

选择性激光小梁成形术的激光效应对体外小梁细胞 MMP-3 及 MMP-9 表达的影响

张洪洋 叶一明 杨扬帆 余敏斌

【摘要】 **背景** 选择性激光小梁成形术(SLT)可增加前房水排出,降低开角型青光眼患者的眼压,但其作用机制尚不清楚。小梁网房水排出阻力受到细胞外基质(ECM)影响,基质金属蛋白酶3(MMP-3)、MMP-9与小梁网ECM的降解密切相关。**目的** 利用永生化小梁细胞建立SLT激光效应模型,观察激光效应对小梁细胞表达MMP-3及MMP-9的影响。**方法** 将永生化人小梁细胞与色素颗粒混悬液共同隔夜培养16h,用SLT所用的Q开关倍频532nmNd:YAG激光照射人小梁细胞,制备SLT激光效应细胞模型,激光能量为0.2mJ,光斑直径为400 μ m,脉冲持续时间为3ns。分别于激光照射后1、4、8、12和24h,采用实时荧光定量PCR法检测激光照射前后小梁细胞中MMP-3 mRNA及MMP-9 mRNA的相对表达情况;ELISA法检测激光照射前后不同时间点培养液中MMP-3及MMP-9蛋白质量浓度的变化。**结果** SLT激光照射人小梁细胞前及照射后1、4、8、12和24h后细胞中MMP-3 mRNA的相对表达量分别为1.00、1.32 \pm 0.12、2.08 \pm 0.05、2.34 \pm 0.04、2.77 \pm 0.05、2.49 \pm 0.27,各组间差异有统计学意义($F=15.966, P=0.007$),其中激光照射后各时间点细胞中MMP-3 mRNA的相对表达量均明显高于对照组,至12h表达量最高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。激光照射前后不同时间点细胞中MMP-9 mRNA的相对表达量分别为1.00、0.91 \pm 0.10、1.27 \pm 0.07、1.46 \pm 0.07、1.69 \pm 0.09、0.87 \pm 0.09,各组间差异有统计学意义($F=30.526, P=0.005$),其中激光照射后4、8和12h小梁细胞中MMP-9 mRNA的相对表达量明显高于对照组,差异均有统计学意义($P=0.001, <0.001, <0.001$)。激光作用后不同时间点小梁细胞培养液中MMP-3及MMP-9蛋白的质量浓度均明显高于相应时间点对照组的检测值,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** SLT激光效应小梁细胞模型在激光作用后早期对MMP-3及MMP-9基因的表达和分泌均明显增加,但其表达随着激光照射后时间的延长而减弱。

【关键词】 氩; 激光疗法; 基质金属蛋白酶; 人小梁细胞; 实时荧光定量PCR; ELISA

Changes of MMP-3 and MMP-9 expressions on human trabecular cells following the exposure of laser associated with selective laser trabeculoplasty Zhang Hongyang, Ye Yiming, Yang Yangfan, Yu Minbin. The Department of Ophthalmology, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China
Corresponding author: Yu Minbin, Email: yuminbin@126.com

[Abstract] **Background** Selective laser trabeculoplasty (SLT) can increase the outflow of aqueous humor and reduce the intraocular pressure of patients with open angle glaucoma, but its mechanism is unknown. To investigate the mechanism of SLT would improve the therapeutic effect of SLT. The aqueous outflow resistance in trabecular meshwork was affected by the extracellular matrix (ECM). Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and MMP-9 were closely related to ECM degradation in trabecular meshwork. **Objective** This study was to observe the effects of SLT on the expressions MMP-3 and -9 in human trabecular cells *in vitro*. **Methods** Immortalized human trabecular cells were cultured with pigment particles mixed suspension for 16 hours and incubated overnight. Then the cells were irradiated with Q switch frequency doubling 532 nm Nd:YAG laser to establish SLT-effective cells with the energy of 0.2 mJ, spot diameter of 400 μ m and pulse duration of 3 ns. The expressions of MMP-3 mRNA and MMP-9 mRNA in the cells were detected by fluorescence quantitative real time PCR before and 1 hour and 4, 8, 12, 28 hours after exposure of laser. The concentrations of MMP-3 and MMP-9 in the medium were assayed using ELISA 1 hour and 4, 8, 12, 28 hours after exposure of laser and compared between the non-irradiation group and the irradiation group. **Results** The relative expressing levels of MMP-3 mRNA were 1.00, 1.32 \pm 0.12, 2.08 \pm 0.05, 2.34 \pm 0.04, 2.77 \pm 0.05 and 2.49 \pm 0.27 in the non-irradiation group and irradiation for 1 hour and 4, 8, 12, 28 hours after exposure of

