

71-77.

- 81.

[30] Chai J, Sheng Z, Guo Z. The experience of the management of burn sepsis with different strategies in our department during the past 29 years [J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2000; 16 (2): 78

【作者简介】
孙志刚 (1963—), 男 (汉族), 天津人, 1986 年毕业于第三军医大学医疗系, 现从事烧伤整形专业, 副主任医师。
(收稿日期: 2002-12-30; 修回日期: 2003-01-12)

基质金属蛋白酶-9 与创面修复

龚加庆¹, 李雅¹, 方驰华²

【摘 要】MMP-9 是金属蛋白酶家族中分子量最大的酶, 它受许多细胞因子的调节。目前认为细胞外基质的降解在很大程度上取决金属蛋白酶与其抑制剂的平衡。MMP-9 可作用较广泛的底物, 在创面修复中起到重要作用, 但在各种创面如急性创面、感染创面和慢性创面中的含量及相应作用有所不同, 并且从某种程度上说 MMP-9 在创面渗液中的含量对创面的愈合趋势有一定的预测作用。对 MMP-9 的深入研究必将有助于攻克创面愈合中的种种难题。

【关键词】MMP-9; 创面修复; 展望
【中图分类号】Q556.9 【文献标识码】A 【文章编号】1001-0726 (2003) 03-0242-05

Matrix metallo-proteinase-9 and wound repair GONG Jia-qing¹, LI Ya¹, FANG Chi-hua², 1. The Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan Province 610083, China; 2. Dept of General Surgery, Zhujiang Hospital, The 1st Military Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510082, China

【Abstract】Matrix metallo-proteinase-9 is an enzyme having the largest molecular weight in the family. It is regulated by many cellular factors. A balance between matrix metallo-proteinase and its inhibitors is very important for the degradation of the cellular-matrix. Since matrix metallo-proteinase-9 can act on many substrates, it is important for wound repair. The content of matrix metallo-proteinase-9 in the acute and chronic and infected wounds are not the same, so the effects of matrix metallo-proteinase-9 are different. To some extent, the content of matrix metallo-proteinase-9 in the wound fluid may forecast the healing tendency of the wound. Further research on matrix metallo-proteinase-9 will help resolve many problems about wound healing.

【Key words】matrix metallo-proteinase-9; wound repair; prospect

近年来, 随着国内外对基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloprotrinase-9 MMP-9) 研究进一步深入, MMP-9 在创伤修复中的重要作用越来越引起学术界的重视, 本文从 MMP-9 的理化性质、功能调节以及在创面修复中的地位及作用作一综述。

一、MMP-9 的理化性质

1. MMP-9 的结构: MMP-9 是金属蛋白酶家族中分子量最大的酶 (92KD)。它以前酶原 (80KD) 的形式合成, 具有 MMP 家族的共性: (1) 前酶含有一个半胱氨酸开关和两个高度保

【基金项目】 全军医学科研“十五”计划面上项目资助 (01MA134)
【作者单位】 成都军区总医院全军普外中心, 四川 成都 610083
2. 第一军医大学珠江医院普通外科, 广东 广州 510082

守区,一个高度保守区位于催化中心,另一个高度保守区位于 N 末端;(2)含有两个 Zn^{2+} ,其中一个位于催化活性中心,为酶活化所必需辅助因子;(3)含有两个 Ca^{2+} ,参与酶活性的激活,并为酶的稳定所必需的辅助因子^[1-2]。MMP-9 由七个片段组成:信号肽片段、激活酶的前肽片段、 Zn^{2+} 结合片段、激活酶片段、纤维连接素片段、类 V 型胶原片段、类凝血酶片段,各片段的具体功能目前还没有完全阐明^[3]。人类的 MMP-9 基因中有 13 个外显子,这个基因中三个内在的纤维连结蛋白样胶原结合点分别被编码成第 5、6、7 个外显子,第 9 个外显子有 144 个碱基编码。相对于家族中其它蛋白酶而言,MMP-9 有 48 个碱基序列是独有的^[4]。

