

基质金属蛋白酶8抑制剂干预对脓毒症小鼠肠道菌群的影响

顾芳艳¹, 朱海燕², 彭耀军², 张立波³, 王书泽⁴, 石 轩⁴, 张蔓丽¹

¹解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心急诊医学科, 北京 100853; ³解放军总医院服务保障中心, 北京 100853; ⁴解放军总医院京中医疗区, 北京 100120

摘要: **背景** 基质金属蛋白酶8 (matrix metalloproteinase 8, MMP8)抑制剂可能是脓毒症的潜在治疗靶点, 目前国内关于MMP8抑制剂治疗脓毒症以及对小鼠肠道菌群影响的研究较少。**目的** 探讨脓毒症小鼠肠道菌群的构成特点以及MMP8抑制剂对脓毒症小鼠肠道菌群的影响, 并筛选差异性菌群。**方法** 6周龄SPF级C57BL/6J小鼠20只, 随机分为模型组、治疗组、假手术组和对照组, 每组各5只。治疗组和模型组小鼠打开腹腔暴露盲肠并在盲肠中点结扎穿刺以构建脓毒症模型, 假手术组小鼠打开腹腔暴露盲肠后收纳盲肠闭合腹腔。在造模前24 h, 治疗组和假手术组每隔12 h腹腔注射0.3 mg/kg的MMP8抑制剂, 对照组和模型组注射等体积的PBS缓冲液。术后24 h处死各组小鼠, 并分别收集各组小鼠结肠内容物进行16S rRNA基因的V3~V4区测序, 分析各组小鼠肠道菌群的 α -多样性、 β -多样性、菌群组成和差异菌的变化。**结果** 与模型组小鼠相比, 治疗组治疗后的扩增序列变异(amplicon sequence variants, ASVs)数量($P=0.029$)、Observed species指数($P=0.029$)、Chao1指数($P=0.028$)、Shannon指数($P=0.016$)升高。PCA($P=0.001$)、PCoA($P=0.001$)和NMDS($P=0.001$, Stress=0.13)分析结果显示, 治疗组和模型组菌群构成与对照组和假手术组聚类距离较远且无重叠, 治疗组在治疗后与模型组小鼠菌群构成有部分重叠。治疗组主要菌属为未分类鼠杆菌科、埃希菌-志贺菌属、肠杆菌属, 模型组主要菌属为联合乳杆菌属、埃希菌-志贺菌属、肠杆菌属。LEfSe分析发现治疗组的差异菌为肠杆菌属和克雷伯菌属, 模型组为埃希菌-志贺菌属。与假手术组比较, 治疗组($P=0.001$)和模型组($P=0.001$)的厚壁菌门/变形菌门比值降低。与模型组小鼠比较, 治疗组小鼠肠道菌群以氨基酸相关酶和茎杆菌细胞周期为主的代谢途径中上调, 糖基转移酶和细菌分泌系统为主的代谢途径中下调。**结论** 脓毒症小鼠肠道中有害菌丰度增加使肠道菌群多样性降低; MMP8抑制剂干预改善了脓毒症小鼠肠道菌群的多样性, 有益菌增多, 有害菌减少。

关键词: 脓毒症; 肠道菌群; MMP8抑制剂; 多样性; 盲肠结扎穿刺

中图分类号: R378; R574

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)05-0476-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24082301

引用本文: 顾芳艳, 朱海燕, 彭耀军, 等. 基质金属蛋白酶8抑制剂干预对脓毒症小鼠肠道菌群的影响 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (5): 476-484.

Effects of MMP8 inhibitor intervention on gut microbiome in septic mice

GU Fangyan¹, ZHU Haiyan², PENG Yaojun², ZHANG Libo³, WANG Shuze⁴, SHI Xuan⁴, ZHANG Manli¹

¹Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Emergency, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Logistic Support Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁴Central Medical Branch of PLA General Hospital, Beijing 100120, China

Corresponding author: ZHANG Manli. Email: zhangmanli1982@126.com

Abstract: Background MMP8 inhibitors may serve as potential therapeutic targets for sepsis. Currently, there are limited domestic studies investigating the effects of MMP8 inhibitors on the treatment of sepsis and their impact on the gut microbiome of mice. **Objective** To investigate the compositional characteristics of the gut microbiome in septic mice, identify differential microbiome, and evaluate the impact of MMP8 inhibitors on the gut microbiome of these septic mice. **Methods** Twenty 6-week-old SPF grade C57BL/6J mice were randomly assigned to model group, treatment group, sham operation group, and control group, with five mice in each group. The treatment and model groups underwent laparotomy to expose the cecum, followed by mid-point ligation and puncture for establishing the sepsis model. Mice in the sham operation group underwent the same abdominal procedure, but the cecum was not ligated or punctured, and the cavity was closed afterward. Twenty-four hours prior to modeling, the treatment and sham operation groups received intraperitoneal injections of 0.3 mg/kg MMP8 inhibitor every 12 hours, while the control and model groups were administered an equal volume of PBS buffer. All mice were sacrificed at 24 hours after surgery, and the colon contents from each group were collected for sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Subsequently, the α and

收稿日期: 2024-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(82402528)

第一作者: 顾芳艳, 学士, 技师。Email: 13681459672@163.com

通信作者: 张蔓丽, 博士, 副主任医师。Email: zhangmanli1982@126.com

β -diversity, as well as the gut microbiome composition of each group, were analyzed to assess changes in differential microbiome composition and diversity. **Results** Compared with the model group, the number of ASVs ($P=0.029$), Observed species index ($P=0.029$), Chao1 index ($P=0.028$), and Shannon index ($P=0.016$) in the treatment group after treatment were significantly increased. PCA ($P=0.001$), PCoA ($P=0.001$) and NMDS($P=0.001$, Stress=0.13) analysis results showed that the microbial community compositions of the treatment and model groups exhibited significant phylogenetic distancing from the control and sham-operation groups, showing no overlapping clusters. Notably, post-treatment microbial profiles in the treatment group demonstrated partial overlap with those of the model group. The main bacterial genera in treatment group were Muribaculaceae-unclassified, Escherichia-Shigella, Enterobacter; the main bacterial genera in the model group were Ligilactobacillus, Escherichia-Shigella, and Enterobacter. LEfSe analysis found that the differential bacteria in the treatment group were Enterobacter and Klebsiella, and the model group was Escherichia-Shigella. Compared with the sham operation group, the ratio of Firmicutes to Proteobacteria was reduced in the treatment ($P=0.001$) and model groups ($P=0.001$). Compared with the model group, the gut microbiome of the mice in the treatment group were up-regulated in metabolic pathways dominated by Amino acid related enzymes and Cell cycle-Caulobacter, and down-regulated in metabolic pathways dominated by Glycosyltransferases and Bacterial secretion system. **Conclusion** In septic mice, increased abundance of pathogenic bacteria in the gut microbiota reduce microbial diversity, whereas MMP8 inhibitor intervention restore diversity, characterized by elevated beneficial bacteria and suppressed harmful bacterial populations.

