文章编号:1000-5404(2010)11-1195-04

论著

420 nm 强脉冲光对痤疮动物模型 TNF-α 和 MMP-2 表达的影响及疗效观察

邢月贞,杨蓉娅,樊 昕,王文岭,李海涛,夏志宽,任晓萍 (100700 北京,北京军区总医院皮肤科)

[摘要] **目的** 研究 420 nm 强脉冲光对痤疮动物模型的疗效观察及其作用的可能机制。**方法** 皮内注射痤疮丙酸杆菌构建大鼠耳廓炎症痤疮模型,用 420 nm 强脉冲光照射痤疮动物模型,观察照射前后炎症皮损的改变,进行皮肤病理学检查,免疫组化法和 Real-time PCR 法测定 TNF-α 及 MMP-2 等因子的表达水平。**结果** 模型组注射部位于第 5 天形成痤疮样皮损;照射组与模型组相比,炎症反应明显减轻;病理示毛囊角化层明显变薄,真皮层炎性细胞减少,皮脂腺缩小;免疫组化示 TNF-α 和 MMP-2 呈阳性表达,且照射使其阳性表达降低;Real-time PCR 示 TNF-α 和 MMP-2 在模型组中呈高表达,照射后表达下调($P<0.05$)。**结论** 420 nm 强脉冲光对痤疮有良好的治疗效果,其有效性可能与细胞因子 TNF-α 及 MMP-2 等的表达有关。

[关键词] 420 nm 强脉冲光;痤疮动物模型;TNF-α;MMP-2
[中图法分类号] R758.733; R454.2 R446.62 [文献标志码] A

Effect of 420 nm intense pulse light on expression of TNF-α and MMP-2 in animal acne model

Xing Yuezhen, Yang Rongya, Fan Xin, Wang Wenling, Li Haitao, Xia Zhikuan, Ren Xiaoping (Department of Dermatology, General Hospital of Beijing Military Area Command, Beijing 100700, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of 420 nm intense pulse light on animal acne model and its possible mechanism. **Methods** A rat model of auricular acne was established by intradermal injection with propionibac-terium and irradiated with 420 nm intense pulse light. Inflammatory skin damage was observed before and after irradiation. Expression of TNF-α, MMP-2 and other factors was detected by dermatopathology, immunohistochemistry and real-time PCR, respectively. **Results** Acne-like lesions were observed in acne model group 5 days after injection of propionibac-terium. The inflammatory reaction level was significantly lower, the folliculus pili cuticular layer was notably thinner, the number of dermal inflammatory cells was obviously less, and the sebiferous gland was remarkably smaller in irradiation group than in control group. Immunohistochemistry showed positive expression of TNF-α and MMP-2 in model group, which was influenced by irradiation. Real-time PCR showed over-expression of TNF-α and MMP-2 in model group, which was reduced after irradiation ($P<0.05$). **Conclusion** 420 nm intense pulse light has good therapeutic effects on ance, which may be related with the expression of TNF-α, MMP-2 and other factors.

[**Key words**] 420nm intense pulse light; animal acne model; TNF-α; MMP-2

Corresponding author: Yang Rongya, E-mail: yangrya@sina.com

痤疮(acne)是一种由多种因素引起的慢性毛囊、皮脂腺炎症性皮肤病,其发病机制较复杂[1]。炎症反应是痤疮发生的重要原因之一,痤疮丙酸杆菌是导致痤疮炎症发生的首要因素,它通过分泌多种促炎症因子,诱导局部炎症反应和机体的免疫反应[2,3]。本研究通过皮内注射痤疮丙酸杆菌构建大鼠耳廓炎症痤疮模型[4],观察 420 nm 强脉冲光照射对该模型的疗效,并对照射前后皮损组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)进行免疫组化和 Real-time PCR 分析,以进一步了解痤疮炎症反应的发生机制,并为临床治疗提供理论依据。

[通信作者] 杨蓉娅,E-mail:yangrya@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 痤疮丙酸杆菌(中国药品生物制品检定所提供,ATCC6919),厌氧条件,4 ℃保存。

1.1.2 实验动物 SD大鼠32只,雌性,均为3~5周龄,体质量100~120 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,普通饲养1周。

