论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0254-04

蚕蚀性角膜溃疡中Ⅲ型胶原层粘连蛋白与纤维连接蛋白的表达

赵长霖,谢汉平,曾玉晓 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 比较蚕蚀性角膜溃疡与正常角膜中Ⅲ型胶原、层粘连蛋白及纤维连接蛋白的定位与含量。**方法** 应用间接免疫荧光技术检测蚕蚀性角膜溃疡与正常角膜中Ⅲ型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白的分布。阳性结果应用图像分析系统进行定量分析。**结果** Ⅲ型胶原在正常角膜中无表达,在蚕蚀性角膜溃疡中分布在基质溃疡处。层粘连蛋白在正常角膜基底膜微量表达,在蚕蚀性角膜溃疡基底膜和 Bowman's 膜表达增多。纤维连接蛋白在正常角膜基底膜呈连续线状分布,在蚕蚀性角膜溃疡上皮层及基质溃疡处有表达,而在基底膜未见表达。**结论** 蚕蚀性角膜溃疡上皮基底膜在其发病机制中可能发挥作用,需要进一步深入研究。

关键词:蚕蚀性角膜溃疡;角膜;胶原;层粘连蛋白;纤维连接蛋

中图法分类号:R341;R772.210.2 **文献标识码**:A

Expression of collagen type Ⅲ, laminin and fibronectin in Mooren's ulcer

ZHAO Chang-lin, XIE Han-ping, ZENG Yu-xiao (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the locations and levels of collagen type Ⅲ, laminin, and fibronectin in Mooren's ulcer and normal human corneas. **Methods** An indirect immunofluorescent technique and immunohistochemical staining were used to determine the distribution of collagen type Ⅲ, laminin, and fibronectin. The positive results were quantitatively analyzed with an image-processing system. **Results** Collagen type Ⅲ was not detected in the normal cornea. However, the staining could be seen in the corneal stroma close to Mooren's ulcer focus. Laminin was expressed faintly in the basement membrane of the normal cornea and the positive expression increased in the basement membrane and Bowman's membrane of Mooren's ulcer. In the normal cornea basement membrane, fibronectin was located continuously. In Mooren's ulcer basement membrane, however, fibronectin could not be found in all sections in which one expressed in epithelium and the others in stoma close to the ulcer focus. **Conclusion** Epithelial basement membrane may play a potential role in the pathogenesis of Mooren's ulcer.

Key words: Mooren's ulcer; cornea; collagen; laminin; fibronectin

蚕蚀性角膜溃疡(Mooren's ulcer)是一种少见的、自发性、慢性、进行性、疼痛性、边缘性角膜溃疡。自从德国医生 Mooren 1867 年详细描述该病以来,一个多世纪的研究发现,这是一种自身免疫性角膜病,但确切的发病机制不清楚,治疗上也无特异、有效的方案,应用免疫抑制药物、手术切除病变角膜及周围结膜等,手术后仍有部分患者的溃疡复发。我们对蚕蚀性角膜溃疡病变角膜的细胞外基质(extracellularmatrix, ECM)变化进行研究,希望能为该病发病机制的研究和治疗提供一定的线索。

1 材料与方法

1.1 角膜材料

病变组:6 个诊断明确的蚕蚀性角膜溃疡患者角膜标本(均为行板层角膜移植术时取下的病变板层角膜,立即液氮处理、-70 ℃冰箱低温冻存备用)。患者为 2003 年 8 月至 2004 年 5 月,在我院住院治疗的病人。诊断标准为近角膜缘处穿凿样角膜溃疡(图 1),既往无系统性自身免疫性疾病史,眼部无感染史,胸片及抗"O"、血沉、类风湿因子、抗核抗体、抗中性粒细胞抗体、抗丙型肝炎病毒抗体等实验室检查阴性。男性 4 例,女性 2 例,年龄 26~68 岁,平均 43.7 岁;均为单眼患病,其中 2 例为复发性。

对照组:4 个正常周边角膜,取自意外死亡的健康人,无眼部疾病。由第三军医大学眼库提供。

作者简介:赵长霖(1975-),女,安徽省安庆市人,硕士研究生,医师,主要从事角膜病防治方面的研究。电话:(023)65398613, E-mail: zcl1975@mail.tmmu.com.cn

通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377,E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-09-09;修回日期:2004-12-29



图 1　蚕蚀性角膜溃疡眼前节照片：周边角膜溃疡，边缘呈典型的穿凿样改变

Fig 1　External photograph of the eye: ulcerating peripheral cornea with characteristic overhanging edge

