

· 论著 ·

增生性瘢痕中基质金属蛋白酶及其抑制因子基因的表达

谢晓繁 贺立新 郝晓凤 陈璧 贾赤宇 孙志刚 曹玉珏 李冬海

【摘要】 目的 了解基质金属蛋白酶 2(MMP-2, 又称明胶酶 A)、MMP-9(又称明胶酶 B)及其金属蛋白酶 1 组织抑制因子(TIMP-1)在增生性瘢痕不同形成时期的基因表达。 **方法** 提取 16 例人体不同时期增生性瘢痕样本和 8 例正常皮肤样本总 RNA, 分离 mRNA, 用反转录-聚合酶链反应法检测 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 基因在不同样本中的表达。 **结果** 在正常皮肤中 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 基因转录产物的灰度比值分别为(3.8 ± 0.7)%、(5.8 ± 4.4)%、(30.3 ± 3.0)%, 在增殖期瘢痕中分别为(13.5 ± 4.5)%、(18.4 ± 4.7)%、(37.7 ± 4.3)%, 明显高于正常皮肤(P < 0.05)。成熟期瘢痕 MMP-2 和 MMP-9 基因表达量已恢复至正常水平, 但 TIMP-1 基因较正常皮肤仍持续高表达(P < 0.05)。 **结论** MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 基因表达增强可能是增生性瘢痕形成的机制之一, MMP-2 和 MMP-9 基因表达降低可能与增生性瘢痕达到相对稳定的成熟状态有关。

【关键词】 基质金属蛋白酶类; 金属蛋白酶 1 组织抑制剂; 瘢痕, 肥大性; 基因表达

Expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and their inhibitor-1 in hypertrophic scars XIE Xiao-fan*, HE Li-xin, HAO Xiao-feng, CHEN Bi, JIA Chi-yu, SUN Zhi-gang, CAO Yu-jue, LI Dong-hai. *Department of Burns and Plastic Surgery, Youanmen Hospital of Beijing Hospital Association, Beijing 100069, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the gene expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in proliferative and mature hypertrophic scars. **Methods** Total RNA from 8 normal skin samples and from 16 human hypertrophic scar samples of different maturing stage was respectively extracted, and then mRNA was isolated. The gene expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in these samples were examined with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The gray scale ratio of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 transcription in normal skin were (3.8 ± 0.7)%, (5.8 ± 4.4)%, (30.3 ± 3.0)%, respectively, which were obviously higher than those in proliferative hypertrophic scar [(14 ± 5)%, (18 ± 5)%, (38 ± 4)%, P < 0.05]. The expression of MMP-2 and MMP-9 genes in mature hypertrophic scar returned to normal level, but that of TIMP-1 remained high when compared with that of normal level (P < 0.05). **Conclusion** The increase in MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 gene expression might be involved in the formation of hypertrophic scars, while the lowering of MMP-2 and MMP-9 gene expression might be associated with the maturation of hypertrophic scars.

【Key words】 Matrix metalloproteinases; Tissue inhibitors of metalloproteinase-1; Cicatrix, hypertrophic; Gene expression

严重创面愈合后形成增生性瘢痕是个复杂的病理学过程, 细胞移行、肉芽组织形成、新生血管化以及基质的重塑均依赖于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的分泌和降解^[1]。随着瘢痕组织的发生, ECM 内胶原纤维的类型和分布不断变化。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一组具有共同生化性质、可降解 ECM 的锌依赖性肽链内切酶, 参与 ECM 代谢。金属蛋白酶类组织抑制因子(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)是组织

局部表达 MMP 的特异抑制因子, 二者之间的平衡在创伤修复过程中可能起重要作用^[2]。本研究拟了解增生性瘢痕不同形成期中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 基因的表达变化规律, 以分析其与增生性瘢痕发生和成熟机制的相关性。

1 对象与方法

1.1 标本来源及制备

取 16 例整形手术患者的增生性瘢痕组织标本, 其中男 10 例、女 6 例。伤口愈合时间为 4 个月 ~ 11 年。瘢痕增生时间 1 年以内 8 例, 1 ~ 2 年 4 例, 2 年以上 4 例。伤口愈合时间在 1 年以内的瘢痕为增殖期的增生性瘢痕, 超过 1 年的瘢痕为成熟期的增生

作者单位: 100069 北京医院协会右安门医院烧伤整形科(谢晓繁、贺立新、孙志刚、曹玉珏、李冬海); 第四军医大学西京医院全军烧伤中心(郝晓凤、陈璧、贾赤宇)



性瘢痕。另取 8 例患者供皮区正常全层皮肤作为对照。以上取样患者均知情同意。所有取材部位未经任何治疗,标本冻存于液氮用于基因检测。

1.2 RNA 的提取与分离

提取上述组织样本中的总 RNA,用 DU-70 型紫外分光分析仪(美国 Beckman 公司)和 DYY 型凝胶电泳仪(北京六一仪器厂)检测所提取的总 RNA,进一步分离纯化 mRNA 并测定其纯度。

