

中性粒细胞弹性蛋白酶在急性呼吸窘迫综合征中的研究现状

任佳佳,李若寒,金旭婷,高晓明,王 岗

西安交通大学第二附属医院重症医学科,陕西 西安 710004

【摘要】 中性粒细胞弹性蛋白酶是中性粒细胞嗜天青颗粒中的主要蛋白酶,在抵御感染中发挥重要作用。然而,大量释放的中性粒细胞弹性蛋白酶可能导致过度炎症反应,加剧肺组织损伤,诱发急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的发展。西维来司他钠作为一种特异性中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,在缓解中性粒细胞弹性蛋白酶诱发的病理过程中具有明显的潜力,并在临床急性呼吸窘迫综合征的治疗中受到广泛的关注。本文将深入探讨中性粒细胞弹性蛋白酶的生物学特性及其在急性呼吸窘迫综合征病理生理中的作用机制,以及西维来司他钠在急性呼吸窘迫综合征临床管理中的应用,为深入理解该药物在急性呼吸窘迫综合征治疗中的作用机制提供重要线索。

【关键词】 急性肺损伤;急性呼吸窘迫综合征;中性粒细胞弹性蛋白酶;凋亡;内皮损伤

【中图分类号】 R563.8

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2024)04-0053-04

Research status of neutrophil elastase in acute respiratory distress syndrome REN Jia-jia, LI Ruo-han, JIN Xu-ting, GAO Xiao-ming, WANG Gang *Department of Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China*

【Corresponding author】 WANG Gang

【Abstract】 Neutrophil elastase (NE) is the main protease in neutrophil azurophilic granules. It plays a crucial role in combating infections. However, excessive release of NE can trigger an amplified inflammatory response that can exacerbate pulmonary damage, leading to the onset of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS). Sivelestat sodium is a specific neutrophil elastase inhibitor. It has obvious potential in the alleviation of neutrophil elastase induced pathological processes. The medicine has also garnered widespread attention in the clinical management of ARDS. This article will deeply explore the biological properties of NE and its mechanism of action in the pathophysiology of ARDS. The application of sivelestat sodium in the clinical management of ARDS is also reviewed. Thus, the important clues for in-depth understanding of the mechanism of action of this drug in the treatment of ARDS would be provided.

【Key words】 Acute lung injury; Acute respiratory distress syndrome; Neutrophil elastase; Apoptosis; Endothelial injury

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, ALI/ARDS)是重症监护病房(Intensive care unit, ICU)中常见的疾病之一,其临床特征包括急性发作的严重低氧血症和双侧肺部影像学浸润表现^[1]。ARDS 实质上是由急性肺泡上皮和肺血管内皮细胞受损,导致肺间质及肺泡高通透性肺水肿。在 ARDS 的病理进程中,中性粒细胞发挥着至关重要的角色。其过度积累和长期活化会导致炎症反应失控,产生过度的脱颗粒现象,进而释放大量抗菌肽、活性氧和中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等炎症介质。临床研究发现 ARDS 患者血浆中 NE 水平显著高于健康个体,并且当 NE 浓度超过 220 ng/ml 时,

患者易发生 ARDS^[2]。同时,在 ARDS 患者支气管肺泡灌洗液中 NE 的蛋白水解活性也显著增加^[3]。动物模型显示 NE 鼻腔滴注后可诱导肺组织出现明显的 ALI 特征,使用 NE 抑制剂可缓解肺损伤^[4],进一步证明了 NE 在 ARDS 病理进展中的重要作用。本文将系统性地探讨 NE 的生物学特征、其在 ARDS 病理生理中的作用机制,以及 NE 抑制剂--西维来司他钠在临床应用中的研究进展,旨在为未来 NE 相关的临床和基础研究提供理论指导,并为改善 ARDS 患者预后提供新的研究方向。

