



爆炸伤创面愈合过程中MMP-9和TGF- β 所起的作用和重量的变化

创面修复是一个复杂的病理过程,需要许多细胞因子和细胞外基质的参与。基质金属蛋白酶(MMP)是一组由结缔组织细胞分泌、参与细胞外基质(ECM)降解的蛋白酶,其活性受金属蛋白酶抑制剂(TIMP)的抑制,二者涉及到正常组织的重塑、骨和创伤的愈合、肿瘤的转移和许多疾病的发生。创伤修复的结果与胶原的合成、降解有密切联系。胶原合成、降解失衡是导致不完全修复的重要原因之一,而目前有关创面修复过程中内源性MMP-9和转化生长因子- β (TGF- β)含量变化及其对创面修复影响的报道尚较少。本实验在构建大鼠爆炸伤创面的动物模型基础上,观察了创面愈合过程中内源性MMP-9和TGF- β 的变化,探讨创面愈合过程中两者的变化趋势以及相互关系,为进一步探讨创面愈合机制和临床治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组 成年SD大鼠48只,体质量250~300 g,由南方医科大学南方医院动物实验中心提供,雌雄不拘。实验前进行1周饲养,实验前3 d连续测体温、脉搏、呼吸。经统计学分析,个体间无明显差异。将48只动物随机分为对照组和治疗组,每组24只。对照组在爆炸伤致伤后创面给予生理盐水喷洒,治疗组致伤后给予创面喷洒TIMP(0.33 mg/ml),2次/d,0.5 ml/次,分别在伤后4、24、48 h和5、7、14、21、28 d取样。致伤后全部放入人工气候模拟舱内,湿热环境条件为:干球温度(T_{db})(35.30±0.54)℃,相对湿度(Rh)(71.64±4.72)%。

1.1.2 大鼠背部爆炸伤动物模型的制备 致伤装置爆炸源为电击起爆的8#瞬发纸质电雷管,内装0.9 g单质猛炸药黑索金,密度1.20 g/cm³,柱装式,长54 mm,内径6.2 mm,外径8.6 mm,导线长2 m。雷管爆速6 726 m/s,爆压33.7 GPa,爆热5 066 J/kg,爆温4 000 ℃。致伤方法:40只大鼠均以20 g/L戊巴妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,背部脱毛备皮,麻醉后俯卧位固定于致伤架上。将雷管置于距背部2 cm处,雷管长轴垂直于表面皮肤。以4.5 V直流电引爆雷管,造成背部软组织缺损性损伤,伤口大小平均为(6.5±1.4)cm×(7.5±0.7)cm×(1.7±0.2)cm。

1.1.3 伤口液标本的采集 动物致伤后立即清创缝合,以体积分数0.03的过氧化氢与等渗盐水交替冲洗伤口,切除坏死组织,分层缝合肌层、皮下和皮肤。在皮下层放置3~5个2 cm×3 cm×0.5 cm的聚乙烯醇(PVA)海绵。PVA海绵置入前经流水一漂洗过夜,煮沸30 min消毒,置入时先浸入无菌等渗盐水中。于各时相点取出PVA海绵,同一时相组中,来自同一动物的PVA海绵每3个合为1个标本。离心,取上清,-70 ℃保存。

1.2 方法

1.2.1 MMP-9的测定 MMP-9含量的测定应用明胶酶谱法[1][2][3]。明胶蛋白、1,10-phenanthroline、苯甲基磺酰氟(PMSF)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)为Sigma公司产品;SDS、聚氧乙烯月桂醚(Brij-35)Ameresco产品;低分子量标准蛋白质Marker由上海丽珠东风生物技术公司提供。

