

缝线诱导大鼠角膜血管新生过程中环氧酶2和基质金属蛋白酶2的表达*

张 静, 陆晓和, 张 妍, 李 祥, 钟彦彦, 张海峰

Expressions of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in suture-induced corneal neovascularization in rats

Zhang Jing, Lu Xiao-he, Zhang Yan, Li Xiang, Zhong Yan-yan, Zhang Hai-feng

Abstract

Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 515282, Guangdong Province, China

Zhang Jing★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 515282, Guangdong Province, China zhangjing20072007@126.com

Correspondence to: Lu Xiao-he, Doctor, Doctoral supervisor, Chief physician, Professor, Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 515282, Guangdong Province, China ykdzjh@sina.com

Received: 2010-01-03
Accepted: 2010-03-17

南方医科大学珠江医院眼科, 广东省广州市 515282

张 静★, 女, 1982 年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事角膜病的基础与临床研究。zhangjing20072007@126.com

通讯作者: 陆晓和, 博士, 博士生导师, 主任医师, 教授, 南方医科大学珠江医院眼科, 广东省广州市 515282 ykdzjh@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)15-02714-04

收稿日期: 2010-01-03
修回日期: 2010-03-17 (2010103005/N - Z)

BACKGROUND: Studies has demonstrated that cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may play an important role in corneal neovascularization (CNV), but their mechanisms and interactions remain unclear.

OBJECTIVE: To investigate the expressions of COX-2 and MMP-2 in suture-induced CNV, and to analyze the interaction between COX-2 and MMP-2, additionally, to explore the mechanisms of CNV.

METHODS: The models of CNV were induced by corneal stitch. The development of CNV was monitored daily under slit-lamp microscope. The expressions of COX-2 and MMP-2 and levels of COX-2 and MMP-2 mRNA in CNV were detected by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at days 1, 4, 7, 14 and 21 after operation, and their correlations were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: New vessels appeared near corneal limbus and grew towards into transparent cornea at 3-4 days after stitching. The stitch sites were edematous. The neovascular thrived and edema increased at 7 days. The neovascular reached to stitch sites at 14 days, and then vascular net formed. Then vessels gradually became thinner at 21 days. Immunohistochemistry and RT-PCR demonstrated: the positive expressions of COX-2 and MMP-2 in CNV localized in inflammatory cells and endothelial cells of neovascularization progressed gradually after stitching, and involved the entire cornea at the 7 day post-treatment. After 7 days the expression decreased following the decrease of inflammatory cells. The expression of COX-2 was correlative with MMP-2 positively ($r=0.981$, $P < 0.05$). All results demonstrated that in inflammation-associated corneal angiogenesis, expression of COX-2 and MMP-2 progressed and closely related to the angiogenesis.

Zhang J, Lu XH, Zhang Y, Li X, Zhong YY, Zhang HF. Expressions of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in suture-induced corneal neovascularization in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(15): 2714-2717. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究表明环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 在角膜新生血管的发生中起重要作用, 但其具体机制及相互关系仍不明确。
目的: 观察环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 在缝线诱导的大鼠角膜新生血管中的表达, 并分析其相关性, 探讨角膜新生血管形成的有关机制。

方法: 采用缝线法建立 SD 大鼠角膜新生血管模型, 术后每日裂隙灯观察角膜新生血管的生长情况, 并于 1, 4, 7, 14, 21 d 取材, 行免疫组化及 RT-PCR 检测环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 蛋白的分布及二者 mRNA 的相对表达量, 并进行相关性分析。

结果与结论: 角膜缝线后三四天可见明显从角膜缘伸入角膜的毛刷状小血管, 垂直角膜缘切线方向, 角膜缝线处水肿; 7 d 角膜新生血管生长旺盛, 角膜水肿继续加重, 14 d 新生血管延伸到或超过缝线位置, 分支密集并互相吻合形成袢状血管; 21 d 角膜新生血管变细。免疫组化及 RT-PCR 显示环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 于缝线后表达逐渐增加, 7 d 达高峰, 以后随炎症细胞的减少而减弱, 主要分布于炎症细胞胞质及新生血管内皮细胞, 两种因子的表达在角膜新生血管中具有正相关性($r=0.981$, $P < 0.05$)。证实炎症相关的角膜新生血管中环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 的表达增加, 并且与新生血管的发生、发展密切相关。

