

# 前列腺素类降眼压药物的长期使用对兔眼球结膜厚度的影响

麻凯 殷成娟 张振永

上海中医药大学附属普陀医院眼科 200062

通信作者:张振永,Email:zzyly818@sina.com

**【摘要】 目的** 探讨前列腺素类降眼压药物的长期使用对兔眼球结膜厚度的影响及其可能的机制。

**方法** 采用随机数表法将 24 只清洁级新西兰大白兔随机分为拉坦前列腺素组、盐酸卡替洛尔组和空白对照组,每组 8 只,均取左眼作为实验眼,其中前 2 个组分别采用拉坦前列腺素滴眼液和盐酸卡替洛尔滴眼液点眼,每天 1 次,每次 1 滴,持续 2 个月;空白对照组不做任何处理。点眼前及点眼后 2 个月,采用光相干断层扫描(OCT)分别测量拉坦前列腺素组和盐酸卡替洛尔组实验兔左眼球结膜全层厚度。采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测点眼后 2 个月各组实验兔球结膜组织中基质金属蛋白酶(MMP)-1 和 MMP-3 mRNA 及蛋白表达水平变化。**结果** OCT 检测结果显示,点眼前拉坦前列腺素组和盐酸卡替洛尔组球结膜厚度分别为(178.88±5.23) μm 和(184.94±11.85) μm,点眼后 2 个月分别为(124.19±11.29) μm 和(183.31±8.71) μm;点眼后 2 个月拉坦前列腺素组兔眼球结膜全层厚度较点眼前及盐酸卡替洛尔组点眼后 2 个月明显变薄,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示,拉坦前列腺素组 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 及蛋白相对表达量均较空白对照组和盐酸卡替洛尔组明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。**结论** 长期点用前列腺素类滴眼液可使兔眼球结膜厚度明显变薄,其机制可能与球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 表达水平升高有关。

**【关键词】** 前列腺素类药物;球结膜/厚度;基质金属蛋白酶;青光眼;滤过手术

**基金项目:**上海中医药大学附属普陀医院院级课题项目(2017301A);上海市第六人民医院联合体课题项目(18-LY-03)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200707-00481

## Effect of long-term topical administration of prostaglandins on bulbar conjunctival thickness in rabbits

Ma Kai, Yin Chengjuan, Zhang Zhenyong

Department of Ophthalmology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Corresponding author: Zhang Zhenyong, Email: zzyly818@sina.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of long-term application of prostaglandin analog drops on bulbar conjunctival thickness in rabbits. **Methods** Twenty-four healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into latanoprost group, carteolol group and blank control group using the random number table method, with 8 rabbits in each group. The left eyes of rabbits were taken as experimental eyes. The rabbits in the latanoprost group and carteolol group were given latanoprost eye drops or carteolol eye drops once a day for 2 months according to grouping. The bulbar conjunctival thickness of left eyes of the latanoprost group and carteolol group were measured by optical coherence tomography (OCT) at baseline and two months after administration, respectively. The conjunctival tissue of the three groups were extracted to investigate the protein and mRNA expression level of matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and MMP-3 by Western blot and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The study protocol was approved by an Ethics Committee of Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. 2017-0014). The use and care of the experimental animals complied with the ARVO Statement. **Results** In the latanoprost group, the conjunctival thickness was significantly reduced from baseline (178.88±5.23) μm to (124.19±11.29) μm at 2 months after administration ( $P < 0.01$ ). In the carteolol group, there existed no significant difference in the conjunctival thickness between baseline (184.94±

11.85)  $\mu\text{m}$  and (183.31 $\pm$ 8.71)  $\mu\text{m}$  at 2 months after administration ( $P>0.05$ ). The conjunctival thickness at 2 months after administration of the latanoprost group was significantly thinner than that of the carteolol group ( $P<0.01$ ). The protein and mRNA expression levels of MMP-1 and MMP-3 in conjunctival tissue of the latanoprost group were significantly higher than those of the blank control group and carteolol group (all at  $P<0.01$ ). **Conclusions** The long-term topical use of prostaglandin analog drops can significantly reduce the bulbar conjunctival thickness in rabbits. The mechanism may be related to the elevated expression levels of MMP-1 and MMP-3 in the bulbar conjunctival tissue.

