

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.018.html>

白细胞介素-1 β 在类青光眼引流阀植入术后瘢痕化中的作用

张康玉 蒋正轩 刘超 夏洋 鲍颖超 陶黎明

摘要 目的 检测白细胞介素-1 β (IL-1 β) 在类青光眼引流阀植入术后瘢痕组织中的表达水平,明确其在瘢痕形成中的作用。方法 将30只新西兰大白兔随机分为硅胶组和新材料组,分别于球结膜下植入硅胶和聚-氯对二苯(Parylene C)涂层包裹的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA);于术后1、4、8周取球结膜至巩膜全层组织,采用苏木精-伊红(HE)染色检测组织中炎细胞浸润和成纤维细胞增生情况,于高倍镜下计数成纤维细胞;免疫组化检测IL-1 β 蛋白的表达及组织中的定位;Western blot法检测IL-1 β 蛋白表达水平;并统计分析IL-1 β 蛋白与成纤维细胞的相关系数。结果 HE染色显示:硅胶组炎细胞浸润、成纤维细胞增生数量明显高于新材料组;Western blot及免疫组化检测术后1、4及8周硅胶组的IL-1 β 蛋白的表达明显高于新材料组($P < 0.05$);免疫组化显示:IL-1 β 主要位于近巩膜面增生的成纤维细胞周围。相关性分析结果表明:4、8周组织中IL-1 β 的表达水平与成纤维细胞呈正相关性($P < 0.05$)。结论 IL-1 β 可能在青光眼引流阀植入术后的瘢痕化形成中起促进作用。

关键词 难治性青光眼;青光眼引流阀;白细胞介素-1 β ;硅胶;PMMA;Parylene C

中图分类号 R 775.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0912-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.018

青光眼是以视神经损伤及视功能损害为特征的一组疾病,是世界首位不可逆转的致盲性眼病。难治性青光眼是一组病情复杂、手术成功率相对较低、术后并发症较多的眼病。目前青光眼引流阀植入术是难治性青光眼主要手术方法,术后早期成功率约80%,远期成功只有约50%^[1]。而其手术失败的主要原因为术后引流阀周围较重炎症反应及成纤维细胞增生,导致引流阀纤维包裹,引流受阻,造成眼压再次升高。目前在成纤维细胞增生和瘢痕化形成中发现很多相关性标志物,主要集中在炎性细胞因子的研究,其中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)具有广泛的生物学性,被认为是最重要的炎性因子。

IL-1 β 是一种分泌型调节蛋白,由巨噬细胞、小胶质细胞及成纤维细胞等多种细胞分泌,是白介素-1的主要分泌形式,是一种重要的促炎因子,在炎症、自身免疫性疾病及体内组织损伤修复中发挥着重要的作用。该文通过将Parylene C涂层包裹的PMMA和硅胶两种不同引流阀材料植入新西兰大白兔球结膜下,预形成不同的瘢痕组织,比较在不同瘢痕化的组织中IL-1 β 蛋白的表达及其对成纤维细胞增生的影响。

2018-02-07 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2016A340); 2017年度高校优秀青年人才支持计划项目(编号: gxyqZD2017033); 安徽医科大学第二附属医院火花计划(编号: 2015hhy02)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

作者简介: 张康玉,女,硕士研究生;

陶黎明,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lmtao9@163.com

administration trimetazidine 5 mg/(kg·d)] for 6 weeks. At the end of the experiment, the left ventricular myocardium was removed and the malondialdehyde (MDA) was determined by thiobarbital method. The superoxide dismutase (SOD) was determined by xanthine oxidase method, and the pyruvate was determined by RT-PCR, then the pathomorphology and myocardial ultrastructure was observed. **Results** The activity of SOD was increased but the expression of MDA were decreased in the myocardium of tramadiazine group. The expression of pyruvate dehydrogenase (PDH) mRNA was up-regulated after treated with trimetazidine, which was higher than that in model group ($P < 0.05$). The degree of myocardial injury in tramadiazine group was lower than that in model group verified by light microscope and electron microscope detection ($P < 0.05$). **Conclusion** Tramadiazine can improve oxidative stress in cardiomyocytes of heart failure dogs. The mechanism may be related to the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) production, indirectly improving the expression of PDH mRNA, improving glucose oxidation, inhibiting lipid peroxidation, improving myocardial energy metabolism.

