

微粒皮种植对糖尿病溃疡创面中 MMP-2 MMP-9 水平的影 响

戚世玲, 朱定衡, 底大可, 吉苏云, 敖 贤, 黄桃源, 何仁亮

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(编号:A2016602)

作者单位: 510700 广州, 广州医科大学附属第五医院皮肤科(戚世玲); 510091 广州, 南方医科大学皮肤病医院(朱定衡, 底大可, 吉苏云, 敖 贤, 黄桃源, 何仁亮)

作者简介: 戚世玲(1979-), 女, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 创面修复和免疫性疾病。E-mail: 372011765@qq.com

通讯作者: 何仁亮(1968-), 男, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 创面修复和皮肤外科。E-mail: zshrl2006@126.com

[摘要] **目的** 探讨微粒皮种植在治疗糖尿病溃疡过程中, 溃疡肉芽组织基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 的动态变化。**方法** 对 18 例糖尿病溃疡患者进行微粒皮种植治疗, 在治疗前和治疗后 7 d、14 d 分别采集创面肉芽组织。用酶联免疫法检测肉芽组织中 MMP-2、MMP-9 浓度, 同时观察溃疡愈合情况。**结果** 微粒皮种植治疗后 7 d、14 d 的溃疡面积在各观察时间点均较治疗前缩小($P < 0.05$); 该组肉芽组织 MMP-2 浓度逐渐下降, 在治疗后第 14 天时降至最低($P < 0.05$); MMP-9 从治疗后逐渐降低, 但各时点与治疗前相比, 差异均无统计学意义; 肉芽组织中 MMP-2 的浓度与溃疡面积大小呈正相关关系($r = 0.385, P < 0.05$)。**结论** 微粒皮种植治疗可降低糖尿病溃疡肉芽组织中 MMP 的浓度, MMP-2 的浓度可能是影响糖尿病皮肤溃疡愈合的相关因素。

[关键词] 微粒皮; 糖尿病; 溃疡; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2018)12-1206-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.12.08

Effect of microskin grafting on MMP-2 and MMP-9 levels in diabetic ulcer QI Shi-ling, ZHU Ding-heng, DI Da-ke, et al. Department of Dermatology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of microskin grafting on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 levels in diabetic ulcer. **Methods** Eighteen cases of diabetic ulcers were treated with microskin grafting. The wound granulation tissues were sampled for detection of MMP-2 and MMP-9 levels before and 7 d, 14 d after treatment using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. The areas of the ulcers were observed and measured. **Results** The area of ulceration after microskin grafting treatment was significantly reduced at each observation time point compared with that before treatment ($P < 0.05$). The concentrations of MMP-2 in the granulation tissues gradually decreased and reduced to the lowest level on the 14th day after treatment ($P < 0.05$). MMP-9 decreased gradually after treatment, but in each time point there was no significant difference in MMP-9 level compared with that before treatment. There was a positive correlation between the concentration of MMP-2 in granulation tissue and the size of ulcer ($r = 0.385, P < 0.05$). **Conclusion** Microskin grafting therapy can reduce the concentration of MMP-2 in the granulation tissues of diabetic ulcers, and the concentration of MMP-2 may be a relevant factor influencing the healing of diabetic ulcers.

[Key words] Microskin; Diabetes mellitus; Ulcer; Matrix metalloproteinase(MMP)

皮肤创面修复一直是医学界长期关注的热点和难点^[1]。微粒皮种植技术创伤小, 手术过程简单, 操作简便, 目前在临床开展较多, 在烧伤、慢性溃疡、

糖尿病性溃疡等创面的愈合中效果良好^[2,3]。但对其作用机制研究甚少。为此, 本研究通过检测糖尿病难治性皮肤溃疡在微粒皮种植治疗后不同时间点

创面肉芽组织中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9的浓度变化,探讨微粒皮移植治疗糖尿病溃疡的作用机制,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2016-07~2017-12住院的18例糖尿病溃疡患者。纳入标准^[2]:(1)符合糖尿病足溃疡诊断标准;(2)足溃疡经过常规处理后无好转或恶化;(3)Wagner分级Ⅲ~Ⅳ级以上,病程迁延,经久不愈者。排除标准:(1)近半年内急性心肌梗死发作、脑梗塞或脑出血者;(2)严重心肺肝肾疾病、恶性肿瘤、精神疾病患者;(3)不配合治疗者及临床资料不全者。所有患者均签署知情同意书,且自愿加入本研究。其中男7例,女11例;年龄56~71(58.3±15.6)岁,糖尿病病程(7.8±6.3)年,皮肤溃疡病程(46.3±48.7)d,糖化血红蛋白(9.1±3.5)%。Wagner分级Ⅲ级12例,Ⅳ级6例。患者入院后予胰岛素控制血糖,严格控制血压、血脂,同时给予抗血小板、改善微循环、营养神经、抗感染等治疗。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 鼠抗人MMP-2、MMP-9 ELISA试剂盒(Santa Cruz Biotechnology公司,美国);全波长酶标仪(Thermo Scientific,美国);BCA蛋白质定量试剂盒(Pierce公司,美国);超声匀浆器(Pro Scientific公司,美国);低温离心机(Beckman,美国)。

