

雌激素干预去势雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 的表达

王涛¹, 刘涛^{2,3}, 吴红雅¹, 刘阳⁴, 陈健康⁵

作者单位:¹(312030)中国浙江省绍兴市,中国医科大学绍兴医院眼科;²(723000)中国陕西省汉中市,西安交通大学医学院附属3201医院眼科;³(710000)中国陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科全军眼科研究所;⁴(621000)中国四川省绵阳市第四人民医院神经外科;⁵(710000)中国陕西省西安市,第四军医大学实验教学中心

作者简介:王涛,副主任医师,眼科教研室主任,研究方向:白内障、眼表疾病、眼底病。

通讯作者:王涛. wt3201@163.com

收稿日期:2013-05-05 修回日期:2013-08-15

Research on the effects of expressions of MMP1, TIMP1 in lacrimal gland of ovariectomized rats

Tao Wang¹, Tao Liu^{2,3}, Hong-Ya Wu¹, Yang Liu⁴, Jian-Kang Chen⁵

¹Department of Ophthalmology, Shaoxing Hospital of China Medical University, Shaoxing 312030, Zhejiang Province, China;

²Department of Ophthalmology, No. 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China; ³Ophthalmology Institute of Chinese PLA, Department of Ophthalmology, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China; ⁴Department of Neurosurgery, the Fourth People's Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, Sichuan Province, China; ⁵Experiment Training Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Tao Wang. Department of Ophthalmology, Shaoxing Hospital of China Medical University, Shaoxing 312030, Zhejiang Province, China. wt3201@163.com

Received:2013-05-05 Accepted:2013-08-15

Abstract

• **AIM:** To study the effects of estrogen on the expression of matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in lacrimal gland of ovariectomized rat.

• **METHODS:** A total of 60 female rats were examined for the expression of MMP-1 and TIMP-1 protein in lacrimal gland through S I t measurement together with Western-blot and RT-PCR methods.

• **RESULTS:** There was significant reduction in S I t and increase in the protein expression of MMP1, TIMP1 and mRNA after ovariectomy conducted on rats ($P < 0.05$). After estrogen treatment, there was significant reduction in S I t and increase in the expression of MMP1, TIMP1 and mRNA as compared with before treatment ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Estrogen must be applied cautiously to treat xerophthalmia following menopause because estrogen can up regulate the expressions of MMP-1 and TIMP-1 and can aggravate the decrease of lacrimal secretion.

• **KEYWORDS:** xerophthalmia; matrix metalloproteinases-1; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1; Western-blot; real-time PCR

Citation: Wang T, Liu T, Wu HY, *et al.* Research on the effects of expressions of MMP1, TIMP1 in lacrimal gland of ovariectomized rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(9):1758-1761

摘要

目的:探讨雌激素对去势雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 表达的影响。

方法:采用 Western-blot 和 RT-PCR 的方法检测 60 只雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 的表达情况,并进行 S I t 检测。

结果:雌鼠去势后 S I t 显著缩短, MMP1 和 TIMP1 蛋白、mRNA 表达均显著增高 ($P < 0.05$); 给予雌激素后, S I t 比给药前显著缩短, MMP1 和 TIMP1 蛋白、mRNA 表达较给药前均显著增高 ($P < 0.05$)。

结论:雌激素上调 MMP1 和 TIMP1 表达,而且可以加重泪液分泌的减少,所以临床需慎用雌激素治疗绝经后干眼症。

关键词:干眼症;基质金属蛋白酶-1;基质金属蛋白酶组织抑制剂-1;蛋白印迹;实时定量 PCR

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.09.05

引用:王涛,刘涛,吴红雅,等. 雌激素干预去势雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 的表达. 国际眼科杂志 2013;13(9):1758-1761

0 引言

干眼症是眼科常见疾病之一。从临床上看,免疫炎症反应、细胞凋亡、性激素水平变化是其发生发展的主要原因。流行病学调查显示,老年妇女干眼症患病率高达 40%,提示干眼病的发生可能与绝经期妇女卵巢功能减退、雌激素水平降低有关^[1]。性激素在许多组织中调节基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinases-1, MMP-1) 和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1) 的合成,然而在泪腺中雌激素怎样影响 MMP-1 和 TIMP-1 的表达,以及其表达与干眼之间的相关性却不清楚,是否可以使用雌激素治疗绝经期干眼症仍有争议,本文对此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 雌性大鼠 60 只,购于第四军医大学实验动物中心,常规室温饲养。