关键词: 角膜新生血管; 环氧酶 2; 基质金属蛋白酶 2; 眼科组织工程; 大鼠
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.15.013

张静, 陆晓和, 张妍, 李祥, 钟彦彦, 张海峰. 缝线诱导大鼠角膜血管新生过程中环氧酶 2 和基质金属蛋白酶 2 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15):2714-2717. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

角膜新生血管形成是一个复杂的病理过程, 目前认为白细胞介素、细胞黏附分子、环氧酶、基质金属蛋白酶、血管生成素、各种生长因子等多种因素参与了角膜新生血管的形成和演进^[1]。缝线诱导的角膜新生血管发生主要机制是炎症反应, 在炎症递质诱导新生血管的过程中环氧酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)

起关键作用^[2]。COX-2是前列腺素合成过程中的重要限速酶, 在大多数正常组织中检测不到, 而在细胞因子、生长因子、癌基因及促肿瘤剂等多种刺激下表达上调, 参与炎症反应、细胞增殖及分化过程^[3]。近年来研究发现COX-2在肿瘤新生血管形成中起重要作用^[4]。而在角膜角膜新生血管中, Kenyon等^[5]研究显示诱导酶COX-2在角膜新生血管组织中大量表达。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一族能降解细胞外基质成分和基底膜

的含锌蛋白酶^[6], 通常以酶原的形式存在, 激活后能酶解蛋白, 破坏局部组织结构、诱导新生血管形成, 其中MMP-2被认为与角膜新生血管的形成有密切关系^[7]。实验发现COX-2、MMP-2表达水平在角膜新生血管中明显升高, 本文应用免疫组化及RT-PCR检测COX-2、MMP-2在角膜新生血管中的分布及表达, 探讨其在角膜新生血管形成中的作用及二者间的相互关系, 进一步研究角膜新生血管的发生机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008-04/10在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 选用SPF级SD大鼠(雌雄兼备)37只, 体质量170~220 g, 由南方医科大学实验动物中心提供(许可证号: SCXK粤2008-0002)。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求^[8]。

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体, 免疫组化试剂盒	武汉博士德公司
抗大鼠 COX-2 单克隆抗体	美国 SANTA 公司
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (Cat. No. #K1622)
ABI (Cat.No. 4369016) Primer	invitrogen
手术显微镜	美国 Leica-M841
显微手术器械	苏州明仁医疗器械厂
10/0 带铲针尼龙线, 裂隙灯显微镜	德国 ZEISS

方法:

实验分组: 将37只SD大鼠适应性喂养1周后开始实验, 按随机数字法分为空白对照组3只和模型组34只。空白对照组不做任何处理, 模型组随机选取6眼用于角膜新生血管生长的动态观察, 其余用于标本取材。

大鼠角膜新生血管模型的建立: 大鼠术前禁食, 腹腔注射3.5~4.0 mL水合氯醛溶液(100 g/L), 双眼均为术眼, 盐酸丁卡因和复方托吡卡胺滴眼液术前点眼各3次, 进行表面麻醉和散瞳。术前常规消毒, 庆大霉素生理盐水冲洗结膜囊。常规无菌操作。在手术显微镜下用10-0带铲针尼龙线距角膜缘约2 mm穿过角膜基质层等间距间断缝合3针(11点、12点、1点3个钟点位置), 跨度约2 mm, 深达2/3角膜基质层, 缝线在角膜表面留线头约1 mm, 术毕, 球结膜下注射庆大霉素, 涂金霉素眼膏以防止感染。若有缝线脱落, 及时原位补缝^[9]。

术后用药及临床观察: 术后术眼每天给予氯霉素点眼, 3次/d, 共2周。自术后第1天起每天裂隙灯下观察术眼角膜新生血管生长情况。由于手术等原因造成感染、前

房出血、前房积脓、缝线局部水肿糜烂严重者、缝线脱落>2次者视为角膜新生血管失败模型, 不列为统计范围, 并及时补充实验动物。

取材及免疫组化切片制备: 术后1, 4, 7, 14, 21 d各随机取3只(6眼)大鼠, 麻醉后立即摘除眼球, 取完整角膜(带完整角膜缘), 沿角膜中心一分为二, 立即置于40 g/L多聚甲醛溶液固定、脱水, 常规石蜡包埋, 行病理检查。取第4, 7天标本做病理检查同时行免疫组织化学检测COX-2、MMP-2的表达。按即用型SABC试剂盒进行抗体标记, DAB显色, 最后用苏木精复染。以试剂盒中未染色的已知阳性对照片与被测标本同时染色作阳性对照, 阴性对照以PBS缓冲液取代一抗, 用DAB显色。两种标记物均以细胞膜呈棕黄色染色者为阳性细胞, 显微镜下观察COX-2、MMP-2在大鼠角膜的表达部位及强度并照相。

