

结膜瓣覆盖治疗角膜碱烧伤中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达

宋东宇^{1,2}, 高明宏¹, 徐旭¹, 于静¹, 禹海¹, 陈颖新¹, 张晓光¹

基金项目: 中国辽宁省自然科学基金资助项目 (No. 20102252)
作者单位: ¹(110016) 中国辽宁省沈阳市, 沈阳军区总医院眼科; ²(122000) 中国辽宁省朝阳市, 朝阳市中心医院眼科
作者简介: 宋东宇, 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病与白内障。
通讯作者: 高明宏, 男, 医学博士, 主任医师, 主任, 全军角膜病学组副组长, 沈阳军区眼科专业委员会主任委员, 辽宁省及沈阳市眼科专业委员会副主任委员, 研究方向: 角膜病、白内障。
song1567eye@163.com
收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-10-23

Expression of MMP-9 and TIMP-1 in alkali-burned cornea of conjunctival flap covering

Dong-Yu Song^{1,2}, Ming-Hong Gao¹, Xu Xu¹, Jing Yu¹, Hai Yu¹, Ying-Xin Chen¹, Xiao-Guang Zhang¹

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 20102252)
¹Department of Ophthalmology, the General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China;
²Department of Ophthalmology, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang 122000, Liaoning Province, China
Correspondence to: Ming-Hong Gao. Department of Ophthalmology, the General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. song1567eye@163.com
Received: 2012-08-13 Accepted: 2012-10-23

Abstract

• **AIM:** To study the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) after conjunctival flap covering in alkali-burned cornea.
• **METHODS:** Rabbit cornea alkali-burns model was made, then 50 rabbits were randomly divided into experimental group ($n=25$) and control group ($n=25$). At the same time the surgery of conjunctival flap covering was given to rabbits of the experimental group. The condition developing of alkali-burned cornea was observed by slit-lamp biomicroscopy, photography in two groups, and the expression of MMP-9 and TIMP-1 was identified by immunohistochemistry in different period.
• **RESULTS:** Expression of MMP-9 increased on the 3rd day, shown a peak on the 14th day, and then decreased gradually. TIMP-1 expressed in the early phrase, and later, the level decreased on 7th day. TIMP-1 level reached the lowest level on 14th day, then increased and

shown a peak on the 21st day. MMP-9 level of the experimental group was significantly lower than that of the control group (the 3rd, 14th, 21st, and 28th day), while TIMP-1 level (the 3rd, 14th and 21st day) was higher ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** During the wound healing process, alkali-burned cornea has close relation with the expression of MMP-9 and TIMP-1. The treatment of conjunctival flap covering for the severe alkali-burned cornea was found to have good effect.

• **KEYWORDS:** conjunctival flap; alkali-burned cornea; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor metalloproteinase-1

Citation: Song DY, Gao MH, Xu X, et al. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in alkali-burned cornea of conjunctival flap covering. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(11):2062-2065

摘要

目的: 研究结膜瓣覆盖术治疗兔角膜碱烧伤中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 的表达机制。

方法: 将 50 只兔随机分成实验组及对照组, 每组分别 25 只, 建立兔角膜烧伤模型。实验组在角膜烧伤后当天行结膜瓣覆盖术。采用免疫组化法测定两组角膜碱烧伤后不同时间点 MMP-9 和 TIMP-1 的表达。

结果: MMP-9 在角膜碱烧伤后的 3d 开始升高, 14d 达到最高, 之后逐渐下降; 而 TIMP-1 在伤后即有表达, 7d 有所下降, 于 14d 达到最低, 21d 达到峰值。实验组 MMP-9 的表达均明显低于对照组, 且角膜碱烧伤后的 3, 14, 21d 和 28d 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 而 TIMP-1 则明显高于对照组, 且角膜碱烧伤后 3, 14d 和 21d 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

