

大鼠外伤性白内障晶状体上皮细胞中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达

石云峰¹, 王峰², 谢志¹, 张爽¹, 廖伟¹

作者单位:¹(161006)中国黑龙江省齐齐哈尔市五官医院眼科;²(150086)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学眼科医院

作者简介:石云峰,女,副主任医师。

通讯作者:石云峰. sdfapple719@126.com

收稿日期:2010-02-21 修回日期:2010-03-23

Expression of MMP-2 and TIMP-2 in the lens epithelial cell of cataract induced by contusion in rats

Yun-Feng Shi¹, Feng Wang², Zhi Xie¹, Shuang Zhang¹, Wei Liao¹

¹Department of Ophthalmology, the Eye & Ear Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China;²Eye Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yun-Feng Shi. Department of Ophthalmology, The Eye & Ear Hospital of Qiqihar, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. sdfapple719@126.com

Received:2010-02-21 Accepted:2010-03-23

Abstract

• AIM: To investigate the expression and significance of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the rat traumatic cataract models.

• METHODS: Twenty healthy SD rats (weighing 250-300g) were used to establish traumatic cataract model on left eyes and then divided into post-traumatic 12, 24, 72 and 168 hours groups randomly. The expression of MMP-2 and TIMP-2 in lens epithelial cells (LEC) were examined by immunohistochemistry staining.

• RESULTS: In the post-traumatic 12 hours, lens opacity began to appear and aggravated as the time went by. Immunohistochemical results showed positive MMP-2 expression in the LEC of every traumatic groups. No expression of MMP-2 was detected in the compared eyes without surgery. But there was no statistical significance for TIMP-2 expression ($P > 0.05$). There was no correlation between the expression of MMP-2 and TIMP-2 ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: MMP-2 takes part in the formation process of traumatic cataract. The imbalance between the expression of MMP-2 and TIMP-2 may play a critical role in the generation and development of traumatic cataract.

• KEYWORDS: matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor

of metalloproteinase-2; traumatic cataract; lens epithelial cell

Shi YF, Wang F, Xie Z, et al. Expression of MMP-2 and TIMP-2 in the lens epithelial cell of cataract induced by contusion in rats. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):636-638

摘要

目的:探讨基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)及其抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)在大鼠外伤性白内障形成过程中所发挥的作用。

方法:正常成年SD大鼠20只,体质量250~300g,建立单眼晶状体穿通伤后外伤性白内障模型,并随机分为伤后12,24,72,168h 4个时相组。用免疫组织化学染色法检测MMP-2和TIMP-2在各组晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)中的表达情况。

结果:外伤后12h晶状体开始出现混浊,并随时间延长而加重。MMP-2在各外伤组LEC中均有较强的阳性表达,而在正常对照眼中无表达。TIMP-2的表达在各组LEC中差异均无显著意义($P > 0.05$)。MMP-2与TIMP-2阳性表达率间无相关性($P > 0.05$)。

结论:MMP-2参与了外伤性白内障形成的病理环节。MMP-2和TIMP-2表达失衡在外伤性白内障的发生和发展过程中发挥重要作用。

关键词:基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-2抑制剂;外伤性白内障;晶状体上皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.008

石云峰,王峰,谢志,等.大鼠外伤性白内障晶状体上皮细胞中MMP-2和TIMP-2的表达.国际眼科杂志2010;10(4):636-638

0 引言

基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)是降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜的一类重要酶类,金属蛋白酶组织抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)是MMP-2的特异性抑制物,ECM的稳定主要依赖于MMP/TIMP间的动态平衡。MMP/TIMP系统在多种眼科疾病中所起的作用是近年来的研究热点。外伤性白内障是眼球发生穿孔伤或钝挫伤后常见并发症之一,发病率为36%~52%,也是眼外伤致盲的主要原因之一,占视力致残者的28.1%。许多研究表明机械性损伤引起的晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)增生、移行和化生与外伤性白内障的发生发展密切相关,但目前尚无MMP-2和TIMP-2在外伤性白内障中发挥作用的相关报道。我们通过建立大鼠单眼外伤性白内障模型^[1],用免疫组织化学法检测外伤性白内障LEC中MMP-2/TIMP-2的表达情况。