1.1.3 主要试剂及仪器 兔抗大鼠TNF-α抗体、兔抗大鼠MMP-2抗体、二抗及DAB显示盒均购自上海麦莎生物技术有限公司;Real-time PCR扩增试剂盒购自北京东胜创新生物技术有限公司;100bp DNA Ladder购自Fermentas公司。核酸紫外分光光度计(德国Biophotomete);Real-time PCR仪(澳大利亚Rotor-Gene RG-3000);飞顿Ⅱ号420 nm光子治疗仪(以色列飞顿公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

1.2.1.1 实验分组 32只SD大鼠随机分为A、B、C、D 4组,每组8只大鼠。A组:空白对照组;B组:生理盐水注射组;C组:痤疮模型组;D组:420 nm强脉冲光照射组。

1.2.1.2 痤疮丙酸杆菌混悬液制备 痤疮丙酸杆菌菌株1株,在脑心浸液培养基中转种活化并增殖,搜集菌落,洗涤,过滤,调整痤疮丙酸杆菌浓度为6×10^7/ml,于95 ℃水浴灭活5 min。

1.2.1.3 实验处理 A组不给予任何处理;B组给予无菌生理盐水50 μl,于大鼠右耳内耳廓中央,皮内注射,共1次;C组给予痤疮丙酸杆菌混悬液50 μl,大鼠右耳内耳廓中央皮内注射,共1次;D组给予痤疮丙酸杆菌混悬液50 μl,大鼠右耳内耳廓中央皮内注射,共1次,7 d后给予420 nm强脉冲光照射治疗(波长420 nm,光斑大小18 mm×4 mm,能量密度13 J/cm^2),2次/周,共3周。A、B、C组大鼠均于注射后第7天处死;D组大鼠于照射完毕后处死。

1.2.2 组织病理及大体观察 观察各组大鼠在处理前后皮肤的大体表现,各组大鼠均于处死后切取右耳注射部位皮肤组织,常规病理检查。

1.2.3 免疫组化法检测 切取各组处死后的大鼠注射区皮肤,常规固定、包埋、制片(切片厚5 μm),采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法即S-P免疫组化法检测标本中TNF-α及MMP-2的表达。

1.2.4 Real-time PCR法检测 取各组处死后大鼠注射区的皮肤组织,按试剂盒说明书提取总RNA,核酸紫外分光光度计测总RNA的浓度及纯度。将提取的总RNA进行体外反转和Real-time PCR。PCR扩增总反应体积为20 μl,经94 ℃预变性15 min,94 ℃ 15 s,58 ℃ 15 s,50循环,72 ℃延伸10 min。得到的PCR产物按照浓度梯度进行稀释,选择1/2、1/4、1/8、1/16、1/32浓度的稀释产物作为标准品模板,进行荧光定量PCR反应。通过这4个标准品生成的反应数据,应用软件Rotor-Gene 6.0,依据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系,生成标准曲线。Real-time PCR引物的设计与合成:依据GenBank中TNF-α、MMP-2及GAPDH的基因序列,设计TNF-α、MMP-2和GAPDH的3对扩增引物:TNF-α上游引物:5′- CACGTCGTAG-CAAACCACCAA-3′,下游引物:5′- GTTGGTTGTCTTTGAGATC-CAT-3′,产物为100 bp。MMP-2上游引物:5′- CTTCAGGT-TCTCCAGCATGA-3′,下游引物:5′-CACCTTGGCACACCTG-TATC-3′,产物为131bp。内参物5-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)上游引物:5′-CAAGGCTGAGAATGGGAAG-3′,下游引物:5′- TGGTGAAGACGCCAGTAGA -3′,产物为131 bp。所有引物均由北京博迈德科技发展有限公司合成。

1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软进行分析,各组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 皮肤变化情况

A组大鼠皮肤正常;B组大鼠注射部位皮肤仅于注射24 h内出现轻度红肿和增厚现象,后逐渐恢复正常;C组大鼠注射部位皮肤于注射24 h时开始增厚,并逐渐增加,于第5天出现粉刺、丘疹、脓疱等痤疮样皮损,色红,质硬;D组大鼠注射区于420 nm强脉冲光照射2次后,脓肿开始消退,厚度变薄,颜色趋于正常。

