

· 临床研究 ·

烧伤湿性医疗技术对鼻黏膜基质金属蛋白酶9 和嗜酸性粒细胞表达的影响

应民政¹, 刘崇梅², 刘理¹, 杨柏球¹, 易敏³, 简敦炳¹, 游舟¹, 陈艳¹, 王婕²

(湖南省岳阳市第二人民医院 1. 耳鼻咽喉头颈外科; 2. 病理科; 3. 检验科, 湖南 岳阳 414000)

摘要: **目的** 通过检测基质金属蛋白酶9 (matrix metalloproteinases, MMP-9) 和嗜酸性粒细胞 (eosinophil, EOS) 在鼻腔黏膜的表达水平, 探讨烧伤湿性医疗技术 (MEBT/MEBO) 对慢性鼻窦炎鼻息肉患者鼻内镜术后疗效的影响。**方法** 对45例接受鼻内镜手术治疗的慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者, 随机分为实验组 (24例) 和对照组 (21例)。实验组为 MEBT/MEBO 组, 对照组为空白组, 分别应用免疫组织化学和苏木精-伊红染色方法检测慢性鼻窦炎鼻息肉患者术后2周术腔黏膜组织中的 MMP-9 和 EOS 的表达。**结果** 对照组术腔黏膜组织中 EOS 的表达水平显著高于实验组, MMP-9 免疫阳性细胞数及着色强度均高于实验组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 烧伤湿性医疗技术 (MEBT/MEBO) 应用于慢性鼻窦炎鼻息肉患者鼻内镜术后创面处理, 能够明显加速术腔上皮化, 可能与通过抑制 MMP-9 降低 EOS 在鼻黏膜局部的浸润有关。

关键词: 烧伤湿性; 鼻内镜术; 基质金属蛋白酶9; 嗜酸性粒细胞

中图分类号: R765.25

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)05-0362-04

Effect of MEBT/MEBO on the expression of MMP-9 and eosinophil in mucosa wounds after endoscopic sinus surgery

YANG Min-zheng, LIU Chong-mei, LIU Li, et al.

(Department of Otolaryngology, the Second People's Hospital of Yueyang City, Yueyang 414000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of MEBT/MEBO on the healing of mucosa wounds after endoscopic sinus surgery through detecting expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and eosinophil (EOS). **Methods** 45 cases with chronic sinusitis receiving endoscopic sinus surgery were randomly divided into two groups, MEBT and vaseline gauze were applied to the surgical mucosa wounds in the experimental group ($n = 24$) and the control group ($n = 21$) respectively. The expression of MMP-9 and EOS in both groups was detected with immunohistochemical method and HE staining respectively 2 weeks after surgery. **Results** The HE staining showed that the EOS number of the control group was higher than that of the experimental group while the immunohistochemical detection showed that the number and intensity of MMP-9 positively stained cells in the experimental group were higher than those in the control group. The differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Application of MEBT to the surgical wounds after endoscopic sinus surgery can promote the epithelization process in the mucosa wounds through a possible mechanism of inhibiting the expression of MMP-9 and reducing the number of EOS in the mucosa.

Key words: MEBT/MEBO; Endoscopy; sinus; Matrix metalloproteinase 9; Eosinophil

基金项目: 岳阳市科技局科技计划项目 (岳市科发[2006]22)。

作者简介: 应民政, 男, 主任医师。

通讯作者: 刘崇梅, Email: zy2001lcm@yahoo.com.cn.

