄鼠 15 只,体重分布 35~40 g,雌鼠 30 只,体重分布 30~35 g。饲养和实验于河北医科大学第四医院动物实验中心[SYXK(冀)2018-001],本实验符合 3R 原则,经河北医科大学第四医院实验动物伦理委员会审核通过(IACUC-4th Hos Hebmu-2019006)。

1.1.2 研究人群

本临床部分研究人群和作者既往发表论文《FIRS 早产儿脐血 MMP-9、TIMP-1 水平变化及其与肺损伤关系的研究》相同,但是研究方向不同[5]。研究人群纳入连续生产的早产儿共 118 例,纳入时间区间为 2018 年 5 月到 2019 年 12 月。依据是否符合 FIRS 诊断标准[6]分为 FIRS 组($n=61$)和非 FIRS 组($n=57$)。其中 FIRS 组男性 32 人,女性 29 人,平均孕周为(29.35±1.44)周,出生体重为(1489±178)g,1 min Apgar 评分为(7.28±

1.42)分,5 min Apgar 评分为(8.59±1.39)分,10 min Apgar 评分为(9.01±1.26)分;非 FIRS 组男性 30 人,女性 27 人,平均孕周为(29.29±1.51)周,出生体重为(1482±169)g,1 min Apgar 评分为(7.32±1.34)分,5 min Apgar 评分为(8.72±1.26)分,10 min Apgar 评分为(9.12±1.32)分。两组新生儿基线资料无统计学差异($P>0.05$)。研究方案经河北医科大学医学伦理委员会审核通过(2020004)。

1.2 主要试剂与仪器

人血清 ELISA 试剂盒(IL-6、MMP-9、TIMP-1、CRP),来源中国艾莱萨生物科技有限公司;维甲酸(retinoic acid,RA),来源中国山东良福制药;脂多糖(lipopolysaccharide,LPS),来源美国 Sigma 公司;瑞姬氏染色液,来源中国温州康泰生物科技公司。离心机(YXI-2),来源日本三洋公司,超低温冰箱购(-80℃),来源日本 SANYO 公司;显微镜(CX-21)来源日本 OLYPUS 公司;荧光定 PCR 仪(型号:Mx3000P),来源美国 Agilent 公司;全自动酶标检测仪,来源美国 VERS Amax 公司;电热恒温水浴箱(型号:JY-17-1),来源中国上海森信实验有限公司;蛋白分析(型号:Au2700),来源日本 OLYPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 临床实验部分

通过 ELLSA 法检测脐血中的白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein-9,MMP-9)水平。所有入组新生儿通过病房治疗及门诊定期随访,每周随访 1 次,随访至出生后 28 d,明确是否发生心肌损伤结局。

新生儿心肌损伤诊断标准参照[7]执行,共纳入包括心肌酶、肌钙蛋白在内的两个必要诊断指标,以及心电图、超声心动图两个辅助诊断指标。详见如下:①心肌酶升高(天冬氨酸转移酶>25 U/L 和/或乳酸脱氢酶>407 U/L 和/或肌酸激酶>725 U/L 和/或肌酸激酶同工酶>39 U/L);②肌钙蛋白升高(心肌肌钙蛋白 I>1.12 μg/L 和/或心肌肌钙蛋白 T>0.14 μg/L);③心电图异常(心动过缓、心律不齐等改变);④超声心动图异常(心脏收缩功能和射血功能减退等)。

1.3.2 动物实验部分

(1)实验分组

实验分组根据是否为 FIRS 小鼠及不同药物干预,随机分为 3 组,详细如下:FIRS 组为 LPS 构建 FIRS 小鼠(模型构建详见下文)组、RA 组为 FIRS 小鼠+RA 组、NS 组为非 FIRS 组(空白对照,生理盐水)。

