

· 实验研究 ·

中性粒细胞来源 MMP-8 对腐皮镰刀菌性角膜炎的组织损伤作用及其机制

董军璐 金鑫 刘华 简守璐 岳娟 张红敏 王丽娅

河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南大学人民医院 郑州大学人民医院, 郑州 450003

通信作者: 王丽娅, Email: wangliya_55@126.com; 张红敏, Email: zhm0906@163.com

【摘要】 目的 研究小鼠腐皮镰刀菌性角膜炎中中性粒细胞来源的基质金属蛋白酶 8 (MMP-8) 对角膜组织的损伤作用及其机制。方法 取 108 只 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 采用腐皮镰刀菌感染法制备右眼真菌性角膜炎 (FK) 模型, 裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜炎情况并评分, 依据 FK 模型眼角膜炎评分将模型眼分为造模后 0、12、24、48 和 72 h 组。于相应时间点处死小鼠并取材角膜组织, 采用 Western blot 法检测 MMP-8、腺苷酸激活蛋白激酶 α (AMPK α) 及其丝氨酸 172 位点磷酸化形式 (p-AMPK α) 蛋白在角膜中的相对表达量; 采用苏木精-伊红染色法检测各时间点组小鼠角膜中中性粒细胞数量; 采用免疫荧光染色法观察角膜中中性粒细胞与 MMP-8 蛋白的共定位表达。体外角膜胶原降解实验中将角膜组织分为 MMP-8 组、缓冲液组和生理盐水组, 分别采用 100 μ l 活化的重组 MMP-8、检测缓冲液和生理盐水处理角膜, 采用羟脯氨酸检测试剂盒测定并比较各组角膜组织中羟脯氨酸质量分数。分别提取人外周血中性粒细胞和采集培养的腐皮镰刀菌孢子, 将人中性粒细胞分为 4 个组, 其中阴性对照组为培养的中性粒细胞, 共培养组为中性粒细胞加孢子共培养, AICAR 处理组和化合物 C 处理组分别向中性粒细胞和孢子共培养体系内加入 p-AMPK 蛋白酶激动剂 AICAR 和抑制剂化合物 C, 采用免疫荧光染色法检测各组人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白的表达水平。结果 造模后 24 h 组小鼠模型眼出现角膜混浊, 造模后 72 h 组出现角膜穿孔。造模后 24、48 和 72 h 组角膜炎评分均高于 12 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。造模后 12、24 和 48 h 组角膜中 MMP-8 蛋白相对表达量高于 0 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 模型眼角膜中 MMP-8 蛋白相对表达量与炎症评分呈中等强度正相关 ($r_s = 0.50, P < 0.05$)。造模后 24、48 和 72 h 组角膜内 p-AMPK α (Thr 172)/AMPK α 值高于 0 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 角膜中 p-AMPK α (Thr 172)/AMPK α 值与 MMP-8 蛋白相对表达量呈中等强度正相关 ($r = 0.54, P < 0.01$)。造模后 24、48 和 72 h 组角膜中中性粒细胞数目明显多于 0 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 角膜中中性粒细胞数目与炎症评分呈强正相关 ($r_s = 0.77, P < 0.001$), 与 MMP-8 蛋白相对表达量呈中等强度正相关 ($r = 0.56, P < 0.05$)。模型眼角膜中 MMP-8 蛋白表达与中性粒细胞高度共定位。缓冲液组、生理盐水组和 MMP-8 组角膜羟脯氨酸质量分数分别为 (0.52 \pm 0.02)、(0.51 \pm 0.03) 和 (0.27 \pm 0.02) μ g/mg, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 156.63, P < 0.01$), 其中 MMP-8 组角膜羟脯氨酸质量分数低于缓冲液组和生理盐水组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。培养的镰刀菌孢子感染人中性粒细胞实验中, AICAR 处理组 MMP-8 表达荧光强度值明显高于阴性对照组和化合物 C 处理组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 小鼠真菌性角膜炎中性粒细胞分泌的 MMP-8 可降解角膜基质层胶原纤维, 导致角膜混浊或穿孔。人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白的表达水平变化可能与 AMPK 活化有关。

【关键词】 角膜炎; 真菌; 感染; 基质金属蛋白酶 8; 中性粒细胞; 近交系小鼠; 人

基金项目: 国家自然科学基金河南联合基金重点支持项目 (U1704283); 国家自然科学基金面上项目 (81770902); 河南省立眼科医院基础研究重点项目 (21JCZD003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210714-00412

Investigation of the tissue-damaging effects and mechanisms of neutrophil-derived MMP-8 in *Fusarium keratitis*

Dong Junlu, Jin Xin, Liu Hua, Jian Shoujun, Yue Juan, Zhang Hongmin, Wang Liya

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan

University People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding authors: Wang Liya, Email: wangliya_55@126.com; Zhang Hongmin, Email: zhm0906@163.com

