DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.038
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1084 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1084-04

TGF-β抑制剂(Decorin)抗滤过泡瘢痕形成及毒副作用的实验研究

谢 琳,贺翔鸽 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所眼科,重庆 400042)

提 要:目的 观察Decorin抑制结膜瘢痕形成,降低眼压效果和对兔眼的毒副作用。方法 模型采用Reichel结膜瘢痕模型,Schiotz氏眼压计测量眼压变化,结合光镜、电镜观察兔眼病理改变。结果 Decorin可使滤过泡形态良好,维持较长时间低眼压,而且无毒副作用。结论 Decorin可作为抑制滤过泡瘢痕形成的辅助药物之一。

关键词:Decorin;转化生长因子-β1;结膜滤过泡瘢痕;眼压
中图法分类号:R392.11;R777.3 文献标识码:A

Anti-conjunctival bleb scarring effect and toxicity of TGF-β inhibitor (Decorin) in rabbits after filtration surgery

XIE Lin, HE Xiang-ge (Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Decorin on alleviating conjunctival scarring and decreasing the intraocular pressure (IOP), and its toxicity on rabbit eyes after filtration surgery. Methods Reichel's model of conjunctival scarring was used. A total of 32 rabbits (64 eyes) were divided into Decorin group (n=24 eyes), PBS group (n=24), mitomycin (MMC) group (n=8) and normal control (n=8). Schiotz's ophthalmotonometer was used to measure the IOP. The pathological changes of rabbit eyes were observed with light microscope and electron microscope. Results Decorin effectively inhibited conjunctival scarring, maintained the lowering of IOP with clinical safety and non-toxicity. Conclusion Decorin can be regarded as an adjuvant agent to reduce subconjunctival scarring after filtration surgery.

Key words: Decorin; transforming growth factor-β1; conjuctival bleb scarring; intraocular pressure

滤过泡瘢痕形成是抗青光眼滤过术失败的主要原因,其主要是由于巩膜表层,Tenon's囊和球结膜之间成纤维细胞增殖、胶原合成增加,从而结膜下组织纤维化。一些抗瘢痕药物,如皮质类固醇、丝裂霉素-C、5-氟尿嘧啶等已用于临床青光眼滤过性手术,对改善滤过泡、提高手术成功率起到一定的作用,但也有一些副作用及并发症,有的药物还具有严重的毒性作用。因此,寻找疗效高、毒副作用小的抗瘢痕形成药物是提高青光眼滤过术成功率研究的热点。

转化生长因子-β(Transforming growth factor-β, TGF-β)能诱导自身合成,促进靶细胞上TGF-β受体的表达,抑制胶原酶合成,使成纤维细胞合成能力增强[1],因此,抑制TGF-β因子的活性是抗瘢痕形成的途径之一。研究表明:Decorin是存在于几乎所有细胞外基质内的一种基质成分,能与TGF-β1、β2、β3结合从而中和其生物学活性,使其活性降低,是TGF-β拮抗剂和天然调节物[2]。本实验在滤过术中应用Decorin,判断Decorin在滤过泡形成中的作用;与丝裂霉素-C比较,评价Decorin对眼组织的毒副作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用健康新西兰大白兔32只,64只眼,雌雄兼用,体重1.8~2.5 kg(由本院实验动物中心提供)。分组:Ⅰ组为Decorin组,24只眼,手术后在7、30 d致死动物并取眼球。Ⅱ组为PBS组,24只眼,手术后在7、30 d致死动物并取眼球。Ⅲ组为丝裂霉素-C(Mitomycin-C, MMC)组,8只眼,手术后在第7天致死动物并取眼球。Ⅳ组为正常眼压对照组(Control),8只眼,不做手术。

1.2 模型制作

本实验采用Reichel[3]的结膜瘢痕模型加用滤过性手术。0.1 mg/ml Decorin(Sigma公司)的配制:将2 mg Decorin冻干粉溶解于20 ml PBS(1×PBS)液中。用离心管分装,每只100 μl,于-20 ℃保存。所有动物采用3%戊巴比妥钠1 ml/kg耳缘静脉注射麻醉。Ⅰ组(Decorin组)常规做巩膜下巩膜咬切术,缝合结膜瓣后立即于结膜瓣下注射Decorin 100 μl(0.1 mg/ml),以后依次在术后1、3、6 d在相同部位的结膜瓣下注射Decorin 100 μl(0.1 mg/ml)。Ⅱ组(PBS组)做同样方法的滤过术,术后同样方式结膜瓣下注射PBS(1×PBS)100 μl。Ⅲ组(MMC组)作同样方法的滤过术,术中在巩膜瓣下放置浓度0.2 mg/ml、剂量200 μl、大小4 mm×6 mm的MMC棉片,5 min以后用200 ml的平衡盐液冲洗。所有眼术后用抗生素眼液点眼。