结论: 角膜碱烧伤的病理损伤及修复过程中, MMP-9 及 TIMP-1 的表达密切相关。结膜瓣覆盖治疗重度角膜碱烧伤的疗效确切。

关键词: 结膜瓣; 角膜碱烧伤; 基质金属蛋白酶-9; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.05

引用: 宋东宇, 高明宏, 徐旭, 等. 结膜瓣覆盖治疗角膜碱烧伤中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达. 国际眼科杂志 2012; 12(11): 2062-2065

0 引言

角膜碱烧伤是临床上较常见的化学性眼外伤, 由于碱具有水溶性和脂溶性, 易于破坏深层组织而造成持久

性损伤,故而是病理变化复杂且较难治愈的眼病之一。角膜病理损伤过程中发生了复杂的炎症反应,众多细胞因子、酶类参与,其中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及其抑制剂组织型基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor metalloproteinase-1, TIMP-1)在损伤中发挥了关键作用。角膜碱烧伤的机制复杂,治疗方法众多,而在重度角膜碱烧伤的治疗中结膜瓣覆盖是一种临床常用的术式,能够保全眼内结构,为眼表结构的重建和视功能的恢复提供治疗基础。本研究通过动物实验,探究基质金属蛋白酶及其抑制剂是否在结膜瓣覆盖治疗角膜碱烧伤的损伤修复过程中发挥关键作用,从而为临床治疗重度角膜碱烧伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康日本大耳白兔 50 只(沈阳军区总医院动物实验中心提供),雌雄兼用,体质量 2.0~2.5kg,均以左眼作为实验眼,实验前裂隙灯显微镜检查眼部无异常。主要试剂:鼠抗兔 MMP-9 多克隆抗体购自 Abcam (Hong Kong);鼠抗兔 TIMP-1 多克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒、辣根酶标记山羊抗兔 IgG,均购自北京博奥森生物公司;硝酸纤维素滤纸购于武汉博士德公司;其余均为国产分析纯试剂。主要仪器:眼科显微手术器械、手术显微镜(150,DE)、裂隙灯显微镜(SLM-2ER 型)、生物显微镜(NIKON,日本)、水浴箱(1202CE 型)、超低温冰箱(MDF-283E 型)、精密旋转切片机(LEIC,德国)、振荡器(THZ-82 型,中国太仓市)、漂烘处理器(ZMN-6802,德国)、彩色图像分析仪(Image8000,澳大利亚)、Olympus 显微镜。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜碱烧伤模型的建立 20g/L 爱尔卡因滴眼液于兔左眼行表面麻醉,置开睑器,将在 1mol/L NaOH 溶液中浸至饱和的直径 8.0mm 的圆形单层滤纸片置于兔角膜中央 1min 后取下,使角膜达到Ⅲ级烧伤程度(眼外伤职业病学组通过的烧伤标准)。立即用生理盐水冲洗角膜表面及结膜囊 2min。2.5g/L 氯霉素眼液及 10g/L 阿托品眼液滴眼。

1.2.2 分组 将左眼碱烧伤后的 50 只兔随机分为实验组(结膜覆盖组)25 只,对照组(未行结膜覆盖组)25 只。建立兔角膜碱烧伤后的当日,实验组行左眼结膜瓣覆盖术。

1.2.3 兔角膜碱烧伤后结膜瓣遮盖手术方法 (1)采用 10g/L 戊巴比妥钠 40mg 腹腔注射麻醉,固定于手术台上;(2)左眼置开睑器,20g/L 爱尔卡因眼液表面麻醉,手术显微镜下刮除角膜周边残存的上皮,用利多卡因注射液将球结膜与结膜囊气球样分离,沿角膜缘做球结膜 360°环形切开,分离结膜和筋膜囊至穹隆部,用游离的结膜瓣完整覆盖角膜,10-0 尼龙线间断对位缝合结膜瓣,并做浅层巩膜固定,涂红霉素眼膏(对照组亦刮除左眼角膜周边残存的上皮)。