1.2.2 微粒皮种植术 (1)清除创面焦痂、脓痂、坏死组织后纱布覆盖创面,注意操作力度,减少对创面的刺激,尽量减少出血。(2)微粒皮制作:常规选取供皮区,消毒麻醉后,按取皮面积(创面面积=1:20~1:30的比例)取韧厚皮片,在无菌生理盐水中剪成0.1~0.2 cm大小的微粒皮。^[2](3)微粒皮种植^[2]:常规消毒创面后用眼科无齿镊将微粒皮种植于创面肉芽中,间隔0.3~0.5 cm,深度0.2~0.3 cm,无菌纱布压迫止血包扎,每天换药1次。

1.2.3 标本收集及溃疡面积测量 所有微粒皮种植治疗患者,在治疗的第0、7、14天测量溃疡面积。注意观察溃疡表面色泽、渗液量、新生肉芽组织等创面变化。换药时取创面内的肉芽组织,迅速放入-80℃冷冻保存备用。

1.2.4 疗效评价标准 创面达到上皮化即为愈合。计算创面愈合率,计算方法为(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积×100%。溃疡创面疗效评定标准分为:(1)痊愈。溃疡创面上皮化,完全愈合。(2)显效。溃疡创面愈合率≥75%,无明

显分泌物,创面肉芽组织新鲜。(3)有效。溃疡创面愈合率<75%,≥25%,分泌物减少,有新生肉芽组织,临床症状有所减轻。(4)无效。溃疡创面无明显变化或扩大,分泌物多,新生肉芽组织少,颜色暗淡。

1.2.5 组织蛋白含量和MMP-2、MMP-9测定^[4]

主要试剂与仪器为鼠抗人MMP-2、MMP-9 ELISA试剂盒(Santa Cruz Biotechnology公司,美国);全波长酶标仪(Thermo Scientific,美国);BCA蛋白质定量试剂盒(Pierce公司,美国);超声匀浆器(Pro Scientific公司,美国);低温离心机(Beckman,美国)。肉芽组织匀浆后采用酶联免疫法测定上清液中MMP-2、MMP-9浓度。具体按试剂盒说明检测,将测得的浓度除以该组织蛋白(BCA法)含量,计算每100 μg组织中MMP-2、MMP-9的含量(ng/100 μg)。

1.3 统计学方法 应用SPSS20.0统计软件对数据进行处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布计量资料经对数转换后进行分析,不同时间点的计量资料比较采用重复测量的方差分析,相关分析采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效 18例患者经上述治疗后痊愈16例,好转2例。

2.2 治疗前后各时间点溃疡面积和肉芽组织中MMP-2、MMP-9浓度比较 治疗后溃疡面积逐渐缩小,并在所测的各时间点间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后肉芽组织中MMP-2蛋白水平在治疗后第7天较治疗前下降($P < 0.05$),至治疗后第14天时下降更明显($P < 0.05$)。MMP-9浓度呈现逐渐下降的趋势,但各时间点差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 治疗前后各时间点溃疡面积和肉芽组织中MMP-2、MMP-9浓度比较($\bar{x} \pm s$)

分类	治疗前	治疗后第7天	治疗后第14天
溃疡面积(cm ²)	10.28 ± 12.35	8.15 ± 11.39*	6.17 ± 9.87**
MMP-2浓度(ng/100 μg)	5.93 ± 1.55	3.87 ± 2.29*	1.56 ± 1.39**
MMP-9浓度(ng/100 μg)	22.85 ± 14.31	20.08 ± 15.44	17.79 ± 12.11

注:与治疗前比较,* $P < 0.05$;与治疗第7天比较,** $P < 0.05$

2.3 两组溃疡肉芽组织中MMP-2、MMP-9浓度的变化及与溃疡面积的关系 肉芽组织中MMP-2的浓度

与溃疡面积大小呈正相关关系($r = 0.385, P = 0.004$)。MMP-9 的浓度变化和溃疡面积的变化无明显相关关系。

2.4 典型病例介绍 患者,男,74岁,微粒皮种植治疗前,溃疡面较多渗出液,微粒皮种植治疗后第7天,渗出较前减少,有新生肉芽组织生长,创面面积较前减少,微粒皮种植治疗后第14天,溃疡面积较前明显缩小。见图1。