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.008

基金项目:卫生部临床学科重点项目(卫规财函[2010]439-176);广州市科技和信息化局科技惠民项目(2014Y2-000172)

作者单位:510080 广州,广东省人民医院眼科

通信作者:余敏斌,Email:yuminbin@126.com

laser SLT, showing a significant difference among the groups ($F = 15.966, P = 0.007$), and relative expressing levels of MMP-3 mRNA were significantly higher in various time points after laser irradiation than those of the non-irradiation group (all at $P < 0.05$). The relative expressing levels of MMP-9 mRNA were $1.00, 0.91 \pm 0.10, 1.27 \pm 0.07, 1.46 \pm 0.07, 1.69 \pm 0.09$ and 0.87 ± 0.09 in the non-irradiation group and irradiation for 1 hour and 4, 8, 12, 28 hours after exposure of SLT, which was considerably different among the groups ($F = 30.526, P = 0.005$), and significant increased values were seen in the 4, 8 and 12 hours after irradiation compared with the non-irradiation group (all at $P < 0.05$), with highest expression in the irradiation for 12-hour group. The concentrations of MMP-3 and MMP-9 proteins in medium were significantly increased in various time points after laser exposure in comparison with the control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The expressions of MMP-3 and MMP-9 in human trabecular cells upregulate and the secretion ability of human trabecular cells to MMP-3 and MMP-9 proteins improves in early stage of SLT *in vitro*. However, these procedures gradually diminish with the lapse of time.

[Key words] Argon; Laser therapy; Matrix metalloproteinases; Trabecular meshwork cell, human; Real-time PCR; ELISA

选择性激光小梁成形术 (selective laser trabeculoplasty, SLT) 是利用 Q 开关倍频 532 nm Nd:YAG 激光对开角型青光眼的小梁网组织进行光凝, 从而建立房水外流通道的治疗方法。SLT 治疗过程中, 激光脉冲选择性地作用于小梁网部位含有色素的小梁细胞, 其高度的选择性和极短的脉冲时间可以减少激光对其周围小梁组织的损伤。美国 FDA 已于 2001 年批准 SLT 应用于临床, 目前已成为原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 治疗的首选方法之一^[1], 但 SLT 的降压幅度有限、降眼压作用逐渐减弱且作用机制尚不完全明确, 因此探讨和寻找 SLT 发挥降眼压作用的机制是解决 SLT 存在问题的根本方法。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组锌与钙离子依赖性的肽链内切酶, 其主要生物学功能是降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 其中 MMP-3 和 MMP-9 在小梁网组织中大量存在, 在炎症刺激和重建房水外流通道过程中发挥调控作用。本研究利用永生化小梁细胞建立 SLT 激光效应模型, 观察激光效应对小梁细胞中 MMP-3 和 MMP-9 表达的影响, 探讨 SLT 的降眼压作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人眼永生化小梁细胞 (中山大学眼科中心卓业鸿教授惠赠, 来源于加拿大魁北克遗传学与基因组实验室 Vincen Raymond 博士); DMEM-F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 色素颗粒 (美国 Sigma 公司); MMP-3 ELISA Kit、MMP-9 ELISA Kit (美国 Raybiotech 公司); SYBR Premix Ex taq 试剂盒、PrimeScript RT Master Mix (大连宝生物工程公司); Trizol (美国 Life 公司)。倍频 532 nm Nd:YAG 激光仪 (澳大利亚 Ellex R&D Pty 公司); 紫外分光光度

