

在晶状体损伤诱导的视神经长时程再生过程中 MMP-12 的表达规律

王国栋^{1*}, 赵剑峰^{1*}, 徐星煜¹, 向祥林¹, 沈一苇¹, 何子涵¹, 刘康², 耿宇¹

引用: 王国栋, 赵剑峰, 徐星煜, 等. 在晶状体损伤诱导的视神经长时程再生过程中 MMP-12 的表达规律. 国际眼科杂志 2023; 23(3):369-374

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81560160); 云南省科技厅科技计划项目 [No.2019FE001(-059)]

作者单位:¹(650031) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第一附属医院眼科;²(650032) 中国云南省昆明市, 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院眼科

*: 王国栋和赵剑峰对本文贡献一致。

作者简介: 王国栋, 男, 硕士, 住院医师, 研究方向: 视神经损伤修复; 赵剑峰, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 晶状体病。

通讯作者: 耿宇, 博士, 副主任医师, 研究方向: 晶状体病与视神经再生相关基础与临床研究. gengyu@mail2.sysu.edu.cn; 刘康, 博士, 主治医师, 研究方向: 视神经损伤修复. edwardliuksf@163.com

收稿日期: 2022-04-14 修回日期: 2023-02-20

摘要

目的: 探讨晶状体损伤诱导 SD 大鼠视神经钳压损伤后轴突长时程再生过程中 MMP-12 的表达变化。

方法: 建立 SD 大鼠视神经损伤模型和晶状体损伤模型, 将实验动物 24 只分为对照组 (仅开放眼眶暴露视神经)、晶状体损伤组、视神经损伤组、晶状体损伤联合视神经损伤组, 每组各 6 只大鼠。采用有参转录组测序分析损伤视神经区域差异基因表达变化, 筛选相关高表达差异基因, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和酶联免疫吸附实验 (ELISA) 定量分析损伤区 MMP-12 的表达量变化。

结果: 转录组测序主成分分析表明, 晶状体损伤联合视神经损伤是基因表达变化中的主要成因。基因表达差异分析显示, 晶状体损伤联合视神经损伤组中, 存在 MMP-12 基因表达上调。在建模成功后 14、21d 时, 晶状体损伤联合视神经损伤组的 MMP-12 mRNA 表达量与对照组、视神经损伤组和晶状体损伤组比较上调 ($P < 0.05$); 在 7、28d 时, 各组间表达无差异。在建模成功后 7、14、21d 时, 晶状体损伤联合视神经损伤组的 MMP-12 蛋白表达量与对照组和视神经损伤组比较上调 ($P < 0.05$); 21d 时, 晶状体损伤联合视神经损伤组与视神经损伤组比较上调 ($P < 0.05$)。28d 时, 各组间表达无差异。

结论: MMP-12 表达上调可能参与晶状体损伤后诱导视神经长时程再生过程。

关键词: 视神经轴突长时程再生; 基质金属蛋白酶-12; 有参转录组测序

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.04

Expression pattern of MMP-12 in long-term optic nerve regeneration induced by lens injury

Guo-Dong Wang^{1*}, Jian-Feng Zhao^{1*}, Xing-Yu Xu¹, Xiang-Lin Xiang¹, Yi-Wei Shen¹, Zi-Han He¹, Kang Liu², Yu Geng¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81560160); Science and Technology Plan Project of Yunnan Provincial Science and Technology Department [No. 2019FE001(-059)]

¹Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China;

²Department of Ophthalmology, the 920th Hospital of Joint Logistic Support Force, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Co-first authors: Guo-Dong Wang and Jian-Feng Zhao

Correspondence to: Yu Geng. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China. gengyu@mail2.sysu.edu.cn; Kang Liu. Department of Ophthalmology, the 920th Hospital of Joint Logistic Support Force, Kunming 650032, Yunnan Province, China. edwardliuksf@163.com

Received: 2022-04-14 Accepted: 2023-02-20

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression changes of MMP-12 during the long-term axon regeneration induced by the lens injury after the optic nerve clamp trauma in sprague-dawley (SD) rats.

• **METHODS:** The optic nerve injury model and lens injury model of SD rats were established, and the 24 experimental animals were divided into control group; lens injury group; optic nerve injury group; lens injury combined with optic nerve injury group, with 6 rats in each group. Reference transcriptome sequencing was used to analyze the expression changes of differentially expressed genes in the injured optic nerve region, and relevant differentially expressed genes with high expression were screened. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to quantify the expression changes of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in the injured optic nerve region.

