文章编号:1000-5404(2006)15-1595-03

论著

蚕蚀性角膜溃疡 MMPs/TIMPs 表达的研究

赵长霖,谢汉平 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨进行性蚕蚀性角膜溃疡患者角膜中基质金属蛋白酶(MMPs)及其特异性组织抑制剂的表达及意义。**方法** 应用间接免疫荧光技术检测进行性蚕蚀性角膜溃疡与正常角膜中 MMP-1、2、3、9,TIMP-1、2 的分布,阳性结果应用图像分析系统进行定量分析。**结果** 正常角膜中,仅上皮层有 TIMP-1、2 的弱阳性表达。在蚕蚀性角膜溃疡,MMP-1、2、3、9,TIMP-1、2 均有阳性表达,MMP-2、TIMP-2 表达于上皮层,MMP-3 表达于基质层,MMP-1、9,TIMP-1 在上皮层和基质层均有表达。**结论** 在蚕蚀性角膜溃疡进展期,角膜中溃疡病变与损伤修复反应共存,但是修复速度不及组织破坏速度;其原因可能与角膜中 MMP-9 过度表达及 MMPs/TIMPs 系统调节失衡有关。

关键词:蚕蚀性角膜溃疡;角膜;基质;金属蛋白酶;基质金属蛋白酶组织抑制剂
中图法分类号:R345.6;R394.3;R772.21 **文献标识码**:A

Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in Mooren's ulcer cornea

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

Abstract: Objective To investigate the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in active Mooren's ulcer corneas. **Methods** An indirect immunofluorescent technique was used to visualize the presence of matrix metalloproteinase-1, 2, 3, 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1, 2 in active Mooren's ulcer corneas from 6 patients and normal human corneas from 4 corpses. The results were further analyzed by an image-processing system. **Results** Only TIMP-1, 2 were detected in normal corneal epithelium while MMP-1, 2, 3, 9, and TIMP-1, 2 all were found in Mooren's ulcer corneas. MMP-2, TIMP-2 expressed in epithelium, MMP-3 expressed in stroma, MMP-1, 9, and TIMP-1 expressed in both epithelium and stroma. **Conclusion** In active Mooren's ulcer cases, corneal lesion and corneal wound healing coexist, but the destructive reaction is greater than wound healing. Over-expression of MMP-9 and unbalanced regulation of MMPs/TIMPs may play an important role in the Mooren's ulcer of this stage.

Key words: Mooren's ulcer; cornea; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解酶系中最主要的一个蛋白水解酶超家族,基质金属蛋白酶及其特异性组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的平衡作用,动态调控着细胞外基质降解与沉积的平衡。研究表明,在角膜溃疡性病变中,MMPs 不是简单参与基质的降解,而是在溃疡的发生、发展和修复过程中都发挥着重要作用[1]。蚕蚀性角膜溃疡(Mooren's ulcer)是一种少见的、慢性、进行性、疼痛性、边缘性的角膜溃疡,目前认为这是一种自身免疫性角膜病,但确切的发病机制仍不清楚。本实验采用间接免疫荧光染色方法和图像分析系统,对进行性蚕蚀性角膜溃疡患者角膜中 MMP-1、2、3、9 及 TIMP-1、2 的表达进行定位、定量研究,探讨 MMPs/TIMPs 在该病进展过程中的作用,希望能为该病发病机制的研究和临床治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 角膜材料 病变组:选取 2003 年 8 月至 2004 年 5 月我院收治的 6 例进行性蚕蚀性角膜溃疡患者的角膜标本(为板层角膜移植手术时切下的病变角膜组织),取溃疡邻近相对健

作者简介:赵长霖(1975-),女,安徽省安庆市人,硕士,医师,主要从事角膜病防治方面的研究。电话:(023)65398613, E-mail: zcl1975@sina.com
通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377, E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-07-04;修回日期:2006-03-15

