

羊膜移植对兔角膜碱烧伤早期 MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响

王晓辉 韩晓丽 郑永征 徐国兴

【摘要】 目的 研究羊膜移植在兔角膜碱烧伤早期治疗中的作用机制。方法 对 60 只新西兰白兔随机分为碱烧伤组、羊膜移植组及正常对照组, 实验组建立角膜碱烧伤模型, 羊膜移植组于烧伤后 30min 实施羊膜移植手术。术后 14、30、60d, 观察分析角膜病理组织学改变; 并应用计算机图像分析系统对角膜组织中基质金属蛋白酶-2 (Matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 (Tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2) 的表达进行半定量测定。结果 羊膜移植组角膜浸润及角膜基质坏死溃疡程度均较同期碱烧伤组为轻, 角膜 MMP-2 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 TIMP-2 表达显著升高 ($P > 0.05$)。结论 羊膜移植可提高角膜 TIMP-2 表达的水平并抑制 MMP-2 的活性, 从而在角膜碱烧伤的早期治疗中起到抑制角膜炎症和溃疡的作用。

【关键词】 羊膜移植; 角膜; 碱烧伤 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2); 基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 (TIMP-2)

The effect of amniotic membrane transplantation on expression of MMP-2 and TIMP-2 after alkaline burn of the corneas in rabbit

WANG Xiao-hui, HAN Xiao-li, ZHENG Yong-zheng, XU Guo-xing. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian, China.

【Abstract】 Purpose To investigate the mechanism of amniotic membrane transplantation (AMT) in the early corneal alkaline burn in rabbits with corneal alkaline burn. Methods 60 New Zealand white rabbits were used and randomly divided into three groups: Normal cornea only as control group (C), corneal alkaline burn group (A), and amniotic membrane transplantation group (AMT). Corneal alkaline burn models of experimental groups were made. AMT was performed 30 minutes after corneal alkaline burn. Pathohistology and computerized corneal analysis on the expression of MMP-2 and TIMP-2 were studied at day 14, 30, and 60. Results After operation, corneal infiltrate, corneal stroma necrosis and ulcer in AMT were all better than those in A. The levels of MMP-2 were lower and the levels of TIMP-2 were higher than those in A by immunohistochemistry. Conclusions Amniotic membrane transplantation could elevate the expression of TIMP-2 and inhibit the expression of MMP-2 in cornea, accordingly amniotic membrane transplantation may play a critical role on inhibiting corneal ulcer and inflammation in the early corneal alkaline burn.

【Key words】 Amniotic membrane transplantation; Cornea; Alkaline burn; MMP-2; TIMP-2

角膜碱烧伤可导致角膜炎症、基质溶解、坏死溃疡甚至穿孔等严重病理改变。近年来大量的临床应用和实验研究表明羊膜移植在角膜碱烧伤的治疗中具有良好的疗效, 但有关其作用的具体机制

尚不完全清楚。近年研究发现基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMPs) 及基质金属蛋白酶组织抑制剂 (Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 与角膜碱烧伤的一系列病理过程密切相关。本试验通过对羊膜移植术后碱烧伤角膜表面 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 表达的研究, 探讨羊膜移植在治疗角膜碱烧伤等眼表疾病的过程中抑制炎症、减轻基质溶解、促进溃疡愈合的作用机制。

基金项目: 福建省教育厅科研基金资助项目 (基金编号 K03023)。

作者单位: 350005 福州, 福建医科大学附属第一医院眼科 (王晓辉 韩晓丽 徐国兴); 福建中医学院附属人民医院眼科 (郑永征)

通讯作者: 韩晓丽, E-mail: hxlf1yk@163.com

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物及分组 由福建医科大学实验动物中心提供 60 只健康无眼病的新西兰白兔, 体重 2.0~2.5kg, 雌雄不限。实验动物随机分成正常对照组(Control group, C)、碱烧伤组(Alkaline burn group, A)、羊膜移植组(Amniotic membrane transplantation group, AMT), 每组 20 只, 选择右眼为实验眼。

