体后形成的复合物与含有相同死亡结构域的接头蛋白TRADD(TNFR-associated death domain protein, TRADD)结合,TRADD活化后激活caspase-9前体,通过caspase家族的级联反应激活caspase-3后诱导细胞凋亡[20]。线粒体途径是指细胞损伤后,细胞色素C从线粒体释放,与细胞凋亡激活因子1结合,活化caspase-9前体,进而通过caspase家族的级联反应激活caspse-3,诱发细胞凋亡[21]。本小组之前的相关研究显示,CAO后视网膜色素上皮细胞、视细胞内节、双极细胞和神经节细胞内的线粒体明显空泡变性[1],提示线粒体途径可能参与了此处视网膜细胞凋亡。

参考文献

1 杨继红,卫建平,郭政,等.急性心肌缺血对视网膜的影响及其机制[J].眼科新进展,2003,23:389-392

2 杨继红,郭政,卫建平,等.大鼠急性心肌缺血状态下视网膜5-羟色胺的表达及其干预的研究[J].眼科研究,2005,23:30-33

3 杨继红,郭政,卫建平,等.曲马多对急性心肌缺血状态下视网膜的保护作用[J].中国实用眼科杂志,2004,22:57-61

4 Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. Adenosine reduces cardiac TNF-α production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion[J]. J Surg Res, 1998, 76(2): 117-123

5 Meunier JC, Molleaeru C, Toll L, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL_1 receptor[J]. Nature, 1995, 377: 532-535

6 Watkins LR, Maier SF. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain[J]. Ann Rev Psychol, 2000, 51: 29-57

7 Rosen SD, Camici PG. The brain-heart axis in the perception of cardiac pain: the elusive link between ischaemia and pain[J]. Ann Med, 2000, 32(5): 350-364

8 Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, et al. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystem: the brain and the immune system[J]. Phamacol Rev, 2000, 52: 595-638

9 Burkhard B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: Immuno-regulatory properties of CNS-resident cells[J]. Glia, 2000, 29(4): 293-304

10 Liu T, Clark RK, McDonnelll PC, et al. Tumor necrosis factor expression in ischemia neurons[J]. Stroke, 1994, 25(7): 1481-1485

11 Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia mice[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 69(1): 135-140

12 Palmieri EA, Benincasa G, Di Rella F, et al. Differential expression of TNF-α, IL-6, and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282: H926-934

13 Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia: systemic and cardiac release[J]. Circulation, 1990, 82(3): 13-22

14 Yang JH, Meng XX, Xie LS, et al. Acute myocardial ischemia up-regulates substance P in the retina of rats[J]. Neurosci Letters, 2008, 443: 218-222

15 赵献明,李浪.急性心肌梗死心肌损伤的免疫学机制研究进展[J].临床荟萃,2007,22(3):221-223

16 李艳,李贵仁,康凤英.缺血再灌注大鼠视网膜诱导型一氧化氮合酶与细胞凋亡的研究[J].眼科新进展,2004,24(6):452-454

17 陈跃国,张成,吴庭槐,等.小鼠视网膜缺血-再灌注后核因子-κB的激活[J].中华眼科杂志,2003,39(9):560-564

18 王云松.细胞凋亡与眼科疾病[J].中国煤炭工业医学杂志,2001,4(11):841-842

19 Haunstetter A, Lzumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease[J]. Circ Res, 1998, 82: 1111-1129

20 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor imediated apoptosis via two sequential signaling complexes[J]. Cell, 2003, 114: 181-190

21 Herr I, Debatin K. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy[J]. Blood, 2001, 98: 603-604

(收稿:2008-09-26　修回:2008-12-22)

(本文编辑:高　红)

· 短篇论著 ·

基质金属蛋白酶及其组织抑制因子在人眼葡萄膜中的表达及分布

栗映梅　申家泉

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一大类含二价锌离子的蛋白水解酶,能够降解除多糖以外的几乎全部细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。TIMPs是MMPs的内源性抑制因子,与MMPs结合形成复合体,抑制MMPs对ECM的降解。眼部许多疾病都与此有关,如翼状胬肉、角膜溃疡、色素膜炎、脉络膜黑色素瘤、青光眼、白内障、糖尿病性视网膜病变等。本研究检测MMPs在正常人眼葡萄膜中的表达和分布,为进一步研究其在葡萄膜疾病中的作用提供分子生物学依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　兔抗人多克隆抗体:MMP-1、2、3、7、9及TIMP-1、2、3、4(武汉博士德生物工程有限公司);免疫荧光SABC-Cy3试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司SA1074)。