2. MMP-9 的活化及调节:MMP-9 以无活性的前酶形式分泌,其活性的封闭是由于在 Zn^{2+} 活性中心的旁边结合有前肽片段内含有的一个半胱氨酸,该半胱氨酸阻断了活性中心与底物的结合。在活化过程中,前肽片段被劈开,半胱氨酸与 Zn^{2+} 分离,从而暴露活性中心。前酶原即在裂解酶的作用下裂解掉 19 氨基酸的信号肽,多肽糖基化而变成 92KD 的酶原形式。92KD 的酶原降解掉氨基酸端 73 个氨基酸产生此酶的活化形式(84KD)^[4,5]。

MMP-9 的活性受细胞因子调节,如上皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、白细胞介素-1(IL-1)、致癌基因产物、组织型纤溶酶原激活剂(TPA)等可促进 MMP-9 mRNA 的合成。SatoH 等^[6]研究发现 MMP-9 mRNA 中有 3 个同源的模块结合点,分别为 AP-1、NFkB 和 SP-1 蛋白,能被 TPA 和 TNF- α 正性诱导。AP-1 位点可独立、少量的诱导,需要 NFkB 和 SP-1 位点的协同作用,和其它金属蛋白酶的 TPA 诱导实验比较,发现 AP-1 位点时 TPA 可诱导基因中所共有的,而 NFkB 和 SP-1 位点仅存在于 MMP-9 基因中。也有许多酶可灭活 MMP-9,其中最有效的为血浆衍生抑制因子 α_2 巨球蛋白。纤溶酶和尿激酶型纤维酶原激活物被认为是 MMP-9 内源性激活剂,也是大多数 MMP 在生理状态下的激活物。

细胞外基质的降解在很大程度上取决金属

蛋白酶与其抑制剂(TIMP)的平衡。导入重组的 TIMP 可加速创面的修复。许多研究表明 MMP-9 和 TIMP-1 关系密切^[7],其作用机理目前还不太清楚。TIMP 的主要功能可与 MMP 形成 1:1 的复合物抑制 MMP 的活性,有作者推测 TIMP-1 可能通过其 17-19 位上的亮氨酸-缬氨酸-异亮氨酸与 MMP 的 $S_1-S_2-S_3$ 区结合,使 MMP 第 16 位上天冬氨酸的羧基作用于其活性中心的锌,从而抑制其活性^[3]。

3. 底物及功能:MMP-9 可作用较广泛的底物,包括 I、III、IV、V 型胶原、明胶和弹性蛋白等,主要底物有 IV、V 胶原和明胶。这个酶的作用已在创面的修复中得到证实。MMP-9 对这些底物起着降解作用,因此在创面的修复中可减少瘢痕的形成,因此认为它在创面修复中减少瘢痕形成应用的前景比较乐观。

二、MMP-9 在创面修复中的作用

在生理情况下,MMP-9 参与细胞外基质的修复和重塑,而病理情况下,MMP-9 也可参与机体的病理生理过程。有作者对小鼠脑外伤模型中的 MMP-9 的表达进行了研究。将小鼠分为 MMP-9 基因缺陷组和正常对照组,发现在正常对照组内 MMP-9 于伤后 3 小时即开始升高,24 小时达高峰,并维持一周时间;而在实验组内,MMP-9 的水平一直较低。因此,认为 MMP-9 肯定参与组织的创伤应激或修复反应,对组织修复过程中的 MMP-9 的产生进行干预,可能会直接影响组织修复的进程^[8]。既然 MMP-9 参与组织创伤反应,则在各种创面中的表达和作用均会发生改变。

1. MMP-9 与急性创面:急性创面的修复依赖于修复细胞与细胞外基质(ECM)的相互作用。成纤维细胞(FB)是主要的修复细胞,在某些趋化因子的作用下,由创周向创面移动,并分泌大量的 ECM 如胶原蛋白、纤维连接蛋白、层连蛋白等^[9]。随着 FB 和其它细胞迁移到伤口部位,伤口处 ECM 沉积,FB、内皮细胞等分泌大量的生长因子如 PDGF、TGF、EGF 等,使细胞持续增殖,ECM 合成及新生血管形成。TGF 对皮肤创伤修复起到重要作用。TGF 一方面刺激 FB 合成 ECM,同时在某种情