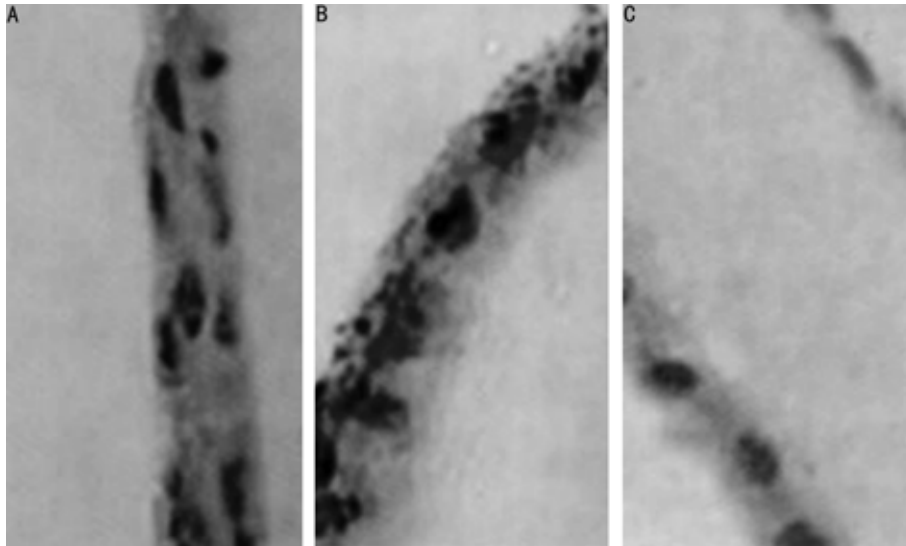


图1 各试验组 LEC 中 MMP-2 的表达情况 (SP × 200) A: 外伤后 12h; B: 伤后 168h; C: 对照眼。

1 材料和方法

1.1 材料 正常成年 SD 大鼠 20 只, 雌雄不限, 体质量 250 ~ 300g (哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供)。即用型兔抗大鼠 MMP-2 和 TIMP-2mAb (福州迈新生物技术有限公司)。SP 试剂盒和 DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。免疫组化步骤按 SP 试剂盒操作。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 阳性对照为购自福州迈新公司的标准阳性对照片。

1.2 方法 SD 大鼠左眼进行人为外伤制造外伤性白内障, 对侧眼作为对照。5g/L 托品酰胺扩瞳, 5g/L 氯胺酮按 10mL/kg 比例 ip 麻醉, 5g/L 利多卡因滴眼, 在手术显微镜下用一次性 1mL 注射器针头在角膜偏中央部位刺穿角膜, 并用针头将晶状体前囊划开 1.0mm × 1.5mm 切口, 自晶状体中央沿前囊切口长轴方向划开数次, 术毕结膜囊涂红霉素眼膏, 术后每天 5g/L 托品酰胺扩瞳。术后将大鼠随机分为伤后 12, 24, 72, 168h 4 个时相组, 每组 5 只, 在各时间点用裂隙灯显微镜观察晶状体混浊程度。术后 12h 可见晶状体在针头刺穿部位呈局限性混浊, 24h 混浊范围扩大, 但仍为淡白色云雾状, 72h 混浊加深、范围更大, 168h 后大部分呈白色混浊, 白色乳块状, 此后白内障发展趋于稳定。对照组晶状体透明, 未见明显混浊。将大鼠颈椎脱臼处死, 摘取双眼眼球, 40g/L 多聚甲醛固定, 做眼球前矢状面石蜡切片 (厚度为 5 μ m)。用免疫组织化学法检测 LEC 中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达情况, 步骤按 SP 试剂盒说明操作, 光学显微镜观察。以未行手术的对侧眼为对照, 处理同上。空白对照不加一抗, 阳性对照自福州迈新公司提供的阳性对照片。MMP-2/TIMP-2 阳性表达均为细胞胞质有呈黄色、棕黄色染色颗粒。每个晶状体标本选 3 张切片, 200 倍光学显微镜下计数全部 LEC 数和染色为阳性的细胞数, 并计算其所占的百分比即为阳性表达率。阳性表达率 0% 为阴性 (-); 1% ~ 25% 为弱阳性 (+); 26% ~ 50% 为阳性 (++) ; > 50% 为强阳性 (+++)。

