

文章编号:1000-5404(2013)04-0293-04

论著

低氧环境对创面修复主要效应细胞表达 MMP-9 的作用

黄 肿,江旭品,张 琼,贾丽杰,张家平,黄跃生 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨低氧(2% O₂)对创面修复主要效应细胞(表皮细胞及真皮成纤维细胞)表达 MMP-9 的影响。**方法** 常规培养人表皮细胞及人真皮成纤维细胞,分为常氧组和低氧组(设低氧培养 3 h 和 6 h 两个组),采用 Western blot、明胶酶谱法和荧光定量 PCR 法检测人表皮细胞和真皮成纤维细胞 MMP-9 细胞蛋白表达、MMP-9 细胞外分泌和 MMP-9 转录水平变化。**结果** 常氧培养的表皮细胞中,MMP-9 呈一定程度的基础表达和细胞外分泌。与常氧组比较,低氧能明显促进表皮细胞 MMP-9 的蛋白表达(6 h 时增强约 20%, $P < 0.01$)和 MMP-9 的细胞外分泌[(44.03 ± 3.00) vs (60.64 ± 3.77), $P < 0.01$]。常氧与低氧条件下真皮成纤维细胞极少表达和分泌 MMP-9。荧光实时定量 PCR 结果显示,低氧培养条件下表皮细胞 MMP-9 mRNA 水平显著增高,常氧对照组为(1.67 ± 0.69),低氧 6 h 组为(5.47 ± 0.51),两者比较差异有统计学意义($P = 0.002$)。**结论** 低氧刺激能显著诱导表皮细胞,而非真皮成纤维细胞,表达和分泌 MMP-9,这一作用可能与低氧刺激促进 MMP-9 的转录有关。

[关键词] 创面愈合;低氧;HaCaT 细胞;人成纤维细胞;MMP-9

[中图分类号] R322.991;R329.25;R364.4

[文献标志码] A

Hypoxia up-regulates MMP-9 in epidermal cells during wound repair

Huang Chong, Jiang Xupin, Zhang Qiong, Jia Lijie, Zhang Jiaping, Huang Yuesheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of hypoxia (2% oxygen) on the expression of MMP-9 in main effector cells and epidermal cells and fibroblasts during wound repair. **Methods** Human epidermal HaCaT cells and primarily cultured fibroblasts from fresh foreskin tissues by circumcision were divided into 2 groups, normoxic group (synchronous culture, no treatment), and hypoxia group (including 2 subgroups with 3 and 6 h under hypoxia). The expression of MMP-9 in epidermal cells and fibroblasts, extracellular secretion of MMP-9 precursor expressions and changes of MMP-9 at the transcription level were respectively by Western blotting, gelatin zymography and fluorescence quantitative PCR. **Results** MMP-9 had a certain degree of basal expression and extracellular secretion in epidermal cells from normoxic group. Hypoxia significantly promoted the expression levels of MMP-9 protein in the epidermal cells (20% increased in 6 h compared with the normoxic group, $P < 0.01$), and the extracellular secretions of MMP-9 precursor protein in hypoxia group at 6 h and normoxic control group (60.64 ± 3.77 vs 44.03 ± 3.00, $P < 0.01$). However, fibroblasts almost never expressed or secreted MMP-9 under normoxic and hypoxic conditions. Fluorescence real-time quantitative PCR indicated hypoxia increased MMP-9 mRNA expression in epidermal cells (hypoxia group at 6 h 5.47 ± 0.51 vs normoxic control group 1.67 ± 0.69, $P = 0.002$). **Conclusion** Hypoxic stimulation significantly induces the expression and secretion of MMP-9 in epidermal cells, rather than dermal fibroblast, which may be related to the promotion of MMP-9 at transcription level in the wound under local hypoxic environment.

[Key words] wound healing; hypoxia; HaCaT cell lines; human dermal fibroblast; MMP-9

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973125) and the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB518101). Corresponding author: Huang Yuesheng, E-mail: yshuang.tmmu@gmail.com; Zhang jiaping, E-mail: japzhang@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973125);国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB518101)

[通信作者] 黄跃生, E-mail: yshuang.tmmu@gmail.com

张家平, E-mail: japzhang@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.003.html>(2012-12-11)