1 NE 的生物学特性

NE 是一种单链、29.5 kDa 的糖蛋白,由 218 个氨基酸组成,具有四个分子内二硫键,其活性催化位点包括组氨酸(His-41)、天冬氨酸(Asp-88)、丝氨酸(Ser-173)。NE 是中性粒细胞四种丝氨酸蛋白酶(包括蛋白酶 3、胰蛋白酶 G 和中性粒细胞丝氨酸蛋白酶 4)中含量最多的蛋白酶。它的编码基因 ELANE 位于人类 19 号染色体和小鼠 10 号染色体上,由五个外显子和四个内含子组成^[5]。高水平的 ELANE 基因转录仅限于中性粒细胞发育的早幼粒

【基金项目】 陕西省高层次人才特殊支持计划资助项目

【通讯作者简介】 王岗,男,博士,研究员,教授,博士生导师。西安医学会重症医学分会主任委员,中国医药教育协会血栓与止血危重病专业委员会副主任委员,中国病理生理学会危重病医学专业委员会青年专家委员会副主任委员。主要研究方向:中性粒细胞弹性蛋白酶在急性呼吸窘迫综合征中病理机制研究。

细胞阶段^[6],同时,在单核细胞和肥大细胞中也可以检测到低水平编码 NE 的 mRNA。NE 在被转录翻译后以其成熟形式储存在嗜天青颗粒中,浓度超过 5 mM^[7]。当中性粒细胞被激活时,NE 将快速从胞质内的颗粒中释放到细胞外空间,也有一些可结合到中性粒细胞外膜上。

宿主可以通过多种蛋白酶抑制剂来保护自身免受 NE 等多种蛋白酶的破坏作用,这些蛋白酶抑制剂包括 $\alpha 1$ 蛋白酶抑制剂和分泌性蛋白酶抑制剂等,它们可以与 NE 结合,捕获并扭曲 NE 催化反应位点,进而抑制 NE 活性^[8]。尽管如此,中性粒细胞拥有多种方法去逃避这些机体的防御作用。首先,中性粒细胞能够在其周围形成相对隔离的“微环境”,由于大多数内源性蛋白酶抑制剂为大分子物质,无法进入到该区域,因此不能抑制中性粒细胞表面粘附 NE 的活性;其次,招募到炎症部位的中性粒细胞释放的大量氧化剂可导致蛋白酶抑制剂的失活;最后,从嗜天青颗粒中释放出来的 NE 大部分结合到细胞表面,导致循环中的内源性 NE 抑制剂无法靠近,从而使 NE 的活性一直处于激活状态^[9]。

2 NE 在 ARDS 中的病理生理角色

2.1 抗感染机制 感染是 ARDS 的常见诱因之一,在此过程中 NE 通过胞内效应和胞外效应对病原体产生清除作用。首先,中性粒细胞在受到感染的刺激后,其内包含 NE 的颗粒将向胞膜移动并与胞膜融合,此时 NE 定位于细胞表面,并趋化中性粒细胞向感染部位移动。当微生物被中性粒细胞所吞噬并隔离在吞噬溶酶体内后,NE 被释放进入吞噬溶酶体中,并与杀微生物肽和活性氧共同作用,直接杀伤被吞噬的病原体,发挥其胞内抗感染作用^[10]。

此外,活化的中性粒细胞还可以释放 NE 形成中性粒细胞外捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),通过胞外作用清除致病微生物,这一过程涉及复杂的信号传导途径。在中性粒细胞暴露于炎症性刺激时,嗜天青颗粒中的多种酶物质转运到细胞质中。NE 首先结合并降解 F-肌动蛋白,并转位至细胞核^[11]。在细胞核中,NE 裁剪组蛋白 H4,导致染色质解聚,并最终引起细胞破裂释放 NET。这些释放的 NET 作为一种生理屏障可以捕获并杀死病原体,同时限制其扩散。既往研究发现,NE 小鼠在腹腔感染革兰氏阴性菌后更容易发生脓毒症并死亡,这表明 NE 对宿主抵抗病原体的侵入非常重要^[12]。

