

## ■ 实验研究 ■



作者简介:陈静嫦,女,1971年10月出生,博士,主治医师。联系电话:020-87330484; E-mail: chenjingchang2000@163.com

About CHEN Jing-Chang: Female, born in October, 1971. Tel: +86-20-87330484; E-mail: chenjingchang2000@163.com

收稿日期:2007-09-24

修回日期:2007-11-10

本文编辑:徐刚珍

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30171000)

作者单位:510060 广东省广州市,中山大学中山眼科中心(陈静嫦,吴河坪,范志刚,林辉); 100730 北京市,首都医科大学附属北京同仁眼科中心(王宁利,乔利亚)

通讯作者:陈静嫦, E-mail: chenjingchang2000@163.com

Received date: Sep 24, 2007

Accepted date: Nov 10, 2007

Foundation item: National Natural Science Foundation (No:30171000)

From the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University (CHEN Jing-Chang, WU He-Ping, FAN Zhi-Gang, LIN Hui), Guangzhou 510060, Guangdong Province, China; Beijing Tongren Ophthalmic Center, Capital Medical Science University (WANG Ning-Li, QIAO Li-Ya), Beijing 100730, China

Responsible author: CHEN Jing-Chang, E-mail: chenjingchang2000@163.com

## IL-1 对房水流出通道中 MMP-9 的影响<sup>△</sup>

陈静嫦 王宁利 吴河坪 范志刚 林辉 乔利亚

### Effects of interleukin-1 on MMP-9 in rat aqueous humor outflow pathways

CHEN Jing-Chang, WANG Ning-Li, WU He-Ping, FAN Zhi-Gang, LIN Hui, QIAO Li-Ya

[Key words] interleukin-1; intraocular pressure; matrix metalloproteinases; extracellular matrix

**[Abstract] Objective** To determine the underlying cellular and molecular mechanisms of interleukin-1 (IL-1) on intraocular pressure reduction by studying its effects on matrix metalloproteinases (MMPs) in aqueous humor outflow pathways. **Methods** Ten Sprague-Dawley rats were selected with one eye receiving intracamerally injection of 30 ng IL-1 $\beta$  and the control atlateral eye receiving equivalent volume of 1 g · L<sup>-1</sup> PBS intracamerally injection. Eyes were removed 30 hours after treatment, then immunohistochemistry was done to examine the expression of MMP-9 in aqueous outflow pathway, and the experimental results were semiquantitative analyzed with computerized image analysis techniques. **Results** Strong positive reaction were detected in trabecular meshwork, ciliary muscle and iris of the treated eyes. The gray scale resolutions of the treated eyes and the contralateral eyes were 47.39 ± 3.30 and 88.42 ± 4.76, respectively, which was statistically different ( $t = 25.95, P = 0.000 < 0.01$ ). **Conclusion** Increased expression of MMPs in three aqueous humor outflow pathways may be the underlying IOP reduction mechanisms of IL-1.

[Rec Adv Ophthalmol 2008;28(1):6-8]

【中图分类号】 Q959.836;R775 【文献标识码】 A

【文章编号】 1003-5141(2008)01-0006-03

【关键词】 白细胞介素-1; 眼压; 基质金属蛋白酶; 细胞外基质

**【摘要】 目的** 通过观察白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)对房水流出通道中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的影响,从分子细胞学水平探讨 IL-1 的降眼压机制。 **方法** SD 大鼠 10 只,随机选择一眼前房注射重组鼠 IL-1 $\beta$  30 ng,对侧眼前房注射等体积 1 g · L<sup>-1</sup> PBS 作为对照。用药 30 h 后取眼球,进行免疫组织化学检测房水流出通道的小梁网、睫状肌和虹膜均出现强阳性反应,自动图像分析显示用药眼与对侧眼的灰度分别为 47.39 ± 3.30、88.42 ± 4.76,差别有非常显著统计学意义( $t = 25.95, P = 0.000 < 0.01$ )。 **结论** IL-1 降眼压机制可能与 3 条房水流出通道的 MMPs 表达增加有关。