2. 羊膜的准备 实验用羊膜均取自健康产妇剖宫产的胎盘, 其产前血清学检查 HIV、HBV、HCV 及梅毒螺旋体均为阴性。将获得的胎盘, 在无菌操作下钝性分离, 去除绒毛膜组织, 完整取下羊膜。用无菌生理盐水清洗羊膜, 去除表面的血凝块, 再用含有 5×10^4 u/L 青霉素、 5×10^4 u/L 链霉素和 2.5mg/L 两性霉素 B 的无菌生理盐水浸泡 10min。取出羊膜后, 上皮面向上平铺于粘贴手术巾的纸片上, 均匀剪成 $4.0\text{cm} \times 4.0\text{cm}$ 大小。新鲜羊膜 4°C 保存于无菌 DMEM 液中, 12h 内使用。

3. 主要仪器 手术显微镜、Olympus 显微镜、摄像机、眼科显微手术器械、彩色图像分析仪(Image8000, 澳大利亚)、ImagePlus5.0 图像分析软件、低温冰箱。

二、方法

1. 兔角膜碱烧伤模型制作 实验组兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉, 1% 的卡因表面麻醉后开睑, 1mol/L NaOH 溶液浸滤纸片(直径 8mm)置于兔角膜中央, 1min 后取下, 生理盐水冲洗结膜囊及眼表, 至 pH 为 7.0。羊膜移植组, 30min 后开始行羊膜移植手术。

2. 手术方法 角膜缘处环形剪开球结膜, 将备好的新鲜羊膜片上皮面朝上平铺于角膜表面, 间断缝合固定于浅层巩膜面, 剪去缝线外多余的羊膜,

然后将结膜重新缝回至角膜缘。术后结膜囊涂抗生素眼膏抗感染。

3. 术后观察 术后 14d 内, 每日裂隙灯下观察各组兔眼前段病变情况, 以后每周观察一次。术后 14d、30d、60d 各实验组分别取下的角膜, 4% 多聚甲醛固定 24h, 常规病理制片。免疫组织化学染色 SP 法检测 MMP-2 及 TIMP-2 表达。

4. MMP-2、TIMP-2 表达观察 光镜下观察胞浆内呈现不同程度、基本均匀的棕黄色粗大颗粒反应者为抗 MMP-2、抗 TIMP-2 抗体染色阳性细胞, 反之染色阴性。

5. 免疫组化计算机图像分析 采用 Image8000 彩色图像分析仪对各组角膜组织免疫组化切片进行平均灰度和面密度分析。记录相应数据, 取其平均值作为该标本的结果, 并对结果进行统计学检验。

三、统计学处理

统计数据采用 SPSS12.0 统计软件处理, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的检验标准, 进行 Kruskal-Wallis 检验和单因素方差分析。

结 果

一、裂隙灯观察眼表情况

角膜碱烧伤后即见角膜中央区出现一与滤纸片直径相同边界清楚的瓷白色混浊区, 深度约 2/3 角膜厚度, 瞳孔及虹膜看不清。碱烧伤组白兔结膜高度混合充血、烧伤区出现灰白色不透明浸润病灶。烧伤后 7~14d 角膜浸润加重, 烧伤区角膜基质水肿、组织坏死, 溃疡形成, 出现角膜新生血管, 28~60d 上皮逐渐修复、角膜浸润减轻、角膜高度血管化并遗留角膜白斑。羊膜移植组早期可见角膜浸润及角膜基质坏死溃疡程度均较同期碱烧伤组为轻, 晚期角膜混浊减轻, 仅遗留少量角膜血管翳。碱烧伤后 60d 各组兔外眼像见图 1。