康的板层角膜，立即液氮处理、-70 ℃冰箱低温冻存备用。诊断标准：近角膜缘处穿凿样角膜溃疡，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。其中男性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。溃疡累及3～6个钟点位的角膜缘，宽度为0.5～4 mm，深度为1/2～2/3 CT。

对照组：4只穿透性角膜移植术后剩余的正常周边角膜，取自意外死亡的健康人，无眼部疾病。对照组角膜由本院眼库提供。

1.1.2 试剂 一抗：MMP-1山羊抗人多克隆抗体，MMP-3小鼠抗人单克隆抗体，北京中山生物技术公司产品；MMP-2、MMP-9小鼠抗人单克隆抗体，TIMP-1、TIMP-2兔抗人多克隆抗体，福州迈新生物技术开发有限公司产品。MMP-1抗体的工作浓度为1∶100，MMP-2抗体的工作浓度为1∶20，其余抗体为即用型工作液。以上抗体均与组织中活化状态的酶特异性结合。二抗：生物素化兔抗山羊IgG（即用型工作液）、生物素化山羊抗小鼠IgG（1∶100）、生物素化山羊抗兔IgG（1∶100），均为武汉博士德生物工程公司产品。SABC-FITC染色试剂盒，武汉博士德生物工程公司产品。异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）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。

1.2 方法

1.2.1 间接免疫荧光染色方法（indirect immunofluorescence，IIF） 按照文献[2]的方法进行。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，取1张组织切片只加缓冲甘油作标本自发荧光对照。

1.2.2 结果分析 荧光显微镜下观察各种抗原在角膜中的表达部位并记录。所采集的图像用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）值，以5个视野的平均值作为该张切片阳性着色的AOD值。

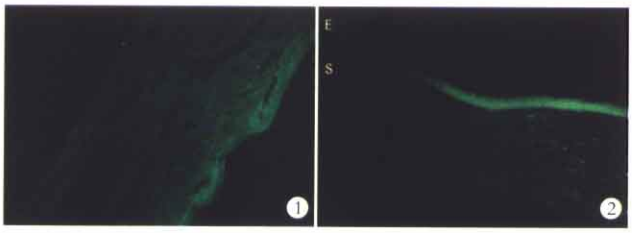
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 12.0统计软件进行Pearson Correlation相关分析。

2 结果

2.1 角膜组织中MMPs的分布

由于本实验标本组织取自手术切除的溃疡邻近相对健康的板层角膜，因此观察范围包括上皮细胞层、前基质层。荧光显微镜下观察，正常角膜中未见MMP-1、2、3、9的阳性着色。在蚕蚀性角膜溃疡中MMP-1、2、3、9都可见阳性染色：MMP-2表达于上皮层；MMP-3主要表达于基质深层间质间；MMP-1、MMP-9在上皮层和基质层均有表达。其中MMP-1表达于上皮细胞和基质层间质间，MMP-9表达于上皮细胞和基质层角膜细胞质内（图1、2）。



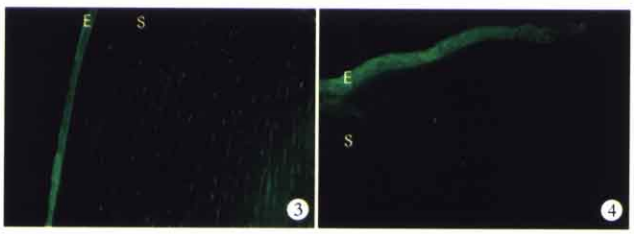
E：上皮层；S：基质层

图1 MMP-3在蚕蚀性角膜溃疡角膜基质深层间质间的表达（IIF×200）

图2 MMP-9在蚕蚀性角膜溃疡角膜上皮细胞和角膜细胞中的阳性表达（IIF×200）

2.2 角膜组织中TIMPs的分布

在正常角膜中，仅在上皮层检测到TIMP-1和TIMP-2的弱阳性染色。在蚕蚀性角膜溃疡，TIMP-1表达于上皮层和基质层角膜细胞；TIMP-2表达于上皮层。病变组染色强度明显高于正常组（图3、4）。



