基础研究　文章编号：0253-3626(2009)06-0698-04

大鼠皮肤 MMP-2，MMP-9 表达与损伤时间相关性的实验研究

李刚莲[1]，刘群英[2]，夏　鹏[1]，吴　伟[1]，万立华[1]

（1.重庆医科大学基础医学院法医学教研室，重庆　400016；2.重庆医科大学附属第一医院中西医结合科，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨创伤皮肤组织基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinase-s，MMPs）-2、9 的表达与损伤时间的相关性，为损伤时间推断提供实验依据。方法：建立大鼠皮肤切创模型，应用免疫组织化学技术、图像分析技术检测不同损伤时间大鼠皮肤组织生前及死后 MMP-2 与 MMP-9 表达。结果：生前伤组大鼠损伤后皮肤组织内 MMP-2 与 MMP-9 在损伤区及损伤区周围皮肤组织中表达明显高于正常对照组（$P<0.05$）。死后伤组皮肤组织中 MMP-2 与 MMP-9 表达与正常对照组比较无明显差异（$P>0.05$）。生前伤组中 MMP-2 在损伤后 0.5 h 可见在中性粒细胞中阳性表达，随时间进展表达逐渐增强，并可见在少量血管内皮细胞中阳性表达，12 h 后明显增多，3 d 达到高峰，维持到第 5 d 后在炎细胞中表达显著减少，而在成纤维细胞，血管内皮细胞中表达增加，维持在一个相对稳定的水平，12 ~ 14 d 恢复正常。MMP-9 在损伤后 1 h 可见在中性粒细胞中阳性表达，随时间进展表达逐渐增强，12 h 后明显增多，3 d 达到高峰，维持到第 5 d，5 d 后在炎细胞中表达显著减少，而在成纤维细胞，血管内皮细胞中表达增加，维持在一个相对稳定的水平，12 ~ 14 d 恢复正常。结论：皮肤损伤组织 MMP-2 与 MMP-9 表达具有规律性且有良好的时间相关性，可望成为法医学损伤时间推断的指标。

【关键词】损伤时间；基质金属蛋白酶 -2，9；皮肤；大鼠

【中国图书分类法分类号】R89　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2008-11-03

Relationship between the expression of MMP-2 and MMP-9 in rat skin and the injury time

LI Gang-lian, et al

(*Department of Forensic Medical, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To explore the expression of MMP-2 and MMP-9 in rat skin after injury and its relationship with the wound time, in order to supply an experimental evidence for the prediction of injury time. *Methods:* After a model of incision of rat's skin was set, immuno-histochemistry technique and auto-image analysis were used to study the expression of MMP-2 and MMP-9 at different post-traumatic time intervals in both antemortem and post-mortem groups. *Results:* The expression of MMP-2 and MMP-9 in ante mortem group was higher than that in the normal control group ($P<0.05$). However, in post-mortem injury group, there were no significant changes in anti- MMP-2 and MMP-9 immuno-reactivities in the area of injury and around the area of injury, compared with the normal control group ($P>0.05$). Further, the expression of MMP-2 could be detected as increasing at 0.5 h, and reached maximum on 3 d, maintained the high level to the 5th day, then decreased gradually, returned to normal lastly on 12 ~ 14 d. Compared with MMP -2, the expression of MMP-9 could be detected increasing at 1 h, and reached maximum on 3 d, maintained the high level to the 5th day, then decreased gradually, returned to normal lastly on 12 ~ 14 d. From 0.5 h to 3 d of wound interval, the expression of MMP isoforms were identified in a large number of infiltrating neutrophilic granulocytes, afterwards the fibroblastic cells (FBCs) and the vascular endothelial cells accounted for the most part of the MMP-2and MMP-9 positive cells. *Conclusion*: The expression of MMP-2 and MMP-9 in rat's skin is time dependent after skin injury, which could be used as a bio-marker to determine the time of injury.