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of tissue damage caused by neutrophil matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in *Fusarium* keratitis. **Methods** A total of 108 male C57BL/6J SPF grade mice, 6–8 weeks old, were selected to establish a model of *Fusarium* keratitis (FK) in the right eyes. Corneal inflammation in mice was observed and scored under a slit lamp microscope. Based on the corneal inflammation scores, the modeling eyes were divided into 0, 12, 24, 48, and 72-hour groups post-modeling. At the corresponding time points, mice were euthanized, and corneal tissues were collected. The expressions of MMP-8, adenylylate-activated protein kinase (AMPK α) and its serine 172-site phosphorylated form (p-AMPK α) proteins in corneal tissues were detected by Western blot. The neutrophil count in mice corneal tissues at each time point was determined using hematoxylin and eosin staining. The co-localization of neutrophils and MMP-8 protein in the cornea was observed by immunofluorescence staining. In the *in vitro* corneal collagen degradation experiment, corneal tissues were divided into MMP-8 group, buffer group, and normal saline group, which were treated with 100 μ l of activated recombinant MMP-8, detection buffer, and normal saline, respectively. Hydroxyproline content in corneal tissues was determined using a hydroxyproline assay kit, and the mass fractions of hydroxyproline were compared among the groups. Peripheral blood neutrophils were isolated from human blood samples, and *Fusarium* spores were collected for experiments. Human neutrophils were divided into four groups, negative control group (cultured neutrophils), co-culture group (neutrophils co-cultured with spores), AICAR-treated group (neutrophils co-cultured with spores and treated with p-AMPK protein kinase activator AICAR), and compound C-treated group (neutrophils co-cultured with spores and treated with the inhibitor compound C). The MMP-8 protein expression levels in each group of human neutrophils were assessed via immunofluorescence staining. The use and care of animals complied with the ARVO statement and Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. The animal experiment protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECA-2017-04-02). One healthy adult volunteer was selected and 10 ml of peripheral venous blood was collected. The clinical study protocol was approved by the Clinical Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECKY-2019 [16]). **Results** At 24 hours post-modeling, corneal opacification was observed in the modeling eyes, and corneal perforation occurred in 72-hour post-modeling group. The corneal inflammation scores in 24, 48, and 72-hour post-modeling groups were all higher than those in 12-hour post-modeling group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.001$). The relative expression levels of MMP-8 protein in the cornea were higher in 12, 24, and 48-hour post-modeling groups compared to 0-hour group, with statistically significant differences (all at $P < 0.001$). There was a moderate positive correlation between the relative expression level of MMP-8 protein in the cornea and the inflammation scores of the modeling eye ($r_s = 0.50, P < 0.05$). In the cornea, the p-AMPK α (Thr 172)/AMPK α ratio was higher in 24, 48, and 72-hour post-modeling groups than in 0-hour group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The p-AMPK α (Thr 172)/AMPK α ratio in the cornea was moderately positively correlated with the relative expression level of MMP-8 protein ($r = 0.54, P < 0.01$). The number of neutrophils in the cornea was significantly higher in 24, 48, and 72-hour post-modeling groups than in 0-hour group, with statistically significant differences (all at $P < 0.001$). The number of neutrophils in the cornea was strongly positively correlated with the inflammation score ($r_s = 0.77, P < 0.001$), and was moderately positively correlated with the relative expression level of MMP-8 protein ($r = 0.56, P < 0.05$). MMP-8 protein expression in the cornea of the modeling eyes showed a high degree of co-localization with neutrophils. The hydroxyproline content in the cornea was (0.52 ± 0.02) μ g/mg, (0.51 ± 0.03) μ g/mg, and (0.27 ± 0.02) μ g/mg in buffer group, normal saline group and MMP-8 group, respectively, with a significant overall difference among them ($F = 156.63, P < 0.01$). The corneal hydroxyproline content was lower in MMP-8 group compared to buffer and normal saline groups, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). In the experiment involving the infection of cultured *Fusarium* spores with human neutrophils, the fluorescence intensity of MMP-8 expression was significantly higher in AICAR-treated group than in negative control group and compound C-treated group, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The MMP-8 secreted by neutrophils in mice with fungal keratitis can degrade corneal stromal collagen fibers, leading to corneal opacification or perforation. The variations in MMP-8 protein expression levels in human neutrophils may be

associated with AMPK activation.

[Key words] Keratitis; Fungi; Infection; Matrix metalloproteinase 8; Neutrophils; Inbred mice; Human

Fund program: National Natural Science Foundation of China Henan Joint Fund Key Support Project (U1704283); National Natural Science Foundation of China (81770902); Henan Eye Hospital Key Program of Basic Research (21JCZD003)

DOI:10. 3760/cma. j. cn115989-20210714-00412

真菌性角膜炎 (fungal keratitis, FK) 是一种由致病真菌引起的感染性角膜炎, 该病致盲率高, 为我国常见的难治性致盲眼病^[1]。FK 的治疗目前大多依赖于局部抗真菌药物。然而, 由于抗真菌药物相对分子质量大且渗透性差, 严重的 FK 药物控制效果欠佳, 预后不良, 大多数患者遗留下中度或重度视力障碍, 约 25% 的患眼仍需进行复杂的手术, 且手术成功率较低^[2-3]。中性粒细胞在抗真菌感染方面发挥重要作用。研究发现, 在真菌感染早期, 角膜内募集的中性粒细胞达 90% 以上, 是 FK 早期主要的免疫细胞^[4-5]。角膜真菌感染后中性粒细胞迅速从角膜缘血管游出并在感染部位浸润, 以杀灭真菌并使病灶局限^[6]。然而, 中性粒细胞在杀菌的同时, 还通过释放蛋白水解酶、活性氧和氮对组织造成损伤^[7]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是中性粒细胞释放的蛋白酶中的一类。MMP-8 是 MMP 家族胶原酶的一种, 可降解 I、II、III 型胶原^[8], 不仅可以辅助中性粒细胞迁移, 还参与组织的损伤过程^[9-10]。目前对 MMP-8 调节先天免疫作用的研究主要集中在肿瘤、癌症以及肺部、血管等炎症相关性疾病^[7], FK 角膜组织破坏方面的研究不多, 对其作用机制知之甚少。AMP 依赖的蛋白激酶 (adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 是一种高度保守的蛋白激酶, 主要以异源三聚体复合物的形式存在于真核细胞中。以往 AMPK 信号通路作为调节能量代谢的途径而备受关注, O'Neill 等^[11]研究发现, AMPK 信号通路在感染和免疫炎症性疾病中也发挥重要作用, 但其在 FK 中的作用尚不清楚。FK 的致病菌主要有丝状真菌和酵母样真菌 2 种类型, 其中丝状真菌中的镰刀菌是我国 FK 的主要致病菌^[12-13], 在 FK 的发生和发展过程中具有一定的代表性。本研究拟探讨中性粒细胞来源 MMP-8 对 FK 角膜组织破坏的作用机制, 为避免患眼角膜组织的损害提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及外周血、菌种来源 SPF 级 6~8

周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 108 只, 购自南京大学模式动物研究所, 经眼科检查均无眼疾。实验小鼠按每笼 6 只饲养, 饲养室内温度保持在 22~26 °C, 湿度 40%~60%, 每日光照与黑暗时间各 12 h。实验动物的饲养及使用均遵照 ARVO 声明, 遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物质量管理办法》要求, 研究方案经河南省眼科研究所实验动物伦理委员会批准 (批文号: HNEECA-2017-04-02)。选取健康成人志愿者 1 名, 采集外周静脉血 5 ml, 研究方案经河南省立眼科医院医学研究伦理委员会审批 [批文号: HNEECKY-2019 (16) 号]。腐皮镰刀菌 (编号: 3. 5840) 购自中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗小鼠 Phospho-AMPK α (Thr172) 抗体、兔抗小鼠 AMPK α (D5A2) 抗体 (美国 CST 公司); 兔抗小鼠 MMP8 抗体 (英国 Abcam 公司); 兔抗小鼠 GAPDH 抗体 (杭州贤至生物科技有限公司); 羊抗兔 IgG-HRP 标记二抗、重组 MMP-8 蛋白 (美国 R&D 公司); Alexa fluor 488 标记 PEG 生物素二抗 (美国 Jackson 公司); DAPI (美国 Invitrogen 公司); Acadesine、二盐酸盐化合物 C (美国 MCE 公司); BCA 法蛋白浓度测定试剂盒、组织裂解液 (北京索莱宝科技有限公司); ECL 发光液 (美国 Millipore 公司); 小鼠眼球固定液 (北京康为试剂公司); 脱脂奶粉 (美国 BD 公司); 羟脯氨酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 裂隙灯显微镜 (SLM-8E, 重庆康华瑞明科技股份有限公司); 体视解剖显微镜 (OMS-90, 日本 Topcon 公司); 正置荧光显微镜 (美国 Olympus 公司); 电泳仪、化学发光仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 FK 小鼠模型制作 所有小鼠腹腔内注射 80 mg/kg 戊巴比妥钠进行全身麻醉, 并采用 1% 盐酸丁卡因滴眼液点右眼进行角膜表面麻醉, 麻醉后将小鼠置于解剖显微镜下进行 FK 模型制作, 具体制作方法参照文献 [4]。