1.3 相关基因的表达及测定

采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法。每份样品取等量 mRNA,采用美国 Promega 公司的 A3500 反转录试剂盒,按说明书进行 cDNA 合成。根据人 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 β 肌动蛋白基因的 cDNA 序列,按照引物设计原则设计引物,并利用 Blast 软件进行同源性比较。PCR 的条件为 94 °C 变性 3 min;扩增:94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s;72 °C 延伸 10 min。每个基因进行 35 个循环。所有样品取等量的 mRNA 进行 PCR 扩增。取 PCR 产物 5 μ l,在 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳。扫描电泳结果,用 UVP-GDS 800 型凝胶图像分析系统(英国 Cambridge 公司)对目的基因的 PCR 产物进行灰度测定。基因表达量以其灰度值与 β 肌动蛋白基因灰度值的百分比表示。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件处理,组间阳性率资料采用 Student-Newman-Keul 方法进行检验。

2 结果

2.1 总 RNA 检测和 mRNA 纯化结果

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,18S rRNA 和 28S rRNA 条带清晰,两者比例约为 1.0:2.5。取等量总 RNA 分离纯化 mRNA 后,通过反转录反应体系获取增生性瘢痕和正常皮肤组织的 cDNA。

2.2 不同组织中 MMP-2 和 MMP-9 基因表达结果

在正常皮肤和不同形成时期的增生性瘢痕中,MMP-2 和 MMP-9 基因的表达变化规律相似,得到的特异性 DNA 片段长度分别为 190 bp 和 213 bp(图 1)。增殖期瘢痕组织中,MMP-2 和 MMP-9 的表达水平分别为(13.5 \pm 4.5)%、(18.4 \pm 4.7)% ,明显高于各自的正常值(3.8 \pm 0.7)%、(5.8 \pm 4.4)% ($P < 0.05$);成熟期瘢痕组织中,2 种基因表达水平分别为(3.6 \pm 0.8)%、(3.6 \pm 2.5)% ,接近各自的正常值 ($P > 0.05$)。

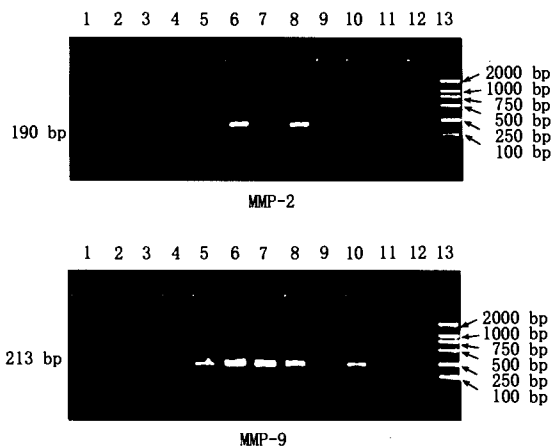


图 1 增生性瘢痕和正常皮肤组织中基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)与 MMP-9 基因表达结果。1~4.成熟期的增生性瘢痕;5~8.增殖期的增生性瘢痕;9~12.正常皮肤;13. DL 2000 DNA marker

2.3 不同组织中 TIMP-1、 β 肌动蛋白基因表达结果

TIMP-1 和 β 肌动蛋白基因的 RT-PCR 产物分别为 253 bp 和 705 bp。在增殖期和成熟期瘢痕组织中,TIMP-1 基因表达水平各为(37.7 \pm 4.3)%、(36.8 \pm 2.5)% ,均显著高于正常皮肤表达水平(30.3 \pm 3.0)% ($P < 0.05$)。作为内参照的 β 肌动蛋白基因,在正常皮肤和不同时期的增生性瘢痕组织中表达水平接近。见图 2。

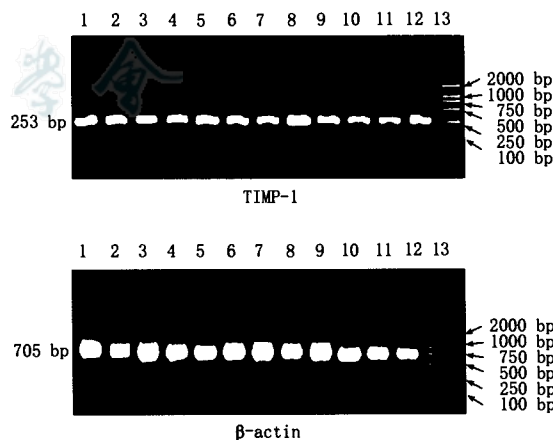


图 2 增生性瘢痕和正常皮肤组织中金属蛋白酶 1 组织抑制因子 (TIMP-1)与 β 肌动蛋白 (β -actin) 基因表达结果。1~4.成熟期的增生性瘢痕;5~8.增殖期的增生性瘢痕;9~12.正常皮肤;13. DL 2000 DNA marker