图 1 (A) 正常兔角膜像; (B) 碱烧伤后 60 天外眼像, 角膜白斑和结膜化, 大量新生血管; (C) 羊膜移植后 60 天外眼像, 示角膜混浊减轻, 角膜新生血管减少,

二、角膜组织 MMP-2 和 TIMP-2 的免疫组织化学分析

1. MMP-2 和 TIMP-2 在角膜中的免疫定位
正常对照组兔角膜上皮细胞胞浆中可见 MMP-2 及 TIMP-2 表达, 呈淡黄色颗粒状; 碱烧伤后 14d, 碱

烧伤组、羊膜移植组角膜上皮细胞、基质中角膜细胞、浸润的炎性细胞 (主要为多形核白细胞) 胞浆中 MMP-2 及 TIMP-2 表达均显著增强, 尤以溃疡坏死区为甚, 呈棕黄色颗粒状。见图 2、3。



图 2 碱烧伤后 14d 兔角膜 MMP-2 的表达 (免疫组化 SP 法, DAB 显色, × 400 倍)。(A) 对照组; (B) 碱烧伤组; (C) 羊膜移植组。

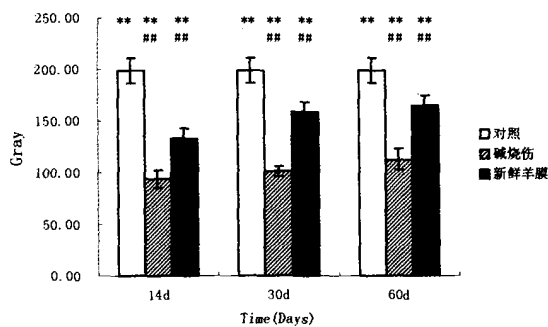


图 3 碱烧伤后 14d 兔角膜 TIMP-2 的表达 (免疫组化 SP 法, DAB 显色, × 400 倍)。(A) 对照组; (B) 碱烧伤组; (C) 羊膜移植组。

2. 角膜组织 MMP-2 及 TIMP-2 的半定量测定:

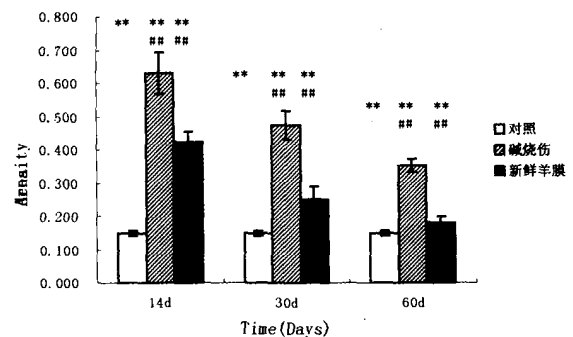
(1) MMP-2 的测定 碱烧伤后 14d, 碱烧伤组、羊膜移植组与对照组相比角膜 MMP-2 表达的平均灰度值均显著降低 (均 $P < 0.01$), 面密度值均显著增高 (均 $P < 0.01$)。伤后 30、60d 各实验组角膜 MMP-2 表达的平均灰度值逐渐增高, 面密度值逐渐下降, 除 60d 时羊膜移植组角膜 MMP-2 表达

的平均灰度值外, 其余均较对照组有统计学差异 (均 $P < 0.05$)。伤后 14、30d, 羊膜移植组角膜 MMP-2 表达的平均灰度值均明显高于碱烧伤组 (均 $P < 0.05$), 面密度值均明显低于碱烧伤组 (均 $P < 0.01$); 伤后 60d, 羊膜移植组角膜 MMP-2 表达的平均灰度值及面密度值较碱烧伤组均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。见图 4、5。



LSD-t 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group(C)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ AMT vs alkali burn group(A)