• **RESULTS:** The Principal Component Analysis of transcriptome sequencing indicated that lens injury

combined with optic nerve injury was the principal component of gene expression change. Analysis of gene expression differences showed that the expression of MMP-12 gene was up-regulated in the lens injury combined with optic nerve injury group. The mRNA expression level of MMP-12 in the lens injury combined optic nerve injury group was up-regulated compared with the control group, the optic nerve injury group and the lens injury group at 14d and 21d after successful modeling ($P<0.05$). At 7, 28d, there was no difference in expression among all groups. The protein expression level of MMP-12 in the lens injury combined with optic nerve injury group was up-regulated compared with the control group and optic nerve injury group at 7, 14 and 21d after successful modeling ($P<0.05$), and it was up-regulated in the lens injury group combined with optic nerve injury group compared with optic nerve injury group at 21d ($P<0.05$). At 28d, there was no difference in expression among all groups.

• **CONCLUSION:** The up-regulated expression of MMP-12 may be involved in the long-term regeneration of the optic nerve after lens injury.

• **KEYWORDS:** long-term optic nerve regeneration; matrix metalloproteinase-12; reference transcriptome sequencing

Citation: Wang GD, Zhao JF, Xu XY, et al. Expression pattern of MMP-12 in long-term optic nerve regeneration induced by lens injury. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(3):369-374

0 引言

视神经损伤是临床上严重的致盲因素之一。虽然属于中枢神经系统的视神经再生困难,但晶状体损伤后能诱导受损视神经轴突出现长时程再生^[1],轴突纤维可以达下丘脑形成有效突触连接并改善实验动物视觉电信号传导^[2]。有研究认为,其机制可能为晶状体蛋白诱导视神经节细胞存活并再生,也有研究认为晶状体损伤后诱发眼部局部炎症在视神经再生过程中起到了重要的作用^[3-4],但既往研究均不能完全解释这种长时程视神经再生的机制^[1,5]。我们采用视神经钳夹伴晶状体损伤诱导视神经长时程再生的动物模型,对视神经损伤区域进行转录组测序,筛选出差异性高表达基因,并对筛选的高表达因子进行后期分子生物学验证。

1 材料和方法

1.1 材料 本课题所用的24只实验动物均在昆明医科大学动物部购买[许可证号:SCXK(滇)K2019-0002],均为SPF级SD雄性大鼠,体质量为180~200g。所有实验动物经昆明医科大学实验动物伦理委员会审核通过。

1.2 方法 将实验动物24只分为对照组、晶状体损伤组、视神经损伤组、晶状体损伤联合视神经损伤组,每组各6只大鼠。

1.2.1 建立SD大鼠视神经损伤模型 6只SD大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(50mg/kg)全身麻醉,麻醉起效后左眼眼部涂0.5%硫酸阿托品凝胶充分散瞳,在眼球外眦部剪开外眦角,暴露部分眼眶脂肪,钝性分离组织,尽可能暴

露眼球后部的视神经,在距眼球约0.2~0.5mm处钳夹视神经约10s,5min后检眼镜观察SD大鼠视网膜,观察到大鼠视网膜中央动脉恢复血供^[6]。外眦角手术切口涂红霉素眼膏每日1次,预防感染,大鼠在SPF级环境下饲养。术后1wk大鼠眼部伤口愈合,无明显眼部感染迹象。术后用检眼镜检查眼底,排除视网膜血管损伤的SD大鼠。6只大鼠均建模成功,适用于后续实验研究。

1.2.2 建立大鼠外伤性白内障模型 6只SD大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(50mg/kg)全身麻醉,麻醉起效后左眼眼部涂0.5%硫酸阿托品凝胶充分散瞳,暴露晶状体,在大鼠角巩膜缘用30G胰岛素针头水平刺入眼内,将晶状体囊膜彻底破坏,术中可见部分晶状体皮质外溢。术后SD大鼠眼部连续涂红霉素眼膏3d,每日1次,预防感染。术后1wk大鼠眼部伤口愈合,无明显感染迹象,在裂隙灯显微镜下可见明显的晶状体白色混浊,晶状体损伤模型建模成功。6只大鼠均建模成功,适用于后续实验研究。

1.2.3 建立晶状体损伤联合视神经损伤模型 6只SD大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(50mg/kg)全身麻醉,麻醉起效后左眼眼部涂0.5%硫酸阿托品凝胶充分散瞳,按照1.2.1和1.2.2方法建立晶状体损伤和视神经损伤模型,建模成功标准同上,6只大鼠均建模成功,适用于后续实验研究。

1.2.4 对照组 6只SD大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(50mg/kg)全身麻醉,麻醉起效后右眼眼部涂0.5%硫酸阿托品凝胶充分散瞳,仅开放眼眶暴露视神经,术后处理同前。术后术眼无感染的大鼠适用于后续实验研究。6只大鼠均纳入后续实验研究。

