

角膜碱烧伤中 PMNs 与 MMP-9 的关系

宋东宇^{1,3}, 高明宏², 李冬梅³

引用:宋东宇,高明宏,李冬梅. 角膜碱烧伤中 PMNs 与 MMP-9 的关系. 国际眼科杂志 2019;19(11):1844-1847

基金项目:首都卫生发展科研专项项目(No.2018-2-2053)

作者单位:¹(122000)中国辽宁省朝阳市中心医院眼科;
²(110016)中国辽宁省沈阳市,北部战区总医院眼科;³(100730)
中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心
北京市眼科学与视觉科学重点实验室

作者简介:宋东宇,男,首都医科大学附属北京同仁医院眼科在读博士研究生,主治医师,研究方向:角膜病、泪道疾病。

通讯作者:李冬梅,女,毕业于中国医科大学,主任医师,教授,博士研究生导师,亚太眼整形学会候任主席,中华医学会眼整形眼眶病学组副组长,中国医师学会整形外科学分会眼整形专委会副主任委员,眼整形科主任,研究方向:眼部整形与修复。ldmlily@x263.net

收稿日期:2019-05-09 修回日期:2019-09-27

摘要

目的:研究角膜碱烧伤后基质损伤修复病程中多形核中性白细胞(PMNs)的浸润和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达的关系。

方法:建立25只家兔角膜碱烧伤模型,分别于伤后3、7、14、21、28d随机处死5只兔,裂隙灯下观察角膜病理修复情况,摘除角膜做病理切片,测定PMNs的浸润量值。免疫组化法测定MMP-9的表达。

结果:PMNs和MMP-9在角膜碱烧伤后的3d开始升高,14d上升达到最大峰值,之后逐渐降低,碱烧伤后角膜基质在第14d溃疡面积及深度最为严重。

结论:角膜碱烧伤病灶中PMNs和MMP-9的量值呈正相关,且角膜的病理损伤与PMNs的浸润和MMP-9的表达密切相关。

关键词:角膜碱烧伤;基质金属蛋白酶-9;多形核中性白细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.11.06

Effect of PMNs and MMP-9 on corneal injury after alkali burn

Dong-Yu Song^{1,3}, Ming-Hong Gao², Dong-Mei Li³

Foundation item: Capital Health Development Research Project (No.2018-2-2053)

¹Department of Ophthalmology, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang 122000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; ³Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Correspondence to: Dong-Mei Li. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China. ldmlily@x263.net

Received:2019-05-09 Accepted:2019-09-27

Abstract

• AML: To study the relationship between the infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and the expression of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) in corneal stroma injury after alkali burn.

• METHODS: Cornea alkali-burned model was made in 25 rabbits, then animals were grouped and sacrificed at 3d, 7d, 14d, 21d and 28d, respectively. The condition developing of alkali-burned cornea was observed by slit lamp biomicroscopy. The corneas were enucleated for histopathological examination. The infiltration of PMNs was identified by hematoxylin eosin (HE) staining and the expression of MMP-9 was identified by immunohistochemistry in different periods.

• RESULTS: The quantity of PMNs and MMP-9 increased on the 3d, reached the lower level on 7d, shown a peak on the 14d, then decreased gradually. The area and depth of corneal stroma after alkali burn were the most severe on the 14d.

• CONCLUSION: During the wound healing process, alkali-burned cornea has close relation with the infiltration of PMNs and the expression of MMP-9. The infiltration of PMNs and the expression of MMP-9 is positively correlated in corneal stroma injury after alkali burn.

• KEYWORDS: alkali-burned cornea; matrix metalloproteinase-9; polymorphonuclear neutrophils

Citation: Song DY, Gao MH, Li DM. Effect of PMNs and MMP-9 on corneal injury after alkali burn. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(11):1844-1847

0 引言

角膜碱烧伤是临床上常见的严重致盲性眼外伤,由于碱易于浸润至深层角膜,造成角膜病灶组织的溃疡溶解,烧伤早期即有复杂的炎症反应,多形核中性白细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)为病灶内重要的炎性细胞。PMNs浸润角膜基质层并不断吞噬坏死组织,直至引起PMNs细胞溶酶体破裂,产生大量蛋白酶加重基质层的溃疡溶解^[1]。角膜基质层中含有大量的胶原成分,在碱烧伤溃疡损伤过程中有大量细胞因子、酶类参与,其中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在损伤中发挥了关键作用,MMP-9又称明胶酶B,活化后能分解多种胶原成分,易造成角膜基质层严重的溃疡溶