Key words trimetazidine; heart failure; malondialdehyde; superoxide dismutase; pyruvate dehydrogenase

1 材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 正常清洁成年新西兰大白兔 30 只(安徽医科大学动物实验中心提供),体重约 2.5 kg,雌雄不限。大白兔饲养于安徽医科大学动物实验中心,单个分笼喂养、自由饮水及进食,室温为 25℃左右,明暗各 12 h 周期性光照。

1.1.2 实验仪器 光学显微镜(上海医光仪器有限公司);Western blot 曝光机(上海 Tanon 公司);Western blot 电泳及转膜电源(美国 Bio-Rad 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);荧光正置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.1.3 实验试剂 Parylene C 涂层包裹的 PMMA(美国加州大学提供);硅胶(安徽医科大学第二附属医院提供);IL-1 β 一抗(北京 Bioss bs-20448R);GAPDH 一抗(美国 Proteintech 60004-Ig);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)二抗(ZB-2305)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(ZB-2301)、兔二步法试剂盒(PV-6001)(北京中杉金桥公司);Western blot 发光试剂(美国 Thermo 公司);组织蛋白提取试剂及 Western blot 配胶试剂(上海碧云天生物有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 实验动物分组、模型及处理 将 30 只新西兰大白兔采用随机数字表法将其分为硅胶组和新材料组,每组 15 只,任选一侧眼作为手术眼。所有动物术前 1 d 给予眼部及全身健康排查,均呼吸平稳,眼表清洁、无明显炎症及瘢痕等疾患,手术均在同一手术室,由同一个操作熟练的眼科医师操作。术前经耳缘静脉给予 3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 全身麻醉,5%盐酸丙美卡因滴眼液点眼结膜囊内行表面麻醉。麻醉满意后,常规消毒铺巾,缝线固定开睑,庆大霉素稀释液冲洗结膜囊,自上方角膜缘打开球结膜,充分分离球结膜与巩膜,球结膜下分别植入大小约 5 mm×5 mm 硅胶片和 Parylene C 涂层包裹的 PMMA 片,用 10~0 的丝线间断缝合,在球结膜囊涂适量妥布霉素地塞米松眼膏,术闭。术后 1、4、8 周各组取 5 只大白兔行过量麻醉后,取自球结膜至巩膜全层组织(去除缝线和植入物),生理盐水反复清洗组织后一半置于 10%多聚甲醛溶液中固定,一半组织置于液氮中,后保存于 -80℃冰箱中。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色法 将固定在 10%多聚甲醛溶液中的组织经梯度乙醇脱水,二甲

苯透明,石蜡包埋 5 μ m 厚切片,HE 染色,光学显微镜下观察组织形态、拍摄照片。高倍镜(400 \times)下计数成纤维细胞。

1.2.3 免疫组化 取 1.2.2 部分制备的石蜡切片,常规脱蜡、胰蛋白酶消化修复抗原, H₂O₂ 去离子水孵育消除内源性过氧化物酶活性,加 IL-1 β 一抗、生物素标记二抗、辣根过氧化物酶标记链霉素工作液, DAB 显色剂室温下显色 10 min,蒸馏水冲洗终止显色;脱水,透明,封片,光学显微镜下观察,以组织中出现棕黄色染色为阳性表达。任意选取各组石蜡切片各 5 张,光学显微镜(400 \times)下观察并拍照。用 JEOR 801D 形态学图像分析系统采集分析处理图像,测定平均吸光度值。

1.2.4 Western blot 将 -80℃冰箱中保存的组织,加 RIPA 和 PMSF 在液氮环境下研磨、裂解后,离心、收集上清液获得总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,4 倍体积加入(5 \times)上样缓冲液。每孔加入 30 μ g 蛋白样品在 SDS-PAGE 胶中分离,低温转印至 PVDF 膜,5%的脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次、每次 10 min,二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次、每次 10 min,加显影液曝光拍照保存。GAPDH 为内参。采用 Scion Image 软件分别分析获得 IL-1 β 及 GAPDH 灰度值,并计算 IL-1 β /GAPDH 灰度值比值为 IL-1 β 的相对表达量。