烧伤湿性医疗技术 (MEBT/MEBO) 由
烧伤湿润暴露疗法 (MEBT) 和湿润烧伤膏

(MEBO)构成,是一种成熟的烧伤医疗技术,应用于慢性鼻窦炎鼻息肉患者鼻内镜术后创面处理,能够使术腔的上皮化时间缩短一半^[1]。目前认为嗜酸性粒细胞(eosinophil, EOS)在局部的渗出和聚集对鼻息肉的发生和发展起了重大作用。鼻息肉中表达上调的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可能参与了鼻息肉的结构重塑,也可能通过降解基底膜的IV型胶原促进EOS向固有层的聚集^[2]。笔者通过对24例接受鼻内镜手术的慢性鼻窦炎鼻息肉患者应用MEBT/MEBO处理术后创面,采用病例对照和免疫组化方法检测MMP-9和EOS在术后黏膜中的表达,以探讨MEBT/MEBO对鼻内镜术后创面的影响和可能存在的联系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2008年1月~2009年1月,在岳阳市二医院住院的慢性鼻窦炎鼻息肉患者45例,随机分成实验组(24例)和对照组(21例)。其中男32例,女13例;年龄为17.6~60.3岁,平均39.2岁;病程3~30年。按海口标准(1997)所选病例均为II型,其中实验组II型2期15例,II型3期9例;对照组II型2期14例,II型3期7例,两组的分型分期无显著性差异。所选病例均无变应性鼻炎的相关症状,此前均未接受过鼻腔鼻窦手术。本次手术根据每个患者的病变程度及CT扫描所提供的资料,均在鼻内镜下实施常规的鼻息肉切除及鼻窦开放术。

1.2 治疗与取材

手术后按常规方式,术后实验组和对照组分别填以浸有MEBO烧伤湿润膏和凡士林的纱条,48 h后一次性完全抽出。实验组抽出纱条后立即将鼻内创面涂以MEBO烧伤湿润膏,方法采用将MEBO湿润烧伤膏挤入注射器内,通过磨平了头部的16号长针头在鼻内镜下进行。以后每天用吸引器轻轻清理鼻腔后换药1次,涂药时尽可能使MEBO覆盖整个创面,主要是中鼻道和开放的筛窦,连续6 d,出院后改为每周1次,连续3个月,中途确认已经上皮化后可适当减

少随访次数;对照组方法基本相同,只是未涂抹MEBO烧伤湿润膏。两组患者抽出纱条后每天均以辅舒良喷鼻2次,抗菌素采用头孢呋辛静脉给药1次,连续6 d。出院后仅以辅舒良喷鼻每日1次,至上皮化为止。

术中取息肉组织送检1次,术后2周经清理鼻腔后取上颌窦开口后壁处的黏膜组织(注意避开水肿组织)再送检1次。送检组织标本均在4%甲醛加PBS缓冲液中固定,制成石蜡块包埋标本保存。

1.3 试剂与方法

鼠抗人单克隆抗体MMP-9抗体为即用型,S-P试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥公司。术中获取鼻息肉组织用10%甲醛固定,后行石蜡包埋,连续切片,制成4 μm 厚的切片,常规苏木精-伊红染色。采用免疫组织化学S-P法检测MMP-9,具体操作按试剂盒说明书进行,切片常规脱蜡至水,PH7.4 PBS冲洗(3 min $\times$ 3),加入0.01 mol/L柠檬酸缓冲液置高温高压修复抗原,再滴加3%过氧化氢阻断室温下孵育10 min, PBS冲洗(3 min $\times$ 3),用兔血清于37℃封闭30 min,滴加50 μl 一抗MMP-9,4℃湿盒孵育过夜, PBS冲洗(3 min $\times$ 3)。加生物素标记的二抗37℃湿盒孵育20 min, PBS冲洗(3 min $\times$ 3),加SP工作液37℃孵育20 min后, DAB显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片。已知阳性的肝组织切片作为阳性对照,以PBS液替代一抗作阴性对照。

1.4 结果评估

1.4.1 EOS计数 常规苏木精-伊红染色。在显微镜下EOS以细胞核呈分叶双核、细胞质丰富为特征。目镜安装细胞计数网格后,20倍物镜下计数5个视野的黏膜下固有层的EOS,取平均值作为EOS的浸润数目。随机选择5个高倍($\times 400$)视野数EOS,取平均值代表该样本EOS个数^[3]。

1.4.2 免疫组织化学MMP-9阳性评估 以胞浆出现棕黄染色为阳性细胞,应用图像分析软件(Image Pro Plus 6.0)测定阳性表达,对每一张免疫组化切片在20倍下随机选取10个视野,每张切片上、下、左、右、中各取2个视野,对视野内的所有细胞测定灰

度值，染色越深灰度值越小，表明阳性越强。结果以灰度值大小表示，取其平均值^[2]。

1.5 统计处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，所得数据用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理。组间比较采用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果