**[Key words]** Prostaglandin analogues; Conjunctiva/thickness; Matrix metalloproteinase; Glaucoma; Filtration surgery

**Fund program:** Project of Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (2017301A); Project of Shanghai No. 6 Hospital Group (18-LY-03)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200707-00481

青光眼是临床常见的不可逆性致盲眼病, 降眼压仍是其主要的治疗方法, 可以减少或避免因眼压升高导致的视神经损伤<sup>[1-2]</sup>。青光眼主要的治疗方法包括应用降眼压药物、激光治疗和手术治疗等, 其中降眼压药物在青光眼控制眼压的治疗中扮演重要角色。目前常用的降眼压药物包括拟胆碱药、 $\beta$  肾上腺素能受体阻滞剂、肾上腺素能受体激动剂、碳酸酐酶抑制剂和前列腺素衍生物等, 其中前列腺素类药物 (prostaglandin analogues, PGA) 是目前青光眼降眼压药物中的一线用药<sup>[3-4]</sup>。PGA 可通过上调房水、睫状肌等处基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达, 增加细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解, 使睫状肌肌间隙增宽, 促进房水经葡萄膜-巩膜通道的流出, 从而达到降低眼压的目的<sup>[5-6]</sup>。研究表明, PGA 会改变 MMPs 及 MMPs 抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 在眼表组织中的表达水平, 使 MMP-1、MMP-7、MMP-9 等的表达水平升高, 而 TIMP-1、TIMP-2 的表达水平显著降低<sup>[7]</sup>。研究发现, 兔眼在点用 PGA 后 2 个月, 角膜厚度显著变薄; 临床研究也发现, 长期使用前列腺素类降眼压药物会使患者的角膜厚度明显变薄, 其机制可能是基于 PGA 上调 MMPs 的表达水平, 进而引起角膜基质层胶原蛋白含量减少, 导致角膜厚度变薄<sup>[8-10]</sup>。结膜组织同样是一层主要由 I、II、IV 型等胶原蛋白构成的眼表膜性组织, 富含 MMPs, 但 PGA 对结膜厚度的影响尚不清楚。本研究拟探讨兔眼局部点用拉坦前列素滴眼液后结膜厚度的变化及其可能的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 选取 24 只 12~14 周龄清洁级健康无眼疾新西兰大白兔, 体质量 1.5~2.0 kg,

雌雄各半, 由上海市松江区松联实验动物厂提供。使用全价颗粒饲料单笼常规饲养, 自由饮水和进食, 室温 26  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度为 40%~80%。采用随机数表法将实验兔随机分为拉坦前列素组、盐酸卡替洛尔组和空白对照组, 每组 8 只, 均取左眼作为实验眼。本研究方案经上海中医药大学附属普陀医院实验动物伦理委员会审核批准 (批文号: 2017-0014)。实验动物的喂养和使用遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的科研动物使用规范。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 拉坦前列素滴眼液 (50 mg/ml, 比利时辉瑞制药有限公司); 质量分数 2% 盐酸卡替洛尔滴眼液 (中国大冢制药有限公司); Trizol、RNA 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (A0208) (上海碧云天生物科技有限公司); Anti-MMP-1 兔多克隆抗体 (ab137332)、Anti-MMP-3 兔多克隆抗体 (ab52915) (英国 Abcam 公司)。CIRRUS HD-光相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 仪 (德国蔡司公司); 转膜仪、垂直电泳槽、酶标检测仪、凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); 低温高速离心机、梯度 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 高精度电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组处理** 拉坦前列素组和盐酸卡替洛尔组分别采用拉坦前列素滴眼液和盐酸卡替洛尔滴眼液点实验兔左眼, 每天 10:00~10:30 点眼 1 次, 每次 1 滴, 持续 2 个月, 空白对照组不做任何处理。

**1.2.2 球结膜厚度测量** 分别于点眼前及点眼后 2 个月, 操作者将实验兔固定在 OCT 镜头前, 助手翻起兔颞侧上下眼睑以充分暴露球结膜 (左眼 1:30~

4:30),另一操作者使用 OCT 仪测量距角膜缘约 0.5 cm 处球结膜厚度,每只眼球结膜在相同位置重复测量 3 次,取平均值,以减少测量误差,尽量减少运动伪影测量的干扰。若因实验兔眼球移动而出现测量误差,则重复测量直至获得满意结果。测量均由同一位有经验的测量人员进行,且球结膜厚度测量均在同一操作室(相同光照、湿度及温度)内进行,比较点眼前后球结膜厚度变化。