统计学分析: 运用 SPSS 11.0 统计分析软件, 两组间率的比较采用 χ^2 检验, 两两指标相关性分析采用 Spearman 等级相关检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 MMP-2 的表达 外伤后 12h, 晶状体前囊膜破裂处的 LEC 还没有明显的增生迹象, 但胞质中已出现 MMP-2 阳

性表达的淡黄色颗粒着染 (图 1A); 外伤后 72h, 前囊膜下上皮细胞增生呈多层排列, 阳性着染明显; 外伤后 168h, 前囊膜下上皮细胞增生更明显, 并向后囊膜延伸, 后囊膜出现移行的上皮细胞, 阳性着染增强 (图 1B)。对侧眼组各时相的 LEC 胞质中均未见明显黄色、棕黄色颗粒 (图 1C)。外伤后不同时相的 LEC 中 MMP-2 的平均阳性表达率 (%) 为 41.4 ± 8.9 , 52.6 ± 7.5 , 71.4 ± 9.8 和 88.2 ± 8.0 , 每一时相进行组间比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 TIMP-2 的表达 实验眼组和对侧眼组各时间的 LEC 中, 均可见 TIMP-2 阳性表达, 胞质内有棕黄色颗粒。TIMP-2 的表达在外伤性白内障与正常晶状体相比较, 差异无显著意义 ($80\% vs 85\%$, $P > 0.05$)。

2.3 MMP-2 和 TIMP-2 表达的相关性 将外伤性白内障组和对侧眼组的 LEC 中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达情况作 Spearman 等级相关分析。MMP-2 和 TIMP-2 的阳性表达率间无相关性 ($r = 0.062$, $P > 0.05$)。

3 讨论

外伤性白内障是眼外伤的常见并发症, 其病理表现既有晶体蛋白的变性混浊, 又有 LEC 的过度增生和迁移。LEC 是晶状体内具有分裂能力的细胞, 在维持晶状体水电解质平衡、营养物质转运、气体交换等方面具有重要作用。该上皮细胞不断分化为晶状体纤维并形成晶状体囊膜, 晶状体囊膜由 LEC 分泌的基底膜样物质聚集而成, 在调节细胞正常的黏附、增殖、移行、分化等生物学行为中起重要作用。近年来有学者认为, 外伤性白内障是由于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 聚集、降解异常和 LEC 转化所致的一种纤维化疾病。Seomun 等^[2]研究表明, ECM 的异常降解能改变 LEC 和 ECM 间的相互作用, 引起细胞转化和基因表达异常, 从而导致晶状体前、后囊膜下纤维化。

晶状体囊是一层包绕整个晶状体、具有弹性的透明基底膜, 由胶原网状结构组成, 组织间隙充满黏多糖。主要成分为 IV 型胶原蛋白和层黏连蛋白, 是 MMP-2 的特异性底物^[3], TIMP-2 是 MMP-2 的特异性抑制剂, 两者在调节 ECM 的动态平衡中发挥重要作用。国内有学者对糖尿病性白内障进行研究^[4], 发现患者的 LEC 中 MMP-2 表达水平增高, 而 TIMP-2 的表达水平未伴随 MMP-2 增高, 两者的比例失衡使 ECM 中的 IV 型胶原和层黏连蛋白等降解增多, 使 LEC 发生上皮间质化, 并最终诱导了囊膜下型白内