图 4 MMP-2 在兔角膜中表达的平均灰度值



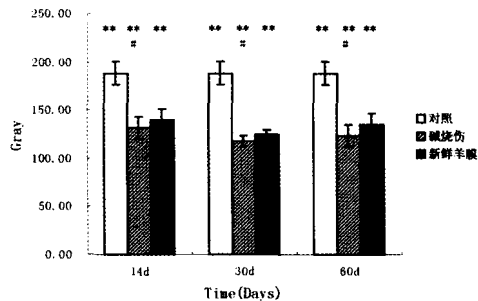
LSD-t 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group(C)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ AMT vs alkali burn group(A)

图 5 MMP-2 在兔角膜中表达的面密度值

(2) TIMP-2 的测定 碱烧伤后 14、30d, 各实验组与对照组相比角膜 TIMP-2 表达的平均灰度

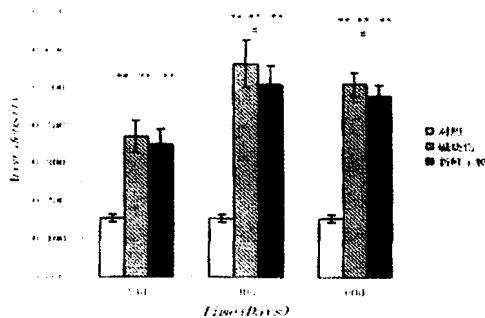
值均显著降低, 面密度值均显著增高 (均 $P < 0.01$)。伤后 30d 角膜中 TIMP-2 表达达到最强。伤后 60d

各实验组角膜 TIMP-2 表达的平均灰度值逐渐增高, 面密度值逐渐下降, 其中角膜 TIMP-2 的表达较对照组有统计学差异 (均 $P < 0.01$)。见图 6、7。



LSD-t 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group(C)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ AMT vs alkali burn group(A)

图 6 TIMP-2 在兔角膜中表达的平均灰度值



LSD-t 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group(C)
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ AMT vs alkali burn group(A)

图 7 TIMP-2 在兔角膜中表达的面密度值

讨 论

角膜碱烧伤是临床上常见的, 治疗较为棘手的严重眼表疾病, 其早期组织病理改变以角膜基质中大量的炎症细胞浸润及胶原纤维断裂溶解为特点^[1]。近年来的研究发现 MMPs 可以溶解角膜中的胶原纤维, 使角膜组织快速崩解。因此, 角膜碱烧伤后的非感染性溃疡形成与 MMP 有直接的关系^[2]。MMPs 是由多种能降解细胞外基质的酶类组成, 属含锌肽链内切酶家族。存在于角膜组织中的 MMP 主要有 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9, 每一种 MMP 可以降解细胞外基质中的不同成分, 导致角膜溃疡的形式^[3, 4]。其中 MMP-2 又称为明胶酶 A, 作用底物主要是细胞外基质中的 IV 型胶原, MMP-2 几乎能对细胞外基质中所有的结构蛋白成分进行降解。本实验结果表明, 兔角膜碱烧伤后角膜上皮细胞, 基质中角膜细胞、浸润的炎性细胞中的 MMP-2 的表达均显著增强。因此推测, 角膜中 MMP-2 表达增强在碱烧伤后角膜炎症、溃疡、坏死等一系列病理过程中发挥重要作用。TIMPs 是

MMPs 的内源性抑制物, 可以特异地与 MMPs 相结合并对 MMPs 的活性进行精确地调节^[5]。TIMPs 与 MMPs 之间的平衡关系在调节胞外基质的降解中发挥重要作用。因此, 上调角膜组织中 TIMP-2 的表达水平, 可以间接地抑制 MMP-2 的表达, 从而达到减轻角膜炎症、坏死、溃疡的治疗作用。

