

基质金属蛋白酶在慢性创面中的研究进展

何秀娟 刘青武 陈佳 马慧可 林燕 李萍

摘要 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)及其抑制剂(matrix metalloproteinase tissue inhibitors, TIMPs)失衡是慢性创面难以愈合的重要原因,是研究慢性伤口的重要靶标。以往认为抑制创面的高酶活性或促进TIMPs表达可以促进创面愈合,随着动物模型和临床研究的深入,MMPs作用表现出复杂性。本文就近年来MMPs分类、功能、动物模型和临床研究的进展进行综述。

关键词 创面修复 基质金属蛋白酶 基质金属蛋白酶抑制剂

中图分类号 R261

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.08.035

慢性创面是创面正常的愈合顺序被破坏,尽管进行了适当的治疗,但愈合过程延长。最常见的慢性创面主要有静脉或动脉溃疡,压疮或糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分,炎症期清除损伤的蛋白质和临时ECM,增殖期降解毛细血管基膜,重塑期收缩和重塑组织,参与细胞迁移和血管生成。创面的高MMPs活性及其与基质金属蛋白酶抑制剂(matrix metalloproteinase tissue inhibitors, TIMPs)失衡是导致慢性创面不易愈合的重要原因。

一、MMPs分类和功能

MMPs属于Zn²⁺依赖金属蛋白酶超家族,分为胶原酶、明胶酶、间充质溶解素类、膜型-MMPs、基质溶解素类和非定义类型^[2]。MMPs可由多种细胞分泌并在细胞膜上聚集,在静止期几乎检测不到。当创伤时MMPs被激活,对促进组织再生具有重要作用^[3]。

1. 胶原酶:包括间质胶原酶(MMP-1)、中性粒细胞胶原酶(MMP-8)、胶原酶-3(MMP-13)和MMP-18。伤口边缘的MMP-1降低了 $\alpha1\beta2$ 整合素和I型胶原之间的亲和力,从而使伤口边缘的角质形成细胞迁移来闭合创面。慢性创面中发现大量 $\alpha2$ -巨球蛋白($\alpha2M$)和MMP-1的复合物。MMP-8主要由中性粒细胞表达和储存,能有效切割I型胶

原。糖尿病足溃疡患者比非糖尿病患者的MMP-1和MMP-8水平明显升高,高蛋白酶环境导致糖尿病患者皮肤创面愈合不良。MMP-13影响角质形成细胞的迁移和血管生成,MMP-13敲除小鼠的成纤维细胞减少,创面收缩程度减轻。

2. 明胶酶:包括MMP-2(明胶酶A)和MMP-9(明胶酶B)。MMP-2和MMP-9释放血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可诱导ECM及血管生成因子的释放,促进创面肉芽组织的纤维蛋白形成。角质形成细胞、上皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞都可以产生MMP-9。MMP-9能影响角质形成细胞迁移和上皮再生。DFU患者受损皮肤中MMP-9水平高于健康人和糖尿病患者的健康皮肤,且MMP-9上调程度与定植细菌数呈正相关^[4]。难愈性糖尿病性溃疡MMP-9基因表达异常^[5]。使用siRNA技术降低糖尿病小鼠伤口MMP-9表达,可显著加速伤口愈合过程并改善新生组织的质量^[6]。使用MMP-9抑制剂局部治疗db/db糖尿病小鼠创面,可使创面愈合加速,再上皮化增多,细胞凋亡显著减少。使用壳聚糖及硫酸软骨素溶液加入I型胶原制成的基质GBT013敷料作用于糖尿病小鼠慢性伤口,能够降低MMP-9酶活性,促进糖尿病创面愈合^[7]。慢性DFU渗出物中MMP-2增高,对降解胶原蛋白和组织破坏具有显著影响^[8]。

3. 其他:MMP-3参与组织重塑,降解胶原纤维,并激活其他MMPs。MMP-14位于细胞表面,可切割细胞周围的胶原纤维。

二、TIMPs分类和功能

TIMPs能够结合并可逆性阻断MMPs活性,包括

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81774312, 81774328, 81804093);北京市自然科学基金资助项目(7212164)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医研究所