种植治疗前溃疡面 种植治疗后第7天溃疡面 种植治疗后第14天溃疡面

图1 典型病例微粒皮种植前后溃疡面变化图

3 讨论

3.1 微粒皮种植操作简便,是一种可以重复进行操作的新型创面修复方法,对患者的二次损伤少,创面愈合质量好^[5],而且手术条件要求相对不高,若患者病情危重甚至可以在病房内行局麻给患者进行微粒皮种植^[6]。因为微粒皮种植技术对创面本身条件和患者身体条件要求不高,对于复杂创面的修复,特别是患者本身基础疾病较多,不能耐受传统手术的创面修复提供了一种新的修复方法和尝试,能够极大地缓解患者痛苦和降低致残率,为临床上复杂创面的修复提供了新的方法,明显提高患者的生活质量,降低了医疗成本。近年来,对微粒皮种植相关的临床治疗的报道较多^[2,7],而且不断有研究对微粒皮种植进行改进,如用重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子提高微粒皮移植成活,以及高分子生物复合膜作为微粒皮移植覆盖物促进创面愈合等新的方法,更进一步提高了微粒皮移植的临床应用效果^[8,9],但有关微粒皮种植的作用机制报道较少。

3.2 糖尿病肢体溃疡是糖尿病严重的并发症,迁延不愈,给患者造成了巨大的经济及精神压力,严重影响患者生活质量^[10]。糖尿病患者由于机体特殊的高糖环境,容易并发肢体远端溃疡。其中糖尿病足临床常见,经久难愈。糖尿病足溃疡发病由多环节参与,包括血管病变、神经病变、感染、细胞代谢异常、免疫功能紊乱、创面局部吞噬细胞、肥大细胞功

能失调等,这些变化导致创面微环境中生长因子等种类和数量平衡失调,导致创面局部组织感染、微灌注不良、组织细胞供氧障碍等^[11]。

3.3 创面愈合是包括细胞内细胞因子和生长因子等通过自分泌和旁分泌相互协调作用的复杂过程。本研究观察了微粒皮种植治疗糖尿病难治性足溃疡后,肉芽组织中 MMP-2、MMP-9 的浓度的变化情况。结果显示,治疗后 MMP-2、MMP-9 浓度逐渐降低, MMP-2 的浓度在治疗后第7天、第14天均有明显差异。肉芽组织中 MMP-2 的浓度与溃疡面积大小呈正相关关系。MMP 是一组由巨噬细胞和其他多种细胞分泌的内肽酶家族,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等,可以使细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解。ECM 的动态平衡异常与机体多种病理过程有关。研究发现糖尿病溃疡难以愈合和 ECM 的降解有关。而降解 ECM 主要依靠 MMP 的调控。MMP 在创面愈合过程中的细胞移行以及组织修复过程中发挥重要的作用。MMP-2 和 MMP-9 是作用最广、研究最多的 MMP。它们能降解变性的胶原、基质以及基底膜,在坏死组织清除过程中协助中性粒细胞和巨噬细胞消化基质^[4],其表达增高及活性增强,使慢性溃疡难以愈合。既往研究发现糖尿病慢性溃疡中 MMP 及其活性酶显著升高^[12],即使在未发生溃疡的糖尿病皮肤中也检测到 MMP-2 呈高表达^[13]。MMP-9 和糖尿病并发症的发生关系密切^[14]。也有研究^[15]发现糖尿病溃疡较非糖尿病溃疡中 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等均有不同程度的升高,并认为抑制过度的 MMP 的活性能促进慢性创面的愈合。本研究发现,随着创面的愈合, MMP 的表达逐渐下降,其中 MMP-2 下降明显。国内有研究发现大鼠进行微粒皮移植后 MMP 表达发生变化^[16],分析可能是少量的微粒皮提供了支架,新生的表皮沿着真皮的支架葡行生长,同时局部细胞的 MMP 表达变化也进一步促进胶原降解及组织间微血管生长,从而促进创面的愈合。在本研究中,虽然肉芽组织中部分基质蛋白水解酶水平的变化和创面愈合呈一定相关性,但将来仍然需要更大样本量的研究来继续证实。而且,众所周知,创面的修复过程是非常复杂的一个过程,可能还涉及其他一些 MMP、血管生成抑制素结合蛋白、感觉神经肽物质、晚期糖基化终末产物、血管内皮生长因子、一氧化氮、缺氧诱导因子等,这些都有可能在糖尿病的溃疡愈合修复过程中起着非常重要的作用^[17]。动物实验研究也发现微粒皮移植与创面血管化进程加快,细胞骨架蛋白的适度表

