

· 实验研究 ·

基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂在大鼠青光眼滤过术后滤过泡组织中的动态表达

刘梦迎 王玲 王大博 姚如永

266003 青岛大学附属医院眼科(刘梦迎、王玲、王大博),中心实验室(姚如永)

通信作者:王玲,Email:tsingtaowl@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.008

【摘要】 **背景** 青光眼滤过术后瘢痕形成是导致手术失败的主要原因,探讨球结膜滤过泡中基质金属蛋白酶 2(MMP-2)及组织金属蛋白酶抑制剂 2(TIMP-2)的表达对于术后瘢痕形成的发病机制研究具有重要意义。**目的** 观察大鼠球结膜滤过泡模型滤过区组织中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达与瘢痕形成进程的关系。**方法** 采用完全随机化分组法将 63 只 6~8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠分为正常对照组和术后 1、3、5、7、14、28 d 组,每只大鼠任选一侧眼为实验眼。采用前房引流管植入术建立大鼠球结膜滤过泡模型,术后裂隙灯显微镜下观察大鼠球结膜滤过泡的形成情况及眼前节反应,各组于相应时间点颈椎脱臼法处死大鼠,其中 3 只眼制备完整眼球冰冻切片,采用免疫荧光化学染色法检测标本中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达和定位;另取 6 只大鼠结膜滤过区组织行 Western blot 检测,观察 MMP-2 和 TIMP-2 在滤过区组织中的动态表达。**结果** 所有术眼在术后第 1 天均形成不同程度隆起的滤过泡,维持时间为 7~17 d,平均生存时间为 12 d。Western blot 检测结果显示,正常对照组大鼠滤过区组织中 MMP-2 蛋白的相对表达量为 121.67 ± 4.37 ,在术后 3 d 组开始逐渐增高,为 183.67 ± 5.61 ,术后 7 d 组达峰值,为 230.50 ± 8.48 ,随后逐渐降低,术后 28 d 组为 172.33 ± 8.43 ,仍高于正常对照组,各组大鼠滤过区组织中 MMP-2 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义($F=280.18$, $P<0.05$)。正常对照组大鼠滤过区组织中 TIMP-2 蛋白的相对表达量为 102.50 ± 6.25 ,在术后 3 d 组开始明显升高,为 162.67 ± 7.00 ,术后 5 d 组 TIMP-2 蛋白表达量达峰值,为 232.00 ± 11.03 ,之后逐渐下降,术后 28 d 组降至 150.50 ± 6.41 ,但仍高于正常对照组,各组间滤过区组织中 TIMP-2 蛋白的相对表达量的总体比较差异有统计学意义($F=145.34$, $P<0.05$)。免疫荧光组织化学结果显示,正常对照组 MMP-2、TIMP-2 仅在大鼠结膜上皮层微弱表达,呈红色荧光,而在术后大鼠滤过区结膜组织上皮层和固有层均呈强荧光。**结论** MMP-2 和 TIMP-2 在大鼠青光眼滤过术后滤过区组织的动态表达与滤过泡的纤维化过程相一致,提示 MMP-2 和 TIMP-2 参与结膜滤过泡的瘢痕化过程。

【关键词】 青光眼/手术;滤过泡;瘢痕化;基质金属蛋白酶 2;组织金属蛋白酶抑制剂 2;Wistar 大鼠
基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2010SW008)

Dynamic expressions of matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor in conjunctival filtering blebs of rats following glaucoma filtering surgery Liu Mengying, Wang Ling, Wang Dabo, Yao Ruyong

Department of Ophthalmology (Liu MY, Wang L, Wang DB), Central Laboratory (Yao RY), Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China