【key words】Time of injury; Matrix metalloproteinase-s 2, 9; Skin; Rats

基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase-s，MMPs)是一类参与多种细胞外基质成份降解的酶[1,2]，因其在创伤修复中表达活跃而成为活体伤中一种生活反应迹象，为法医学推断损伤时间提供一种新的可能的参考指标。目前关于 MMPs 在损伤时间推断中的应用，国内外鲜有报道，本研究选择大鼠为实验对象，以 MMP-2 和 MMP-9 为观察指标，探讨损伤时间推断的新依据。

作者介绍：李刚莲（1974- ），女，硕士，研究方向：法医病理学。

通讯作者：万立华，男，教授，E-mail:ccsw@cqmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试剂

一抗 MMP-2，MMP-9 兔抗鼠单克隆抗体、二抗、DEPC，及 SABC 试剂盒，DAB 显色剂等，均购自武汉博士德生物技术公司。

1.2 大鼠切创损伤模型建立

健康成年 SD 大鼠 115 只，体质量(200 ± 20)g，雌雄不分，随机分为 3 组，分别为正常对照组，创伤组，死后损伤组，每组 5 只。创伤组设伤后即刻，0.5 h、1 h、2 h 、3 h、6 h、12 h 、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、10 d、12 d、14 d 共 17 个时相点，死后伤组设 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 共 5 个时相点。动物在造创前于背部剪毛，1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉，局部常规消毒处理，用无菌手术刀片在背部沿脊柱两侧各作一长 1.5 cm 切口，深达深筋膜。创面自然止血后，不包扎，不施药。动物造创后入清洁笼内饲养，给清洁饮水，自由取食。动物于造创后相应时相点被颈椎脱位处死，取创口及周围 1.0 cm × 1.5 cm 全层皮肤及皮下组织。对照组大鼠同样方法处理后不作切口。处死后取与损伤组大鼠相同部位大小相等的皮肤组织作为对照。所取皮肤标本放入 4%多聚甲醛 /PBS 中固定 24 h 后，脱水、透明、石蜡包埋。

1.3 免疫组化染色

制作厚 5 μm 石蜡切片，贴敷于涂有 APES 的载玻片上。微波修复抗原，PBS 缓冲液清洗 3 min，共 3 次。正常羊血清孵育。兔抗鼠单克隆抗体 MMP-2，MMP-9 作为一抗。SABC 法免疫组织化学染色，DAB 显色均按说明书进行。苏木素复染，PBS 代替一抗作为阴性对照。显微镜下按着色深浅及范围分为：阴性：不着色；弱阳性：部分胞浆着淡黄色；阳性：胞浆或胞膜大部分着黄色；中等阳性：胞浆或胞膜着浅褐黄色；强阳性：胞浆或胞膜着深褐黄色等 5 个等级，未见非特异性染色。另做常规 HE 染色。

1.4 图像分析和统计学处理

于 400 倍显微镜下每张切片随机取 5 个测量视野，计数包括中性粒细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞，计算每个视野中阳性细胞数与 3 种细胞总数的比值。统计学方法：采用 SAS8.2 统计软件进行分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，时间点间两两比较采用 SNK 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 创伤性皮肤基本病理变化及 HE 染色常规观察

生前伤组损伤后 0.5~1 h 组皮肤真皮层内可见毛细血管明显扩张充血，毛细血管周围见少量炎症细胞浸润，以中性粒细胞为主，间质内轻度水肿，表皮层内未见炎症细胞浸润。2 h 组皮肤真皮层内可见毛细血管明显扩张充血。毛细血管周围及间质内见中量炎症细胞浸润，以中性粒细胞为主，间质内水肿明显，表皮层内见少量炎症细胞浸润。3 ~ 24 h 各组皮肤表皮层内及真皮层内均可见毛细血管明显扩张充血。毛细血管周围及间质内可见大量炎症细胞浸润，以中性粒细胞为主，间质内水肿明显。2 d 皮肤干燥已结痂，镜下见肉芽组织开始形成，并向创口长入。3 ~ 4 d 组可见肌肉间，皮下组织，真皮内均有肉芽组织，除中性粒细胞等炎性细胞外，还有成纤维细胞增多。4 ~ 5 d 组伤口已由肉芽组织填平，肉芽组织炎症细胞少见，7 d 及 7 d 后各组可见肉芽组织开始纤维化，肉眼创口已完全愈合。死后造创的组织，肉眼及显微镜下无生前伤所见的肉眼及显微镜下改变，各组皮肤均明显变干，变薄。正常对照组、死后伤组均未见间质内水肿，毛细血管扩张充血，炎症细胞浸润。

