

# 大鼠压疮局部皮肤组织中 TNF- $\alpha$ 、MMP-2 的表达和胶原含量及其意义

丁伟佳, 陈茵, 郑伟基, 何穆

深圳市龙岗中心医院烧伤外科, 广东 深圳 518116

**摘要:** **目的** 探讨在大鼠压疮局部皮肤组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 蛋白表达和胶原纤维、IV 型胶原含量及其意义。**方法** 选取健康成年雄性 SD 大鼠 45 只, 按随机数字表法分为对照组、模型 A 组和模型 B 组, 每组 15 只。对照组不给予任何处理, 模型 A 组和 B 组采用缺血-再灌注磁片循环压迫的方式, 在大鼠后肢股薄肌处施压, A 和 B 组分别给予 3 个和 5 个缺血-再灌注循环, 制造压疮模型。采用 HE 染色观察皮肤组织形态, Masson 染色观察胶原纤维、IV 型胶原的含量, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法检测 MMP-2、TNF- $\alpha$  蛋白的表达。**结果** 对照组、模型 A 组、模型 B 组大鼠压疮局部皮肤组织中胶原纤维含量面积比 [ (45.02  $\pm$  7.43)%, (20.41  $\pm$  3.27)%, (8.91  $\pm$  2.41)% ] 和 IV 型胶原含量面积比 [ (11.04  $\pm$  2.71)%, (8.71  $\pm$  1.80)%, (4.94  $\pm$  1.72)% ] 呈依次降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。对照组、模型 A 组、模型 B 组大鼠压疮局部皮肤组织中 TNF- $\alpha$  (0.47  $\pm$  0.09, 1.14  $\pm$  0.11, 1.60  $\pm$  0.21) 和 MMP-2 蛋白表达的光密度值 (0.11  $\pm$  0.02, 0.33  $\pm$  0.02, 0.50  $\pm$  0.04) 呈依次增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** 大鼠压疮局部皮肤组织中 TNF- $\alpha$  和 MMP-2 表达增高, 而胶原减少, 可能是压疮形成的原因之一。

**关键词:** 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 基质金属蛋白酶 2; 胶原; 压疮

**中图分类号:** R-33 R 722.14<sup>+</sup>2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2017)01-0045-03

局部组织的压迫和在此基础上发生的缺血再灌注损伤, 导致局部肌肉组织坏死, 皮下筋膜、脂肪等组织细胞成分同样发生显著凋亡。临床上压疮较为常见, 特别是在年龄偏大、基础合并症较多、病情较重的昏迷患者中, 发生率可达 0.5% 以上<sup>[1-2]</sup>。在压疮的发生发展过程中, 伴随着明显的炎症细胞因子富集, 巨噬细胞、单核细胞及中性粒细胞均可促进组织损伤和细胞坏死。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 可在缺血再灌注损伤时促进白细胞介素 (IL)-6、IL-8 等对皮下组织的浸润, 加剧细胞凋亡<sup>[3]</sup>; 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 可促进细胞外基质或胶原纤维的分解, 并诱导下游炎症因子抑制 IV 型胶原纤维的修复性增生<sup>[4-5]</sup>。本研究通过建立动物模型, 探讨大鼠股薄肌胶原纤维、IV 型胶原的含量, 并初步探讨 MMP-2 及 TNF- $\alpha$  蛋白表达的变化趋势, 从而为揭示压疮过程中的相关炎症损伤机制提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 受试动物 选取健康成年雄性 SD 大鼠 45 只,

体质量 250 ~ 290 g, 购自江苏省动物实验中心。大鼠自由饮水、进食, 室温 (25.00  $\pm$  2.00)  $^{\circ}\text{C}$ , 分笼喂养。按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型 A 组和模型 B 组, 每组 15 只。

1.2 动物模型制备 10% 水合氯醛按照 250 mg/kg 的浓度进行腹腔注射麻醉, 将大鼠置于固定板上, 采用剪刀剪除大腿内侧的股薄肌毛, 模型 A 组给予大腿股薄肌施压 22.7 kPa, 持续施压 2 h, 放松 0.5 h, 每日重复 3 次; 模型 B 组给予大腿股薄肌施压 22.7 kPa, 持续施压 2 h, 放松 0.5 h, 每日重复 5 次; 对照组不予任何处理。实验终点给予大鼠安乐死, 剪取大鼠大腿内侧股薄肌处压伤肌肉组织 (约 250 mg), 于冰上操作, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  生理盐水中洗涤残留血液, 4% 多聚甲醛-PBS 溶液固定, 脱水, 常规包埋, 连续切片 5  $\mu\text{m}$ 。获得施压强度较低的压疮模型 (模型 A 组) 和施压强度较高的压疮模型 (模型 B 组)。