Keywords: sepsis; gut microbiome; matrix metalloproteinase 8; diversity; cecal ligation and puncture

Cited as: Gu FY, Zhu HY, Peng YJ, et al. Effects of MMP8 inhibitor intervention on gut microbiome in septic mice[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(5): 476-484.

脓毒症是宿主对感染反应失调引起的危及生命的多器官功能障碍，是儿童、成人死亡和发病的主要原因之一。全球每年约有4 890万新发脓毒症病例，其中约1 100万人死亡，占全球死亡总人数的19.7%^[1-2]。瑞典学者根据2019年第3次脓毒症和感染性休克国际共识定义的标准对住院患者进行病例审查，发现脓毒症的发生率为4.1%^[3]。脓症患者大量使用抗生素后肠道内会产生耐药菌，这表明脓毒症的发病与肠道菌群的变化密切相关，肠道菌群紊乱通过多种机制增加脓毒症的易感性。随着脓毒症的快速进展，肠道菌群紊乱也持续加剧，最终增加了终末器官功能障碍的风险^[4]。目前有多种脓毒症的治疗方法，主要以抗生素、液体复苏及脏器功能保护为主，但重症患者大量使用激素和血管活性药物对机体有一定伤害。研究发现，基质金属蛋白酶8 (matrix metalloproteinase 8, MMP8)在脓症患者体内浓度明显提高，该酶是一种中性粒细胞衍生的胶原酶，可裂解胶原蛋白、纤连蛋白和一些非胶原底物的细胞因子，MMP8抑制剂可能是脓毒症的潜在治疗靶点^[5]。国内关于MMP8抑制剂对脓毒症小鼠肠道菌群影响的研究较少，肠道菌群在脓毒症发病过程中的作用机制较为复杂，其潜在的信号通路不是很清楚，仍需深入研究脓毒症与肠道菌群的关联以发现新的微生物标志物和治疗靶点^[6-7]。本研究采用盲肠结扎穿刺(cecal ligation and puncture, CLP)的方法构建脓毒症小鼠模型，并通过设置对照实验探讨MMP8抑制剂对脓毒症小鼠肠道菌群的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20只体质量为20~25 g的6周龄雄性SPF级C57BL/6J小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司，生产许可证编号为SCXK(京)2019-0010。该小鼠饲养于解放军总医院实验动物中心屏障设施内，室温维持在22~26℃，湿度维持在40%~70%，12 h/12 h昼夜间断照明。动物实验方案经解放军总医院医学伦理委员会审查并批准(批号：2023-X19-57)，实验过程中严格遵守实验动物福利伦理指导原则。

1.2 试剂和仪器

磷酸盐缓冲液(PBS, Solarbio公司); MMP8抑制剂I(Santa Cruz公司); 戊巴比妥钠(Sigma公司); 二甲基亚砜(Sigma公司); Qiagen Mini Kit粪便DNA提取试剂盒(QIAGEN公司); Sorvall LEGEND Micro 21R高速低温离心机(Thermo公司); NanoDrop 2000分光光度计(Thermo公司); proflex PCR仪(Thermo公司)。

1.3 实验分组、模型构建和治疗

20只小鼠随机分为模型组、治疗组、假手术组和对照组，每组5只。模型组和治疗组小鼠采用CLP的方法构建脓毒症小鼠模型，通过腹腔内注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠，刺激肢体无反应后用75%乙醇消毒手术区域皮肤，皮肤晾干后在剑突下约1 cm处沿腹中线剪开切口，暴露盲肠并分离，用无菌丝线在盲肠中点处结扎盲肠，用21号针头在结扎处进行穿刺后轻轻挤压盲肠以挤出少量粪便，将盲肠放回腹腔并缝合切口。假手术组小鼠

打开腹腔暴露盲肠后将肠组织再放回腹腔缝合切口, 对照组小鼠不行外科手术。治疗组和假手术组小鼠于CLP模型构建前24 h开始, 每隔12 h腹腔注射0.3 mg/kg的MMP8抑制剂溶液(用1%二甲亚砜溶解PBS, 最终浓度为0.03 mg/mL), 对照组和模型组小鼠仅在取材前经腹腔注射与MMP8抑制剂等量的PBS溶液。

1.4 结肠内容物样本收集与DNA提取

CLP手术24 h后麻醉各组小鼠并收集结肠内容物样本0.2 g, 储存于无菌EP管中, 迅速转移至-80°C冰箱保存。根据Qiagen Mini Kit粪便DNA提取试剂盒提取结肠内容物中细菌的总DNA, 利用NanoDrop 2000对DNA进行定量。

1.5 细菌DNA的扩增及测序结果分析

使用杭州联川生物技术股份有限公司合成的Barcode通用上游引物341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和下游引物805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')对16S rRNA V3~V4高可变区基因进行PCR扩增, PCR反应体系的实验条件: 98°C预变性30 s, 98°C变性10 s, 54°C退火30 s, 72°C延伸45 s共计扩增32个循环, 72°C延伸10 min获得PCR产物。PCR产物由AMPure XT beads纯化, 使用Qubit进行定量。使用2%琼脂糖凝胶电泳对PCR扩增产物进行检测, 采用AMPure XT beads回收试剂盒回收PCR扩增产物。对回收纯化后的PCR产物使用Agilent 2100生物分析仪和Illumina的文库定量试剂盒进行评估, 将浓度在2 nmol/L以上合格的DNA样品进行梯度稀释后上机测序以构建文库。根据所需测序量按相应比例混合, 并经NaOH变性为单链进行上机测序; 使用NovaSeq 6000测序仪进行2 × 250 bp的双端测序。