况下可抑制 MMP-9 的产生,并增加 MMP-9 抑制剂 TIMP-1 的合成^[10]。由此可见,MMP-9 在 FB 和 ECM 的相互作用中起到关键调节作用。

正常皮肤中无 MMP-9,MMP-9 主要由上皮细胞,尤其是 FB 产生。创伤早期,炎性细胞、多形核白细胞、单核巨噬细胞均产生 MMP-9。Agern MS 等^[11]研究发现炎性细胞在向以不同胶原为主的基底膜移动时的产生 MMP-9 的量不同,其中以向 IV 型胶原为主的基底膜上移动时产生的 MMP-9 为高,作者推测 MMP-9 为上皮细胞迁移所必需的。Tarleton JF 等^[12]发现 MMP-9 参与内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞和基质角质细胞核迁移,促进新生血管的生成和创面的再上皮化。

Legrand-C 等^[13]对 MMP-9 在小鼠支气管上皮细胞修复作用中的机理研究发现,MMP-9 的活性与支气管上皮细胞的迁移速度成正比。在上皮细胞迁移过程中,MMP-9 集聚于细胞外基质,作用较为活跃。其集聚过程与肌动蛋白关系密切,作用机理目前不清楚。上皮细胞的迁移通过胶原蛋白 IV 连接得以实现,MMP-9 活性在细胞和胶原连接较少的部位较高。当胶原 IV 连接作用受阻时,上皮细胞不能发生迁移,但可以逐渐分化成熟。MMP-9 活性受阻时,上皮细胞和胶原连接均保持初始状态。因此认为 MMP-9 通过对细胞外基质的重塑而实现上皮细胞的迁移,使创面得以修复。

2. MMP-9 与感染创面:创伤早期的炎性浸润阶段,中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等炎性细胞移行至伤口处吞噬、灭菌、清除细胞和组织碎片及异物。这些炎性细胞均能分泌 MMP-9,所降解的胶原肽段为一种趋化因子,可促进单核-巨噬细胞移向伤处而加速清创过程。炎性细胞在移行过程中必需降解细胞外基质屏障以到达靶组织^[14]。除了性细胞能产生 MMP-9 外,细菌也能产生 MMP-9。有作者对感染创面的检测发现,创面中细菌数量越高,各种炎性因子如 IL-2、IL-6 等和 MMP-9 的水平越高,而 TIMP 和 PDGF、EGF、TGF 等生长因子的含量越低,因此,控制创面感染有助于创面的修复^[15-16]。

3. MMP-9 和慢性创面:慢性感染性溃疡

创面的治疗至今仍是困扰临床的一大难题。特别是在湿热环境下急性创面最易造成创面感染,感染创面在处理不当情况下,较易成为慢性难愈性创面。近年来,各种生长因子(growth factor GF)在创面中的应用研究给解决这一难题带来曙光,但 GF 真正应用于临床仍有许多复杂工作要做。Yager DR 等^[17]研究发现,在慢性感染创面中,MMP-9 的活性较急性创面中的 MMP-9 的活性高出近 125 倍(平均 4-500 倍),而 GF 水平却明显低下。Okumura K 等^[18]研究表明,在慢性创面内加入的¹²⁵I 标记的 EGF 可被较快降解,而加入 TIMP-1 后,降解速度显著下降,这说明 MMP-9 在降解生长因子方面可能存在较大的作用。Neil T 等^[19]发现慢性创面渗液可降解 EGF 和 EGF 受体,不能刺激蛋白质 DNA 的合成,而急性创面渗液不能降解 EGF 和 EGF 受体,但蛋白质 DNA 合成能力较血浆高出 2~3 倍。其原因为可能:(1)急性创面渗液中高浓度的生长因子可促进蛋白质 DNA 的合成;(2)慢性创面中 MMP-9 的活性的增加起到降解生长因子的作用,后种可能性较大,因为慢性创面渗液中低浓度的生长因子并不影响细胞的有丝分裂。