1.2.5 转录组测序

1.2.5.1 RNA提取鉴定和文库制备 建模成功后14d,视神经损伤组取视神经损伤区的组织为标本,对照组和晶状体损伤组取距眼球约0.2~0.5mm的视神经组织,提取总RNA后,在1%琼脂糖凝胶上电泳检测RNA降解和污染情况。使用Qubit[®] 2.0荧光光度计中的Qubit[®] RNA分析试剂盒,NanoPhotometer[®]分光光度计和生物分析仪2100系统的RNA Nano 6000 Assay Kit评估浓度、纯度、完整性。

每个测序样本的RNA总量为3 μ g,使用NEB Next UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina[®]生成基因文库测序,并将索引代码添加到每个组别不同样本的属性行列中,即用聚T寡聚糖连接的磁珠从总RNA中提取mRNA。在NEBNext(5 \times)第一链合成反应缓冲液中,用二价阳离子在升温条件下对mRNA进行裂解。使用MMuLV逆转录酶和随机六聚体引物合成第一链cDNA。使用RNA酶H和DNA聚合酶I进行第二链cDNA的合成,剩余的突出物通过核酸外切酶/聚合酶的活性转化为钝端。DNA片段3'端腺基化后,连接具有发夹环结构的NEBNext接头,从而为下一步杂交铺垫。应用AMPure XP系统对基因文库片段进行过滤筛选,选出长度为250~300bp的cDNA片段。然后,使用3 μ L的USER酶与大小选择、接头连接的cDNA在37 $^{\circ}$ C下反应15min,然后在95 $^{\circ}$ C下反应5min,最后行PCR。使用Phusion High Fidelity DNA聚合酶、Index引物和通用PCR引物进行PCR扩增,再用AMPure XP系统对PCR产物进行提纯。

基因文库建成后,用 Qubit2 荧光光度计对其初次定量,并将文库浓度调整为 $1.5\text{ng}/\mu\text{L}$,用 Agilent 2100 生物分析仪检测文库的插入规格。待插入片段大小与符合预期时,采用 qRT-PCR 准确定量文库的有效浓度。为确保基因文库质量其有效浓度须大于 $2\text{nmol}/\text{L}$ 。

应用 TruSeq PE Cluster Kit v3-CBOT-HS 在 CBOT 群集生成系统上对编码样本的群集进行索引。最后,生成簇后,在 Illumina NovaSeqTM 平台上对文库制备进行测序,并产生 $125\text{bp}/150\text{bp}$ 的成对末端阅读。

1.2.5.2 有参转录组差异基因表达分析 采用有参转录组无生物学重复模式,使用 Edger 程序包对于每个测序文库,通过一个标度归一化因子来调整读取计数,再进行差异表达分析。使用 Edger 软件包对两种条件进行差异表达分析。用 Benjamini&Hochberg 法调整 P 值。以校正 P 值为 0.05 ,折叠式变化绝对值 $[\log_2(\text{FoldChange})]$ 为 2 作为差异表达的阈值。分析将所有差异表达的基因映射到 GO 数据库中的每一项,计算每一项中的基因数量,筛选差异表达明显富集的基因。

1.2.6 qRT-PCR 实验

1.2.6.1 总 RNA 提取 建模成功后 $7, 14, 21, 28\text{d}$,过量麻醉处死 SD 大鼠,视神经损伤组取损伤区视神经组织称重,晶状体损伤组和对照组取距眼球约 $0.2\sim 0.5\text{mm}$ 的视神经组织,每取 0.1g 加入 $1500\mu\text{L}$ Trizol 溶液,放入去酶 EP 管中。采用 Trizol 法提取视神经总 RNA。采用 U-3010 微量分光光度计(日本)进行总 RNA 定量。

1.2.6.2 引物合成 采用 premier5.0 进行特异性引物设计,经 NCBIblast 基因库验证引物特异性,由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

1.2.6.3 mRNA 扩增 逆转录反应按照 PrimeScriptRTEnzymeMixI (TAKARA) 试剂盒说明书进行操作,构建 $20\mu\text{L}$ 反应体系,反应条件如下: $(1) 37^\circ\text{C}, 15\text{min}; (2) 85^\circ\text{C}, 5\text{s}; (3) 4^\circ\text{C}$ 保存。qRT-PCR 按照 TBGreenPremixExTaqII (TAKARA) 试剂盒说明书进行操作,构建 $20\mu\text{L}$ 扩增体系,反应条件如下: $95^\circ\text{C} (30\text{s}) \rightarrow [95^\circ\text{C} (5\text{s}) \rightarrow 60^\circ\text{C} (34\text{s}) \rightarrow 95^\circ\text{C} (15\text{s})] \times 40 \rightarrow 60^\circ\text{C} (1\text{min}) \rightarrow 95^\circ\text{C} (15\text{s})$ 。