(2)构建 FIRS 小鼠动物模型

FIRS 小鼠动物模型构建 FIRS 小鼠模型构建参考国外学者[8-9]进行。饲养 1 周将雌雄小鼠按 2∶1 合笼,次日观察到阴栓的雌鼠视为怀孕第 1 天。孕 15 d 时对 FIRS 组及 RA 组小鼠进行羊膜囊内注射 LPS(USA,sigma,0.25~2.5 μg/sac),总量不超过 100 μg/kg,NS 组注射等量生理盐水。注药后观察孕鼠感染、流产等征象,其中流产率 10.00%。建模成功标志:孕鼠分娩后进行胎盘组织镜下观察,可见炎细胞大量浸润、正常绒毛结构消失,伴随水肿及部分纤维化。本实验小鼠建模成功建模成功率为 83.73%。

(3)药物干预

药物干预对上述 3 组小鼠进行不同干预,RA 组建模成功后于孕 17 d 开始,通过 MMP-9 抑制剂维甲酸(retinoic acid,RA)(山东良福制药)灌胃,剂量 50 μg/(kg·d),至分娩。FIRS 组、NS 组在孕 17 d 使用和 RA 组等量生理盐水(normal saline,NS)灌胃,至分娩。

(4)留取标本

组织留取及指标观察从 3 组中各随机取 3 只孕 19 d 孕鼠,行剖宫产手术,留取胎鼠的胎盘、心脏组织,余孕鼠待自然分娩,分别于产后 1、7、14 d 处死仔鼠(每组每时间点 $n=10$ 只),均留取心脏组织,部分甲醛溶液中固定后石蜡包埋用于 HE 染色,余于液氮中迅速冷冻后置-80℃保存用以 RT-PCR 检测。

(5)HE 染色观察心肌病理损伤

胎盘及小鼠心脏组织 HE 染色镜检:采集的胎盘及心脏组织中性甲醛中固定 4 h 后进行制片、HE 染色。

(6)RT-PCR 检测 IL-6、MMP-9 及 TIMP-1 表达量

小鼠心脏组织中 IL-6、MMP-9 及 TIMP-1 表达量的 RT-PCR 测定:将留取的心脏组织中提取总 RNA,并进行 RNA 纯度及完整性测定。样本进行反转录,其中引物设计如表 1。并进行实时荧光定量 PCR 扩增,读取相对表达量。

1.4 统计学方法

数据通过 SPSS(21.0,IBM)及 R 软件

(RStudio 2021.09.0 Build 351)进行统计分析,相关矩阵图通过 R 软件(RStudio 2021.09.0 Build 351)进行绘制。计量资料采用 t 检验进行分析,多组均数的比较采用重复测量方差分析,相关性分析采用 Spearman's 线性相关。计数资料比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法进行。$\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 早产儿脐血中 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值表达水平

FIRS 组 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值分别为(38.53±9.01)pg/L、(42.27±12.53)ng/L、(110.48±17.06)ng/L、(38.30±9.93)%和非 FIRS 组(对照组)比较,均高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),详见表 2。

表 1 相关指标扩增引物序列

Table 1 Amplification primer sequence of related indicators

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增片段长度(bp) Amplified fragment length
内参 β-Action	F:GGGAAATCGTGCGTGAC R:AGGCTGGAAAAGAGCCT	176
白介素-6 IL-6	F:GCCTTCCCTACTTCACAA R:CAACTCTTTTCTCATTTCCAC	138
基质金属蛋白酶-9 MMP-9	F:TCACTTTCCCTTCACCTTC R:ATTTGCCGTCCTTATCGT	113
基质金属蛋白酶抑制剂-1 TIMP-1	F:TCTGGCATCCTCTTGTTG R:GGTGGTCTCGTTGATTTCT	144

2.2 不同组别早产儿心脏损伤结局比较

随访期间,FIRS 组患儿心肌损害发生 17 例,非 FIRS 组心肌损伤发生 3 例,FIRS 组心肌损伤率(27.87%)显著高于非 FIRS 组(5.26%),差异具有统计学意义($P=0.001$),详见表 3。

2.3 胎/仔鼠心脏病理组织改变

分别在小鼠孕 19 d、产后 1 d、产后 7 d、产后 14 d 4 个时间节点获取胎/仔鼠心脏标本,制备 HE 染色组织切片。结果显示:结果可见 FIRS 组心肌组织可见明显出血灶及水肿,心室壁变薄;RA 干预后与 FIRS 组病变相似心脏结构变化,但是程度明显减轻,NS 组未见明显心脏组织结构改变,见图 1。