角膜组织中COX-2、MMP-2 mRNA表达检测: 分别取正常角膜及模型组1, 4, 7, 14, 21 d角膜, 用RT-PCR法检测植片中COX-2、MMP-2 mRNA的表达。用TRIzol提取总RNA。根据反转录聚合酶链反应试剂盒说明进行反转录-聚合酶链反应。特异引物对由广州杰特伟生物科技有限公司合成, 以GAPDH为内参照。

引物序列:

内参 GAPDH (110 bp):

上游引物: 5' CTC CCA TTC CTC CAC CTT TG 3',
下游引物: 3' CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG 5'。

COX-2 (146 bp):

上游引物: 5' GTG TGA GTG GTA GCC AGC AA 3',
下游引物: 3' CCC ACA GGA GGA TCT GAA AA 5'。

MMP-2 (146 bp):

上游引物: 5' GAA ACC GTG GAT GAT GCT TT 3',
下游引物: 3' CCA TCA AAC GGG TAT CCA TC 5'。

聚合酶链反应扩增: 采用标准的三步法, COX-2、MMP-2: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性45 s, 56 °C退火45 s, 72 °C延伸20 s, 共40个循环。反应在iQ5 (美国Bio-Rad)荧光定量PCR仪上进行, 72~95 °C缓慢升温, 产生GAPDH和COX-2、MMP-2溶解曲线。重复2次。

实时荧光定量PCR: 结果采用仪器自带的BioRad.iQ5软件进行分析, 观察扩增曲线和溶解曲线, 以GAPDH为内参基因, 对cDNA的含量进行相对定量分析, 计算样本待测基因与GAPDH表达差异倍数。

主要观察指标: 角膜新生血管生长情况及COX-2、MMP-2在正常角膜及角膜新生血管中的分布及相对表达量。

设计、实施、评估者: 设计为第一、二作者, 实施和评估为全部作者, 均经过正规培训, 实验过程未采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者用SPSS 13.0统计软件进

行数据分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各时间点COX-2、MMP-2表达量比较用单向方差分析; 两者相关性用Spearman相关分析检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 33只SD大鼠进入结果分析, 因缝线处局部感染、前房出血、脱线 >2 次者导致模型失败8眼, 排除在外, 余无脱失。

2.2 裂隙灯显微镜观察结果及角膜新生血管生长的动态观察 角膜缝线后1 d未见明显角膜新生血管, 缝线处角膜缘血管扩张充血, 角膜缝线处水肿隆起明显; 4 d可见明显从角膜缘伸向角膜生长的毛刷状小血管、角膜水肿范围扩大; 7 d新生血管密度均匀、垂直于角膜缘向缝线方向延伸、角膜水肿继续加重; 14 d新生血管延伸到达或超过缝线位置, 分支密集并互相吻合形成袢状血管网; 21 d新生血管逐渐萎缩变细呈线状。

2.3 病理组织学及免疫组化检测结果

病理组织学结果:

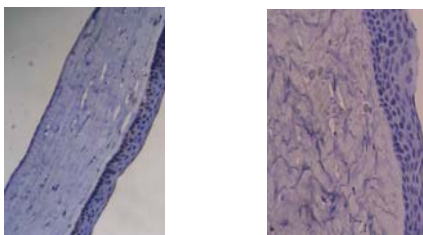
空白对照组:

角膜较薄, 角膜组织结构正常, 可见角膜上皮层、前弹力层(与基底细胞层紧贴)、基质层、后弹力层、内皮层排列整齐, 正常角膜透明无水肿、无混浊、无新生血管及淋巴细胞等炎性细胞浸润。

模型组:

术后1 d可见少量的炎性细胞浸润,
 术后4 d可见炎性细胞浸润增多(淋巴细胞、多形核白细胞、巨噬细胞、少数中性粒细胞), 少量新生血管形成, 位于上皮细胞层及前基质层。
 术后7 d角膜基质层可见大量的新生血管, 管腔大, 有浆细胞、淋巴细胞及成纤维细胞浸润, 炎症反应较重, 在角膜缘与缝线间的角膜基质层中可见大量的内皮细胞, 腔内充满红细胞。
 术后14 d可见基质层内有部分血管腔, 周围有成纤维细胞聚集。
 术后21 d血管腔塌陷, 基质层内胶原纤维也明显增多。