近年来, 大量的临床和实验研究结果表明, 羊膜移植对角膜碱烧伤具有良好的治疗效果。为了进一步探讨其机制, 我们建立了兔角膜碱烧伤模型, 对羊膜移植术后的角膜组织 MMP-2、TIMP-2 的表达进行了测定。结果表明, 羊膜移植术后角膜炎症性浸润、组织坏死、溃疡形成的程度均明显减轻, 而角膜 MMP-2 的表达水平显著降低, TIMP-2 的表达则明显升高。因此推测羊膜移植对角膜碱烧伤的治疗作用是通过提高角膜表达 TIMP-2 的水平, 来抑制 MMP-2 的表达和酶的活性、改变 MMP-2 与 TIMP-2 之间的平衡状态来实现的。最近研究发现新鲜羊膜和保存羊膜组织本身可以表达和分泌 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4^[6], 因此推测羊膜组织中表达的 TIMP-2 进入角膜后抑制了角膜中 MMP-2 的活性, 这也可能是羊膜移植后角膜组织 TIMP-2 表达增高的机制。

除了 TIMP-2 的调节作用外, 还有多种因素可能参与对角膜 MMP-2 表达的调节。有研究表明, MMPs 的释放和表达受到各种致炎因子的调节, 如 IL-1 和 TNF- α 等^[7, 8]。Heiligenhaus^[9]用羊膜移植治疗大鼠单疱病毒性角膜炎的过程中, 发现羊膜移植术后 2d 角膜表达 IL-1 α 和 TNF- α 水平显著减少, 同时 MMP-2、MMP-8、MMP-9 的表达也明显减少。由此可以看出, 羊膜移植引起角膜表达 IL-1、TNF- α 减少也是导致角膜 MMP-2 表达下调的可能因素。此外, 有研究发现, 羊膜组织可以表达和分泌 IL-10^[6], 而 IL-10 能抑制 MMPs 的表达^[10], 但羊膜移植后 IL-10 对角膜 MMP-2 的影响还有待进一步的研究证实。本研究结果表明, 羊膜移植术后角膜浸润程度明显减轻, 而近年的研究^[1, 11]也显示碱烧伤行羊膜移植术后 14d 左右, 角膜组织中多形核白细胞或嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润明显减少, 证明羊膜组织能抑制白细胞活化而消除炎症, 其机制可能是羊膜组织促进白细胞凋亡或分泌多种细胞因子抑制白细胞的活化。而碱性烧伤后角膜中的 MMP-2 主要来源于多形核白细胞和再生的上皮细胞, 本实验结果也表明, 在碱烧伤组中角膜炎症细胞 (主要为多形核白细胞) MMP-2 表达显著增强,

因此,羊膜移植抑制了角膜中多形核白细胞等炎症细胞的浸润,从而导致角膜MMP-2的表达下调,在减轻角膜炎症浸润程度的同时也减轻了角膜基质的溶解坏死程度。

综上所述,羊膜移植可能通过促进角膜TIMP-2表达、抑制角膜多形核白细胞等炎症细胞的浸润活化、抑制角膜释放多种致炎因子等机制来抑制角膜MMP-2的表达和活性,从而在角膜碱烧伤的早期治疗中发挥其减轻角膜基质的溶解坏死程度、减少角膜穿孔等严重的并发症发生、抑制炎症促进溃疡愈合等重要作用。

参考文献

- 1 陈剑,丁琦,徐锦堂.新鲜羊膜移植术治疗急性期角膜碱烧伤的组织病理与超微结构观察.眼科新进展,2001,21:15-17.
- 2 Zhng H, Li C, Baciuc PC. Expression of intergrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal argiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci,2002,43:955-962.
- 3 沈玺,叶纹,钟一声.羊膜移植对大鼠角膜碱烧伤后基质金属蛋白酶的影响.眼视光学杂志,2005,7:76-79.
- 4 Fini ME, Girard MT, Matsubara M, et al. Unique regulation of the matrix metalloproteinase, gelatinase B. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36: 622-633.
- 5 Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta,2000,1477:267-283.
- 6 Hao Y, Hui-Kang D, Hwang DG, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea,2000,19:348-352.
- 7 Postlethwaite AE, Lachman LB, Mainardi CL, et al. Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. J Exp Med,1983,157:801-806.
- 8 Li DP, Lokeshwar BL, Solomon A, et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. Exp Eye Res,2001,73:449-459.
- 9 Heiligenhaus A, Li HF, Yang Y, et al. Transplantation of amniotic membrane in murine herpes stromal keratitis modulates matrix metalloproteinases in the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci,2005,46:4079-4085.
- 10 Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, et al. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. J Clin Invest,1995,96:2304-2310.
- 11 王旭,张华,王立言.兔眼碱烧伤行羊膜移植术后转归的实验研究.眼科,2005,14:186-190.