1.2.4 实验用药与观察 实验组及对照组左眼角膜碱烧伤后,10g/L 阿托品眼液点左眼,2 次/d;2.5g/L 氯霉素眼液点左眼,3 次/d;红霉素眼膏涂左眼,1 次/晚(均连续用药 3d)。分别于 3, 7, 14, 21, 28d 各个时间点经兔耳缘静脉注入空气,随机处死实验组和对照组各 5 只,处死前进行裂隙灯检查及眼前节照相。

1.2.5 免疫组化染色观察 MMP-9 和 TIMP-1 表达 处死兔后,迅速摘除眼球,剪下角膜,甲醛固定,乙醇逐级脱水,二甲苯透色,石蜡包埋,5 μ m 连续切片。切片脱蜡,3mL/L 过氧化氢孵育 15min,抗原修复,血清封闭,滴 1:100 稀释的一抗,37℃ 下孵育 1h,滴二抗,滴过氧化物酶标 SABC 液,DAB 显色。显微镜下(\times 400)观察组织切片,抗 MMP-9 抗体、抗 TIMP-1 抗体染色阳性的细胞表现为胞浆均匀的棕黄色粗大颗粒,反之则为染色阴性。采用 Image8000 彩色图像分析仪对两组角膜组织免疫组化切片进行,分析实验组和对照组各取 5 张切片,用计算机图像分析仪采集免疫组化切片图像。采集系统以 \times 20 物镜输入,每张切片随机采集 10 个视野,对图像中阳性反应部位进行平均灰度分析。记录相应数据,取 50 个数据的平均值作为结果。

统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析,两组之间比较采用两样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜下观察 角膜烧伤后立即可见角膜中央有一直径约 8mm 的与滤纸片大小相符的瓷白色的边界清晰的烧伤病灶,深度达角膜基质层,瞳孔及虹膜窥视不清。随病程进展,对照组结膜充血,角膜中央出现灰白色溃疡灶,14d 溃疡面积及基质浸润程度最重,达到角膜损伤溶解的高峰期;实验组 14d 结膜瓣与角膜附着紧密,结膜瓣水肿色泽灰白,结膜瓣结合处缝线在位,愈合良好;28d 实验组结膜瓣已大部分溶解吸收,瘢痕较轻,新生血管较少,角膜透明度明显优于对照组(图 1)。

2.2 角膜碱烧伤后 MMP-9 及 TIMP-1 的表达 角膜碱烧伤后的溶解高峰出现在碱烧伤后的 14d,免疫组化可知碱烧伤后的 14d MMP-9 分泌达高峰,TIMP-1 分泌达最低点,21d TIMP-1 大量分泌,达到峰值,角膜溶解的病理损伤过程与 MMP-9 及 TIMP-1 的表达密切相关(图 2,3)。MMP-9 在烧伤后 3d 开始升高,14d 达到最高,之后趋于下降,而 TIMP-1 在伤后即有表达,7d 有所下降,于 14d 达到最低,后又于 21d 达到峰值。实验组 MMP-9 的表达均明显低于对照组,而 TIMP-1 则高于对照组。实验组与对照组不同时间点 MMP-9 和 TIMP-1 的阳性细胞平均光密度值,采用两样本 t 检验,两两比较不同时间点两组间均数,实验组 MMP-9 含量较对照组明显降低,差异有统计学意义($t_{3d} = 35.3958, P = 0.0000$; $t_{14d} = 10.8910, P = 0.0000$; $t_{21d} = 4.7532, P = 0.0000$; $t_{28d} = 19.9220, P = 0.0000$);而各时间点 TIMP-1 含量较对照组均有增加,特别是在结膜遮盖后 3d ($t_{3d} = 3.5184, P = 0.0002$),14d ($t_{14d} = 2.2831, P = 0.0246$)及 21d ($t_{21d} = 2.8377, P = 0.0055$)明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