达,以及创面纤维连接蛋白和层粘连蛋白的升高等均可能有关^[18~20]。

综上所述,微粒皮种植治疗糖尿病足溃疡有可能与创面中 MMP 的调节有关,更多复杂的机制还需要进一步探索和明确。

参考文献

- Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5(1): a23267.
- 何仁亮,余志和,王洪生,等. 自体微粒皮种植技术配合 MEBO 治疗糖尿病皮肤慢性溃疡的临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(3): 299 - 301.
- 程鹏,何仁亮,向红辉. MEBO 联合微粒皮种植术治愈 1 例糖尿病足截肢后残端创面[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2013, 25(2): 118 - 121.
- 何利平,王椿,陈大伟,等. APG 治疗糖尿病难治性皮肤溃疡对创面肉芽组织中 MMP-1、MMP-9 及 TIMP-1 水平的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(5): 757 - 761.
- 陈铮. 自体微粒皮种植技术的临床应用及疗效分析[J]. 医学信息, 2014, (3): 350.
- 舒承清,陈伟明,邓永高,等. 微粒皮种植技术在复杂创面修复的临床应用[J]. 中外医疗, 2014, 33(20): 71 - 72.
- 何仁亮,黄桃源. 湿润烧伤膏在皮肤科的临床应用[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2015, 27(4): 294 - 299.
- 解英,冷崇燕,汪虹,等. 高分子生物复合膜作为微粒皮移植覆盖物的实验研究[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(16): 2617 - 2621.
- de Fatima RDSK, Da SP, Ferreira VT, et al. Quality of life of people with chronic ulcers[J]. J Vasc Nurs, 2016, 34(4): 131 - 136.
- 龚磊,黎涛,杨月莲,等. 前列地尔联合 VSD 负压吸引治疗糖尿病足溃疡疗效分析[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(12): 1196 - 1198.

- 常学洪,常方媛,董建凤,等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制物在糖尿病足创面愈合中作用的研究概况[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(9): 916 - 919.
- Li L, Chen D, Wang C, et al. The Effect of Autologous Platelet-Rich Gel on the Dynamic Changes of the Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Expression in the Diabetic Chronic Refractory Cutaneous Ulcers[J]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 954701.
- Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, et al. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts[J]. Br J Dermatol, 2003, 149(1): 13 - 16.
- Mishra M, Flaga J, Kowluru RA. Molecular Mechanism of Transcriptional Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 in Diabetic Retinopathy[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(8): 1709 - 1718.
- Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients[J]. Diabetologia, 2002, 45(7): 1011 - 1016.
- 张旭辉,黄勇,徐盈斌,等. 自体微粒皮与异体脱细胞微粒真皮混合移植对大鼠创面 MMP1、MMP10 表达的影响[J]. 现代预防医学, 2012, 39(10): 2527 - 2530.
- 余晓波. 糖尿病肾病的发病机制及治疗进展[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(10): 1022 - 1025.
- 张旭辉,徐盈斌,黄勇,等. 自体微粒皮与异体脱细胞微粒真皮混合移植对大鼠创面纤维连接蛋白和层粘连蛋白表达的影响[J]. 中华医学美容美容杂志, 2012, 18(4): 290 - 293.
- 黄勇,徐盈斌,张旭辉,等. 不同比例自体微粒皮与异体脱细胞微粒真皮复合移植的研究[J]. 中华实验外科志, 2011, 28(9): 1441 - 1444.
- 张旭辉,黄勇,徐盈斌,等. 自体微粒皮与异体脱细胞微粒真皮混合移植对大鼠创面细胞骨架蛋白与新生血管化的影响[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2011, 6(5): 713 - 721.

[收稿日期 2018-04-23][本文编辑 韦所苏]

《中国临床新医学》杂志诚征广告启事

《中国临床新医学》杂志为国家卫生计生委主管,由中国医师协会和广西壮族自治区人民医院共同主办的国家级医学学术性科技期刊(月刊,国内外公开发行)。本刊诚征各种药品、医疗器械、医疗耗材等宣传广告。有意者请与本刊联系。

本刊地址:广西南宁市桃源路6号广西壮族自治区人民医院内,联系电话:0771-2186013。

E-mail: zglcxyzz@163.com, 联系人:韦颖。

· 本刊编辑部 ·