2.2 炎症反应 中性粒细胞所释放的 NE 参与了 ARDS 中“炎症风暴”的发生,这导致肺血管内皮和肺泡上皮细胞发生损伤。ARDS 早期阶段,炎性趋

化因子促进中性粒细胞迁移和 NE 的释放。NE 释放后又可调节炎症细胞浸润、细胞因子和趋化因子的表达和分泌。动物研究表明,气管滴注 NE 后可导致小鼠肺泡灌洗液中的中性粒细胞和巨噬细胞增加,同时也会显著增加促炎性细胞因子的表达^[13]。在内皮细胞模型中,NE 可通过激活二酰甘油激酶、蛋白激酶 C、磷脂酶 C、 Ca^{2+} -钙调蛋白和核转录因子 κB (NF- κB) 信号通路来促进细胞间粘附分子 1(ICAM-1)的表达^[14]。此外,NE 与肺泡上皮细胞共培养后可激活丝裂原活化蛋白激酶,进而上调 NF- κB 信号活性,导致 IL-8 合成增加^[15]。特异性 NE 抑制剂的使用可通过抑制 NF- κB 信号通路或激活 Nrf2/HO-1 信号通路,有效缓解 ALI 动物模型中肺组织炎症因子的表达(如肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素-1 β , 白细胞介素-8, 白细胞介素-6, ICAM-1, 基质金属蛋白酶-9)及氧化应激水平^[16~18]。这些研究表明,在 ARDS 进展过程中,NE 和炎症风暴之间存在着正反馈机制,其详细机制值得进一步深入研究。

2.3 肺泡上皮凋亡 大量动物研究证据表明,在 ARDS 病理进展中可观察到广泛的肺泡上皮细胞凋亡现象^[19]。NE 与肺泡上皮细胞凋亡之间存在一定的关联。有学者在体外研究中发现,NE 能够通过激活蛋白酶激活受体 1 结合,进而激活 NF- κB 和 p53 信号通路,导致线粒体通透性增加,最终诱发肺泡上皮细胞凋亡^[20]。在 LPS 诱导的脓毒性肝损伤模型中,观察到使用 NE 特异性抑制剂能够通过抑制 NF- κB 的活化和凋亡现象,从而预防肝损伤^[21]。然而,使用 NE 抑制剂能否通过抑制凋亡缓解脓毒症诱导的 ALI 尚不明确,仍需进一步研究。

2.4 血管内皮损伤 NE 和血管内皮损伤的关系最早在 1986 年提出^[22],该研究发现趋化因子的刺激可以导致中性粒细胞对微血管内皮细胞的损伤,而 NE 在其中扮演着关键角色。这一报道引发了对 NE 介导 ARDS 中内皮损伤的广泛研究。在炎症条件下,NE 能够引起内皮细胞间粘附连接蛋白的损伤,从而促进中性粒细胞的跨内皮迁移^[23]。有研究报道,在 LPS 诱导的 ALI 动物模型中,使用 NE 抑制剂可以有效保护肺血管内皮糖萼,从而改善小鼠的生存率^[24]。

3 西维来司他钠在 ARDS 中的临床应用

机制研究提示药理学抑制 NE 一定程度上可改善 ARDS。在当前开发的各类 NE 抑制剂中,西维来司他钠是唯一被认为可用于 ALI/ARDS 治疗的 NE 抑制剂。但其在 ARDS 中的临床疗效仍存在一定的争议。

该药物首次的临床试验于 1998 年在日本进行,研究对象为患有全身性炎症反应综合征的 ALI 患者。其研究结果显示,西维来司他钠剂量为 $0.16 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,持续使用最长达 14 天,能够降低患者机械通气率并缩短 ICU 住院时长^[25]。2004 年在日本进行的临床 III 期试验结果表明,西维来司他钠可改善 ARDS 患者的肺功能,降低机械通气时长和缩短 ICU 住院时长^[26]。之后,有研究对上述临床 III 期试验进行二次分析后发现,西维来司他钠用药可以明显减少 ARDS 患者的医疗花费^[27]。然而,同期发表的一项涉及 492 例机械通气的 ALI 患者的国际多中心 STRIVE 研究,并未发现西维来司他钠可以改善患者机械通气天数和 28 天全因死亡率,且患者 180 天死亡率存在增高的趋势,因此该试验被提前终止^[28]。