Corresponding author: Wang Ling, Email: tsingtaowl@hotmail.com

【Abstract】 **Background** The scarring of conjunctival filtering blebs after glaucomatous surgery is a leading cause of operation failure. Exploring the balance between matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in conjunctival filtering bleb is very important for the study on pathogenesis of postoperative scarring. **Objective** This study was to evaluate the role of MMP-2 and TIMP-2 in wounding healing of subconjunctival tissue after filtering surgery in rats. **Methods** Sixty-three clean male SD rats were divided into normal control group and postoperative 1-day, 3-day, 5-day, 7-day, 14-day and 28-day group. The drainage tube was monocularly implanted into the anterior chamber of the rats to establish the filtering surgery models, and the operative response of the eyes was examined under the slit lamp microscope. The animals were sacrificed in corresponding time points, and the frozen sections of eyeballs were prepared, and the expressions of MMP-2 and TIMP-2 in conjunctival and subconjunctival tissues were detected using immunofluorescence technique. Western blot was employed to assay the dynamic expressions of MMP-2 and TIMP-2 proteins in conjunctival and subconjunctival tissues in different groups. The use and care of the rats complied with the Instruction Notions with Respect to Care for Laboratory by State

Ministry of Science and Technology. **Results** Filtering blebs were formed in all the operated eyes 1 day after surgery and remained for 7–17 days, with the average survival time of 12 days. Western blot assay revealed that the expression levels of MMP-2 protein in the filtering blebs of the normal control group were 121.67 ± 4.37 , and the expressions were gradually elevated from the postoperative 3-day group (183.67 ± 5.61) until the postoperative 7-day group (230.50 ± 8.48) and then gradually declined till the postoperative 28-day group (172.33 ± 8.43), showing a significant difference among the groups ($F = 280.18, P < 0.05$). In addition, the expression levels of TIMP-2 protein in filtering blebs of the normal control group were 102.50 ± 6.25 . The expression levels were gradually raised in postoperative 3-day group (162.67 ± 7.00) and peaked in the postoperative 5-day group (232.00 ± 11.03), and then the levels gradually reduced till the postoperative 28-day group (150.50 ± 6.41), with a significant difference among the groups ($F = 145.34, P < 0.05$). Immunofluorescent staining showed that MMP-2 and TIMP-2 were weakly expressed in the conjunctival epithelium of the normal rats, while in the operated rats, strong fluorescence for MMP-2 and TIMP-2 was seen in both conjunctival epithelium and subconjunctival tissues of filtering blebs. **Conclusions** The expression trends of MMP-2 and TIMP-2 in the filtering blebs are consistent to the fibrosis process of conjunctival tissue, indicating that MMP-2 and TIMP-2 participate in the scar formation of conjunctival filtering bleb after glaucoma filtering surgery.

[**Key words**] Glaucoma/surgery; Filtering blebs; Scarring; Matrix metalloproteinase-2; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2; Rats, Wistar

Fund program: Research Award Fund for Outstanding Young Scientists Project in Shandong Province (BS2010SW008)

青光眼是一组以视神经萎缩和视野缺损为共同特征的疾病,病理性眼压升高是其主要危险因素,小梁切除术是治疗药物无法控制的青光眼的主要术式之一,术后功能滤过泡的形成及维持是手术成功的关键,而术后术区成纤维细胞增生、胶原沉积、滤过泡瘢痕化可导致房水外引流通道封闭,是导致手术失败的主要原因^[1-2]。目前认为,滤过泡瘢痕化主要与 Tenon 囊成纤维细胞的过度增生及纤维化有关^[3]。研究发现,抗青光眼术后滤过泡局部基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 和 MMP-9 活性明显升高,可能在切口重塑和收缩过程中发挥重要作用^[4-5]。我们前期的研究中采用前房引流管植入术制作大鼠球结膜滤过泡模型,动态观察了滤过泡形成及瘢痕化过程中的形态学及组织病理学变化^[6]。本研究中利用大鼠球结膜滤过泡模型,探讨 MMP-2 及组织金属蛋白酶抑制剂 2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, TIMP-2) 在结膜滤过泡形成与瘢痕化过程中的作用,为干预滤过区瘢痕化过程的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 6~8 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 63 只,体质量 350~400 g。标准清洁级饲养环境中喂养,温度为 18~25℃,湿度为 40%,光照与黑暗时间各为 12 h。正式实验前常规饲养 1 周。大鼠术前经裂隙灯显微镜和检眼镜检查,排除眼部疾患。采用完全随机化分组方法将实验动物分为正常对照组及术后 1、3、5、7、14、28 d 组,每组 9