1.2.7 ELISA 视神经损伤组取损伤区视神经组织称重,晶状体损伤组和对照组取距眼球约 $0.2\sim 0.5\text{mm}$ 的视神经组织称重,加入 9 倍重量的 PBS 溶液,匀浆后,用 $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min ,取上清液。用稀释液 $1:4$ 稀释上清液(均用复孔检测)后加入 $50\mu\text{L}$ 至微孔内,同时设置 MMP-12 梯度浓度标准品作为对照;将辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体($100\mu\text{L}$)加入微孔内, 37°C 温箱进行孵育 60min 。孵育完成后反复冲洗 96 孔板 5 次,加入底物 A 及底物 B 各 $50\mu\text{L}$,然后 37°C 避光孵育 15min 。最后,每孔加终止液 $50\mu\text{L}$, 15min 内在 450nm 波长下读取吸光度值,通过用标准品吸光度值绘制标准曲线,从而计算出各样本浓度。

统计学分析:采用 SPSS 11.0 软件进行分析,多组数据比较采用单因素方差分析,组间比较方差齐时采用 LSD- t 检验,方差不齐时采用 Tamhane's T_2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有参转录组测序结果

2.1.1 不同组别的主成因分析 对照组和视神经损伤组数据聚集(绿色线框),其第一主成因(PC1)和第二主成因(PC2)基本重合。晶状体损伤联合视神经损伤组的 PC1 为 94.83% (蓝色线框),在成因分析中所占比例最大,是基因表达变化中的主要因素;晶状体损伤组的 PC2 方差为 3.83% (蓝色线框),为次要因素(图 1)。

2.1.2 不同组间基因表达差异分析 视神经损伤组和对照组比较,差异基因数最少,为 164 个基因。晶状体损伤联合视神经损伤组和视神经损伤组比较,差异基因数最多,为 3396 个(表 2)。晶状体损伤联合视神经损伤组和对照组比较时,MMP-12(基因 ID: ENSRNOG00000030187)在晶状体损伤联合视神经损伤组清理数据为 1680.95 ,对照组的清理数据为 1.00 。定量分析比较两组间差异的倍数变化为 10.55 。晶状体损伤联合视神经损伤组的 MMP-12 的 $\log_2(\text{FoldChange})$ 值较高,基因表达上调 10 倍以上,对照组无明显上调。伴有晶状体损伤的各组中,均存在 MMP-12 基因表达上调。

2.2 不同时间各组间 MMP-12 的 mRNA 表达量比较 建模成功后 7d ,四组大鼠 MMP-12 mRNA 表达量比较,差异无统计学意义($F = 1.453, P > 0.05$)。建模成功后 14d ,四组大鼠 MMP-12 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义($F = 41.476, P < 0.01$);晶状体损伤联合视神经损伤组与对照组、视神经损伤组和晶状体损伤组比较,MMP-12 mRNA 显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$);其余各组间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。建模成功后 21d ,四组大鼠 MMP-12 mRNA 表达量比较,差异有统计学意义($F = 103.843, P < 0.01$);与对照组、视神经损伤组和晶状体损伤组比较,晶状体联合视神经损伤组 MMP-12 mRNA 显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$);晶状体损伤组与视神经损伤组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);其余各组间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。建模成功后 28d ,四组大鼠 MMP-12 mRNA 表达量比较,差异无统计学意义($F = 1.266, P > 0.05$),见图 2。

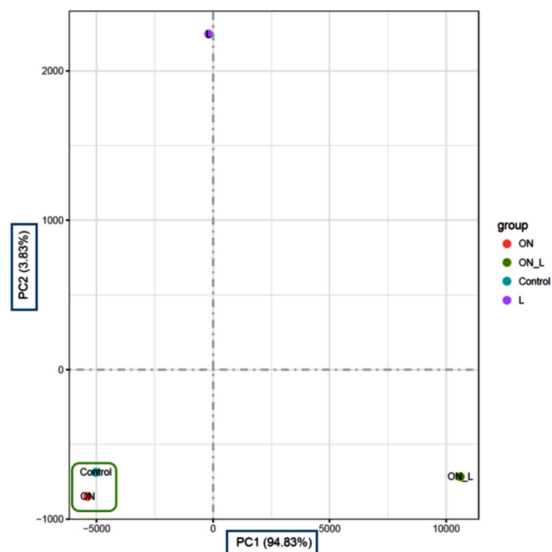


图 1 不同组别的主成因分析 绿色线框:对照组和视神经损伤组数据聚集;蓝色线框:晶状体损伤联合视神经损伤组的 PC1 方差为 94.83% ;晶状体损伤组的 PC2 方差为 3.83% 。