创面再上皮化是创面修复的早期事件和核心环节,表现为创缘新生表皮向创面中心的持续移行。研究显示,创面(包括烧伤创面)形成后,由于局部耗氧量增多及微循环破坏,创面及周边形成了局部低氧环境^[1],这一低氧环境对早期创面修复的启动,包括促进创面表皮移行,具有积极意义^[2]。MMP-9属基质金属蛋白酶家族成员,其不表达于正常皮肤组织,而在创面形成后由多种细胞表达和分泌,通过移除和重塑细胞外基质在创面表皮细胞移行和再上皮化中发挥重要作用^[3-5]。在创面修复早期,已观察到多种细胞,包括表皮细胞、成纤维细胞和炎症细胞均可诱导表达MMP-9。创面局部低氧是否是创面修复早期上述细胞表达MMP-9的诱导因素,目前尚不清楚。本研究通过细胞体外低氧模型,观察低氧培养对创面修复主要效应细胞表皮细胞和真皮成纤维细胞表达MMP-9的影响,为进一步揭示创面局部低氧环境促进创面修复的细胞分子机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

HaCaT表皮细胞株来源于中科院上海细胞库;成纤维细胞取自泌尿外科门诊人包皮环切手术中的包皮组织,患者年龄10~22岁(取材过程中已告知患者,并通过医院伦理委员会的审查)。荧光定量Real time PCR试剂盒、逆转录试剂盒(TOYOBO公司),青、链霉素双抗、1640培养基、胎牛血清、胰酶(Gibco公司),MMP-9与GAPDH一抗(Abcam公司),山羊抗兔二抗(KPL公司),二氧化碳培养箱(Forma公司),凝胶成像系统(美国Bio Rad),低氧培养箱(Thermo公司),LightCycler型实时荧光定量基因扩增系统(ABI公司),酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组 HaCaT细胞在37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下用含10%胎牛血清+1640培养基培养24h,然后重新更换含10%胎牛血清的1640培养液培养;实验分为正常对照组(21% O₂)、低氧(2% O₂)3h组以及低氧(2% O₂)6h组。成纤维细胞在37℃、5% CO₂和饱和湿度的条件下用含10%胎牛血清高糖DMEM培养基培养24h,然后重新更换培养;实验分为正常对照组(21% O₂)、低氧(2% O₂)3h组以及低氧(2% O₂)6h组。

1.2.2 原代成纤维细胞分离及培养

1.2.2.1 原代培养 在泌尿外科门诊手术室无菌条件下,切取新鲜包皮皮肤,无菌盐水反复冲洗后放入DMEM培养液内带回超净台工作间。把组织块置于培养皿内,PBS液漂洗若干遍后眼科剪剪切组织块约为1mm×1mm×1mm大小,接种于25cm²培养瓶瓶壁上,组织块0.3~0.5cm。于37℃培养箱内培育3.5h,然后向瓶底慢慢注入DMEM培养液5mL,置于37℃温箱内培养,1周以后取出培养瓶,弃去瓶内培养液,PBS液漂洗若干次后加相同的培养液5mL继续培养。待细胞萌出后,以同样方法每周换液2次。

1.2.2.2 传代培养 待原代培养成纤维细胞生长基本融合

成片时即可消化传代。弃去培养瓶内的培养液,向瓶内加入0.25%的胰蛋白酶溶液少许。消化大约1min,镜下观察其细胞质回缩,见细胞间隙增大时立即吸出消化液,加入含10%血清的DMEM培养液终止消化。用吸管轻轻反复吹打瓶壁细胞使之脱落形成细胞悬液并吹打约180次充分混匀细胞悬液,按1:3比例分装传代,加入5mL的DMEM培养液后置于37℃恒温培养箱内培养,隔日换液1次,待细胞融合成单层再次传代。本实验均在第4~8代进行。

1.2.3 RNA的提取及荧光定量反转录聚合酶链反应 取约5×10⁵个HaCaT细胞,加入1mL Trizol吹打若干次,室温静置15min,加入0.2mL氯仿,混匀以后室温静置15min,然后于4℃12000×g下离心15min,吸取上层液相,加入1mL的异丙醇,混匀后室温静置10min,再于4℃12000×g情况下离心10min,弃上清,75%乙醇清洗1次,将EP管倒置于滤纸上,将RNA沉淀晾干,用约30μL无RNA酶去离子水溶解沉淀。总RNA定量后取1μg进行反转录(25μL体系),反转录按试剂盒说明书进行。反转录完成后进行荧光定量聚合酶链反应:取1μL cDNA样本作为PCR扩增模板,阴性对照扩增模板为无RNA酶的去离子水;扩增条件为95℃预变性30s;随后95℃30s,62℃1min,共45个循环。采用Primer Premier 5.0软件设计引物,引物由北京鼎国公司合成。MMP-9上游引物:5'-GCCTGCAACGTGAACATCT-3',下游引物:5'-TCAAAGACCGAGTCCAGCTT-3',片段大小173bp。GAPDH上游引物:5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3',下游引物:5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCC TTGT-3',片段大小127bp。实验重复3次,记录Ct值,采用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量。

