

基质金属蛋白酶及其抑制因子在胎儿皮肤内的表达特征及其意义

李文娟 陈伟 付小兵 朱任之

【摘要】 目的 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-3、MMP-9及金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)、TIMP-2在不同发育时期胎儿皮肤中的表达特征及其可能的生物学意义。方法 24例被测标本中包括不同胎龄(12~40周)的胎儿皮肤。用免疫组化方法和病理技术检测这5种蛋白在胎儿皮肤中定位和表达量的变化规律。结果 MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2在不同时期的胎儿皮肤内均有表达,它们主要分布于表皮细胞、成纤维细胞、毛囊和汗腺上皮细胞以及血管内皮细胞的胞浆中。在早期(胎龄12~18周)妊娠胎儿皮肤中,MMP-2、MMP-3、MMP-9蛋白呈强阳性表达,随着胎儿生长发育,这些蛋白的阳性率逐渐降低,在晚期(胎龄27~40周)妊娠胎儿皮肤中这些蛋白的阳性细胞率均明显低于早期妊娠胎儿(P 均 <0.05)。TIMP-1和TIMP-2呈相反的变化规律,在早期妊娠胎儿皮肤中表达水平较低,而在晚期妊娠胎儿皮肤中这两种蛋白阳性细胞率增大,显著高于早期妊娠胎儿(P 均 <0.05)。结论 MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2可能对皮肤的发生、结构功能的维持以及创伤后修复起重要作用。在早期妊娠胎儿皮肤中,MMP-2、MMP-3、MMP-9高表达以及TIMP-1和TIMP-2低表达可能与胎儿皮肤创面无瘢痕愈合密切相关。

【关键词】 基质金属蛋白酶类; 金属蛋白酶组织抑制因子; 胎儿皮肤; 无瘢痕愈合

Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in fetal skin and their biological significance

LI Wen-juan*, CHEN Wei, FU Xiao-bing, ZHU Ren-zhi. * Key Research Laboratory of Wound Repair, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (formerly 304th Hospital), Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression characteristics of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2) in developing fetal skin and their potential biological significance. Methods Skin of 24 cases of fetuses with different gestational age (12-40 weeks) were obtained, embedded with paraffin wax, and sectioned. Immunohistochemistry and pathological methods were used to detect the expression intensity and distribution of MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2. Results Positive immunohistochemical signals of MMPs and TIMPs could be found in fetal skin at different gestational periods. These proteins mainly located in the cytoplasm of epidermal cells, fibroblasts, epithelial cells of hair follicles and sweat glands and vascular endothelial cells. In earlier gestational fetal skin (12-18 weeks), the expression levels of MMP-2, MMP-3 and MMP-9 were high. Along with the advancement in gestational age, the positive rates of these three proteins in skin were lowered, and in later gestational fetal skin (27-40 weeks) the expression rates were significantly decreased compared with those in earlier gestational fetal skin (all $P < 0.05$). On the contrary, protein expression levels of TIMP-1 and TIMP-2 were apparently lower in earlier versus later gestational skin (both $P < 0.05$). Conclusion MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 might be involved in the skin development and maintenance of cutaneous structure and function. Higher expression of MMP-2, MMP-3 and MMP-9 and lower protein levels of TIMP-1 and TIMP-2 may provide an antiscarring signal in healing of wound during early periods of gestation.

【Key words】 matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase; fetal skin; scarless healing

哺乳动物胚胎,包括人类,在早期均有显著的皮肤无瘢痕创伤愈合能力。对于其发生机制的研究,到

基金项目:国家“973”项目(2005CB522603),国家杰出青年科学基金(30400172)和国家自然科学基金(30170966)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军创伤修复重点实验室(李文娟,陈伟,付小兵);兰州大学基础医学院病理教研室(李文娟,朱任之)