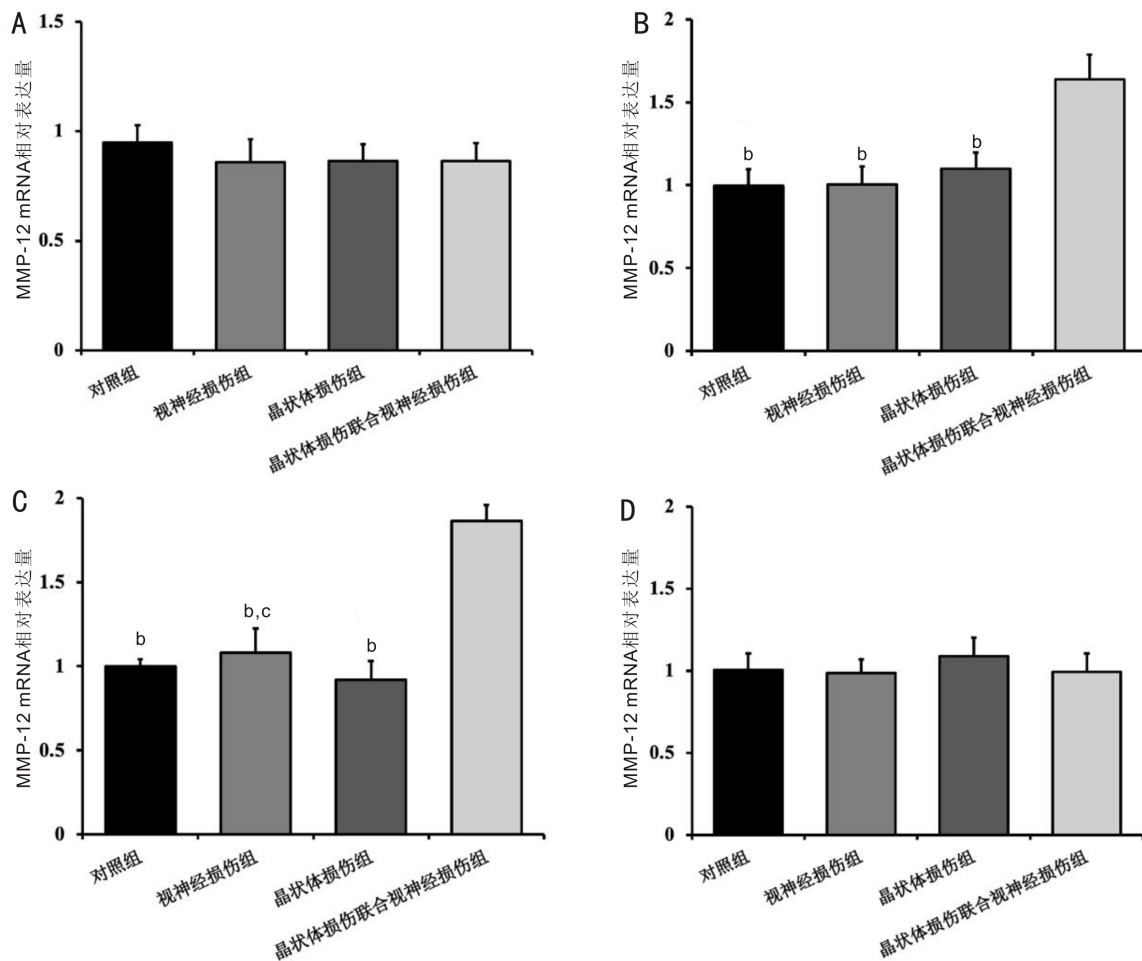


图2 不同时间各组间MMP-12的mRNA表达量比较 A:建模成功后7d;B:建模成功后14d;C:建模成功后21d;D:建模成功后28d;^b $P < 0.01$ vs 晶状体损伤联合视神经损伤组;^c $P < 0.05$ vs 晶状体损伤组。

表1 引物序列

基因名称(大鼠)	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
MMP-12(440bp)	TTGATGGCAAAGGTGCTA	TGAAGTAATGTTGCTGGC
GAPDH(292bp)	GTGCTGAGTATGTCCTGGAGTCT	ACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGA

表2 不同组间差异基因的数量

组间对照	差异基因数	上调基因数	下调基因数
视神经损伤组 vs 对照组	164	32	132
晶状体损伤组 vs 对照组	884	655	229
晶状体损伤联合视神经损伤组 vs 对照组	3219	1635	1584
晶状体损伤联合视神经损伤组 vs 视神经损伤组	3396	1573	1823
晶状体损伤联合视神经损伤组 vs 晶状体损伤组	725	299	426
视神经损伤组 vs 晶状体损伤组	874	736	138

2.3 不同时间各组间MMP-12蛋白表达量比较 建模成功后7d,四组大鼠MMP-12蛋白表达量比较,差异有统计学意义($F = 4.199, P < 0.05$)。晶状体损伤联合视神经损伤组与对照组和视神经损伤组比较,MMP-12蛋白显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),与晶状体损伤组比较上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。建模成功后14d,四组大鼠MMP-12蛋白表达量比较,差异有统计学意义($F = 8.143, P < 0.01$);晶状体损伤联合视神经损伤组与对照组和视神经损伤组比较,MMP-12蛋白表达显

著上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$);其余各组间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。建模成功后21d,四组大鼠MMP-12蛋白表达量比较,差异有统计学意义($F = 3.124, P < 0.05$)。晶状体损伤联合视神经损伤组MMP-12蛋白表达与对照组比较显著上调,差异有统计学意义($P < 0.01$),与视神经损伤组比较上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);其余各组间两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。建模成功后28d,四组大鼠MMP-12蛋白表达量比较,差异无统计学意义($F = 0.244, P > 0.05$),见图3。

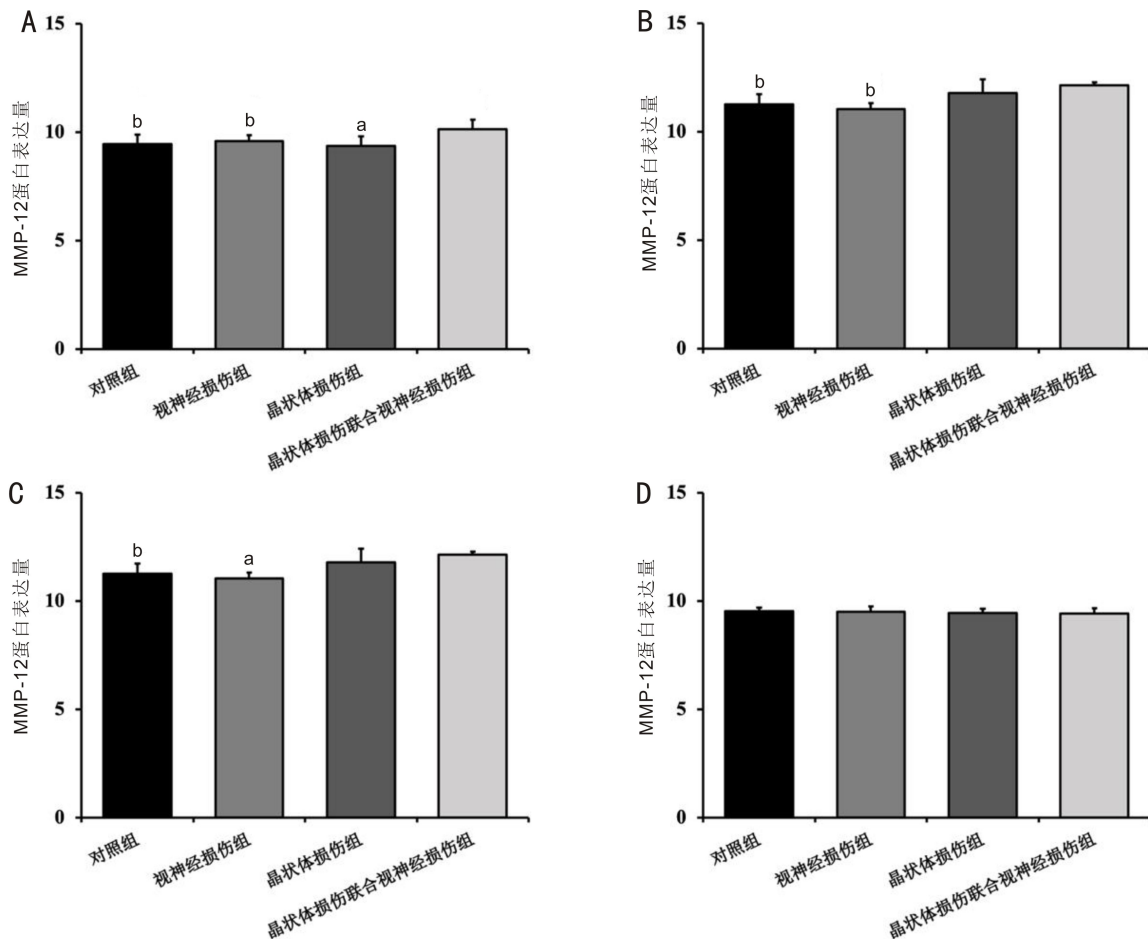


图3 不同时间各组间MMP-12蛋白表达量比较 A:建模成功后7d;B:建模成功后14d;C:建模成功后21d;D:建模成功后28d;^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 晶状体损伤联合视神经损伤组。