1.3 眼压测量

用Schiotz氏眼压计测量,由同一观察者完成,采取盲法。术后14 d内每天测量,以后每3 d测量1次直到动物死亡。每次每只眼作3次测量,取平均读数。

1.4 取材及切片的制作

Ⅰ、Ⅱ组动物在术后7、30 d经耳缘静脉注射消毒空气致死动物,立即摘除眼球,置于0 ℃生理盐水中,分别取下6 mm×8 mm的结膜滤过泡、2 mm×3 mm的角膜、滤过泡下方的睫状体和颞侧视网膜。固定于10%中性福尔马林液中72 h,常规石蜡包埋,做5 μm厚连续切片。常规HE染色,普通光镜检查。固定于3%戊二醛液中,透射电镜检查。Ⅲ组动物在术后第7天用同样方法致死,立即摘除眼球,置于0 ℃生理盐水中,取结膜滤过泡、角膜、睫状体和视网膜。用同样的方法做普通光镜和透射电镜检查。

基金项目:重庆市科委中青年应用基础研究基金资助项目(98-5356)
作者简介:谢 琳(1966-),女,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事青光眼、白内障等方面的研究。电话:(023)68757341
收稿日期:2001-07-10;修回日期:2001-09-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5　统计学处理

采用 t 检验。

2　结果

2.1　大体形态

在 30 d 内观察, Decorin 组的滤过泡隆起、弥散。PBS 组的滤过泡局限、平坦、面积小。MMC 组的滤过泡隆起、弥散, 滤过泡壁菲薄。

2.2　眼压情况

Decorin 组眼压保持较低水平, 在术后各时相点与正常眼压对照组比较差异显著($P<0.01$), PBS 组眼压随时间有上升趋势, 术后 7 d 以前与正常眼压对照组比较差异非常显著($P<0.01$), 与 Decorin 组比较差异不显著。PBS 组 7 d 以后眼压升高, 与正常眼压对照组比较差异显著($P<0.05$), 与 Decorin 组比较差异非常显著($P<0.01$), 见表 1。

表 1　各组眼压比较(mmHg, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of intraocular pressure in different groups(mmHg, $\bar{x}\pm s$)

	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d
Decorin	8.65±0.88 **	8.77±0.82 **	10.19±0.96 **△	11.38±1.29 **△△	12.86±1.35 **△△
PBS	8.79±0.51 **	9.23±1.17 **	12.23±1.91 *	15.58±0.65	16.65±1.01
Control	16.24±0.98	16.28±1.11	16.25±0.87	16.19±1.07	16.31±0.68

1 mmHg=0.133 kPa; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* PBS

2.3　组织病理学观察

2.3.1　结膜改变　　光镜下, 术后 7 d, Decorin 组结膜上皮完整, 纤维细胞数量少, 排列整齐; MMC 组结膜上皮结构有缺损, 纤维细胞明显减少。术后 30 d, Decorin 组滤过泡仍可见较疏松的上皮下结缔组织、散在的胶原纤维, 见图 1; PBS 组滤过泡可见厚而致密的纤维组织, 几乎未见滤过空泡, 见图 2。电镜下, Decorin 组结膜上皮细胞、腺上皮细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞的超微结构正常。MMC 组结膜上皮细胞胞质内粗面内质网明显扩大, 形成大空泡, 见图 3, 成纤维细胞胞核内异染色质增多、边集、核周间隙扩大, 胞质内线粒体肿胀、内质网扩大。

2.3.2　角膜内皮改变　　术后 7 d, 光镜下, Decorin 组角膜内皮细胞完整、连续, 见图 4, 而 MMC 组角膜内皮细胞部分缺失、脱落, 见图 5。电镜下, Decorin 组角膜内皮细胞内细胞器未见破坏。MMC 组角膜内皮细胞脱落, 胞质内线粒体肿胀、内质网轻度扩大。