作者简介:李文娟(1977-),女(汉族),陕西西安人,硕士研究生,研究方向为创伤修复发生机制的基础和应用研究。

目前为止,大都集中于创伤愈合中纤维化及肉芽组织的形成上,我们前期的研究发现,胎儿无瘢痕愈合不受胎儿所处的无菌、湿润和低氧环境的影响,而可能与伤口处的细胞因子浓度变化密切相关^[1,2]。我们已经认识到,创伤修复涉及到细胞外基质(ECM)的合成,沉积及降解之间的平衡。基质金属蛋白酶(MMPs)作为降解ECM的重要酶类,在创伤愈合过程中可能发挥重要作用^[3]。目前,关于胎儿发育过

程中,参与胶原蛋白代谢的基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-3、MMP-9 及其抑制因子-1 (TIMP-1)和 TIMP-2 在人类皮肤组织中的定位表达变化还少见报道,对这一规律的揭示,有利于深入揭示 MMPs 调节创面愈合的机制和胎儿皮肤创面无瘢痕愈合的部分奥秘。

1 材料和方法

1.1 标本来源及制备:胎儿皮肤取自孕妇因外伤(如车祸)而致流产的胎儿背部皮肤,共 24 例。胎龄(EGA)为 12~40 周,其中 EGA 12 周、14 周、16 周、18 周、20 周、22 周、24 周、25 周、27 周、29 周、33 周和 40 周各 2 例。根据胎儿发育的不同时期,将胎儿皮肤标本分为:早期皮肤(EGA 12~18 周)、中期皮肤(EGA 20~25 周)和晚期皮肤(EGA 27~40 周)3 类。取标本时,经过孕妇本人和院方同意。所有取材未经任何药物处理,用体积分数为 10%的中性甲醛固定,脱水、石蜡包埋,切片后备用。

1.2 皮肤组织中 MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白含量的检测:用免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素过氧化物酶法(SP)。MMP-2 抗体(BA0569)、MMP-3 抗体(BA1272)购于美国 Boster 公司;MMP-9 单克隆抗体(sc-21733)以及 TIMP-1 抗体(sc-5538)、TIMP-2 抗体(sc-21735)和 SP 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,操作按试剂盒说明书。将石蜡切片脱蜡至水并进行抗原热修复后,系列染色,其中一抗用抗体稀释液按 1:100 稀释,光镜观察,结果以胞浆或质膜着棕色者为阳性染色。另用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗为阴性对照。

1.3 组织学观察:在 400 倍光镜下观察免疫组化结果。随机选取 8 个视野,计数阳性细胞数和总细胞数,并计算阳性细胞率。

1.4 统计学方法:用 SPSS 软件对所有数据进行统计学处理,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,阳性率资料组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察:光镜下不同发育阶段人皮肤有典型组织学结构。胎儿发育早期(12~18 周),皮肤表皮仅由 2~3 层表皮细胞组成,真皮内汗腺开始发育,完整毛囊结构尚未形成。胎龄 20 周左右,真皮层可见一些上皮细胞团,可能是正在发育的毛囊结构。胎龄 22 周左右,皮肤表皮由 3~4 层表皮细胞组成,汗腺、毛囊和皮脂腺等皮肤附属器官已形成,但体积

小且结构不成熟。胎龄 27 周以后,皮肤表皮细胞层数逐渐增多,汗腺和毛囊结构逐渐成熟且数量递增。

2.2 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 在不同胎龄胎儿皮肤中的表达变化(表 1):在 400 倍光镜下,观察切片中表达每种蛋白的阳性细胞。结果表明,3 种 MMPs 在不同胎龄的胎儿皮肤组织中都有阳性表达。早期妊娠胎儿皮肤组织中 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 呈强阳性表达,蛋白颗粒主要分布于表皮细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、脂肪细胞以及部分毛囊和汗腺上皮细胞的胞浆中(图 1~3),阳性细胞率分别为(71.25±4.27)%、(63.50±6.26)%和(63.50±7.43)%。随着胎儿的发育,皮肤组织内这些蛋白的阳性细胞率逐渐降低,晚期妊娠胎儿皮肤 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 蛋白的阳性细胞率分别为(33.75±1.49)%、(34.00±4.34)%和(33.00±5.10)% ,与早期妊娠胎儿皮肤相比,蛋白表达均显著下降(P 均 <0.05)。