1.2　试剂

Collagen type Ⅲ 鼠抗人单克隆抗体，美国 Zymed 公司产品；Laminin 鼠抗人单克隆抗体，Fibronectin 兔抗人多克隆抗体，购自福州迈新生物公司。以上抗体均为即用型工作液，作为一抗。二抗生物素化山羊抗小鼠 IgG、生物素化山羊抗兔 IgG（即用型工作液），SABC-FITC 染色试剂盒均为武汉博士德生物工程公司产品。FITC 即异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate），吸收光谱为 490～495 nm，发射光谱为 520～530 nm，发射光呈黄绿色荧光。

1.3　间接免疫荧光染色方法

从低温冰箱中取出角膜标本，以 OCT（Saknra Finetechmical Co. Ltd, USA）包埋，－20 ℃低温恒冷冷冻切片机（SHANDON-AS 620，UK）切成 6 μm 厚的冰冻切片，粘于 APES 处理过的载玻片上，低温风扇吹干，4 ℃纯丙酮固定 10 min，0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）泡洗 5 min。5% 的非免疫山羊血清室温下封闭组织 30 min，倾去多余血清，分别加入适量一抗，4 ℃过夜。PBS 充分振荡洗涤 3 次，每次 3 min，吸去多余液体，分别滴加相应的生物素化二抗。37 ℃恒温箱内孵育 30 min，PBS 振荡洗涤 3 min×3 次，滴加 1∶100 PBS 稀释的 SABC-FITC 复合物。37 ℃反应 30 min，PBS 振荡洗涤 5 min×4 次。缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察染色结果并照相记录。每张切片在 200 倍放大率下随机取 5 个视野，用计算机采集图像，图像存储为 TIF 格式留作分析。以阳性组织切片间接免疫荧光染色作为阳性对照，PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4　结果分析

阳性染色结果用 Image-pro plus 4.5 软件（Media Cybernetics Company, USA）分析，测量每张图像阳性区域的平均光密度（average optical density, AOD），以 5 个视野的平均值作为该张切片阳性染色的平均光密度值。结果经统计分析软件 SPSS12.0 作统计学处理，分别求得病变组（$n=6$）和正常对照组（$n=4$）阳性表达 AOD 值的均值和标准差（$\bar{x} \pm s$），行两独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　角膜组织中Ⅲ型胶原的分布

由于本实验标本组织取自手术切除的板层角膜，因此观察范围包括上皮层、上皮基底膜、Bowman's 膜、基质层。荧光显微镜下，正常角膜呈暗绿色背景着色，隐约见上述各层结构完整，基质层胶原纤维板排列整齐，未见Ⅲ型胶原的阳性荧光表达。蚕蚀性角膜溃疡的角膜上皮层粘附疏松，部分缺损，基质层不同程度水肿，胶原纤维板间隙扩大，纤维板的直径大小不一。Ⅲ型胶原呈点状分布于邻近溃疡部位基质层的纤维板层间，远离溃疡处较近溃疡处排列规则（图 2）。

2.2　角膜组织中层粘连蛋白（Laminin，LN）的分布

在正常角膜的上皮层与 Bowman's 膜交界处，即基底膜部位，可见 LN 的不连续点状分布，荧光强度较弱（图 3）。而在蚕蚀性角膜溃疡的基底膜及 Bowman's 膜，LN 呈片状分布，表达的荧光强度明显高于正常角膜（图 4）。两者的 AOD 值相比较，差异有显著性（$P<0.05$）（表 1）。



E: Epithelium; S: Stroma

图 2　免疫荧光染色显示Ⅲ型胶原在蚕蚀性角膜溃疡基质层的表达　（SABC 法×200）

Fig 2　Positive expression of collagen type Ⅲ in Mooren's ulcer　（SABC×200）

图 3　免疫荧光染色显示层粘连蛋白在正常角膜上皮基底膜的表达　（SABC 法×200）

Fig 3　Positive expression of laminin in the normal epithelial basement membrane　（SABC×200）

图 4　箭头示层粘连蛋白在蚕蚀性角膜溃疡基底膜及 Bowman's 膜的表达　（SABC 法×200）

Fig 4　Positive expression of laminin in the basement membrane and Bowman's membrane of Mooren's ulcer shown by white arrow　（SABC×200）

表1 蚕蚀性角膜溃疡与正常角膜 LN、FN 阳性表达 AOD 值的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of average optical density of laminin and fibronectin in Mooren's ulcer and normal corneas ($\bar{x} \pm s$)

	Mooren's ulcer($n=6$)	Normal cornea($n=4$)	t	P
LN	0.273±0.039	0.431±0.107	3.376	<0.05
FN	0.531±0.072	0.214±0.139	-8.503	<0.01