1.6 生物信息学和统计学分析

(1)数据拆分: 对测序获得的双端数据, 首先根据Barcode信息对样品进行数据拆分, 并去除接头和Barcode序列。(2)数据拼接和过滤: ①去除RawData的引物序列和平衡碱基序列; ②将每一对paired-end reads根据Overlap区拼接合并成一条更长的tag; ③对测序Reads进行窗口法质量扫描, 扫描窗口默认为100 bp, 当窗口内平均质量值低于20时, 将Read从窗口起始到3'终止的部分截掉; ④去除截短后长度小于100 bp的序列; ⑤去除截短后N(不确定模糊碱基)的含量在5%以上的序列; ⑥去除嵌合体序列。(3)DADA2去噪: 通过Qiime

dada2 denoise-paired调用DADA2进行长度过滤和去噪。获得ASV(feature)特征序列和ASV的Feature丰度表格, 并去除序列总数仅为1的ASV序列^[8]。

(4)多样性分析: 基于得到的扩增序列变异(amplicon sequence variant, ASV)(feature)特征序列和ASV(feature)丰度表格进行 α -多样性分析和 β -多样性分析。本研究使用QIIME2软件进行 α -多样性分析, 主要通过Observed species、Shannon、Chao1、Goods coverage等指数对各组小鼠肠道菌群的组内多样性进行评估。本研究的 β -多样性分析主要通过计算加权UniFrac距离度量进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)和非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析, 对各组小鼠肠道菌群的组间多样性进行评估。(5)物种注释: 根据ASV(feature)序列文件采用SILVA数据库以NT-16S数据库进行物种注释, 并根据ASV(feature)丰度表对各物种在各样本中的丰度进行统计, 注释的置信度阈值为0.7。(6)差异分析和高级分析: 基于得到的物种丰度统计信息, 进行各比较组之间的LEfSe分析和PICRUST2功能预测分析。

1.7 统计学方法

采用SPSS 28.0软件对多组数据进行单因素方差分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Fisher's精确检验对无生物学重复样品进行差异比较, Kruskal-Wallis检验对有生物学重复样品的多组之间进行比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠内容物16S rRNA基因测序原始数据分析

根据黎李俊和赵春光等^[9-10]使用CLP构建脓毒症模型的高成模率, 本研究也采用CLP构建脓毒症小鼠模型。造模24 h后分别收集对照组、假手术组、治疗组和模型组共20份小鼠结肠内容物样本进行16S rRNA测序, 共观察到5 066个ASVs, 对照组特有1 008个ASVs, 治疗组特有702个ASVs, 模型组特有381个ASVs, 假手术组特有1 428个ASVs, 4组共有430个ASVs(图1A)。平均每个样品测序序列数为74 879条, 序列长度在400~500 bp范围内的数量为74 842条(占比99.95%), 与16S rRNA V3~V4区域序列长度吻合, 符合后续结果分析(图1B)。对照组平均每个样品获得802个ASVs, 假手术组平均每个样品获

得 927 个 ASVs, 治疗组平均每个样品获得 483 个 ASVs, 模型组平均每个样品获得 287 个 ASVs(包括组间重复的 ASVs); 与假手术组相比, 治疗组和模型组的 ASVs 数减少($P < 0.001$, 图 1C); 与模型组相比, 治疗组的 ASVs 数升高($P = 0.029$, 图 1C)。Goods coverage 指数实际反映测序结果代表样本的真实情况, 本次测序的各组指数均值均为 1, 提示测序结果可靠(图 1D)。

2.2 四组小鼠肠道菌群物种组成分析

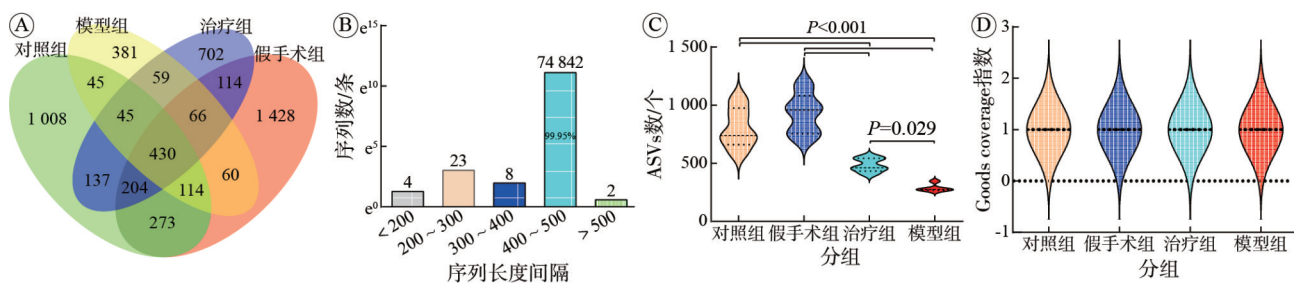
在门水平上对照组和假手术组以厚壁菌门(53.76%、70.1%)、拟杆菌门(34.71%、19.15%)、髌骨细菌门(8.07%、6.53%)为主; 治疗组和模型组以厚壁菌门(15.77%、21.69%)、拟杆菌门(27.11%、6.31%)、变形菌门(54.66%、67.80%)为主(图 2A)。与对照组和假手术组比较, 治疗组和模型组厚壁菌门降低, 变形菌门升高(所有 $P < 0.05$, 图 2B); 与模型组比较, 治疗组拟杆菌门相对丰度增加($P = 0.032$, 图 2B), 变形菌门相对丰度降低, 但差异无统计学意义($P = 0.398$, 图 2B)。急性溃疡性结肠炎的肠道菌群的结构异常, 肠道通透性增加导致的肠道菌群失调主要表现为厚壁菌门/拟杆菌门比值增加^[11]; 在本研究中, 与模型组比较, 治疗组厚壁菌门/拟杆菌门比值降低($P = 0.010$, 图 2C)。厚壁菌门与变形菌门比例的变化从另一个方面反映肠

道菌群稳态; 研究显示, 使用嗜酸乳杆菌灌胃小鼠可以显著提高小鼠的认知能力, 厚壁菌门/变形菌门比值也显著提高^[12]; 与对照组和假手术组比较, 治疗组和模型组厚壁菌门/变形菌门比值降低(所有 $P < 0.05$, 图 2D)。

在属水平上, 对照组以未分类鼠杆菌科(21.71%)、乳酸杆菌属(25.34%)、候选糖单胞菌属(8.07%)为主; 假手术组以未分类鼠杆菌科(12.41%)、毛螺菌科-NK4A136-组(22.54%)、未分类梭菌目(12.71%)为主; 治疗组以未分类鼠杆菌科(14.73%)、埃希菌-志贺菌属(11.48%)、肠杆菌属(24.16%)和克雷伯菌属(12.92%)为主; 模型组以联合乳杆菌属(10.24%)、埃希菌-志贺菌属(39.31%)、肠杆菌属(18.54%)为主。与对照组和假手术组比较, 模型组的埃希菌-志贺菌属和肠杆菌属相对丰度增加(所有 $P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组在治疗后鼠杆菌属的相对丰度增加($P = 0.040$), 埃希菌-志贺菌属相对丰度降低($P = 0.017$); 与对照组比较, 假手术组、治疗组和模型组的乳酸杆菌属的相对丰度降低($P = 0.012$, $P = 0.011$, $P = 0.013$); 与假手术组比较, 治疗组和模型组的毛螺菌科-NK4A136-组减少(所有 $P < 0.001$)。见图 3。