通讯作者:李萍,研究员,博士生导师,电子信箱:liping411@126.com

TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4。TIMP-1 是 MMP-9 的特异性抑制剂,可促进人成纤维细胞生长,减少细胞凋亡,主要在烧伤创缘强表达。TIMP-2 抑制所有 MMPs,主要抑制 MMP-2 前体与活性形式,在焦痂下基质中大量表达,在迁移上皮创面边缘缺乏。TIMP-3 与周围基质紧密相连,可以抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13。TIMP-2 和 TIMP-3 是 MMP-14 的抑制剂。TIMP-4 在真皮创伤中作用较小。

慢性创面表皮中 TIMP-1、TIMP-2 和 TIMP-3 的表达均降低,出现了 MMPs 与 TIMPs 的失衡。研究发现糖尿病皮肤组织和糖基化终末产物处理的人成纤维细胞中 TIMP-1 的表达均显著降低;采用 TIMP-1 载体介导基因治疗糖尿病大鼠创面后,创面愈合明显改善。采用激光照射体外培养的糖尿病患者皮肤成纤维细胞,可增加 TIMP-1 表达,减少基质降解,促进糖尿病创面愈合。

三、MMPs 在创面愈合中的研究进展

MMP-1、MMP-8、MMP-13、MMP-14、MMP-2 和 MMP-9 在急性创伤皮肤再上皮化和消除瘢痕组织的作用已经被报道。目前,大多数 MMPs 基因敲除的小鼠研究涉及伤口的急性炎症,并不能说明 MMPs 对慢性皮肤创面的作用。例如,MMP-3^{-/-}动物发生皮肤接触性超敏反应受损,MMP-9^{-/-}小鼠皮肤炎症细胞浸润减少和清除细菌效率降低。MMP-9 已知是维持慢性皮肤伤口的因素,因此是有害的,然而其在急性炎症中发挥促血管生成作用,甚至可能是有益的。这说明对于愈合迟缓性皮肤伤口,MMPs 的作用取决于疾病或治疗阶段。

MMPs 以无活性的酶原形式生成,受到 TIMPs 和 $\alpha 2$ -巨球蛋白的严格控制。大多数 MMPs 在皮肤中如何被激活,以及是否有活性都是未知的。随着 MMPs 活性形式的研究深入,如果能开发出一种专门结合活性 MMPs 的阻断剂结合树脂,就可以在慢性伤口愈合领域取得突破性进展。MMP-9 在糖尿病创面中表达上调,可作为糖尿病创面的标志物。在糖尿病患者和非糖尿病患者的伤口中均检测到 MMP-8。此外,抑制 MMP-9 和给予外源性 MMP-8 治疗可加速糖尿病小鼠伤口愈合。MMP-8 和 MMP-9 抑制剂的联合治疗产生了叠加结果,表明基于药理学抑制 MMPs 和外源酶替代的新疗法是可行的^[9,10]。目前迫切需要对静脉功能不全和压疮引起的慢性伤口的类似研究。MMPs 的广泛分析,酶活性测试和扎实

的临床工作将明确有害的和有益的 MMPs,然后选择最佳的选择性 MMPs 抑制剂和理想的重组酶联合治疗特定的慢性伤口^[11]。

一项把静脉性腿部溃疡患者创面渗出液中 9 种 MMPs 和 4 种人 TIMPs 水平进行比较的研究表明,肉芽创面渗出液中 MMP-1 和 MMP-13 的水平高于炎症创面,而炎症创面渗出液中 MMP-2、MMP-9 和 MMP-12 的含量显著高于肉芽创面^[12]。在炎症创面渗出液中 TIMP-1 和 TIMP-2 水平较高,而在肉芽创面渗出液中 TIMP-4 水平较高。当人骨髓单核细胞 THP-1 细胞被创面渗出液刺激时,MMP-1、MMP-8 和 MMP-9 水平在接触炎症创面渗出物后升高,而 MMP-3、MMP-7、MMP-12 和 MMP-13 水平用肉芽创面分泌物刺激时升高。舒洛地希是一种治疗静脉性腿部溃疡的糖胺聚糖(glycosaminoglycans, GAGs),其在体外使肉芽创面渗出液刺激的 THP-1 细胞 MMP-2 水平升高,MMP-7 水平降低,并使炎症创面渗出液刺激的 THP-1 细胞 MMP-8 水平显著降低。上述结果阐明了 MMPs 水平的阶段特异性差异,提供了一种针对不同疾病状态获取生化标志物的筛选方法和标准,以客观的方式评估临床治疗效果,但是尚不能确定这些分子是难愈合性静脉创面的原因还是结果。由于没有理想的慢性静脉溃疡的动物模型,这些分子和治疗方案尚未在体内进行研究。