2.3 角膜组织中纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)的分布

正常角膜,FN 呈高亮荧光、连续、均一的线状排布在基底膜(图5)。而蚕蚀性角膜溃疡的基底膜未见 FN 的表达,1例表达在上皮细胞内(图6),其他5例在溃疡邻近部位的基质层呈点片状表达(图7)。根据 AOD 值分析(表1),正常角膜中 FN 表达量显著多于蚕蚀性角膜溃疡,差异有非常显著意义($P<0.01$)。



E: Epithelium; S: Stroma

图5 纤维连结蛋白在正常角膜上皮基底膜呈线状分布 (SABC 法×400)

Fig 5 Linear distribution of fibronectin in the normal corneal epithelial basement membrane (SABC×400)

图6 纤维连结蛋白在蚕蚀性角膜溃疡上皮层的阳性表达,基底膜无表达 (SABC 法×200)

Fig 6 Positive expression of fibronectin in the epithelium of Mooren's ulcer and the negative expression in basement membrane (SABC×200)

图7 箭头示纤维连结蛋白在蚕蚀性角膜溃疡基质层的表达,基底膜无表达 (SABC 法×200)

Fig 7 Positive expression of fibronectin in the corneal stroma of Mooren's ulcer, but negative in the basement membrane (SABC×200)

3 讨论

3.1 细胞外基质与角膜溃疡

角膜除了3种固有细胞以外,主要由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分构成。ECM 大体可分为胶原、蛋白多糖、糖蛋白3大类,角膜主要由胶原蛋白构成。基质层胶原纤维的有序排列和蛋白多糖的合理分布是角膜透明性的重要保证。角膜溃疡时,胶原大量降解,糖蛋白、蛋白多糖成分也受影响,使基质结构被破坏,角膜混浊、水肿、变薄。同皮肤创伤修复过程类似,角膜损伤后会通过代偿性反应进行创伤修复。基质对创伤的反应依赖角膜细胞的作用[1]。伤后创缘附近健康的角膜细胞增殖、移行至创区,分化为肌成纤维细胞和成纤维细胞。肌成纤维细胞通过平滑肌收缩机制闭合伤口;成纤维细胞合成Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型胶原及各种蛋白多糖和糖蛋白,填满缺损区域;经过长时间的基质重塑,角膜恢复透明。

目前关于Ⅲ型胶原是否存在于正常角膜组织中争议很大,有的学者认为成人角膜中包含Ⅲ型胶原,Ben-Zvi[2]的实验只在胎儿角膜中检测到。但是,穿透性角膜移植术后1周,植片、植床结合处开始出现Ⅲ型胶原[3];PRK 术后2周[4],上皮下可观察到Ⅲ型胶原 mRNA 的表达,并逐渐增多,表明Ⅲ型胶原是角膜愈合过程的新生成分,参与基质的创伤愈合。我们的实验在正常角膜中未检测到Ⅲ型胶原,与 Ben-Zvi 的观察结果一致;但在病变角膜基质层近溃疡部位观察到黄绿色强荧光,提示蚕蚀性角膜溃疡的角膜细胞仍在合成、分泌新的胶原成分,溃疡病变发展的同时存在着自身修复反应。

层粘连蛋白和纤维连接蛋白是上皮基底膜特异且重要的糖蛋白成分,在上皮细胞的附着、分化、增殖、移行等行为中扮演着重要角色。当上皮缺损时,创面 LN、FN 增殖,引导创缘增殖的上皮细胞向创面中央移行,使得创面重新上皮化并粘附紧密。正常角膜基质层没有 LN、FN 的表达,当基质损伤时,创伤区 FN 增加,与胶原蛋白、蛋白多糖等交织成一个疏松的网状结构,使角膜细胞、成纤维细胞沿着网状纤维向创缘移动[5,6],成纤维细胞进一步分泌 ECM 成分填补创面。我们在正常角膜基底膜检测到 LN 的微量、不连续点状表达,FN 的连续线状分布,与组织学结构相符。在

蚕蚀性角膜溃疡的基底膜和 Bowman's 膜，LN 多量表达；基质层溃疡病变及邻近区域，FN 明显增多，均提示角膜在促修复因素作用下，不断有新的 ECM 成分被合成。但是，在 6 例病变角膜的基底膜，我们都未检测到 FN 的阳性染色，是一个值得探讨的现象。根据正常角膜基底膜清晰、明确的阳性着染，和病变标本基质层的阳性表达，首先可以排除抗体敏感性及染色方法上的误差；那么只能说明病变角膜基底膜可能没有 FN 的表达。究竟是该类病人的基底膜本来就缺乏 FN，还是溃疡浸润基质层之前，病变首先溶解了基底膜的 FN，需要进一步研究。当然，蚕蚀性角膜溃疡发病率非常低，我们研究的标本例数有限，有必要检测更多的样本进行验证。