2.2 皮肤组织病理

A组表皮较薄,可见毛囊,表皮、真皮交界清楚(图1A);B组与A组相同;C组表皮角化过度,毛囊面积扩大,炎性细胞弥漫性浸润,皮脂腺消失(图1B);D组毛囊角化层明显减轻,真皮层可见少量炎性细胞,皮脂腺缩小(图1C)。

2.3 免疫组化结果

(1)阴性表达对照(图2);(2)模型组TNF-α和MMP-2呈强阳性表达,420 nm强脉冲光照射6次后,TNF-α和MMP-2的表达显著降低(图3、4)。



A:空白组;B:模型组;C:照射组

图1 各组大鼠耳部皮肤组织病理变化 (HE ×20)

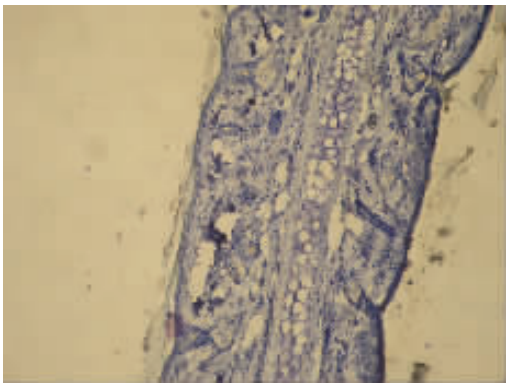
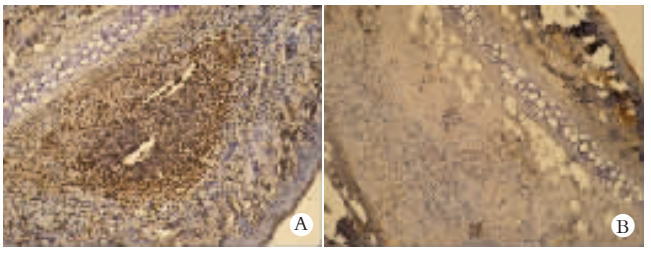
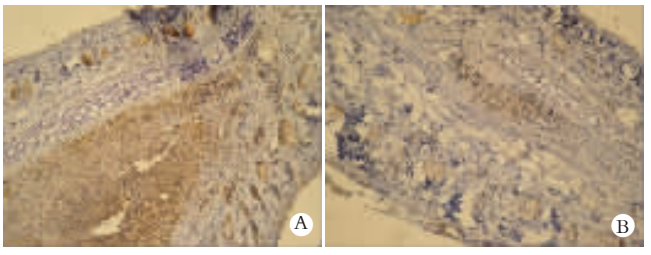


图 2 大鼠耳部皮肤的阴性表达对照 （S-P ×20）



A:模型组; B:照射组

图 3 模型组和照射组大鼠耳部皮肤 TNF-α 的表达 （S-P ×20）



A:模型组; B:照射组

图 4 模型组和照射组大鼠耳部皮肤 MMP-2 的表达 （S-P ×20）

2.4 Real-time PCR 结果

以空白对照组为基数 1,TNF-α 和 MMP-2 在模型组大鼠皮损中均呈高表达(TNF-α 为 4.24,MMP-2 为 2.22),在 420 nm 强脉冲光照射后表达显著下调(TNF-α 为 1.27,MMP-2 为 0.91)(图 5、6)。