2.3 四组小鼠结肠内容物中菌群多样性分析

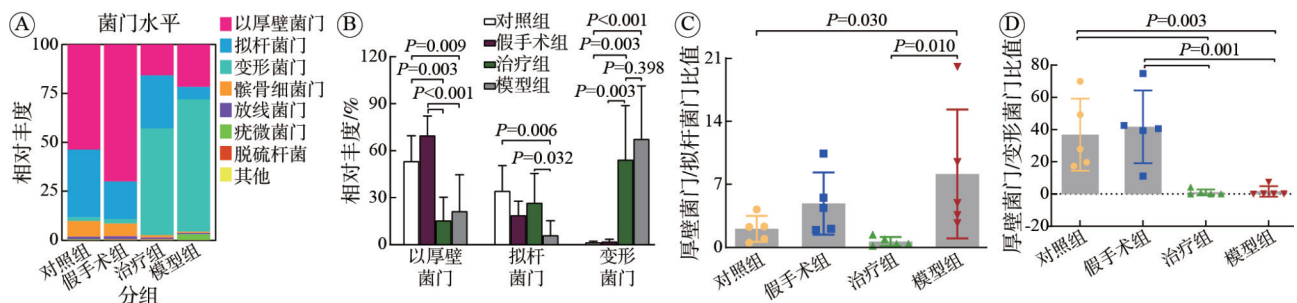
α -多样性分析结果显示, 与对照组相比, 假手



A: 各组小鼠结肠内容物测序得的共有和特有 ASVs 数目; B: 平均每个样品测序序列数; C: 各组 ASVs 数比较; D: Goods coverage 指数。

图 1 各组小鼠结肠内容物测序得到的 ASVs 数量和菌群覆盖度

Fig. 1 Number of ASVs and gut microbiome coverage obtained by sequencing the colon contents of four groups of mice



A: 堆叠图显示门水平的物种组成; B: 柱形图显示优势菌门在各组的差异; C: 厚壁菌门/拟杆菌门比值; D: 厚壁菌门/变形菌门比值。

图 2 各组小鼠在门水平的物种组成和差异

Fig. 2 Composition and differences of the four groups of mice at the phylum level

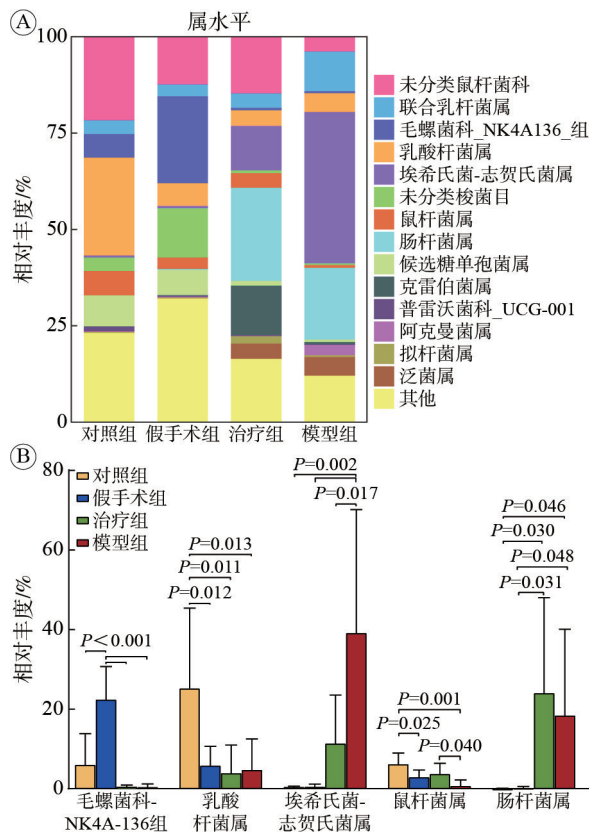


图3 各组小鼠在属水平的物种组成(A)和差异(B)

Fig. 3 Composition (A) and differences (B) of the four groups of mice at the genus level

术组的 Observed species 指数、Chao1 指数升高(所有 $P > 0.05$), Shannon 指数升高($P = 0.045$)(图4); 与假手术组比较, 治疗组和模型组小鼠的 Observed species 指数(所有 $P < 0.001$)、Chao1 指数(所有 $P < 0.001$)、Shannon 指数($P = 0.003$ 、 $P < 0.001$)均降低; 与模型组相比, 治疗组治疗后的 Observed species 指数($P = 0.029$)、Chao1 指数($P = 0.028$)、Shannon 指数($P = 0.016$)均升高。脓毒症模型小鼠肠道菌群 α -多样性显著降低, 在使用 MMP8 抑制剂治疗后脓毒症小鼠肠道菌群 α -多样性升高, 但多样性无法恢复到原始状态。

β -多样性方面, PCA($P = 0.001$)、PCoA($P = 0.001$)和NMDS($P = 0.001$, Stress=0.12)分析结果显示, 治疗组和模型组菌群构成与对照组和假手术组聚类距离较远且无重叠, 提示治疗组、模型组菌群构成与对照组、假手术组显著不同; 治疗组在治疗后与模型组小鼠菌群构成有部分重叠, 提示两组菌群构成存在一定相似性(图5)。脓毒症小鼠模型使用 MMP8 抑制剂治疗后菌群构成发生部分改变。