1.3 检测方法 试剂和仪器: Masson 染色、HE 染色试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司, TNF- $\alpha$  和 MMP-2 抗体购自 Abcam 公司, HRP 标记二抗购自南京碧云天生物科技有限公司。OLMPICS 倒置显微镜购自上海精密仪器有限公司, HSO-99 分光光度计购自成都泰康生物公司。(1) HE 染色观察皮肤组织形态: 采用石蜡脱水, 微波修复, 枸橼酸缓冲液 98 $^{\circ}\text{C}$ ,

5 min后采用 3% 过氧化氢抑制 10 min, 在 50% 石蜡二甲苯液中浸蜡 10 min, 100% 石蜡液中浸蜡 10 min, DAB 显色, 苏木素复染、脱水(85% 酒精 1 次、95% 酒精 2 次、无水酒精 2 次、无水酒精和二甲苯各半 1 次、纯二甲苯 2 次), 封片、镜检。(2) Masson 染色观察胶原纤维或者 IV 型胶原: 用 Regaud 苏木精染液或 Weigert 苏木精液染核 5 ~ 10 min, 用 Masson 丽春红酸性复红液 5 ~ 10 min, 以 2% 冰醋酸水溶液浸洗片刻, 用苯胺蓝或光绿液染色 5 min, 95% 酒精、无水酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。粗大深染的暗绿色长条为胶原纤维, 而暗红色或者细小的纤维样结构为 IV 型胶原。以 Image-Pro Plus 4.01 软件分析胶原纤维和 IV 型胶原所占面积比。(3) 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法检测 TNF- $\alpha$  和 MMP-2 蛋白的表达: 采用石蜡切片脱蜡至水, 切片厚度 3 mm, 烤片 68  $^{\circ}\text{C}$  20 min, 常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 阻断灭活内源性过氧化物酶, 0.01 M 枸橼酸缓冲液(pH 6.0) 中煮沸(95 $^{\circ}\text{C}$ , 15 ~ 20 min)。加入 10% 牛奶封闭液封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 加入 TNF- $\alpha$  和 MMP-2 一抗 20  $\mu\text{l}$  (1:200 稀释), PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的二抗(1:500 稀释), 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素工作液。苏木素复染, 常规脱水、透明、干燥、封片。采用 Image Pro Plus 4.01 专业图像分析软件进行图像分析, 定量采用吸光度法测量光密度(OD)值。

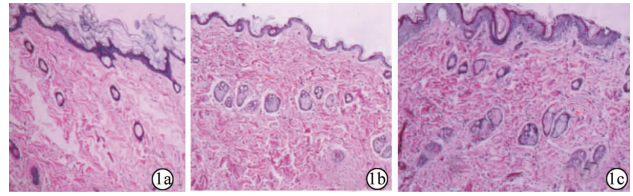
1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较使用方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组皮肤组织形态 在 200 倍光学纤维镜下观察发现, 对照组大鼠皮肤为复层鳞状上皮, 结构清晰, 成纤维细胞数量多, 无明显炎性细胞浸润, 模型 A 组大鼠上皮层次清晰, 成纤维细胞有所减少, 炎性细胞开始浸润, 模型 B 组大鼠上皮明显增厚, 成纤维细胞明显减少, 炎性细胞浸润明显。见图 1。

2.2 各组胶原纤维、IV 型胶原的含量比较 对照组、模型 A 组、模型 B 组大鼠压疮局部皮肤组织中胶原纤维面积比 [(45.02  $\pm$  7.43)%, (20.41  $\pm$  3.27)%, (8.91  $\pm$  2.41)%] 和 IV 型胶原含量面积比 [(11.04  $\pm$  2.71)%, (8.71  $\pm$  1.80)%, (4.94  $\pm$  1.72)%] 呈依次降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 各组 TNF- $\alpha$  和 MMP-2 蛋白表达比较 对照组、