表1 不同时间点各组 S I t 测量值 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}/5\text{min}$)

分组	造模前	造模后 1mo	造模后 3mo	造模后 5mo	给药后 6wk
A 组	7.62±0.44	7.64±0.66	7.63±0.94	7.61±0.76	7.59±0.88
B 组	7.56±0.60 ^a	5.27±0.84 ^c	3.57±0.61 ^e	2.31±0.63 ^e	2.11±0.47 ^e
C 组	7.59±0.66 ^{a,c}	5.26±0.93 ^{c,e}	3.62±0.64 ^{c,e}	2.38±0.66 ^{c,e}	1.15±0.51 ^{e,g}

^a $P>0.05$ vs A 组; ^c $P>0.05$ vs B 组; ^e $P<0.05$ vs A 组; ^g $P<0.05$ vs B 组。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 60 只 SD 雌性大鼠随机分为对照组和实验组(去卵巢组),对照组 20 只设为 A 组,只切除腹腔内部分脂肪组织;实验组大鼠分 B 和 C 两组,各 20 只,均切除双侧卵巢,8wk 后采取颈椎脱臼法处死大鼠。

1.2.2 动物模型的建立 实验组两组大鼠均用 6% 水合氯醛 200mg/kg 腹腔注射麻醉,剃去腹部鼠毛,25g/L 碘酊及 700mL/L 乙醇消毒,做腹正中切口,打开腹腔后沿输尿管寻找淡红色黄豆大卵巢,切除双侧卵巢后分层关腹。建模 5mo 后 B 组注射生理盐水, C 组予苯甲酸雌二醇 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下注射每 3d 一次, A 组不予任何干预。此操作后 6wk 处死所有大鼠,立刻摘取大鼠泪腺。部分用 4% 多聚甲醛和 4% 戊二醛固定,部分置液氮中保存。

1.2.3 S I t 测定 所有实验动物分别于建模前和建模后 1,2,3,4,5mo 及给药后 6wk 行泪液分泌量(Schirmer I test, S I t)测定。根据 Fujihara 等^[2]报道采用改良的 S I t 方法测量:将测试滤纸裁成 1mm×17mm,一端折弯 2.5mm,置于大鼠下睑外侧 1/3 结膜囊内,其余部分悬垂于皮肤表面,5min 后观察试纸湿润长度。

1.2.4 Western-blot 检测雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 蛋白的表达 标本离体后立即去除坏死组织,并抽提蛋白,测浓度后-70℃冻存备用。灌制十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)-聚丙烯酰胺分离胶和积层胶后,加 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,拔去梳子后加样。每孔加样 25 μL ,第一泳道加入预染低分子量标准分子质量蛋白。起始电压 8V/cm,样品进入分离胶后提至 15V/cm。待电泳完毕后蛋白转印于硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉封闭膜,加入 MMP1/TIMP1 抗体(1:500),4℃过夜,洗膜,分别加入 IgG,反应 1h。洗膜后加入 DAB 显色。蛋白的检测均以 PBS 替代一抗作为阴性对照,以 β -actin 作为阳性对照,将每一个样本的条带灰度值与相应 β -actin 的条带灰度值相比。

1.2.5 RT-PCR 检测雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 mRNA 的表达 取 100mg 组织标本置于灭菌匀浆器中,加入 1mL 预冷的 Trizol 后充分研磨,然后将液体移入 1.5mL 离心管,4℃ 12000r/min 离心 15min,取上清液,加入 1/5 体积氯仿,混匀后室温静置 5min,4℃ 12000r/min 离心 15min,将上层液体小心移至新的 1.5mL 离心管中,加等体积异丙醇,混匀后室温静置 15min,4℃ 12000r/min 离心 15min,弃上清液,加 1mL 750mL/L 乙醇后混匀,4℃ 12000g 离心 10min,弃上清液,室温干燥 5min,管底白色沉淀即所得总 RNA。cDNA 模板的制备根据 Fermentas 反转录试剂盒说明,将 2mg 总 RNA 反转录为 cDNA,-20℃冰箱保存备用。引物设计: MMP-1 上游: 5 - CGACTCTAGAAACA

