

# 骨形成蛋白-7 在大鼠角膜损伤愈合的表达及作用

陈盛举<sup>1</sup>,任婉娜<sup>1</sup>,胡彩丽<sup>1</sup>,蒲英<sup>1</sup>,李丽<sup>2</sup>,杜宇<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(730030)中国甘肃省兰州市,兰州大学第二医院眼科;<sup>2</sup>(300000)中国天津市,解放军第254医院眼科中心

作者简介:陈盛举,毕业于兰州大学医学院,硕士,副主任医师,副主任,研究方向:白内障。

通讯作者:任婉娜,毕业于兰州大学医学院,硕士,主治医师,研究方向:斜弱视,角膜病。renwanna@126.com

收稿日期:2013-04-07 修回日期:2013-08-12

## Expression patterns and effect of bone morphogenetic protein 7 on corneal wound healing in rats

Sheng-Ju Chen<sup>1</sup>, Wan-Na Ren<sup>1</sup>, Cai-Li Hu<sup>1</sup>, Ying Pu<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Yu Du<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China; <sup>2</sup>Eye Center of No. 254 Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300000, China

Correspondence to:Wan-Na Ren. Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. renwanna@126.com

Received:2013-04-07 Accepted:2013-08-12

### Abstract

• AIM: To observe the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) during corneal wound healing in rats, and to discuss the effects of BMP-7 on corneal wound healing.

• METHODS: Totally 42 male Wistar rats were divided into seven groups, six rats in each group and one of the groups as control group. The experimental groups were made into cornea model by needle puncture at their corneas of right eyes. The corneas were surgically removed at six different time points (6h, 1d, 3d, 5d, 7d, 14d) after operation. The localization and expression of BMP-7 was determined by immunohistochemical methods and computer image analysis.

• RESULTS: The expression of BMP-7 of experimental groups gradually rose on the 1<sup>st</sup> day and 3<sup>rd</sup> day in the injured corneal epithelium after operation and significant difference ( $P < 0.05$ ). Then it decreased gradually on the 5<sup>th</sup> day. And it reached the normal level on the 14<sup>th</sup> day.

• CONCLUSION: BMP-7 is expressed in cornea of rats and may play a negative role on corneal wound healing after injury.

• KEYWORDS: bone morphogenetic protein 7; cornea; rats; needle puncture; wound healing

Citation: Chen SJ, Ren WN, Hu CL, et al. Expression patterns

and effect of bone morphogenetic protein 7 on corneal wound healing in rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(9):1751-1753

### 摘要

目的:通过观察大鼠角膜损伤愈合过程中骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)的表达规律来探讨其在大鼠角膜损伤愈合过程中可能发挥的作用。

方法:雄性 Wistar 大鼠 42 只,随机分为 7 组,每组 6 只,其中一组为正常对照组,动物模型组均取右眼制造角膜针刺损伤模型。于损伤后各时间点(6h;1,3,5,7,14d)取角膜标本,HE 染色行组织病理学检查,免疫组织化学染色观察 BMP-7 的表达与分布,计算机图像分析系统对结果进行分析。

结果:鼠角膜上皮 BMP-7 的表达于损伤后 1,3d 逐渐升高( $P < 0.05$ );损伤后 5d 时表达逐渐降低,至损伤后 14d 时表达恢复正常。角膜基质层及角膜内皮层中 BMP-7 的表达未见明显变化。