计 (上海洪纪仪器设备有限公司)。

1.2 体外激光效应模型的建立

参照文献[2]的方法建立体外激光效应模型。将冻存培养人眼永生化小梁细胞自液氮中取出并复苏, 传 2~3 代, 将生长至 40%~50% 融合状态的小梁细胞在制备好的 100 mg/L 色素颗粒 DMEM 混悬液中隔夜培养 16 h。孵育后的细胞用 PBS 冲洗去除细胞表面的色素颗粒, 加入适量含血清的 DMEM/F₁₂ 培养基, 置于体积分数 5% CO₂、37 °C 的恒温细胞培养箱待用。激光照射前培养的小梁细胞 PBS 洗涤 2 次, 加入新鲜 PBS, 然后倍频 532 nm Nd:YAG 激光对单孔培养的单层细胞进行不重叠的激光照射, 激光能量为 0.2 mJ, 光斑直径为 400 μm, 脉冲持续时间为 3 ns, 每孔照射 3 000 点。照射 3 ns 后弃去 PBS, 加入 DMEM/F₁₂ 培养基, 将细胞放入培养箱进行孵化。

1.3 体外 SLT 激光效应模型能量的确定

激光照射的起始能量为 0.6 mJ, 根据小梁细胞对激光照射的反应调整激光能量。激光照射细胞瞬间, 培养皿内产生肉眼可见的最小气泡, 然后降低 0.1 mJ, 作为体外 SLT 模型的激光能量。最终设为 0.2 mJ, 在体外模型中将此能量定义为“标准能量”。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测激光照射前后各组小梁细胞中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达

1.4.1 RNA 的提取 吸出 6 孔板中各组细胞中的培养液。每孔中加入 1.0 ml Trizol, 使 Trizol 均匀覆盖细胞面, 反复吹打后移至 1.5 ml EP 管中, 室温静置 5 min。向 EP 管中加入 200 μl 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 5 min, 4 °C 条件下 12 000×g 离心 15 min。将上层透明水相转移入另一 1.5 ml EP 管, 加入 500.0 μl 异丙醇。颠倒 EP 管数次混匀液体, 室温静置 10 min, 4 °C 条件下 12 000×g 离心 10 min。轻吸弃上清, 留下 EP 管底部白色沉淀, 加入预冷的体积分数 75% 乙醇

1 ml (DEPC 水配制), 小心振荡后 4 °C 条件下 7 500×g 离心 5 min。轻弃上清, RNA 沉淀置于室温中干燥 10 min, 加入 30.0 μl DEPC 水溶解。将 RNA 水溶液置于 -80 °C 冰箱保存, 或直接用于逆转录反应。

1.4.2 总 RNA 纯度和质量浓度测定 检测 RNA 在波长为 260 nm、280 nm 处的吸光度(A)值, 确定 RNA 质量浓度。以总 RNA A_{260}/A_{280} 值均在 1.8 ~ 2.0 认为 RNA 质量较为理想。取 2.0 μl RNA 样品, 溶于 98.0 μl DEPC 水中, 最终质量浓度×50 即为样品 RNA 质量浓度。加入适量 DEPC 水调整 RNA 质量浓度为 100 μg/ml。

1.4.3 逆转录反应 取 4 μl mRNA 作为模板, 反应体系如下: 5 倍 PrimeScript RT Master Mix 2.0 μl, 无水 RNase 4.0 μl, 总 RNA 4.0 μl。逆转录反应条件: 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s, 反应完成后, 将 cDNA 置于冰上或 -20 °C 保存。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 所用引物序列见表 1。反应体系如下: 5 倍 SYBR Premix Ex Taq 2×12.5 μl, 上游引物 F(10 μmol/L) 1.0 μl, 下游引物 R(10 μmol/L) 1.0 μl, ROX reference Dye I 1.0 μl, ddH₂O 6.5 μl, cDNA 3.0 μl, 总容积为 25.0 μl。采用两步法 real-time PCR, 在 ABI PRISM 7000 real-time PCR 仪上反应, 条件如下: 95 °C 预变性 10 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 31 s, 40 个循环。反应结束后按公式: 相对含量 $C = 2^{-(C_{ix}-C_{iGAPDH})} = 2^{-\Delta C_i}$, 进行 mRNA 相对量的计算, 实验重复 3 次。

表 1 基因引物序列

基因	序列
MMP-3	5'-CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA-3' 5'-TTCAGCTATTTGCTTGGGAA-3'
MMP-9	5'-GAACCAATCTCACCAGCAGG-3' 5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'
GAPDH	5'-GATTCCACCCATGGCAAATT-3' 5'-TCTCGCTCTGGAAGATGCT-3'