只,任意选取大鼠一侧眼为实验眼。实验动物的使用和喂养遵循青岛大学发布的《青岛大学实验动物管理条例》及国家科学技术委员会颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.1.2 主要试剂及仪器 免疫荧光抗体:兔抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体 (ab37150, 1:200)、小鼠抗大鼠 TIMP-2 单克隆抗体 (ab1828, 1:20) (美国 Abcam 公司);Cy3 标记的山羊抗兔二抗 (CW0103, 1:100)、Cy3 标记的山羊抗小鼠二抗 (CW0145, 1:100) (北京康为世纪生物科技有限公司);DAPI (1:4 000, 上海碧云天生物技术有限公司);Western blot 抗体:小鼠抗大鼠 MMP-2、TIMP-2 单克隆抗体 (1:800)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗 (1:6 000) (美国 Santa Cruz 公司)。SZ2-ILST 型解剖显微镜 (日本 Olympus 公司);CM1950 型冰冻切片机、DFC480 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司);OCT 包埋剂 (美国樱花公司);电转移装置、垂直板蛋白电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司);29G 胰岛素穿刺针 (日本泰尔茂公司);硅胶管 (北京医用橡胶制品研究所)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠球结膜滤过泡模型的制作 将质量分数 10% 水合氯醛按 0.3 ml/100 g 的剂量行腹腔内注射以诱导全身麻醉,术中需追加麻醉时剂量少于首剂量的 1/3,术眼用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,质量分数 0.25% 氯霉素滴眼液冲洗 Tenon 囊 3 次,质量分数 0.5% 碘伏常规消毒术眼及眼睑以外 2 cm 皮肤,铺无菌洞巾。参照 Sherwood 等^[7]描述的方法在解剖显微镜下于大鼠眼球颞上方角膜缘

后 2.0~2.5 mm 处制作以角膜缘为基底的结膜瓣,长 2~3 mm,剪开球结膜,钝性分离 Tenon 囊并暴露局部巩膜,在距角膜缘约 0.5 mm 处用 29G 胰岛素针头穿刺巩膜进入前房,注入黏弹剂以维持前房。将内径 0.3 mm、外径 0.6 mm、长 3.0~4.0 mm 的微管(硅胶管)前端剪成斜面,末端为平面,将微管斜面向上沿巩膜隧道穿刺进入前房。因植管与巩膜隧道连接较紧密,故无需缝合。植管后即可见末端有液体流出,用 10-0 丝线连续缝合球结膜及 Tenon 囊。术后结膜囊内涂红霉素眼膏。术后注意保温,待大鼠完全苏醒后送回动物房。每日定点观察大鼠的一般情况,并于同一时间点麻醉状态下观察大鼠术眼炎症反应及滤过泡情况。术后 3 d 内常规用 0.25% 氯霉素滴眼液点双眼,每日 2 次,预防手术区感染。以术后球结膜滤过泡形成作为判断手术效果的标准^[4]。手术均由同一人操作。

1.2.2 滤过泡标本的制备 于术后第 1、3、5、7、14 和 28 天颈椎脱臼法分别处死 6 只大鼠,剪取手术区结膜及结膜下组织。用细胞裂解液提取总蛋白,利用标准蛋白含量曲线对样本定量后行 Western blot 检测。各组剩余的 3 只大鼠处死后摘取眼球,用 PBS 冲净血迹, OCT 包埋,制备冰冻切片,行免疫荧光组织化学检测。

1.2.3 Western blot 法检测标本中 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白的表达 取等量各标本总蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,蛋白印迹转至 PVDF 膜上,质量分数 10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入相应一抗,室温孵育 2 h。PBST 漂洗 3 次,每次 10 min;再加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗,室温孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次,每次 10 min。采用增强化学发光法显影,在柯达感光底片上曝光 1 min,保存分析结果。每个标本至少重复检测 3 次,显影后扫描成图片,应用凝胶图像分析系统对蛋白条带进行灰度值转换。以 GAPDH 作为内参,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 免疫荧光化学染色法检测各标本中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达 取 OCT 包埋的眼球标本置于冰冻切片机切片,切片厚 6 μm ;用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS-T 缓冲液冲洗 2 次,阻断液(质量分数 5% BSA、PBS-T、质量分数 0.5% TritonX-100)室温封闭 30 min;加入相应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS-T 缓冲液漂洗 3 次;避光条件下,加入 Cy3 标记的山羊抗小鼠二抗以及 Cy3 标记的山羊抗兔二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h; PBS-T 缓冲液漂洗 3 次; DAPI 染核 5 min, 缓冲液漂洗后荧光显微镜下观察并拍照。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(软件序列号:

5296295381, 美国 SPSS 公司)进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间方差经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,正常对照组及术后 1、3、5、7、14、28 d 组间大鼠眼滤过区组织中 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白表达量的总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠造模后一般情况及眼前节表现

大鼠术后一般情况良好。术眼滤过泡不同程度隆起,角膜透明,前房存在;造模后 4 只眼发生浅前房,从研究中剔除并补做相应数量的模型。实验术中 3 只眼出现前房出血,术后 2~3 d 可自行吸收。术后出现不同程度的房水闪辉和细胞漂浮,术后 2~4 d 消失;术眼瞳孔呈圆形,对光反射存在,晶状体透明。未发生滤过泡渗漏、出血、感染、白内障及眼内炎等并发症。

2.2 结膜滤过泡形成情况

术后第 1 天术眼均可见明显的滤过泡(图 1A)。滤过泡维持时间为 7~17 d,平均生存时间为 12 d。术后 4~5 d 滤过泡表面开始出现血管化(图 1B)。

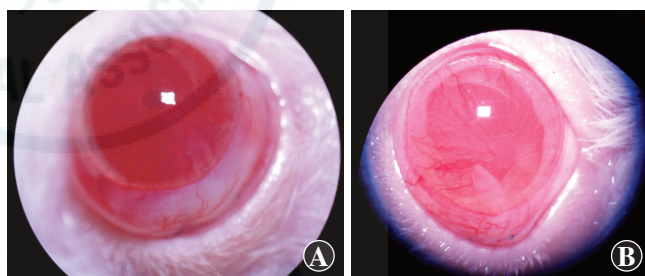


图 1 大鼠造模情况 A:术后 1 d 滤过泡隆起 B:术后 5 d 滤过泡隆起,表面可见血管

2.3 各组大鼠滤过区组织中 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白的相对表达

术后 1 d 组模型眼滤过区组织中 MMP-2 蛋白相对表达量(灰度值)约为正常对照组的 1/2,但术后 3 d 组 MMP-2 蛋白的相对表达量增高,术后 7 d 组达峰值,随后逐渐降低,但术后 28 d 组仍高于正常对照组(图 2),各组间大鼠滤过区组织中 MMP-2 蛋白的相对表达量的总体比较差异有统计学意义($F = 280.18, P < 0.05$),术后 3、5、7、14 和 28 d 组大鼠术眼滤过区组织中 MMP-2 蛋白的相对表达量均明显高于正常对照组和术后 1 d 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),术后 5、7 和 14 d 组大鼠术眼滤过区组织中 MMP-2 蛋白的相对表达量明显高于术后 3 d 组,而术后 28 d 组

MMP-2 蛋白的相对相对表达量明显低于术后 3 d 组和术后 5 d 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 术后 5 d 组与术后 14 d 组之间 MMP-2 蛋白的相对表达量差异无统计学意义 ($P = 0.29$) (表 1)。

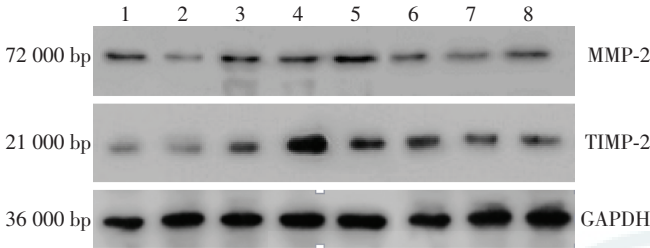


图 2 Western blot 法检测各组大鼠滤过区组织中 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白的表达 1: 正常对照组 2: 术后 1 d 组 3: 术后 3 d 组 4: 术后 5 d 组 5: 术后 7 d 组 6: 术后 14 d 组 7: 术后 28 d 组 8: 阳性对照 MMP: 基质金属蛋白酶; TIMP: 组织金属蛋白酶抑制剂