另一项研究发现,各种形式的 MMP-9 在压疮患者创面表达上调^[13]。对 MMP-9 基因启动子(-1562 C->T)单核苷酸多态性的研究发现,T 等位基因表达较高。一项由 22 例 DFU 患者参加的研究显示,第 0、12 周“愈合良好者”MMP-1 水平显著高于“愈合不良者”;MMP-9 水平显著低于“愈合不良者”。研究通过分析 MMP-9 水平,MMP-1/TIMP-1 和 MMP-9/TIMP-1 比率,提出了一种“不良治愈评分系统”,其可以在患者入院时确定,有可能在临床上用作治愈的预测因子,从而采取适当的治疗计划^[14]。

一项研究把静脉性腿部溃疡(VLU)患者、2 型糖尿病神经病变足溃疡(DFU)患者和 VLU 患者的自体皮肤移植后供体部位(作为愈合对照伤口)比较,3 组伤口液体没有 MMP-9 水平的差异;两个慢性伤口组 TIMP-1 水平显著降低,导致 MMP-9/TIMP-1 比率严重不平衡;2 型糖尿病患者血清中 MMP-9 水平较高,因此研究认为阻断 MMP-9 高酶活性并不一定

使慢性创面恢复正常^[15]。

MMPs(包括 MMP-9)是重要的免疫调节剂。局部使用蛋白酶(如胶原酶)及其抑制剂可模拟正常伤口愈合的过程,这种局部皮肤治疗可能没有全身不良反应。第2种免疫调节方法是局部应用 MMPs 诱导剂,例如原则上可以通过促炎 IL-1 诱导表达内源性胶原酶,但如果循环中 IL-1 水平轻微升高,则可能诱发全身急性反应和发热。此外,一种更合适的方法可能是使用趋化因子,如人体内主要的中性粒细胞趋化剂 IL-8,IL-8 与 GAGs 局部结合,并招募和激活中性粒细胞,产生 MMP-8 和所有形式的 MMP-9^[16]。

以蛋白酶抑制剂为基础的策略来改善慢性伤口。慢性创伤微环境 MMPs 和 TIMPs 失衡导致外源性生长因子的降解。因此,解决这个问题的一种方法是提供蛋白酶抑制剂。例如,ND-336 可选择性地抑制 MMP-2、MMP-9 和 MMP-14,可通过减少炎症反应、增强上皮再生和增加血管生成来加速糖尿病小鼠的伤口闭合。在伤口敷料中加入蛋白酶抑制剂也已被探索。例如,将胶原蛋白和氧化再生纤维素基质结合到伤口敷料中,可以通过与 MMPs 结合和钝化来改善伤口修复。银敷料和水凝胶是抗菌的,在猪模型和临床试验中也显示出了有前景的结果^[17]。此外,银通过取代 MMPs 中的锌使蛋白酶失活,从而加速肉芽组织的形成。

慢性伤口 MMPs 的水平增加导致病理性基质降解。因此需要功能性生物材料来恢复 MMPs 和 TIMPs 之间的平衡以促进伤口愈合。硫酸化糖胺聚糖 GAG 衍生物具有抗炎和免疫调节作用,天然 GAG 与 TIMP-3 相互作用,前者是功能化生物材料中有希望的候选者。通过结合实验和分子建模方法鉴定了 TIMP-3 的 GAG 结合位点,并揭示 GAG 衍生物比天然 GAG 具有更高的螯合 TIMP-3 的能力,而且不改变其对 MMPs 的抑制潜力。因此,含有 GAG 衍生物的生物材料可以保护组织免于过度的蛋白水解降解,通过重建 MMPs/TIMPs 平衡来治疗慢性伤口^[18]。