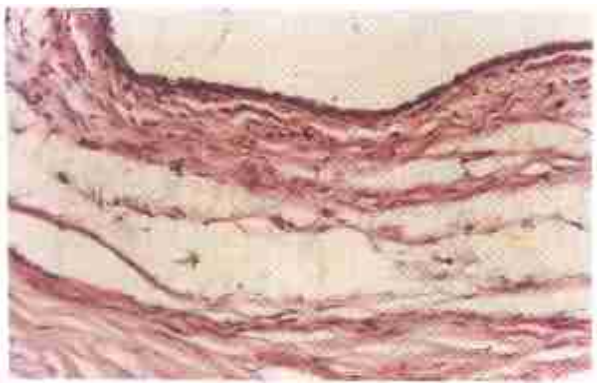


图 1　**Decorin** 组术后 **30 d**, 滤过泡结膜下结缔组织疏松(→)　(HE× 200)

Fig 1　Loosened subconjunctival connective tissues in Decorin group 30 d after filtration operation　(HE× 200)

2.3.3　睫状体改变　　术后第 7 天, 光镜下, Decorin 组睫状体上皮双层细胞排列正常, 见图 6; MMC 组睫状体上皮双层细胞及核极性紊乱、层次不清, 细胞质内有明显空泡形成。电镜下, Decorin 组双层细胞细胞器未见破坏。MMC 组色素上皮细胞肿胀、溶解性坏死。

2.3.4　视网膜改变　　光镜、电镜下, Decorin 组和 MMC 组的视网膜未发现异常。

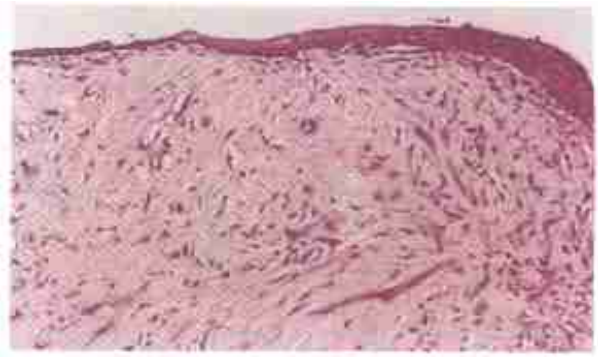


图 2　**PBS** 组术后 **30 d**, 滤过泡中的纤维组织厚而致密(→)　(HE× 200)

Fig 2　Thickened and compact of intra-bleb fibrous tissues in PBS group 30 d after filtration operation　(HE× 200)

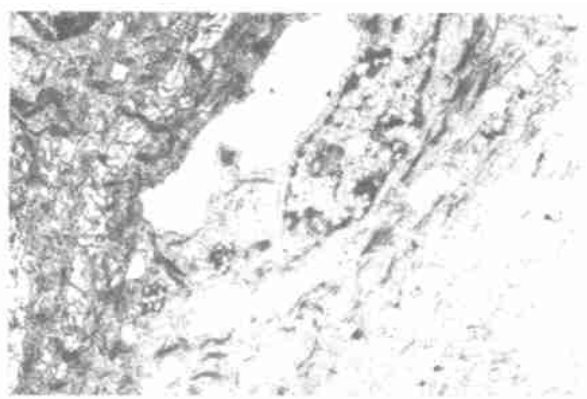


图 3　**MMC** 组术后第 **7** 天, 结膜上皮细胞胞质内粗面内质网明显扩大, 形成大空泡(→)　(TEM× 8 000)

Fig 3　Rough endoplasmic reticulum of conjuctival epithelial cells enlarged and with valcuoles formation 7 d after operation in MMC group　(TEM× 8 000)

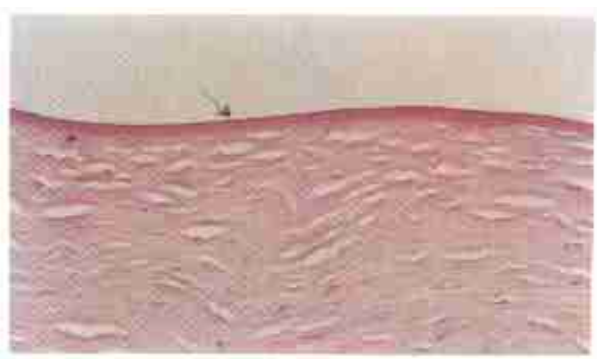


图 4　**Decorin** 组术后第 **7** 天, 角膜内皮细胞完整、连续(→)　(HE× 200)

Fig 4　Corneal endothelial cells intact and sucessive in Decorin group 7 d after operation　(HE× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