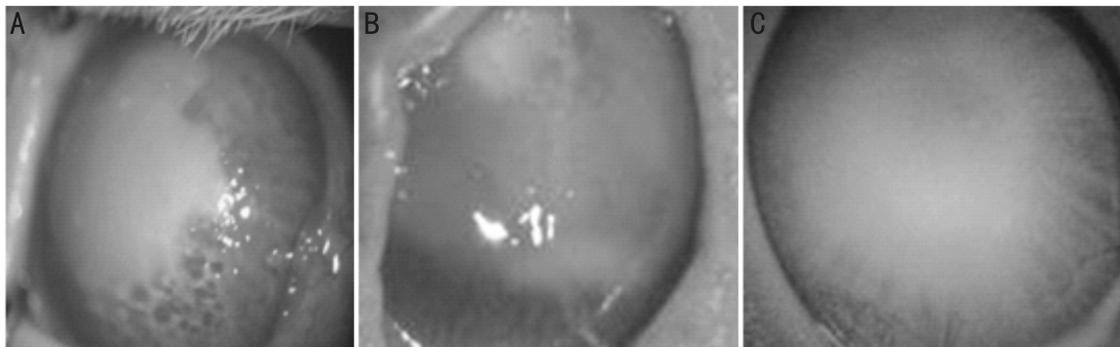


图1 裂隙灯下观察角膜碱烧伤情况 A:碱烧伤后 3d,角膜基质层溃疡水肿,病灶边界不清;B:碱烧伤后 14d,角膜基质层严重溃疡溶解;C:碱烧伤后 28d,角膜基质层溃疡减轻,瘢痕形成。

解^[2]。碱烧伤后的病理损伤机制非常复杂,角膜病灶区严重的炎症反应和基质层溃疡溶解并存,两者是否具有一致性,如何认识 PMNs 与 MMP-9 的相互作用及其关系,尚需深入研究。本文通过建立在体动物角膜碱烧伤模型,探究角膜碱烧伤后 PMNs 浸润和 MMP-9 的表达时相,并且创新性的研究二者的相关性,为深入研究及治疗角膜碱烧伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用健康清洁级新西兰白兔 25 只(首都医科大学动物研究中心提供),10~12 月龄,体质量 2.0~3.0kg,雌雄均用,右眼为实验眼,左眼为正常对照眼,实验前仔细检查眼部无病变。动物实验过程中,严格遵循国家科技部颁布的《实验动物管理条例》,同时本研究获得朝阳市中心医院伦理委员会的批准。

1.1.2 实验器材 使用试剂:鼠抗兔 MMP-9 抗体(Abcam);辣根酶标记山羊抗鼠 IgG、SP 及 DAB 试剂盒(Bioss);纤维滤纸(BOSTER)。使用仪器:超净工作平台(SW-CJ-IFD,沈阳)、匀速振荡器(JHYC-3,苏州)、水浴箱(ZD600,苏州)、精密切片机(HM325,美国)、漂烘器(ZMN-6802,日本)、图像分析仪(Image8000,北京)、裂隙灯(SL-6F,苏州)、高倍显微镜(CK53,深圳)和图像分析系统(Image Plus6.0,沈阳)。

1.2 方法

1.2.1 角膜碱烧伤模型的建立 依据中华医学会眼外伤学组制定的角膜烧伤标准,建立兔右眼角膜Ⅲ级碱烧伤的动物模型,操作由同一有经验的实验人员完成。为确保滤纸片大小形状一致,用直径为 8.0mm 的角膜移植环钻钻取多张圆形单层滤纸片,充分浸泡于 1.0mol/L NaOH 溶液中 10s,镊子夹取后置于器皿盒内备用。器械固定实验兔头部,右眼置开睑器,20g/L 盐酸丙美卡因滴眼液点眼 4 次充分表面麻醉,把浸泡备用的滤纸片置于角膜中央区,确保滤纸与角膜表面充分接触,计时 1min 后取下,注射器抽取大量生理盐水冲洗上睑穹窿部及角结膜表面 5min,确保无 NaOH 溶液残留(经反复预实验,碱烧伤角膜 1min,生理盐水冲洗 5min,能确保角膜达到Ⅲ级烧伤,且烧伤程度不至于角膜穿孔)。按此方法对 25 只兔右眼均进行角膜碱烧伤模型的建立^[2]。