4. MMP-9 对创面愈合的预测作用:Agren MS 等^[20]对 15 名患者急性创面(平均长 2cm,深 0.13cm)渗液和健康成人的血浆内的 MMP-9 进行了比较研究,发现实验组创面渗液组织蛋白内 MMP-9 表达水平于伤后 24h 达 33.0 (25.8~100.9) ng/mg,高出健康成人血浆内 MMP-9 浓度(平均 3.2ng/mg) 10 倍,48h 后为 24.4 (19.0~43.2) ng/mg,两者之间均有显著差异。伤后第 2 天至第 10 天创面渗液内 MMP-9 浓度基本保持稳定。对实验组每个患者研究发现,伤后创面内胶原蛋白的沉积量与 MMP-9 量成反比,MMP-9 表达于 24h 后仍较高的患者,其创面愈合时间延迟。另外具有生物活性的 MMP-9 只有在伤后 10 天才能检测到。作者考虑:(1)MMP-9 可能与伤口内胶原蛋白有高度亲和性;(2)MMP-9 可能存在于其他调控胶原蛋白沉积的途径。因此认为,早期创面渗液内 MMP-9 的浓度及活性的测定将有助于创面愈合前景的预测。

三、MMP-9 在创面修复应用中前景展望

业已证实 MMP-9 可促进上皮细胞的迁移,加速创面修复,而 TGF 等生长因子为创面修复所必需,但 TGF 却能抑制炎性细胞对 MMP-9 的分泌,因此 MMP-9 在创面的修复中可能与生长因子存在某种制约关系,但具体情况还有待于进一步研究。Neil T 等^[19]发现,慢性创面中 MMP-9 的水平明显高于急性创面。付小兵认为在慢性创面中各种修复细胞处于一种休眠状态,当外源性应用 GF 后,创面失活的修复细胞如单核巨噬细胞等复活,加速了组织修复^[21],MMP-9 水平也随之下降^[22]。方培耀等^[23]认为慢性创面渗液中 GF 水平低下,可能与创面液中某种酶有关,修复细胞功能失活与复活可能与创面液中某种因素的开关作用有关。

综上所述,目前,MMP-9 在创面治疗的应用中仍有许多问题有待于解决:(1)GF 既可促进 MMP-9 的分泌,也可抑制 MMP-9 的分泌,MMP-9 对 GF 的活性也有抑制作用,两者的相互制约关系有待阐明;(2)在创面渗液中,GF 和 MMP-9 存在一种此消彼长的关系,MMP-9 是否对 GF 有降解作用;(3)在一定情况下,TIMP-1 的应用可促进创面的愈合,其临床应用时机如何掌握等。相信随着对 MMP-9 在创面修复中作用研究进一步深入,这些问题将得到相应地回答。

参考文献

- [1] Murphy G, Knauper V, Cowell S, et al. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases [J]. Ann-N-Y-Acad-Sci. 1999; 878: 25-39.
- [2] Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, et al. Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes [J]. J Cell Physiol. 1999; 180: 271-84.
- [3] Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling [J] FASEB J, 1991; 5: 2145-2154.
- [4] Tryggvason K, Huhtala P, Tuuttila A, et al.

Structure and expression of type IV collagenase genes [J]. Cell Differ. 1990; 32: 307-312.

- [5] Pei XH, Nakanishi Y, Takayama K, et al. Granulocyte, granulocyte-macrophage, and macrophage colony-stimulating factors can stimulate the invasive capacity of human lung cancer cells [J]. Br-J-Cancer. 1999; 79: 40-46.
- [6] Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells [J]. Oncogene. 1993; 8: 395-440.
- [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]. J Biol Chem. 2000; 275: 28308-28315.
- [8] Wang-X; Jung-J; Asahi-M; Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury [J]. J-Neurosci. 2000 20: 7037-42.
- [9] Clark RAF. Regulation of fibroblast in cutaneous wound repair [J]. Am J Med Sci. 1993; 306: 42-48.
- [10] O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta (1) [J]. Hypertension. 2000; 36: 319-24.
- [11] Agern Ms, Gelatinase activity during wound healing [J]. Br J Dermatol. 1994. 131: 634-640.
- [12] Vickery CT, Leaper DJ, et al. Post-surgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metallo-proteinase-9 [J]. Br J Dermatol. 1997; 137: 506-516.
- [13] Legrand-C; Gilles-C; Zahm-JM; Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling [J]. J-Cell-Biol. 1999; 26; 146: 517-29.
- [14] Pilcher BK, Wang M, Qin XJ. et al. Role of Matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity [J]. Ann-N-Y-Acad-Sci. 1999; 878: 12-24.
- [15] Meisser A, Chardonnens D, Campana A. Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloprotenases [J]. Mol-hum-Reprod. 1999; 5: 252