表 1 不同妊娠胎儿皮肤组织中 MMP-2、MMP-3、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白表达变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Expression of MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in the different tissues of fetal skin($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	早期妊娠胎儿	中期妊娠胎儿	晚期妊娠胎儿
MMP-2	(71.25±4.27)%	(58.00±20.03)% [#]	(33.75±1.49)% ^{#*}
MMP-3	(63.50±6.26)%	(51.63±17.84)% [#]	(34.00±4.34)% ^{#*}
MMP-9	(63.50±7.43)%	(49.63±17.65)% [#]	(33.00±5.10)% ^{#*}
TIMP-1	(23.63±3.62)%	(36.75±3.45)% [#]	(47.25±2.96)% ^{#*}
TIMP-2	(55.75±2.60)%	(62.63±5.24)% [#]	(75.63±5.85)% ^{#*}

注:与早期比较;[#] $P < 0.05$;与中期比较;^{*} $P < 0.05$

2.3 TIMP-1 和 TIMP-2 在不同胎龄胎儿皮肤中的表达变化(表 1,图 4,图 5):在早期妊娠胎儿皮肤组织中,TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白阳性细胞率较低,分别为(23.63±3.62)%和(55.75±2.60)%。随着胎儿不断生长,这两种蛋白在皮肤组织中的表达水平逐渐升高,到晚期妊娠胎儿皮肤组织中,这两种蛋白的阳性细胞率分别增至早期妊娠胎儿皮肤的 1.9 倍和 1.4 倍,蛋白表达也均明显增强(P 均 <0.05)。这两种阳性蛋白的分布规律相似,阳性表达细胞主要为表皮细胞、毛囊和汗腺上皮细胞、血管内皮细胞和部分成纤维细胞。

3 讨论

晚期妊娠胎儿和成人皮肤创面修复时,伴随着成纤维细胞大量增殖,ECM 的异常合成与分泌,伤口愈合后形成瘢痕。而早期妊娠胎儿都具有在皮肤创伤后以无瘢痕形式愈合的特点。1971 年,Rowlatt^[4]偶然发现胎儿皮肤无瘢痕愈合现象;且这

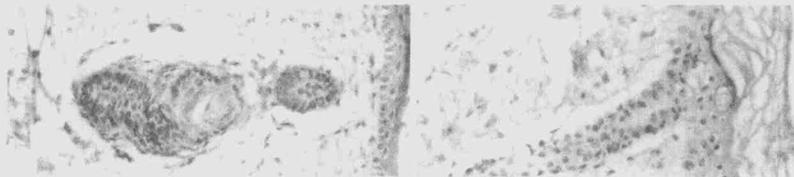


图 1 MMP-2 在胎龄 22 周(左图)和胎龄 33 周(右图)胎儿皮肤组织中的表达(SP, ×200)
Figure 1 Expression of MMP-2 in 22-week (left) or 33-week (right) fetal skin tissues (SP, ×200)

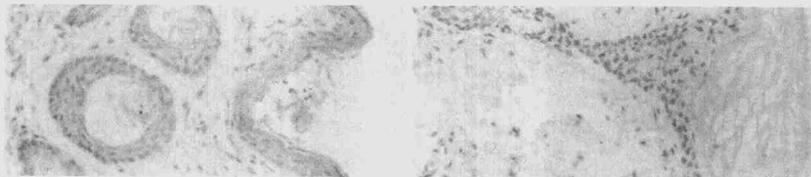


图 2 MMP-3 在胎龄 25 周(左图)和胎龄 40 周(右图)胎儿皮肤组织中的表达(SP, ×200)
Figure 2 Expression of MMP-3 in 25-week (left) or 40-week (right) fetal skin tissues (SP, ×200)