3 讨论

角膜碱烧伤是临床上常见的、较为难治的眼表疾病,烧伤早期就有大量炎症细胞浸润,由于碱性物质具有浸润性,随病程发展可发生眼表持续性损伤、角膜溃疡甚至穿孔、角膜基质的混浊及新生血管生成等,在一系列的病理损伤过程中 MMPs 与 TIMPs 系统起着重要的作用^[1,2]。MMPs 是一类具有 Ca^{2+} - Zn^{2+} 离子依赖的内源性蛋白酶,

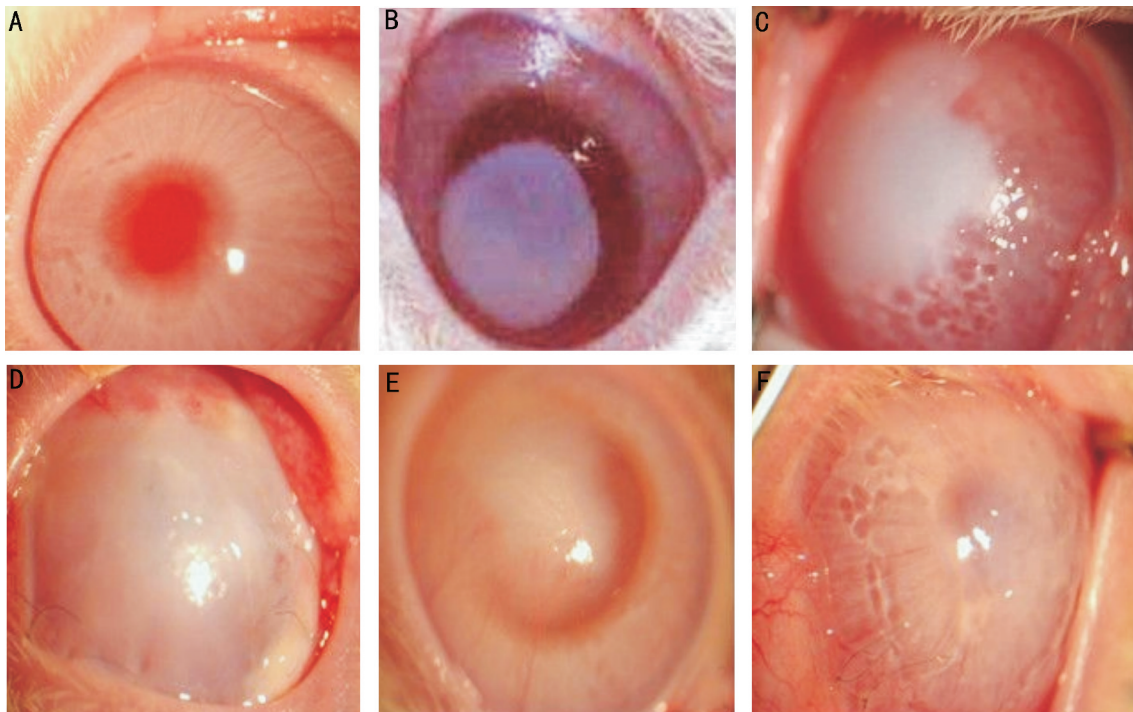


图1 裂隙灯显微镜下观察角膜烧伤情况 A:正常兔角膜; B:角膜碱烧伤当日; C:碱烧伤后14d; D:结膜瓣遮盖术后14d; E:碱烧伤后28d; F:结膜瓣遮盖术后28d。

表1 兔角膜组织中不同时间 MMP-9 和 TIMP-1 阳性细胞平均光密度 $\bar{x} \pm s$

时间	MMP-9		TIMP-1	
	实验组	对照组	实验组	对照组
3d	0.2021±0.0100 ^a	0.2842±0.0130	0.3083±0.0120 ^a	0.3002±0.0110
7d	0.2901±0.0181	0.2931±0.0150	0.2062±0.0130	0.2062±0.0140
14d	0.3207±0.0240 ^a	0.3848±0.034	0.2051±0.0150 ^a	0.2003±0.0160
21d	0.2980±0.0410 ^a	0.3310±0.027	0.3381±0.0160 ^a	0.3241±0.0310
28d	0.2860±0.0240 ^a	0.2901±0.0130	0.2074±0.0170	0.2071±0.0130

