

翼状胬肉基质金属蛋白酶表达的意义

周进, 孔庆健, 杨道华, 孙玮玮, 邱承敏

作者单位: (201600) 中国上海市松江区中心医院眼科
作者简介: 周进, 女, 主治医师, 研究方向: 白内障、眼表疾病。
通讯作者: 孔庆健, 男, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼、眼表疾病。kqjian633@hotmail. com
收稿日期: 2010-12-08 修回日期: 2011-02-10

Matrix metalloproteinases expression in pterygium

Jin Zhou, Qing-Jian Kong, Dao-Hua Yang, Wei-Wei Sun, Cheng-Min Qiu

Department of Ophthalmology, Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China

Correspondence to: Qing-Jian Kong. Department of Ophthalmology, Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China. kqjian633@hotmail. com

Received: 2010-12-08 Accepted: 2011-02-10

Abstract

- AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinases (MMP) in pterygium.
- METHODS: The expression differences of MMP-2, MMP-7 and MMP-9 between human pterygium and the normal conjunctiva tissue were compared with immunohistochemical technique.
- RESULTS: MMP-2, MMP-7 and MMP-9 were expressed on all layers of pterygium. MMP-2 and MMP-7 were strongly expressed in hemoendothelial layer and squamous epithelium. MMP-9 was expressed in hemoendothelial layer. The positive expression of MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in pterygium was stronger than that in the normal conjunctiva tissue ($P < 0.01$).
- CONCLUSION: Over-expression of MMP may play an important role in the pathogenesis and relapse of pterygium.
- KEYWORDS: pterygium; matrix metalloproteinases; immunohistochemical technique

Zhou J, Kong QJ, Yang DH, et al. Matrix metalloproteinases expression in pterygium. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2011;11(4):599-601

摘要

目的: 研究基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 在翼状胬肉中的表达。

方法: 采用免疫组织化学法, 检测翼状胬肉与正常结膜组织中 MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 的表达, 比较两者表达的差异。

结果: MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 在翼状胬肉各层组织中均有不同程度的表达, MMP-2 和 MMP-7 在血管内皮层及鳞状上皮层中表达强阳性, MMP-9 在血管内皮层中表达阳性。MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 在正常结膜组织中表达阴性或弱阳性。翼状胬肉组织中 MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 的表达强于正常结膜组织, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

结论: MMP 高表达可能与翼状胬肉的发生及复发有关。

关键词: 翼状胬肉; 基质金属蛋白酶; 免疫组织化学法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 04. 011

周进, 孔庆健, 杨道华, 等. 翼状胬肉基质金属蛋白酶表达的意义. 国际眼科杂志 2011;11(4):599-601

0 引言

翼状胬肉是一种临床常见的眼表疾病, 是在外界刺激因素作用下引起的结膜变性疾病, 发病率较高, 手术后复发率也较高, 可达 25% ~ 40%。翼状胬肉不但影响美观, 还可引起角膜散光, 严重的因伸入瞳孔区而影响视力。虽然翼状胬肉是最为古老的眼病之一, 人们对它的认识也已有上千年, 但迄今翼状胬肉的发病机制尚无一种公认的理论, 因此探讨翼状胬肉的发病机制, 可以为进一步预防及寻找治疗翼状胬肉的方法提供理论依据。近年来, 研究基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 在翼状胬肉发病中的作用开始受到重视^[1]。我们采用免疫组织化学法, 研究翼状胬肉组织与正常结膜组织中 MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 的表达差异, 探讨其在翼状胬肉发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 收集 2009-03/11 原发性及继发性翼状胬肉手术切除的胬肉组织标本 67 例 78 眼; 男 29 例 33 眼, 女 38 例 45 眼, 年龄 35 ~ 75 (平均 61.2) 岁。收集治疗性白内障手术的角结膜缘球结膜组织标本 20 例 20 眼, 年龄 66 ~ 78 (平均 71.7) 岁, 无其它眼病史。兔抗人 MMP-2 多克隆抗体, 兔抗人 MMP-9 mAb, 兔抗人 MMP-7 mAb 及二抗, 由上海太阳生物技术有限公司提供; DAB 显色剂为长岛公司产品。