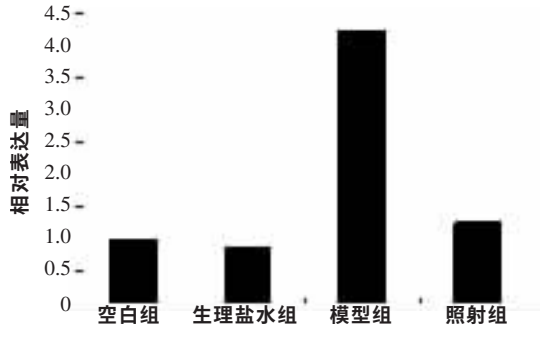


图 5 不同组的 TNF-α mRNA 表达的影响

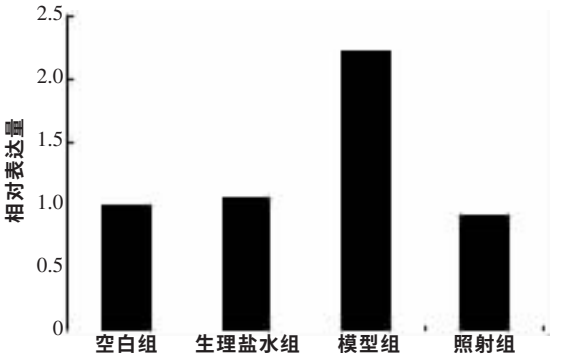


图 6 不同组的 MMP-2 mRNA 表达的影响

3 讨论

痤疮是皮肤科常见病,临床表现为粉刺、丘疹、脓疱、结节、囊肿等多种形式损害,部分患者皮损形成萎缩性瘢痕,严重影响患者的身心健康[5]。痤疮的病因和发病机制复杂,其中炎症反应是痤疮发生的重要原因,痤疮丙酸杆菌是导致痤疮炎症发生的首要因素[6]。为了模拟人类痤疮的慢性炎症反应,我们在 SD 大鼠的右耳内耳廓皮内注射痤疮丙酸杆菌,使其产生慢性炎症并在炎性部位形成痤疮样皮损,再进行 420 nm 强脉冲光照射,观察其治疗效果。De-Young 等[4]在研究中指出痤疮模型的炎症反应到构建的第 21 天达到高峰,到第 42 天依然存在,所以痤疮模型的构建方法对照射治疗的效果影响不大。本研究显示,模型组大鼠右耳皮内注射痤疮丙酸杆菌液后,注射部位皮损组织真皮层内可见大量炎性细胞,在 420 nm 强脉冲光照射 6 次后,局部皮损真皮层炎性细胞明显减少。但痤疮丙酸杆菌在人类真皮层中产生炎症反应及 420 nm 强脉冲光的照射对真皮层的作用机制并没有得到解释。

TNF-α 是一种主要由活化的单核巨噬细胞产生的糖蛋白,具有广泛的生物学活性,是一种重要的炎症介质和免疫调节因子,参与了体内许多疾病的病理生理过程[7]。已有实验表明:痤疮丙酸杆菌可刺激小胶质细胞产生 TNF-α[8],TNF-α 在痤疮的炎症反应中起非常重要的作用[9]。本研究中,免疫组化及 Real-time PCR 检测结果均表明 TNF-α 在痤疮大鼠模型中呈阳性高表达,在 420 nm 强脉冲光照射痤疮样皮损处 6 次后,TNF-α 表达明显降低。其结果既点明了痤疮丙酸杆菌可诱导产生炎症细胞 TNF-α,TNF-α 参与了痤疮炎症的发生过程,也说明了 420 nm 强脉冲光的照射可抑制 TNF-α 的活性,从而达到抗炎和免疫调节作用。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组含锌的蛋白水解酶,主要来源于巨噬细胞,在细胞外基质合成、降解与组织重塑过程中起决定性调节作用[10]。Papakonstantinou等[11]在痤疮患者的炎性皮损皮脂内发现多种MMPs,如MMP-1、MMP-9及MMP-13,它们均由角质化细胞分泌产生。有资料表明MMP-2是MMPs中作用最广泛的酶,主要功能是降解细胞外基质和基底膜的主要成分-Ⅳ型、Ⅴ型胶原和明胶,改变局部组织结构,破坏基底膜屏障[12]。本研究中,免疫组化及Real-time PCR检测结果表明MMP-2在模型组中呈阳性高表达,420 nm强脉冲光照射痤疮样皮损处6次后,MMP-2表达显著降低,表明MMP-2的表达与TNF-α有关,MMP-2参与了痤疮炎症的发生过程。痤疮早期炎症部位的TNF-α等细胞因子可通过放大核因子-κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)信号通路,合成大量MMPs,包括MMP-2,从而影响了胶原纤维正常生成和组织愈合修复的过程,促使瘢痕形成[13]。420nm强脉冲光抑制TNF-α活性,同时降低MMP-2的活性,可降低局部炎症反应,促进局部组织正常修复,以减少瘢痕形成。