2.4 不同日龄组别胎/仔鼠心脏组织 IL-6、MMP-9、TIMP-1 表达水平

FIRS 组小鼠在孕 19 d、产后 1 d、产后 7 d、产后 14 d 4 个时间节点 IL-6、MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组,差异具有统计学意义,$P<0.05$。RA 组通过 RA 干预后,相同时间节点 IL-6、MMP-9 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组($P<0.05$),但是低于相同时间节点的 FIRS 组($P<0.05$),详见表 4。

表 2 不同组别脐血 IL-6、MMP-9、TIMP-1、M/T 比值水平比较($n=118$)

Table 2 Comparison of cord blood IL-6, MMP-9, TIMP-1, M/T ratio levels in different groups

组别 Groups	IL-6 (pg/L)	MMP-9(ng/L)	TIMP-1 (ng/L)	M/T 比值(%) M/T rate
非 FIRS 组($n=57$) Non-FIRS group	4.45±1.00	3.43±1.95	39.72±24.86	10.48±4.49
FIRS 组($n=61$) FIRS group	38.53±9.01*	42.27±12.53*	110.48±17.06*	38.30±9.93*

注:与非 FIRS 组比较,*$P<0.05$。

Note. Compared with non-FIRS group, *$P<0.05$.

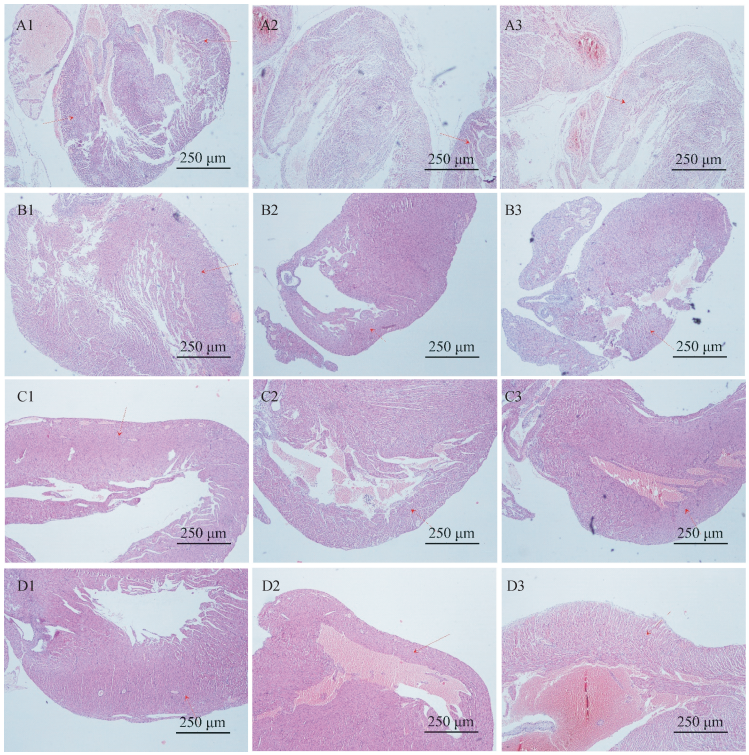
表 3 不同组别新生儿心肌损伤发生率比较($n=118$)

Table 3 Comparison of incidence rates of neonatal myocardial injury in different groups

组别 Groups	心肌损害 Occurrence	无心肌损害 Nonoccurrence	总例数 Total	比值(%) Rate
非 FIRS 组($n=57$) No-FIRS group	3	54	57	5.26
FIRS 组($n=61$) FIRS group	17	44	61	27.87*

注:与非 FIRS 组比较,*$P<0.05$。

Note. Compared with non-FIRS group, *$P<0.05$.