1.2.2 腐皮镰刀菌复苏和传代 腐皮镰刀菌复苏和传代方法参照文献 [14] 中描述的方法。4 °C 保存的镰



刀菌转种至葡萄糖马铃薯琼脂培养基,置于 26~28 ℃ 培养箱内生长 7 d,转种至葡萄糖马铃薯液体培养基于 26~28 ℃ 培养箱内生长,取培养 5~7 d 的菌丝用于实验。

1.2.3 实验分组及模型眼炎症评分 造模后 12 h 于裂隙灯显微镜下对小鼠模型眼进行 FK 炎症评分,并根据炎症评分将小鼠分为 12 h、24 h、48 h、72 h 模型组,每组 27 只小鼠 27 眼,再分别于 24、48 和 72 h 在裂隙灯显微镜下对小鼠模型眼进行炎症评分,采用过量麻醉方法处死各组小鼠。参照文献[15]中描述的方法对 FK 模型眼进行炎症评分,总评分为各项评分之和。(1)病灶面积 占角膜总面积 1%~25%为 1 分;占角膜总面积 26%~50%为 2 分;占角膜总面积 51%~75%为 3 分;占角膜总面积 76%~100%为 4 分。(2)角膜混浊度 角膜轻度雾状混浊,瞳孔及虹膜清晰可见为 1 分;角膜浅层混浊,透过病灶可见瞳孔及虹膜为 2 分;角膜全层呈不均匀混浊为 3 分;均匀致密混浊为 4 分。(3)角膜水肿为 1 分。(4)前房积脓 少量积脓,未及旁中央为 1 分;大量积脓,达角膜旁中央为 2 分。(5)角膜病灶表面粗糙和隆突为 2 分。(6)后弹力层膨出为 3 分。(7)角膜穿孔为 4 分。(8)角膜新生血管 新生血管面积占角膜总面积 1%~50%为 1 分;新生血管占角膜总面积 51%~100%为 2 分。(9)眼球肿胀明显,比正常眼球体积膨大为 5 分。(10)角膜溶解,眼球萎缩为 6 分。

1.2.4 Western blot 法检测 FK 小鼠角膜组织内目标蛋白相对表达量 每组分别取 23 只小鼠,冰上取角膜组织,浸泡于 100 μ l 组织裂解液(内含蛋白酶抑制剂),剪碎角膜,充分研磨。离心半径 8 cm,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,蛋白变性后备用。聚丙烯酰胺凝胶 90 V 恒压电泳,湿转法转膜,将目标相对分子质量范围的硝酸纤维素膜进行免疫反应。将硝酸纤维素膜放入 5%脱脂奶粉封闭液中,于摇床上室温下封闭 1 h;去除封闭液,分别浸入 MMP-8 (1:1 000)、AMPK α (1:1 000)、Phospho-AMPK α 一抗 (1:1 000),4 ℃ 孵育过夜;复温后用 0.01 mol/L TBST 洗 3 次,每次 5 min;于 HRP IgG 二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h;用 ECL 显色液显色,置于化学发光仪中进行曝光,以 GAPDH 为内参。采用 Quantity One 软件进行灰度统计分析,目标蛋白相对表达量为目标蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值。

1.2.5 羟脯氨酸测定法检测角膜组织中羟脯氨酸质量分数 每组取 2 只未处理小鼠的角膜 4 只,按照 1.2.4 部分方法取角膜并修剪为直径 2 mm 大小。将

角膜分为 MMP-8 组、缓冲液组和生理盐水组,取 96 孔板,每孔各加入 1 只角膜,按照分组分别添加 100 μ l 活化的重组 MMP-8、缓冲液和生理盐水,每组 4 个孔。将 96 孔板置在培养箱中于 37 ℃、5% CO₂ 条件下孵育 24 h,采用羟脯氨酸测定试剂盒测定角膜中羟脯氨酸质量分数。

1.2.6 苏木精-伊红染色法检测小鼠角膜组织中中性粒细胞数量 各时间点组分别取 4 只小鼠的 4 只眼球,室温下置于固定液内 12 h 以上,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,5 μ m 厚切片并制成白片。各组分别取 4 张白片行苏木精-伊红染色,正置荧光显微镜下观察角膜样本中性粒细胞并拍照。采用 ImageJ 软件计数各切片中性粒细胞数。

1.2.7 免疫荧光染色法观察角膜组织中中性粒细胞与 MMP-8 蛋白的共定位表达 取小鼠 48 h FK 模型组白片切片 1 张(见 1.2.6 部分),脱蜡,浸泡于 Tris-EDTA 修复液内加热煮沸进行抗原修复。取出白片,滴加 MMP-8 一抗 (1:200) 4 ℃ 孵育过夜,次日复温,浸入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤 3 次,每次 5 min;再滴加 Alexa fluor 488 二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h,浸入 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加 5 μ g/ml DAPI 室温孵育 30 min,封片,正置荧光显微镜下观察并定位角膜组织中中性粒细胞和 MMP-8 蛋白的表达。MMP-8 显示绿色荧光,中性粒细胞显示蓝色荧光。

1.2.8 人中性粒细胞和腐皮镰刀菌孢子提取 将抽取的外周静脉血置于抗凝管内,1 300 r/min 离心 10 min,收集血细胞。加入红细胞裂解液,血液与红细胞裂解液体积比为 1:3;在 Percoll 密度梯度液(依次向 15 ml 离心管内缓慢加入 4 ml 81% Percoll、3 ml 70% Percoll 和 4 ml 55% Percoll)上层加入白细胞悬液,1 700 r/min 离心 20 min,收集 4 ml 液面层的细胞,即中性粒细胞。以 1 倍 PBS 重悬,1 700 r/min 离心 5 min,收集沉淀物,加入 RPMI-1640 培养基重悬后计数。刮取真菌培养基上的腐皮镰刀菌菌落并溶于无菌生理盐水,过滤,1 700 r/min 离心 5 min,得到真菌孢子,光学显微镜下计数。