1.2 方法 将切除后的组织立即置于 100g/L 中性甲醛中固定, 常规乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, 切片 (厚度为 4 μ m)。分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。用 ElivisonTM super 法检测翼状胬肉组织及正常结膜组织 MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 的表达。标本常规脱蜡水化, 用 30mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化酶, EDTA (pH = 8.0) 微波修复抗原, 滴加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗室温 30min, DAB 显色 10min; 苏木素轻度复染, 经脱水透明处理后用中性树脂封片。用 PBS 液代替一抗作阴性对照。光学显微镜下观察细胞着色情况, 以细胞质内出现棕黄色颗粒反应产物为阳性。阳性强弱依染色深浅来判断。记分标准: 光镜下每张切片任取 5 个视野进行细胞计数, 至少计数 500 个细胞, 以阳性细胞占细胞总数的百分比表示阳性表达率。阳性

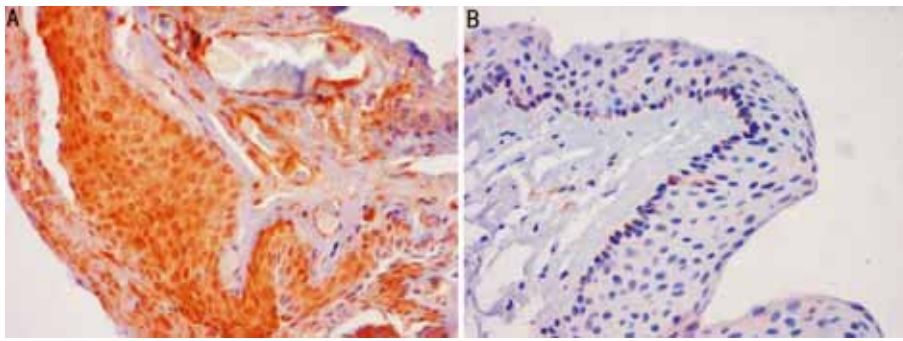


图1 MMP-2 的表达(Elivison ×200) A:翼状胬肉;B:正常结膜。

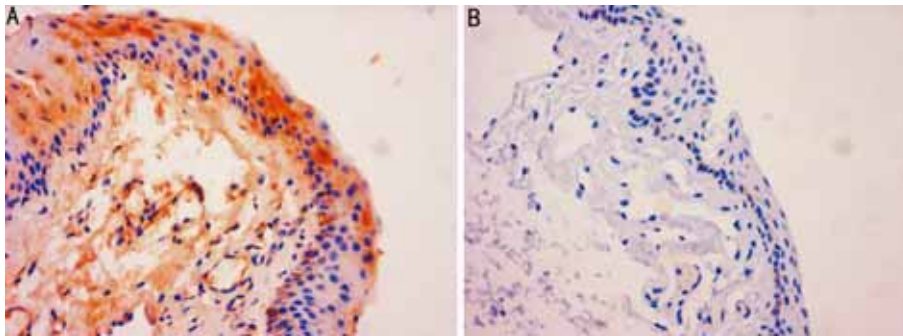


图2 MMP-7 的表达(Elivison ×200) A:翼状胬肉;B:正常结膜。

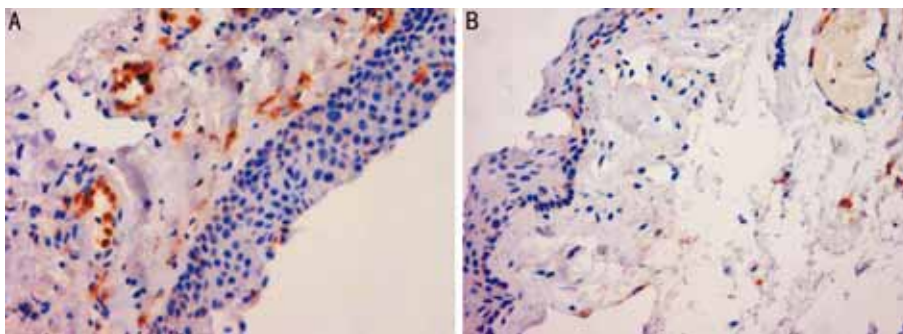


图3 MMP-9 的表达(Elivison ×200) A:翼状胬肉;B:正常结膜。

表达率达 0% ~ 5% 为阴性, 6% ~ 25% 为弱阳性(+), 26% ~ 50% 为阳性(++), >50% 为强阳性(+++)。

统计学分析:应用 SPSS 15.0 统计软件包进行数据处理,等级资料比较采用秩和检验。取 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 MMP-2 的表达 在翼状胬肉组织中可见较多的 MMP-2 阳性细胞,细胞质、细胞膜染色呈棕黄色, MMP-2 蛋白主要表达于鳞状上皮和血管内皮细胞胞质。在 78 眼翼状胬肉组织中, MMP-2 弱阳性到强阳性表达 78 眼,阳性率 100%。正常结膜组织中细胞未见阳性表达。MMP-2 在翼状胬肉组织中阳性表达与正常结膜组织间差异具有显著性 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1)。

