文章编号:1000-5404(2008)13-1291-02

论著

大鼠皮肤实验性枪弹伤后 MMP-1 和 MMP-3 的表达研究

李红卫[1,2],万立华[1],马智华[2],李万军[1,3],何 锐[2] ([1]重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;[2]重庆刑事科学技术研究所,重庆 400042;[3]汉中市 3201 医院病理科,陕西 汉中 723000)

摘 要:**目的** 探讨枪弹伤后大鼠皮肤 MMP-1 和 MMP-3 随时间变化的表达情况,为枪弹伤后的损伤时间判断提供依据。**方法** 建立大鼠对照组和实验组模型。对照组断颈处死后直接取材;实验组分别于枪弹伤后 0、1、3、6、12、18、24、48、72 h 取材($n=3$)。取材后用 Northern blot 法对 MMP-1 和 MMP-3 的 mRNA 进行半定量检测。**结果** MMP-1 和 MMP-3 在枪弹伤后即刻其表达就有增加,以后表达继续升高,一直呈上升趋势($P<0.01$, $P<0.05$);而阴性对照组几乎没有表达。**结论** 枪弹伤后大鼠皮肤 MMP-1 和 MMP-3 表达增加的规律性,对枪弹伤后损伤时间的推断有一定的价值。

关键词:枪弹伤;损伤时间;MMP-1;MMP-3
中图法分类号:R345;R363.271;R826.502 **文献标识码**:A

Expressions of MMP-1 and MMP-3 following time after gunshot injury

LI Hong-wei[1,2], WAN Li-hua[1], MA Zhi-hua[2], LI Wan-jun[1,3], HE Rui[2] ([1]The Clinic Laboratory of Medicine Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Chongqing Institute of Criminal Science and Technology, Chongqing 400042; [3]Department of Pathology, No. 3201 Hospital of Hanzhong, Hanzhong Shannxi 723000, China)

Abstract: Objective To study the expressions of MMP-1 and MMP-3 following time after gunshot injury. Methods Thirty healthy Wistar mice were divided into 2 group randomly: the control group and the experimental group. The whole thickness skin of right hind limb injured by gunshot was obtained, immediately after sacrifice in the control groups and at 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 h after gunshot injury in the experimental group. The amount of MMP-1 and MMP-3 mRNA was detected by Northern blot. Results The expressions of MMP-1 and MMP-3 in experimental group increased immediately after gunshot injury, kept rising at constant rate. However, no changes of expression was found in the control group. Conclusion Gunshot leads to the increased expression of MMP-1 and MMP-3, and its regularity can help to deduce the damage time of gunshot injury.

Key words: gunshot injury; damage time; MMP-1; MMP-3

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMP)是一类由锌依赖性的内肽酶组成的酶家族,现已发现有 20 多种 MMP 与胚胎发育、组织分化、细胞迁移以及损伤后组织重构、血管增生和斑块破裂等有关[1,2],同时在肿瘤侵袭与转移及肿瘤生长的调节中起重要作用[3]。目前国内外医学临床研究表明,MMP-1 和 MMP-3 在损伤后其表达有一个量的变化。在法医学研究领域,目前尚少有相关报道。本实验利用大鼠皮肤枪弹伤模型,观察伤后 MMP-1 和 MMP-3 的表达情况,探讨其与损伤经历时间的关系,旨在为枪弹损伤时间推断提供新的依据。

作者简介:李红卫,男,河北省冀县人,博士研究生,副主任法医师,主要从事法医病理损伤检案与研究方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(023)63750130

收稿日期:2007-05-14;修回日期:2007-10-30

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠抗 MMP-1 单克隆抗体(SC-21731),山羊抗 MMP-3 多克隆抗体(SC-7202);二抗:抗山羊 IgG-HRP(Sigma,A4174),抗小鼠 IgG-HRP(Sigma,A4174);牛血清白蛋白(BSA,Sigma,美国);化学增强发光试剂盒(Northern blot Chemiluminescence Reagent Plus)。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠 30 只,体质量(350 ± 50)g,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 方法

大鼠随机分为实验组和对照组。实验组又按损伤后取材时间不同分为 9 组,即枪弹伤后 0、1、3、6、12、18、24、48、72 h,每组 3 只。

建模方法:对照组直接断颈处死;枪弹伤是用小口径手枪

近距离(距设计部位 5 cm 处)射击实验大鼠右后肢后,将其放回笼中存活至限定时间,沿创缘切取宽 0.5 cm 全层皮肤,质量 100 mg,置于液氮冷藏保存。按 Northern blot 试剂盒的操作流程进行操作。通过荧光定量分析得到结果。

1.4 统计学分析

以对照组的荧光定量值为基值,将各实验组的荧光定量值与其相除得到的比值,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理用 JMTJFX 软件进行 t 检验。

2 结果

将各实验组的荧光定量值与对照组的荧光定量值相除,得到的比值结果见表 1。结果显示,在枪弹伤后立即有 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 的表达增加,在不同时间点,其表达持续升高,呈明显上升趋势($P<0.01$, $P<0.05$),阴性对照组几乎没有表达。