[眼科新进展 2008;28(1):6-8]

房水流出通道中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的异常表达和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的异常代谢多年前已被认为与青光眼病理性眼压增高密切相关<sup>[1]</sup>。白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)是一种细胞因子,近期被证实具有增加培养小梁网细胞的 MMPs 的表达<sup>[2]</sup>和房水流出易度的作用<sup>[3,4]</sup>。但是,至今有关 IL-1 对眼压和房水流出通道 MMPs 影响的活体研究报道较少。我们对此进

行了相关活体动物研究,发现 IL-1 具有增加小梁网通道房水流出<sup>[5]</sup>,以及强而持久的降低眼压的作用<sup>[6]</sup>。因此,本研究将观察 IL-1 对活体房水流出通道 MMPs 表达情况,以期在分子细胞学水平探讨 IL-1 的降眼压机制。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物** SD 大鼠 10 只,体重 200 ~ 250 g,排除全身和眼部病变。

由中山大学北校区实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂** 重组大鼠 IL-1 $\beta$  (英国 PEPRO TECH 公司产品),  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸平衡盐溶液 (PBS) 稀释成  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 混合固定液 (体积分数为 40% 甲醛 50 mL, 体积分数为 95% 酒精 250 mL, 冰醋酸 25 mL, 蒸馏水 175 mL); 一抗: 小鼠抗大鼠 MMP-9 单克隆抗体 (Neomarkers 公司, 美国); 试剂盒: 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组织化学染色超敏试剂盒 (Kit-9701, 含 A 过氧化酶阻断剂, B 非免疫血清, C 生物素标记羊抗小鼠二抗, D 为链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液, 福州迈新生物技术开发公司); DAB 酶底物显色试剂盒 (DAB-0031/1031, 福州迈新生物技术开发公司)。手术显微镜 (苏州), 微量注射器 (自制), 微量进样器 (上海医用激光仪器厂), 常规石蜡包埋、切片所需器材。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 本研究采用自身双眼对照。为突出 IL-1 这一干预因素的作用, 避免溶剂及前房注射对实验结果的影响, 随机选择大鼠一眼前房注射  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  重组大鼠 IL-1 $\beta$   $30 \text{ ng}$  ( $5 \mu\text{L}$ ), 对侧眼前房注射为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS  $5 \mu\text{L}$ 。采用的药物剂量为前期研究中产生最大降压幅度的用量<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 给药方法** 按体重给予氯胺酮 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和氯丙嗪 ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 混合液腹腔注射麻醉。前房注射在手术显微镜下进行, 以保证药物确切进入前房。先用 30-G 针头经角巩膜缘进入前房, 有少量房水流出, 随即用自制微量注射器沿原穿刺口进入前房, 并缓慢注入药物, 留针 30 s 后拔出针头, 四环素软膏涂于伤口。先行双眼前房注射药物的预实验, 并对用药后实验动物的眼部表现和日常活动进行观察, 确定双眼操作并未造成明显的副作用, 以及没有对其日常生活造成明显不利影响后, 方进行本实验。以上注射操作均由同一人完成。

**1.2.3 免疫组织化学染色方法** 前期动物活体研究显示 IL-1 在用药 24 ~ 48 h 后用药眼已出现眼压下降<sup>[6]</sup>, 而其他研究表明 MMPs 的激活需要 4 ~ 48 h<sup>[7]</sup>, 因此, 选择用药 30 h 作为 IL-1 对房水流出通道 MMPs 作用的观察时间。用药 30 h 后按体重氯胺酮和氯丙嗪等量混合液进行腹腔注射麻醉, 用混合固定液心脏灌注 30 min, 取眼球后用混合固定液固定 30 h, 取材, 逐级酒精脱水, 石蜡包埋 ( $56 \sim 58 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 切片 ( $6 \mu\text{m}$ ), 烘片 ( $50 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 1 h, 置  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温箱 24 h。后取出二甲苯脱蜡, 体积分数 95% ~ 80% 酒精逐级洗除二甲苯, 水化, 然后分别加入非特异性阻断血清、一抗、二抗并孵育, 按厂家提供的具体步骤进行免疫组织化学操作 (迈新公司), 最后苏木素复染, 中性树胶封片。封片后第 2 天, 观察房水流出通道是否有阳性反应 (棕色为阳性反应)。不加二抗为阴性对照。所采用的药物剂量、观察时间均参照前期研究结果<sup>[5-6]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用统计软件 SPSS 10.0 进行分析。用药眼与对侧眼免疫组织化学结果中阳性部位的灰度比较进行配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