注: MMP: 基质金属蛋白酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.5 ELISA 法检测不同时间点小梁网细胞培养液中 MMP-3 和 MMP-9 质量浓度

取出超低温存放的激光模型培养基标本, 室温解冻 30 min, 实验前 30 min 按照试剂盒的说明书配制工作液。分别加入 100 μl 标准品或 100 μl 样品在酶标板孔内, 轻轻混匀, 置于摇床, 封住板孔, 室温孵育 150 min。甩尽培养板内液体, 每孔加入 250 μl 洗涤液洗涤反应板, 置于摇床 5 min, 甩尽板内液体; 反复洗涤 4 次。每孔加入 100 μl 生物素标记的 Anti-MMP-3 或 MMP-9, 轻轻混匀 30 s, 封住板孔, 置于摇床, 室温孵育 60 min。重复洗板 5 次, 每孔加入 100 μl 1 倍辣根过氧

化物酶, 轻轻混匀, 置于摇床, 封住板孔, 室温孵育 45 min。洗板后, 每孔加入 100 μl 1 倍 TMB 显色液, 封住板孔, 轻轻混匀 30 s, 置于摇床, 避光室温孵育 30 min。每孔加入 50 μl 终止液以终止反应。立即读取波长为 450 nm 处 A 值。以 A 值为纵坐标, 以标准品质量浓度为横坐标绘制散点图, 应用 Sigma plot 软件得出标准曲线, 根据样品的 A 值计算培养基样品中 MMP-3 和 MMP-9 的质量浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(软件序列号: 24DV-5GXD-3Y24-53YJ-8RLD)进行分析。本研究测试指标的数据资料经 K-S 检验均呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Bartlett 检验方差齐。本研究采用均衡分组多水平实验设计, 对照组和激光照射后不同时间点组细胞中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 相对表达量的差异比较均采用单因素方差分析, 多重比较采用 Dunnett *t* 检验; 激光照射组和对照组在不同时间点细胞培养基中 MMP-3 和 MMP-9 蛋白质量浓度的差异比较采用重复测量两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验法, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 激光照射后不同时间点小梁细胞中 MMP-3 mRNA 的相对表达

RNA 电泳图表明 RNA 质量良好(图 1)。对照组及照射后 1、4、8、12 和 24 h 组小梁细胞中 MMP-3 mRNA 的相对表达量分别为 1.00、1.32±0.12、2.08±0.05、2.34±0.04、2.77±0.05、2.49±0.27, 组间差异有统计学意义($F = 15.966, P = 0.007$), 激光照射后 1 h, 小梁细胞中 MMP-3 mRNA 相对表达量开始升高, 照射后 12 h MMP-3 mRNA 的相对表达量最高, 照射后 24 h 其表达量稍下降。各照射组的小梁细胞中 MMP-3 mRNA 相对表达量与对照组相比均明显升高, 差异均有统计学意义($P = 0.008, <0.001, <0.001, <0.001, <0.001$)(图 2)。

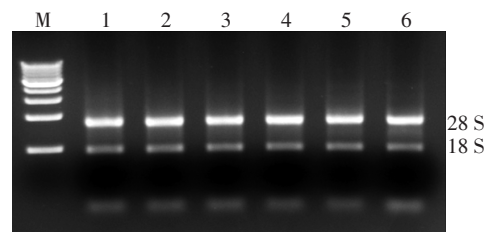
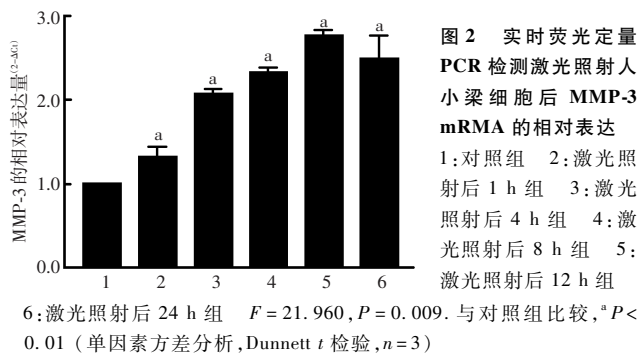
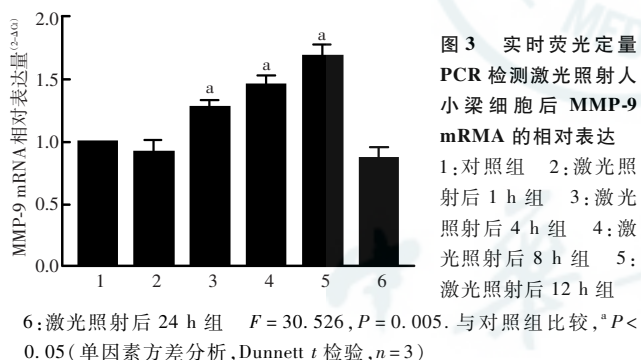


