

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.30.004

基质金属蛋白酶-8 对角膜基质胶原的作用研究*

金鑫¹,刘素素¹,贺司宇¹,王丽娅¹,张芬芬²,代闫芳¹,杨柯¹,张晔瑞³,张红敏^{1△}

(1. 郑州大学人民医院眼科/河南省眼科研究所/河南省立眼科医院,郑州 450000;2. 锦州医科大学眼科学硕士研究生,辽宁锦州 121000;3. 新乡医学院眼科学硕士研究生,河南新乡 453000)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶-8(MMP-8)对角膜的作用。方法 选取健康 C57BL/6J 小鼠 15 只,右眼角膜基质内注射 10 μ L MMP-8 作为实验组,左眼给予等量生理盐水作为对照组。于 0、4、8 h 使用双光子显微镜二次谐波成像技术对活体小鼠角膜逐层扫描,Imaris 软件对所得图像三维重建,计算图像信号强度。4、8 h 在裂隙灯下评价角膜混浊度。8 h 角膜取材,测定各角膜羟脯氨酸水平。结果 0 h 实验组及对照组小鼠角膜基质纤维信号强度分别为 89.7 \pm 11.2、85.3 \pm 7.0,4 h 分别为 14.5 \pm 3.4、46.6 \pm 14.0,8 h 分别为 11.0 \pm 4.6、34.6 \pm 12.5,4 h 及 8 h,实验组较对照组角膜基质信号强度明显降低($P<0.05$);4 h 及 8 h,实验组较对照组角膜明显混浊($P<0.05$);8 h 测得实验组与对照组角膜羟脯氨酸水平分别为(0.433 \pm 0.090)、(0.590 \pm 0.133) μ g/mg,实验组明显低于对照组($F=7.193,P=0.014$)。结论 MMP-8 对小鼠角膜基质胶原有明显的降解破坏作用,导致角膜透明度下降。

[关键词] 角膜基质;基质金属蛋白酶-8;二次谐波成像**[中图分类号]** R392.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)30-4187-03

Effect of MMP-8 on cornea collagen*

Jin Xin¹, Liu Susu¹, He Siyu¹, Wang Liya¹, Zhang Fenfen², Dai Yanfang¹, Yang Ke¹, Zhang Zhirui³, Zhang Hongmin^{1△}

(1. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Zhengzhou University/Henan Provincial Eye Institute/Henan Provincial Eye Hospital, Zhengzhou, Henan, 450000, China; 2. Department of Ophthalmology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 3. Master Degree Candidate of Ophthalmology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of MMP-8 on cornea. **Methods** Fifteen C57BL/6J healthy mice were selected. The right eyes corneal stroma was injected by 10 μ L MMP-8 as the experimental group and the left eyes were injected by same amount of normal saline as the control group. At 0, 4, 8 h, the two-photon microscope second harmonic generation imaging technology was used to scan mice corneal stroma layer by layer in vivo. The obtained images were performed the 3D reconstruction by Imaris software and the signal intensity of the images were calculated. At 4, 8 h, the corneal opacity degree was evaluated under slit lamp. At 8 h, mice were killed and corneas were collected to determine the hydroxyproline concentration. **Results** The cornea stromal fiber signal strengthes at 0 h in the experimental group and control group were (89.7 \pm 11.2) and (85.3 \pm 7.0), which at 4 h were (14.5 \pm 3.4) and (46.6 \pm 14.0) respectively, which at 8 h were (11.0 \pm 4.6) and (34.6 \pm 12.5) respectively. The cornea stromal signal strength at 4, 8 h in the experiential group was significantly decreased compared with that in the control group ($P<0.05$); the cornea at 4, 8 h in the experimental group was significantly turbid than that in the control group ($P<0.05$); the cornea hydroxyproline concentrations detected at 8h in the experiential group and control group were (0.433 \pm 0.090) μ g/mg and (0.590 \pm 0.133) μ g/mg respectively, the experimental group was significantly lower than the control group ($F=7.193,P=0.014$). **Conclusion** MMP-8 has obvious degradation and destroy effect on mice corneal stroma collagen, which leads to the decrease of corneal opacity.