目前西维来司他钠对 ARDS 治疗效果的临床研究仍在继续。2006 ~ 2022 年国内外连续发表的多项小样本量临床研究显示西维来司他钠可增加 ARDS 患者氧饱和度,减少机械通气时长、ICU 住院时长及医疗费用,然而研究中患者的生存率并没有得到明显的改善^[29,30]。2017 年,一项后续的研究利用日本全国范围数据库的回顾性分析纳入了在入院后 7 天内接受西维来司他钠治疗的 1997 例 ARDS 患者和未接受西维来司他钠治疗的 2279 例 ARDS 患者,结果表明在入院后 7 天内使用西维来司他钠可降低患者 3 个月内的死亡率^[31]。然而,2017 年的一项荟萃分析却发现西维来司他钠治疗仅增加 ARDS 患者 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 水平,对机械通气天数、ICU 住院时长和死亡率的影响与对照组相比无统计学差异^[32]。在最新的 2023 年发表的一项荟萃分析结果表明西维来司他钠治疗不但可以增加 ARDS 患者 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 水平,同时还可缩短机械通气时长、ICU 住院时长、降低死亡率^[33]。

ARDS 临床疗效存在争议的原因可能是 ARDS 患者的异质性和给药策略的不同。有研究将国际多中心 STRIV 研究和其他研究做了比较,认为西维来司他钠治疗效果的差异可能与 ARDS 患者肺损伤严重程度有关。多数西维来司他钠治疗 ARDS 有效的研究对象通常纳入肺损伤评分小于 2.5,而 STRIV 研究选取的患者肺损伤评分大于 2.5^[28,34]。当对 STRIV 研究中肺损伤评分小于 2.5 的人群再次分析时,发现西维来司他钠治疗可以降低患者的死亡率和机械通气时长,提示 ARDS 患者个体化治疗的必要性。另外,多项动物研究提及西维来司他钠早期给药在治疗 ALI 时的潜在益处。同样,本课题组通过网络药理学方法结合动物实验验证发现,

西维来司他钠提前给药可以通过抑制肺组织炎症反应及凋亡现象来缓解脓毒症诱导的 ALI^[35]。因此,作为治疗 ARDS 的一种潜在策略,NE 抑制剂的精细化治疗,仍需进一步研究,特别是剂量、给药时间等关键因素,需要结合临床试验和动物研究,以明确 NE 抑制剂在 ARDS 治疗中的实际效果。

4 结论

尽管 NE 在清除病原体中发挥着重要作用,但大量证据表明在 ALI/ARDS 疾病中,NE 的过度活化是导致炎症反应、血管内皮以及肺泡上皮细胞损伤的重要原因。西维来司他钠作为 NE 的一种抑制剂,已在临床试验中显示出一定的疗效,但其结果存在争议性,主要的原因可能为疾病严重程度和用药时间的不同所导致。因此,未来研究需深入了解 NE 在 ARDS 中的调控机制,并针对 NE 的特异性抑制剂进行更为细致的探究,将有助于我们全面理解 ARDS 疾病的病理机制,并为其治疗提供更为科学有效的策略。

【参考文献】

- [1] Grasselli G, Calfee CS, Camporota L, et al. ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies [J]. *Intensive Care Med*, 2023, 49(7):727-759.
- [2] Kodama T, Yukioka H, Kato T, et al. Neutrophil elastase as a predicting factor for development of acute lung injury [J]. *Intern Med*, 2007, 46(11):699-704.
- [3] McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, et al. Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Invest*, 1982, 69(3):543-553.
- [4] Tremblay GM, Vachon E, Larouche C, et al. Inhibition of human neutrophil elastase-induced acute lung injury in hamsters by recombinant human pre-elafin (trappin-2) [J]. *Chest*, 2002, 121(2):582-588.
- [5] Belaouaj A, Walsh BC, Jenkins NA, et al. Characterization of the mouse neutrophil elastase gene and localization to chromosome 10 [J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(1):5-8.
- [6] Garwicz D, Lennartsson A, Jacobsen SE, et al. Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model [J]. *Haematologica*, 2005, 90(1):38-44.
- [7] Voynow JA, Shinbashi M. Neutrophil elastase and chronic lung disease [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8):1065.
- [8] Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation [J]. *Nature*, 2000, 407(6806):923-926.
- [9] Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(2):137-150.
- [10] Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(1):377-396.
- [11] Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, et al. A

- myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis [J]. *Cell Rep*, 2014, 8 (3):883-896.
- [12] Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis [J]. *Nat Med*, 1998, 4(5):615-618.
- [13] Tanaka A, Minoguchi K, Chen X, et al. Activated protein C attenuates leukocyte elastase-induced lung injury in mice [J]. *Shock*, 2008, 30(2):153-158.
- [14] Ishihara K, Yamaguchi Y, Uchino S, et al. ICAM-1 signal transduction in cells stimulated with neutrophil elastase [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(11):2102-2112.
- [15] Chen HC, Lin HC, Liu CY, et al. Neutrophil elastase induces IL-8 synthesis by lung epithelial cells via the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Biomed Sci*, 2004, 11(1):49-58.
- [16] Zhang H, Zeng J, Li J, et al. Sivelestat sodium attenuates acute lung injury by inhibiting JNK/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Biomol Biomed*, 2023, 23(3):457-470.
- [17] Kim DH, Chung JH, Son BS, et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(12):1681-1689.
- [18] Yuan Q, Jiang YW, Fang QH. Improving effect of Sivelestat on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats [J]. *Apmis*, 2014, 122(9):810-817.
- [19] Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206 (3):145-150.
- [20] Suzuki T, Yamashita C, Zemans RL, et al. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via a PAR-1-, NF-kappaB-, and p53-dependent pathway [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41 (6):742-755.
- [21] Kwon AH, Qiu Z. Neutrophil elastase inhibitor prevents endotoxin-induced liver injury following experimental partial hepatectomy [J]. *Br J Surg*, 2007, 94(5):609-619.
- [22] Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, et al. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase [J]. *J Clin Invest*, 1986, 77 (4):1233-1243.
- [23] Ionescu CV, Cepinskas G, Savickiene J, et al. Neutrophils induce sequential focal changes in endothelial adherens junction components: role of elastase [J]. *Microcirculation*, 2003, 10(2):205-220.
- [24] Suzuki K, Okada H, Takemura G, et al. Neutrophil Elastase Damages the Pulmonary Endothelial Glycocalyx in Lipopoly saccharide-Induced Experimental Endotoxemia [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(8):1526-1535.
- [25] Tamakuma ST, Hirasawa H, et al. A phase III clinical study of neutrophil elastase inhibitor ONO-5046 * Na in SIRS patients [J]. *Rinsho Iyaku*, 1998, 14:289-318.
- [26] Tamakuma S, Ogawa M, Aikawa N, et al. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2004, 17(5):271-279.
- [27] Aikawa N, Fujishima S, Kobayashi M, et al. Cost-minimisation analysis of sivelestat for acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome [J]. *Pharmacoeconomics*, 2005, 23 (2):169-181.
- [28] Zeiher BG, Artigas A, Vincent JL, et al. Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(8):1695-1702.
- [29] Miyoshi S, Ito R, Katayama H, et al. Combination therapy with sivelestat and recombinant human soluble thrombomodulin for ARDS and DIC patients [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8:1211-1219.
- [30] Gao X, Zhang R, Lei Z, et al. Efficacy, safety, and pharmacoeconomics of sivelestat sodium in the treatment of septic acute respiratory distress syndrome: a retrospective cohort study [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(11):11910-11917.
- [31] Kido T, Muramatsu K, Yatera K, et al. Efficacy of early sivelestat administration on acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *Respirology*, 2017, 22(4):708-713.
- [32] Pu S, Wang D, Liu D, et al. Effect of sivelestat sodium in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1):148.
- [33] Ding Q, Wang Y, Yang C, et al. Effect of sivelestat in the treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Intensive Care Res*, 2023, 1:1-10.
- [34] Aikawa N, Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2014, 10:621-629.
- [35] Ren J, Deng G, Li R, et al. Possible pharmacological targets and mechanisms of sivelestat in protecting acute lung injury [J]. *Comput Biol Med*, 2024, 170:108080.

(收稿日期:2024-05-29;修回日期:2024-06-03)

(本文编辑:侯晓林)