注: 1a: 对照组; 1b: 模型 A 组; 1c: 模型 B 组。

图 1 各组大鼠股薄肌处皮肤组织形态(HE 染色,  $\times 200$ )

表 1 各组大鼠股薄肌处皮肤组织胶原纤维和 IV 型胶原含量面积比 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	胶原纤维	IV 型胶原
对照组	15	45.02 $\pm$ 7.43	11.04 $\pm$ 2.71
模型 A 组	15	20.41 $\pm$ 3.27 *	8.71 $\pm$ 1.80 *
模型 B 组	15	8.91 $\pm$ 2.41 **	4.94 $\pm$ 1.72 **
F 值		41.522	21.467
P 值		<0.01	<0.01

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型 A 组比较, #  $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠股薄肌处皮肤组织 TNF- $\alpha$  和 MMP-2 蛋白表达 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	TNF- $\alpha$	MMP-2
对照组	15	0.47 $\pm$ 0.09	0.11 $\pm$ 0.02
模型 A 组	15	1.14 $\pm$ 0.11 *	0.33 $\pm$ 0.02 *
模型 B 组	15	1.60 $\pm$ 0.21 **	0.50 $\pm$ 0.04 **
F 值		38.411	24.871
P 值		<0.01	<0.01

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型 A 组比较, #  $P < 0.05$ 。

模型 A 组、模型 B 组大鼠压疮局部皮肤组织中 TNF- $\alpha$  (0.47  $\pm$  0.09, 1.14  $\pm$  0.11, 1.60  $\pm$  0.21) 和 MMP-2 蛋白表达的 OD 值 (0.11  $\pm$  0.02, 0.33  $\pm$  0.02, 0.50  $\pm$  0.04) 呈依次增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

## 3 讨论

压疮在临床上较为常见, 特别是在老年医学科、重症医学科及外科手术后的患者中, 由于机体长期卧床、局部血液循环不佳, 易导致压疮的出现<sup>[6]</sup>。压疮可导致局部肌肉、筋膜等组织的变性坏死, 严重的压疮可影响到神经功能, 导致关节功能障碍<sup>[6]</sup>。一项汇集了 114 例外科手术后老年患者发生下肢或臀部压疮的临床资料分析可见, 1.5% 的患者因为压疮而发生严重的毒血症或败血症, 导致住院时间延长, 增加了患者的经济压力<sup>[7-8]</sup>。对于压疮形成过程中相关炎症因子的研究, 可进一步揭示压疮的发生机制, 为压疮的临床诊疗提供基础理论依据。

反复的缺血-再灌注损伤是促进压疮发生的主要过程, 在此过程中细胞炎症因子的富集, 单核细胞、中性粒细胞等炎症细胞的浸润, 可以导致压疮患者病情的进一步进展。TNF- $\alpha$  作为 TNF 超家族成员, 可通

过上调下游 IL-6、IL-8 及炎症趋化因子,加剧炎症因子的组织损伤作用,同时 TNF- $\alpha$  可以激活肥大细胞、巨噬细胞对于 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的诱导作用,促进下游自然杀伤细胞对机体平滑肌细胞膜的破坏<sup>[9-10]</sup>;胶原纤维是皮下组织、筋膜等的细胞间的重要组成部分,压疮形成的过程中 MMP-2 可促进细胞间胶原纤维的分解。IV 型胶原是机体修复过程中的基质成分,可促进基底膜的修复, MMP-2 可分解 IV 型胶原,抑制机体的自身性修复过程,同时 MMP-2 可分解皮下组织细胞间的其他基质成分,促进组织坏死<sup>[11-12]</sup>。有研究探讨 TNF- $\alpha$  及 MMP-2 在大鼠压疮模型中蛋白水平的异常表达<sup>[9,13]</sup>,但对于胶原纤维及 IV 型胶原异常代谢的研究不足,而本研究则增加了对大鼠压疮模型中胶原纤维及 IV 型胶原含量的观察。

