

· 葡萄膜炎研究 ·

内毒素诱导性葡萄膜炎眼中 NO 含量和基质金属蛋白酶-9 及其组织型金属蛋白酶抑制剂-1 与诱导型 NO 合酶的表达

王毓琴 胡维琨 张晓农 王毓林

【摘要】 目的 观察基质金属蛋白酶(MMP)-9 及其组织型金属蛋白酶抑制剂(TIMP)-1、一氧化氮(NO)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在内毒素诱导性葡萄膜炎(EIU)眼组织中的变化。方法 90 只 Sprague-Dawley (SD)大鼠随机分为实验组(81 只)和对照组(9 只)。实验组大鼠双后足垫注射伤寒杆菌内毒素(LPS)200 μ l 建立 EIU 模型;对照组大鼠不予注射。在 LPS 注射后 0、6、12、18、24、48、72、96 h 和 7 d 分别处死 9 只实验组大鼠,观察眼部改变并进行组织病理学检查。检测血浆、房水和葡萄膜组织的 NO 含量和房水蛋白浓度。免疫组织化学方法和计算机图像分析系统检测 MMP-9、TIMP-1 和 iNOS 的表达及其平均吸光度[A,旧称光密度(OD)]值。结果 虹膜、睫状体的上皮细胞和渗出的炎性细胞表达 iNOS、MMP-9 和 TIMP-1。房水蛋白浓度,血浆、房水和葡萄膜组织中 NO 含量,以及 MMP-9 的 A 值与炎症程度呈正相关,iNOS 和 TIMP-1 的 A 值与炎症程度无明显相关性。iNOS 在 LPS 注射后 6 h 可见表达,12 h 达高峰,以后逐渐下降。TIMP-1 表达出现于 24 h,72 h 时达高峰。结论 在 EIU 发生、发展过程中,MMP-9、TIMP-1、NO、iNOS 的含量或表达发生变化,提示它们参与 EIU 的病理过程。

【关键词】 内毒素炎; 葡萄膜炎; 基质金属蛋白酶; 金属蛋白酶类抑制剂; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶

中图分类号:R773.9 R773 R446.39

The contents of nitric oxide, and expressions of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and inducible nitric oxide synthase in endotoxin induced uveitis WANG Yu-qin, HU Wei-kun, ZHANG Xiao-nong, et al. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: ZHANG Xiao-nong, Email: zhangxiaonong@163.com

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), its tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and contents of nitric oxide (NO) in the ocular tissues of Sprague-Dawley (SD) rats with endotoxin induced uveitis (EIU). **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into experimental (81 rats) and control group (9 rats). The model of EIU was induced in rats in experimental group by injecting with lipopolysaccharide (LPS) 200 μ l into the hind feet pads, while the rats in the control group were not injected. Nine rats were executed 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 hours and 7 days, respectively, after injecting with LPS; the NO content and concentration of protein in the aqueous humor in blood plasma, aqueous humor, and uveal tissues were detected. The expressions of MMP-9, TIMP-1 and iNOS in the ocular tissues were detected by immunohistochemistry, and the average absorbance (A) value was evaluated by computer medical image analysis system. **Results** iNOS, MMP-9 and TIMP-1 expressed in the epithelial cells of iris and ciliary body and exudated inflammatory cells of rats. The concentration of protein in the aqueous humor, the contents of NO in blood plasma, aqueous humor, and uveal tissues, and A value of MMP-9 had obvious relativity with the inflammatory extent, while no positive correlation was found between the inflammatory extent and the A value of iNOS and TIMP-1. Expression of iNOS was found 6 hours after injection, reached the peak after 12 hours, and then dropped gradually. The expression of TIMP-1 could be seen 24 hours after injection, and reached its peak after 72 hours. **Conclusion** The content of NO and expressions of iNOS, MMP-9 and TIMP-1 changes from the beginning and during the development of EIU, which suggests that NO, iNOS, MMP-9 and TIMP-1 are involved in the pathologic process of EIU.