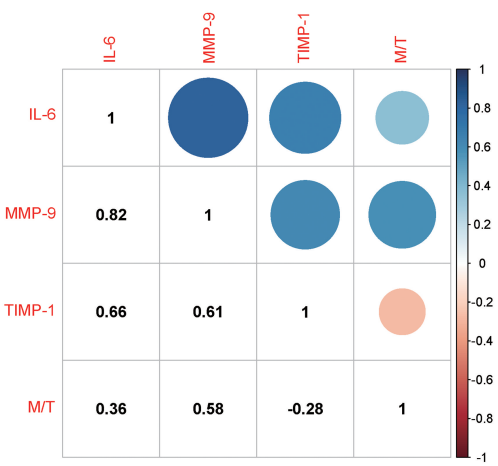


注：A1～D1：对照组（NS 组）孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织；A2～D2：FIRS 组孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织；A3～D3：RA 组孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织。红色箭头所标注的的位置：病理表现典型部位；其中 A2 和 A3 箭头所指的为同一张载玻片上两枚不同的心脏，A2：FIRS 组，A3：RA 组。

图 1　不同时间点胎/仔鼠心脏组织切片图（HE 染色）

Note. A1～D1, Control group (NS group) mouse heart tissue at 19 days of gestation, 1, 7, and 14 days after delivery. A2～D2, FIRS group at 19 days of gestation, 1 after delivery heart tissue of mice at day 7, 14 days after delivery. A3～D3, RA group mouse heart tissue at 19 days of gestation, 1, 7, and 14 days after delivery. The positions marked by the red arrows, Typical parts of pathological manifestations. Arrows of A2 and A3 point to two different hearts on the same slide, A2, FIRS group. A3, RA group.

Figure 1　Tissue sections of fetal/offspring hearts at different time points (HE staining)



注：蓝色圆点：正相关；红色圆点：负相关；坐下角数字：相关系数。

图 2　小鼠心脏组织中 IL-6 与 MMP-9、TIMP-1 及 MMP-9 / TIMP-1 比值相关矩阵图

Note. Blue dot, Positive correlation. Red dot, Negative correlation. Number of sitting angles, Correlation coefficient.

Figure 2　Correlation matrix of IL-6 with MMP-9, TIMP-1 and MMP-9 / TIMP-1 ratio in mouse heart tissue

2.5　FIRS 小鼠心脏组织 IL-6 与 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 的相关性分析

对 FIRS 小鼠心脏组织中 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 进行相关性分析，结果显示：IL-6 与 MMP-9［$r_{MMP-9}=0.82$，95% CI（0.69，0.90）］、TIMP-1［$r_{TIMP-1}=0.66$，95% CI（0.44，0.81）］及 M/T［$r_{M/T}=0.36$，95% CI（0.06，0.61）］呈正相关，见图 2。

3　讨论

FIRS 是胎儿时期较为严重的炎症反应疾病，其主要机制为胎儿体内大量炎症因子释放，并激活体内不可控炎症级联反应，最终可能导致患儿的不同脏器损伤[10]。Tang 等[11]人进行的一项纳入了 10 项研究共计 1116 例患者的 Meta 分析，评价了 FIRS 导致的新生儿不良结局，结果显示：FIRS 可导致新生儿早发败血症（neonatal early-onset sepsis，EOS）、支气管肺发育不良（bronchopulmonary dysplasia，

表 4 不同组别不同胎龄下指标表达量比较($n=10$)

Table 4 Comparison of index expression in different groups and gestational ages

	组别 Groups	IL-6 mRNA	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA	MMP-9/TIMP-1
G19	NS 组 NS group	1.05±0.40	0.70±0.15	1.57±0.41	0.47±0.17
	FIRS 组 FIRS group	10.49±1.10*	15.85±0.67*	4.90±0.55*	3.28±0.25*
	RA 组 RA group	6.98±0.96*#	6.43±0.83*#	3.52±0.49*#	1.85±0.27*#
P1	NS 组 NS group	0.51±0.24	0.63±0.22	2.11±0.56	0.33±0.14
	FIRS 组 FIRS group	9.53±1.10*	13.09±1.54*	5.40±0.79*	2.46±0.40*
	RA 组 RA group	4.07±0.78*#	3.69±0.65*#	2.84±0.76*#	1.36±0.32*#
P7	NS 组 NS group	0.53±0.11	0.50±0.13	1.24±0.24	0.40±0.08
	FIRS 组 FIRS group	7.44±0.68*	10.48±0.98*	4.20±0.44*	2.52±0.35*
	RA 组 RA group	3.58±0.94*#	3.53±0.31*#	2.74±0.53*#	1.34±0.32*#
P14	NS 组 NS group	0.46±0.09	0.44±0.11	0.96±0.10	0.45±0.11
	FIRS 组 FIRS group	6.74±0.69*	9.09±0.40*	3.46±0.57*	2.69±0.44*
	RA 组 RA group	2.87±0.89*#	3.36±0.59*#	2.06±0.46*#	1.67±0.98*#