另外，病变角膜中 3 种新生 ECM 成分不同的表达方式，与各自的结构特点及在角膜愈合反应中的作用是一致的。Ⅲ型胶原参与基质胶原纤维的形成，主要是调节胶原纤维束的大小；我们的实验观察到Ⅲ型胶原呈点状分布于基质层的纤维板层间，而不是布满整个胶原纤维，正体现了这一功能。Ⅲ型胶原在远离溃疡部位排布相对规则，提示新生的 ECM 成分已经开始重塑，这应该是蚕蚀性角膜溃疡病程能够持续数月至数十年的原因之一。新生的 LN 主要分布于蚕蚀性角膜溃疡的基底膜及 Bowman's 膜，提示 LN 在创伤愈合中的作用可能是侧重于促进上皮细胞层与其下方基质的紧密连接。FN 表达于上皮层及溃疡邻近部位的基质层，说明上皮细胞和角膜细胞均在合成 FN，分别补充基底膜和基质层的相应成分，以调理上皮细胞和成纤维细胞的移行粘附活动。

3.2　蚕蚀性角膜溃疡基底膜特点

蚕蚀性角膜溃疡以周边角膜基质层数个斑状浸润灶起病，病灶逐渐融合，相应部位的上皮缺损、基质出现浅沟；溃疡进展是先沿角膜缘，然后向角膜中央扩展，进行缘呈穿凿样，未累及的角膜始终保持透明。既往研究表明，这是一种特发性、自身免疫性疾病[7]。可能是外伤、感染或其他不明原因使角膜的抗原性发生改变，或释放出隐蔽抗原从而激发自身免疫反应；免疫反应过程中，中性粒细胞释放胶原酶引起角膜溶解。Berman[8]认为角膜溃疡基质的溶解几乎都是由角膜上皮缺损引起，都与不适当的炎症反应有关；而长期不愈的上皮缺损都伴有基底膜的异常和缺失。可以认为，基底膜不仅与上皮性角膜病变密切相关，在基质的创伤愈合中也发挥着重要作用。那么，蚕蚀性角膜溃疡与其基底膜在发病机制或病理过程中是否存在某种内在联系呢？我们的实验证实蚕蚀性角膜溃疡角膜中存在自身修复反应，但是临床上溃疡迁延不愈，显然是组织修复速度不及破坏速度。其直接原因可能是免疫炎症反应的作用，蛋白水解酶被持续合成释放，胶原蛋白及其他 ECM 成分被水解。本实验观察到该病的基底膜 FN 缺失，至少说明了基质层病变蔓延至上皮面之前，基底膜功能已存在缺陷。这可能是上皮缺损的直接原因，并且造成缺损区域再上皮化障碍，同时影响其下基质的愈合。除了 LN、FN，角膜上皮基底膜还有半桥粒、Ⅶ型胶原、Ⅳ型胶原等重要结构组分及某些自体抗原成分。蚕蚀性角膜溃疡患者基底膜改变仅仅是蛋白水解酶作用的结果，还是也参与了自身免疫反应？我们认为，探索蚕蚀性角膜溃疡上皮基底膜的特点，可能会为其发病机制的研究提供线索。

参考文献：

[1] Fini M E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea[J]. Prog Retin Eye Res, 1999, 18(4): 529 - 551.

[2] Ben-Zvi A, Rodrigues M M, Krachmer J H, *et al*. Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea[J]. Curr Eye Res, 1986, 5(2): 105 - 117.

[3] Kato T, Nakayasu K, Kanai A. Corneal wound healing and immunohistological features of extracellular matrix following penetrating keratoplasty in rabbits[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1999, 103(7): 519 - 526.

[4] 齐艳华，王康孙，洪　杉. PRK 术后角膜基质内Ⅰ型和Ⅲ型胶原的 mRNA 表达[J]. 眼科，2000，9(1)：53 - 54.

[5] Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer J E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly[J]. Cell Sci, 2003, 116(Pt 16): 3269 - 3276.

[6] Taliana L, Evans M D, Dimitrijevich S D, *et al*. Vitronectin or fibronectin is required for corneal fibroblast-seeded collagen gel contraction[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(1): 103 - 109.

[7] 谢汉平，陈家祺. 蚕蚀性角膜溃疡的研究现状[J]. 中国实用眼科杂志，1999，17(6)：326 - 330.

[8] Berman M, Manseau E, Law M, *et al*. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983, 24(10): 1358 - 1366.

（编辑　王　红）