【Key words】 Endotoxin; Uveitis; Matrix metalloproteinases; Tissue inhibitor of metalloproteinases; Nitric oxide; Nitric-oxide synthase

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科
(王毓琴、王毓林,现在广州中山眼科中心医院)
通讯作者:张晓农,Email: zhangxiaonong@163.com

内毒素诱导的葡萄膜炎(EIU)动物模型是一种较好的人类葡萄膜炎模型^[1],目前报道其炎症消退的机

制可能与淋巴细胞的凋亡、细胞因子的活化等有关^[18]。但对葡萄膜炎中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9), 及其组织型金属蛋白酶抑制剂 (TIMP-1) 的表达和葡萄膜组织中一氧化氮 (NO) 浓度的研究国内外较少报道。我们用伤寒杆菌内毒素 (LPS) 在 Sprague Dawley (SD) 大鼠建立内毒素诱导性葡萄膜炎 (EIU) 模型, 观察在 LPS 注射后不同时间点葡萄膜组织、房水和血浆中 NO 的含量, 以及葡萄膜组织中 MMP-9、TIMP-1 和 iNOS 的表达变化, 初步探讨 MMP-9、TIMP-1 和 NO、iNOS 在 EIU 模型中炎症转归的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

SD 大鼠 90 只 (Ⅱ级), 6~8 周龄, 健康无眼疾, 体重 0.15~0.18 kg, 雌雄不限, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供。随机分为 2 组: 实验组大鼠 81 只, 参照文献^[5]的方法, 在每只大鼠双后足垫注射 LPS 200 μ l (将 LPS 溶于无菌生理盐水中, 使溶液浓度为 1 g/L), 分别在 LPS 注射后 0、6、12、18、24、48、72、96 h 和 7 d 处死 9 只大鼠; 对照组 9 只大鼠不予注射。

1.2 主要试剂

LPS 为美国 Sigma 公司产品, NO 试剂盒为深圳晶美生物有限公司产品, 兔抗大鼠 TIMP-1 多克隆抗体、山羊抗大鼠 MMP-9 多克隆抗体, 兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 链霉素抗生素蛋白-过氧化酶连接 (SP) 试剂盒 HistostainTM plus 为美国 Zymed 公司产品。

1.3 检测指标和方法

水合氯醛按 0.3 g/kg 的剂量腹腔注射麻醉大鼠。各组大鼠在注射后的各个时间点进行裂隙灯检查, 参照葡萄膜炎炎症分级标准^[19]进行临床评分。各组分别取 3 只大鼠的眼球用于石蜡切片, 参照文献^[7]的方法进行常规 HE 和免疫组织化学染色, 并对免疫组织化学染色切片进行计算机图像分析, 以检测阳性细胞的平均吸光度 [A, 旧称光密度 (OD)] 值; 另 6 只大鼠用于获取血浆、房水和葡萄膜组织样本, 检测各组样本中 NO 的含量和房水蛋白浓度。

直视下抽取心脏血液, 以离心半径 20 cm, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液获取血浆样本。手术显微镜下, 用微量进样器由透明角膜前房穿刺, 收集房水, 以离心半径 20 cm, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液获取房水样本。角膜缘后 1 mm 环形剪开眼球, 撕下虹膜、睫状体和脉络膜, 称重后加入适量三蒸水, 研磨制成 5% 匀浆, 以离心半径 20 cm,

10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液获取葡萄膜组织样本。参照 NO 试剂盒说明书, 采用硝酸还原酶法检测血浆的 NO 含量。

采用 Gene Quant RNA/DNA Calculator 检测仪测定蛋白浓度。取 100 μ l 双蒸水加入比色杯, 调零, 吸弃。加入 100 μ l 待测房水样本, 记录 320、280、260 nm 波长的 A 值。按公式 $Pr = 1.55 \times (A_{280nm} - A_{320nm}) - 0.76 \times (A_{260nm} - A_{320nm})$ 算出蛋白浓度。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经计算机 SPSS11.0 软件采用 AVOVA 分析的最小显著差异检验 (LSD) 法进行统计学分析。

2 结果

实验组大鼠双眼均诱导出现临床可见的葡萄膜炎, 于 LPS 注射后 6 h 出现房水闪辉, 24 h 达炎症高峰, 瞳孔缩小, 虹膜重度充血 (图 1), 前房大量纤维索性渗出, 甚至积脓, 以后逐渐减轻, 7 d 时基本消退。将 LPS 注射后 12、18、24、48、72 h 组的临床评分值分别与上一组值相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

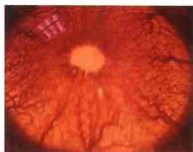


图 1 注射 LPS 24 h 后鼠眼裂隙灯显微镜下彩色像。虹膜重度充血 $\times 16$

Fig. 1 Photochrome of slit lamp microscope of the eye of a rat 24 hours after LPS injection. Serious hyperemia of iris $\times 16$