结论:BMP-7 在大鼠角膜上皮层均有表达,可能作为负性的生长因子参与角膜损伤愈合过程。

关键词:骨形成蛋白-7;角膜;大鼠;针刺损伤;愈合

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.09.03

引用:陈盛举,任婉娜,胡彩丽,等.骨形成蛋白-7 在大鼠角膜损伤愈合的表达及作用.国际眼科杂志 2013;13(9):1751-1753

### 0 引言

骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)又称骨形态发生蛋白,是转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族中具有多种功能的一种细胞因子<sup>[1]</sup>。BMPs 通过与其受体的相互作用调节多种细胞的增殖、分化、黏附、迁移和再生<sup>[1]</sup>。角膜损伤是一类临床上常见的疾病,角膜的损伤修复是一个复杂的过程,此过程是由多种细胞和众多细胞因子在时间和空间上高度协调而完成的。随着研究的深入,骨形成蛋白与眼的关系十分密切,不仅在眼的发育过程中发挥着重要作用,还参与调节眼部各组织的正常生理功能,并且与某些眼部疾病也有关系<sup>[2]</sup>。目前国内对 BMP-7 在眼部的表达及作用的研究尚处于起步阶段。本课题通过观察大鼠角膜损伤愈合过程中骨形成蛋白-7(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)的表达规律来探讨 BMP-7 在大鼠角膜损伤愈合过程中可能发挥的作用,为合理利用 BMP-7 促进或控制角膜组织中各种细胞的生长提供依据,为有效治疗角膜损伤提供新的思路和有效策略。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物分组及模型建立 健康成年雄性 Wistar 大鼠 42 只,体质量 150 ~ 280g,无眼疾患(兰州大学医学部实

验动物中心提供)。分为正常对照组(6只)和动物模型组(36只)。动物模型组均取右眼制造角膜针刺创伤模型(参照 Larry 等<sup>[3]</sup>报道的针刺损伤角膜法制作动物模型),即采用10%水合氯醛(40mg/kg)腹腔内麻醉后,5g/L地卡因滴眼2次,用无菌7号针头针刺大鼠右眼角膜,深度为角膜全层的1/3~2/3,针刺范围为2mm区域的角膜。根据损伤后取材时间不同将其分为6h;1,3,5,7,14d组,共计6组,每组6只。

**1.1.2 取材及标本制备** 动物模型组分别于术后各时间点颈椎脱臼法处死,立即摘除全眼球,4%甲醛固定后剥离眼球,取角膜组织,石蜡包埋后,切片。

## 1.2 方法

### 1.2.1 染色

**1.2.1.1 HE 染色** 切片常规脱蜡,苏木精染色,盐酸酒精分色,伊红染色。

**1.2.1.2 免疫组化 SABC 法** 角膜组织切片常规脱蜡至水,经3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶10min,10g/L牛血清白蛋白封闭20min,加浓度为1:50的BMP-2单克隆抗体(购于武汉博士德生物工程有限公司),4℃过夜,PBS冲洗后加生物素化的羊抗兔IgG,37℃,20min后PBS冲洗,然后再加SABC,37℃,20min后PBS冲洗。DAB显色,苏木素对比染色,脱水,透明,封片。切片均在同一条件下进行处理。PBS代替一抗做阴性对照,大鼠软骨切片做阳性对照。

**1.2.2 免疫组化染色结果判断和评定** 光镜观察,以细胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞,其结果评定采用等级评分法:细胞浆无特异性着色者为阴性(-);细胞浆轻度特异性着色,呈浅棕黄色者为弱阳性(+);细胞浆中度特异性着色,呈棕色者为中度阳性(++);细胞浆明显着色,呈深棕色者为强阳性(+++)。

**1.2.3 图像分析** 采用HPIAS-1000高清晰度彩色图像分析系统测定阳性表达物的平均灰度值(mean gray, MG),灰度值0(黑色,表达最强)~255(白色,无表达),即值越高表达越弱。方法如下:每组取6张切片,每张切片中由于在角膜的上皮、基质和内皮中的表达差异较大,故分别在以上3个部位随机取3个视野(200倍)作图像分析,计算6切片的平均灰度。