^aP<0.05 vs 对照组。

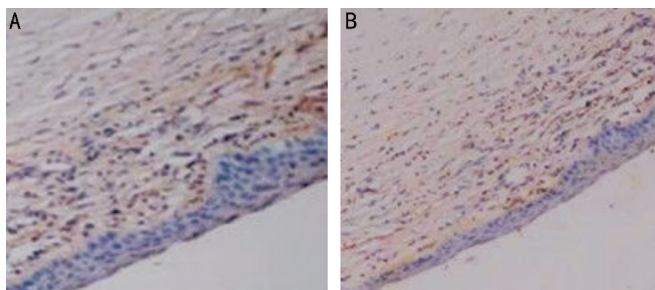


图2 两组14d时 MMP-9 阳性表达(×400) A:角膜碱烧伤后; B:结膜瓣遮盖后。

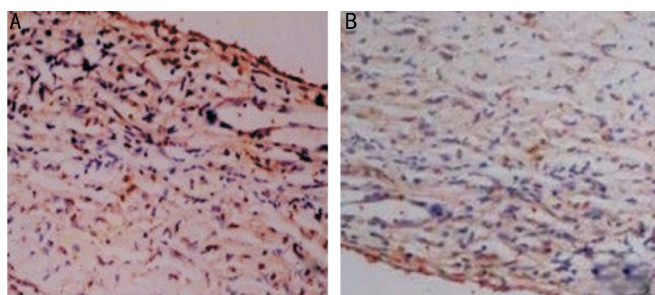


图3 两组21d时 TIMP-1 阳性表达(×400) A:角膜碱烧伤后; B:结膜瓣遮盖后。

以无活性酶原形式合成分泌,而活化的 MMPs 可降解多种角膜基质成分^[3,4]。TIMPs 是 MMPs 的内源性抑制剂,一般与 MMPs 按 1:1 比例以非共价键形式结合,特异性抑制其活性。二者的表达平衡参与角膜基质的损伤和修复。

McCulley 将眼部化学烧伤的临床病程分为 4 个时期,即烧伤期、急性期(0~7d)、修复早期(1~3wk)和修复晚期(>3wk)^[5]。本研究涉及的时相是角膜烧伤期、急性期和修复早期,碱烧伤后兔角膜的修复过程和碱性物质的损伤过程同时进行。建立兔角膜碱烧伤动物模型,通过结膜瓣覆盖治疗Ⅲ度兔角膜碱烧伤,并将结膜瓣覆盖组与对照组作比较,观察急性期及修复早期结膜瓣覆盖术后兔角膜组织中 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响。

MMP-9 即明胶酶 B,相对分子量是 92kDa,以酶原形式分泌,主要存在于角膜基质中,能降解弹性蛋白、IV 型胶原、V 型胶原和明胶。正常角膜中不能检测到 MMP-9 表达,而在碱烧伤的兔角膜中,MMP-9 表达明显增高,且与炎症反应明显相关。TIMPs 分为 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 和 TIMP-4^[6],可以特异性抑制所有 MMPs 的活性,TIMP-1 是所有 TIMPs 亚类中活性最强且能特异性抑制 MMP-9 活性^[7],其具有双重的阻止功能,一方面与酶原结合阻止酶原作用于细胞表面,又另一方面与激活的明

胶酶结合令其失活。资料表明, TIMP-1 在成纤维细胞周期 S 相中大量出现, 说明它与细胞的修复生长有关^[8]。本研究结果显示, MMP-9 和 TIMP-1 的免疫定位, 碱烧伤组、结膜瓣覆盖组主要分布于角膜基质、浸润的炎细胞及新生血管的内皮细胞中, 这与 Ma 等^[9]通过原位酶谱技术检测的结果基本相符。