[Key words] corneal matrix; matrix metalloproteinases-8; second harmonic generation

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)是一种严重的致盲性眼病,近年来发病率逐渐升高^[1]。国内外学者研究发现,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-8 在 FK 表达升高^[2]。MMP-8 属于 MMPs 中胶原酶的一种,可降解 I、II、III 型胶原。目前研究认为 MMP-2 和 MMP-9 在角膜基质重塑及胶原降解中有重要作用^[3],而 MMP-8 对角膜的作用及作用机制尚少见研究报道。二次谐波(second harmonic generation, SHG)成像是近年发展起来的一种层面扫描解析组织结构的光学成像技术,具有非线性光学成像特有的三维高分辨率和高成像深度,在生物医学领域先后应用于角膜、活细胞成像等研究方向^[4]。本实验通过建立小鼠角膜 MMP-8 基质注射模型,使用 SHG 实时活体观察胶原纤维信号强度等,探讨 MMP-8

对小鼠角膜胶原的作用。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 实验动物 8~12 周龄无特殊病原体(SPF)级雄性 C57BL/6J 小鼠 15 只,体质量 20~25 g,购自南京大学模式动物研究所,经裂隙灯检查无眼科疾病。实验小鼠在温度为(25 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度为 59%~61%、12 h 光照/12 h 黑暗的 SPF 级动物房内饲养,由专人管理。动物的饲养与使用遵照相关的实验动物伦理要求。

1.1.2 主要试剂及仪器 重组鼠 MMP-8(rmMMP-8,美国 R&D 公司)、MMP-8 检测试剂盒(美国 AnaSpec 公司)、羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所)、4-乙酸汞基苯胺

(AMPA, 美国 Sigma 公司)、酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)、裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司)、手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司)、体视显微镜(德国 Zeiss 公司)、双光子激光扫描显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MMP-8 活性鉴定 用 Assay Buffer 配制 50 μL 1 ng/ μL MMP-8(含 1 mmol/L AMPA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 活化后加入酶板, 同时加入 50 μL MMP-8 底物; 另设 50 μL Assay 缓冲液加入 50 μL MMP-8 底物作为单纯底物孔, 各重复 3 个复孔, 室温孵育 30 min。设置激发光波长 340 nm, 发射光波长 490 nm, 酶标仪测吸光度(A)值。

1.2.2 角膜基质注射动物模型建立及分组 右眼作为实验组, 用 Assay 缓冲液配置 20 ng/ μL MMP-8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 活化, 角膜基质注射方法参考文献[5]。实验小鼠按 0.017 mL/g 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉。手术显微镜下, 术者左手轻按小鼠结膜囊以暴露眼球, 右手持微量注射器, 角膜缘内 1 mm 处进针, 进入角膜中基质层后缓慢注射约 10 μL MMP-8。左眼作为对照组按上述方法注射等量生理盐水。

1.2.3 角膜混浊度临床评分 基质注射前(0 h)及注射后 4、8 h 在裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜混浊度, 评分系统如下[6]: 角膜完全透明, 虹膜纹理清晰可见, 计 0 分; 角膜轻度混浊, 可见 75% 及以上虹膜纹理, 计 1 分; 角膜基质中度混浊, 可见 50%~<75% 虹膜, 计 2 分; 角膜基质重度混浊, 仅可见 50% 以下虹膜, 计 3 分; 角膜基质完全混浊, 不可见前房、虹膜及瞳孔, 计 4 分。

1.2.4 SHG 观察角膜基质信号强度 将小鼠麻醉平稳后放在特殊制作的固定头位的平台上, 暴露待测角膜, 根据参考文献[6]设置发射波长 780 nm, 20 倍水浸物镜观察, 使用 Z-stack ($Z=5 \mu\text{m}$) 逐层扫描, 于 0、4、8 h 采集图像, 获得的图像用 Imaris 软件进行三维重建, 计算图像的平均信号强度。图像信号强度越强即说明角膜基质胶原纤维排布越规则, 角膜基质结构完整, 图像信号越弱即说明角膜基质胶原纤维结构紊乱或被降解[7]。

1.2.5 羟脯氨酸试剂盒检测角膜羟脯氨酸水平 羟脯氨酸为胶原水解产物, 测定羟脯氨酸可反映角膜中胶原的水平, 操作参考文献[8]及试剂盒说明书进行, 方法如下: 8 h 后经腹腔麻醉小鼠, 脱颈椎法处死, 体视显微镜下进行角膜取材, 测质量(mg)。将角膜放入 EP 管中剪碎, 加入 100 μL 水解液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min, 调节 pH 在 6.0~6.8, 加入 1 mL 蒸馏水及少量活性碳, 混匀离心, 取 100 μL 上清液。配置 100 μL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 羟脯氨酸标准品。取 100 μL 蒸馏水作为空白对照。向空白管、标准品及各样品中分别加入 100 μL 56 mmol/L Chlormine T 试剂, 室温孵育 25 min, 取 100 μL 上清液, 加入 100 μL 1 mol/L Ehrlich's 液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 冷却后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μL 加入 96 孔板, 各设 2 个复孔, 于波长 550 nm 测定 A 值。按照公式: (测定 A 值-空白 A 值)/(标准 A 值-空白 A 值) \times 标准品浓度 \times 水解液总体积(0.1 mL)/角膜湿重(mg), 计算样品中的羟脯氨酸水平($\mu\text{g}/\text{mg}$)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。角膜混浊度比较采用两独立样本资料比较的 Wilcoxon 秩和检验。SHG 检测基质信号强度组间比较采用重复测量方差分析。角膜羟脯氨酸浓度检测组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-8 活性鉴定 MMP-8 平均 A 值(A_{490})为 206.3 \pm 13.9, 单纯底物孔为 34.0 \pm 6.6。