光镜下见息肉组织中上皮层及间质中以 EOS、中性粒细胞浸润为主，另外还有淋巴细胞及浆细胞等(图 1)。在高倍镜下术后实验组与对照组中 EOS 计数分析比较差异有统计学意义(*P* < 0.05, 表 1)。

2.2 MMP-9 在两组术后表达的比较

MMP-9 主要在上皮细胞、炎症细胞以及腺上皮细胞表达(图 2 ~ 4)，均定位于细胞质。实验组中术后 MMP-9 呈弱阳性表达(灰度值为 147.28 ± 5.20)，而对照组组织中 MMP-9 的表达增强，两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05, 表 1)。

表 1 两组术前术后 MMP-9 图像灰度值及 EOS 计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	MMP-9 图像灰度值		EOS 细胞数/HP	
		术前	术后 2 周	术前	术后 2 周
实验组	24	137.05 ± 6.25	147.28 ± 5.20 *	12.90 ± 3.18	10.06 ± 4.21 **
对照组	21	136.56 ± 4.23	143.53 ± 4.36	12.76 ± 4.49	11.86 ± 3.15

注: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.05

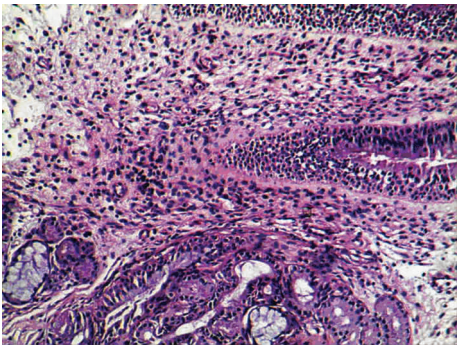


图 1 术前鼻息肉上皮及间质 EOS 浸润 (HE 染色, × 400)

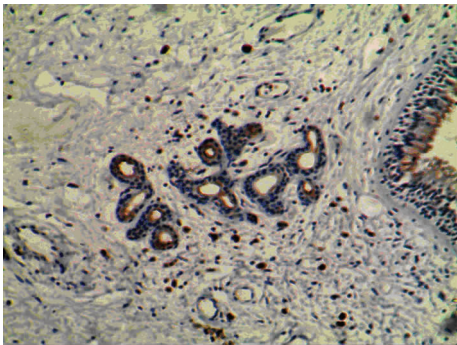


图 2 术后实验组鼻黏膜组织中 MMP-9 表达 (SP 染色, × 200)

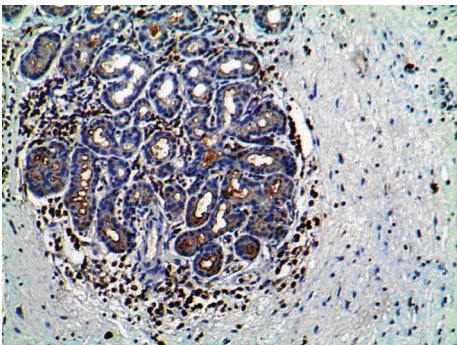


图 3 术后对照组鼻黏膜组织中 MMP-9 表达 (SP 染色, × 200)

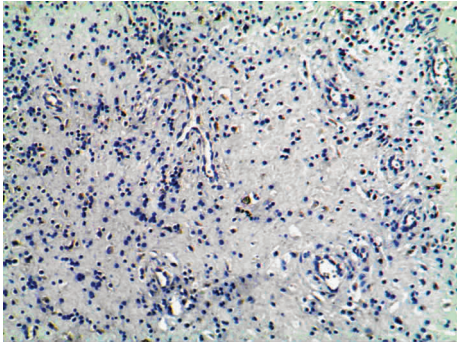


图 4 MMP-9 阴性对照 (SP 染色, × 200)