2.2 创伤性皮肤免疫组化观察

2.2.1 损伤区及周边区 MMP-2 的表达 正常对照组中 MMP-2 几乎未见表达，血管内皮细胞在正常皮肤中未见染色。死后伤组，除死后 0.5 ~ 1h 组偶可见中性粒细胞阳性表达外，其它各组均未见阳性表达。损伤组，伤后即刻组切片染色与对照组染色基本相同；0.5 ~ 1 h 组损伤区开始有中性粒细胞的浸润，中性粒细胞中可见 MMP-2 阳性表达，但染色强度较淡；伤后 2 ~ 12 h，损伤区及其邻近周围浸润的细胞数量随损伤时间延长逐渐增多。真皮层血管和毛囊周围可见散在阳性表达的中性粒细胞，其中 12 h 组大部分中性粒细胞着色；1 d 组损伤区及其周围表皮层内的中性粒细胞、皮脂腺染色增强。真皮层基质内炎性细胞大部分呈阳性染色。以中性粒细胞为主，可见散在阳性单核细胞表达，部分血管内皮细胞和少量成纤维细胞也呈阳性表达；伤后 3 d 组，新生表皮的阳性染色强度增强，阳性细胞以中性粒细胞，血管内皮细胞和成纤维细胞为主，此时 MMP-2 在中性粒细胞中的表达达到峰值（图 1），仍可见少量在单核细胞中的阳性表达；4 d 组基本与 3 d 组类似；5 d 组皮肤组织损伤区及损伤区周围 MMP-2 的表达维持在一个相对稳定的高峰水平，阳性细胞以血管内皮细胞和成纤维细胞为主，在中性粒细胞中基本未见阳性表达；伤后 5 d 开始，新生上皮染色强度低，肉芽组织内大量新生血管内皮可见阳性染色。7 ~ 10 d 肉芽组织中阳性细胞数增加，染色增强，可见大部分成纤维细胞阳性染色；12 ~ 14 d，肉芽组织萎缩。肉芽组织中新生血管的内皮细胞、成纤维细胞染色基本消失。

2.2.2 损伤区及周边区 MMP-9 的表达 正常对照组、死后伤各组与损伤各组 MMP-9 表达的免疫组化观察结果同 MMP-2 的表达基本相似，不同的发现是：损伤各组 MMP-9 在伤后 1 h 才见在中性细胞中表达，也随时间进展表达增加，其余各时相点 MMP-9 免疫组化表达特点与 MMP-2 类似（图 2）。

2.3 数据图像分析及统计学结果

经统计学方差分析，各相邻两组之间 MMP-2、MMP-9 阳性细胞比率相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。其中伤后 3 ~ 5 d 组和 7 ~ 10 d 组阳性细胞比率与其它各时间组相比，