Leyden等[14]认为痤疮丙酸杆菌可能在痤疮炎症中,尤其是在维持痤疮严重度方面起到重要的作用。近年来,随着痤疮治疗中抗生素的广泛应用和抗生素耐药性的不断产生,局部物理方法治疗痤疮越来越受到重视。强脉冲光等光子技术是目前应用较多的一项治疗痤疮的有效新技术。420 nm强脉冲光为高能量特定谱段的蓝光,可穿透皮肤,并刺激内源性卟啉大量增加,激发卟啉释放出单态氧离子,高效杀灭痤疮丙酸杆菌,并对表皮葡萄球菌、卵状马拉色菌也有杀灭和抑制作用,且能清除毛囊内炎症反应物和脂栓,达到治疗效果;此外光子瞬间释放大量热量能轻柔地打开毛孔,释放堵塞物,消除炎症,加快反应过程[15,16]。本研究中420 nm强脉冲光照射后痤疮动物模型的炎症反应明显减轻,免疫组化和Real-time PCR检测炎性细胞因子表达下调,表明420 nm强脉冲光有较强的杀菌消炎作用,并促进皮损组织的正常修复与愈合,减少瘢痕形成。

参考文献:

[1] 穆艳蕾,杨蓉娅,王文岭,等.蓝光对痤疮患者的疗效及对糠秕马拉色菌的影响[J].第三军医大学学报,2009,31(22):2269-2271.

[2] 朱文元.痤疮[M].南京:东南大学出版社,2004:308

[3] Dreno B. Pathophysiology of acne[J]. Presse Med, 2005, 34(7): 537-539.

[4] De-Young L M, Young J M, Ballaron S J, *et al*. Intradermal injection of Propionibacterium acnes: a model of inflammation relevant to acne [J]. J Invest Dermatol, 1984, 83(5): 394-398.

[5] 潘宏,白秦玉,陈光仍.寻常性痤疮综合治疗进展[J].青海医药杂志,2008,38(6):74-76.

[6] Szabo K, Tax G, Teodorescu-Brinzeu D, *et al*. TNF alpha gene polymorphyisms in the pathogenesis of acne vulgaris[J]. Arch Dermatol, Res, 2010, 13.

[7] 张学颖,雷明明,孙健,等.趋化因子FKN对单个核细胞TNF-α和MMP-2表达的影响及ERK在其中的作用[J].中国实验诊断学,2009,13(3):309-312.

[8] 鲁传龙,齐显龙,党军强,等.痤疮丙酸杆菌对小胶质细胞产生TNF-α、IL-1β的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(5):510-511.

[9] Kourbeti I S, Boumpas D T. Biological therapies of autoimmune diseases [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 4(1): 41-46.

[10] Loftus I M, Naylor A R, Goodall S, *et al*. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption[J]. Stroke, 2000, 31(1): 40-47.

[11] Papakonstantinou E, Aletras A J, Glass E, *et al*. Matrix metalloproteinases of epithelial origin in facial sebum of patients with acne and their regulation by isotretinoin [J]. J Invest Dermatol, 2005, 125 (4): 673-684.

[12] Ou Y, Li W, Li X, *et al*. Sinomenine reduces invasion and migration abilityin fibroblast-like synoviocytes cells co-cultured with activated human monocytic THP-1 cells by inhibiting the expression of MMP-2, MMP-9, CD147[J]. Rheumated Int, 2010,16

[13] Kang S, Cho S, Chung J H, *et al*. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo* [J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1691-1699.

[14] Leyden J J, McGinley K J, Vowels B. Propionibacterium acnes colonization in acne and nonacne[J]. Dermatology, 1998, 196(1): 55-58.

[15] 樊昕,王丹,刘丽红,等.420nm强脉冲光治疗中重度痤疮40例[J].中国美容医学,2008,17(11):1669-1670.

[16] Elman M, Lebzelter J. Light therapy in the treatment of acne vulgaris [J]. Dermatol Surg, 2004, 30(2 Pt 1): 139-146.

(**收稿**:2010-02-26;**修回**:2010-03-31)

(编辑 邓强庭)