CAAGAGCAAGA-3,下游:5 - AAGGTTAGCTTACTGTCACA CGCTT-3; TIMP-1 上游:5 - ATCCTGTTGTTGCTGTGGCTG ATAG-3,下游:5 - TGCTGGGTGTAACCTCTTTATTTC A-3; β -actin 上游:5 - GGTGGTTATGACTTTGTTAC-3,下游:5 - CAGGCGTGATGGCTTATTTGT-3。PCR 反应体系 25mL,包括 SYBR GreenI 12.5mL,ROXI 10.5mL,10mmol/L 的上下游引物各 0.5mL,cDNA 模板 0.5mL,补充灭菌 ddH₂O 至 25mL。反应条件:95℃ 10s,95℃ 5s,55℃ 34s,72℃ 1min,共 40 个循环。加样时,按照 ABI 7500 Real Time 仪器说明书,每一样本和基因同时做一个相同的复孔,输出数据为两者的平均值,统计时采用目的基因与 β -actin 的比值即相对定量值(relative quantitation, RQ)进行比较。

统计学分析:对所得数据采用 SPSS 16.0 统计软件行统计分析,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。成组设计的两均数比较采用配对样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,两变量间相关性用 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S I t 结果 两实验组动物在建模后 1mo 测 S I t 结果即开始下降,到 3mo 时较建模前均下降 50%,且与建模前比较有统计学差异($t_B = 22.23, P<0.05; t_C = 22.43, P<0.05$);给药 6wk 后实验 C 组 S I t 较 B 组缩短,两者比较有统计学差异($t = 5.47, P<0.05$);而且 C 组与给药前比较有统计学差异($t = 7.49, P<0.05$,表 1)。

2.2 雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 蛋白的表达 去卵巢雌鼠给药 6wk 后,各组 MMP-1 比较有统计学差异($F = 40.01, P<0.05$);B 组表达高于 A 组,两组间有统计学差异($t = 11.69, P<0.05$);C 组高于 B 组,两组间有统计学差异($t = 2.85, P<0.05$)。各组 TIMP-1 比较有统计学差异($F = 129.36, P<0.05$);B 组表达高于 A 组,两组间有统计学差异($t = 8.63, P<0.05$);C 组高于 B 组,两组间有统计学差异($t = 9.27, P<0.05$,图 1,表 2)。MMP-1 和 TIMP-1 之间呈正相关($r_s = 0.745, P<0.05$)。

2.3 雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 mRNA 的表达 去卵巢雌鼠给药 6wk 后,各组 MMP-1mRNA 比较有统计学差异($F = 65.83, P<0.05$)。B 组表达高于 A 组,两组间有统计学差异($t = 14.36, P<0.05$);C 组高于 B 组,两组间有统计学差异($t = 3.90, P<0.05$);各组 TIMP-1mRNA 比较有统计学差异($F = 94.35, P<0.05$)。B 组表达高于 A 组,两组间有统计学差异($t = 11.69, P<0.05$);C 组高于 B 组,两组间有统计学差异($t = 5.16, P<0.05$,图 2,表 3)。MMP-1 mRNA 和 TIMP-1 mRNA 之间呈正相关($r_s = 0.59, P<0.05$)。

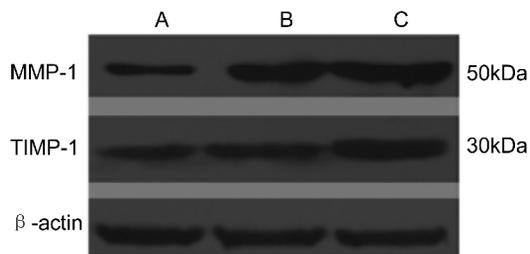


图1 雌鼠泪腺中 MMP1 和 TIMP1 蛋白的表达。

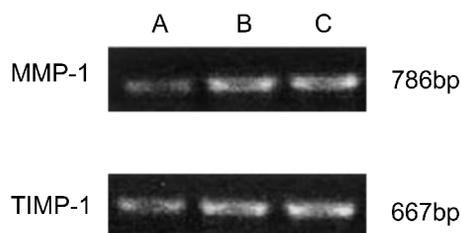


图2 雌鼠泪腺中 MMP-1 和 TIMP-1 mRNA 的表达。

表2 雌鼠泪腺中 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白的表达 $\bar{x} \pm s$

分组	MMP-1	TIMP-1
A 组	0.25±0.09	0.26±0.12
B 组	0.52±0.07 ^a	0.51±0.09 ^a
C 组	0.69±0.23 ^{a,c}	0.79±0.09 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B 组。

表3 雌鼠泪腺中 MMP-1 和 TIMP-1 mRNA 的表达 $\bar{x} \pm s$

分组	MMP-1	TIMP-1
A 组	0.36±0.07	0.37±0.05
B 组	0.59±0.09 ^a	0.57±0.06 ^a
C 组	0.76±0.15 ^{a,c}	0.76±0.13 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B 组。