差异均有统计学意义（$P<0.05$）。数据图像分析及统计学数据见表 1。

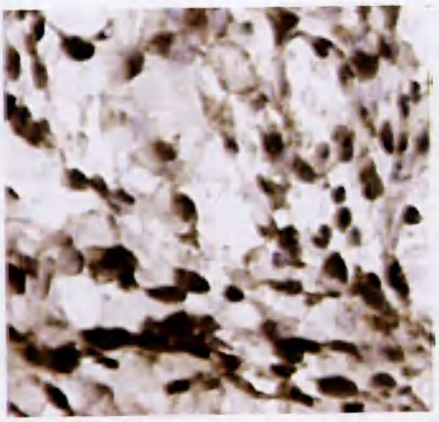


图 1　损伤后 3 d，MMP-2 在中性粒细胞中表达最强（免疫组化染色×400）

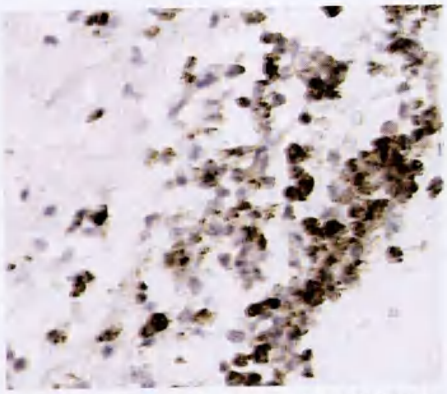


图 2　损伤后 3 d，MMP-9 在中性粒细胞中表达最强（免疫组化染色×200）

表 1　MMP-2，MMP-9 阳性细胞比率（$\bar{x}\pm s$）

损伤时间	MMP-2 阳性细胞率(%)	MMP-9 阳性细胞率(%)
0 ~ 0.5 h	2.12 ± 1.03[1,2]	0
1 h	10.21 ± 1.32[1,2]	5.82 ± 1.20[1,2]
2 h	16.71 ± 1.45[1,2]	11,82 ± 2.43[1,2]
3 h	24.73 ± 2.98[1,2]	16.59 ± 3.62[1,2]
6 h	36.81 ± 2.26[1,2]	30.17 ± 4.16[1,2]
12 h	44.12 ± 1,26[1,2]	40.19 ± 3.57[1,2]
24 h	55.21 ± 3.15[1,2]	52.59 ± 3.37[1,2]
2 d	65.74 ± 3.73[1,2]	60.29 ± 3.71[1,2]
3 d	88.65 ± 3.64[1]	90.18 ± 4.22[1]
4 d	89.15 ± 3.75[1]	87.98 ± 3.21[1]
5 d	87.79 ± 3.11[1]	87.46 ± 3.19[1]
6 d	77.21 ± 3.67[1,2]	75.25 ± 3.84[1,2]
7 d	67.82 ± 3.61[1,2]	68.81 ± 3.45[1,2]
10 d	63.53 ± 2.47[1,2]	65.98 ± 3.75[1]
12 d	24.39 ± 2.61[1,2]	19.96 ± 3.65[1,2]
14 d	11.23 ± 1.12[1,2]	10.29 ± 3.51[1,2]

注：1.与对照组比较，$P<0.05$；2.与邻近上组比较，$P<0.05$

3　讨　论

3.1　MMPs 及其特征

MMPs 是降解细胞外基质最重要的蛋白水解酶类，其主要功能之一是降解细胞外基质（Extracelluar matrix，ECM）。一种 MMP 可以直接降解一种或几种 ECM，也可以通过激活其它类型的 MMP 而发挥作用，从而形成瀑布效应[3~5]。除此之外，MMPs 在细胞迁移、血管生成、伤口愈合、胚胎发育、动脉粥样硬化，恶性肿瘤的浸润与转移等病理生理过程中发挥重要作用[3]。在损伤修复中，MMPs 表达有一定特异性，皮肤损伤后 MMP-1、2、3 和 MMP-9 被表达[6]。

3.2　MMP-2、MMP-9 与皮肤损伤

MMP-2、MMP-9 又称为明胶酶，有研究表明，MMP-2、MMP-9 不仅能持续降解间质的纤维类胶原，而且在细胞外基质胶原重塑过程中具有重要作用[7]。一方面，MMP-2、MMP9 降解、破坏靠近细胞表面的 ECM 和基底膜（Basal membrane，BM），另一方面则通过毛细血管内生，新生血管形成等促进血管生成及血管平滑肌迁移，促进肿瘤浸润和转移[6]。在创面修复中，MMP-2、9 主要参与基底膜的溶解、血管形成和坏死组织的清除[8,9]。本实验应用免疫组织化学染色技术观察到在大鼠皮肤切创愈合过程中，皮肤损伤区及损伤区周围的中性粒细胞、成纤维细胞有 MMP-2、MMP-9 表达，而且在血管内皮细胞中也有 MMP-2、MMP-9 的动态表达，表明两者在皮肤损伤愈合的过程中起重要作用。本实验观察到，正常皮肤几乎不表达 MMP-2 和 MMP-9，损伤后出现阳性表达，可能是由于炎症细胞表达的 MMP-2、MMP-9 受早期炎症细胞因子刺激而激活，并产生大量的细胞因子参与早期炎症过程。罗丽娟等[10]报导 MMP-2 的高表达可以促进 MMP-9 的表达与活化，从而促进胶原纤维与弹性蛋白降解，ECM 遭破坏，基底膜降解，这也许可以解释我们观察到的 MMP-2 在伤后半小时开始表达，而 MMP-9在伤后 1 h 才被表达。朱新勇等[11]研究发现，创面早期愈合过程中，MMP-9 水平上升促进创面细胞迁移，有利于创面炎症坏死组织清除，可能是创面愈合的机制之一。