1.2.9 体外腐皮镰刀菌孢子感染人中性粒细胞 将 1.2.8 中处理和获取的中性粒细胞分为 4 个组,阴性对照组为常规培养基培养的中性粒细胞,共培养组为中性粒细胞与孢子共培养,AICAR 处理组和化合物 C 处理组分别向中性粒细胞和孢子共培养体系内加入 p-AMPK 蛋白酶激动剂 AICAR 或抑制剂化合物 C。采用 24 孔板,按照分组分别依次添加培养基 500 μ l/孔、

AICAR 500 $\mu\text{mol/L}$ /孔或化合物 C 10 $\mu\text{mol/L}$ /孔、中性粒细胞 5.0×10^5 /孔和孢子 5.0×10^5 /孔,其中孢子在中性粒细胞培养 30 min 后加入,均于 37°C 、5% CO_2 条件下孵育 4 h。

1.2.10 细胞免疫荧光染色法检测

中性粒细胞中 MMP-8 的表达 取

1.2.9 中处理的细胞,以 4% 多聚甲

醛固定,0.2% Triton 透化,滴入 2% 牛血清白蛋白室温下封闭 1 h,滴加 MMP-8 一抗(1:200) 4°C 孵育过夜。次日复温,滴加 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;再滴加荧光 488 二抗(1:1 000)室温下孵育 1 min,浸入 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。滴加 5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 室温下反应 30 min,封片,正置荧光显微镜下观察并拍照,各组统一曝光强度和时

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验评估是否满足正态分布。FK 炎症评分呈偏态分布,数据资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表达,造模后不同时间点组 FK 炎症评分总体差异比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用 Dunnett T3 检验。角膜中 MMP-8 及 p-AMPK α 蛋白相对表达量、角膜中羟脯氨酸质量分数、角膜中中性粒细胞数量经 Shapiro-Wilk 检验均呈正态分布,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料经 Levene 检验进行方差齐性检验。不同时间点组角膜中 MMP-8 和 p-AMPK α 蛋白相对表达量、角膜羟脯氨酸质量分数、中性粒细胞数量以及体外实验各组角膜中 MMP-8 蛋白荧光强度总体差异比较均采用单因素方差分析,事后比较若方差齐采用 LSD- t 检验,若方差不齐则采用 Dunnett T3 检验。角膜中 MMP-8 相对表达量与炎症评分关系评估以及造模后不同时间点中性粒细胞数量与炎症评分的相关性分析均采用 Spearman 秩相关分析,角膜中 p-AMPK α 蛋白相对表达量与 MMP-8 蛋白相对表达量关系评估以及造模后不同时间点中性粒细胞数量与 MMP-8 蛋白相对表达量相关性分析均采用 Pearson 线性相关分析,并对相关系数进行假设检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后不同时间组小鼠模型眼角膜病变情况及评分比较

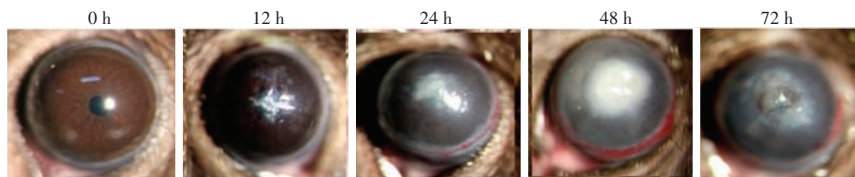


图 1 各组小鼠模型眼角膜裂隙灯显微镜下病灶表现 随着造模后时间的延长,角膜病灶面积逐渐扩大

Figure 1 Slit lamp micrographs of cornea lesion in different groups Area of corneal lesions was progressively expanded over time after modeling

造模后 24 h 组小鼠模型眼出现典型的菌丝苔被,随造模后时间延长病灶面积逐渐扩大,角膜混浊逐渐加重,并伴有前房积脓,造模后 72 h 组 42% 的模型眼出现角膜穿孔(图 1)。造模后 12、24、48 和 72 h 组模型眼角膜炎症评分分别为 2(2,3)、6(5,6)、9(8,9) 和 12(12,14) 分,总体比较差异有统计学意义($H = 129.38, P < 0.01$),其中造模后 24、48 和 72 h 组炎症评分均明显高于 12 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。

2.2 造模后不同时间组角膜中 MMP-8 相对表达量比较

与造模前相比,造模后不同时间组 MMP-8 蛋白表达条带均明显增强,其中以造模后 24 h 组角膜中 MMP-8 蛋白表达条带最强(图 2A)。造模后 0、12、24、48、72 h 组角膜中 MMP-8 蛋白相对表达量分别为 1.07 ± 0.24 、 22.77 ± 13.40 、 53.41 ± 15.97 、 43.99 ± 24.94 和 14.35 ± 10.21 ,总体比较差异有统计学意义($F = 9.89, P < 0.01$),其中造模后 12、24 和 48 h 组 MMP-8 蛋白相对表达量明显高于 0 h 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 2B)。模型眼角膜组织内 MMP-8 蛋白相对表达量与相应炎症评分呈中等强度正相关($r_s = 0.50, P < 0.05$)(图 3)。

2.3 未处理小鼠离体角膜 MMP-8 孵育后角膜中羟脯氨酸质量分数比较

缓冲液组、生理盐水组和 MMP-8 组角膜羟脯氨酸质量分数分别为 (0.52 ± 0.02) 、 (0.51 ± 0.03) 和 $(0.27 \pm 0.02) \mu\text{g/mg}$,总体比较差异有统计学意义($F = 156.63, P < 0.01$),其中 MMP-8 组角膜中羟脯氨酸质量分数明显低于缓冲液组和生理盐水组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.4 造模后不同时间组模型眼角膜组织中 p-AMPK 蛋白相对表达量比较及其与 MMP-8 蛋白表达量的相关性

随造模后时间的延长,小鼠模型眼角膜中 p-AMPK α (Thr 172) 蛋白相对表达量升高,造模后 0、12、24、48、72 h 组模型眼角膜中 p-AMPK α (Thr172)/