表 1 枪弹伤后不同时间点损伤皮肤 MMP-1 和 MMP-3 的 mRNA 表达情况(比值,$\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-1	MMP-3
对照组	1.000 0 ± 0.000 0	1.000 0 ± 0.000 0
伤后 0 h	1.284 4 ± 0.030 8[a]	1.342 1 ± 0.040 7[a]
伤后 1 h	1.976 1 ± 0.221 6[a]	2.076 0 ± 0.105 6[a]
伤后 3 h	2.661 2 ± 0.020 3[a]	2.362 3 ± 0.116 0[a]
伤后 6 h	3.710 1 ± 0.233 4[a]	2.959 1 ± 0.182 3[a]
伤后 12 h	5.172 3 ± 0.664 8[b]	3.367 5 ± 0.167 0[b]
伤后 18 h	6.791 8 ± 0.986 7[a]	3.998 5 ± 0.259 5[b]
伤后 24 h	9.959 4 ± 5.090 3[b]	4.825 0 ± 0.752 5[a]
伤后 48 h	11.359 4 ± 3.055 0[b]	5.257 6 ± 0.801 5[a]
伤后 72 h	12.533 4 ± 3.579 9[b]	6.096 7 ± 0.713 9[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与前一组比较

3 讨论

3.1 MMP-1、MMP-3 的结构和功能

MMP-1 又名成纤维细胞胶原酶或间质胶原酶,是人成纤维细胞胶原酶中最早被纯化和 cDNA 克隆的脊椎动物胶原酶,可降解Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅶ和Ⅹ型胶原明胶及蛋白多糖。尽管 MMP-1 在体外可由许多种正常细胞产生,但在正常休眠组织中其水平极低,一般难以检测。在体内,MMP-1 主要是生理和病理条件下,在组织生长和重构期间表达,广泛发挥其生物学功能[4]。在正常成人组织中 MMP-1 表达量极少,但在病理情况下如创伤愈合、修复或重塑等过程中,MMP-1 的表达量增加[5]。MMP-1 具有多种功能,作用于不同的底物。某些基质成分也是 MMP-1 酶的作用底物,如聚集蛋白聚糖、多能聚糖等[6]。因此,MMP-1 在细胞外基质的生理修复中起关键作用。MMP-1 也可以通过分解作用使细胞外基质中储存的生物活性分子释放出来,使其发挥功能[7]。作为同一家族的 MMP-3,其结构和功能与 MMP-1 相似。

3.2 MMP-1、MMP-3 枪弹伤后的表达及法医学意义

损伤时间推断在法医学上具有十分重要的意义。近年来,随着免疫组织化学技术、分子生物学技术的发展,它们在法医损伤时间推断研究领域中也得到普遍应用,学者们对有关损伤时间的标志物进行了大量研究,为法医推断损伤时间提供了很大的帮助。但这些研究主要是针对常见的钝器、锐器伤的损伤时间所进行的研究。而对枪弹伤损伤时间研究的相关报道很少,在法医学检案实践中,推断枪弹伤的损伤时间常是依据钝器伤的损伤时间来推断。实际上,枪弹伤的损伤并不等同于钝器伤,除了高速旋转弹头造成皮肤等组织的广泛而严重的损伤之外,还有发射火药燃烧产生的高温、高压作用,能引起组织不同程度的烧伤、冲击波损伤及射击残留物等对创口的污染,故枪弹伤后蛋白的表达情况也不同于钝器伤后蛋白的表达情况。因此利用钝器伤的损伤时间来推断枪弹伤的损伤时间的可靠性和准确性值得商榷。

本研究表明在伤后即有 MMP-1 和 MMP-3 的 mRNA大量表达,其表达量随时间的延长而呈明显的增加趋势,各时间点间有显著性差异($P<0.01$, $P<0.05$),在伤后 72 h 达最高,而阴性对照组无表达。MMP-1 和 MMP-3 间呈高度一致性,后者相对更稳定些,波动较前者小,说明 MMP-1 和 MMP-3 对推断枪弹伤的损伤时间均有一定的参考价值,但利用 MMP-3 是否更可靠些还有待研究证明。

通过研究,发现 MMP-1 与 MMP-3 在枪弹损伤后的表达与损伤经过时间有良好的相关性,且相对稳定,波动不大。因此,该方法对判断枪弹损伤经过时间有一定的价值,利用该方法可以得到一个较为准确的结果。本实验仅仅是我们对枪弹损伤经过时间的初步研究,还有待进一步深入研究才能运用于法医检案实践。

参考文献:

[1] Imai K, Ohuchi E, Aoki T, *et al*. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2 [J]. Carcer Res, 1996, 56(12): 2707 - 2710.

[2] Minatoguchi S, Takemura G, Chen X H, *et al*. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony stimulating factor treatment[J]. Circulation, 2004, 109(21): 2572 - 2580.

[3] 马泽彝,樊翌明,吴志华, 等. 皮肤鳞状细胞癌和基底细胞上皮瘤膜型基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶-2 表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(10): 584 - 586.

[4] Woessner J F, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs[M]. New York: Oxford University Press, 2000: 1 - 10.

[5] Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3): 207 - 214.

[6] 汪俊军,顾振华,张春妮, 等. 脂蛋白(a)氧化和自身免疫与动脉粥样硬化的关系[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(8): 740 - 742.

[7] McCawley L J, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(5): 534 - 540.

(编辑 栾 嘉)