统计学分析:数据采用SPSS 19.0统计软件分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述并采用完全随机设计方差分析,组间多重比较采用SNK-q检验; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HE 染色光镜观察结果** 正常对照组大鼠角膜各层排列整齐,未见明显病理学的改变。动物模型组损伤后6h,角膜创缘不整,部分角膜上皮细胞脱落,基质层排列尚整齐。损伤后1d,创缘水肿,角膜上皮层细胞层数减少,细胞排列不整,部分细胞极性紊乱,上皮下基底细胞可见少量核分裂,角膜基质层轻度水肿、增厚。损伤后3d,角膜上皮细胞排列不规则,角膜基质层明显增厚,纤维母细胞肥大增生,基质浅层细胞数增多,并可见少量炎症细胞。损伤后5d,创面大部分修复,细胞排列整齐,胶原纤维增多但纤维排列密度低于正常。损伤后7d,创面完全修复,各层细胞排列整齐,基质层较正常轻度增厚。损伤后14d,组织学上已恢复正常。

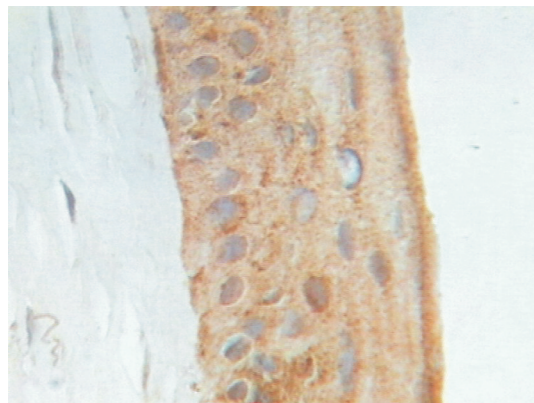


图1 BMP-7在大鼠正常角膜上皮的表达(SABC×400)。

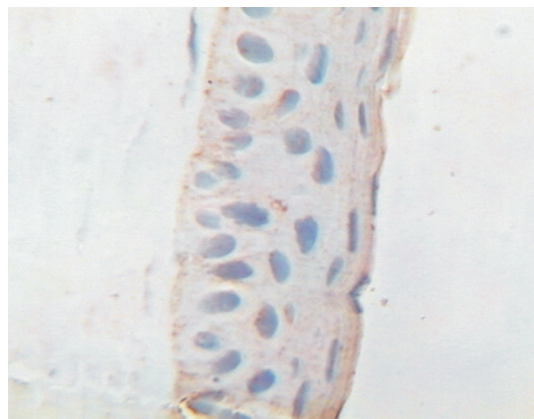


图2 BMP-7在损伤第5d大鼠角膜上皮的表达(SABC×400)。

**2.2 免疫组织化学结果** 正常对照组中,大鼠角膜各层均可见BMP-7的表达,其中角膜上皮细胞强烈表达,以胞浆为主,近角膜上皮基部表达逐渐增强(图1);基质层中等强度表达:内皮细胞强阳性表达,胞浆及少量胞核均有表达。动物模型组角膜损伤后6h,1d,角膜上皮细胞胞浆中黄色细颗粒状物质的表达较正常未见明显变化,仍为强阳性表达,表达的阳性强度约+++;损伤后3d,角膜上皮细胞胞浆内阳性颗粒较正常及损伤后6h,1d组有所减少,表达的阳性强度约++~+++;至损伤后5d时,角膜上皮层表面细胞及翼状细胞中阳性颗粒较正常及前面各组明显减少,染色明显变浅,角膜上皮基部基底细胞层的表达轻度下降,约为+~++(图2);损伤后7d,角膜上皮层染色较5d时变深,但较正常对照组表达仍浅,表达的阳性强度约++;损伤后14d,角膜上皮层胞浆内染色变深,棕黄色颗粒增多,基本接近正常水平的表达,表达的阳性强度约+++。各时间点中,角膜基质层中BMP-7的表达未见明显变化,阳性强度约为+~++。

角膜内皮细胞中BMP-7表达也未见明显变化,呈阳性表达,表达的阳性强度约++~+++。

**2.3 免疫组化计算机图像分析结果** 计算机图像分析系统测量角膜不同部位BMP-7阳性表达的平均灰度值。其各时段不同部位表达BMP-7的灰度值的均值变化见表1。

**2.4 统计结果分析** 动物模型组角膜上皮层表达的BMP-7的灰度值于损伤后6h开始升高,但与正常对照组相比,无显著性差异( $q=3.57, P=0.442 > 0.05$ );损伤后1,3d时,灰度值逐渐升高,与正常对照组相比,有显著性差异( $q=22.15, 33.09; P$ 均 $=0.000 < 0.01$ );至损伤后5d时,