大鼠皮肤为复层鳞状上皮,正常的大鼠皮下组织或股薄肌细胞间的成纤维细胞数量较多,构成了细胞间的骨架结构,维持平滑肌细胞的正常形态和功能。本研究中对实验组大鼠采用不同的强度进行股薄肌的压迫造模,结果发现随着压迫强度的增加,大鼠股薄肌细胞间的成纤维细胞逐渐分解,数量减少,而细胞炎症因子的浸润逐渐加剧。TNF- $\alpha$  是缺血再灌注损伤中的重要效应分子,在发挥下游炎症因子的激活过程中具有中心性的调控作用,本研究中模型 A 组及 B 组大鼠局部组织中的 TNF- $\alpha$  蛋白表达明显上升,且模型 B 组的上升更为明显,差异具有统计学意义,提示随着压疮病情的加剧, TNF- $\alpha$  呈现出明显的高表达。TNF- $\alpha$  可通过提高抗原提呈细胞的提呈作用,加剧自然杀伤细胞的细胞毒作用。MMP-2 可分解细胞间基质成分如胶原纤维,模型 A 组及 B 组中的 MMP-2 蛋白表达依次升高,上调的 MMP-2 可以促进细胞间骨架成分的分解,促进压疮病情的进展。模型 A 组及 B 组大鼠局部组织中的胶原纤维含量下降,其中 B 组下降更为明显,而 IV 型胶原的含量也明显下降,考虑可能与 MMP-2 对相关胶原的分解有关,但本研究并未进行 MMP-2 与胶原纤维相关关系的分析,存在一定的不足。

综上所述,压疮大鼠模型中 MMP-2 及 TNF- $\alpha$  存在明显的高表达,同时胶原纤维及 IV 型胶原含量下

降,考虑可能与 MMP-2 的分解作用有关。相关炎症细胞因子的改变在促进压疮病情的进展中发挥重要的调节作用。

#### 参考文献

- [1] 林俊,李怡,陈晓燕,等. 农村地区老年压疮高危人群照顾者压疮知识的现状调查[J]. 中华老年医学杂志,2015,34(1):91-93.
- [2] Wang Y, Pu L, Li Z, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene expression and apoptosis in ischemia-reperfusion injury: a rat model of early-stage pressure ulcer[J]. Nurs Res, 2016, 65(1):35-46.
- [3] 喻皎花,汪欢,柯卉,等. 细胞因子在压疮护理中的应用研究进展[J]. 护理学杂志,2016,31(7):106-109.
- [4] Edsberg LE, Wyffels JT, Ogrin R, et al. A pilot study evaluating protein abundance in pressure ulcer fluid from people with and without spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2015, 38(4):456-467.
- [5] 李影,陈镜宇,张玲玲,等. 肿瘤坏死因子受体相关因子参与炎症免疫调节的研究进展[J]. 中国药理学通报,2015,31(9):1206-1211.
- [6] 商丹英,贾勤,李璐,等. 风险管理模式在骨科术后患者压疮护理中的应用有效性探究[J]. 中华全科医学,2015,13(4):664-666.
- [7] Thomason SS, Powell-Cope G, Peterson MJ, et al. A Multisite Quality Improvement Project to Standardize the Assessment of Pressure Ulcer Healing in Veterans with Spinal Cord Injuries/Disorders[J]. Adv Skin Wound Care, 2016, 29(6):269-276.
- [8] 李文锦,邓亮. 重组人表皮生长因子外用溶液联合重组牛碱性成纤维细胞生长因子外用溶液治疗压疮的临床疗效[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(18):1517-1519.
- [9] 王晓慧,毛挺挺,潘莹莹,等. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与基质金属蛋白酶 2 及胶原在大鼠压疮皮肤组织中的表达及意义[J]. 中华烧伤杂志,2016,32(3):160-167.
- [10] 谢浩煌,张宏宇,毛挺挺,等. 外源性重组人碱性成纤维细胞生长因子对大鼠压疮深部组织损伤后肌肉修复的作用[J]. 中华烧伤杂志,2015,31(6):439-445.
- [11] Gumieiro DN, Rafacho BP, Goncalves AF, et al. Serum metalloproteinases 2 and 9 as predictors of gait status, pressure ulcer and mortality after hip fracture[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e574524.
- [12] 马艳梅,单思,杨蕾芳,等. 压疮动物模型组织损伤的实验研究[J]. 中国实用护理杂志,2013,29(6):66-67.
- [13] 诸葛海燕,刘晓红,张悦. 老年住院患者压疮的风险评估及防治策略[J]. 中华老年医学杂志,2012,31(9):829-830.

收稿日期:2016-07-07 修回日期:2016-08-14 编辑:王宇