1.2.2 TGF- β 测定 应用双抗体夹心法(ELISA)。TGF- β ELISA试剂盒由美国Biosource生物试剂公司提供,灵敏度为15.6 pg/ml,操作按说明书进行。每个标本检测2次,取其平均值。

1.3 统计学处理

使用SPSS11.0 for windows软件包进行统计学分析,不同时相点比较用单因素方差分析,组间均数比较采用t检验,两变量相关性采用直线相关分析。

2 结果

2.1 大鼠爆炸伤后伤口液中MMP-9含量的变化

对照组:在伤后4~24 h稳步上升,48 h达到高峰,以后维持在较高水平至第5天稍有回落,第14天时继续上升,第21天及第28天MMP-9达到最高值。治疗组:创面给予TIMP处理后,伤口液中MMP-9含量均比同一时相点有所降低,尤其是以伤后第14、21、28天降低最为明显(P<0.01)。

表 1 伤后对照组和治疗组不同时间伤口液 MMP-9 含量

Tab.1 MMP-9 measurement in effusion from the wound at different time points ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n=24$, $\text{Mean} \pm \text{SD}$)

Group	4 h	24 h	48 h	5 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Control	252.30±16.47	433.48±61.36	642.49±35.59	499.21±83.54	526.69±31.72	859.31±180.61	864.24±46.08	973.02±55.53
Treatment	219.33±25.91	373.98±86.53	594.32±19.18	463.49±61.00	468.81±37.37	501.42±54.42	485.03±19.39	439.25±23.60
<i>t</i>	1.860	0.971	2.920	0.598	2.045	9.091	13.13	15.34
<i>P</i>	0.136	0.386	0.055	0.582	0.11	0.001	0.000	0.000

MMP-9: Matrix metalloproteinases-9; Control group: $F=73.77$, $P=0.000$; Treatment group: $F=15.298$, $P=0.000$

2.2 创面伤口液中TGF- β 含量的变化

伤后4 h即升高, 24~48 h达峰值, 之后水平有所下降, 但仍维持在较高水平; 伤后第7天再次出现一高峰值, 以后逐渐下降; 到第28天时降为最低点, 为高峰值的1/3。由此可见TGF- β 的含量在创伤2周后始终维持在低水平。给予TIMP处理后, 24 h时TGF- β 即可见不同程度的升高。随着时间的不同, 升高的幅度逐渐增加。48 h、14 d、21 d、28 d 4个时间点两组比较有非常显著性差异($P<0.01$), 24 h、5 d两组比较有统计学差异($P<0.05$)。

表 2 伤后对照组和治疗组不同时间伤口液 TGF- β 含量Tab.2 TGF- β measurement in the effusion of the wound at different time points (ng/ml , $n=24$, $\text{Mean} \pm \text{SD}$)

Group	4 h	24 h	48 h	5 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Control	41.02±2.65	259.74±25.11	356.28±16.75	222.17±43.07	359.48±75.40	253.20±15.00	151.40±13.44	123.84±18.03
Treatment	44.90±14.85	337.17±26.59	434.87±18.34	360.50±32.50	412.43±37.75	523.58±7.63	521.53±24.80	606.02±40.41
<i>t</i>	-0.446	-3.666	-5.480	-4.440	-1.088	-27.813	-22.719	-18.871
<i>P</i>	0.679	0.021	0.005	0.011	0.338	0.000	0.000	0.000

TGF- β : Transforming growth factor- β ; Control group: $F=32.33$, $P=0.000$; Treatment group: $F=116.25$, $P=0.000$

3 讨论

正常情况下创面愈合和组织改建时, 基质蛋白的合成和降解保持动态平衡, 基质的降解受纤溶酶和MMP的调节。TGF- β 一方面刺激基质成分如纤维连接蛋白、胶原和基质蛋白多糖的表达, 另一方面诱导TIMPs和纤溶酶原激活抑制因子的表达, 从而导致细胞外基质的沉积。所以TGF- β 和MMP之间的平衡协调对创面的正常愈合和塑形至关重要[4][5]。