表1 大鼠角膜损伤后各时间段不同部位 BMP-7 平均灰度的变化  $\bar{x} \pm s$ 

组别	角膜上皮层	角膜基质层	角膜内皮层
正常对照组	163.77±6.67	196.98±5.78	169.80±9.42
动物模型组			
6h组	166.50±6.37	193.40±4.8	173.26±10.93
1d组	180.72±4.63	204.51±7.91	177.61±4.83
3d组	189.09±5.29	205.52±11.05	179.02±9.57
5d组	191.76±4.02	205.40±13.92	173.95±14.16
7d组	186.39±3.27	203.39±11.31	171.86±11.20
14d组	169.05±9.89	194.20±7.94	165.60±12.61
F	21.737	1.970	1.081
P	0.000	0.097	0.393

灰度值达到最高值,与正常对照组相比,有显著性差异( $q=36.58, P=0.000<0.01$ );损伤后7d,灰度值较正常对照组高( $q=29.56, P=0.000<0.01$ ),但较5d组有所减低,但无显著性差异( $q=7.02, P=0.135>0.05$ )。

动物模型组角膜内皮层、基质层各时间点表达的 BMP-7 的灰度值与正常对照组相比,均无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

BMP-7 称为成骨蛋白-1(osteogenic protein-1, OP-1),是 BMPs 中的一个亚组<sup>[4]</sup>,BMPs 对角膜的代谢平衡和损伤愈合过程都发挥作用<sup>[1]</sup>。眼组织中,尤其是角膜组织的发育过程复杂,并需要多种 BMPs 成员及其他细胞因子的参与。BMP-7 对于眼发育的过程具有重要的影响。Michael 等的研究进一步评价 BMP-7 在眼球组织中的作用<sup>[5]</sup>。最初,BMP-7 信号广泛表达于神经上皮,随后限制在神经视网膜上,然后表达于诱导的晶状体和角膜上皮,胚胎 13.5d, BMP-7 就在角膜上持续表达,所以,在眼的发育过程中, BMP-7 不仅是视网膜、晶状体发育中的必需调节信号,也可能是角膜发育中的必需调节信号。Robert 等认为, BMP 信号传导通路在角膜和晶状体细胞分化的过程中起到了直接的作用<sup>[6]</sup>。Michael 等的研究结果显示,在眼的形成过程中, BMP-7 是必需的<sup>[5]</sup>。

角膜损伤是一类临床上常见的疾病。轻微的角膜损伤,仅可涉及角膜上皮层,修复后可不留任何痕迹。严重者可伤及角膜全层,甚至波及其他的组织。各种角膜屈光手术、角膜移植术以及涉及到角膜的各种手术操作,也同时是对角膜的损伤。因此,研究角膜损伤的修复过程,具有重要的临床意义。本研究结果显示,在大鼠正常角膜上皮及内皮中, BMP-7 呈强阳性表达,基质中亦有 BMP-7 的表达。在角膜损伤后, BMP-7 的表达呈一动态变化过程:角膜损伤后 6h,角膜上皮细胞胞浆中的表达接近正常水平,推测在损伤早期 BMP-7 尚未被消耗,含量无明显变化;角膜损伤后 1,3d,角膜上皮细胞胞浆内阳性颗粒较正常有所减少;角膜损伤后 5d,角膜上皮细胞胞浆中阳性颗粒较正常及其他各组明显减少( $P<0.05$ ),染色明显变浅,而角膜上皮基底部基底细胞的表达轻度下降,推测此时, BMP-7 被大量消耗,消耗的部分用于参与角膜的损伤愈合过程,因此表达明显下降,而角膜上皮基底部可能是产生 BMP-7 的部位,或者是 BMP-7 含量较高的部位,或者是 BMP-7 在大量产生的同时因参与修复再生而被消耗,因此,虽然在损伤后表达有所下降,但下降不显著;角膜损伤后 7d,角膜上皮层染色较前变深,