3 讨论

成年期哺乳动物视神经受损后再生困难^[7-8],是长期以来亟待解决的临床难题^[9-10]。既往研究提示,视神经损伤后轴突能够在移植的外周神经中再生^[11],提示视神经有内在的生长活性。一般情况下,钳压受损的视神经再生不超过2wk^[12],再生的轴突短,甚至不到几毫米,不能恢复视功能^[13]。在视神经受到挤压性损伤同时伴有晶状体损伤时,则会诱导受损的视神经轴突发生长时程再生,这种再生现象可以持续达1mo,且再生纤维可以达下丘脑(下级神经元所在区域)形成有效的突触连接,实验动物的视觉电生理有明显改善^[1-2]。在研究这种长时程再生的机制时,视神经损伤区域和损伤的晶状体中均未发现有脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-4(neurotrophin-4, NT-4)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等神经营养因子的表达;使用这些细胞因子相应的受体抑制剂也不能影响视神经节细胞的再生过程^[2],提示神经营养因子不是促进长时程再生的关键因子。

本实验转录组测序中,主成因分析显示:对照组和视神经损伤组数据聚集,而晶状体损伤联合视神经损伤组数据与它们离散,说明晶状体损伤联合视神经损伤大鼠模型具有不同于其它各组的基因差异表达模式,且晶状体损伤

联合视神经损伤组的PC1为94.83%,在成因分析中所占比例最大,是基因表达变化中的主要因素。晶状体损伤联合视神经损伤组,高表达的差异基因主要富集在细胞因子反应、白细胞淋巴细胞和正向免疫系统调节过程,这说明炎症反应可能参与了晶状体损伤诱导视神经损伤长时程再生过程。既往研究也发现炎症反应有促进视神经再生的作用^[14],与我们的结论一致。

MMP-12在生理状态下参与胚胎形成、新生血管的形成及伤口的愈合^[15],在病理状态下参与组织重构、风湿性关节炎、恶性肿瘤转移、动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)和急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的病理进程^[16-17];MMP-12能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及血管壁成分,从而促进肿瘤细胞的侵袭及转移,而且MMP-12还能激活其它MMPs从而促进水解过程^[18];MMP-12具有促髓鞘再生作用,它能诱导胰岛素样生长因子1/胰岛素样生长因子结合蛋白6复合体中释放具有活性的胰岛素样生长因子从而促进髓鞘形成并成熟^[19],MMP-12基因敲除小鼠表现出少突胶质细胞成熟和髓鞘形成延迟,降低小胶质细胞迁移活性并促进它的成熟,可以减缓星形胶质细胞病,有利于轴突再生^[20]。有研究也发现在NgR基因敲除的大鼠若同时存在眼内炎症,视神经轴突再生会增强^[21-22];而炎症浸润细胞,如:巨噬细胞和中性粒细胞,是在炎症促进视神经再生过程中起到调控作用的主体^[23-24]。

我们结合转录组测序结果,对晶状体损伤联合视神经损伤的SD大鼠视神经损伤区域组织进行qRT-PCR实验,检测MMP-12 mRNA的表达变化。晶状体损伤联合视神经损伤组的MMP-12 mRNA,在14、21d时表达显著上调,而在7、28d时,无升高。ELISA结果提示晶状体损伤联合视神经损伤组在第7、14、21d时,MMP-12的蛋白质表达显著升高,但在28d时,各组间表达无差异。提示晶状体损伤联合视神经损伤后的视神经长时程再生伴随有MMP-12的表达上调。既往研究提示MMP-12和MMP-9表达有促进视神经损伤的再生作用^[25],未有文献报道MMP-12在视神经长时程再生过程中的表达规律。

因此,我们认为MMP-12的表达上调可能参与晶状体损伤诱导视神经钳夹损伤后轴突长时程再生过程,但MMP-12发挥促轴突再生可能是综合作用的结果,其机制需要进一步研究探讨。