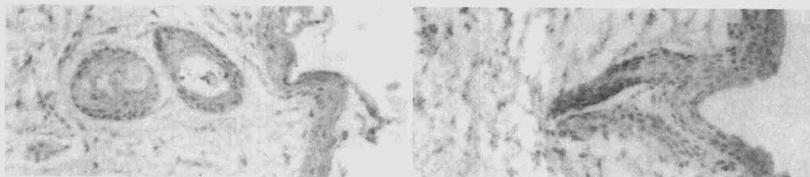


图 3 MMP-9 在胎龄 25 周(左图)和胎龄 29 周(右图)胎儿皮肤组织中的表达(SP, ×200)
Figure 3 Expression of MMP-9 in 25-week (left) or 29-week (right) fetal skin tissues (SP, ×200)

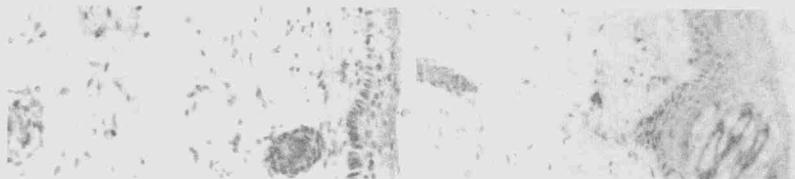


图 4 TIMP-1 在胎龄 22 周(左图)和胎龄 40 周(右图)胎儿皮肤组织中的表达(SP, ×200)
Figure 4 Expression of TIMP-1 in 22-week (left) or 40-week (right) fetal skin tissues (SP, ×200)

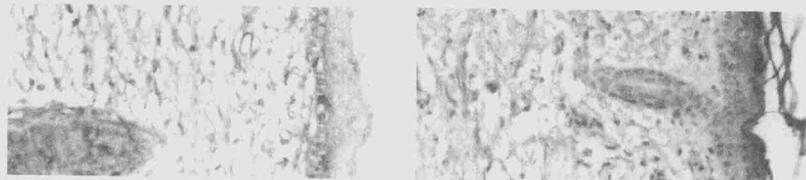


图 5 TIMP-2 在胎龄 22 周(左图)和胎龄 29 周(右图)胎儿皮肤组织中的表达(SP, ×200)
Figure 5 Expression of TIMP-2 in 22-week (left) or 29-week (right) fetal skin tissues (SP, ×200)

一现象已在大量的实验模型中得以证实,认为它可能是胎儿皮肤特有的修复方式^[5]。创伤愈合是肉芽组织合成与降解之间的一种平衡。至今,许多有关胎儿创伤愈合的研究所关注的内容主要是一些介导肉芽组织合成和纤维化相关的细胞因子含量变化,而很少注意到那些涉及到组织转换的蛋白和酶。在创伤修复的过程中有大量酶被释放,它们的功能主要是重建 ECM,我们可以据此认为,这些因子可能涉及调节创面无瘢痕修复,而 MMPs 就是这些因子中的一种。

MMPs 是一组具有相似特征的锌和钙依赖性内肽酶,它的功能是降解 ECM 中的许多蛋白,其中一个重要的特征是 MMPs 还受到另一组分子及其组织抑制因子 TIMPs 的抑制。MMPs 在一些生理过程中扮演重要角色,如组织修复、血管形成及组织形态发育等^[6]。MMPs 具有很强的生物学作用,它们的激活过程可在多个水平被调节,例如,慢性创伤中存在 MMP-2 和 MMP-9 的升高及蛋白酶抑制因子水平的降低。我们选择了 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 以及 TIMP-1 和 TIMP-2,试图证实妊娠无瘢痕期时存在 MMPs 表达较强、TIMPs 表达较低的现象。理论上,这样的平衡适于组织转归和重建。本实验的结果与我们最初的假设基本相符,与晚期妊娠胎儿相比,早期妊娠胎儿皮肤组织表达更高水平的 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 以及较低水平的 TIMP-1 和 TIMP-2。本研究结果还显示,MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 以及 TIMP-1 和 TIMP-2 在胎儿和成人皮肤组织中都有阳性表达,并且它们在皮肤组织内的分布规律相似。这显示皮肤的生长发育、表型和功能的维持以及损伤后的修复可能都需要 MMPs 及其抑制蛋白 TIMPs 参与。