1.2.4 蛋白抽提及Western blot检测 取各组铺满6孔板的HaCaT细胞以及铺满40mL培养方瓶的成纤维细胞,用SDS裂解液裂解细胞,迅速放于冰盒上,超声仪超声打断大的DNA分子,沸水放置5min使蛋白变性,按RCDC法定量后等量25μg上样后经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳约90min,将蛋白转移至PVDF膜上,100V电压下运行90min后于含5%的脱脂奶粉中封闭1h,用兔抗人单克隆抗体MMP-9抗体(稀释度1:1000)孵育对应条带,4℃冰箱过夜。次日用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗37℃孵育1h(二抗稀释度为1:5000),每次孵育完后均用TBS洗膜4遍,每次15min。将化学发光试剂滴加于膜上,于凝胶成像仪中曝光获取图像,用Image J软件对照片进行分析,计算目的条带与内参条带灰度值的比值。

1.2.5 明胶酶谱法 将各组铺满6孔板的HaCaT细胞以及各组培养瓶上成纤维细胞的细胞上清定量为1mL,在总培养时间相同,但是低氧处理不同时间后,提取上清培养液,等体积30μL上样后,于含0.1%明胶的7.5%聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后取出胶体,置于洗脱液(2.5% TritonX-100)中震荡洗涤约1h;明胶缓冲液(50mmol/L Tris,100mmol/L CaCl₂,200mmol/L NaCl,1μmol/L ZnCl₂)37℃孵育过夜,次日于考马斯亮蓝溶液中染色1h,后用脱色液脱色约30min,得到深蓝色背景上的透亮带。于凝胶成像仪中拍取照片。用Image J软件分析亮度值。

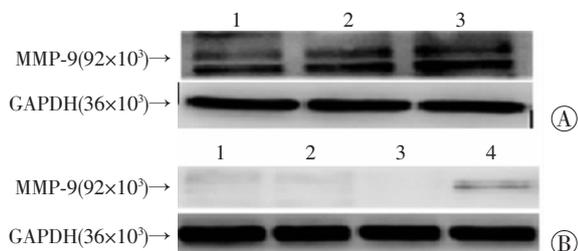
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件,两组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Western blot 检测 MMP-9 蛋白表达

正常对照组 HaCaT 细胞 MMP-9 蛋白表达水平(0.51 ± 0.15),低氧 3 h 组为(1.02 ± 0.14),二者比较差异显著($P = 0.014$)。低氧 6 h 组为(1.23 ± 0.14),与正常对照组比较有显著差异($P = 0.004$)。而在成纤维细胞中,无论是常氧或是低氧培养条件,几乎未检测到 MMP-9 表达(图 1)。

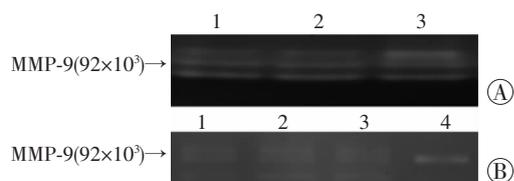


A: HaCaT 细胞 1:正常对照组;2:低氧 3 h 组;3:低氧 6 h 组;B:成纤维细胞 1:正常对照组;2:低氧 3 h 组;3:低氧 6 h 组;4:HaCaT 细胞正常对照组

图 1 Western blot 检测 MMP-9 在 HaCaT 细胞以及人成纤维细胞内蛋白表达

2.2 明胶酶谱法检测 MMP-9 的胞外分泌

HaCaT 表皮细胞正常对照组 MMP-9 的含量为(44.03 ± 3.00),低氧 3 h 组为(45.66 ± 1.62),低氧 6 h 组为(60.64 ± 3.77),低氧培养 6 h 组显著高于正常对照组($P = 0.001$)。而成纤维细胞无论常氧还是在低氧培养下,其培养液中 MMP-9 的含量都极少(图 2)。



A: HaCaT 细胞 1:正常对照组;2:低氧 3 h 组;3:低氧 6 h 组;B:成纤维细胞 1:正常对照组;2:低氧 3 h 组;3:低氧 6 h 组;4:HaCaT 细胞正常对照组