各组间大鼠滤过区组织中 TIMP-2 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 145.34, P < 0.05$), 其中以术后 5 d 组表达量最高, 术后 3、5、7、14 和 28 d 组大鼠滤过区组织中 TIMP-2 蛋白的相对表达量明显高于正常对照组和术后 1 d 组, 术后 5、7 和 14 d 组 TIMP-2 蛋白的相对表达量明显高于术后 3 d 组, 术后 28 d 组 TIMP-2 蛋白的相对表达量明显低于术后 3、5、7 和 14 d 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 术后 14 d 组 TIMP-2 蛋白的相对表达量与术后 7 d 组比较差异无统计意义 ($P = 0.42$) (表 1)。

表 1 各组大鼠术眼滤过区组织中 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白的相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	MMP-2	TIMP-2
正常对照组	6	121.67 ± 4.37	102.50 ± 6.25
术后 1 d 组	6	63.17 ± 6.11	125.00 ± 6.90
术后 3 d 组	6	183.67 ± 5.61 ^{ab}	162.67 ± 7.00 ^{ab}
术后 5 d 组	6	196.83 ± 9.72 ^{abc}	232.00 ± 11.03 ^{abc}
术后 7 d 组	6	230.50 ± 8.48 ^{abcd}	189.00 ± 8.44 ^{abcd}
术后 14 d 组	6	192.67 ± 6.12 ^{abce}	194.67 ± 8.64 ^{abcd}
术后 28 d 组	6	172.33 ± 8.43 ^{abcdef}	150.50 ± 6.41 ^{abcdef}
F		280.18	145.34
P		< 0.05	< 0.05

注: 与各自的正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的术后 1 d 组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自的术后 3 d 组比较, ^c $P < 0.05$; 与各自的术后 5 d 组比较, ^d $P < 0.05$; 与各自的术后 7 d 组比较, ^e $P < 0.05$; 与各自的术后 14 d 组比较, ^f $P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK-q 检验) MMP: 基质金属蛋白酶; TIMP: 组织金属蛋白酶抑制剂

2.4 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白在各组大鼠滤过区组织中的表达及定位

正常对照组大鼠结膜组织上皮层可见 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白的表达, Cy3 标记后呈红色荧光, 但结膜组织的固有层无表达。MMP-2 及 TIMP-2 蛋白在术眼

滤过区结膜组织上皮层及固有层的表达均呈强阳性, 术后 7 d 组大鼠术眼滤过区免疫荧光染色后可见结膜上皮层下为较疏松的结缔组织, 结膜下细胞增生活跃, 滤过泡隆起; 术后 28 d 组可见滤过区致密胶原纤维沉积, 滤过泡消失 (图 3, 4)。

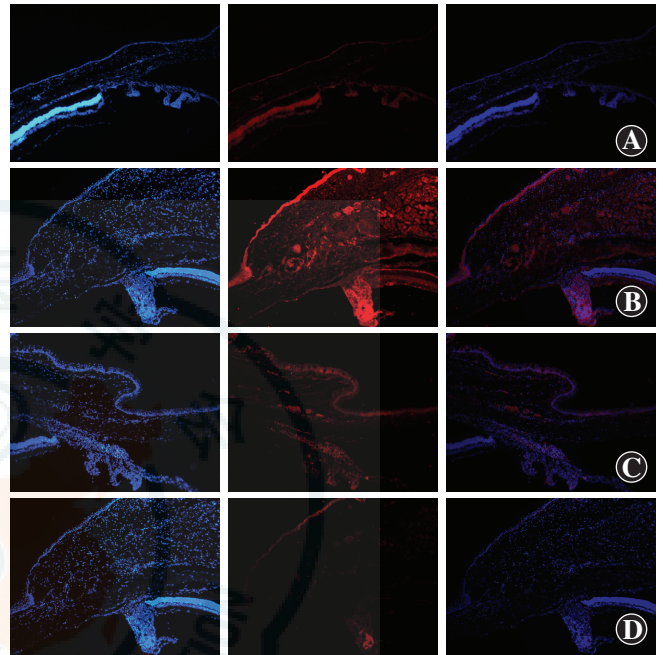


图 3 各组大鼠滤过区组织 MMP-2 的表达 (Cy3 × 100) A: 正常对照组 MMP-2 仅在大鼠正常结膜上皮层呈微弱表达 B: 术后 7 d 组大鼠滤过泡结膜组织上皮层和固有层均可见 MMP-2 呈强阳性表达 (箭头) C: 术后 28 d 组大鼠滤过泡结膜组织上皮层和固有层 MMP-2 均呈强阳性表达 D: 阴性对照