从本实验结果可以看出, TGF- β 的第一个高峰为伤后48 h, 伤后第7天出现第二高峰值。而MMP-9在伤后第48小时即升高, 这与文献的报道是一致的[6][7]。伤后第14天TGF- β 水平逐渐下降, 至伤后第28天水平最低; 而MMP-9在伤后第14天水平明显升高, 并持续表达至第28天。这可能是由于机体抗热代偿能力耗竭, 自身调节能力下降, 创面内细菌大量繁殖, 大量的金属蛋白酶释放, 抵消了TGF- β 水平, 降解了TGF- β 的活性, 使其含量在一定时间内随时间延长而逐渐降低。

正常组织内并不表达MMP-9, 伤后48 h创面液MMP-9水平升高, 这说明组织受伤后随着血液细胞成分迁移进入创面内。但是在慢性创面中, 活性过高的蛋白酶, 过度分解了基质成分, 并且降解了创面内的生长因子活性[8], 而低表达的生长因子无法正常地诱导基质成分如纤维连接蛋白、胶原和基质蛋白多糖的表达及基质沉积, 也无法诱导TIMPs和纤溶酶原激活抑制因子的表达, 形成一种难以纠正的恶性微环境, 从而阻碍了创面的愈合。

在创伤早期, MMP-9和TGF- β 均较早地介入创面的修复过程且有协同作用。一随着创面的逐渐愈合, MMP-9的表达降低。而在一些由于感染或其他原因所致创面长期不愈合的创面中, MMP-9和TGF- β 的作用相背而驰。本实验中, 伤后第2~4周, MMP-9水平持续在高水平表达, TGF- β 水平却维持在低水平表达, 这与Yager[9]的发现一致, 提示由于过度的蛋白分解阻碍了溃疡的愈合。过度的MMPs活性可以使创面局部组织内有效的生长因子及ECM成分降解, 导致细胞迁移及ECM的形成不充分, 这种MMPs蛋白分解作用相对过度的现象, 可以解释在缺乏适当的载体情况下, 多肽生长因子经常难以发挥促进慢性创面愈合的部分原因。

实验采用PVA海绵进行伤口液收集。PVA海绵组织相容性好, 对伤口组织不会造成明显的刺激作用, 对实验结果的影响较小[10]。虽然影响创面愈合的原因很多, 但从本实验可以看出, MMP-9活性升高, 维持在高水平的MMP-9加速基质的分解, 抑制生长因子的分泌和活性, 是造成创面愈合困难的一个不可忽视的因素; 治疗组创面给予TIMP后, 愈合时间明显缩短, 从而说明在愈合延迟伤口中, 降低MMP-9活性、抑制其分泌、加速其分解, 也是治疗难愈合创面的一个新的思路和尝试。

- [1]Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus[J]. Clin Biochem, 1993, 26(3): 191-8.
- [2]Zhang JK, Sun Y, Zhang JQ, et al. Appearance and regression of rat pouch tissue[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(5): 1005-13.
- [3]Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases[J]. Anal Biol, 1994, 218(2): 325-9.
- [4]Luke YO, Larsen PH, Krekoski CA, et al. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes[J]. J Neurosci, 1999, 19(19): 8464-75.
- [5]Kobayashi Y, Matsumoto M, Kotani M, et al. Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in langerhans cell migration and maturation[J]. J Immunol, 1999, 163(11): 5989-93.
- [6]Yang L, Chan T, Demare J, et al. Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- β 1 in the epidermis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(6): 2147-57.
- [7]Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis[J]. Genes Dev, 2000, 14(2): 163-76.
- [8]Pyo R, Lee JK, Shipley JM, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms[J]. J Clin Invest, 2000, 105(11): 1641-9.
- [9]Yager DR, Zhang LY, Liang HX, et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids[J]. J Invest Dermatol, 1996, 107(5): 743-8.
- [10]Sawai T, Usui N, Sando K, et al. Hyaluronic acid of wound fluid in adult and fetal rabbits[J]. J Pediatr Surg, 1997, 32(1): 41-3.

[回结果列表](#)