E：上皮层；S：基质层

图3 TIMP-1在蚕蚀性角膜溃疡角膜上皮层和角膜细胞的表达（IIF×200）

图4 TIMP-2在蚕蚀性角膜溃疡角膜上皮层的表达（IIF×200）

2.3 病变角膜组织中MMPs、TIMPs的表达特点

测量蚕蚀性角膜溃疡患者角膜中MMP-1、2、3、9及TIMP-1、2阳性表达的AOD值，见表1。将6组AOD值两两间进行Pearson Correlation相关分析，各组相关分析的 P 值为0.246～0.881，均大于0.05，故差异无显著性，即各酶之间的AOD值无相关性。

表1 蚕蚀性角膜溃疡角膜中MMPs、TIMPs表达的AOD值（$\bar{x} \pm s$）

蚕蚀性角膜溃疡	n	AOD
MMP-1	6	0.353±0.026
MMP-2	6	0.344±0.029
MMP-3	6	0.357±0.007
MMP-9	6	0.386±0.099
TIMP-1	6	0.549±0.018
TIMP-2	6	0.542±0.010

3 讨论

3.1 MMPs/TIMPs在角膜溃疡与愈合过程中的生物学作用

MMPs是一个结构与功能相关的含锌肽链内切酶

超家族，对 ECM 有广泛的降解作用。MMPs 最大共同特点是活性与锌离子有关[1,3,4]。它们均以无活性的潜酶形式分泌，激活后方可发挥蛋白水解酶功能。MMPs 的活性为其天然特异性抑制因子——基质金属蛋白酶组织抑制剂 TIMPs 所抑制。目前发现有 4 种 TIMP，每种 TIMP 能抑制大多数 MMPs，但各自的抑制对象略有不同[5]。MMPs/TIMPs 系统协调维持着 ECM 沉积与降解的平衡。MMPs、TIMPs 的时空表达失调与慢性角膜溃疡密切相关。

3.2　MMPs/TIMPs 在蚕蚀性角膜溃疡中的作用模式

在正常角膜组织中，我们仅在上皮层检测到 TIMP-1、-2 的弱阳性表达；病变角膜中，MMP-1、2、3、9 和 TIMP-1、-2 均有表达，表达水平较对照组明显增高。Smith 等[6]报道，角膜组织中 MMP-2 和泪膜中 MMP-9 的过度表达是周边溃疡性角膜炎（peripheral ulcerative keratitis，PUK）角膜病变发生、发展的关键。蚕蚀性角膜溃疡角膜中 MMP-1、2、3、9 均有表达，提示在蚕蚀性角膜溃疡进展期，导致角膜溶解的因素持续存在。以往研究对在角膜溃疡中发挥作用的 MMPs 来源一直未确定[6,7]。本实验观察到这几种酶表达在蚕蚀性角膜溃疡的上皮层和/或基质层、角膜细胞，因而我们认为在该病进展期，MMPs 主要是由上皮细胞及角膜细胞等角膜固有细胞合成及分泌。既往研究认为蚕蚀性角膜溃疡的角膜溶解是由于球结膜与角膜缘发生免疫炎症反应所致。我们推测，早期免疫反应使角结膜中 MMPs 过度分泌和活化，诱导溃疡发生；随着病程进展，角膜固有细胞对 MMPs 的调节紊乱可能是溃疡迁延不愈的主要原因。这可以解释临床上系统应用糖皮质激素不能完全控制蚕蚀性角膜溃疡，手术切除溃疡邻近球结膜和病变角膜也不能阻止溃疡复发的原因。糖皮质激素能够抑制机体的免疫反应，但不能控制 MMPs 的生成和活化；手术能够去除致病的免疫源成分，但不能控制失衡的 MMPs 酶系统，因此病变仍会继续发展。