**1.2.3 实验兔球结膜组织标本的制备** 点眼后 2 个月,观察实验兔眼表有无充血、炎症、红肿、糜烂等变化,若有则予以剔除,以免干扰实验结果。采用耳缘静脉注射过量 2% 戊巴比妥钠法处死实验兔,各组分别取兔左眼球结膜组织,在质量分数 0.9% 氯化钠溶液中冲洗后立即放入 -80 °C 冰箱中保存。使用时将其取出,用眼科剪剪成 1 cm×1 cm 的组织块并在天平上称质量,用于实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 表达水平** 每组取 20~30 mg 球结膜组织加入 EP 管中,每个 EP 管中各加入 1 ml Trizol 和 3 颗钢珠,将 EP 管放在高速研磨机中研磨 5 min,频率为 65 Hz,静置,抽取上清液,离心半径 6 cm,12 000 r/min 离心 15 min,管底的絮状沉淀即为球结膜组织中总 RNA 量。根据 RNA 逆转录试剂盒说明书将球结膜组织中的 RNA 逆转录为 cDNA。设计引物序列(表 1),将 cDNA 按反应体系配制所需要的 PCR 缓冲液(冰上进行),每个样品采用 2 个复孔的反应体系进行实时荧光定量 PCR 扩增实验。实时荧光定量 PCR 反应条件:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火及延伸 30 s,40 个循环。在每个循环结束时读取荧光强度。反应结束后,计算机自动分析荧光信号并将其转换为 Ct 值,以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算每个目的基因的相对表达量。实验重复 3 次,结果取平均值。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列及产物长度

Table 1 Primers for real-time fluorescence quantitative PCR and the length of product

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
MMP-1	正向:GACCAGGTATGATGAATATA	120
	反向:AATTTTTCTGCAGTTGAAC	
MMP-3	正向:CTGAAGCGCTGATGTACCCA	115
	反向:AGGGACAGGTCCATAGGA	
$\beta$ -actin	正向:ATCATGAAGTCCGACGTGGA	113
	反向:GCGGTGATCTCCTCTGCAT	

注:MMP:基质金属蛋白酶; $\beta$ -actin: $\beta$  肌动蛋白

Note:MMP:matrix metalloproteinase

**1.2.5 Western blot 法检测各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白表达水平** 每组取 20~30 mg 球结膜组织,按照每 10 mg 组织大约需要加入 100  $\mu$ l 蛋白裂解液的比例配制所需的蛋白裂解液(RIPA 裂解液:PMSF:cocktail=100:1:1)。向 EP 管中加入灭菌后的钢珠,放在高速研磨机中研磨组织 5 min,频率为 65 Hz。静置,抽取上清液,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书步骤测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳,电泳结束后,在恒流 300 mA 下转膜 2 h,将 PVDF 膜放入质量分数 5% BSA 溶液中,于摇床上室温封闭约 2 h。弃去 BSA 溶液,加入 5% BSA 溶液稀释的 Anti-MMP-1 兔多克隆抗体(1:1 000)和 Anti-MMP-3 兔多克隆抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜,次日,弃去一抗,加入 5% BSA 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:1 000)室温孵育 1 h。将洗涤后的 PVDF 膜在凝胶成像仪中显影,采用 ImageJ 软件进行灰度值扫描,以  $\beta$ -actin 作为内参照,目的蛋白相对表达量=目的蛋白表达灰度值/内参表达灰度值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以  $\text{mean}\pm\text{SD}$  表示。点眼前后拉坦前列腺素组与盐酸卡替洛尔组实验兔球结膜厚度比较采用重复测量两因素方差分析,点眼后 2 个月 3 个组间 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 及蛋白相对表达量总体比较均采用单因素方差分析,两两比较均采用 Dunnett-*t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 点眼前后拉坦前列腺素组与盐酸卡替洛尔组实验兔球结膜厚度比较

OCT 检测结果显示,与点眼前比较,拉坦前列腺素组点眼后 2 个月实验兔球结膜全层厚度变薄(图 1)。点眼前后拉坦前列腺素组与盐酸卡替洛尔组实验兔球结膜厚度总体比较差异均有统计学意义( $F_{\text{组别}}=216.72, P<0.01; F_{\text{时间}}=118.49, P<0.01$ ),其中点眼后 2 个月拉坦前列腺素组实验兔球结膜厚度较点眼前和盐酸卡替洛尔组点眼后 2 个月均明显变薄,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )(表 2)。