损伤后 1 h，除炎症细胞表达 MMP-2，MMP-9 外，血管内皮细胞也表达少量的 MMP-2，MMP-9，其意义可能在于促进损伤局部中性粒细胞迁移，参与炎症反应。本实验结果发现损伤愈合的早期 1 h ~ 3 d 真皮层内浸润的大量中性粒细胞、部分血管内皮细胞及成纤维细胞表达 MMP-2，阳性细胞在 3 d 达到高峰且维持到第 5 d。而 MMP-9 在伤后 1 h ~ 3 d 除在表皮层和皮下、真皮内浸润的中性粒细胞、毛细血管内皮细胞表达外，损伤区及损伤周边区浸润的中性粒细胞、血管内皮细胞和增生的成纤维细胞也有阳性表达，提示损伤后早期，损伤区及损伤区周围的 MMPs 表达可能在调节创口愈合的整个过程中都有重要作用，并直接影响愈合的过程。损伤后血管生成的关键环节是内皮细胞的运动和直接迁移，MMPs 是调控这些过程的重要蛋白水解酶，在内皮细胞的迁移过程中发挥重要

作用。MMP-2,MMP-9 水解细胞外基质所产生的水解片段也对血管生成起调节作用[12]。

伤后 5～12 d,炎症细胞表达 MMP-2 显著下降,损伤区及周围主要在成纤维细胞,血管内皮细胞中阳性表达;在此阶段,MMP-9 的表达也以主要在血管内皮细胞和成纤维细胞中;两者均维持在相对稳定的高水平。组织修复过程中的成纤维细胞、血管内皮细胞阳性表达,可能是 MMPs 参与肉芽组织中细胞的增殖、迁移和新生血管的形成,并为肉芽组织的生长和新生上皮的再生提供足够的营养和机体内环境。

损伤愈合的最后阶段是胶原的合成和沉积。大多数研究表明通过刺激 MMPs 的表达有利于创伤组织中胶原的降解和沉积,创伤源性成纤维细胞在应用 MMPs 抑制物(TIMP)后胶原合成下降[13,14]。伤后 5~10 d 损伤周边区可见 MMP-2、MMP-9 稳定高水平表达，提示很可能是 VEGF、TGF-β_1 刺激产生的大量 MMPs 在损伤区的胶原沉积中发挥重要作用。另外还有研究表明,过量的 MMPs 表达导致胶原沉积、瘢痕形成,因此,各种损伤致基底膜完整性被破坏,角朊细胞暴露于基质,启动表皮细胞产生 MMPs,获得胶原分解活性并发挥关键作用[15]。损伤愈合的晚期需要 TIMP 活性下降而 MMPs 增强从而促进胶原的形成，本实验研究表明伤后 5-10 d 持续稳定高水平表达,也进一步说明了损伤愈合晚期,高水平表达的 MMPs 能进一步增加胶原的合成和沉积；另外,研究表明 MMP-2 的表达可以促进 MMP-9 的表达与活化;以及在多种炎症细胞因子、生长因子如 TGF-β_1,VEGF 等作用条件下,均可诱导 MMPs 的表达增高[5,16],这些充分表明了愈合创口中以及创口周围 MMP-2 和 MMP-9 的持续性不同水平的表达对血管生成、胶原沉积并增加创口张力均有重要的作用。