图 1 RNA 电泳图 M: 蛋白分子标志物 1: 对照组 2: 激光照射后 1 h 3: 激光照射后 4 h 4: 激光照射后 8 h 5: 激光照射后 12 h 6: 激光照射后 24 h



2.2 对照组和各激光照射组小梁细胞中 MMP-9 mRNA 的相对表达

对照组及照射后 1、4、8、12 和 24 h 组小梁细胞中 MMP-9 mRNA 的相对表达量分别为 1.00、 0.91 ± 0.10 、 1.27 ± 0.07 、 1.46 ± 0.07 、 1.69 ± 0.09 、 0.87 ± 0.09 , 组间差异有统计学意义 ($F = 30.526, P = 0.005$), 激光照射后 1 h, MMP-9 mRNA 相对表达量未发生明显改变, 激光照射后 4 h, MMP-9 表达量开始上升, 照射后 12 h 其表达量最高, 激光照射后 4、8 和 12 h 组小梁细胞中 MMP-9 mRNA 相对表达量明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.001, < 0.001, < 0.001$), 照射后 24 h 组 MMP-9 mRNA 相对表达量与对照组相比稍下降, 但差异无统计学意义 ($P = 0.057$) (图 3)。



2.3 各组小梁细胞在不同时间点培养液中 MMP-3 和 MMP-9 的质量浓度

与对照组相比, 激光照射后 1 h, 培养液中 MMP-3 蛋白的质量浓度与同时间点对照组值比较未见明显升高; 激光照射后 4 h, MMP-3 蛋白的质量浓度明显高于对照组, 激光作用后 24 h, 激光组 MMP-3 质量浓度是对照组的 1.78 倍, 激光组照射后 4、8、12 和 24 h 与对照组相应时间点间 MMP-3 蛋白的质量浓度差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 组内不同时间点间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。激光照射后各时间点, 培养液中 MMP-9 蛋白质量浓度均明显高于相应时间点的对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 激光照射小梁细胞后培养液中 MMP-3 及 MMP-9 蛋白的质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)

照射后时间 (h)	MMP-3 质量浓度 (ng/ml)		MMP-9 质量浓度 (pg/ml)	
	对照组 (n=9)	激光组 (n=9)	对照组 (n=9)	激光组 (n=9)
1	0.75±0.14	0.90±0.20	134.56±31.03	168.92±27.05 ^a
4	0.96±0.23	1.18±0.12 ^a	326.42±24.57	372.56±50.86 ^a
8	1.03±0.12	1.43±0.20 ^a	820.19±43.81	1094.76±37.29 ^a
12	1.23±0.21	1.91±0.17 ^a	1134.58±39.70	1336.11±36.07 ^a
24	1.20±0.15	2.13±0.19 ^a	2583.02±46.44	2959.66±74.22 ^a

注: MMP-3: $F_{\text{时间}} = 65.99, P < 0.001; F_{\text{分组}} = 192.03, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 14.21, P < 0.001$. MMP-9: $F_{\text{时间}} = 10531.12, P < 0.001; F_{\text{分组}} = 386.31, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 53.33, P < 0.001$. 与各自的对照组比较, $^a P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) MMP: 基质金属蛋白酶