1.2　标本　20例正常供体眼来自山东省立医院眼库,供者年龄20~49岁。纵切眼球,取中央4~5 mm宽的环形标本,10%中性甲醛固定,脱水,石蜡包埋。

1.3　方法　所有切片先行苏木精-伊红染色,虹膜、睫状体、脉络膜结构完整的眼球行免疫荧光染色。蜡块4 μm连续切

本课题为山东省自然科学基金课题资助(Y2002C32)

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院眼科(栗映梅,研究生,现在济南市第二人民医院眼科 250001)

通讯作者:栗映梅(Email: liyingmei77@sohu.com)

片，切片经烤片、脱蜡、微波抗原修复后，分别滴加 1:20/PBS正常血清封闭液，室温 10 min，4 ℃过夜，PBS 冲洗；滴加 50 μL 稀释的兔抗人 MMP-1 多克隆一抗（9 种兔抗人多克隆抗体分别滴加），4 ℃过夜，PBS 冲洗；滴加 1:100/PBS 生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗，30 ℃，20 min，PBS 冲洗；滴加现配制的1:100/PBS SABC-Cy3 溶液，30 ℃，20 min，PBS 冲洗；水溶性封片剂封片，激光共聚焦显微镜观察结果。Cy3 在 554 nm 激化，在 568 ~ 574 nm 发出鲜红色荧光，根据红色荧光的强弱分为：阴性（ - ）、弱阳性（ + ）、阳性（ ++ ）和强阳性（ +++ ）。用 PBS 代替一抗，其他步骤相同，作为阴性对照。

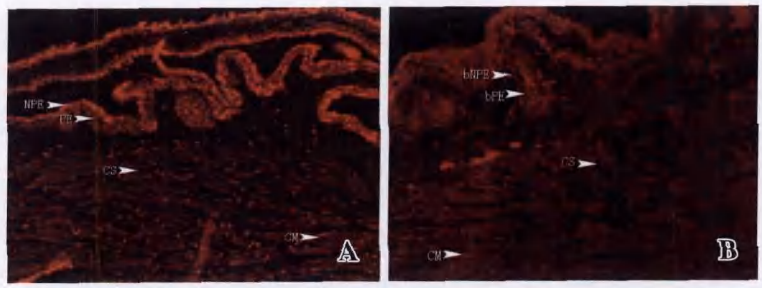

图 2　MMP-1、2、3、7、9 及 TIMP-1、2、3、4 在睫状体各部分的表达（ ×100）

2　结果

2.1　MMPs 及 TIMPs 在虹膜各部位的表达　MMPs 及 TIMPs 在虹膜前缘层、前上皮细胞层、基质层、后上皮细胞层各层表达强度依次减弱，前缘层内 MMP-1，2，3 及 TIMP-1 呈现强荧光（ +++ ）（图 1A，1B），MMP-7 及 TIMP-2，3，4 表达较弱，MMP-9 表达最弱（ + ）（图 1C）；前上皮细胞层中 MMP-2 表达显著高于其他 8 个抗体（图 1A）；基质中 MMP-1 及 MMP-2 表达强于其他各抗体；后色素上皮的红色荧光很弱，MMP-2 略强于其他各抗体（图 1A）。阴性对照无表达。

2.2　MMPs 及 TIMPs 在睫状体各部分的表达　在无色素上皮、睫状肌、色素上皮、基质表达强度依次减弱（图 2A），MMP-1、2、3、7、9 及 TIMP-1、2、4 在睫状体均以相同的模式表达，主要位于色素上皮和无色素上皮的细胞浆（图 2A），而 TIMP-3 的表达主要位于上皮细胞的基底膜（图 2B）。阴性对照无表达。