1.2.2 模型治疗及处理 角膜碱烧伤后 3d 内,角膜损伤较重,为避免角膜穿孔和实验动物的眼部不适,兔双眼(实验组和对照组)均给予非抗生素药物,小牛血去蛋白提取物眼用凝胶,4 次/d,点双眼。分别于碱烧伤后 3、7、

14、21 和 28d 从模型兔中随机选取 5 只,按照 0.2mL/100g 体质量腹腔注射氯胺酮和氯丙嗪 1:1 混合液麻醉后,裂隙灯下观察双眼角膜并进行眼表照相,随即静脉注入空气窒息法处死^[2]。实验动物发生严重眼内出血或角膜溶解穿孔则予剔除。

1.2.3 角膜处理和数据获取 兔被麻醉处死后,沿角膜缘环形剪开球结膜及筋膜,快速剪断眼外肌和视神经,摘除双侧眼球,完整切取带有 1.0mm 宽巩膜的角膜组织,10% 甲醛溶液固定 24~48h,常规不同浓度乙醇梯度脱水,应用二甲苯溶液致透明化,石蜡包埋,4 μ m 连续切片^[1]。

角膜切片彻底脱蜡后常规 HE 染色,从每只角膜的大量切片中随机选取 5 张,200 倍光镜视野下,随机选取 10 个视野,Image 8000 图像分析仪和 Image Plus 6.0 系统读像分析,细胞核蓝色深染的细胞为 PMNs,记录相应数据,每组的 5 只角膜获取 250(50 \times 5) 个数据,计算平均值($\bar{x}\pm s$)作为数据结果。

石蜡切片常规脱蜡,0.3% 过氧化氢孵育 15min,修复抗原,血清封闭,加入 1:100 稀释后的一抗,37 $^{\circ}$ C 温度下孵育 1h,滴加二抗,加入过氧化物酶标 SABC 液,DAB 显色。400 倍生物显微镜下观察免疫组化切片,胞浆呈均匀的棕黄色粗大颗粒的细胞为 MMP-9 染色阳性的细胞^[1]。分别从实验组(右眼)和对照组(左眼)的每个角膜切片中随机取 5 张,Image 8000 图像分析仪分析图像,以 $\times 20$ 物镜输入采集系统,每张切片随机选取 10 个视野,记录 MMP-9 阳性细胞光密度。收集数据,每组的 5 只角膜获取 250(50 \times 5) 个数据,计算平均值($\bar{x}\pm s$)作为数据结果。

统计学分析:采用 SPSS20.0 系统和 Origin 8.0 软件对实验数据进行统计学处理。以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,采用单因素方差分析进行多组间的比较,若差异显著则多组数据与对照组均数的比较采用 Dunnett-*t* 检验,组内不同时间点的差异比较采用两两比较的 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据相关分析采用 Pearson 相关性检验,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯下观察 碱烧伤后 3d 兔右眼球表面大量粘稠分泌物,烧伤病灶呈现边界不清的灰白色溃疡,深度达角膜基质层,窥视不清眼内结构(图 1A)。14d 实验组的角膜溃疡深度及面积最为严重,病灶周边大量新生血管生长,角膜病灶溃疡溶解最重,达高峰期(图 1B)。28d 实验组角膜溃疡区基本瘢痕化,表面新生血管生长,透明度极差(图 1C)。对照组角膜无明显变化。

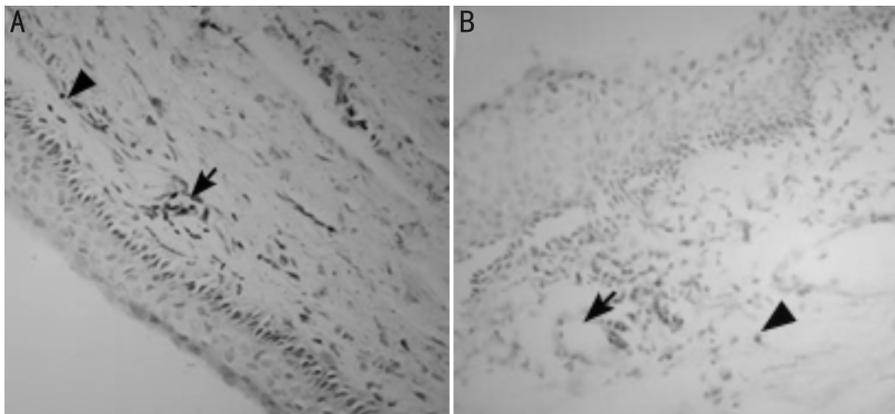


图2 HE染色切片观察PMNs和新生血管($\times 400$) A:碱烧伤后3d;B:碱烧伤后14d。三角示PMNs,箭头示新生血管。B图与A图比较,可见碱烧伤后PMNs和新生血管增多,角膜基质纤维更为紊乱。