3 讨论

以往认为,瘢痕的过度增生是病变部位成纤维细胞产生的大量 ECM(如胶原蛋白、纤连蛋白、糖胺多糖等)在细胞外过度沉积所致。但实际上表皮细胞、成纤维细胞的迁移分化,血管内皮细胞的增殖,

新血管的形成等都影响着增生性瘢痕的形成^[3]。MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶,其水解底物为变性胶原和 ECM 的主要成分,如 IV 型胶原和 V 型胶原等。MMP-2 还可以降解糖蛋白成分纤连蛋白和层黏连蛋白,在增生性瘢痕发生和成熟过程中起着十分重要的作用^[4]。为此在本研究中,笔者观察了不同发生时期增生性瘢痕组织内这 2 种 MMP 及其抑制因子 TIMP-1 基因表达的变化规律。

研究结果提示,在正常皮肤组织内,MMP-2 和 MMP-9 基因表达水平较低,以维持皮肤组织正常结构和血管形成。在增殖期的瘢痕组织中,上述 2 种基因表达水平显著升高,可能与增生性瘢痕发生初期组织细胞内炎性介质、细胞因子等大量积累,刺激成纤维细胞、内皮细胞和角质形成细胞大量表达 MMP-2 和 MMP-9 有关。MMP-2、MMP-9 可以通过降解上皮细胞和成纤维细胞的基底膜和 ECM,促进其增殖迁移,加速肉芽组织过度增生和组织重建,诱导增生性瘢痕的形成。此外,它们还参与调控内皮细胞和角质形成细胞的迁移,加速新生血管的生成和创面再上皮化。

据文献报道,在创伤愈合早期(伤后 3~8 周),MMP-2、MMP-9 蛋白含量和生物活性明显升高,可持续到瘢痕形成后 9 个月^[5,6]。这表明 MMP-2、MMP-9 在瘢痕组织的重建和形成过程中起着十分重要的作用。在成熟期的瘢痕组织内,MMP-2、MMP-9 基因表达恢复到正常皮肤水平,其原因可能是 ECM 降解作用减弱,瘢痕组织内成纤维细胞、上皮细胞等细胞增殖和迁移速度降低,ECM 大量积累,瘢痕达到相对稳定的缘故。

创面愈合后随着 MMP 的表达增加,其拮抗物质也发生了相应变化。TIMP 是一个多基因家族,具有抑制 MMP 活化、更新 ECM、抑制血管化、促进细胞分裂和改变细胞形态等生物活性功能。TIMP-1 是 MMP-9 的抑制剂,能够特异地与活化和无活性的

MMP-9 形成复合物,从而防止使局部组织活化的蛋白酶蓄积^[7]。

本研究结果提示,在正常皮肤组织中 TIMP-1 表达水平较高,可能与该因子参与维持皮肤及其附件结构稳定的作用相关。在增生期瘢痕组织中 TIMP-1 基因表达水平显著增强,其机制可能是在反馈信号诱导下,抑制过量表达的 MMP-2、MMP-9 对机体的损伤,或与成纤维细胞增殖后大量 ECM 沉积有关;在成熟期瘢痕组织中,TIMP-1 持续高表达可能与维持瘢痕形态和结构有关。因此,在增生性瘢痕形成后期,抑制 TIMP-1 基因表达可能是促进胶原等 ECM 降解,治疗增生性瘢痕的有效方法之一,但具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Haverstock BD. Hypertrophic scars and keloids. *Clin Pediatr Med Surg*, 2001, 18(1): 147-159.
- [2] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [3] 陈伟,付小兵,孙同柱,等.增生性瘢痕组织中转化生长因子- β 异构体与受体含量变化及对瘢痕形成的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16(4): 252-256.
- [4] Dietmar U, Ernst-Magnus N, Dennis VH, et al. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and P III NP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111: 1423-1431.
- [5] Gillard JA, Reed MWR, Buttle D, et al. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Rep Reg*, 2004, 12(3): 295-304.
- [6] 李文娟,陈伟,付小兵,等.基质金属蛋白酶及其抑制因子在增生性瘢痕中的表达特征及意义. *感染、炎症、修复*, 2005, 6(4): 207-209.
- [7] Price B, Dennison C, Tschesche H, et al. Neutrophil tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 occurs in novel vesicles that do not fuse with the phagosome. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 28308-28315.

(收稿日期:2006-12-21)

(本文编辑:王旭)

· 消息 ·

2006 年本刊影响因子为 0.734

据中国科学技术信息研究所最近发布的“2007 年版中国科技期刊引证报告(核心版)”显示,2006 年《中华烧伤杂志》影响因子为 0.734。该机构有关专家分析:统计当年(2006 年)的影响因子反映的是此前 2 年发表论文的被引用情况;在期刊扩版初期,影响因子与期刊载文量呈反向变化趋势。本刊自 2005 年第 1 期起由 64 页扩版至 80 页,载文量的大幅增加是 2006 年影响因子较 2005 年降低的直接原因。

本刊将以此为新的起点,着力从各方面提高杂志质量,同时期待着广大读者、作者朋友们的积极参与和有力支持!

中华烧伤杂志编辑部