3.3　MMPs/TIMPs 在角膜损伤修复反应中的作用

与皮肤损伤愈合过程类似，角膜损伤愈合反应 中 MMP-1 不可缺少。再上皮化时，迁移的上皮细胞分泌 MMP-1，借助其对 ECM 的降解作用移行、覆盖创面、完成上皮化；基质层修复时，角膜细胞补充 MMP-1 到损伤部位，作用于被破坏的或新沉积的胶原以完成胶原重塑[7]。MMP-2 和 MMP-9 在角膜创伤修复反应中分工不同，MMP-9 可能参与基底膜的重建，而 MMP-2 侧重于基质层修复的胶原重塑过程[8]。对于 MMP-3，研究显示它只由移行新形成的多层上皮细胞或其下方深层基质成纤维细胞合成[9]，提示 MMP-3 在上皮基底膜构建和基质重塑中发挥作用。蚕蚀性角膜溃疡病程漫长，进展期 MMP-1、2、3、9 在溃疡形成及角膜代偿修复过程都应该发挥着作用，其中具体的作用方式有待进一步研究。修复期角膜 MMP-9 一般只表达于上皮层[7]，本研究显示，蚕蚀性角膜溃疡的上皮细胞和基质层角膜细胞都在合成 MMP-9，提示 MMP-9 的过度表达可能导致基底膜修复障碍，进而影响再上皮化和基质层的修复。

在蚕蚀性角膜溃疡，我们发现角膜上皮细胞、角膜细胞都在分泌 TIMP-1、TIMP-2，表达水平较正常对照显著上调，是为拮抗组织中过度活化的 MMPs。但是如果按 1∶1 的结合比例计算，活化的 MMPs 多于 TIMPs，角膜自身分泌的 TIMPs 不能够完全抑制 MMPs 的水解作用。值得注意的是，虽然本研究结果提示，在活动性蚕蚀性角膜溃疡的角膜组织中，MMP-1、2、3、9 异常表达，TIMP-1 和 TIMP-2 较正常角膜的表达增强，然而，MMP-1、2、3、9，TIMP-1、TIMP-2 表达的 AOD 值之间无相关性，这一结果提示，蚕蚀性角膜溃疡的 MMPs 和 TIMPs 可能存在网络调节机制，目前这些调节机制尚不清楚，需进一步研究。MMPs/TIMPs 调节失衡，组织修复能力不及破坏能力，可能是该病慢性迁延的原因。所以，本阶段在治疗上应注重抑制 MMPs 的产生和活化，加用锌离子制剂和/或人工合成的基质金属蛋白酶抑制剂，特别是针对 MMP-9 的特异性抑制剂，将有利于溃疡的静止和愈合。板层角膜移植术后加用基质金属蛋白酶抑制剂可能减少溃疡复发。

参考文献：

[1] KUO I C. Corneal wound healing[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2004, 15(4): 311 - 315.

[2] 蔡文琴，王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994：62.

[3] WONG T T, SETHI C, DANIELS J T, *et al*. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment[J]. Surv Ophthalmol, 2002, 47(3): 239 - 256.

[4] SIVAK J M, FINI M E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology[J]. Prog Retin Eye Res, 2002, 21(1): 1 - 14.

[5] WILL H, ATKINSON S J, BUTLER G S, *et al*. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3[J]. J Biol Chem, 1996, 271(29): 17119 - 17123.

[6] SMITH V A, HOH H B, EASTY D L. Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis[J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(12): 1376 - 1383.

[7] DANIELS J T, LIMB G A, SAARIALHO-KERE U, *et al*. Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGF-mediated migration on collagen I[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(3): 1048 - 1055.

[8] FINI M E, GIRARD M T, MATSUBARA M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing[J]. Acta Ophthalmol Suppl, 1992, (202): 26 - 33.

[9] INOUE M, KRATZ G, HAEGERSTRAND A, *et al*. Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing and stops re-epithelialization[J]. J Invest Dermatol, 1995, 104(4): 479 - 483.

（编辑　王　红）