参考文献

- 1 Yang SG, Li CP, Peng XQ, *et al.* Strategies to promote long-distance optic nerve regeneration. *Front Cell Neurosci* 2020;14:119
- 2 Fischer D. Stimulating axonal regeneration of mature retinal ganglion cells and overcoming inhibitory signaling. *Cell Tissue Res* 2012;349(1):79-85
- 3 Böhm MRR, Prokosch V, Brückner M, *et al.* β 2-crystallin promotes axonal regeneration in the injured optic nerve in adult rats. *Cell Transplant* 2015;24(9):1829-1844
- 4 Thanos S, Böhm MRR, Meyerzu Hörste M, *et al.* Role of crystallins in ocular neuroprotection and axonal regeneration. *Prog Retin Eye Res* 2014;42:145-161
- 5 Duan X, Qiao M, Bei FF, *et al.* Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling. *Neuron* 2015;85(6):1244-1256
- 6 李雪颖, 李迪, 陈丽平, 等. 小鼠视神经损伤后视网膜中TLR-9与MyD88表达变化. *国际眼科杂志* 2022;22(6):916-919
- 7 Vanhunsel S, Bergmans S, Beckers A, *et al.* The age factor in optic nerve regeneration: intrinsic and extrinsic barriers hinder successful recovery in the short-living killifish. *Aging Cell* 2022;21(1):e13537
- 8 Fague L, Liu YA, Marsh-Armstrong N. The basic science of optic nerve regeneration. *Ann Transl Med* 2021;9(15):1276
- 9 潘统鹤, 黄亚特, 南开辉. 视神经再生的研究进展. *眼科学报* 2022;37(1):14-24
- 10 王晶莹, 王影, 赵子德, 等. 缺血性视神经病变相关分子的病理机制. *国际眼科杂志* 2021;21(7):1187-1190
- 11 Cen LP, Luo JM, Geng YQ, *et al.* Long-term survival and axonal

- regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection and a peripheral nerve graft. *Neuroreport* 2012;23(11):692-697
- 12 Yin YQ, Cui Q, Li YM, *et al.* Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 2003;23(6):2284-2293
- 13 Zhang S, Liu B, Zhu H, *et al.* A novel rat model with long range optic nerve injury to study retinal ganglion cells endogenous regeneration. *Neuroscience* 2021;465:71-84
- 14 李珊珊, 尤冉, 郭笑霄, 等. 视神经再生机制研究与进展. *中国组织工程研究* 2021;25(23):3740-3745
- 15 Aristorena M, Gallardo-Vara E, Vicen M, *et al.* MMP-12, secreted by pro-inflammatory macrophages, targets endoglin in human macrophages and endothelial cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):3107
- 16 Hohjoh H, Horikawa I, Nakagawa K, *et al.* Induced mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp-3, Mmp-12, and Mmp-13 in the infarct cerebral cortex of photothrombosis model mice. *Neurosci Lett* 2020;739:135406
- 17 Deng XS, Meng XZ, Li F, *et al.* MMP-12-induced pro-osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells. *J Surg Res* 2019;235:44-51
- 18 刘爽, 赵冬雪. 基质金属蛋白酶12的研究进展. *医学综述* 2018;24(14):2781-2786
- 19 Larsen PH, DaSilva AG, Conant K, *et al.* Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and-12 null mice. *J Neurosci* 2006;26(8):2207-2214
- 20 Hansmann F, Zhang N, Herder V, *et al.* Delayed astrogliosis associated with reduced MI microglia activation in matrix metalloproteinase 12 knockout mice during theiler's murine encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* 2019;20(7):1702
- 21 Li SS, He QH, Wang H, *et al.* Injured adult retinal axons with Pten and Socs3 co-deletion reform active synapses with suprachiasmatic neurons. *Neurobiol Dis* 2015;73:366-376
- 22 Yang M, Jian L, Fan W, *et al.* Axon regeneration after optic nerve injury in rats can be improved via PirB knockdown in the retina. *Cell Biosci* 2021;11(1):158
- 23 Li HY, Huang M, Luo QY, *et al.* Lycium barbarum (wolfberry) increases retinal ganglion cell survival and affects both microglia/macrophage polarization and autophagy after rat partial optic nerve transection. *Cell Transplant* 2019;28(5):607-618
- 24 De La Rosa-Reyes V, Duprey-Díaz MV, Blagburn JM, *et al.* Retinoic acid treatment recruits macrophages and increases axonal regeneration after optic nerve injury in the frog *Rana pipiens*. *PLoS One* 2021;16(11):e0255196
- 25 孙海燕, 张焕婷, 卞晓芸, 等. 牛磺酸对大鼠视神经损伤后MMP-2和MMP-9表达的促进作用. *眼科新进展* 2012;32(9):823-826