### 2.2 各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 结果显示,点眼后 2 个月 3 个组 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F=38.131, 324.037$ , 均  $P<0.01$ ),其



中拉坦前列腺素组 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 相对表达量均较空白对照组和盐酸卡替洛尔组明显升高, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 3)。

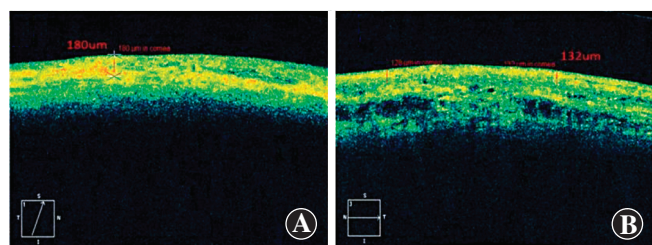


图 1 OCT 测量拉坦前列腺素组实验兔球结膜全层厚度 点眼前 2 个月兔眼球结膜全层厚度较点眼前明显变薄 A:点眼前 B:点眼前 2 个月

Figure 1 Conjunctival thickness of latanoprost group measured by optical coherence tomography before and after administration The conjunctival thickness was thinner at 2 months after administration A: Before administration B: Two months after administration

表 2 拉坦前列腺素组与盐酸卡替洛尔组点眼前后实验兔球结膜厚度比较 (mean±SD, μm)

Table 2 Comparison of the conjunctival thickness between the carteolol and latanoprost group at different time points (mean±SD, μm)

组别	眼数	不同时间点兔眼球结膜厚度	
		点眼前	点眼前 2 个月
盐酸卡替洛尔组	8	184.94±11.85	183.31±8.71
拉坦前列腺素组	8	178.88±5.23	124.19±11.29 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{组别}} = 216.72, P < 0.01$ ;  $F_{\text{时间}} = 118.49, P < 0.01$ 。与同时间点盐酸卡替洛尔组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与各组内点眼前比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (重复测量两因素方差分析, Dunnett-*t* 检验)  
 Note:  $F_{\text{group}} = 216.72, P < 0.01$ ;  $F_{\text{time}} = 118.49, P < 0.01$ 。Compared with the carteolol group at the same time point, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with the respective values before administration within each group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (Repeated measurement two-way ANOVA, Dunnett-*t* test)

表 3 各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 3 Comparison of MMP-1 mRNA and MMP-3 mRNA relative expression levels in conjunctival tissue among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	MMP-1 mRNA 相对表达量	MMP-3 mRNA 相对表达量
空白对照组	8	1.000±0.008	1.020±0.408
盐酸卡替洛尔组	8	1.130±0.167	1.070±0.489
拉坦前列腺素组	8	5.550±1.615 <sup>ab</sup>	3.380±0.284 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		38.131	324.037
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

注:与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与盐酸卡替洛尔组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) MMP:基质金属蛋白酶

Note: Compared with the blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with the carteolol group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, Dunnett-*t* test) MMP: matrix metalloproteinase

### 2.3 各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白相对表达量比较

Western blot 检测结果显示,点眼前 2 个月拉坦前列腺素组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白表达条带灰度均强于空白对照组和盐酸卡替洛尔组(图 2)。3 个组 MMP-1 和 MMP-3 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 26.980, 20.586$ , 均  $P < 0.01$ ), 其中拉坦前列腺素组 MMP-1 和 MMP-3 蛋白相对表达量均较空白对照组和盐酸卡替洛尔组明显升高, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 4)。

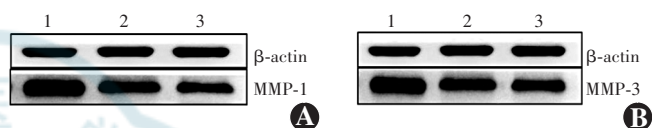


图 2 Western blot 法检测各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白表达电泳图 拉坦前列腺素组 MMP-1 和 MMP-3 蛋白表达条带均强于空白对照组和盐酸卡替洛尔组 A: MMP-1 B: MMP-3 1: 拉坦前列腺素组; 2: 盐酸卡替洛尔组; 3: 空白对照组 β-actin: β 肌动蛋白; MMP: 基质金属蛋白酶