3 讨论

目前关于 SLT 降低眼压的机制尚不十分明确。早期的研究通过建立离体人尸眼氩激光小梁成形术 (argon laser trabeculoplasty, ALT) 模型发现, 激光氩作用后白细胞介素 (interleukin, IL) 1α 、IL- 1β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等因子释放增加^[3], 引起巨噬细胞聚集, 刺激 MMPs 的表达和分泌增加, 推测 ALT 主要是通过 MMPs 途径重建 ECM, 增加房水引流^[4]。ALT 和 SLT 在小梁网组织中作用的原理不同, ALT 通过激光能量非特异性地作用于小梁网, 利用热效应产生凝固性损伤, 而 SLT 通过激光特异性地作用于小梁网含有色素的内皮细胞, 由于激光脉冲时间 (3 ns) 远低于色素的热释放时间 (1 μ s), 所以术后不会产生凝固性损伤。研究发现, SLT 与 ALT 术后小梁网超微结构改变不同, ALT 作用于小梁网后, 色素性小梁与非色素小梁交界处的葡萄膜小梁网形成弹坑样改变, 在弹坑的底部及边缘出现组织凝固性坏死, 而 SLT 作用于小梁网后, 仅可见小梁网细胞质内色素颗粒的崩解及细胞的分解, 小梁细胞周围的组织未受到影响^[5]。ALT 与 SLT 在作用原理、激光作用时间、激光作用后组织病理学等方面均存在差异。研究还发现, SLT 后猴眼小梁网内的单核细胞及巨噬细胞数量明显增加, 可能是 SLT 作用于小梁网后, 促进了自身的免疫系统释放某些活性物质, 局部细胞因子和化学趋化因子释放增加, 促进单核细胞聚集, 聚集的单核细胞转化为巨噬细胞所致, 因小梁网处的巨噬细胞内可见崩解的色素颗粒^[6]。巨噬细胞在小梁网内可吞噬组织碎片, 清除色素颗粒, 使小梁网处房水的流出阻力降低。在对兔 SLT 模型的治疗研究中发现, 激光治疗后前房脂质过氧化物酶增加, 眼内的氧自由基浓度增加, 引起轻度炎症, 从而发挥生物学效应^[7]。研究发现, SLT 可以改变内皮细胞间的连接, 因此推断其

与前列腺素类滴眼液发挥相似的降眼压作用^[8]。关于 SLT 作用机制的研究多建立在动物模型的基础上,而对于人在体及体外小梁细胞及细胞外基质在激光作用后的变化尚不十分明确。

小梁网内皮细胞上的沉积物为 ECM,由小梁细胞产生,对维持房水的排出十分重要。正常情况下 ECM 处于不断产生和降解的动态平衡中,病理条件下 ECM 增多或降解减少导致其堆积而影响组织功能。ECM 的生理功能是保证房水外流通畅。MMPs 的主要功能是降解 ECM,Bradley 等^[9]利用人眼体外灌注模型,在灌注介质中加入活化的 MMP-3、MMP-2 和 MMP-9,发现房水流出率增加 160%。人小梁细胞中有 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 的表达^[10],MMP-3 主要用于蛋白多糖,并能激活其他 MMPs 一同参与到 ECM 降解的过程中,而蛋白多糖是增加小梁网房水外流阻力的主要成分^[11]。MMP-9 在生理情况下表达量极少,在细胞分化、组织损伤修复中发挥重要作用,但在受到炎症、损伤或外源性刺激的情况下其表达和分泌增加^[12]。因此,本研究选择检测 MMP-3、MMP-9 的表达来探讨 SLT 治疗后早期发挥降眼压作用的机制。

小梁细胞 SLT 激光效应模型的研究显示,激光作用后激光斑中央细胞气化缺失,但激光斑周边部分的细胞形态无明显改变。激光斑内细胞受到激光刺激后在基因表达和蛋白合成,尤其是对 ECM 生成和降解有关蛋白产生影响,可能与 SLT 发挥降眼压作用的机制有关。本研究的结果显示,体外培养的人小梁细胞经过激光作用后,各个观察时间点分泌 MMP-3 和 MMP-9 的浓度均明显高于对照组,同时小梁细胞 *MMP-3*、*MMP-9* 基因表达在激光照射后 12 h 表达达高峰,此后随观察时间的延长表达量逐渐减少。术后 24 h, *MMP-3* 基因表达仍明显高于术前水平,而 *MMP-9* 基因表达在术后 24 h 恢复到术前水平。小梁网细胞 MMP-3 和 MMP-9 的分泌在观察期内持续增加,而基因表达在术后 12 h 逐渐降低,这种差异可能是由于二者在转录、翻译和合成蛋白质各个水平的调节差异引起的。因此, *MMP-3* 基因表达和分泌增加在激光作用早期对于减少房水外流的阻力具有非常重要的作用。本研究结果提示,在激光作用早期,SLT 可能是通过 *MMPs* 基因表达和分泌增加改变 ECM 含量,降低房水流出阻力,从而发挥降眼压的作用。此外, *MMPs* 的增加有助于小梁细胞离开基底膜,增生、移行并修复激光受损区域。