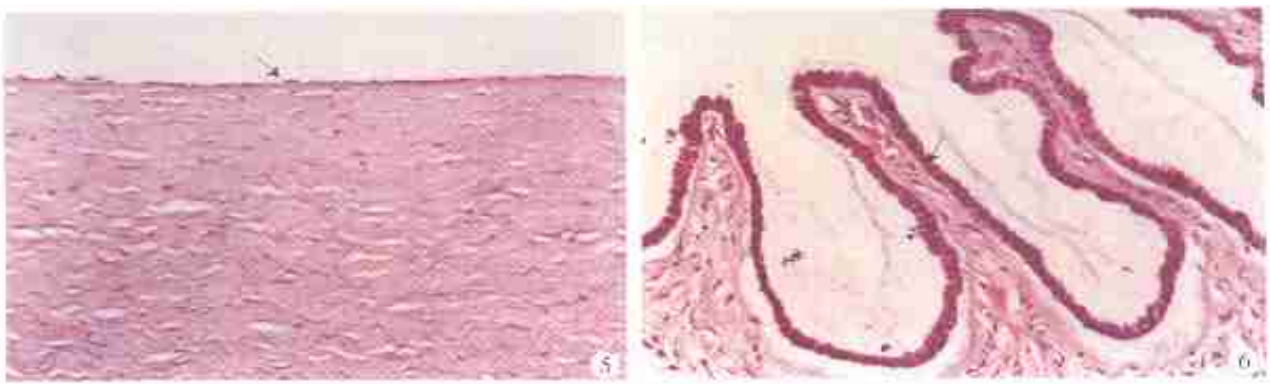


图5 MMC组术后第7天，角膜内皮细胞部分缺失、脱落(→) (HE× 200)

Fig 5 Corneal endothelial cells partially detached and lost in MMC group 7 d after operation (HE× 200)

图6 Decorin组术后第7天，睫状体上皮双层细胞排列正常(→) (HE× 200)

Fig 6 Ciliary epithelial cells well-arranged in Decorin group 7 d after operation (HE×200)

3 讨论

3.1 TGF—β 对滤过泡瘢痕的影响

包括转化生长因子(Transforming growth factor-β, TGF-β)在内的多种细胞因子在瘢痕形成中起着重要作用。TGF-β 来源于血小板、巨噬细胞和一些其他细胞，其受体存在于所有细胞上。它的主要生物效应是调节细胞增殖和结缔组织合成，并可刺激间质细胞的增生，如成纤维细胞、平滑肌细胞等表达、合成、分泌胶原蛋白及纤维连接蛋白，同时抑制基质降解酶的产生，促进基质沉积[4]。文献[5]报道，在小鼠的角巩缘创伤模型中发现术后2 d成纤维细胞开始增多，在伤口愈合过程中，TGF-β_1、TGF-β_2出现早而且保持高表达。本研究推测抗青光眼滤过术的失败与TGF-β_1、TGF—β_2早而高的表达、创伤愈合的过度反应有关。TGF-β_1、β_2、β_3不仅能刺激成纤维细胞的生长，而且其水平变化能显著地调节结膜瘢痕反应[6]。本实验发现，手术以后结膜下瘢痕形成，影响滤过效果，眼压控制不好，呈上升趋势。

3.2 Decorin 对结膜滤过泡瘢痕的影响

3.2.1 Decorin的分子结构和作用原理 Decorin是一种小分子的硫酸软骨素类蛋白多糖，包括1个核心蛋白和1条氨基葡萄糖多聚糖链。核心蛋白的80%由含亮氨酸的24个氨基酸的10个重复单位组成。Decorin存在于几乎所有细胞外基质内，能直接调整基质成分和细胞粘附及增殖。在中国仓鼠卵巢细胞中Decorin呈高表达，对其形态学和生长率有奇特的作用[7]。利用特殊抗体(6-B-6, LF-96)免疫标记浸渍法，也发现Decorin含有肯定的携带硫酸软骨素氨基葡萄糖的核心蛋白物质，该核心蛋白能够抑制胶原纤维的生长，中和TGF-β的功能，从而抑制纤维化[8]。本实验所用Decorin从牛的关节软骨中提取，没有免疫原性。