注:与 NS 组比较,* $P<0.05$;与 FIRS 组比较,# $P<0.05$。

Note. Compared with NS group, * $P<0.05$. Compared with FIRS group, # $P<0.05$.

BPD)等相关疾病。此外,尚有报道证实 FIRS 可诱导新生儿的心肌损伤[2,12]。本研究结果也证实 FIRS 新生儿心肌损伤发生率为 27.87%,显著高于非 FIRS 组(5.26%)。

但是截至目前,FIRS 介导的心肌损伤具体分子机制,尚不明确。Mitchell 等[13]通过构建灵长类宫内感染模型,来探求 FIRS 患者所致心肌损伤的具体机制,结果显示:通过 PCR 技术共 609 个分子探针来鉴别心脏组织中差异表达的分子,其中 FIRS 组心脏组织中 IL-6 和白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)显著高于对照组。此外,炎症因子作为 FIRS 重要的致病机制已经成为共识,IL-6 水平变化值已经成为重要的诊断依据[7,14-17]。因此,炎症因子 IL-6 的升高,可能是 FIRS 导致心肌损伤的潜在病因。

但是 IL-6 是直接导致 FIRS 介导的心肌损伤,还是通过其他分子途径进行调节,其机制尚不明确。既往研究表明,炎性细胞因子 IL-6 可在炎症感染后发生结构改变,成为活化的前体物质并上调 MMP-9 表达。而 MMP-9 可促进炎性细胞的趋化、聚集,加速血管内皮 IV 型胶原纤维的降解,破坏脏器结构并加重炎症损伤[18]。本研究首先对 FIRS 新生儿和对照组进行了 IL-6、MMP-9 水平的检测,结果显示,FIRS 组中 IL-6 和 MMP-9 水平显著增加。笔者基于此,进一步设计动物实验,来探讨 IL-6 通过调节 MMP-9 表达水平介导 FIRS 所致心肌损伤的可能机制。

本研究通过羊膜囊注射 LPS 来构建小鼠 FIRS 模型。结果通过胎盘组织学检测,来判定建模的成功率,本研究建模成功率为 83.73%,和既往研究报道相仿[19-21]。本研究中,FIRS 组心脏组织 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值显著高于对照组,$P<0.05$。此外,人体内存在 MMP-9 天然抑制剂 TIMP-1,而结果显示 FIRS 组 M/T 比值显著高于对照组,这提示 MMP-9 在心肌损伤的结局中起到了关键性作用。而进一步的相关性分析结果显示,IL-6 水平的表达和 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值呈正相关,进一步验证了 IL-6 通过调节 MMP-9 发挥 FIRS 心肌损伤的机制。

维甲酸(RA)是维生素 A 的代谢中间产物,是已经上市获批肿瘤治疗的药物,研究表明 RA 具有抑制 MMP-9 表达的作用[22]。Axel 等[23]研究表明 RA 可显著降低血管内皮细胞 MMP-9 的表达水平,可逆转心血管疾病的进展。此外,阳双健等[24]研究发现维甲酸可下调 MMP-9 的表达,并进一步增强滋养层细胞侵袭及促血管形成能力。本研究通过应用 RA 来干预 FIRS 小鼠,结果显示 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值相较于 FIRS 组均有不同程度下降,P 均<0.05。结果提示,RA 能减轻小鼠体内的炎症反应,对炎症所致的心肌损伤起保护作用,MMP-9 抑制剂相关的药物有可能成为治疗 FIRS 早产儿心肌损伤的潜在药物。

综上所述:FIRS 可通过释放 IL-6,调节 MMP-9、TIMP-1 水平及 M/T 比值,介导早产儿心肌损伤的发生,应用 MMP-9 抑制剂相关药物可在心肌损伤过程中发挥保护作用,为临床提供潜在治疗药物。

参考文献:

[1] 甄军海, 李莉, 严静. 脓毒症心肌损伤生物标志物的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(7): 699-702.