(收稿时间 2007-04)

· 病例报告 ·

长期服用氯丙嗪致角膜和晶状体色素沉着—例

朱冬青 许迅 郑志

患者女 44 岁 16 年前始因精神疾病口服氯丙嗪控制,4 年前平均剂量为 400mg/d,近 4 年改为 200mg/d。全身其他系统无特殊病史。右眼视力 1.0(-2.00D),左眼视力 0.8(-2.00D)。角膜表面及基质清晰,睑裂区角膜内皮细胞面见双眼一致性弥漫性棕黄色色素颗粒沉着,间隙分明(图 1)。房角开放。房水闪辉征(-),无浮游颗粒。虹膜色泽无异常。瞳孔对光反应灵敏。瞳孔区晶状体表面亦见棕黄色浓淡不均的色素沉积。散瞳后其他部位未见类似色素(图 2)。深皮质及核未见明显混浊。玻璃体及眼底未检及异常。眼压:右 19mmHg,左 20mmHg。诊断为:氯丙嗪致角膜及晶状体色素沉着;虹膜睫状体炎?予泪然眼药水滴眼,观察、随访,未见有虹膜睫状体炎依据。



图 1 角膜后面色素沉着 图 2 晶状体前表面瞳孔区色素

讨论 氯丙嗪是一种常见的抗精神病药。不良反应有嗜睡、体位性低血压、抗胆碱样作用。过敏反应包括胆汁郁积性黄疸、皮疹、光过敏等。长期服用后有的可引起眼部及皮肤色素沉着。病变部位及程度与累积剂量有关。当总剂量达到 500g 时可首先发生晶状体前囊及囊下色素沉着^[1]。Thaler 等^[2]将晶体混浊从孤立的棕色尘样色素沉着到形成星形白内障分为 5 级。角膜病变常伴发于晶体混浊加重时,表现为睑裂区内皮细胞和后弹力层的黄白色、略棕色或黑色色素沉着,也可累及上皮层,严重时侵及基质层。视网膜色素病变所需的剂量更大,达 2400mg/d^[3]。其他可引起色素沉着的眼组织包括球结膜、巩膜及眼睑皮肤。氯丙嗪引起的角膜和晶状体色素沉着据认为是由于药物与紫外线相互作用导致的黑色素蛋白变性和沉积^[4]。即使停药后一般也不会逆转。

参考文献

- 1 Alexander LJ, Bowerman L, Thompson LR. The prevalence of the ocular side effects of chlorpromazine in the Tuscaloosa Veterans Administration patient population. J Am Optom Assoc, 1985,56:872-876.
- 2 Thaler JS, Curinga R, Kiracofe G. Relation of graded ocular anterior chamber pigmentation to phenothiazine intake in schizophrenics-quantification procedures. Am J Optom Physiol Opt, 1985,62:600-604.
- 3 Leung AT, Cheng AC, Chan WM, et al. Chlorpromazine-induced refractile corneal deposits and cataract. Arch Ophthalmol, 1999,117:1662-1663.

(收稿时间:2007-06)

作者单位:200080 上海市武进路 83 号 上海交通大学附属第一人民医院眼科

通讯作者:许迅, E-mail: drxuxun@tom.com