

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

朱新勇¹, 方驰华¹, 张丽芸², 左大明², 陈政良² (1 南方医科大学珠江医院普外科, 广东 广州 510282; 2 南方医科大学免疫教研室, 广东 广州 510282)

摘要:目的 通过研究湿热环境基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及转化生长因子- β (TGF- β)在创面愈合过程中的表达变化, 探讨它们对创面愈合所起的作用以及两者之间的相互关系, 为临床预防和治疗湿热环境下战伤创面提供理论依据。方法 建立湿热环境爆炸伤创面的动物模型, 收集伤后 4、24、48 h 和 5、7、14、21、28 d 创面渗液。采用明胶酶谱法和 ELISA 法, 分别对创面 MMP-9 和 TGF- β 进行检测。结果 创面愈合过程中 MMP-9 和 TGF- β 有规律性变化, 以伤后 48 h 为高峰, TGF- β 伤后 7 d 出现第二高峰, 伤后 2 周两者水平下降, 并且出现分离现象。创面给予金属蛋白酶抑制剂 (TIMP) 的干预, 在早期无明显作用, 但在后期, 即伤后 2 周, 可以降低 MMP-9、上调 TGF- β 的水平。结论 创面愈合过程中, 早期 MMP-9 和 TGF- β 水平上升促进了创面细胞的迁移, 有利于创面炎性坏死组织的清除, 可能是创面愈合的机制之一, 而 MMP-9 水平的过度升高, 不利于创面的愈合。合理外用 TIMP 对促进延迟愈合创面的愈合会取得良好的效果。

关键词: 爆炸伤; 伤口愈合; 金属蛋白酶类; 转化生长因子 β ; 湿热环境

中图分类号: R642 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)07-0844-03

Expressions and role of endogenetic matrix metalloproteinases-9 and transforming growth factor-beta during wound healing of blast injury

ZHU Xin-yong¹, FANG Chi-hua¹, ZHANG Li-yun², ZUO Da-ming², CHEN Zheng-liang²

¹Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

²Department of Immunology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of endogenetic matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) and transforming growth factor- β (TGF- β) and their role in the wound healing of blast injury. **Methods** Rat models of blast injury under a humid and hot environment were established and the effusion from the wound surface was collected at 4, 24, 48 h and 5, 7, 14, 21 and 28 days after injury, respectively. The contents of MMP-9 and TGF- β in the effusion of the wound were measured by zymography and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. **Results** During the wound healing of blast injury, MMP-9 and TGF- β exhibited changes that followed a regular pattern, both reaching the peak value at 48 h after the injury. TGF- β content reached the another peak on day 7. TGF- β value and MMP-9 contents decreased in the second week after injury and their reduction was no longer parallel. Administration of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in the early phase of injury showed no obvious effect, but during the 2 weeks after the injury, its administration caused decrease in MMP-9 content and increase in TGF- β content in the effusion. **Conclusions** In the early phase of wound healing, the elevation of MMP-9 and TGF- β accelerated cell migration to promote the clearance of the inflammatory necrosis tissues, which might be one of the wound healing mechanisms. But overexpression of MMP-9 in the wound may hinder wound healing, and appropriate use of TIMP can accelerate the delayed wound healing.

Key words: blast injury; wound healing; matrix metalloproteinases; transforming growth factor-beta; high humid and high hot environment

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

收稿日期: 2005-01-22

基金项目: 全军十五医学科科研项目(01MA134)

Supported by Mandatory Project of the Tenth Five-Year Plan for Medical Science of PLA

作者简介: 朱新勇 (1966-), 男, 博士, 副主任医师, E-mail: zxy517710@sohu.com

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(Tdh)(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 戊巴比妥钠(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^[1-3]。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 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n=24$, Mean \pm 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, $n=24$, Mean \pm SD)

Group	4 h	24 h	48 h	5 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Control	41.02 \pm 2.65	259.74 \pm 25.11	356.28 \pm 16.75	222.17 \pm 43.07	359.48 \pm 75.40	253.20 \pm 15.00	151.40 \pm 13.44	123.84 \pm 18.03
Treatment	44.90 \pm 14.85	337.17 \pm 26.59	434.87 \pm 18.34	360.50 \pm 32.50	412.43 \pm 37.75	523.58 \pm 7.63	521.53 \pm 24.80	606.02 \pm 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。—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。

参考文献:

- [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.