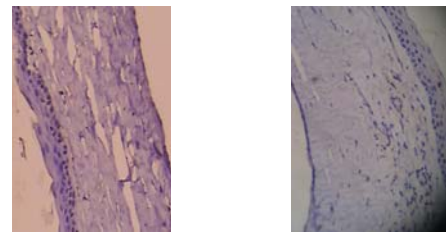
免疫组化检测结果: 正常SD大鼠角膜仅上皮层微弱表达COX-2, MMP-2几乎无表达, 见图1。



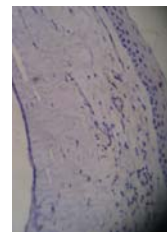
a: Cyclooxygenase-2 b: Matrix metalloproteinase-2

Figure 1 Immunohistochemical expressions of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in the normal cornea (SP, $\times 400$)
图 1 空白对照组正常角膜组织中 COX-2 和 MMP-2 免疫组织化学表达(SP, $\times 400$)

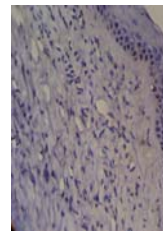
模型组缝线后4 d, COX-2、MMP-2在角膜上皮层、基质层炎性细胞中表达增强, 见图2a, b。缝线后7 d, 炎性细胞、新生血管内皮细胞均染色阳性, 表现为细胞浆或胞膜呈棕黄色粗大颗粒, 见图2c, d。7 d后表达减弱, COX-2、MMP-2的表达在缝线后开始升高, 7 d达高峰, 随后开始回落。COX-2和MMP-2在角膜新生血管中的含量均随天数增加逐渐增多, 且表达部位一致。



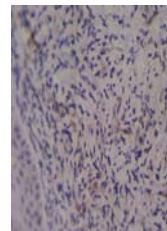
a: Cyclooxygenase-2 at 4 days after stitching



b: Matrix metalloproteinase-2 at 4 days after stitching



c: Cyclooxygenase-2 at 7 days after stitching



d: Matrix metalloproteinase-2 at 7 days after stitching

Figure 2 Immunohistochemical expressions of corneal cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 at 4 and 7 days after stitching (SP, $\times 400$)
图 2 模型组角膜缝线后第4, 7天角膜 COX-2 和 MMP-2 免疫组织化学表达(SP, $\times 400$)

2.4 COX-2、MMP-2 mRNA在模型组角膜中的表达 以模型组各时间点大鼠角膜目的基因与GAPDH基因循环数表达差异倍数代表COX-2、MMP-2 mRNA的相对表达量, Pearson相关检验显示, 模型组COX-2 mRNA表达与MMP-2 mRNA表达呈正相关($r=0.981$, $P < 0.05$)。见表1。COX-2及MMP-2在各样品中扩增后的溶解曲线见图3, 4。

表 1 角膜样本 COX-2、MMP-2 mRNA 在术后不同时间点的表达差异倍数

Table 1 Fold differential expressions of corneal cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA at different time points after operation ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Time (d)	COX-2 mRNA	MMP-2 mRNA
1	3.55±0.54	0.15±0.08
4	19.56±8.35	0.92±0.05
7	64.71±11.74	3.21±0.43
14	43.67±17.67	1.68±0.50
21	19.69±2.64	1.10±0.29

$r = 0.981, P < 0.05$

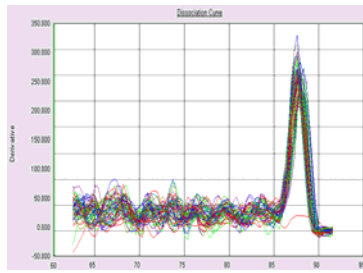


Figure 3 Melting curves of cyclooxygenase-2 mRNA in different corneal samples

图3 COX-2在各样品中扩增后的熔解曲线

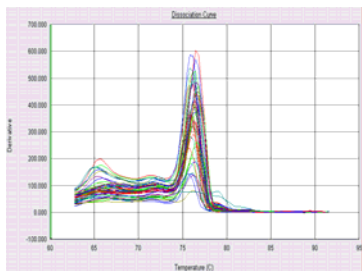


Figure 4 Melting curves of matrix metalloproteinase-2 mRNA in different corneal samples