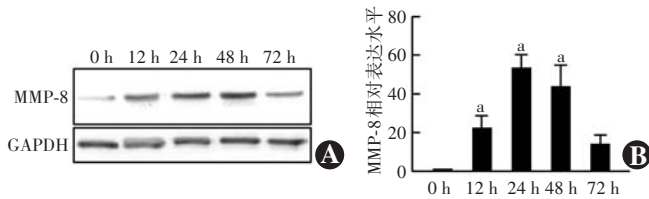


图 2 造模后不同时间组小鼠角膜组织中 MMP-8 蛋白表达 A:不同时间组小鼠角膜组织中 MMP-8 蛋白表达电泳图 B:不同时间组小鼠角膜组织中 MMP-8 蛋白相对表达量量化比较 $F = 9.89, P < 0.01$. 与造模后 0 h 组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 5$) MMP:基质金属蛋白酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 2 MMP-8 protein expression of modeling eyes at different time points following modeling A: Electrophoretogram of MMP-8 protein expression of modeling eyes at different time points B: Comparison of MMP-8 protein relative expression level in cornea among different time points $F = 9.89, P < 0.01$. Compared with 0 hour after molding, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 5$) MMP: matrix metalloproteinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

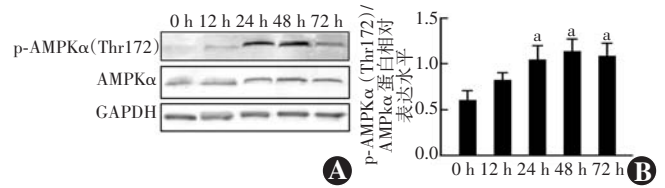


图 4 造模后不同时间组小鼠角膜中 p-AMPK 蛋白表达比较 A:不同时间组小鼠角膜组织中 p-AMPK 蛋白表达电泳图 B:不同时间组小鼠角膜组织中 p-AMPKα (Thr172)/AMPKα 表达值比较 $F = 3.11, P < 0.05$. 与造模后 0 h 组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 18$) AMPK:AMP 依赖的蛋白激酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 Comparison of p-AMPK expression in cornea among different time points following modeling A: Electrophoretogram of p-AMPK protein expression in cornea among different time points B: Comparison of relative expression levels of p-AMPKα (Thr172)/AMPKα protein in cornea among different time points $F = 3.11, P < 0.05$. Compared with 0 hour after molding, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 18$) AMPK: adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

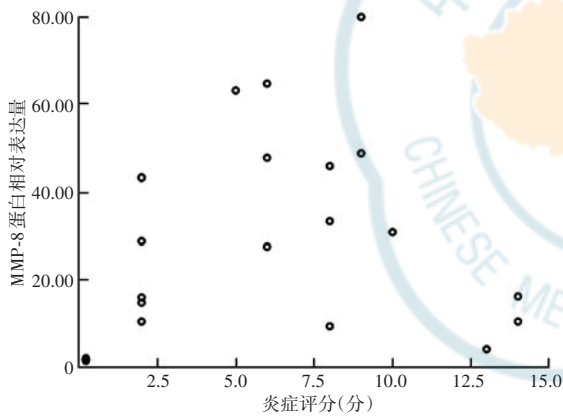


图 3 MMP-8 蛋白相对表达量与炎症评分相关性分析 MMP-8 相对表达量与炎症评分呈中等强度正相关 ($r_s = 0.50, P < 0.05$) (Spearman 秩相关分析, $n = 25$) MMP:基质金属蛋白酶

Figure 3 Correlation of MMP-8 relative expression with inflammation score in modeling eyes The relative expression of MMP-8 in cornea was positively correlated with inflammation score ($r_s = 0.50, P < 0.05$) (Spearman rank correlation analysis, $n = 25$) MMP: matrix metalloproteinase

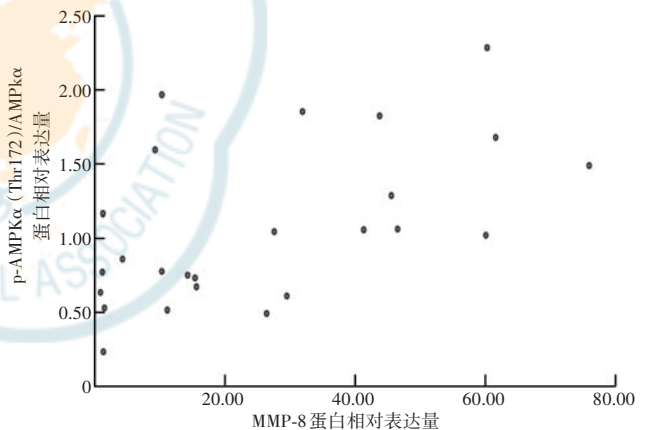


图 5 p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα 表达量与 MMP-8 表达量相关性分析 p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα 表达量与 MMP-8 表达量呈中等强度正相关 ($r = 0.54, P < 0.01$) (Pearson 线性相关分析, $n = 25$) AMPK:AMP 依赖的蛋白激酶;MMP:基质金属蛋白酶

Figure 5 Correlation of p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα expression with MMP-8 expression p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα expression was moderately positively correlated with MMP-8 expression in cornea ($r = 0.54, P < 0.01$) (Pearson linear correlation analysis, $n = 25$) AMPK: adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase; MMP: matrix metalloproteinase

AMPKα 值分别为 0.61 ± 0.40 、 0.82 ± 0.36 、 1.04 ± 0.64 、 1.13 ± 0.60 和 1.09 ± 0.58 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 3.11, P < 0.05$), 其中, 造模后 12 h 组模型眼角膜中 p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα 值与造模后 0 h 组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模后 24、48 和 72 h 组角膜中 p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα 值明显高于 0 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。角膜中 p-AMPKα (Thr 172)/AMPKα 值与 MMP-8 蛋白相对表达量呈中等强度正相关 ($r = 0.54, P < 0.01$) (图 5)。

2.5 造模后不同时间组角膜中中性粒细胞数量比较
造模后 12 h 组模型眼角膜中即出现中性粒细胞, 随造模时间延长, 角膜中中性粒细胞逐渐增多 (图 6)。造模后 0、12、24、48、72 h 组角膜中中性粒细胞数量分别为 (8 ± 6) 、 (35 ± 19) 、 (1479 ± 286) 、 (1994 ± 188) 和 (1328 ± 93) 个/切片, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 17.13, P < 0.01$), 其中造模后 24、48 和 72 h 组角膜中中性粒细胞数量明显多于 0 h 组, 差异均有统计

学意义(均 $P < 0.001$)。模型眼角膜中中性粒细胞数量与炎症评分呈强正相关($r_s = 0.77, P < 0.001$), 与 MMP-8 蛋白相对表达量呈中等强度正相关($r = 0.56, P < 0.05$) (图 7)。