实验组大鼠注射 LPS 后 24 h, 可见大量中性粒细胞浸润于虹膜、睫状体、前房 (图 2) 及玻璃体、视网膜组织 (图 3), 且前房内充满纤维索性渗出物。对照组无炎症表现。

实验组大鼠房水、血浆和葡萄膜组织中 NO 含量均在 LPS 注射后 6 h 显著增高, 24 h 达到高峰, 以后含量逐渐降低。在同一实验组的 3 个组织样本中, 以房水的 NO 含量升高最为显著 (表 1)。

实验组大鼠房水蛋白浓度在 LPS 注射后 12 h 明显升高, 与对照组及 LPS 注射后 6 h 相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 LPS 注射后 24 h 房水蛋白浓度达到高峰; 在 96 h 时基本降至基线水平, 与 0 h 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 LPS 注射后各时间点大鼠的临床评分, 房水蛋白浓度, 以及血浆、房水、葡萄膜中 NO 的含量

组别	临床评分(分)	房水蛋白浓度(mg/ml)	不同组织中 NO 的含量($\mu\text{mol/L}$)		
			血浆	房水	葡萄膜
对照组	0.20±0.15	3.71±0.45	8.59±1.30	69.06±4.08	356.17±10.79
实验组 0 h	0.20±0.15	3.64±0.45	8.81±1.47	61.05±7.19	369.59±34.20
实验组 6 h	1.40±0.55**	2.57±1.24	26.32±3.59**	339.64±29.02**	427.68±28.85**
实验组 12 h	2.40±0.55**	3.75±1.04**	43.41±4.47**	395.03±13.62**	436.85±29.55**
实验组 18 h	4.69±0.89**	12.43±2.36**	62.16±4.84**	621.64±21.83**	510.74±10.00**
实验组 24 h	5.80±0.84**	20.67±2.16**	113.69±13.16**	725.11±26.69**	973.29±51.41**
实验组 48 h	4.09±0.71**	10.19±2.24**	14.65±4.56**	255.38±15.67**	569.66±29.04**
实验组 72 h	1.40±0.55**	2.69±0.77	11.57±1.58**	153.81±13.75**	491.26±20.10**
实验组 96 h	1.00±0.71	4.95±0.88	8.75±1.28	73.60±11.28**	435.27±35.62**
实验组 7 d	0.40±0.55	1.82±0.62	7.22±1.38	63.18±9.95	357.48±23.40**

注: *与对照组比较 $P < 0.05$, **与前一组比较 $P < 0.05$

免疫组织化学染色结果显示, iNOS(图 4)、MMP-9(图 5)、TIMP-1(图 6、7)阳性染色主要见于虹膜上皮细胞、睫状体上皮细胞, 渗出的炎症细胞的细胞浆中, 部分表达于角膜上皮细胞、视网膜神经节细胞。iNOS 在注射 LPS 后 6 h 开始表达, 12 h 达高峰; 其阳性细胞 A 值与注射 LPS 后 0.6 h 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在注射 LPS 24 h 后各组的阳性细胞 A 值与注射后 0 h 相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。在注射 LPS 后 6、12、18、24、48、72 h,

MMP-9 阳性细胞 A 值与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。TIMP-1 于 24 h 开始表达 (A 值为 0.120 ± 0.056), 72 h 达高峰 (A 值为 0.175 ± 0.061), 以后逐渐下降。

以临床评分结果代表炎症的严重程度, 分别检测房水蛋白浓度、血浆、房水和葡萄膜组织的 NO 含量及 MMP-9、iNOS 和 TIMP-1 的 A 值与 EIU 炎症程度的相关性, 结果表明: 房水蛋白浓度、血浆、房水和葡萄膜组织的 NO 含量及 MMP-9 的 A 值呈正相关 ($r =$