发现用药眼的房水流出通道, 包括小梁网细胞、睫状肌细胞和虹膜的细胞浆和间质均出现较强的阳性反应。经全自动图像分析系统处理并分析, 对用药眼和对侧眼的阳性部位进行半定量分析, 结果见表 1、图 1 ~ 3, 经配对  $t$  检验, 差异有非常显著统计学意义 ( $t = 25.95, P = 0.000 < 0.01$ )。



Figure 1 Negative control: Without the secondary antibody ( $40 \times 2.5$ ) 阴性对照: 不加二抗 ( $40 \times 2.5$ )

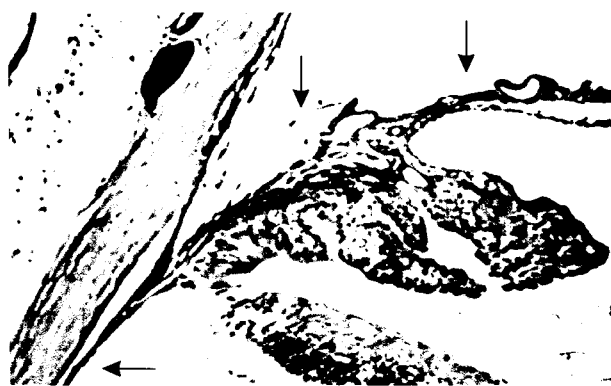


Figure 2 Treated eyes: Strong positive reaction was found in cytoplasmic and ECM of trabecular meshwork, ciliary muscle and iris ( $20 \times 2.5$ ) 用药眼: 可见虹膜、小梁网和睫状肌的胞浆和外基质出现强的棕色阳性反应 ( $20 \times 2.5$ )

## 3 讨论

**3.1 MMPs 激活剂降低眼压的机制和特点** MMPs 包含一组 ECM 降解酶, 分布广泛, 参与胚胎的生长发育、组织的损伤修复和重塑等生理病理过程。MMPs 不少于 17 种, 分布于眼部的 MMPs 主要有 4 种, 包括间质胶原酶、明胶酶 A、明胶酶 B 和间质溶解素, 分别命名为 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-3。它们可降解 ECM, 作用底物既有交叉, 又各有特点, MMP-1 主要作用底物为 I、II、III 型胶原; MMP-2、MMP-9

表1 用药眼与对侧眼免疫组织化学结果半定量分析

Table 1 Semi-quantitative analysis of immunohistochemical results in treated eyes and control lateral eyes

(n = 10, gray scale)

Eyes	Gray scale resolution										$\bar{x} \pm s$
Treated	52.64	46.43	45.22	44.21	50.21	47.45	49.51	43.21	44.01	51.02	47.39 ± 3.30 <sup>△</sup>
Control	91.54	82.02	86.50	89.04	93.79	79.01	90.02	88.12	93.04	91.14	88.42 ± 4.76 <sup>△</sup>

Note: <sup>△</sup>P < 0.01

Figure 3 Contralateral eyes: Weak brown staining was partly showed in trabecular meshwork, ciliary muscle and iris (20 × 2.5) 对侧眼:可见虹膜、小梁网和睫状肌出现弱的棕色反应(20 × 2.5)