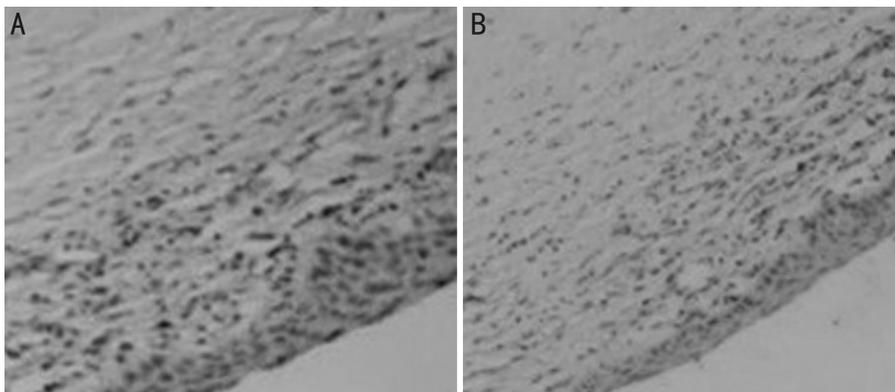


图3 MMP-9阳性表达(SABC $\times 400$) A:角膜碱烧伤后14d,大量MMP-9表达;B:角膜碱烧伤后28d,MMP-9表达趋于下降。

表1 碱烧伤后各时间点角膜中MMP-9阳性细胞平均光密度及实验组内相互比较

组别	眼数	MMP-9	实验组内相互比较 q 值(P 值)			
			7d	14d	21d	28d
正常对照组	25	0.0015 \pm 0.0006				
碱烧伤 3d	5	0.2842 \pm 0.0130	4.1534 (<0.05)	10.1663 (<0.01)	4.7294 (<0.05)	2.4355 (>0.05)
碱烧伤 7d	5	0.2431 \pm 0.0150		14.3197 (<0.01)	8.8829 (<0.01)	1.7180 (>0.05)
碱烧伤 14d	5	0.3848 \pm 0.0340			5.4368 (<0.01)	12.6017 (<0.01)
碱烧伤 21d	5	0.3310 \pm 0.0270				7.1649 (<0.01)
碱烧伤 28d	5	0.2601 \pm 0.0130				

2.2 HE染色切片观察 400倍生物显微镜下观察HE染色切片,PMNs为镜下视野内胞核蓝色且深染的细胞。碱烧伤后3d,角膜溃疡区上皮组织缺如,基质层水肿肥厚,胶原纤维部分紊乱,角膜上皮及基质层可见少量PMNs;碱烧伤后14d,病灶区周边残存的上皮层细胞水肿,基质层溶解变薄,大量纤维溶解断裂且排列紊乱,可见新生血管生长,特别是溃疡溶解区的基质层细胞中存在大量PMNs浸润,呈团簇样存在且胞核较大(图2)。

2.3 PMNs的量值 兔角膜碱烧伤后3、7、14、21、28d角膜病灶组织中PMNs密度值分别为58.34 \pm 4.67、46.34 \pm 2.36、90.07 \pm 5.67、83.23 \pm 3.31和43.28 \pm 3.45个/1000 μm^2 。正常对照组角膜基质内几乎未见PMNs细胞。实验组不同时间点PMNs密度值变化比较明显,碱烧伤后3d角膜基质层即可见大量PMNs浸润,7d时数量略有下降,继而快速增多,即在14d时达到顶峰,之后逐渐减少,28d时下降至接近7d时数量。

2.4 角膜碱烧伤后MMP-9的表达 碱烧伤后的角膜基质层溶解高峰出现在14d,观察免疫组化图片可发现碱烧

伤14d的角膜基质层中MMP-9的量值达到顶峰,随后角膜碱烧伤后的28d,MMP-9的表达明显减少,角膜溶解溃疡的病损修复过程与MMP-9的表达紧密相关(图3)。