四、展望

MMPs 和细胞因子一样,可以成为治疗常见慢性伤口的有效药物或药物靶点。现有的技术可以确定在伤口愈合的不同阶段的目标蛋白酶。例如,MMP-9 在炎症早期是有益的中性粒细胞源性分子,但一旦形成肉芽组织,它就成为慢性伤口的有害和维持因素。到目前为止,直接促血管生成的治疗方法都失败了,但在动物模型研究中,局部蛋白酶和蛋白酶

抑制剂治疗可促使糖尿病创面更快愈合。用促炎性细胞因子和趋化因子替代治疗可能有助于将张力性肉芽肿性皮肤创面转变为富含血管的炎性组织,这是外科清创术的一种补充方式。现今的技术,例如转录组和蛋白质组学,用于描述正常和异常的伤口愈合,并且对于动物模型,可以针对有用的免疫调节剂和靶标。因此,跨学科研究的结合,以及用基础、临床前和临床分子免疫学的专门研究取代病例报告,将改变慢性伤口愈合领域的发展。最后,免疫调节疗法的临床转化取决于改进给药方法的发展^[19]。然而,许多已经进入临床试验的疗法未起到预期效果,因为目前的给药方法依赖于超生理的大剂量,而不是可控的、持续的释放。因此,新的传递系统对于目前正在探索和将来将要探索的治疗方法的成功转化至关重要。

参考文献

- 何秀娟,张金超,刘青武,等.免疫细胞调控创面愈合的研究进展[J].医学研究杂志,2019,48(9):13-16
- 冯洁,农晓琳.基质金属蛋白酶及其抑制剂在糖尿病皮肤创面愈合中作用的研究进展[J].山东医药,2018,58(38):106-109
- 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 G, Zou X, Zhu Y, et al. Expression and influence of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and vascular endothelial growth factor in diabetic foot ulcers[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2017, 16(1): 6-13
- Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 gene in wounds of type 2 diabetes mellitus cases with susceptible -1562C>T genotypes and wound severity [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2014, 13(2): 94-102
- Li N, Luo HC, Ren M, et al. Efficiency and safety of beta-CD-(D3)7 as siRNA carrier for decreasing matrix metalloproteinase-9 expression and improving wound healing in diabetic rats[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(20): 17417-17426
- Guillemin Y, Le Broc D, Segalen C, et al. Efficacy of a collagen-based dressing in an animal model of delayed wound healing[J]. J Wound Care, 2016, 25(7): 406-413
- Krisp C, Jacobsen F, McKay MJ, et al. Proteome analysis reveals antiangiogenic environments in chronic wounds of diabetes mellitus type 2 patients[J]. Proteomics, 2013, 13(17): 2670-2681
- Gao M, Nguyen TT, Suckow MA, et al. Acceleration of diabetic wound healing using a novel protease-anti-protease combination therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(49): 15226-15231
- Meisel JE, Chang M. Selective small-molecule inhibitors as chemical tools to define the roles of matrix metalloproteinases in disease[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(11): 2001-2014

(下转第161页)

2018, 38(6): 401-406

11 Sameh M, Raida BS, Yosra C, *et al.* Renal amyloidosis complicating adult onset Still's disease: about three cases [J]. *Pan Afr Med J*, 2019, 32: 158

12 Bernabei L, Waxman A, Caponetti G, *et al.* AA Amyloidosis associated with Castleman disease: a case report and review of the literature [J]. *Medicine: Baltimore*, 2020, 99(6): e18978

13 Zuckerman JE, Peng F, Karl BE, *et al.* Cancer-associated AA amyloidosis presenting as crescentic glomerulo-nephritis [J]. *Kidney Int Rep*, 2019, 4(6): 882-887

14 Verine J, Mourad N, Desseaux K, *et al.* Clinical and histological characteristics of renal AA amyloidosis: a retrospective study of 68 cases with a special interest to amyloid-associated inflammatory response [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(12): 1798-1809

15 Mhamedi SA, Meghraoui H, Benabdelhak M, *et al.* La ponction biopsie rénale: indications, complications et résultats [J]. *Pan Afr Med J*, 2018, 31: 44