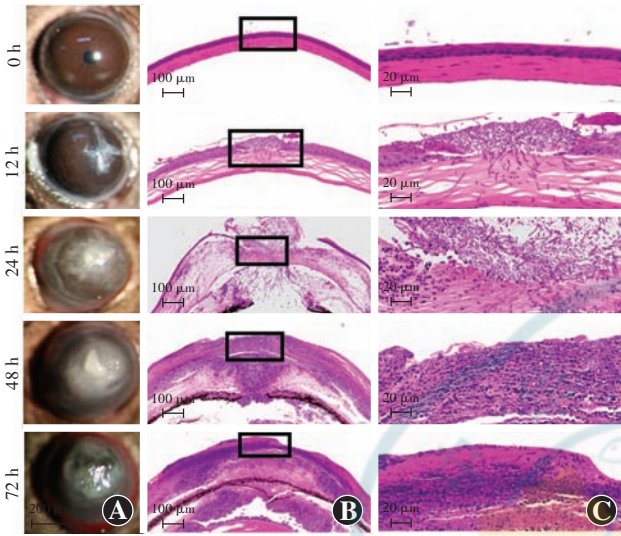


图 6 造模后不同时间组裂隙灯显微镜下角膜表现及病理组织学检查表现 随造模后时间延长及病情加重,角膜组织中中性粒细胞数量增加并向角膜深层浸润 A:不同时间组裂隙灯显微镜下角膜病灶表现 B:不同时间组模型眼角膜组织学表现(HE $\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 方框内所示为角膜病灶区 C:角膜病灶区放大图(HE $\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$)

Figure 6 Slit lamp microphotographs and histopathological findings of corneal lesions at various time points following modeling

The inflammation of the corneas was gradually aggravated over the time, and the number of neutrophils was obviously increased A: Manifestation of corneal lesion under a slit lamp microscope at each time point B: The pathohistological findings of lesions (HE $\times 200$, bar = $100 \mu\text{m}$) The corneal lesion was marked in square frame C: Magnified view of the corneal lesion (HE $\times 400$, bar = $20 \mu\text{m}$)

2.6 MMP-8 蛋白在角膜中性粒细胞中的表达及定位

MMP-8 蛋白在角膜的中性粒细胞中呈阳性表达, 呈绿色荧光, 包绕中性粒细胞的分叶核, 角膜中中性粒细胞呈蓝色荧光, 可见绿色荧光与蓝色荧光重叠, 即 MMP-8 蛋白与中性粒细胞表达高度共定位(图 8)。

2.7 不同腐皮镰刀菌孢子感染处理组人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白相对表达量比较

MMP-8 蛋白在中性粒细胞中表达呈绿色荧光, AICAR 处理组 MMP-8 蛋白表达荧光强度强于阴性对照组和化合物 C 处理组(图 9)。阴性对照组、中性粒细胞与孢子共培养组、AICAR 处理组和化合物 C 处理组人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白表达荧光强度值分别为 $5\ 516\ 671 \pm 146\ 755$ 、 $5\ 666\ 755 \pm 331\ 791$ 、 $6\ 063\ 087 \pm$

$332\ 378$ 和 $5\ 518\ 788 \pm 419\ 323$, 组间总体比较差异有统计学意义($F = 12.75, P < 0.01$), 其中 AICAR 处理组人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白表达荧光强度值明显高于阴性对照组和化合物 C 处理组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

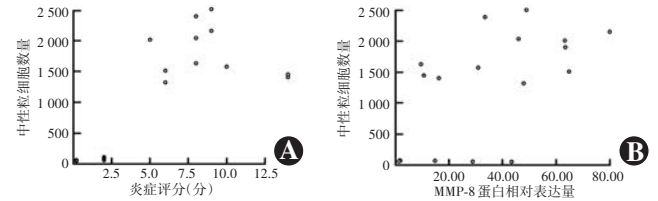


图 7 模型眼角膜中性粒细胞数量与炎症评分或 MMP-8 蛋白相对表达量相关性分析 A: 中性粒细胞数与炎症评分呈强正相关($r_s = 0.77, P < 0.001$) (Spearman 秩相关分析, $n = 20$) B: 中性粒细胞数与 MMP-8 蛋白相对表达量呈中等强度正相关($r = 0.56, P < 0.05$) (Pearson 线性相关分析, $n = 20$) MMP: 基质金属蛋白酶

Figure 7 Correlations of neutrophil count with inflammation score or MMP-8 protein expression A: Neutrophil count was positively correlated with inflammation score ($r_s = 0.77, P < 0.001$) (Spearman rank correlation analysis, $n = 20$) B: Neutrophil count was positively correlated with MMP-8 protein expression ($r = 0.56, P < 0.05$) (Pearson linear correlation analysis, $n = 20$) MMP: matrix metalloproteinase

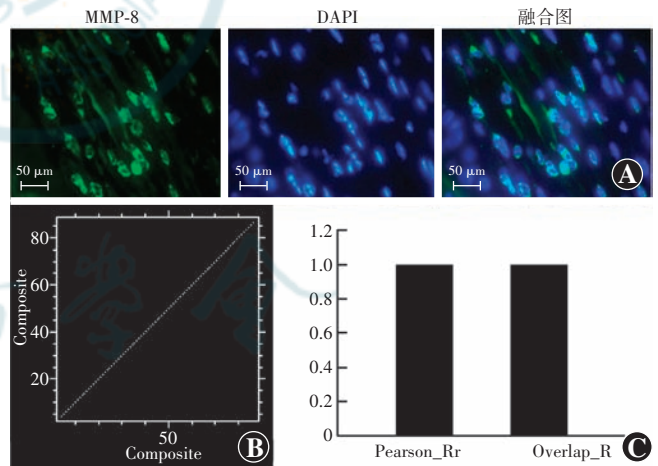


图 8 MMP-8 蛋白在角膜中性粒细胞中的表达情况 A: MMP-8 蛋白表达包绕中性粒细胞分叶核, 呈绿色荧光(Alexa fluor 488), 中性粒细胞核呈蓝色荧光(DAPI) ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: 荧光共定位分析拟合图 C: 荧光共定位分析计算结果条图(Pearson_Rr = 1, Overlap_R = 1) MMP: 基质金属蛋白酶; DAPI: 二脒基苯基吲哚

Figure 8 MMP-8 protein expression in neutrophils in the cornea A: MMP-8 encompassed neutrophil segmented nuclei, showing green fluorescence (Alexa fluor 488), and neutrophil nuclei presented blue fluorescence (DAPI) ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) B: Fitted plot of fluorescence co-localization analysis C: Histogram of calculated results of fluorescence co-localization analysis (Pearson_Rr = 1, Overlap_R = 1) MMP: matrix metalloproteinase; DAPI: diamidindine phenyl indole