经检验分析,实验数据服从正态分布,满足方差齐性,实验组内各时间点MMP-9阳性细胞平均光密度值随时间延长出现明显波动(先上升后下降),差异有统计学意义($F=33.78, P<0.01$)。兔左眼为对照组(正常眼),各时间点MMP-9阳性细胞平均光密度值平稳无变化,求取平均值作为对照组均值。不同时间点实验组MMP-9阳性细胞平均光密度值均高于对照组,组间均数比较用Dunnett- t 检验(表1),3、7、14、21和28d差异明显,均具有统计学意义($P<0.05$)。实验组内各时间点的MMP-9阳性细胞平均光密度值相互比较用SNK- q 检验(表1),可见不同时间点MMP-9阳性细胞平均光密度值变化明显($P<0.05$),碱烧伤后3d即有大量MMP-9产生,7d时有所下降,之后明显提升且在14d时达到高峰,14d后逐渐降低,在28d降至接近烧伤7d时水平。

2.5 量值相关性 角膜碱烧伤后病灶组织内PMNs的浸

润与 MMP-9 的表达的量值呈正态分布,对两组数值进行 Pearson 相关性检验,呈正相关($r=0.963, P=0.004$)。

3 讨论

角膜碱烧伤是临床上较为多见的,治疗较为困难的严重眼表疾病,早期即出现大量炎性细胞浸润,随着病程的进展可见眼表持续性病损、角膜溃疡溶解、角膜混浊瘢痕及大量新生血管等,尤其是角膜基质层损伤较重,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要包括胶原、蛋白多糖、糖蛋白、糖胺多糖和弹力纤维五大类,其中胶原是 ECM 中最丰富的结构成分。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可作为降解细胞外基质的酶类,在角膜组织溃疡溶解损伤及细胞迁移修复中发挥重要的作用^[3],而 MMP-9 作为 MMPs 家族中的重要一员,在角膜基质的病理损伤过程中能够降解大量胶原^[4-5]。MMP-9 又被称为明胶酶 B,相对分子量为 92kD,以无活性的酶原形式分泌,主要存在于角膜基质层中,活化后能降解 IV 型胶原、V 型胶原、弹性蛋白和明胶。正常角膜中只能微量检测到 MMP-9 表达,而在兔角膜碱烧伤后的病灶区内, MMP-9 表达明显增加,在我们的研究中,实验组与对照组的量值做统计学分析,均有统计学意义,可以说明 MMP-9 在角膜碱烧伤后的溃疡溶解中具有重要作用,并且与炎性反应明显呈正相关。在本研究中发现,免疫定位 MMP-9,其主要分布于溃疡的角膜基质、浸润的炎细胞和新生血管的内皮细胞中,这与 Ma 等^[6]通过原位酶谱技术检测的研究结果相一致, MMP-9 能够大量降解角膜基质,从而引起严重的损伤。

研究发现碱烧伤后 3d 角膜上皮层及基质层病灶中就存在大量的 PMNs 浸润,第 7d 量值却有下降,碱烧伤后的 14d 则达到浸润的峰值,大量角膜基质溃疡溶解,甚至是穿孔,伤后 14d 为角膜组织病理损伤的严重期,炎症反应也最为严重, PMNs 浸润达到最大值,角膜碱烧伤后的溃疡溶解与 PMNs 的浸润水平显著相关,这与报道文献^[2,7]的研究一致。因正常对照组的角膜基质层未见明显的 PMNs 存在,实验组与对照组差异明显,我们未进行组间的统计学分析。在空间分布上,早期 PMNs 分布在碱烧伤创口边缘的角膜基质内,主要有外源性碱性物质致伤所引起,角膜表面无浸润;后期 PMNs 浸润部位与溃疡部位一致,主要是与免疫性炎症反应相关,这与 Peebo 等^[8]的研究结果相同。碱烧伤后 PMNs 浸润损伤角膜组织的病程进展快速,进入角膜基质的 PMNs 大量吞噬坏死物质,进而使溶酶体破裂,溶酶体酶大量进入角膜烧伤溃疡区,对胶原进行溶解破坏,有研究证实明胶酶 MMP-9 与中性粒细胞相关^[9-11]。Noerager 等^[12]通过对外周血中的 PMNs 细胞分离提取后,在 PMNs 碎裂物及上清液中分离到 MMP-9 的存在。而我们的研究是通过制做角膜碱烧伤的动物模型,在活体动物的角膜炎性病灶组织中测得 PMNs 及 MMP-9 的量值,所得实验数据更准确、直观,并对碱烧伤不同时相的 PMNs 与 MMP-9 量值做 Pearson 相关性检验,相关系数 $r=0.963, P=0.004$,从而创新性地证明了二者关系密切,且具有明显正相关性。实验方式不同,无论是通过外周血的细胞提取,还是通过直接的活体动物实验,其结果具有一致性,但我们的实验数据直接在角膜炎性病灶内测得,更能表达和证实二者的相关性,且通过统计学分析证实相关性明显具有统计学意义($P<0.01$)。