Figure 2 Electrophoretogram of the expression of MMP-1 and MMP-3 in conjunctival tissue of the three groups detected by Western blot The protein expression bands of MMP-1 and MMP-3 in the latanoprost group were stronger than those in the blank control group and carteolol group 1: latanoprost group; 2: carteolol group; 3: blank control group MMP: matrix metalloproteinase

表 4 各组实验兔球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)

Table 4 Comparison of relative expression levels of MMP-1 and MMP-3 protein in conjunctival tissue among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	MMP-1 蛋白 相对表达量	MMP-3 蛋白 相对表达量
空白对照组	8	0.860±0.030	0.930±0.023
盐酸卡替洛尔组	8	0.880±0.272	0.970±0.010
拉坦前列腺素组	8	1.040±0.074 <sup>ab</sup>	1.000±0.023 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		26.980	20.586
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

注:与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与盐酸卡替洛尔组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) MMP:基质金属蛋白酶

Note: Compared with the blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with the carteolol group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, Dunnett-*t* test) MMP: matrix metalloproteinase

### 3 讨论

PGA 及其衍生物已成为治疗青光眼,尤其是原发性开角型青光眼的一线用药。PGA 具有降眼压作用快、持续时间长的优点,患者依从性较好,且药物对眼表的不良反应较小<sup>[11]</sup>。研究表明,长期点用 PGA 滴眼液可使中央角膜厚度明显变薄<sup>[8-10,12]</sup>。盐酸卡替洛

尔滴眼液是临床上常用的降眼压药物之一,其与拉坦前列腺素使用的防腐剂均是苯扎氯铵,使用盐酸卡替洛尔滴眼液作为阳性对照可排除苯扎氯铵对实验结果可能产生的影响。通过在结膜下植入铝箔的方法可以在眼前节 OCT 图像上区分结膜固有层与下方的 Tenon 囊膜,从而准确测量结膜全层厚度<sup>[13-14]</sup>,本研究用同样的方法测量兔球结膜厚度。本研究选择球结膜 1:30~4:30 为全层厚度测量的部位原因如下:(1)受到上直肌和下直肌的干扰,球结膜厚度测量范围较小;(2)兔下眼睑因眼位使球结膜不易暴露;(3)鼻侧有第三眼睑的干扰。本研究结果显示,拉坦前列腺素滴眼液长期使用可使兔眼球结膜厚度明显变薄,但盐酸卡替洛尔滴眼液的长期使用对兔眼球结膜厚度无明显影响,与本课题组前期临床研究结果一致<sup>[15]</sup>。

MMPs 是一类依赖于锌离子的内肽酶超家族,是一组广泛存在于眼表膜性组织的蛋白水解酶。MMPs 可降解 ECM 的几乎所有成分,包括基质中以及联系于细胞质膜上的各种胶原酶和弹性蛋白酶,是以 ECM 成分为水解底物的蛋白酶家系,广泛参与各种病理生理过程。MMPs 根据底物的特异性可分为以下 6 种:(1)间质胶原酶(MMP-1、-8、-13);(2)明胶酶(MMP-2、-9);(3)间质溶解素(MMP-3、-10、-11);(4)膜型(MMP-14、-15、-16 等);(5)基质溶解素(MMP-7、-26 等);(6)金属弹性蛋白酶(MMP-12)。TIMPs 是一类具有抑制 MMPs 活性的一组多功能因子家族,目前已经发现 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4 通过对 MMPs 的抑制作用从而影响细胞的增生、生长和分化。MMPs 通常以酶原的形式被合成和分泌,其活化可被 TIMPs 抑制,从而失去水解 ECM 的能力。MMPs 与 TIMPs 的合成、分泌和活化之间的动态平衡决定了 ECM 合成和溶解。研究发现长期点用 PGA 滴眼液使角膜厚度变薄的机制可能是基于 PGA 使角膜组织中 MMP-1、MMP-3 等的表达水平升高以及 TIMP-1 等的表达水平降低,使角膜组织中 I 型、II 型胶原蛋白等的表达水平明显降低,从而使角膜厚度变薄<sup>[16]</sup>。基于上述研究,本实验分析长期点用拉坦前列腺素滴眼液是否同样会引起兔眼球结膜组织中 MMPs 表达水平的变化,结果发现拉坦前列腺素组兔眼球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 及蛋白表达水平较空白对照组和盐酸卡替洛尔组明显升高,差异均有统计学意义。研究表明,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族与 MMPs 的表达密切相关,其中在 MAPK 家族中与炎症反应密切相关的信号通路分别是细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated

protein kinases, ERK)通路、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路和 p38 MAPK<sup>[17]</sup>,这 3 种信号通路可以通过介导和调控炎症因子发挥不同的作用。此外,MAPK 信号通路还可以进一步激活各种靶细胞的核因子- $\kappa$ B、AP-1 等转录因子的合成,进而调控 MMPs 的数量和活性<sup>[18]</sup>。研究还发现,热休克蛋白可以通过增加炎症因子的表达水平进而激活 ERK、JNK 信号通路,调控 MMP-1 和 MMP-3 的过表达<sup>[19]</sup>,引起 MMPs 在转录、翻译水平表达失衡,降解酶合成增加,酶活性增强,导致 ECM 降解。PGA 作用于眼表后是否通过上述途径使球结膜组织中 MMP-1、MMP-3 的表达水平升高,从而引起胶原纤维溶解,使球结膜变薄,仍需要进一步研究,以期明确 PGA 长期作用于兔眼表后使结膜厚度变薄的机制。

对于药物难以有效控制眼压的青光眼患者仍需要进行手术治疗,滤过手术仍是目前临床上常用的治疗青光眼的术式,但瘢痕形成和 ECM 成纤维细胞增生阻塞滤过道是青光眼滤过手术失败的主要原因,抑制滤过手术后球结膜瘢痕的形成和刺激 ECM 的降解以维持滤过泡的形态及滤过道的通畅对于青光眼滤过手术后房水的重吸收具有重要意义<sup>[20]</sup>。MMPs 可广泛降解多种胶原纤维和弹力纤维,对滤过手术后结膜瘢痕形成和 ECM 堆积起到一定的抑制作用<sup>[21]</sup>。对于青光眼患者,滤过手术后适量点用 PGA 是否有利于维持滤过泡的形态及滤过道的通畅,从而利于滤过手术后房水的引流,值得进一步研究。结膜淋巴管广泛分布于球结膜组织中,对青光眼滤过手术后房水的重吸收起决定性作用<sup>[22-23]</sup>。结合本实验研究结果,变薄的球结膜组织对滤过手术将会产生何种影响,球结膜变薄后结膜淋巴管的密度是否降低并因此抵消结膜变薄、理论上增加滤过效应,以及 PGA 对结膜淋巴管的影响还需要进一步研究。

本研究结果显示,前列腺素类降眼压药物的长期使用可使实验兔球结膜厚度变薄,其变薄的机制可能与球结膜组织中 MMP-1 和 MMP-3 的表达水平升高有关,这将为青光眼的临床治疗和基础研究提供一定的参考。但本研究并未对球结膜组织中其他相关 MMPs 进行统一检测,不排除前列腺素类滴眼液作用于结膜后对其他 MMPs 表达水平产生影响,其具体机制仍需进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