-560.

- [16] Robson MC. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria [J]. Surg Clin North Am. 1997; 70: 637-650.
- [17] Yager DR, Chen SM, Ward SI, et al. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors [J]. Wound Repair Regen, 1997; 5: 23-32.
- [18] Okumura K, Kiyohara Y, Komada F, et al. Improvement in wound healing by epidermal growth factor ointment [J]. 1990; 7: 1289-1293.
- [19] Neil T, Bennett MD, Gregory S, et al. Growth factor and wound healing: part II. Role in normal and chronic wound healing [J]. Am J Surg 1993; 166: 74-81.
- [20] Agren MS, Jorgensen LN, Andersen M, et al. Matrix metalloproteinase 9 level predicts optimal collagen deposition during early wound repair in humans [J]. Br J Surg. 1998; 85: 68-71.
- [21] 付小兵. 生长因子促(抑)创伤修复的临床应用与展望 [J]. 中华创伤杂志, 1998; 14: 365-366.
- [22] Wayne K, Stadelmann MD, Alexander G, et al. Physiology and Healing Dynamics of chronic cutaneous wounds [J]. Am J Surg 1998; 176 (S2A): 26S-38S.
- [23] 方培耀, 程枫. 不同深度的 II 度烧伤创面中单核巨噬细胞生长因子的 mRNA 表达 [J]. 中华创伤杂志, 1998; 14: 353-355.

【作者简介】

龚加庆 (1971—), 男 (汉族), 湖南常德人, 1994 年毕业于第一军医大学, 医学硕士, 主治医师。

李雅 (1972—), 女 (汉族), 湖北金山市人, 1993 年毕业于第三军医大学, 主治医师。

方驰华 (1958—), 男 (汉族), 西安市人, 第四军医大学毕业, 科主任, 主任医师。

(收稿日期: 2002-11-21; 修回日期: 2003-03-01)

关于评选第二届“美宝杯”优秀论文奖的通知

中国中西医结合学会烧伤专业委员会拟于 2004 年 5 月在广西南宁召开第八届全国烧伤创疡学术会议。届时将举办第二届“美宝杯”优秀论文奖的评选活动, 参选论文范围定为 2002 年以来在《中国烧伤创疡杂志》上发表和参加本次学术会议的论文 (第一届“美宝杯”获奖的论文除外), 欢迎应用烧伤湿性医疗技术及相关专业的医护人员踊跃投稿。现将评审条件和具体要求通知如下:

1. 送审论文有较强的科学性, 逻辑性和实用性。临床经验总结有推广价值和参考价值。
2. 对应用徐荣祥教授所研究创立的原位干细胞培植再生修复技术为基础的再生医学方面的论文择优评选。
3. 基础研究论文要求有扎实的理论依据, 参考文献真实准确, 观点鲜明, 论据充分。
4. 临床总结论文要求对临床经验有分析, 对教训有客观的认识, 统计学处理按学术论文规范的要求进行。
5. 文理通顺, 可读性强。

会议征文内容请参阅本期杂志刊登的征文通知 (封四)。来稿请注明“美宝杯稿件”, 并请寄至: 北京市宣武区广义街 7 号乐凯大厦 1104 室 中国烧伤创疡杂志社收, 邮编: 100053, 联系人: 邢颖, 联系电话: 010-63042423, E-mail: pariodical@mebo.com