[2] Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock [J]. Curr Opin Crit Care, 2009, 15(5): 392-397.

[3] Lund A, Giil LM, Slettom G, et al. Antibodies to receptors are associated with biomarkers of inflammation and myocardial damage in heart failure [J]. Int J Cardiol, 2018, 250: 253-259.

[4] 张召才, 严静, 蔡国龙, 等. 脓毒症大鼠心脏基质金属蛋白酶及其抑制物基因的表达变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1641-1643.

[5] 闫祎炜, 江莲, 李梅, 等. FIRS 早产儿脐血 MMP-9、TIMP-1 水平变化及其与肺损伤关系的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 35-41.

[6] Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The fetal inflammatory response syndrome [J]. Clin Obstet Gynecol, 2007, 50(3): 652-683.

[7] 薛丹, 陈贻骥. 新生儿心肌损伤诊断的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(9): 891-894.

[8] Rounioja S, Räsänen J, Glumoff V, et al. Intra-amniotic lipopolysaccharide leads to fetal cardiac dysfunction. A mouse model for fetal inflamm atory response [J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(1): 156-164.

[9] Liu SF, Yan Y. Animal models of pulmonary hypertension due to left heart disease. Anim Model Exp Med [EB/OL]. [2022-2-9]. https://onlinelibrary. wiley. com/doi/epdf/10. 1002/ame2. 12214.

[10] 唐秦, 邵勇. 胎儿炎症反应综合征研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2019, 46(1): 48-52.

[11] Tang Q, Zhang L, Li H, et al. The fetal inflammation response syndrome and adverse neonatal outcomes: a meta-analysis [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2021, 34(23): 3902-3914.

[12] Fukumoto K, Pierro A, Spitz L, et al. Differential effects of neonatal endotoxemia on heart and kidney carnitine palmitoyl transferase I [J]. J Pediatr Surg, 2002, 37(5): 723-726.

[13] Mitchell T, MacDonald JW, Srinouanpranchanh S, et al. Evidence of cardiac involvement in the fetal inflammatory response syndrome: disruption of gene networks programming cardiac development in nonhuman primates [J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 218(4): 438.

[14] Helmo FR, Alves EAR, Moreira RAA, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018, 31(9): 1227-1233.

[15] Vaisbuch E, Romero R, Gomez R, et al. An elevated fetal interleukin-6 concentration can be observed in fetuses with anemia due to Rh alloim munization: implications for the understanding of the fetal inflammatory response syndrome [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 24(3): 391-396.

[16] Jung E, Romero R, Yeo L, et al. The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2020, 25(4): 101146.

[17] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study [J]. JAMA, 1995, 273(2): 117-123.

[18] Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, et al. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation [J]. Am J Pathol, 2012, 180(5): 2028-2039.

[19] Ueda K, Cho K, Matsuda T, et al. A rat model for arrest of alveolarization induced by antenatal endotoxin administration [J]. Pediatr Res, 2006, 59(3): 396-400.

[20] Cao L, Wang J, Tseu I, et al. Maternal exposure to endotoxin delays alveolarization during postnatal rat lung development [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 296(5): L726-L737.

[21] 房晨阳, 周霞, 杨艳珍, 等. 重组 CC16 蛋白对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织结构及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 222-228.

[22] Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, et al. Retinoid-mediated suppression of tumor invasion and matrix metalloproteinase synthesis [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 878: 466-486.

[23] Axel DI, Frigge A, Dittmann J, et al. All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells [J]. Cardiovasc Res, 2001, 49(4): 851-862.

[24] 阳双健, 钟黎黎, 盛莹, 等. 全反式维甲酸通过调控 sFlt-1 表达对滋养层细胞侵袭及促血管形成能力的影响 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(15): 1928-1933.

〔收稿日期〕2021-12-13