2.3　MMPs 及 TIMPs 在脉络膜的表达　MMPs 及 TIMPs 在脉络膜有较强的红色荧光，MMP-1、MMP-2 及 TIMP-1 略强于其他各抗体。阴性对照无表达。

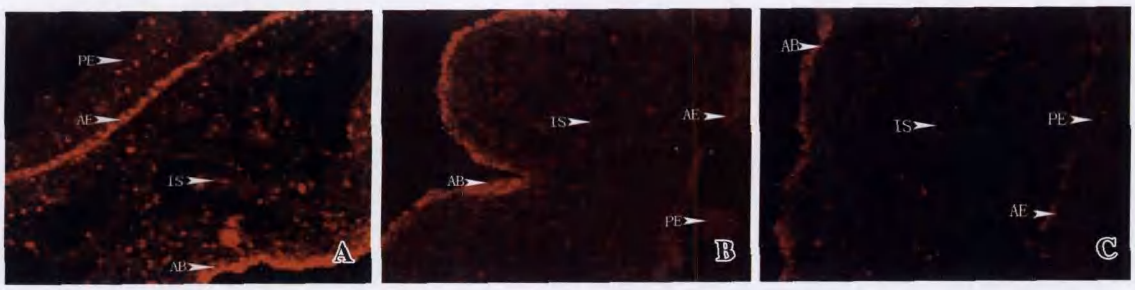

图 1　MMP-1、2、3、7、9 及 TIMP-1、2、3、4 在虹膜各部分的表达（ ×200）

3　讨论

MMPs 是能够水解多种 ECM 的 Zn^{2+} 蛋白酶[2]，与许多相关的生理、病理过程有关[3-4]，可产生于多种正常组织细胞和肿瘤细胞中，至今发现的 MMPs 已有 20 多种[2]。TIMPs 主要由巨噬细胞和结缔组织产生，广泛分布于组织及体液中。

根据 MMPs 和 TIMPs 的理化特性和免疫学特性以及研究目的不同，可采用不同的方法进行研究。本实验应用人眼各组织石蜡切片，研究 MMPs 及 TIMPs 在人眼葡萄膜中的表达和分布，由于虹膜、睫状体、脉络膜富含色素，若采用普通免疫组织化学方法会造成假阳性，所以我们采用免疫荧光技术，在荧光显微镜下观察抗原的表达。结果显示色素膜各层有广泛的 MMP-1、2、3、7 及 TIMP-1、2、3、4 表达，而且存在一定的表达规律，其中明胶酶 MMP-9 具有特异性降解基底膜胶原和各型变性胶原的功能，在正常状态下表达普遍低，在各种病理状态下可能受到巨噬细胞的刺激而分泌增加，参与外伤、炎症、伤口愈合等与 ECM 的急性调节反应有关的过程。MMP-9 还参与色素膜的多种病理过程，如肿瘤的浸润和转移、新生血管的形成等。在睫状体中 TIMP-3 的分布特点不同于其他 MMPs 和 TIMPs，其分布主要位于上皮细胞的基底膜，这可能与其本身的特性有关。TIMP-3 是与 ECM 结合的非可溶性蛋白，位于细胞外膜上，并能紧密连结基底膜。本研究所得结果与 Yan 等[1] 的报道基本一致，说明 MMPS 及 TIMPS 在色素膜有广泛的分布，对降解色素膜各组织 ECM 中广泛分布的各类胶原，维持色素膜正常的生理功能，尤其是对房水通过睫状肌束间隙进入睫状上腔、脉络膜上腔的葡萄膜 - 巩膜流出通路的维持有着重要作用。

参考文献

1 Yan XM, Tezel G, Martin B, et al. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor α in glaucomatous opic nerve head[J]. Arch Ophthalmol, 2000, 118 (5): 666 - 673

2 Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodling[J]. FASEB J, 1991, 5 (8): 2145 - 2154

3 Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology[J]. Genes Dev, 2000, 14(17): 2123 - 2133

4 Tomita T, Nakase T, Kaneko M, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinases inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(2): 373 - 378

（收稿：2008 - 08 - 25　修回：2008 - 11 - 30）

（本文编辑：尹卫靖）