2.4 肠道菌群生物标志物的筛选分析

LEfSe 进化分支图分析结果显示, 4组小鼠肠

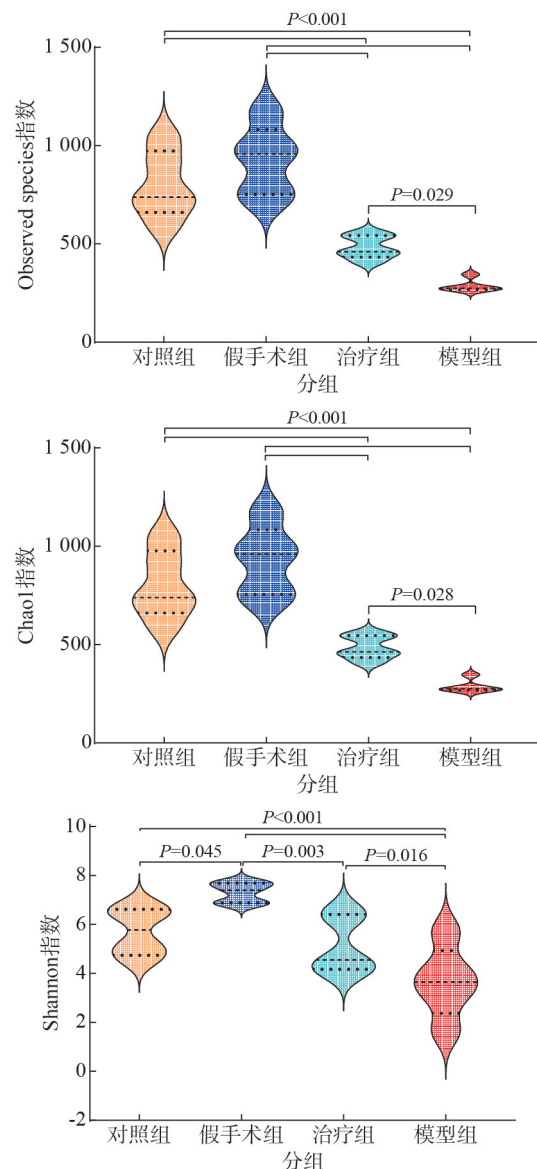
图4 各组小鼠肠道菌群 α -多样性指数的比较

Fig. 4 Comparison of alpha diversity index of gut microbiome in four groups of mice

道菌群从门到种水平存在明显的系统进化分支差异(图6A)。使用 LDA 值 ≥ 4.7 的线性判别分析在4组间共筛选出25个有差异的物种条目(图6B)。对照组在属水平差异菌为未分类鼠杆菌科, 假手术组在属水平差异菌为毛螺菌科-NK4A136-组、未分类梭菌目(图6B), 治疗组在属水平差异菌为肠杆菌属、克雷伯菌属, 模型组在属水平差异菌为埃希氏菌-志贺菌属。

2.5 肠道菌群功能预测分析

基于 MetaCyc 数据库, 通过 PICRUSt2 预测分析发现4组小鼠的肠道菌群都参与了多条代谢途径, 共有14个代谢通路发生了改变(所有 $P < 0.05$)。与模型组比较, 治疗组有6条代谢途径上调, 分别