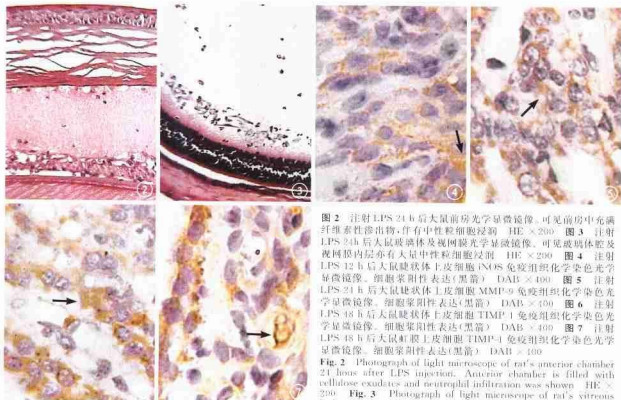


图 2 注射 LPS 24 h 后大鼠前房光学显微镜像。可见前房中充满纤维蛋白渗出物, 伴有中性粒细胞浸润 HE $\times 200$ 图 3 注射 LPS 24 h 后大鼠玻璃体及视网膜光学显微镜像。可见玻璃体腔及视网膜内层亦有大量中性粒细胞浸润 HE $\times 200$ 图 4 注射 LPS 12 h 后大鼠睫状体上皮细胞 iNOS 免疫组织化学染色光学显微镜像。细胞浆阳性表达 (黑箭) DAB $\times 400$ 图 5 注射 LPS 24 h 后大鼠睫状体上皮细胞 MMP-9 免疫组织化学染色光学显微镜像。细胞浆阳性表达 (黑箭) DAB $\times 400$ 图 6 注射 LPS 48 h 后大鼠睫状体上皮细胞 TIMP-1 免疫组织化学染色光学显微镜像。细胞浆阳性表达 (黑箭) DAB $\times 400$ 图 7 注射 LPS 48 h 后大鼠虹膜上皮细胞 TIMP-1 免疫组织化学染色光学显微镜像。细胞浆阳性表达 (黑箭) DAB $\times 400$

inner layers of retina HE $\times 200$ 图 4 Photograph of light microscope image of immunohistochemical staining of iNOS of epithelial cells of ciliary body of rats 12 hours after LPS injection. Positive expression of cytoplasm (black arrow) DAB $\times 400$ 图 5 Photograph of light microscope image of immunohistochemical staining of MMP-9 of epithelial cells of ciliary body of rats 12 hours after LPS injection. Positive expression of cytoplasm (black arrow) DAB $\times 400$ 图 6 Photograph of light microscope image of immunohistochemical staining of TIMP-1 of epithelial cells of ciliary body of rats 12 hours after LPS injection. Positive expression of cytoplasm (black arrow) DAB $\times 400$ 图 7 Photograph of light microscope image of immunohistochemical staining of TIMP-1 of epithelial cells of iris of rats 12 hours after LPS injection. Positive expression of cytoplasm (black arrow) DAB $\times 400$

表 2 LPS 注射后各时间点大鼠的 iNOS、MMP-9 和 TIMP-1 免疫组织化学计算机图像分析平均 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS	MMP-9	TIMP-1
对照组	0.095±0.001	0.111±0.061	0.111±0.061
实验组 0 h	0.095±0.001	0.112±0.006	0.110±0.058
实验组 6 h	0.134±0.059* [#]	0.120±0.059* [#]	0.112±0.005
实验组 12 h	0.159±0.079* [#]	0.158±0.063* [#]	0.111±0.005
实验组 18 h	0.110±0.002* [#]	0.174±0.060* [#]	0.112±0.006
实验组 24 h	0.098±0.004 [#]	0.175±0.059 [#]	0.120±0.056* [#]
实验组 48 h	0.095±0.002	0.159±0.071* [#]	0.158±0.070* [#]
实验组 72 h	0.094±0.002	0.157±0.063 [#]	0.175±0.061* [#]
实验组 96 h	0.095±0.001	0.112±0.039 [#]	0.159±0.050* [#]
实验组 7 d	0.094±0.002	0.090±0.065	0.127±0.055* [#]

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$, [#] 与前一组比较 $P < 0.05$

0.905, 0.901, 0.907, 0.831, 0.878; P 均 < 0.05), iNOS 和 TIMP-1 的 A 值与其无明显相关性 ($r = -0.026, 0.199$; P 均 > 0.05)。

3 讨论

Lan 等^[8]研究发现在人类虹膜和睫状体中广泛表达 MMPs 和 TIMPs。我们发现虹膜上皮细胞、睫状体上皮细胞、渗出的炎症细胞和角膜上皮细胞、视网膜神经节细胞中的细胞浆中均有 MMP-9、TIMP-1 阳性表达,且随病变过程表达水平发生改变。在 LPS 注射后 6 h, MMP-9 即出现表达,然后随着炎症的加重而达到高峰,以后随着炎症的减退而逐渐在 LPS 注射后 7 d 时回到基线水平。提示 MMP-9 是炎症反应的重要促进因子,其表达水平与炎症程度呈正相关,与 Cuello 等^[9]研究相符。而 TIMP-1 于 LPS 注射后 24 h 才出现表达,72 h 达高峰,以后逐渐下降,在 LPS 注射后 7 d 时仍高于对照组水平。我们认为, MMP-9 和 TIMP-1 的平衡在葡萄膜组织细胞外基质(ECM)的更新过程中起关键作用。在 EIU 早期, MMP-9 过度表达,加速葡萄膜血管 ECM 的降解,白细胞渗出增加,促进炎症的发生发展,在炎症的高峰期, TIMP-1 开始表达并逐渐升高,所以在炎症后期, TIMP-1 表达逐渐增高, MMP-9 的活性受抑,炎症减轻。