1.2.5 相关性分析 高倍镜下计数 HE 染色切片中的成纤维细胞数,分析统计同一组织相同的视野下免疫组化中 IL-1 β 的平均光密度,计算线性相关系数,推算 IL-1 β 与成纤维细胞的相关性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间数据比较采用独立样本的 t 检验;相关性分析采用 Pearson 直线相关性分析;检测水准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色 硅胶组、新材料组术后均有明显的炎细胞浸润和纤维细胞增生。1 周组织:硅胶组较新材料组有更多炎细胞浸润、新生血管和肉芽组织,且细胞核增大、深染、分裂象增多。4 周组织:两组的炎细胞均较 1 周时减轻,成纤维细胞增多。硅胶组较新材料组可见较多紊乱的成纤维细胞,巢状分布,胶原纤维密集、彼此交织,呈波浪状,伴有明显的炎细胞浸润。8 周组织:两组较 4 周组织中的炎细胞明显减轻,新材料组已无明显的炎细胞浸润,硅胶

组较新材料组仍有较多炎细胞,胶原纤维更为致密、排列更紊乱呈波纹状或年轮状。见图1。

2.2 免疫组化 两组术后组织中均有炎细胞 IL-1 β 的表达,细胞中见棕褐色阳性染色,主要分布胞质中,且集中在近巩膜面的增殖的成纤维细胞周围(4、8周表现明显)。1周组织:两组 IL-1 β 均明显增多,硅胶组较新材料组增加更显著($t = 2.565, P < 0.05$);4周组织:两组 IL-1 β 较1周均减少,但硅胶

组仍较新材料组多($t = 3.122, P < 0.05$);8周组织:两组 IL-1 β 较4周均再次减少,硅胶组仍比较多,而新材料组 IL-1 β 明显减少($t = 3.350, P < 0.01$)。见图2、3。

2.3 Western blot 两组术后 IL-1 β 的表达均增高,1周增高最显著,4周和8周 IL-1 β 的表达逐渐减少,各个时间段硅胶组的表达均高于新材料组,两组间差异有统计学意义:1周($t = 2.526, P < 0.05$),