2.2 角膜混浊度临床评分的比较 于 0、4、8 h 使用体视显微镜对角膜拍照(图 1)。4 h 混浊度为 0 分的角膜在实验组为 0 只, 对照组为 11 只, 混浊度为 1 分在实验组为 12 只, 对照组为 4 只, 混浊度为 2 分在实验组为 3 只, 对照组为 0 只; 8 h 混浊度为 0 分的角膜在实验组为 0 只, 对照组为 13 只, 混浊度为 1 分在实验组为 4 只, 对照组为 2 只, 混浊度为 2 分在实验组为 11 只, 对照组为 0 只。使用 Wilcoxon 秩和检验统计结果, 4 h 及 8 h 实验组与对照组角膜混浊度比较, 差异有统计学意义(均 $P=0.000$)。

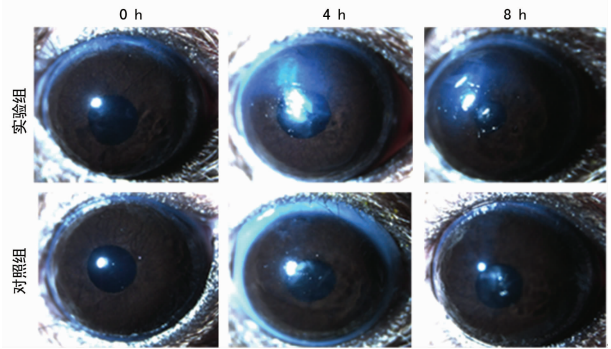


图 1 体视显微镜下小鼠角膜($\times 16$)

2.3 SHG 观察基质信号强度 0 h 实验组与对照组角膜基质信号强度分别为 89.7 \pm 11.2、85.3 \pm 7.0; 4 h 实验组与对照组分别为 14.5 \pm 3.4、46.6 \pm 14.0; 8 h 实验组与对照组分别为 11.0 \pm 4.6、34.6 \pm 12.5。重复测量方差分析统计结果, 根据 Mauchly 球形检验, 所得数据不符合球形假设($P<0.05$), 故对数据进行多变量方差分析, 各个时间点的数据差异有统计学意义($P<0.01$)。各组内不同时间点角膜基质信号强度比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 实验组和对照组 0 h 间比较, 差异无统计学意义($P=0.75$); 实验组和对照组间 4 h 及 8 h 比较, 差异有统计学意义($P=0.000$), 实验组角膜基质纤维信号强度较对照组明显降低。

2.4 角膜羟脯氨酸水平测定 8 h 角膜取材, 实验组与对照组角膜羟脯氨酸水平分别为(0.433 \pm 0.090)、(0.590 \pm 0.133) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 使用单因素方差分析统计数据, 经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布($P>0.05$), 组间方差经 Levene 检验证实方差齐, 实验组角膜羟脯氨酸水平明显低于对照组($F=7.193$, $P=0.014$)。

3 讨论

FK 是全球范围内一种严重的致盲性眼病, 由于共聚焦显微镜等早期诊断及抗真菌滴眼剂的早期应用, 已部分降低真菌性眼内炎的发生率, 从而避免眼内容物剜除。然而临床上 FK 患者由于基质破坏在晚期往往形成瘢痕愈合, 若瘢痕位于瞳孔区, 甚至致盲[1]。由于角膜供体紧缺, 虽然人工角膜及各种角膜替代材料正在研究中, 目前仍有相当一部分患者不能够进行角膜移植, 且术后为预防角膜排异反应需长期应用抗排斥滴眼剂, 影响患者的生活质量, 所以如何防止瘢痕形成已成为近年来 FK 研究的重要方向。

FK 大致发病过程如下, 角膜受外伤后, 上皮细胞屏障受损, 导致基底膜暴露, 致病真菌黏附于受损的角膜上皮, 引起机体天然免疫和适应性免疫反应。一方面, 真菌的病原相关分子结构与宿主角膜上皮细胞的 Toll 样受体(TLRs)相互作用, 引起角膜上皮细胞分泌白细胞介素(IL)-8 等诱导中性粒细胞浸润; 另一方面, 真菌表面的 β -葡聚糖与角膜居留巨噬细胞表面的 Dectin-1 结合, 导致酪氨酸激酶(Syk)磷酸化、核因子(NF)- κB 转移至核内, NF- κB 进入核内进一步引起肿瘤坏死因子