可能此时, BMP-7 含量在逐渐增加;角膜损伤后 14d,角膜上皮层 BMP-7 的表达与正常对照组相比已基本恢复正常水平。各时间点中,角膜基质层中的 BMP-7 的表达未见明显变化,虽然组织学上有纤维母细胞的增生,新生血管形成参与再生,但可能由于该角膜损伤模型造成的损伤较浅,或此部位 BMP-7 含量较稳定,故变化不明显。各时间点中,角膜内皮细胞中的 BMP-7 均呈强阳性表达,表达在损伤后未见明显变化,可能由于该角膜损伤模型只损伤到了角膜全层的前 1/3 ~ 2/3,未能影响到角膜内皮,因此表达未见明显变化,也可能由于角膜损伤后内皮细胞产生了大量 BMP-7,损伤未能过度损耗该部位的 BMP-7,所以表达仍呈强阳性。此实验结果与 Jeevan 等的研究相似,其认为在视网膜损伤时,视网膜色素上皮的 BMP 可作为负性的生长因子而被下调,它参与了视网膜损伤后的修复过程,它的作用可能是控制增殖性视网膜疾病损伤的过度修复<sup>[7]</sup>。

You 等<sup>[8]</sup>研究结果表明,体外培养的角膜上皮及基质内可查见 BMP-7 的转录,细胞因子在培养的角膜基质表达水平较高,而其受体在培养的角膜上皮中表达水平较高。尽管 BMP 对角膜的作用机制尚不清楚,但 BMP-7 及其受体在角膜中的表达,提示他们对成人角膜似乎也起作用。You 等<sup>[8]</sup>进一步推断 BMP-7 是上皮细胞和基质功能的重要调节者。

综上所述, BMP-7 可以保持大鼠角膜代谢的平衡及维持大鼠角膜的生理功能,在大鼠角膜损伤愈合过程中,在角膜的各部位均有表达,在角膜上皮层表达的变化呈现一定的规律性,而在角膜基质层和内皮层的表达未见明显变化。在损伤愈合过程中, BMP-7 可能作为负性的生长因子参与角膜损伤愈合过程。因此,通过该研究我们认为, BMP-7 可能在大鼠角膜损伤愈合的表达及作用中至关重要,也为角膜损伤修复选择一个治疗方法提供指导,但骨形成蛋白参与调节角膜损伤愈合过程的具体过程及详细机制还有待于进一步的研究。

### 参考文献

- 1 Carl A, Kirker H. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic protein. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 43 (1): 65-92
- 2 Wordinger RJ, Clark AF. Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye. *Exp Biol Med* 2007; 232(8): 979-992
- 3 Larry F, Rich MD, Viginia L, et al. Stimulation of corneal wound healing with mesodermal growth factor. *Arch Ophthalmol* 1979; 97: 1326-1330
- 4 Sabourin CL, Kusewitt DF, Applegate LA, et al. Expression of fibroblast growth factors in ultraviolet radiation - induced corneal tumors and corneal tumor cell lines from *Monodelphis domestica*. *Mol Carcinog* 1993; 7(3): 197-205
- 5 Solursh M, Langille RM, Wood J, et al. Osteogenic Protein-1 is Required for Mammalian Eye Development. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218(2): 438-443
- 6 Day RC, Beck CW. Transdifferentiation from cornea to lens in *Xenopus laevis* depends on BMP signalling and involves upregulation of Wnt signaling. *Dev Biol* 2011; 11: 54
- 7 Mathura JR Jr, Jafari N, Chang JT, et al. Bone Morphogenetic Proteins-2 and -4: Negative Growth Regulators in Adult Retinal Pigmented Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(2): 592-600
- 8 You L, Kruse FE, Pohl J, et al. Bone morphogenetic proteins and growth and differentiation factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(2): 296-311