图 2 明胶酶谱法检测 MMP-9 在 HaCaT 细胞以及人成纤维细胞胞外表达

2.3 Real-time PCR 检测 MMP-9 mRNA 表达

低氧培养 HaCaT 细胞 6 h 后,HaCaT 细胞 MMP-9 mRNA 水平(5.47 ± 0.51)较正常对照组(1.67 ± 0.69)明显增高($P = 0.002$)。

3 讨论

MMPs 是一组能够水解细胞外基质的蛋白裂解酶,MMP-9 是其家族中的重要一员,又称 IV 型胶原酶或明胶酶。MMP-9 合成后以酶原的形式从细胞内分泌到细胞外。MMP-9 参与了急性创面修复的几个早期步骤,包括角质形成细胞从基底膜脱离,促进细胞沿创面基质爬行等。MMP-9 表达升高可促进上皮细胞的移行^[10];反之,则抑制表皮细胞移行^[11]。

最近有研究表明,在大鼠创面模型中,MMP-9 的表达在创面形成后持续升高,伤后 3 d 达顶峰,而后逐渐下降,21 d 后降至正常皮肤水平^[12]。另有研究采用低氧探针证明创面形成的第 3 天局部低氧达到了最大程度,而后逐渐回归正常^[13],提示创面局部低氧环境与 MMP-9 的表达存在较强的关联度。已知创面形成 3 d 后创周氧分压小于 10 mmHg^[14],而 2% 的氧浓度接近 10 mmHg 左右的低氧环境^[15],因此本研究采用 2% 的氧浓度作为体外实验的刺激因素,在一定程度上模拟了在体创面修复早期细胞所处的局部低氧环境。

有关创面局部低氧诱导创面 MMP-9 表达的主要效应细胞目前并不清楚。本研究表明,低氧培养条件下,表皮细胞 MMP-9 的表达明显升高,提示局部低氧可能在创面修复早期通过诱导表皮细胞表达 MMP-9,进而促进表皮细胞移行,参与创面修复。我们也发现,低氧培养条件下表皮细胞 MMP-9 mRNA 水平显著增高,说明低氧可能从转录水平促进了表皮细胞表达 MMP-9,但具体调节机制有待深入探讨。另有研究显示,真皮成纤维细胞也是创面修复早期 MMP-9 诱导表达的重要效应细胞^[12]。我们发现,无论是常氧或低氧培养条件下,真皮成纤维细胞 MMP-9 的表达量都极少,与体内观察结果有区别,考虑与在体环境下创面修复细胞所处环境更为复杂有关^[15]。本研究采用体外低氧培养模型,证明了单一低氧刺激并不是真皮成纤维细胞表达 MMP-9 的诱发因素。

综上所述,本实验从 MMP-9 的表达和细胞外分泌两方面,比较了低氧刺激对人表皮细胞与真皮成纤维细胞表达 MMP-9 的影响,结果提示,表皮细胞,而不是成纤维细胞,是低氧刺激诱导 MMP-9 表达的效应细胞。研究为进一步探讨创面局部低氧环境促进创面愈合的作用及机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Tandara A A, Mustoe T A. Oxygen in wound healing--more than a nutrient [J]. World J Surg, 2004, 28(3): 294-300.
- [2] Singer A J, Clark R A. Cutaneous wound healing [J]. N Engl J Med, 1999, 341(10): 738-746.
- [3] Mignatti P, Rifkin D B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis [J]. Enzyme Protein, 1996, 49(1/3): 117-137.
- [4] Salo T, Lyons J G, Rahemtulla F, et al. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes [J]. J Biol Chem, 1991, 266(18): 11436-11441.
- [5] Dunsmore S E, Rubin J S, Kovacs S O, et al. Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production [J]. J Biol Chem, 1996, 271(40): 24576-24582.
- [6] O'Toole E A, Marinkovich M P, Peavey C L, et al. Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue [J]. J Clin Invest, 1997, 100(11): 2881-2891.

- [7] Ridgway P F, Ziprin P, Peck D H, *et al.* Hypoxia increases reepithelialization via an alphavbeta6-dependent pathway [J]. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(2): 158 - 164.
- [8] Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, *et al.* Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314 - 321.
- [9] Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(5): 998 - 1008.
- [10] Seomun Y, Kim J T, Joo C K. MMP-14 mediated MMP-9 expression is involved in TGF-beta1-induced keratinocyte migration [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(3): 934 - 941.
- [11] Xue M, Jackson C J. Autocrine actions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 counter the effects of MMP-9 to promote survival and prevent terminal differentiation of cultured human keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(11): 2676 - 2685.
- [12] Manuel J A, Gawronska-Kozak B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice [J]. *Matrix Boil*, 2006, 25(8): 505 - 514.
- [13] Xing D, Liu L, Marti G P, *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factor in the burn wound [J]. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(2): 205 - 213.
- [14] Horikoshi T, Balin A K, Carter D M. Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 1986, 86(4): 424 - 427.
- [15] Hopf H W, Rollins M D. Wounds: an overview of the role of oxygen [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(8): 1183 - 1192.