在胎儿发育早期,皮肤伤口愈合后也不形成瘢痕;随着胎儿逐渐发育成熟,在妊娠中期,伤口愈合后形成类似瘢痕样结构;而在妊娠后期的胎儿皮肤组织中,创面愈合后伴随着瘢痕的形成^[7]。创面修复方式的变化机制可能与皮肤组织中 MMP-2、MMP-3、MMP-9 以及 TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白含量的变化有关。MMP-2 和 MMP-9 属于 MMPs 超家族中的明胶酶类,水解底物主要是变性胶原和 ECM 的主要成分 IV 型胶原和 V 型胶原等。MMP-3 属于基质溶素类,它的水解底物较广泛,如 III、IV、V 型胶原以及明胶、蛋白聚糖、糖蛋白等。TIMP-1 能与 MMP-9 前体及活化的 MMP-3 和 MMP-9 形成高度亲和、非共价键结合的复合物,

抑制其生物活性,TIMP-2 则抑制 MMP-2 生物功能^[8,9]。本研究中发现,胎儿发育早期(妊娠 12~18 周),皮肤组织内 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 蛋白呈强阳性表达,TIMP-1 和 TIMP-2 表达水平则较低,MMPs/TIMPs 比值较高;在胎儿发育中期(妊娠 20~25 周),3 种 MMPs 蛋白的阳性细胞率均开始降低,而 TIMP-1 和 TIMP-2 表达增强,MMPs/TIMPs 比值降低;胎儿发育晚期(妊娠 27~40 周)皮肤伤口愈合后能够形成瘢痕,而此时皮肤组织中 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 蛋白阳性信号明显减弱,TIMP-1 和 TIMP-2 表达增强,MMPs/TIMPs 比值降至最低。因此,早期胎儿伤口无瘢痕愈合可能与 MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 高表达以及 TIMP-1 和 TIMP-2 低表达,并由此引起的创面愈合过程中 ECM 沉积减少、有规律分布、组织无瘢痕修复有关。而发育晚期的胎儿皮肤组织中,TIMP-1 和 TIMP-2 表达增强,3 种 MMPs 蛋白表达降低,可能是伤口愈合时 ECM 大量沉积、肉芽组织过度增生并纤维化,从而形成瘢痕的原因之一,但具体机制还需进一步研究。

参考文献:

- 1 陈伟,付小兵,葛世丽,等. 胎儿和出生后机体皮肤内转化生长因子- β 1 基因表达的变化[J]. 中国危重病急救医学,2004,16:206-209.
- 2 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 胎儿和成人皮肤组织中 bFGF、c-fos 和 c-myc 基因转录与翻译的变化及其与创面无瘢痕愈合的关系[J]. 中国危重病急救医学,2002,14:96-99.
- 3 Ziv M P, Eric D P, Dawn L U, et al. Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: The other side of the wound healing balance[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 110: 801-811.
- 4 Rowlatt U. Intrauterine wound healing in a 20-week human fetus[J]. Pathol Anat Histol, 1979, 381: 353-361.
- 5 Chen Wei, Fu Xiaobin, Ge Shili, et al. Ontogeny of expression of transforming growth factor- β and its receptors and their possible relationship with scarless or scar-forming healing in human fetal and postnatal skins[J]. Wound Rep Reg, 2005, 13: 68-75.
- 6 Kahari V M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin[J]. Exp Dermatol, 1997, 6: 199-213.
- 7 Dang C, Ting K, Soo C, et al. Fetal wound healing current perspectives[J]. Clin Plast Surg, 2003, 30: 13-23.
- 8 Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinases-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis[J]. Genes Dev, 2000, 14: 163-170.
- 9 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.

(收稿日期:2005-09-23 修回日期:2006-02-01)

(本文编辑:李银平)