本研究的局限性在于仅研究了 MMP-3 和 MMP-9 在激光模型中的变化,而其他与小梁网 ECM 合成和降解有关的 *MMPs*,如 MMP-1、MMP-2 等,有待于进一步

研究。组织基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 在调节房水流动性方面也有重要作用。因此,需要对 MMPs 及 TIMPs 在 SLT 降眼压机制中的作用进行更深入、全面的研究。此外本实验建立激光效应模型应用的色素细胞与人类小梁色素细胞来源不同,同时体外培养环境与 SLT 体内治疗后小梁细胞的微环境变化存在差异。因此,进一步完善 SLT 激光效应的模型,探讨其发挥作用的机制对提高 SLT 的临床治疗效果具有重要意义。

本研究对体外培养小梁细胞建立 SLT 的激光效应模型进行研究,发现激光作用后早期 MMP-3 和 MMP-9 表达和分泌明显增加,说明 MMP-3、MMP-9 表达和分泌的增加可能参与 SLT 早期降眼压的作用。然而,这种效应随时间延长而减弱,因此延长观察时间并对 MMPs 及其抑制剂 TIMPs 进行更全面、系统的研究有助于阐明 ECM 合成和降解在 SLT 发挥降眼压效应中的作用。

参考文献

- [1] Realini T. Selective laser trabeculoplasty: a review [J]. J Glaucoma, 2008, 17(6): 497-502. doi:10.1097/IJG.0b013e31817d2386.
- [2] 张洪洋,叶一明,杨杨帆,等.选择性激光小梁成形术体外激光效应模型的建立[J].中华实验眼科杂志,2014,32(2):107-113. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.003.
- [3] Bradley JM, Anderssohn AM, Colvis CM, et al. Mediation of laser trabeculoplasty-induced matrix metalloproteinase expression by IL-1beta and TNF alpha[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(2): 422-430.
- [4] Parshley DE, Bradley JM, Samples JR, et al. Early changes in matrix metalloproteinases and inhibitors after in vitro laser treatment to the trabecular meshwork[J]. Curr Eye Res, 1995, 14(7): 537-544.
- [5] Kramer TR, Noecker RJ. Comparison of the morphologic changes after selective laser trabeculoplasty and argon laser trabeculoplasty in human eye bank eyes[J]. Ophthalmology, 2001, 108(4): 773-779.
- [6] Alvarado JA, Katz LJ, Trivedi S, et al. Monocyte modulation of aqueous outflow and recruitment to the trabecular meshwork following selective laser trabeculoplasty[J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(6): 731-737. doi:10.1001/archophthalmol.2010.85.
- [7] Guzey M, Vural H, Satici A, et al. Increase of free oxygen radicals in aqueous humour induced by selective Nd:YAG laser trabeculoplasty in the rabbit[J]. Eur J Ophthalmol, 2001, 11(1): 47-52.
- [8] Alvarado JA, Iguchi R, Martinez J, et al. Similar effects of selective laser trabeculoplasty and prostaglandin analogs on the permeability of cultured Schlemm canal cells[J]. Am J Ophthalmol, 2010, 150(2): 254-264. doi:10.1016/j.ajo.2010.03.012.
- [9] Bradley JM, Vranka J, Colvis CM, et al. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(13): 2649-2658.
- [10] Alexander JP, Samples JR, Van Buskirk EM, et al. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(1): 172-180.
- [11] Knepper PA, Farbman AI, Telser AG. Aqueous outflow pathway glycosaminoglycans[J]. Exp Eye Res, 1981, 32(3): 265-277.
- [12] 康剑书,何为民.明胶酶 MMP-2 和 MMP-9 及其组织抑制剂与眼科疾病[J].国际眼科杂志,2009,9(11):2154-2157.

(收稿日期:2014-11-13)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)