(收稿:2012-10-19;修回:2012-11-22)

(编辑 龙 亮)

经验交流

文章编号:1000-5404(2013)04-0296-01

36例剖宫产术中氯胺酮和丙泊酚全麻诱导的应用疗效分析

李源强 (401520 重庆 合川,合川区妇幼保健院麻醉科)

[关键词] 剖宫产术全麻诱导;氯胺酮;丙泊酚
[中图法分类号] R614.2 [文献标志码] B

临床上行剖宫产术常采用的麻醉方式是区域麻醉,如:脊髓麻醉、硬膜外麻醉和硬-腰联合麻醉(combined spinal and epidural anesthesia, CSEA)。但是当产妇伴有区域麻醉禁忌证(例如:凝血系统功能障碍、穿刺部位炎症、脊柱畸形等)时,必须选择全身麻醉。全麻中产妇术中无知晓,保持了气道的通畅,减少了术中血容量不足的产妇低血压的发生,是一种比较理想的产科麻醉方法^[1]。现对我院近年应用小剂量氯胺酮和丙泊酚进行全麻诱导的剖宫产手术进行回顾性分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2009年6月至2011年6月期间,36例全身麻醉下剖宫产术病例。孕周均大于39周,年龄(29±6)岁。美国麻醉协会(american society of anesthesiologists, ASA)麻醉分级I~II级。其中血小板减少凝血功能障碍者6例,脊椎畸形不能行椎管内麻醉4例,肥胖致硬膜外穿刺困难者4例,椎管内麻醉阻滞失败而改为全身麻醉者7例,患者拒绝接受椎管内麻醉者5例,腰膝疼痛者4例,硬膜外穿刺出血者6例,术前均无明显的胎儿宫内窘迫。

1.2 处理措施及评价方法

产妇术前30 min 静脉注射胃复安10 mg,甲氧咪呱300 mg。入室后行心电图监护,麻醉前快速滴注500 mL 复方氯化钠,产科

医生准备就绪后,面罩给氧去氮3 min 后开始麻醉诱导。静注氯胺酮1.0 mg/kg, 丙泊酚1.0 mg/kg,琥珀胆碱1.5 mg/kg,快速诱导后气管内插管。接Heal Force 麻醉机行机械通气,潮气量:8 mL/kg,呼吸频率:12 次/min,吸呼比:1:2,呼吸末CO₂在35~40 mmHg之间,0.75%异氟醚吸入。新生儿娩出后静脉注射舒芬太尼5~10 μg/kg,维库溴胺0.05 mg/kg,咪达唑仑0.02~0.05 mg/kg,静脉20 U 缩宫素滴注,术中根据需要间断推注丙泊酚,舒芬太尼及维库溴胺。新生儿娩出后常规吸痰清理呼吸道,面罩吸氧,轻拍足底,分别于胎儿娩出后1、5、10 min 行Apgar评分(8~10分为正常,4~7分为轻度窒息,0~3为重度窒息)。记录插管前,插管时,插管后,手术结束时收缩压(SBP),心率(HR),脉搏血氧饱和(SpO₂)。

2 结果

2.1 新生儿情况

36例新生儿娩出后1 min 无1例重度窒息(Apgar评分0~3分)发生,娩出后1 min 胎儿轻度窒息(Apgar 4~7分)4例,经清理呼吸道面罩人工通气辅助呼吸后好转,36例新生儿5、10 min Apgar评分都恢复正常,Apgar评分为10分,哭声响亮,心率呼吸正常,肌张力好。

2.2 产妇情况

36例产妇在氯胺酮和丙泊酚诱导下均顺利完成了剖宫产手术,术中产妇的SBP,HR,SpO₂情况见表1。36例产妇均未术中知晓、术中体动、术后烦躁等不良反应,全部产妇未见呕吐、误吸发生。术后24 h 随访产妇和新生儿均健康平稳,7 d 后顺利出院。

(下转 301 页)

[通信作者] 李源强,电话:(023)42838585

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1733.017.html> (2013-01-31)