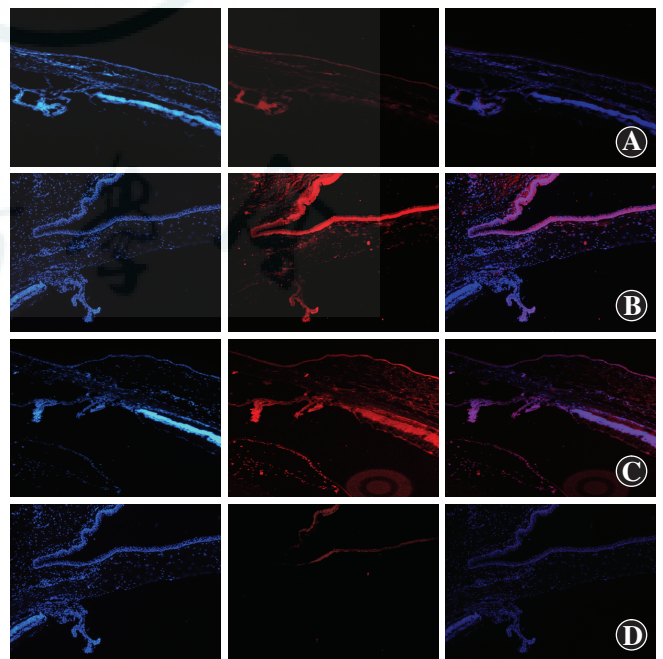


图 4 各组大鼠滤过区组织 TIMP-2 的表达 (Cy3 × 100) A: 正常对照组仅见结膜上皮层 TIMP-2 呈弱阳性表达 B: 术后 7 d 组大鼠滤过区结膜组织上皮层和固有层 TIMP-2 呈强阳性表达 (箭头) C: 术后 28 d 组大鼠滤过区结膜组织上皮层和固有层均可见 TIMP-2 呈强阳性表达 D: 阴性对照

3 讨论

目前,以鼠作为球结膜滤过泡模型的手术方式主要有针刺法^[4,8]、改良法^[9]和植管法^[7]。植管法与临床上青光眼引流装置的植入术较为相似,通过前房植入微管使房水引流至结膜下,滤过功能稳定,滤过道较既往术式不易闭合。我们的前期研究结果也表明,植管法可以制造一个长期存在的滤过泡^[6]。本研究中选择植管法成功制作大鼠球结膜滤过泡模型,整个过程具有典型的创伤愈合瘢痕样病理改变,类似于青光眼滤过手术后结膜及结膜下创伤愈合过程。本研究中实验眼术中 3 只眼发生前房出血,一般术后 2~3 d 可自行完全吸收,未见滤过泡渗漏、出血、感染、白内障及眼内炎等并发症发生,并排除抗代谢药物的应用及术后并发症的发生。

成纤维细胞在创伤修复的增生期发挥着非常重要的作用,主要包括成纤维细胞的活化、迁移、增生及合成结缔组织的各种成分,其对伤口的收缩、新基质的合成堆积及修饰也有十分重要的作用。在正常眼组织中已发现有 MMPs 的表达,其过度表达与眼部瘢痕形成密切相关^[10-13],而病理性瘢痕形成是 MMPs/TIMPs 之间调控失衡的结果^[14-16]。关于 MMPs 和 TIMPs 在滤过泡周围的表达部位,许多文献也有过类似报道^[6,15-17]。本研究中采用免疫荧光组织化学法观察滤过泡模型中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达部位,结果显示 MMP-2 和 TIMP-2 表达部位基本一致,在正常结膜组织中仅结膜上皮层有弱阳性表达,结膜固有层基本无表达,而在滤过泡结膜组织上皮层、固有层均可见到强阳性表达。本研究中也观察到在滤过术后 7 d,结膜上皮层可见较疏松的结缔组织,滤过泡不同程度隆起;术后 28 d 结膜区滤过泡瘢痕化,滤过区致密胶原纤维沉积,瘢痕化改变,滤过泡消失,这与我们前期研究中的滤过泡形态和病理改变相一致^[6]。