图4 MMP-2在各样品中扩增后的熔解曲线

3 讨论

近来的研究表明COX-2促进角膜新生血管的可能机制:①可能与其催化花生四烯酸生成的前列腺素诱导组织生成血管内皮生长因子有关^[10]。②可能与其催化花生四烯酸生成的前列腺素产物诱导MMP-2的产生及活性增加有关,另外大肠癌、乳腺癌细胞转染COX-2也可增加MMP-2的活性^[11]。Amico等^[12]发现创伤后COX-2在角膜全层表达明显增加,尤其在上皮层占主要地位。本实验应用免疫组化方法及RT-PCR研究了COX-2在角膜新生血管模型中表达及分布,结果显示COX-2表达在缝线后第4天迅速提高,7 d达高峰,14 d已下降,第21天仍有表达,其表达主要分布在浸润的炎症细胞及新生血管的内皮细胞的胞质。

唐维强等^[13]研究显示MMP-2在新生血管角膜的酶谱中可区分出72 ku的MMP-2酶原和62 ku的活性酶,而在正常角膜主要以酶原形式存在,检测不到活性酶。MMP-2酶原在新生血管角膜的含量明显高于正常角膜。Kvanta等^[14]研究了炎症相关大鼠角膜新生血管模型MMP-2、MMP-9和血管内皮生长因子的作用,结果表明MMP-2表达增强并主要在炎性细胞浸润的新生血管形成区域表达。本实验发现,在正常角膜组织中MMP-2 mRNA微量表达,而在角膜新生血管中则有不同程度的过表达,随着新生血管的发生发展,MMP-2 mRNA水平呈现先增高后降低的趋势,其表达部位与趋势与

COX-2相一致。

在肿瘤MMP-2异常表达的调控因素中,COX-2对MMP-2表达的上调作用越来越受到人们的关注^[15]。Pan等^[16]通过COX-2抑制剂抑制COX-2转录直接抑制MMP-2基因转录和蛋白表达。在角膜新生血管中是否也这种联系呢?本实验结果显示:缝线后的角膜组织中,COX-2和MMP-2随炎症反应的加重逐渐上调表达,且两种蛋白的表达部位高度一致,主要在浸润的炎症细胞和新生血管内皮细胞的胞质,相关分析显示两者呈显著正相关。提示两者之间在角膜新生血管可能存在一定的协同关系,COX-2可能通过直接或间接的方式(如bcl-2、血管内皮生长因子、uPA等)上调MMP-2合成并与其相互协同促使角膜新生血管生成,但关于COX-2与MMP-2是如何相互协同促使角膜新生血管生成的具体机制有待进一步研究,同时为进一步探索应用选择性COX-2抑制剂防治角膜新生血管相关眼病提供了理论依据。

4 参考文献

- [1] Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol*. 2001;12(4):242-249.
- [2] Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, et al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2004;18(2):300-310.
- [3] Koki A, Khan NK, Woerner BM, et al. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol*. 2002;507(1):177-184.
- [4] Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;89(3):215-220.
- [5] Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, et al. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(8):1625-1632.
- [6] Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*. 1998;12(12):1075-1095.
- [7] Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in Matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990;8(4):121-125.
- [8] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [9] Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization. *Cornea*. 1998;17(4):403-409.
- [10] Zhang BX, Chen XP, Yu HP, et al. *Zhonghua Shiyan Waike Zazhi*. 2004;21(6):673-675. 张必翔,陈孝平,余红平,等. 环氧合酶-2和血管内皮生长因子共表达与肝细胞癌血管生成的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2004,21(6):673-675.
- [11] Dohadwala M, Batra RK, Luo J, et al. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2 dependent invasion. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50828-50833.
- [12] Amico C, Yakimov M, Catania MV, et al. Differential expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the cornea during wound healing. *Tissue Cell*. 2004;36(1):1-12.
- [13] Tang WQ, Liu L, Yanke Xin Jinzhan. 2006;26(9):671-673. 唐维强,柳林.缝线诱导大鼠角膜新生血管模型MMP-2活性检测[J]. *眼科新进展*, 2006,26(9):671-673.
- [14] Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2000;70(4):419-428.
- [15] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*. 2000;60(5):1306-1311.
- [16] Pan MR, Chuang LY, Hung WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett*. 2001;508(3):365-368.