障的形成。以上实验说明,MMP/TIMP 在白内障的发病机制中占重要地位。我们通过成功建立鼠外伤性白内障动物模型,观察伤后 12,24,72,168h 4 个时相 LEC 的增生和转移情况。用免疫组化法检测外伤性白内障和正常 LEC 中 MMP-2 的表达情况,结果发现正常 LEC 中无表达。而外伤性白内障中,从伤后尚无细胞增生的第 12h,到出现明显增生的第 72h,以及到细胞发生明显迁移的第 168h, MMP-2 在 LEC 内部均呈较强的阳性表达,这提示 MMP-2 涉及 LEC 异常行为的多个环节。我们推断外伤性白内障中,晶状体上皮细胞 MMP-2 表达增多,使晶状体 ECM 降解增多,正常上皮细胞周围的 ECM 成分发生改变,ECM 的正常结构和生理功能被破坏,影响了上皮细胞的生物活性及功能,导致细胞转化和基因表达异常,晶状体纤维再生、基底膜样物质的复制以及胶原合成的释放,引起囊膜下纤维化病变。因此,MMP-2 可能与外伤性白内障的发生发展密切相关。

正常生理状态时 MMPs 与 TIMPs 协同产生,维持动态平衡,在组织重建、细胞迁移、血管生成、伤口愈合等过程中发挥重要作用,这种平衡一旦被打破,EMC 代谢发生异常,可导致各种疾病并促进疾病恶化。Kawashima 等^[5]应用免疫组化法对白内障术后的晶状体囊膜进行检测,发现有 TIMP-1,-2 的阳性表达。Sachdev 等^[6]通过免疫组化、ELISA、酶谱分析等方法对白内障和正常晶状体进行对比研究,证实均有 TIMP-1,-2,-3 的表达。因此,TIMPs 在白内障及正常组织中均有阳性表达。TIMP-2 是 MMP-2 的特异性抑制剂,一般随 MMP-2 的表达而表达,两者相互作用、相互抗衡,其含量比例与 ECM 中各成分是否被破坏有关。本研究中,TIMP-2 在外伤性白内障和正常 LEC 中均有阳性表达,同 Kawashima 等报道的结果相一致,且两者阳性率相比较差异无显著性。另外,TIMP-2 在外伤性白内障组 LEC 中的表达与 MMP-2 的表达无相关性。这些都说明 TIMP-2 的表达并未随着 MMP-2 表达的增多而相应增多,MMP-2 和 TIMP-2 的表达明显失衡。由此可见,在外伤性白内障的病程中,LEC 表达 MMP-2 数量增多,而其

抑制剂的拮抗作用未相应提高,二者比例的失衡使晶状体 ECM 中的各种成分降解增多,导致正常 LEC 赖以增殖和生存的 ECM 组成成分发生改变,诱发白内障的形成。MMP-2 和 TIMP-2 在体内受多种形式的调控,如转录水平的调控、潜酶活化、其他抑制因子及负反馈调节等^[7]。机体内存在多种细胞因子和生长因子,它们可以调节 LEC 增殖和 ECM 合成,也可诱导或上调 MMP 和 TIMP 的表达,反过来 MMP 和 TIMP 对这些激活的细胞也具有促增殖作用。因此,在外伤性白内障的发生发展过程中 MMP-2/TIMP-2,ECM、细胞因子、生长因子等诸多因素间存在着复杂的网络调控机制,目前对这类复杂调控机制的认识还很肤浅,有待今后开展更深入研究。

参考文献

- 1 万光明,张效房. 外伤性白内障动物模型的制作探讨. 眼外伤职业眼病杂志 2002;24(6):617-618
- 2 Seomun Y, Kim J, Lee EH, *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells. *Biochem J* 2001;358(Pt1):41-48
- 3 Mackay AR, Gomez DE, Cottam DW, *et al.* Identification of the 72-kDa(MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase / type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. *Biotechniques* 1993; 15(6): 1048-1051
- 4 徐国兴,胡建章,郑卫东,等. 基质金属蛋白酶-2 和金属蛋白酶-2 组织抑制因子及转化生长因子 β_1 在糖尿病性白内障患者晶状体上皮细胞的表达及意义. 中华眼科杂志 2003;39(7): 411-414
- 5 Kawashima Y, Saika S, Miyamoto T, *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases of fibrous humans lens capsules with intraocular lenses. *Cur Eye Res* 2000;21(6): 962-967
- 6 Sachdev NH, Grolamo ND, Nolan TM, *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in the human lens: implications for cortical cataract formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):4075-4082
- 7 Tamiya S, Wormstone IM, Marcantonio JM, *et al.* Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens. *Exp Eye Res* 2000;71(6):591-597