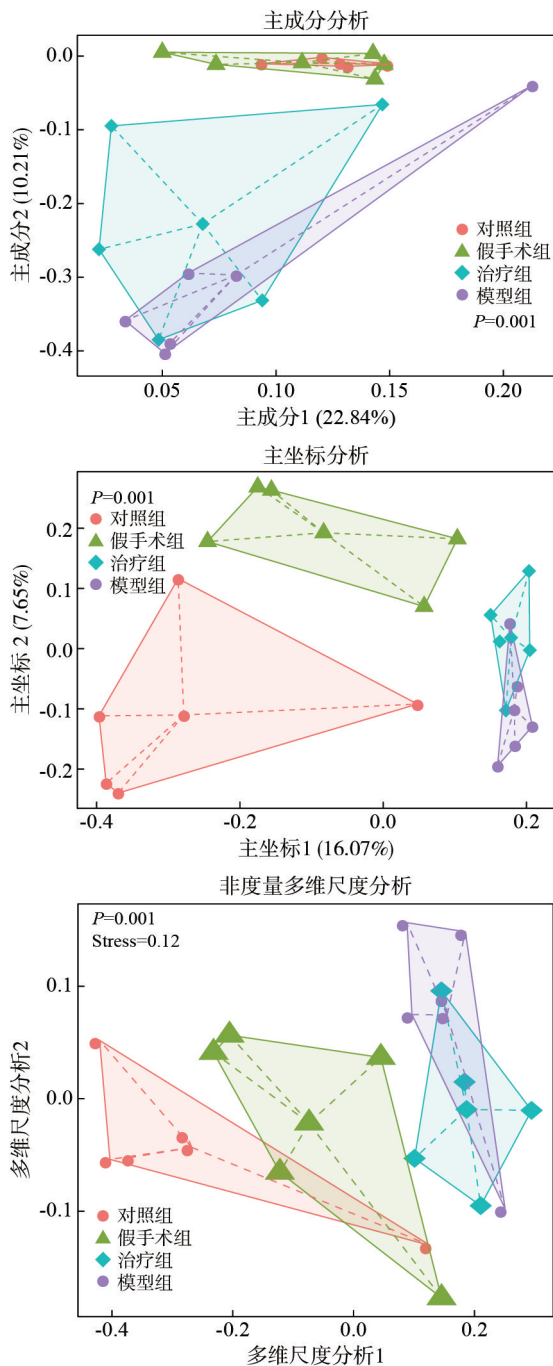


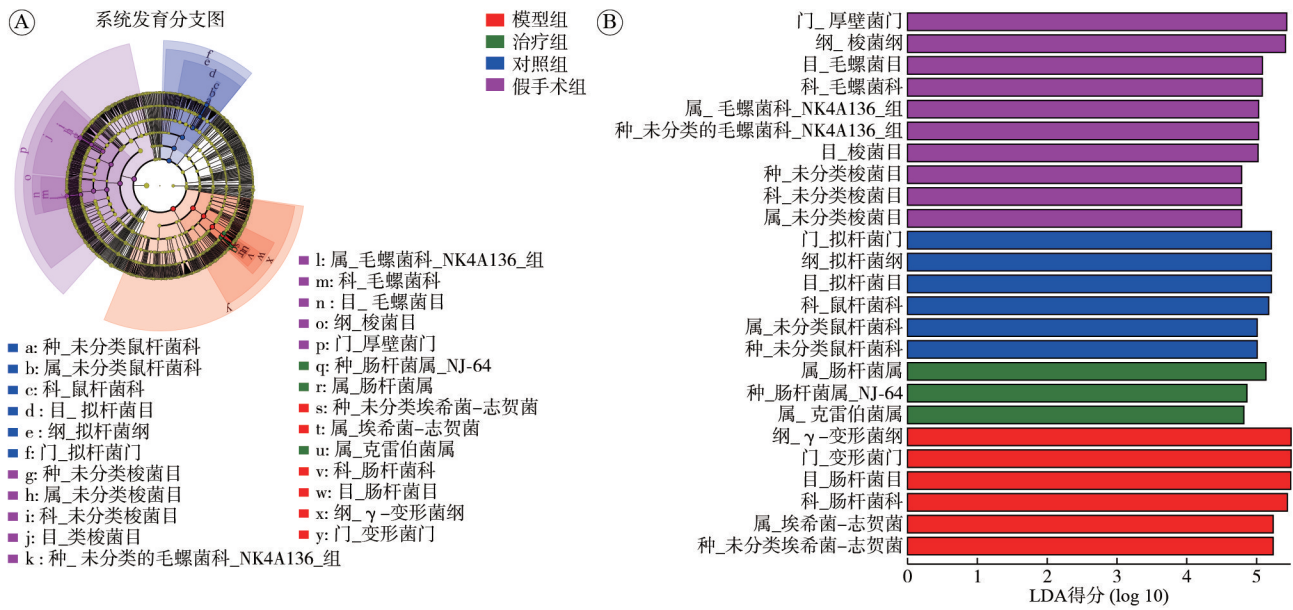
图5 各组小鼠肠道菌群β-多样性指数的比较

Fig. 5 Comparison of beta diversity index of gut microbiome in four groups of mice

为氨基酸相关酶、细胞骨架蛋白、链霉素生物合成、抗坏血酸和醛糖酸代谢、茎杆菌细胞周期和聚酮化合物糖单位生物合成；治疗组有8条代谢途径下调，分别为糖基转移酶、细菌分泌系统、核苷酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、霍乱弧菌致病循环途径、糖类消化和吸收、泛醌和其他萜类醌生物合成和乙苯降解等(图7)。

3 讨论

脓毒症是由传染源引起的生理和生化异常的综合征，会引起临床器官功能障碍和脓毒症相关器官的迅速衰竭而导致患者死亡^[13]。目前关于利用肠道菌群改善或治疗脓毒症主要集中在3个方面：(1)使用益生菌和益生元来调节肠道菌群生态平衡；(2)粪菌移植，把健康者的肠道菌群移植给患者重新建立其正常菌群来维持机体平衡；(3)选择性消化道去污以达到减少肠道菌群移位的目的^[14,6]。肠道菌群已被证明在脓毒症的发生和发展中发挥着重要作用，研究发现老年脓毒症小鼠的肠道菌群丰度和结构存在较大变化，其肠道微生物群破坏和肝组织炎症程度高于成年脓毒症小鼠^[15]。MMP8蛋白可以上调促炎因子的表达水平而导致严重炎症反应，该蛋白的活性在脓毒症患者中显著增强，其水解全身蛋白可能是脓毒症休克的一种新病理机制^[16]。MMP8蛋白表达水平在脓毒性脑病中特异性增强，可作为脓毒症相关脑损伤的潜在生物标志物^[17]。MMP8属于MMP家族的II型胶原酶，在心血管疾病、关节、肾、消化和呼吸系统疾病以及癌症等多种疾病中发挥重要作用，在这些疾病中MMP8抑制剂对疾病有积极影响^[18]，但MMP8抑制剂对脓毒症小鼠肠道菌群影响的研究较少，因此建立可靠的动物模型对此研究尤为重要。本研究采用CLP的方法构建脓毒症小鼠模型，是因为与细菌脂多糖注射诱导脓毒症模型相比，CLP是最接近于人类脓毒症机制的模型，被称为脓毒症模型的“金标准”，更接近临床脓毒症的炎症反应特点^[19]。在本研究中分别设置对照组、假手术组、模型组和治疗组，探讨MMP8抑制剂对脓毒症小鼠肠道菌群的影响。健康人类的肠道菌群以拟杆菌门和厚壁菌门为主，两个菌门的细菌约占人体肠道细菌总数的90%^[20]。本研究结果显示，对照组和假手术组以厚壁菌门、拟杆菌门为主，占比分别为88%和89%左右，这与上述文献报道一致。在脓毒症患者的肠道菌群的α-多样性低于健康个体，与对照组比较，脓毒症患者肠道中的机会致病菌相比罗茵属、伯克霍尔德菌属、棒状杆菌属、卟啉单胞菌属等菌属大量增加，产短链脂肪酸的有益菌罗斯伯里亚菌、双歧杆菌、粪杆菌、粪球菌、布劳特菌、梭菌、瘤胃球菌等菌属降低^[20]。Stadlbauer等^[21]研究发



A: 门到种水平的进化分支图; B: LDA得分柱状图(LDA评分≥4.7)。

图 6 LEfSe 分析筛选各组小鼠肠道菌群的差异菌

Fig. 6 LEfSe analysis to screen the differential bacteria in the gut microbiome of four groups of mice