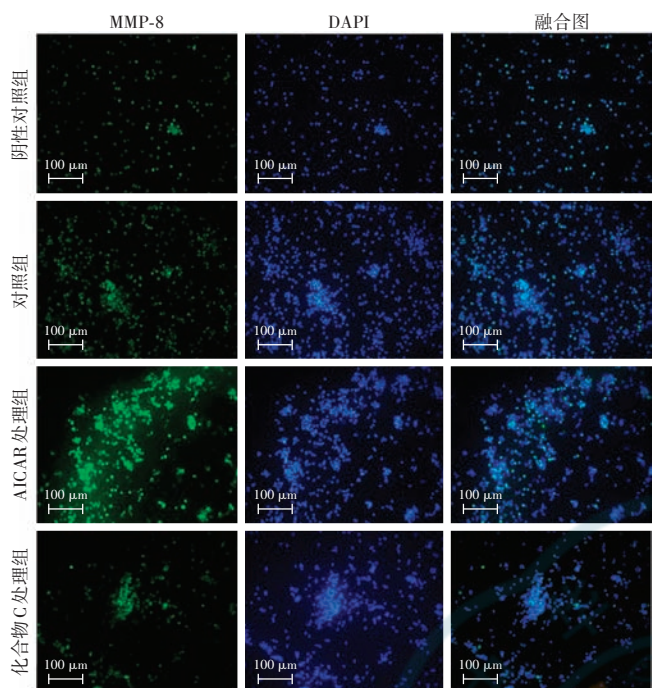


图 9 各处理组人中性粒细胞中 MMP-8 蛋白表达的免疫荧光染色 MMP-8 蛋白在人中性粒细胞的表达呈绿色荧光 (Alexa fluor 488), 人中性粒细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) ($\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) AICAR 处理组 MMP-8 蛋白表达荧光强于阴性对照组和化合物 C 处理组 MMP: 基质金属蛋白酶; DAPI: 二脒基苯基吲哚

Figure 9 Immunofluorescence staining of MMP-8 expression in human neutrophils nuclei MMP-8 expression showed green fluorescence (Alexa fluor 488) and human neutrophil nuclei presented blue fluorescence (DAPI) ($\times 200$, bar = $100 \mu\text{m}$) The fluorescence was stronger in AICAR-treated group than in negative control group and compound C-treated group MMP: matrix metalloproteinase; DAPI: diamindine phenyl indole

3 讨论

正常角膜无血管、透明, 是重要的屈光介质。角膜基质约占整个角膜厚度的 90%, 由绝大部分胶原纤维构成的细胞外基质和少量细胞组成。角膜胶原纤维的主要成分是 I 型胶原, 构成了角膜组织的主要骨架^[16]。角膜的折光功能依赖于有序排列的胶原板层结构, 有序胶原结构的破坏是角膜混浊的主要原因^[17]。本课题组既往通过小鼠角膜 MMP-8 基质注射造模发现, 注射眼角膜较对照眼明显混浊, 证明 MMP-8 可直接降解角膜基质层胶原纤维造成基质破坏, 导致角膜混浊^[18], 与本研究体外实验结果一致。正常角膜中无中性粒细胞, 角膜真菌感染诱发中性粒细胞向角膜内迁移募集。研究表明, 去除中性粒细胞的 FK 小鼠角膜内菌丝量较高, 证明了中性粒细胞关键的杀菌作用, 而去除中性粒细胞的 FK 小鼠角膜混浊程度、组织损伤程度较正常 FK 小鼠低, 表明角膜组织混浊是中性粒细胞降解胶原蛋白破坏组织所致^[19]。本研究

也同样发现, FK 小鼠感染早期, 随着角膜内中性粒细胞数量的增多, 其分泌的 MMP-8 表达水平也逐渐升高, 有助于中性粒细胞由角膜缘向角膜感染部位迁移以杀死真菌, 在此过程中也会降解角膜基质层胶原纤维致使角膜混浊, 使 MMP-8 表达水平与 FK 炎症评分严重程度呈正相关。

中性粒细胞分泌 MMP-8 前体, 只有破坏其活性位点与 Zn^{2+} 的相互作用才会被激活。激活的过程可以通过中性粒细胞释放的活性氧和多种蛋白酶来介导, 如组织蛋白酶 G、糜蛋白酶以及 MMP-3、MMP-7、MMP-10、MMP-14 等^[8, 20-25]。AMPK 磷酸化激活 MMP-8 是我们首次在 FK 中发现的, 其在人肺结核疾病中已有报道, 中性粒细胞来源的 MMP-8 导致基质破坏空洞化的过程依赖于 AMPK, AMPK 激活水平在人肺结核细胞模型中上调, 并驱动中性粒细胞 MMP-8 分泌和基因表达, 这被 AMPK 抑制剂化合物 C 抑制^[26], 与本研究中体外镰刀菌孢子感染人中性粒细胞实验结果一致。由于中性粒细胞趋化网络在小鼠和人是不同的, 鼠和人的中性粒细胞在循环细胞的数量和形态方面也不同^[27], 因此本研究中选用人中性粒细胞来研究 AMPK 与 MMP-8 之间的作用。AICAR、二甲双胍或 A-769662 (AMPK 激活剂) 均被报道在各种炎症和免疫动物模型中发挥抗炎作用^[28-32], 在 FK 动物模型中尚未见报道, AMPK 磷酸化激活 MMP-8 在 FK 病变中的作用还需进一步研究。

综上所述, 本研究证明了在 FK 病变早期, 中性粒细胞分泌大量 MMP-8 降解角膜基质层胶原纤维致使角膜混浊, 组织被破坏, MMP-8 表达水平与 FK 的严重程度相关。本研究首次发现在 FK 病程中, AMPK 信号通路在调节中性粒细胞 MMP-8 分泌和天然免疫介导的组织破坏之间存在相互作用, AMPK 磷酸化可调控人中性粒细胞 MMP-8 分泌。本研究为 FK 中性粒细胞分泌 MMP-8 致组织破坏提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 董军璐: 实施研究、采集数据、统计/分析数据、文章撰写; 金鑫、刘华、简守璐、岳娟: 实施研究; 张红敏、王丽娅: 酝酿和设计实验、实施研究、解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅

参考文献

- [1] Wang L, Sun S, Jing Y, et al. Spectrum of fungal keratitis in central China [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2009, 37 (8): 763-771. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2009.02155.x.
- [2] Mills B, Radhakrishnan N, Karthikeyan Rajapandian SG, et al. The role of fungi in fungal keratitis [J/OL]. Exp Eye Res, 2021, 202: 108372 [2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33249061/>. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108372.
- [3] Niu L, Liu X, Ma Z, et al. Fungal keratitis: pathogenesis, diagnosis and