3.2.2 Decorin对结膜滤过泡的影响 近年来，临床应用MMC拮抗青光眼滤过术后的滤过泡瘢痕形成取得一些疗效，其减少滤过泡纤维化、提高手术成功率的作用得到一致肯定。MMC是由头状链霉菌层分离出的一种抗代谢药物，具有烷化作用，与DNA分子的双螺旋形成交联，抑制DNA的合成，能阻止成纤维细胞产生胶原物质。Khaw等[9]对家兔行滤过术，术中放置0.4%的MMC于巩膜瓣下5 min，在术后30 d组织培养观察发现胶原纤维仍被抑制，眼压保持较低水平，对保持滤过泡的通畅发挥了很好的作用。

本实验发现，在手术后结膜下使用Decorin的第30天，其滤过泡的大体形态仍是隆起、弥散，与MMC组滤过泡的大体形态相似；而PBS组的滤过泡局限、平坦、面积小。不同时期Decorin组的眼压保持较低的水平，与正常眼压对照组比较有显著差异；PBS组在术后7 d以前眼压较低，与Decorin组比较无差异，而在7 d以后眼压有上升趋势，与Decorin组比较差异显著。由此可见，Decorin可使滤过泡形成良好，及维持较长时间的低眼压。

3.2.3 Decorin的毒性研究 随着MMC在临床上抗滤过泡瘢痕形成的广泛应用，其毒副作用也越显突出。如：结膜切口或滤过泡渗漏、角膜内皮细胞损害等[10,11]；文献[12]报道，低眼压性黄斑病变是发生在年轻近视患者小梁切除术联合应用MMC后的一种严重的并发症，其发生率达4%～17%，分析其原因为MMC对睫状体上皮细胞的毒性损伤致房水生成减少，低眼压可致视网膜感光细胞缺失，脉络膜增厚，内界膜表面增殖致视网膜固定皱褶形成。本实验也证实，在术后第7天，MMC对结膜上皮细胞、成纤维细胞、角膜内皮细胞、睫状体色素上皮细胞有毒性作用。而Decorin对结膜上皮细胞、成纤维细胞、角膜内皮细胞、睫状体色素上皮细胞、视网膜无毒性作用。由此可见，Decorin对滤过泡瘢痕有一定抑制作用，而且无毒副作用。

参考文献：

[1] Knittel T, Janneck T, Muller L, *et al*. Transforming growth factor beta 1-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

regulated gene expression of Ito cells[J]. Hepatology, 1996, 24(2): 352—360.
[2] Border W A, Noble N A, Yamamoto T, *et al*. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease[J]. Nature, 1992, 360(6 402): 361—364.
[3] Reichel M B, Cordeiro M F, Alexander R A, *et al*. New model ! of conjunctival scarring in the mouse eye[J]. Br J Opthalmol, 1998, 82(9): 1 072—1 077.
[4] Narayanan A S, Page R C, Swanson J. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators[J]. Biochem J, 1989, 260(2): 463—469.
[5] Mietz H, Chez Barrios P, Lieberman M W, *et al*. A mouse model to study the wound healing response following filtration surgery[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(6): 467—475.
[6] Cordeiro M F, Bhattacharya S S, Schultz G S, *et al*. TGF-beta 1, -beta 2, and -beta 3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(3): 756—763.
[7] Merle B, Durussel L, Delmas P D, *et al*. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain[J]. J Cell Biochem, 1999, 75(3): 538—546.
[8] Melrose J, Ghosh P, Taylor T K, *et al*. Elevated synthesis of biglycan and decorin in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration [J]. Eur Spine J, 1997, 6(6): 376—384.
[9] Khaw P T, Doyle J W, Sherwood M B, *et al*. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1993, 111(2): 263—267.
[10] Schwartz A L, Weiss H S. Bleb leak with hypotony after laser suture lysis and trabeculectomy with mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1992, 110(8): 1 049.
[11] Derick R J, Pasquale L, Quigley H A, *et al*. Potential toxicity of mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1991, 109(12): 1 635.
[12] Nuyts R M, Greve E L, Geijssen H C, *et al*. Treatment of hypotonous maculopathy after trabeculectomy with mitomycin C[J]. Am J Ophthalmol, 1994, 118(3): 322—331.