3 讨论

干眼的发病机制比较复杂,老年女性的内分泌变化是干眼发生的重要因素。然而是由于性激素的过剩还是不足,和/或雌、雄激素之间的不平衡影响发病尚存在争议。已证实女性在性成熟前卵巢功能丧失(如卵巢因病切除),表现出一定程度的眼表损害和干眼症状明显重于对照组^[3]。Mathers 等^[4]发现绝经前妇女,血清睾酮水平与泪液量呈负相关,而雌激素水平与之呈正相关;在绝经后的妇女,这种关系相反,即高睾酮水平与泪液量增加相关,高雌激素水平与泪液量减少相关。亦有研究表明,雌激素在一定程度上能影响泪腺功能,其机制尚不清楚,Wickham 等^[5]已检测到在泪腺及睑板腺中存在雌激素受体,推理雌激素通过其受体对它们的功能产生影响。Suzuki 等^[6]报道应用 17 β -雌二醇 6h 和/或 24h 后,即可观察到人角膜上皮细胞中促炎细胞因子和基质金属蛋白酶(MMPs)表达增加,提示雌激素可能在干眼的眼表炎症中起作用。

有研究表明,MMPs 与干眼症有非常密切的关系^[7,8],在 NRTN 基因完全缺失的小鼠模型中,其角膜上皮及泪液中 MMPs 的质量浓度明显高于含 NRTN 基因的小鼠。已证实性激素在许多细胞中调节 MMPs,干燥综合征(Sjoren

syndrome, SS) 患者泪液和唾液中 MMPs 均增加^[9,10],泪腺炎症诱导的兔干眼模型泪腺和角膜中 MMPs 同样升高^[9,11],推测 MMPs 可能是干眼发病的密切因素。MMPs 的表达受蛋白因子、性激素、神经激素、细胞间相互作用和细胞转化等多种因素的调节。MMPs 家族均是锌和钙依赖的酶,目前发现有 20 多种亚型,但其结构及作用机制相似,他们既参与组织重建,又可引起细胞外基质功能紊乱或崩解。其中分布于眼部的 MMPs 家族成员主要有 4 种,包括间质胶原酶(MMP-1)、明胶酶 A(MMP-2)、间质溶解素(MMP-3)与明胶酶 B(MMP-9)。MMPs 可降解几乎全部细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分并能激活其他 MMPs,形成瀑布效应。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制物,可在转录水平上调节 MMPs 表达,通过其氨基末端决定簇与 MMPs 以 1:1 的比例形成 MMP-TIMP 复合体,从而阻断 MMPs 与底物结合。在机体内,活化的 MMPs 与 TIMPs 间保持动态平衡,平衡的打破将导致组织细胞的 ECM 的沉积与降解,并影响细胞的移行、黏附和浸润^[12]。MMP-1 属于胶原酶亚族,是第一个被定性的基质金属蛋白酶,可切割 I, II, III, VIII, X 型胶原及明胶、可聚蛋白多糖等,在 II 型胶原的降解中起着关键的作用^[13],而且其他许多 MMPs 亚型对 II 型胶原的降解均需要通过它起作用,被视为降解胶原的起始酶和限速酶。MMP-1 无胞内贮存,受刺激后由细胞临时合成释放,故在正常休眠组织中 MMP-1 表达量极少,一般难以检测,但在病理情况下如创伤愈合、修复或重塑过程中, MMP-1 表达量增加^[14]。MMP-1 主要表达于成纤维细胞、角质细胞、内皮细胞、单核巨噬细胞、成骨细胞和软骨细胞, Gatton 等^[15]研究发现,人睫状肌、虹膜、巩膜、角膜内皮细胞和睫状体非色素上皮细胞均有 MMP-1 的表达。MMP-1 和 TIMP-1 在维护 ECM 稳态及其代谢过程起着极其重要的作用。