16 Matsuura M, Abe H, Tominaga T, *et al.* A novel method of DAPI staining for differential diagnosis of renal amyloidosis [J]. *J Med Invest*, 2017, 64(34): 217-221

17 Casadonte R, Kriegsmann M, Deininger SO, *et al.* Imaging mass spectrometry analysis of renal amyloidosis biopsies reveals protein localization with amyloid deposits [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(18): 5323-5331

18 Heybeli C, Yildiz S, Oktan MA, *et al.* Long-term outcomes of patients with amyloidosis following kidney transplant [J]. *Exp Clin Transplant*, 2019, Epub ahead of print

19 Santaş H, Sendogan DO, Kumru G, *et al.* Long-term results of kidney transplantation in patients with familial Mediterranean fever and

amyloidosis [J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(7): 2289-2291

20 Okuda Y. AA amyloidosis - Benefits and prospects of IL-6 inhibitors [J]. *Mod Rheumatol*, 2019, 29(2): 268-274

21 Yamada Y, Ueno T, Irifuku T, *et al.* Tocilizumab histologically improved AA renal amyloidosis in a patient with multicentric Castleman disease: a case report [J]. *Clin Nephrol*, 2018, 90(3): 232-236

22 Sendogan DO, Saritas H, Kumru G, *et al.* Outcomes of canakinumab treatment in recipients of kidney transplant with familial Mediterranean fever: a case series [J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(7): 2292-2294

23 Yildirim T, Yilmaz R, Uzerk Kibar M, *et al.* Canakinumab treatment in renal transplant recipients with familial Mediterranean fever [J]. *J Nephrol*, 2018, 31(3): 453-455

24 Fernández-Nebro A, Olivé A, Castro MC, *et al.* Long-term TNF-alpha blockade in patients with amyloid A amyloidosis complicating rheumatic diseases [J]. *Am J Med*, 2010, 123(5): 454-461

25 Gottenberg JE, Merle-Vincent F, Bentaberry F, *et al.* Anti-tumor necrosis factor alpha therapy in fifteen patients with AA amyloidosis secondary to inflammatory arthritides: a followup report of tolerance and efficacy [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(7): 2019-2024

26 Kuroda T, Wada Y, Kobayashi D, *et al.* Effective anti-TNF-alpha therapy can induce rapid resolution and sustained decrease of gastroduodenal mucosal amyloid deposits in reactive amyloidosis associated with rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2009, 36(11): 2409-2415

(收稿日期: 2020-10-13)

(修回日期: 2021-03-23)

(上接第157页)

11 Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(12): 904-927

12 Ligi D, Mosti G, Croce L, *et al.* Chronic venous disease - Part II: proteolytic biomarkers in wound healing [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 1900-1908

13 Latifa K, Sondess S, Hajer G, *et al.* Evaluation of physiological risk factors, oxidant-antioxidant imbalance, proteolytic and genetic variations of matrix metalloproteinase-9 in patients with pressure ulcer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29371

14 Luanraksa S, Jindatanmanusan P, Boonsiri T, *et al.* An MMP/TIMP ratio scoring system as a potential predictive marker of diabetic foot ulcer healing [J]. *J Wound Care*, 2018, 27(12): 849-855

15 Trostrup H, Holstein P, Karlsmark T, *et al.* Uncontrolled gelatin degradation in non-healing chronic wounds [J]. *J Wound Care*, 2018, 27(11): 724-734

16 Opdenakker G, Van Damme J, Vranckx JJ. Immunomodulation as rescue for chronic atonic skin wounds [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(4): 341-354

17 Forlee M, Rossington A, Searle R. A prospective, open, multicentre study to evaluate a new gelling fibre dressing containing silver in the management of venous leg ulcers [J]. *Int Wound J*, 2014, 11(4): 438-445

18 Rother S, Samsonov SA, Hofmann T, *et al.* Structural and functional insights into the interaction of sulfated glycosaminoglycans with tissue inhibitor of metalloproteinase-3 - A possible regulatory role on extracellular matrix homeostasis [J]. *Acta Biomater*, 2016, 45: 143-154

19 Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, *et al.* Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets [J]. *Adv Wound Care: New Rochelle*, 2018, 7(7): 209-231

(收稿日期: 2021-02-05)

(修回日期: 2021-03-18)