(编辑　谢义霞)

(上接 1083 页)

DNA 凝胶片, 150 V, 30 min, 从 V 型孔内吸回含所需的 DNA 溶液。无水乙醇沉淀, 紫外分光仪定量。

1.2.3　hTRT 质粒 pGRN145 目的片段与载体质粒 pGBKT7 的定向连接[3], 按载体: 插入片段摩尔比 1∶3 的比例, 将二者加入到连接反应体系中, 5× T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μl, T4 DNA 连接酶 1 μl(总反应体积 10 μl), 12 ℃反应 16 h, 置 4 ℃备用。

1.2.4　大肠杆菌 DH5α 感受态细胞的制备(氯化钙法)。

1.2.5　转化: 将 pGBKT7-hTRT 连接产物转化入制备好的 DH5α 大肠杆菌感受态细胞。感受态细胞 100 μl, 加连接反应物 2 μl 置冰浴 30 min。42 ℃水浴 90 s。加 900 μl LB 培养液, 37 ℃振荡培养 45 min。转化菌涂于卡那霉素 LB 琼脂平板倒置培养 16 h。提取质粒, *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切鉴定重组体。

2　结果

hTRT cDNA 质粒经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分为目的片段 3.4 kb, 载体 10.6 kb 两段, 采用电洗脱法回收 3.4 kb 目的片段。

将载体质粒 pGBKT7 经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切, 采用电洗脱法回收 7.3 kb 载体片段。通过 T4 DNA 连接酶将 hTRT cDNA 质粒目的片段定向克隆入载体质粒 pGBKT7, 将其转化入大肠杆菌 DH5α。抽提质粒后经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切(7.3、3.4 kb)及 *Hind* Ⅲ单酶切(4.9、4.2、1.5kb)证实, hTRT cDNA 目的片段与载体质粒 pGBKT7 连接, 表明成功构建了 pGBKT7-hTRT 诱饵融合蛋白表达载体。

3　讨论

研究表明, 在已发现的端粒酶 3 个亚单位中, hTRT 可能是端粒酶催化活性亚单位。hTRT 在恶性肿瘤及肿瘤细胞株中呈高表达, 但在正常组织及端粒酶阴性的细胞株中不表达, 与端粒酶活性具有良好的一致性。hTRT cDNA 导入正常细胞使端粒酶活化, 细胞的生长周期增加, 而且细胞的核型无任何改变。研究显示 hTRT 上调是肿瘤发生的重要事件[4,5]。有关端粒及端粒相关蛋白的研究已取得较大进展, 但端粒、端粒酶相关蛋白组分的构成及其调控的分子机制并不十分清楚。因此, 利用亚克隆技术构建 hTRT 诱饵融合蛋白表达载体, 通过酵母双杂交技术筛选与 hTRT 相互作用的未知蛋白分子, 可望为上述问题的解决带来希望。

目前研究蛋白质间相互作用的主要技术方法之一是酵母双杂交技术, 其原理是基于许多真核转录活化因子是由两个物理上能分开的、功能上独立的结构域组成。如酵母 GAL4 转录活化因子包含一个 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DNA-BD)和转录活化结构域(Active domain, AD), 两种结构域是激活一个基因所必需的。两种不同的克隆载体用于制备这两种 GAL4 结构域分别与有相互作用可能性的两种蛋白的基因融合, 如果两种杂合蛋白的非 GAL4 部分相互作用, 则使 DNA-BD 和 AD 栓在一起, 使 GAL4 的转录活化功能再现, 激活具有上游 GAL4 结合位点的报告基因(lacZ 和 His3)。将编码靶蛋白基因克隆至 DNA— BD 载体以产生靶蛋白-DNA-BD 的融合蛋白(即"诱饵"), 即可筛选构建在 AD 载体上的 cDNA 文库, 获取 His^+ 的转化株, 利用灵敏的β-半乳糖苷酶活性的滤膜影印分析, 进一步检测 His^+ 转化株中二级报告基因(lacZ)的表达。因此, 诱饵融合蛋白表达载体的成功构建是实验首先要解决的关键问题。本研究以两种限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ分别消化 hTRT 质粒 pGRN145、载体质粒 pGBKT7, 将目的片段 hTRT cDNA 定向克隆入载体 pGBKT7, 经过大肠杆菌转化及质粒提取, 再经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切证实成功构建了 hTRT 诱饵融合蛋白表达载体 pGBKT7-hTRT, 为从 cDNA 文库中筛选与 hTRT 相互作用的端粒相关未知蛋白的编码基因奠定了良好的实验基础。

关键词: 端粒; 诱饵载体
中图法分类号: R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Greider C W. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future[J]. Curr Biol, 1998, 8(5): R178.
[2] 吉昌华, 陈南春, 杨安钢, 等. 生物化学及分子生物学实验与技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1994. 165.
[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 55—65.
[4] Steinert S, Shay J W, Wright W E. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(3): 1 095—1 098.
[5] Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, *et al*. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(2): 401—405

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net