我们在研究中发现, MMP-9 和 TIMP-1 的变化周期与碱烧伤的临床损伤及病理修复具有一致性。碱烧伤后不同阶段, 碱烧伤组角膜 MMP-9 表达较对照组显著降低, 而 TIMP-1 则明显高于对照组, 提示角膜碱烧伤后大量 MMP-9 表达, TIMP-1 作为 MMP-9 的抑制剂也随之发生反应性的变化。早期大量 MMP-9 释放入基质, 激活蛋白裂解反应, 炎症细胞释放, 导致角膜溃疡。晚期随着损伤愈合进展, TIMP-1 的作用逐渐增强, 抑制 MMP-9 的活化, 减轻角膜混浊, 维持角膜内皮细胞的静止状态^[10], 从而减轻角膜上皮基底膜和基质胶原的降解, 以及由此造成的炎症细胞浸润。因此, 我们认为 MMP-9 与 TIMP-1 的表达失衡在角膜碱烧伤的发生中起主要作用, 结膜瓣促进 MMP-9 与 TIMP-1 的动态平衡的重建, 有利于细胞和组织的修复。

结膜瓣遮盖术治疗角膜碱烧伤的机制尚不明确, 人为造成“角膜上皮化”可能是阻止角膜溃疡发展的关键所在, 同时局部血运的改善和修复过程的加速也很重要。当前理论认为带蒂的结膜瓣含有丰富的血管和淋巴管, 紧密与烧伤角膜接触, 可将结膜固有营养因子运送到角膜表面, 提高了局部抗炎能力, 以利于炎性反应消退和烧伤的角膜修复。同时, 结膜瓣可以保护角膜创面不受胶原酶的溶解, 免除炎性分泌物的刺激, 促进了溃疡面与结膜瓣的愈合^[11]。此外, 结膜瓣遮盖还能机械性保护角膜创面。

本研究说明, 结膜瓣可促进 MMP-9 与 TIMP-1 动态平衡的重新建立, 不仅对角膜基质组织的重建有免疫监控功能, 并且在角膜碱烧伤损伤修复过程中发挥重要作用, 这也为结膜瓣遮盖治疗角膜碱烧伤提供了理论依据。因此, 更全面彻底地理解结膜瓣如何调控 MMP-9 与 TIMP-1

间的平衡机制, 对于角膜碱烧伤患者的临床治疗将具有重要的价值。但对 MMP-9 和 TIMP-1 的激活和抑制的分子机制以及如何合理调节二者之间的平衡, 从而有效防治角膜碱烧伤后角膜溃疡和溶解、角膜新生血管化和纤维化等并发症, 有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(6):913-921
- 2 Garran RM, Zieske JD, Assouline M. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1266-1270
- 3 Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;30:21491-21494
- 4 Kenney MC, Chwa M, Alba A, et al. Localization of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, gelatinase A and gelatinase B in pathological human corneas. *Curr Eye Res* 1998;11(9):48-53
- 5 张效房, 杨进献. 眼外伤学. 郑州: 河南医科大学出版社. 1997:594-596
- 6 Erlewyn-lajeunesse MD, Hunt LP, Pohunek P, et al. Bronchoalveolar lavage MMP-9 and TIMP-1 in preschool wheezers and their relationship to persistent wheeze. *Pediatr Res* 2008;64(2):194-199
- 7 Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, et al. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor in asthma. *Thorax* 2005;60(4):277
- 8 Zhao WQ, Li H, Yanlshira K, et al. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 1998;111(9):1147-1153
- 9 Ma DH, Chen JK, Kim WS, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in inflammation-induced corneal neovascularization. *Ophthalmic Res* 2001;33(6):353-362
- 10 Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977;14:53-65
- 11 Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, Sroolun and Thoft's the cornea: scientific foundations and clinical practice. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2005:949-957