值得提出的是本实验通过对各时间段 MMP-2 和 MMP-9 表达的阳性细胞进行统计学分析还发现 MMPs 表达的阳性细胞数随损伤后时间的不同而表现出规律性变化。MMP-2 的阳性细胞数在伤后 0~1 h 较低,1 h～2 d 持续增加并于 3~5 d 达到最高峰,5～10 d 有所下降但仍维持在一个相对稳定的高水平,直至伤后 12～14 d 左右降到正常水平。MMP-9 的阳性细胞数在伤后 0～1 h 表达较低,1 h～2 d 持续增高,并在 3 d 达到最高峰,至 5 d 内保持稳定高表达,直至 5 d 后开始下降，但仍维持在一个相对稳定的高水平,直至伤后 12～14 d 左右降到正常水平。这些实验结果提示:(1) MMP-2 和 MMP-9 随皮肤损伤后时间的不同呈现出规律性变化,可望作为推断皮肤损伤时间的指标;(2) MMPs 作为皮肤损伤愈合过程中降解细胞外基质的关键酶,在皮肤损伤愈合过程中发挥重要作用,是皮肤损伤愈合过程中的重要因子;(3) MMP-2 和 MMP-9 在皮肤损伤愈合过程中表达的时间规律性变化,可能作为一种客观指标用于皮肤损伤时间推断。鉴于目前法医病理学对 MMPs 的研究主要限于 MMP-11 与月经血鉴定[17],以及 MMPs 与心血管病性猝死的鉴定[15]。我们在本实验中选择具有高度同源性的 MMP-2、MMP-9 作为检测指标,观察其表达变化与损伤时间的相关性,目前已初步被证实其用于推断损伤时间的可能性和可行性[18]。需要指出的是,我们选择大鼠作为实验对象证实了这种可能性和可行性;但是,对于不同种属的实验动物,以及对人体进行法医检案的实际应用过程中,是否会因种属不同而出现 MMPs 表达上的差异,还需要进一步深入研究。此外,MMP-2 和 MMP-9 在创伤组织中表达的稳定性及精确定量问题,也需要我们进一步研究。

参 考 文 献

[1] 吴随群,赵 伟.肺癌 MMP-2 和 MMP-9、VEGF 在非小细胞肺癌中表达和意义[J].肿瘤基础与临床,2007,20(1):12-14.

[2] 董 颖,赵长宏.基质金属蛋白酶与肿瘤侵袭转移的研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2007,21(4):384-386.

[3] 金 霞,张健慧.基质金属蛋白酶基因多态性研究进展[J].国外医学遗传学分册,2005,28(2):76-79.

[4] Sethi C S,Bailey T A,Luthert P J,et a1.Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders[J]. Br J Ophthalmol,2000,84:654-666.

[5] Visse R,Nagase H.Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metallo proteinases:structure,function,and biochemistry[J]. Circ Res,2003,92:827 -839.

[6] 白丽洁,戚秀兰.TGF-β1 和 MMP2 对大鼠胰腺坏死后的再生作用[J].中国误诊学杂志,2004,4(3):341-342.

[7] Kahari V M,Saarialho K U.Matrix metalloproteinase in skin[J]. Exp Dermatol,1997,6(5):199-213.

[8] Armstrong D G,Jude E B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing[J]. Am Podiatr Med Assoc,2002,92:12-18.

[9] O'Toole E A. Extracellar matrix and keratinocyte migration[J]. Clin Exp Derma tol,2001,26:525-530.

[10] 罗丽娟,周 辉. MMP-2 及其抑制剂、TGF-β1 与翼状胬肉[J].实用临床医学,2007,8(10):128-130.

[11] 朱新勇,方弛华,张丽芸,等.爆炸伤面愈合过程中 MMP-9 和 TGF-β1 所起的作用和重量的变化[J]. 第四军医大学学报,2005,25(7):844-846.

[12] 陈 杰,李甘地.病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005,51-52.

[13] 唐四元,管茶香,周建华.基质金属蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 在肺组织损伤修复中的表达[J]. 中国现代医学杂志,2004,14(12):16-18,22.

[14] 杜孝文,吴小候,张守健,等.MMP-2、MMP-9 在大鼠肾缺血再灌损伤早期的表达及意义[J]. 重庆医学,2008,37(14):1536-1538.

[15] 陆兴安, 许 明, 沈国良, 等. 病理性瘢痕组织中 TGF-β1 形成及 MMP-1 的表达[J]. 江苏医药,2005,31(12):901-902.

[16] 吴 薇,冯相平,陈新山.基质金属蛋白酶与心血管疾病及其法医学意义[J]. 中国法医学杂志,2005,20(1):37-40.

[17] 郑 晶,陆惠玲,陈 森.月经血鉴定与基质金属蛋白酶 -11[J].中山大学研究生学刊(自然科学·医学版),2005,26(3):s1-s3.

[18] 李红卫,万立华,马智华,等.大鼠皮肤枪弹伤后 MMP-1 和 MMP-3 的表达研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(13):1291-1292.

（责任编辑：冉明会）