(TNF)- α 、IL-1 β 、IL-8 表达,扩大炎症反应,免疫细胞(主要是中性粒细胞^[9])释放水解酶,在杀灭真菌的同时对角膜造成破坏^[10]。

MMPs 分 5 个亚组,胶原酶、明胶酶、基质水解酶、膜型金属蛋白酶及广泛底物酶。其中,MMP-8 属于胶原酶的一种,又名中性粒细胞胶原酶。正常状态下,MMP-8 以酶原的形式存在,然而病理状态下,如角膜溃疡^[11]、人工角膜移植术后^[10],MMP-8 表达迅速升高,当 MMPs 与基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)失衡,可导致角膜基质降解。

本研究通过建立 MMP-8 高表达模型,以 SHG 成像技术活体实时观察角膜基质胶原纤维及混浊度变化,并通过角膜羟脯氨酸的测定,定量观察角膜胶原水平,阐明了 MMP-8 可直接降解角膜 I 型胶原,从而造成基质破坏,导致角膜混浊。随着 MMPs/TIMPs 在角膜疾病研究的不断深入,现已研制多种天然及人工合成 TIMPs,在角膜炎症早期使用 TIMPs 滴眼剂可为角膜瘢痕的治疗提供新策略。本研究为 TIMPs 滴眼剂应用于 MMP-8 高表达的角膜病以减轻角膜瘢痕提供新思路。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Leal SM, Pearlman E. The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis-Insights from human disease and animal models [J]. *Cytokine*, 2012, 58(1): 107-111.
- [3] Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, et al. Proteinases of the cornea and precorneal tear film[J]. *Vet Ophthalmol*, 2007, 10(4): 199-206.
- [4] 王艳艳, 韩蒙, 孙辉, 等. 用二次谐波成像技术研究经飞秒激光切削后角膜变化[J]. *激光生物学报*, 2005, 14(5):

321-326.

- [5] Sonoda Y, Streilein JW. Orthotopic corneal transplantation in mice—evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply[J]. *Transplantation*, 1992, 54(4): 694-704.
- [6] Ghazaryan A, Tsai HF, Hayrapetyan G, et al. Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy[J]. *J Biomed Opt*, 2013, 18(3): 31105.
- [7] Siddiqi NJ, Alhomida AS. Hydroxyproline concentrations in ocular tissues of Arabian camel (*Camelus dromedarius* Linn.) [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2003, 40(6): 451-454.
- [8] 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.
- [9] Lee H, Overall CM, McCulloch CA, et al. A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(11): 4812-4826.
- [10] Robert MC, Arafat SN, Spurr-Michaud S, et al. Tear Matrix Metalloproteinases and Myeloperoxidase Levels in Patients With Boston Keratoprosthesis Type I [J]. *Cornea*, 2016, 35(7): 1008-1014.
- [11] Sakimoto T, Ohnishi T, Ishimori A. Simultaneous study of matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and soluble cytokine receptors in the tears of noninfectious corneal ulcer patients[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(9): 1451-1456.

(收稿日期: 2017-01-18 修回日期: 2017-04-06)

(上接第 4186 页)

- [2] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity[J]. *Science*, 2007, 316(5826): 889-894.
- [3] Guo JJ, Ren W, Li AM, et al. Fat mass and Obesity-Associated gene enhances oxidative stress and lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(4): 1004-1009.
- [4] 祝红梅. FoxO1 在氧化应激诱导糖异生/胰岛素抵抗机制中的作用[D]. 泸州: 西南医科大学, 2011.
- [5] Pitman RT, Fong JT, Billman P, et al. Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a Cell-Type specific manner[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38444.
- [6] 张洁蕾. FTO 与 FoxO1 在非酒精性脂肪肝中的表达及其意义[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [7] Forbes S, Taylor-Robinson SD, Patel N, et al. Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(3): 641-647.
- [8] 刘慧. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群变化与胰岛素

抵抗及血清 LPS、TNF- α 、IL-6 的相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.

- [9] 陈青云, 吴耀生, 洗苏, 等. 肥胖与血脂、血压、脂肪肝等因素关系的 Logistic 回归分析[J]. *广西医学*, 2002, 24(1): 1-4.
- [10] Bravard A, Lefai E, Meugnier E, et al. FTO is increased in muscle during type 2 diabetes, and its overexpression in myotubes alters insulin signaling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 258-268.
- [11] 吴雪, 郑丽丽. 肥胖基因 FTO 对非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. *河南医学研究*, 2015, 24(7): 64-66.
- [12] Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1355-1362.
- [13] Matsumoto M, Han S, Kitamura T, et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(9): 2464-2472.

(收稿日期: 2017-01-30 修回日期: 2017-04-18)