3 讨论

慢性鼻窦炎鼻息肉是临床上常见的鼻黏膜慢性炎症性疾病,具有迁延不愈、反复发作的特点。鼻息肉组织的病理学特征之一是间质中有大量EOS浸润。Tryka等^[4]认为鼻息肉中EOS的浸润程度与其上皮增殖有关,EOS较多的鼻息肉中上皮增殖更活跃。所以了解EOS的浸润、激活和生存调节以及它们对鼻息肉形成和生长的影响,是研究鼻息肉发病机制的关键所在。文献报道通过免疫组化染色发现,77%的鼻息肉中有中到大量的EOS浸润,且几乎所有的EOS都是活化的EOS。EOS是一种具有潜在损害的细胞,不仅作为炎性介质、释放多种细胞因子和炎性介质,导致血管通透性增高,血浆渗出、组织水肿及张力增高,逐渐形成鼻息肉^[5]。鼻息肉患者术后鼻腔鼻窦黏膜长期慢性刺激,大量嗜酸性粒细胞浸润,从而提高嗜酸性粒细胞的生存和激活,促进嗜酸性粒细胞毒性作用,以致损伤上皮细胞黏膜固有层,黏膜固有层疝出导致息肉再次形成。因此,鼻息肉术后一段时间内术腔黏膜组织中EOS浸润的程度是术后转归的重要因素之一。此外,亦有研究表明MMP-9与EOS在鼻息肉的表达显著相关,也与鼻息肉的复发显著相关,提示MMP-9可能通过使鼻黏膜膜局部EOS的聚集增加,参与了鼻息肉的复发,MMP-9可作为鼻息肉复发的危险因素之一^[6-8]。

目前,MEBO的应用已提升为烧伤湿性医疗技术(MEBT/MEBO)技术和再生医疗技术,其实质是让烧伤组织立体式暴露于生理的湿润环境中^[3]。王天生等^[9]将MEBO应用于鼻内镜术后,报道的效果可归纳为:减轻疼痛,减少出血,主动引流鼻腔内的污物,预防粘连,抗炎、抗感染,缩短黏膜上皮化的时间。作者认为按照湿性烧伤医疗技术(MEBT/MEBO)的要求处理伤口,效果会更好。从本文的结果可以看出,实验组与对照

组中EOS计数分析比较,差异有统计学意义,对照组鼻黏膜组织中MMP-9的表达显著高于实验组,这些结果提示:MEBT/MEBO可能与通过抑制MMP-9从而影响术腔EOS炎症的发展和细胞因子的表达有关。

总之,鼻内镜术后的特殊环境有利于炎症反应的发生与发展,随着鼻腔黏膜细胞EOS的聚集和MMP-9表达的增高,愈合的时间可能会延长,复发可能性亦随之加大。临床上应该重视这段时间的治疗,使用湿性烧伤医疗技术(MEBT/MEBO)能够获得较为满意的效果。

参考文献:

- [1] 应民政,刘崇梅,向继斌,等. 烧伤湿性医疗技术在鼻内镜术后的临床应用[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2010,16(6):456-458.
- [2] 陈江波,王天生,孙虹. 基质金属蛋白酶-9和嗜酸粒细胞在鼻息肉组织的表达及其对预后的影响[J]. 临床耳鼻喉咽喉头颈外科杂志,2009,23(18):840-843.
- [3] 巴罗,杜进涛,刘亚峰,等. 鼻息肉及变应性鼻炎中IL-17表达与嗜酸粒细胞浸润的意义[J]. 临床耳鼻喉咽喉头颈外科杂志,2010,24(2):53-56.
- [4] Tryka E, Skomra D, Klatka J, et al. Epithelial cell proliferation in nasal polyps[J]. Otolaryngol Pol, 2005, 59(4):523-526.
- [5] 闫舒,李娜,杨艳华,等. 鼻息肉的组织病理学特征及其发病机制[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(1):52-54,98.
- [6] 王天生,孙虹,陈江波,等. 鼻息肉中MMP-9和NF- κ B的表达研究[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志,2004,10(2):80-82.
- [7] 陆翔,刘争,崔永华. 转化生长因子 β 1和基质金属蛋白酶及其组织抑制物在慢性鼻窦炎和鼻息肉组织中的差异性表达[J]. 临床耳鼻喉咽喉科杂志,2005,19(14):633-635.
- [8] 庄夏衍,王挥戈. 鼻息肉组织中各种浸润细胞的意义及相互间的作用[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2010,24(2):46-48.
- [9] 王天生,孙虹,贺广湘,等. 湿润烧伤膏在鼻内镜术后应用的临床研究[J]. 中国内镜杂志,2004,10(2):50-56.

(修回日期:2011-04-29)