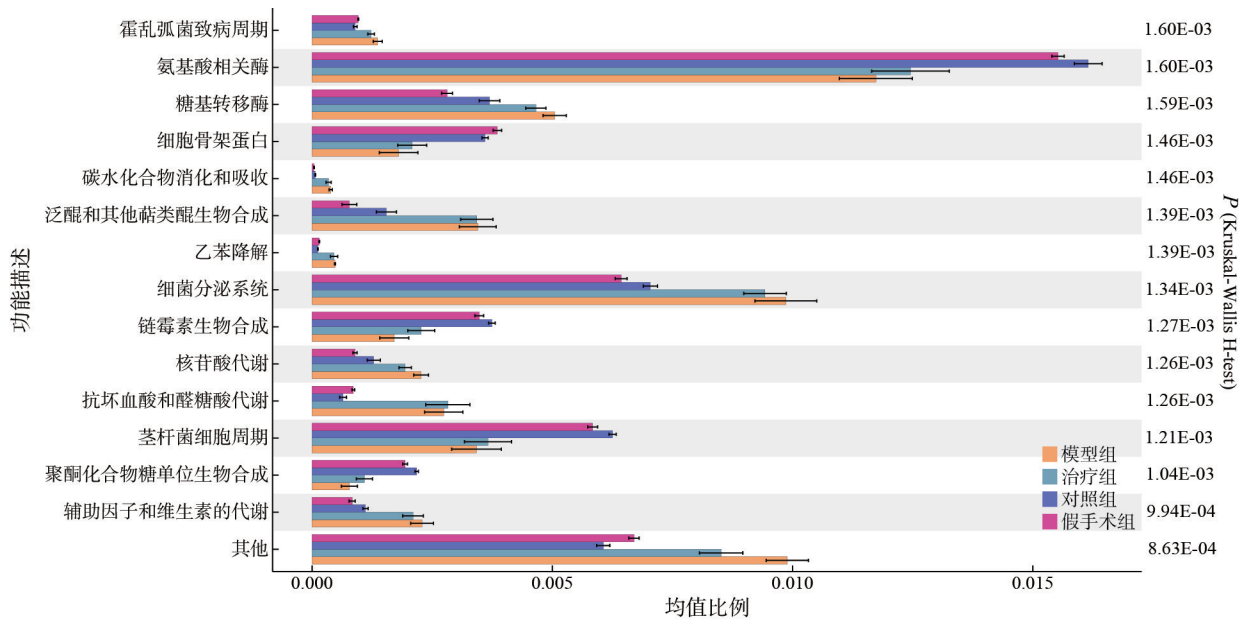


图 7 各组小鼠肠道微生物群的 PICRUSt2 功能预测结果分析

Fig. 7 The predictive analysis of PICRUSt2 function of gut microbiome in four groups of mice

现, 脓毒症患者肠道菌群 α -多样性显著低于健康受试者, β -多样性分析结果显示聚类显著不同; 脓毒症患者肠道中的致病菌链球菌属的丰度增加, 有益菌瘤胃球菌科 UCG-014 和另枝菌属的丰度减少; 脓毒症患者在经过 28 d 的复合益生菌制剂治疗后肠道菌群的多样性和功能得到显著改善, 其中植物乳杆菌、唾液乳杆菌、粪肠球菌等益生菌增加。本研究中的模型组小鼠肠道菌群的 α -多样性低于对照组和假手术组, 模型组小鼠经 MMP8

抑制剂治疗后其肠道菌群 α -多样性显著增加, 提示脓毒症小鼠紊乱的肠道菌群经过 MMP8 抑制剂治疗后多样性和丰富度得到改善。厚壁菌门/变形菌门比值的降低与肠道菌群紊乱相关, 因此有学者把厚壁菌门/变形菌门比值降低作为评估肠道菌群紊乱的指标。Mantovani 等^[22]研究发现, 随着肝硬化的不断进展及恶化厚壁菌门/变形菌门比值逐渐降低, 并与 90 d 病死率和再住院率高度相关。本研究结果显示, 与对照组和假手术组提示, 治

疗组和模型组的厚壁菌门/变形菌门比值降低,提示治疗组和模型组小鼠的肠道菌群发生了紊乱。Xu等^[23]研究发现,模型组小鼠肠道中的埃希菌-志贺菌属增加,毛螺菌科-NK4A136-组减少;使用巴马汀可以改善神经功能,减少脑组织中的细胞凋亡,并降低脓毒症相关脑病小鼠的炎症细胞因子水平,抑制Notch1/NF- κ B通路的表达,促进有益菌(如毛螺菌科-NK4A136-组)的生长、抑制病原菌(如埃希菌-志贺菌属)增加等。本研究结果表明,MMP8抑制剂治疗后治疗组的病原菌埃希菌-志贺菌属的相对丰度降低,然而增加了产短链脂肪酸的有益菌鼠杆菌属的丰度,提示MMP8抑制剂有望成为改善脓毒症肠道菌群紊乱的新治疗靶点。

本研究通过PICRUST2预测分析发现模型组和治疗组小鼠在细菌分泌系统相关的代谢通路中的表达高于对照组和假手术组,这可能与埃希菌-志贺菌属相对丰度增加相关。志贺菌、肠侵袭性大肠埃希菌是革兰阴性菌,志贺菌可侵袭人类结肠上皮细胞来诱发炎症反应而引起人类细菌性痢疾;肠侵袭性大肠埃希菌通过编码细菌3型分泌系统的大毒力质粒,并将该质粒的毒力蛋白从细菌直接转移到宿主细胞的细胞质中,破坏宿主上皮细胞功能,还能促进其自身摄取、在宿主细胞质中复制并传播到邻近细胞,促进炎症反应^[24]。

本研究存在一定局限性:(1)样本量较少;(2)采用CLP方法构建脓毒症小鼠模型,虽然更贴近临床败血症的炎症特点,但无法完全模拟临床脓毒症患者的病理生理状态;(3)大量研究发现,脓毒症组小鼠盲肠组织局部黏膜上皮缺失,肠腺结构消失,伴少量炎性细胞浸润,炎症反应在脓毒症的发生、发展过程中起着至关重要的作用^[25-26],本研究缺乏对脓毒症小鼠以及治疗组盲肠组织病理检测以及炎症相关研究,未来可通过病理样本收集、设计更详细的试验方案进一步研究。

综上所述,本研究证明MMP8抑制剂干预增加了肠道中的有益菌,降低有害菌,并改善脓毒症小鼠的肠道菌群的多样性和功能,这为MMP8抑制剂早期干预调节肠道菌群作为脓毒症治疗的潜在靶点提供了一定的理论依据。

作者贡献 顾芳艳:实验操作,统计分析,撰写初稿,文章修订;彭耀军、张立波、王书泽、石轩:模型建立,实验操作,样品收集;朱海燕:实验设计,原始数据整理分析;张蔓丽:研究指导,文章修订,基金资助,文章评阅。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: 13681459672@163.com。