按照 McCulley 的研究,化学性角膜烧伤可以分为以

下四期:角膜烧伤期(烧伤当时)、损伤急性期(0~7d)、角膜修复早期(1~3wk)和角膜修复晚期(大于 3wk)^[2,13],我们通过建立动物模型,研究碱烧伤急性期、修复早期和修复晚期的角膜溃疡区的组织病理损伤及病程进展中 PMNs 浸润和 MMP-9 表达的时相,依据统计学分析充分证实二者具有明显正相关性,该理论能够为临床治疗角膜碱烧伤提供新思路。临床上治疗早期角膜碱烧伤,控制炎症即是抑制 PMNs 的浸润和减少 MMP-9 的大量表达,依据二者的正相关性,抑制炎症反应,促进上皮的早期修复,可以减少角膜病灶的溃疡溶解,进而有效地减轻角膜病灶的病理性损伤。

依据本研究中 PMNs 及 MMP-9 的变化曲线,在角膜碱烧伤后 3d 内就要频点抗炎眼液,早期应用小牛血去蛋白提取物眼用凝胶类药物,稀释残存碱性物质,促进上皮层的修复,减少炎性细胞浸润,而 7~21d 是烧伤后的角膜溃疡溶解期,在抗炎治疗的同时要抑制基质蛋白酶类的溶解作用。碱烧伤 14d 后,即可应用促进上皮和基质修复的眼膏或眼液,进而达到促进修复减少瘢痕的最佳疗效^[2,13]。在临床诊治上,炎症反应和 MMPs 的溃疡降解密切相关,角膜碱烧伤的病理损伤是多因素共同作用的结果,炎症反应与新生血管生长因子的相互关系, MMPs 家族中其他的酶类因子是否与炎症反应相关,尚需实验研究。

参考文献

- Xiao O, Xie ZL, Wu B, et al. Minocycline inhibits alkali burn-induced corneal neovascularization in mice. *PLoS One* 2012; 7(7): 418-458
- 宋东宇, 高明宏, 崔珊珊, 等. 结膜瓣遮盖治疗角膜碱烧伤中 PMNs 浸润的变化. *国际眼科杂志* 2016; 16(10): 1824-1827
- Stetler-Stevenson WG, Gavril NV. Normalization of the tumor microenvironment: evidence for tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a cancer therapeutic. *Connect Tissue Res* 2014; 55(1): 13-19
- Garrana RM, Zieske JD, Assouline M. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(6): 1266-1270
- 梁庆丰, 李彬, 张阳, 等. 兔铜绿假单胞菌性角膜感染后炎症失控反应发病机制及治疗研究. *中华实验眼科杂志* 2016; 34(2): 125-131
- 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
- Sosne G, Christopherson PL, Barrett RP, et al. Thymosin beta 4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(7): 2388-2395
- Peebo BB, Gan L, Sun XF, et al. Expression of the focal adhesion protein PINCH in normal and alkali-injured corneas and the role of PMNs. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 2007; 85(4): 395-400
- Smith VA, Rishmawi H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(2): 147-153
- 毛梅, 汪丽, 邓晓玲, 等. 内皮祖细胞对脂多糖刺激活化后中性粒细胞分泌功能的影响. *中国急救医学* 2015; 35(9): 859-862
- 郭海琴, 马文娟, 韩新鹏, 等. 粒细胞活化、组蛋白去乙酰化酶 2 与重症哮喘关系的临床研究. *国际呼吸杂志* 2017; 37(12): 890-895
- Noerager BD, Xu X, Davis VA, et al. A Potential Role for Acrolein in Neutrophil-Mediated Chronic Inflammation. *Inflammation* 2015; 38(6): 2279-2287
- 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 MMP-1 的表达. *国际眼科杂志* 2012; 12(11): 2062-2065