本研究采用 Western-blot 方法检测雌激素作用下 MMP-1 蛋白在去卵巢雌鼠泪腺中含量的变化,同时检测了其抑制剂 TIMP-1 蛋白的变化。并且为了解 MMP-1 和 TIMP-1 在转录水平的调控,应用 RT-PCR 技术检测 MMP-1 mRNA 和 TIMP-1 mRNA 水平。两种实验方法的结果均显示:去卵巢雌鼠泪腺中 MMP-1 和 TIMP-1 表达较正常组增加;雌激素干预 6wk 后泪腺中 MMP-1 和 TIMP-1 表达较去卵巢雌鼠组也有显著增加。这些结果显示卵巢摘除后 MMP-1 和 TIMP-1 总的趋势是上调,而且雌激素的单独使用可更显著上调去卵巢雌鼠泪腺中 MMP-2 与 TIMP-2 的表达。同时,去卵巢雌鼠泪腺中 S I t 表达术后较术前下降 50%;雌激素治疗组给药 6wk 后泪腺中 S I t 表达较给药前显著缩短。分析机制可能是:由于雌鼠去势后单纯增加雌激素,或雌、雄激素的比例失调,可引起泪腺释放细胞因子和炎症介质,促进 MMPs 的合成与活化,从而导致 MMPs 及 TIMPs 表达增高,而雌激素通过上调 MMP-1 的表达导致泪腺萎缩,泪液分泌减少。但因本实验中未能研究雄激素对去势雌鼠干眼症的影响,故这一分析尚需要进一步实验的证实。基础研究已证实,雌激素在其它组织中也能促进 MMPs 的表达和活性,如肾小球系膜细胞^[16]、人色素上皮细胞^[17]、角膜上皮细胞^[6]。在不同的

SS 鼠模型中也是如此^[9,11], 因此我们认为 MMP-1 和 TIMP-1 可能也是本病的发病机制。TIMP-1 既能与酶原形式的 MMP-1 结合, 也能与活化的 MMP-1 结合使其失活, 从而在维持各种生理状态下 ECM 的沉积和降解的平衡中起关键作用。在本实验中发现 TIMP-1 随 MMP-1 的表达增高而增高, 两者有明显正相关性, 亦证实了这一点。但 MMP-1 和 TIMP-1 的蛋白水平与各自的 mRNA 水平未发现类似的相关性, 这种基因和蛋白的表达不一致说明, 在雌鼠去势模拟的绝经模型中, 雌激素的干预尽管可以促进两种因子 mRNA 的表达上调, 但可能还有其他因素参与影响 MMP-1 和 TIMPs 蛋白的翻译过程, 从而干扰了免疫炎症反应和组织修复。

综上所述, 在绝经期, MMP-1 和 TIMP-1 可能参与了干眼症的发病, 而雌激素能加重泪腺萎缩, 泪液分泌减少, 建议临床医生使用雌激素治疗绝经后干眼症时应该慎重。

参考文献

- 1 Bjerrum KB. Keratoconjunctivitis sicca and primary Sjögren's syndrome in a Danish population aged 30-60 years. *Acta Ophthalmol Scand* 1997; 75 (3) :281-286
- 2 Fujihara T, Murakami T, Fujita H, et al. Improvement of corneal barrier function by the P2Y2 agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ;42(1) :96-100
- 3 Smith JA, Vitale S, Reed GF, et al. Dry eye signs and symptoms in women with premature ovarian failure. *Arch Ophthalmol* 2004;122:151-156
- 4 Mathers WD, Stovall D, Lane JA, et al. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. *Cornea* 1998;17(4) :353-358
- 5 Wickham LA, Gao J, Toda I, et al. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78:146-153
- 6 Suzuki T, Sullivan DA. Estrogen stimulation of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinase gene expression in human corneal

epithelial cells. *Cornea* 2005;24(8) :1004-1009

- 7 Song XJ, Li DQ, Farley W, et al. Neurturin-deficient mice develop dry eye and keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44 (10) :4223-4229
- 8 宋秀君, 张晓融, 卞小云, 等. 高渗透压对人角膜上皮细胞 MMP-9 的上调作用. *眼科研究* 2004;12(6) :611-613
- 9 Kontinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R, et al. Matrix metalloproteinase(MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol* 1998 ; 17 (5) : 335-347
- 10 Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, et al. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 2002;85:147-153
- 11 Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, et al. Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(11) :5767-5771
- 12 Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) - 3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *Biol Chem* 1995;270(24) :14313-14318
- 13 Fernandes JC, Martel - Pelletier J, Lascau - Coman V, et al. Collagenase - 1 and collagenase - 3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* 1998;25(8) :1585-1594
- 14 Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(3) :207-214
- 15 Gatton DD, Sagara T, Lindsey JD, et al. Matrix metalloproteinase-1 localization in the normal human uveoscleral outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(2) :363-369
- 16 Potier M, Elliot SJ, Tack I, et al. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(2) :241-251
- 17 Marin-Castaño ME, Elliot SJ, Potier M, et al. Regulation of estrogen receptor and MMP-2 by estrogens in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1) :50-59