参考文献

- Schlapbach LJ, Scott Watson R, Sorce LR, et al. International consensus criteria for pediatric sepsis and septic shock [J]. JAMA, 2024, 331 (8): 665-674.
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. Lancet, 2020, 395 (10219): 200-211.
- Mellhammar L, Wollter E, Dahlberg J, et al. Estimating sepsis incidence using administrative data and clinical medical record review [J]. JAMA Netw Open, 2023, 6 (8): e2331168.
- Adelman MW, Woodworth MH, Langelier C, et al. The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis [J]. Crit Care, 2020, 24 (1): 278.
- Fang X, Duan SF, Hu ZY, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-8 protects against sepsis serum mediated leukocyte adhesion [J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 814890.
- 张洪光, 邱建清, 郝佳慧, 等. 肠道菌群在脓毒症中的研究进展 [J]. 中国医学创新, 2023, 20 (7): 178-182.
- 王燕飞, 谈林华. 肠道菌群在脓毒症中的作用和研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2023, 41 (8): 634-640.
- Glenn TC, Pierson TW, Bayona-Vásquez NJ, et al. Adapterama II: universal amplicon sequencing on Illumina platforms (TaggiMatrix) [J]. PeerJ, 2019, 7: e7786.
- 黎李俊, 杨国辉. 一种改良盲肠结扎穿孔刺致大鼠脓毒症模型的方法 [J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42 (4): 468-476.
- 赵春光, 卡斯木·玉素甫, 牛旭平, 等. 虾青素改善脓毒症小鼠肠道损伤及其作用机制初探 [J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23 (5): 574-581.
- Li SL, Qian QF, Xie YS, et al. Ameliorated effects of fucoidan on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis and accompanying anxiety and depressive behaviors in aged C57BL/6 mice [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72 (25): 14199-14215.
- Jeon S, Kim H, Kim J, et al. Positive effect of Lactobacillus acidophilus EG004 on cognitive ability of healthy mice by fecal microbiome analysis using full-length 16S-23S rRNA metagenome sequencing [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (1): e0181521.
- Adegboro BA, Imran J, Abayomi SA, et al. Recent advances in the pathophysiology and management of sepsis: a review [J]. Af J Clin Exp Micro, 2021, 22 (2): 133-145.
- 张哲, 方建江. 肠道微生物群与脓毒症关系及临床应用研究进展 [J]. 浙江医学, 2023, 45 (24): 2673-2678.
- Yuan YY, Liu SH, Ding XF, et al. Early intestinal microbiota changes in aged and adult mice with sepsis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1061444.
- Bauzá-Martínez J, Aletti F, Pinto BB, et al. Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality [J]. Br J Anaesth, 2018, 121 (5): 1065-1074.
- Dong JL, Wang S, Hu ZH, et al. Extracellular proteins as potential biomarkers in Sepsis-related cerebral injury [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1128476.
- Guti S, Baidya SK, Banerjee S, et al. A robust classification-dependent multi-molecular modelling study on some biphenyl sulphamide based MMP-8 inhibitors [J]. SAR QSAR Environ Res, 2021, 32 (10): 835-861.

- 19 李超, 石炳毅, 柏宏伟, 等. 脂多糖注射及盲肠结扎穿刺诱导脓毒症血症肾损伤模型的对比研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2021, 42 (4): 215-220.
- 20 Yu JY, Li HP, Zhao JJ, et al. Alterations of the gut microbiome in Chinese Zhuang ethnic patients with sepsis [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/2022/2808249>.
- 21 Stadlbauer V, Horvath A, Komarova I, et al. Dysbiosis in early sepsis can be modulated by a multispecies probiotic: a randomised controlled pilot trial [J]. *Benef Microbes*, 2019, 10 (3): 265-278.
- 22 Mantovani A, Longo L, Thoen RU, et al. Firmicutes/Bacteroidetes and Firmicutes/Proteobacteria ratios are associated with worse prognosis in a cohort of Latin American patients with cirrhosis [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2024, 79: 100471.
- 23 Xu YB, Shen BX, Pan XS, et al. Palmatine ameliorated lipopolysaccharide-induced sepsis-associated encephalopathy mice by regulating the microbiota-gut-brain axis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155307.
- 24 Belotserkovsky I, Sansonetti PJ. Shigella and enteroinvasive Escherichia coli [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2018, 416: 1-26.
- 25 李玮, 林名瑞, 陈怀宇, 等. 脓毒症小鼠肠道菌群紊乱的研究 [J]. 中国急救医学, 2021, 41 (10): 887-892.
- 26 李晓明, 刘超, 王晓莉, 等. 基于炎症标志物构建ICU脓毒症患者早期预测模型 [J]. 解放军医学院学报, 2022, 43 (4): 400-405.

(责任编辑: 孟晓彤)

(上接第460页)

- 14 钱邦平, 黄季晨, 邱勇, 等. 截骨矫形术治疗强直性脊柱炎颈胸段畸形的疗效分析 [J]. 中华骨科杂志, 2018, 38 (4): 204-211.
- 15 Sivaganesan A, Kim HJ. A review of indications, surgical technique, and outcomes for the cervical pedicle subtraction osteotomy [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2022, 30 (3): e295-e300.
- 16 钱邦平, 邱勇. 强直性脊柱炎颈胸段后凸畸形合并胸腰椎后凸畸形截骨顺序的选择 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28 (8): 673-674.
- 17 郑国权, 张永刚, 王岩, 等. 强直性脊柱炎后凸畸形的301分型 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 25 (9): 769-774.
- 18 Polly DW Jr, Holton KJ, Haselhuhn JJ, et al. Does A hinged operating table facilitate sagittal correction in transforaminal lumbar interbody fusion with Smith-Peterson osteotomy? A radiographic analysis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2024, 482 (6): 1065-1070.
- 19 Al Barim B, Mütther M, Schipmann S, et al. Pedicle subtraction osteotomy for deformity correction in the upper cervical spine: a technical note [J]. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*, 2022, 83 (1): 69-74.
- 20 Luan HP, Peng C, Liu K, et al. Comparison of pedicle subtraction osteotomy and vertebral column decancellation for the correction of thoracolumbar kyphotic deformity in ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Neurosurg Spine*, 2023, 39 (3): 370-379.
- 21 Kim HJ, Virk S, Elysee J, et al. Surgical strategy for the management of cervical deformity is based on type of cervical deformity [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (21): 4826.
- 22 Smith JS, Shaffrey CI, Lafage R, et al. Three-column osteotomy for correction of cervical and cervicothoracic deformities: alignment changes and early complications in a multicenter prospective series of 23 patients [J]. *Eur Spine J*, 2017, 26 (8): 2128-2137.
- 23 Tobin MK, Birk DM, Rangwala SD, et al. T-1 pedicle subtraction osteotomy for the treatment of rigid cervical kyphotic deformity: report of 4 cases [J]. *J Neurosurg Spine*, 2017, 27 (5): 487-493.
- 24 Kim KT, Lee SH, Son ES, et al. Surgical treatment of "chin-on-pubis" deformity in a patient with ankylosing spondylitis [J]. *Spine*, 2012, 37 (16): E1017-E1021.
- 25 Wang Y, Lenke LG. Vertebral column decancellation for the management of sharp angular spinal deformity [J]. *Eur Spine J*, 2011, 20 (10): 1703-1710.
- 26 Martini ML, Neifert SN, Chapman EK, et al. Cervical spine alignment in the sagittal axis: a review of the best validated measures in clinical practice [J]. *Global Spine J*, 2021, 11 (8): 1307-1312.
- 27 Suk KS, Kim KT, Lee SH, et al. Significance of chin-brow vertical angle in correction of kyphotic deformity of ankylosing spondylitis patients [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28 (17): 2001-2005.

(责任编辑: 施晓亚, 潘越)