- prevention[J/OL]. Microb Pathog, 2020, 138 : 103802 [2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31626916/>. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103802.
- [4] 张红敏, 刘素素, 许中中, 等. 小鼠真菌性角膜炎中主要免疫细胞的作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(9) : 779-784. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.003.
Zhang HM, Liu SS, Xu ZZ, et al. Effects of immunocyte on the process of fungal keratitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(9) : 779-784. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.003.
- [5] Sun Y, Abbondante S, Karmakar M, et al. Neutrophil caspase-11 is required for cleavage of caspase-1 and secretion of IL-1 β in *Aspergillus fumigatus* infection[J]. J Immunol, 2018, 201(9) : 2767-2775. DOI: 10.4049/jimmunol.1701195.
- [6] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(3) : 159-175. DOI: 10.1038/nri3399.
- [7] Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8; cleavage can be decisive[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(4) : 217-223. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.04.001.
- [8] Arafat SN, Suelves AM, Spurr-Michaud S, et al. Neutrophil collagenase, gelatinase, and myeloperoxidase in tears of patients with Stevens-Johnson syndrome and ocular cicatricial pemphigoid [J]. Ophthalmology, 2014, 121(1) : 79-87. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.06.049.
- [9] Lin M, Jackson P, Tester AM, et al. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro[J]. Am J Pathol, 2008, 173(1) : 144-153. DOI: 10.2353/ajpath.2008.080081.
- [10] Danielsen PL, Holst AV, Maltesen HR, et al. Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair[J]. Surgery, 2011, 150(5) : 897-906. DOI: 10.1016/j.surg.2011.06.016.
- [11] O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation[J]. Nature, 2013, 493(7432) : 346-355. DOI: 10.1038/nature11862.
- [12] Kredics L, Narendran V, Shobana CS, et al. Filamentous fungal infections of the cornea; a global overview of epidemiology and drug sensitivity[J]. Mycoses, 2015, 58(4) : 243-260. DOI: 10.1111/myc.12306.
- [13] Hassan AS, Al-Hatmi AM, Shobana CS, et al. Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the genus *Fusarium* causing human keratomycosis in South India[J]. Med Mycol, 2016, 54(3) : 287-294. DOI: 10.1093/mmy/myv105.
- [14] 孙声桃, 吕奇学, 韩雷, 等. 我国中原地区 653 株真菌性角膜炎分离镰刀菌的基因型及药物敏感性[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(9) : 660-667. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.09.005.
Sun ST, Lv QX, Han L, et al. Molecular identification and *in vitro* susceptibility of *Fusarium* from fungal keratitis in central China[J]. Chin J Ophthalmol, 2015, 51(9) : 660-667. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.09.005.
- [15] Zhang H, Wang L, Li Z, et al. A novel murine model of *Fusarium solani* keratitis utilizing fluorescent labeled fungi [J]. Exp Eye Res, 2013, 110 : 107-112. DOI: 10.1016/j.exer.2013.03.002.
- [16] Ho LT, Harris AM, Tanioka H, et al. A comparison of glycosaminoglycan distributions, keratan sulphate sulphation patterns and collagen fibril architecture from central to peripheral regions of the bovine cornea[J]. Matrix Biol, 2014, 38 : 59-68. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.06.004.
- [17] Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly [J]. Exp Eye Res, 2015, 133 : 69-80. DOI: 10.1016/j.exer.2014.08.001.
- [18] 金鑫, 刘素素, 贺司宇, 等. 基质金属蛋白酶-8 对角膜基质胶原的作用研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(30) : 4187-4189. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2017.30.004.
Jin X, Liu SS, He SY, et al. Effect of MMP-8 on cornea collagen [J]. Chongqing Med, 2017, 46(30) : 4187-4189. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2017.30.004.
- [19] Leal SM Jr, Vareechon C, Cowden S, et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection [J]. J Clin Invest, 2012, 122(7) : 2482-2498. DOI: 10.1172/JCI63239.
- [20] Macleod T, Doble R, McGonagle D, et al. Neutrophil elastase-mediated proteolysis activates the anti-inflammatory cytokine IL-36 receptor antagonist [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 24880 [2023-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27101808/>. DOI: 10.1038/srep24880.
- [21] Knäuper V, Krämer S, Reinke H, et al. Characterization and activation of procollagenase from human polymorphonuclear leucocytes. N-terminal sequence determination of the proenzyme and various proteolytically activated forms [J]. Eur J Biochem, 1990, 189(2) : 295-300. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15489.x.
- [22] Knäuper V, Wilhelm SM, Seperack PK, et al. Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin [J]. Biochem J, 1993, 295 (Pt 2) : 581-586. DOI: 10.1042/bj2950581.
- [23] Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus [J/OL]. J Biol Chem, 1998, 273(37) : 23959-23968 [2023-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9727011/>. DOI: 10.1074/jbc.273.37.23959.
- [24] Knäuper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2 [J]. Eur J Biochem, 1996, 235(1-2) : 187-191. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.00187.x.
- [25] Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, et al. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6) : 2550-2556. DOI: 10.1167/iovs.02-1190.
- [26] Ong CW, Elkington PT, Brilha S, et al. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis [J/OL]. PLoS Pathog, 2015, 11(5) : e1004917 [2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25996154/>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004917.
- [27] Fan X, Patera AC, Pong-Kennedy A, et al. Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8 [J/OL]. J Biol Chem, 2007, 282(16) : 11658-11666 [2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17197447/>. DOI: 10.1074/jbc.M607705200.
- [28] Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs [J/OL]. J Biol Chem, 2004, 279(20) : 20767-20774 [2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14985344/>. DOI: 10.1074/jbc.M401390200.
- [29] Nath N, Giri S, Prasad R, et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2005, 175(1) : 566-574. DOI: 10.4049/jimmunol.175.1.566.
- [30] Nath N, Khan M, Paintlia MK, et al. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis [J]. J Immunol, 2009, 182(12) : 8005-8014. DOI: 10.4049/jimmunol.0803563.
- [31] Bai A, Ma AG, Yong M, et al. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(11) : 1708-1717. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.08.009.
- [32] Bai A, Yong M, Ma AG, et al. Novel anti-inflammatory action of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside with protective effect in dextran sulfate sodium-induced acute and chronic colitis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 333(3) : 717-725. DOI: 10.1124/jpet.109.164954.

(收稿日期:2023-03-14 修回日期:2023-08-23)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)