[1] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma

- worldwide in 2010 and 2020 [J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90 (3) : 262-267. DOI: 10. 1136/bjo. 2005. 081224.
- [2] Krishna R, Debyr PW, Waldman CW, et al. Comparing the efficacy of the monocular trial treatment paradigm with multiple measurements of intraocular pressure before and after treatment initiation in primary open-angle glaucoma [J]. Clin Ophthalmol, 2012, 6 : 491-496. DOI: 10. 2147/OPTH. S29858.
- [3] Rotchford AP, King AJ. Repeatability of measurements of effectiveness of glaucoma medication [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96 (12) : 1494-1497. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2012-301877.
- [4] van der Valk R, Webers CA, Schouten JS, et al. Intraocular pressure-lowering effects of all commonly used glaucoma drugs: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Ophthalmology, 2005, 112 (7) : 1177-1185. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2005. 01. 042.
- [5] Weinreb RN, Lindsey JD. Metalloproteinase gene transcription in human ciliary muscle cells with latanoprost [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43 (3) : 716-722.
- [6] Bahler CK, Howell KG, Hann CR, et al. Prostaglandins increase trabecular meshwork outflow facility in cultured human anterior segments [J]. Am J Ophthalmol, 2008, 145 (1) : 114-119. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2007. 09. 001.
- [7] Ito T, Ohguro H, Mamiya K, et al. Effects of antiglaucoma drops on MMP and TIMP balance in conjunctival and subconjunctival tissue [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47 (3) : 823-830. DOI: 10. 1167/iov. 05-0902.
- [8] Lopilly Park HY, Kim JH, Lee KM, et al. Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea [J]. Exp Eye Res, 2012, 94 (1) : 13-21. DOI: 10. 1016/j. exer. 2011. 10. 017.
- [9] Schrems WA, Schrems-Hoesl LM, Mardin CY, et al. The effect of long-term antiglaucoma drug administration on central corneal thickness [J]. J Glaucoma, 2016, 25 (3) : 274-280. DOI: 10. 1097/IJG. 000000000000190.
- [10] Richter M, Krauss AH, Woodward DF, et al. Morphological changes in the anterior eye segment after long-term treatment with different receptor selective prostaglandin agonists and a prostamide [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (10) : 4419-4426. DOI: 10. 1167/iov. 02-1281.
- [11] Aptel F, Cucherat M, Denis P. Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials [J]. J Glaucoma, 2008, 17 (8) : 667-673. DOI: 10. 1097/IJG. 0b013e3181666557.
- [12] Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, et al. Effects of long-term topical prostaglandin therapy on central corneal thickness [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2014, 30 (5) : 440-444. DOI: 10. 1089/jop. 2013. 0196.
- [13] Zhang X, Li Q, Liu B, et al. *In vivo* cross-sectional observation and thickness measurement of bulbar conjunctiva using optical coherence tomography [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (10) : 7787-7791. DOI: 10. 1167/iov. 11-7749.
- [14] Li QS, Zhao L, Zhang XR, et al. The palpebral conjunctival epithelium thickness in young adults measured by optical coherence tomography [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2015, 38 (4) : 250-252. DOI: 10. 1016/j. clae. 2015. 02. 005.
- [15] Li QS, Bao FF, Zhang ZY, et al. Effect of long-term topical latanoprost medication on conjunctival thickness in patients with glaucoma [J]. Int J Ophthalmol, 2018, 11 (7) : 1158-1162. DOI: 10. 18240/ijo. 2018. 07. 14.
- [16] Birt CM, Buys YM, Kiss A, et al. The influence of central corneal thickness on response to topical prostaglandin analogue therapy [J]. Can J Ophthalmol, 2012, 47 (1) : 51-54. DOI: 10. 1016/j. cjejo. 2011. 12. 012.
- [17] Zoukhri D, Macari E, Choi SH, et al. c-Jun NH2-terminal kinase mediates interleukin-1beta-induced inhibition of lacrimal gland secretion [J]. J Neurochem, 2006, 96 (1) : 126-135. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 2005. 03529. x.
- [18] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes [J]. Matrix Biol, 2002, 21 (3) : 251-262. DOI: 10. 1016/s0945-053x(02)00007-0.
- [19] Park CH, Lee MJ, Ahn J, et al. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop [J]. J Invest Dermatol, 2004, 123 (6) : 1012-1019. DOI: 10. 1111/j. 0022-202X. 2004. 23487. x.
- [20] Schlunck G, Meyer-ter-Vehn T, Klink T, et al. Conjunctival fibrosis following filtering glaucoma surgery [J]. Exp Eye Res, 2016, 142 : 76-82. DOI: 10. 1016/j. exer. 2015. 03. 021.
- [21] Honda N, Miyai T, Nejima R, et al. Effect of latanoprost on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 on the ocular surface [J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128 (4) : 466-471. DOI: 10. 1001/archophthalmol. 2010. 40.
- [22] Yu DY, Morgan WH, Sun X, et al. The critical role of the conjunctiva in glaucoma filtration surgery [J]. Prog Retin Eye Res, 2009, 28 (5) : 303-328. DOI: 10. 1016/j. preteyer. 2009. 06. 004.
- [23] Guo W, Zhu Y, Yu PK, et al. Quantitative study of the topographic distribution of conjunctival lymphatic vessels in the monkey [J]. Exp Eye Res, 2012, 94 (1) : 90-97. DOI: 10. 1016/j. exer. 2011. 11. 011.

(收稿日期:2021-05-13 修回日期:2021-08-15)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

## 广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

递法明片 惠州市百吉瑞医药有限公司……前插页

艾乐舒(0.2%氯替泼诺混悬滴眼液) 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

尼目克司(醋甲唑胺片) 杭州仟源保灵药业有限公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……后插页

中华医学会期刊 APP 中华医学会杂志社……后插页

欧蓝(人工晶状体) 天津高视晶品医疗技术有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底