主要作用底物为IV、V型胶原、明胶(变性胶原)、层粘连蛋白(laminin, LN)、纤粘连蛋白(fibronectin, FN)、弹性蛋白和蛋白多糖;MMP-3的作用底物则主要为LN、FN、弹性蛋白和蛋白多糖。小梁网和葡萄膜巩膜通道的ECM包括胶原I、III、IV、V、FN、LN、弹性纤维和蛋白多糖,其中蛋白多糖中的氨基葡糖多聚糖基团被认为是房水流出阻力形成的主要物质基础<sup>[8]</sup>。因此,MMP-2、MMP-3、MMP-9有可能通过降解小梁网和葡萄膜巩膜通道的ECM,包括蛋白多糖,减少生理性房水外排而降低眼压。由于ECM的半衰期长达36h,故通过降解ECM起效的MMPs激活剂的降压持续时间较长。另外,由于葡萄膜巩膜通道为非压力依赖性通道,所以促其房水外流的MMPs激活剂将具有降压幅度大、降压平稳和夜间有效等优点。

**3.2 IL-1降低眼压的可能性及机制** 体外研究表明MMP-9分布于小梁网和葡萄膜巩膜通道<sup>[2]</sup>,作用底物广泛,直接参与了房水流出通道阻力的调节<sup>[3]</sup>,因此,本实验选择MMP-9作为观察指标。本研究首次在动物活体上观察了IL-1对房水流出通道MMP-9表达的影响,证实了IL-1具有增加房水流出通道MMP-9表达的作用,结果与国外一些相关的体外研究相似<sup>[2]</sup>。本研究在分子组织水平支持了IL-1降低眼压的可能性,以及进一步明确其降低眼压的可能作用

机制。由于强阳性反应不但出现在小梁网,而且出现在睫状肌和虹膜,所以估计IL-1降低眼压的作用途径包括3条房水流出通道,这可能成为IL-1降低眼压幅度较大的原因所在。因此,可以推测IL-1的降压效果可能优于只通过葡萄膜巩膜通道起效的新型抗青光眼药物—拉坦前列素滴眼液(Xalatan)。另外,作为MMPs的激活剂,IL-1应具备降压幅度大、维持时间长、降压平稳和夜间有效等优点。

**3.3 IL-1研发的意义** 随着我国社会及经济的发展,人们利用抗青光眼药物治疗的观念也发生了改变,对青光眼的综合治疗质量和用药依从性更为重视。因此,传统一线抗青光眼药物噻吗心安的有效性及其安全性受到质疑,如降压欠平稳,夜间降压作用差,以及长期抑制房水生成后引起眼前节包括小梁网的营养障碍和功能损害等。而通过促生理性房水外排,兼具强效、安全和维持时间长等将是未来新型降低眼压药物的发展方向。IL-1有望成为理想的新型降低眼压药物,值得进一步研究。

### 参考文献

- Francis J. The importance of mucopolysaccharides in intraocular pressure regulation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1975;14:173-176.
- Pang IH, Hellberg PE, Fleener DL, Jacobson N, Clark AF. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human trabecular meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3485-3493.
- Bradley JM, Vranka J, Colvis CM, Conger DM, Alexander JP, Fisk AS, et al. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2649-2658.
- Kee C, Seo K. The effect of interleukin-1 $\alpha$  on outflow facility in rat eyes [J]. *J Glaucoma* 1997;6:246-249.
- 陈静嫻,王宁利,范志刚,刘长征,曾明兵,林辉. 白细胞介素-1对房水动力学的影响 [J]. *眼科研究* 2007;25(4):292-294.
- 王宁利,陈静嫻,范志刚,吴河坪,林辉,乔利亚. 白细胞介素-1 $\alpha$ 对兔眼压的影响及其眼内毒副作用的观察 [J]. *中华眼科杂志* 2005;41(7):647-651.
- Agarwal S, Long P, Gassner R, Piesco NP, Buckley MJ. Cyclic tensile strain suppresses catabolic effects of interleukin-1 $\beta$  in fibrochondrocytes from the temporomandibular joint [J]. *Arthritis Rheum* 2001;44(3):608-617.
- Knepper PA, Goossens W, Hvizd M, Palmberg PF. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1360-1367.