2.2 MMP-7 的表达 在翼状胬肉组织中可见部分的 MMP-7 阳性细胞,细胞质、细胞膜染色呈棕黄色, MMP-7 蛋白主要表达于鳞状上皮和血管内皮细胞胞质。在 78 眼翼状胬肉组织中, MMP-7 弱阳性到强阳性表达 65 眼,阳性率 83.3%。正常结膜组织中细胞未见阳性表达。MMP-7 在翼状胬肉组织中阳性表达与正常结膜组织间差异具有显著性 ($P < 0.01$, 表 1, 图 2)。

2.3 MMP-9 的表达 在翼状胬肉组织中可见部分的 MMP-9 阳性细胞,细胞质、细胞膜染色呈棕黄色, MMP-9 蛋白主要表达于血管内皮细胞胞质。在 78 眼翼状胬肉组织

表 1 MMP 在翼状胬肉组织中的表达

MMP	分组	n	-	+	++	+++	眼
MMP-2	正常结膜	20	20	0	0	0	
	翼状胬肉	78	0	5	2	71	
MMP-7	正常结膜	20	20	0	0	0	
	翼状胬肉	78	13	15	21	29	
MMP-9	正常结膜	20	20	0	0	0	
	翼状胬肉	78	24	12	20	22	

中, MMP-9 弱阳性到强阳性表达 54 眼,阳性率 69.2%。正常结膜组织中细胞未见阳性表达。MMP-9 在翼状胬肉组织中阳性表达与正常结膜组织间差异具有显著性 ($P < 0.01$, 表 1, 图 3)。

3 讨论

翼状胬肉是起源于角膜缘干细胞的一种炎症性增生性疾病,其特征是广泛的基质重构和包括 Bowman's 膜受到破坏在内的角膜侵犯^[2]。翼状胬肉的病理改变首先出现睑裂部球结膜上皮浸润及其下的组织变性。其次,发生反应性的血管增生、组织肥厚和硬化隆起。病变可能在相当时间内局限于结膜,但随着病变的发展,大量新生血管伸入,并侵入角膜导致翼状胬肉的形成。本研究 HE 染色显示,胬肉组织角膜上皮灶性增生伴有乳头形成,部分区

域上皮萎缩,表皮下纤维结缔组织增生,伴有胶原纤维嗜碱性变;血管增生明显伴充血,灶性淋巴细胞浸润。MMP 是一组降解细胞外基质的含锌蛋白质,几乎能降解细胞外基质的所有成分。MMP 参与很多生物学过程,如胚胎发育、器官形成、神经生长、创伤愈合和血管形成等过程。目前已知的 MMP 主要分 4 类:(1)胶原酶(MMP-1,8,13),主要降解 I, II 和 III 型胶原;(2)明胶酶(MMP-2,9),主要降解 IV, V 型胶原和变形的 I, II, III 型胶原;(3)基质溶素(MMP-3,7,10,11,12);(4)膜型金属蛋白酶(MMP-14,15,16,17)^[3]。我们发现:MMP-2, MMP-7 和 MMP-9 在翼状胬肉中的阳性表达率分别为 100%, 83.3% 和 69.2%。在翼状胬肉组织中 MMP-2 表达阳性率最高,并定位于鳞状上皮层和血管内皮细胞胞质;MMP-7 在胬肉组织中也有较高的表达,也定位于鳞状上皮层和血管内皮细胞胞质;MMP-9 在血管内皮组织也有较高的表达,定位于血管内皮细胞胞质。而以上 3 种 MMP 在正常结膜组织中无表达或弱阳性表达。MMP-2 在许多生物过程中发挥着重要作用。翼状胬肉在早期的炎症反应刺激中可使上皮细胞产生 MMP-2, MMP-2 主要降解明胶酶、IV 型胶原、V 型胶原和弹性蛋白^[4],导致弹性纤维及胶原纤维异常增生;MMP-2 还可以促进血管周围的胶原酶活性及降解血管周围的基质,使血管内皮细胞外基质向血管生成因子方向移动,从而促进翼状胬肉新生血管形成^[5]。而上皮细胞异常分泌的 MMP-2 能裂解角膜前弹力层纤维原蛋白,导致上皮细胞尤其是变性的基底部角膜缘上皮细胞突破 Bowman's 膜, Bowman's 膜是角膜上皮和基质层的自然屏障。一旦 Bowman's 膜遭到破坏,翼状胬肉将向角膜侵犯和生长^[5],从而导致了翼状胬肉的发展。MMP-9 主要表达在间质的纤维母细胞胞质中,提示纤维母细胞中 MMP-9 的异常表达可能降解了基质中的胶原纤维,促使胶原纤维的崩解^[4]。研究表明, MMP-9 不仅可以破坏 IV 型、V 型胶原,还可以破坏突变的胶原,最终导致胶原的完全破坏和细胞侵入^[6]。已有研究表明, MMP-9 与新生血管的形成密切相关^[7]。MMP-7 为基质溶酶,广泛降解细胞外基质。最近的研究还发现 MMP-7 在翼状胬肉的活性增加,特别是在血管周围有强阳性表达,并认为 MMP-7 也与翼状胬肉的发病机制有关^[8]。