本研究中还动态观察了在大鼠球结膜滤过泡形成及瘢痕化进程中 MMP-2 及 TIMP-2 的蛋白表达趋势,结果显示滤过术后第 1 天组织中 MMP-2 表达量降低,约为正常水平的 1/2,推测可能是手术导致正常细胞外基质的破坏,引起 MMP-2 活化降解异常的细胞外基质,被大量消耗;术后第 3 天,随着滤过区炎症反应的加剧,MMP-2 的表达增加,其可能与各种细胞因子和生长因子的释放有关;术后第 28 天,组织中只剩下散在分布的成纤维细胞和血管组成的致密胶原瘢痕组织^[6],但整个炎症创伤修复过程在术后 6~8 周才达到较稳定的状态,所以此时 MMP-2 的表达量仍稍高于基

线水平。本研究中结果显示,术后第 1 天时 TIMP-2 的表达量即开始增加,至术后第 5 天时 TIMP-2 表达达峰值,术后第 7 天时成纤维细胞继续增生,MMP-2 表达量达峰值,此时 TIMP-2 已开始下降,之后 MMP-2 及 TIMP-2 的表达持续减少,术后第 28 天时 MMP-2 的表达均稍高于 TIMP-2,即 TIMP-2 相对减少,这导致细胞外基质中 IV 型胶原蛋白和层黏连蛋白等降解增多,细胞外基质成分发生改变,最终纤维瘢痕形成,这与我们前期滤过泡形态与病理改变相一致^[6]。

抗青光眼滤过术后伤口的瘢痕化是一系列复杂的动态生物学反应过程,术后 3~5 d 成纤维细胞移行增生活跃,术后约 11 d 恢复至基线水平,术后 8~12 周创伤修复过程基本达到相对稳定状态^[18]。前期动物模型研究显示,术后约 1 周滤过泡表现出活跃的创伤愈合反应,术后 2 周内创伤修复中的瘢痕形成最为关键,成纤维细胞增生活跃,瘢痕化形成。术后 2 周内进行干预调控是建立良好的滤过通路、减少术后瘢痕化的关键,这为以后干预滤过泡瘢痕化的时机选择提供了参考。

综上所述,本研究中通过观察 MMP-2 和 TIMP-2 在球结膜滤过泡模型鼠眼术后滤过泡形成及瘢痕化过程中的动态表达,发现 MMP-2 与 TIMP-2 表达的平衡状态与滤过泡的瘢痕化密切相关。目前研究已证明 MMP-2 能够促进瘢痕化的形成,导致滤过手术的失败^[19]。MMP-2 和 TIMP-2 的相互作用和表达的平衡参与术后整个瘢痕化过程。未来我们将进一步研究 TIMP-2 对 MMP-2 的特异性抑制作用,通过降解 Tenon 囊成纤维细胞外基质,抑制滤过泡瘢痕化的形成,进而提高滤过手术的成功率。

参考文献

- [1] Broadway DC, Chang LP. Trabeculectomy, risk factors for failure and the preoperative state of the conjunctiva[J]. J Glaucoma, 2001, 10(3): 237-249.
- [2] Mearsa AA, Aslanides IM. Uses and complications of mitomycin C in ophthalmology[J]. Expert Opin Drug Saf, 2007, 6(1): 27-32. DOI: 10.1517/14740338.6.1.27.
- [3] Shima I, Katsuda S, Ueda Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases in wound healing after glaucoma filtration surgery in rabbits[J]. Ophthalmic Res, 2007, 39(6): 315-324. DOI: 10.1159/000109987.
- [4] Sheridan CM, Unger WG, Ayliffe W, et al. Macrophages during fibrosis following sclera fistulising surgery in a rat model[J]. Curr Eye Res, 1996, 15(5): 559-568.
- [5] Chintala SK, Wang N, Diskin S, et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) is associated with leaking glaucoma filtering blebs[J]. Exp Eye Res, 2005, 81(4): 429-436. DOI: 10.1016/j.exer.2005.03.001.
- [6] 明佩佩,王玲,王大博,等.大鼠青光眼滤过术后滤过泡形态与组织病理学动态观察[J].中华实验眼科杂志,2014,32(10): 886-890. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.005.