研究表明, iNOS 激活并诱导产生大量的 NO 是内毒素诱导的葡萄膜炎中血管功能紊乱, 通透性增加的主要原因, NO 还能损伤超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等体内重要的抗氧化体系, 从而加重眼组织的损伤^[10]。我们发现在 EIU 过程中, 血浆、房水和葡萄膜组织的 NO 含量随着 EIU 的炎症程度而发生平行的变化, 其规律为在 LPS 注射后 6 h 出现表达,

然后随着炎症的加重于 LPS 注射后 24 h 达到高峰, 以后随着炎症的减退而逐渐下降。所以, 我们可以通过检测血浆中 NO 的含量来推断房水和葡萄膜组织中的 NO 含量, 从而反映葡萄膜炎程度。本实验结果显示, iNOS 表达于虹膜、睫状体的上皮细胞和渗出的炎性细胞中, 与 Jacquemin 等^[11]的研究结果相符。iNOS 在 LPS 注射后 6 h 可见到表达, 12 h 达高峰, 而在炎症高峰时 iNOS 的表达则显著降低。原因可能是在 EIU 早期, iNOS 在 LPS 等刺激下诱导产生, 生成大量 NO, 促使炎症反应发生并逐渐发展, 在炎症达到高峰时, 过量的 NO 负反馈抑制 iNOS 的活性, 降低 NO 的合成。

我们发现在 EIU 模型中, 血浆、房水和葡萄膜组织中 NO 的含量以及 iNOS、MMP-9 和 TIMP-1 的表达随 EIU 病理过程的发展而发生变化, NO 含量、MMP-9 和 iNOS 活性增加促进炎症的发生、发展, 而 TIMP-1 起着抑制炎症的作用。因此我们认为, 提高内源性 TIMP-1 的表达或使用 MMP-9 和 iNOS 的抑制剂可能为葡萄膜炎的防治提供新策略。

4 参考文献

- 1 籍莉, 杨培增, 林健贤, 等. 内毒素诱导的 SD 大鼠葡萄膜炎外周血淋巴细胞凋亡的研究. 眼科研究, 2002, 20: 123-125.
- 2 Yang P, Smith JR, Damodar KS, et al. Visualization of cell death in vivo during murine endotoxin-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 1993-1997.
- 3 Yang P, De Vos AF, Kijlstra. Interferon gamma immunoreactivity in iris nerve fibres during endotoxin induced uveitis in the rat. Br J Ophthalmol, 1998, 82: 695-699.
- 4 Mo JS, Matsukawa A, Ohkawara S, et al. CXC chemokine GRO is essential for neutrophil infiltration in LPS-induced uveitis in rabbits. Exp Eye Res, 2000, 70: 221-226.
- 5 Yang P, De Vos AF, Kijlstra A. Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37: 77-85.
- 6 Hoekzema R, Murray PI, van Hareu MA, et al. Analysis of interlenkin-6 in endotoxin induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32: 88-95.
- 7 王毓琴, 胡维琨, 张晓农. MMP-9 及 TIMP-1 在内毒素诱导性葡萄膜炎大鼠中的表达. 眼科新进展, 2003, 23: 319-322.
- 8 Lan J, Kumar RK, Di Girolamo N, et al. Expression and distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the human iris and ciliary body. Br J Ophthalmol, 2003, 87: 208-211.
- 9 Cuello C, Wakefield D, Di Girolamo N. Neutrophil accumulation correlates with type IV collagenase/gelatinase activity in endotoxin induced uveitis. Br J Ophthalmol, 2002, 86: 290-295.
- 10 Koga T, Koshiyama Y, Gotoh T, et al. Coinduction of nitric oxide synthase and arginine metabolic enzymes in endotoxin-induced uveitis rats. Exp Eye Res, 2002, 75: 659-667.
- 11 Jacquemin E, Dekozak Y, Thillaye B, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in the eye from endotoxin induced uveitis rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37: 1187-1196.

(收稿日期: 2004-03-09)

(本文编辑: 朱敏)