综上所述, MMP 是一种内源性蛋白水解酶,在机体中参与了组织损伤及修复的过程,也参与了新生血管的形成。在翼状胬肉发生过程中,由于 MMP-2 的过度表达使角膜前弹力层溶解,这可能是翼状胬肉形成的主要原因。

MMP-7 和 MMP-9 在血管内皮中表达增强,促使了新生血管的形成,这可能是翼状胬肉发展的原因之一。MMP 的活性主要受它的抑制剂(TIMP)的调节,有学者提出翼状胬肉的发生可能与抑制 TIMP 的活性有关,激活的酶和游离的 TIMP 之间的平衡决定了总体 MMP 的活性,这个平衡的破坏是引起组织侵犯的重要因素^[9],这可能也是翼状胬肉的发生及复发的重要原因。故临床在治疗翼状胬肉的手术过程中,我们可以应用一些合成的 TIMP,可能会对阻止或减缓胬肉的发展及降低翼状胬肉的复发起到一定的作用。目前临床应用较多的 TIMP 有丝裂霉素等。丝裂霉素可在手术中或手术后局部应用,虽然有一定的治疗效果,但有文献报道,在应用的过程中可出现伤口愈合迟缓、过敏性结膜炎、表层角膜炎,严重者可致巩膜软化、坏死、穿孔,以及继发性青光眼等并发症。这可能是在应用过程中浓度的掌握有一定的问题,故探讨 MMP 在翼状胬肉中的表达,寻找有效、副作用小的 TIMP 的药物,还有待我们临床进一步研究。

参考文献

- 1 Naib-Majani W, Eltohami I, Wernert N, *et al.* Distribution of extracellular matrix proteins in pterygia: an immunohistochemical study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242(4):332-338
- 2 郑卫东,徐国兴,胡建章,等. 基质金属蛋白酶-1 及其抑制剂和转化生长因子- β 1 在翼状胬肉中的表达及意义. *眼视光学杂志* 2006;8(1):46-48
- 3 李淑琳. 翼状胬肉发病机制的研究进展. *眼科研究* 2009;27(3):249
- 4 肖诗艺,袁静,朱格非,等. 明胶酶 A 及血管内皮细胞生长因子在翼状胬肉组织中的表达. *眼科新进展* 2006;26(8):577-580
- 5 罗丽娟,周辉. 翼状胬肉中 MMP-2, TIMP-2 和 TGF- β 1 的表达意义. *国际眼科杂志* 2008;8(7):1352
- 6 Moon HI, Chung JH. The effect of erythrodiol-3-acetate on the expression of matrix metalloproteinase-9 caused by ultraviolet-irradiated cultured human keratinocyte cells. *J Ethnopharmacol* 2005;21(6):85-93
- 7 Chantrain CF, Henriet P, Jodele S, *et al.* Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 2006;42(3):310-318
- 8 Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Active matrilysin (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;42(9):1963-1968
- 9 Di Girolamo N, Coroneo M, Wakefield D. Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am J Pathol* 2005;167(2):489-503