Ming PP, Wang L, Wang DB, et al. Dynamic changes of morphology and

histopathology of conjunctival filtering bleb after anti-glaucoma filtering surgery in rat[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(10): 886-890. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.005.

[7] Sherwood MB, Esson DW, Neelakantan A, et al. A new model of glaucoma filtering surgery in the rat[J]. J Glaucoma, 2004, 13(5): 407-412.

[8] Mietz H, Chevez-Barrios P, Lieberman MW. A mouse model to study the wound healing response following filtration surgery[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(6): 467-475.

[9] 马建民, 赵家良, 张文宝, 等. 应用滤过性手术在大鼠眼上建立结膜滤过泡瘢痕化模型的研究[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(11): 980-984.

Ma JM, Zhao JL, Zhang WB, et al. Study on a rat model of filtering bleb scarring formation[J]. Chin J Ophthalmol, 2006, 42(11): 980-984.

[10] Tsai YY, Chianq CC, Yeh KT, et al. Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3462-3467. DOI:10.1167/iov.09-4921.

[11] Sun YC, Hsiao CH, Chen WL, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and MMP-3 in superior limbic keratoconjunctivitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3701-3705. DOI:10.1167/iov.10-6324.

[12] Azar DT, Pluznik D, Jain S, et al. Gelatinase B and A expression after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy[J]. Arch Ophthalmol, 1998, 116(9): 1206-1208.

[13] Tamiya S, Wormstone IM, Marcantonio JM, et al. Induction of matrix metalloproteinases 2 and 9 following stress to the lens[J]. Exp Eye Res, 2000, 71(6): 591-597.

[14] Liu CJ, Huang YL, Chiu AW, et al. Transcript expression of matrix metalloproteinases in the conjunctiva following glaucoma filtration surgery in rabbits[J]. Ophthalmic Res, 2004, 36(2): 114-119. DOI: 10.1159/000076891.

[15] Yang SF, Lin CY, Yang PY, et al. Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(10): 4588-4596. DOI:10.1167/iov.08-3147.

[16] McCluskey P, Molteno A, Wakefield D, et al. Otago glaucoma surgery outcome study: the pattern of expression of MMPs and TIMPs in bleb capsules surrounding Molteno implants[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(5): 2161-2164. DOI:10.1167/iov.08-2063.

[17] Mathalone N, Marmor S, Rahat MA, et al. MMP expression in leaking filtering blebs and tears after glaucoma filtering surgery[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011, 249(7): 1047-1055. DOI: 10.1007/s00417-011-1658-0.

[18] Min J, Lukowski ZL, Levine MA, et al. Comparison of single versus multiple injections of the protein sartin for prolonging bleb survival in a rabbit model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(12): 7625-7630. DOI:10.1167/iov.12-10120.

[19] Misra S, Fu AA, Anderson JL, et al. The rat femoral arteriovenous fistula model: increased expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 at the venous stenosis[J]. Vasc Interv Radiol, 2008, 19(4): 587-594. DOI: 10.1016/j.jvir.2008.01.005.

(收稿日期: 2015-05-29)

(本文编辑: 刘艳)

读者 · 作者 · 编者

眼科常用英文缩略语名词解释

AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)	mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)	MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)	NF: 核因子 (nuclear factor)
DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)	OCT: 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography)
EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)	OR: 优势比 (odds ratio)
EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)	PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)	PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)	RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)	POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)	RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)	RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)	RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
IL: 白细胞介素 (interleukin)	S I t: 泪液分泌试验 (Schirmer I test)
IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)	shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)
IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)	siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
LASIK: 准分子激光原位角膜磨镶术 (laser in situ keratomileusis)	α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
ICGA: 吲哚青绿血管造影 (indocyanine green angiography)	TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)	TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
miRNA: 微小 RNA (microRNA)	TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)	UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
	VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
	VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)