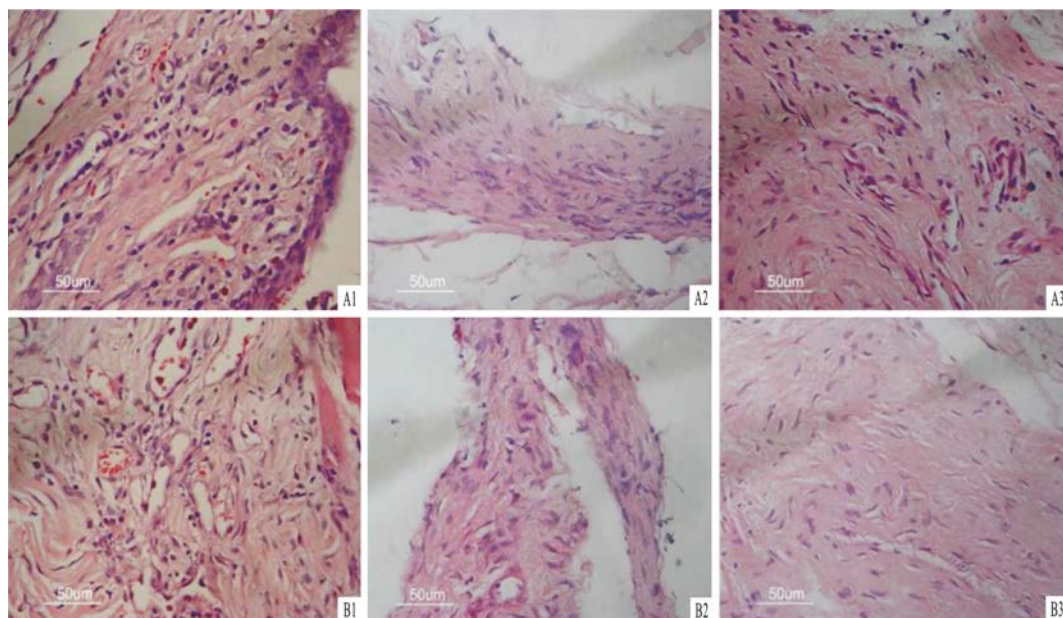


图1 两组不同时期中 HE 染色结果 $\times 400$

A: 硅胶组; B: 新材料组; 1: 1 周; 2: 4 周; 3: 8 周

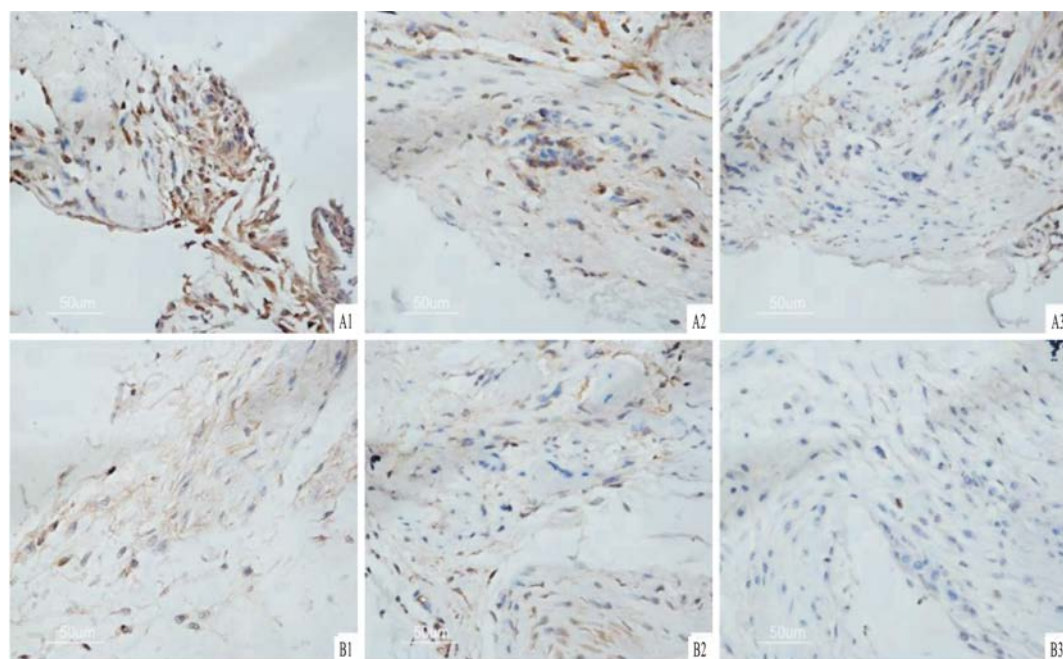


图2 两组不同时期 IL-1 β 免疫组化结果 $\times 400$

A: 硅胶组; B: 新材料组; 1: 1 周; 2: 4 周; 3: 8 周

表1 IL-1 β 的平均光密度与成纤维细胞数相关性分析结果($\bar{x} \pm s$)

项目	4 周		8 周	
	IL-1 β 的平均吸光度	成纤维细胞数	IL-1 β 的平均吸光度	成纤维细胞数
硅胶	0.420 6 \pm 0.092 6	155.600 0 \pm 6.503 9	0.323 4 \pm 0.060 7	126.200 0 \pm 8.983 3
新材料	0.265 6 \pm 0.006 1	133.600 0 \pm 17.285 8	0.215 4 \pm 0.038 8	99.400 0 \pm 12.074 8
r 值	0.705		0.851	
P 值	0.023		0.002	

4 周 ($t = 2.474$, $P < 0.05$), 8 周 ($t = 4.244$, $P < 0.01$)。见图 4、5。

平均光密度值与成纤维细胞数的相关系数 4 周: ($r = 0.705$, $P < 0.05$) 8 周: ($r = 0.851$, $P < 0.01$)。见表 1、图 6。

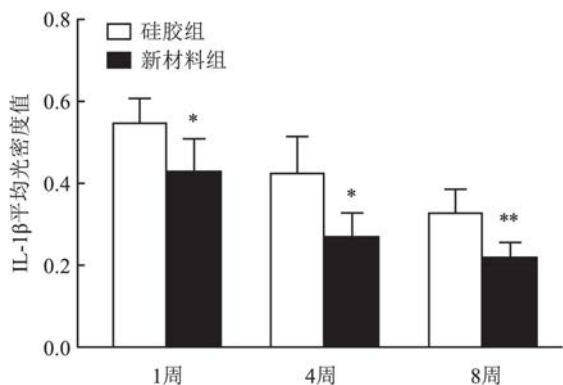


图3 统计分析比较两组不同时期 IL-1 β 的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)
与硅胶组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

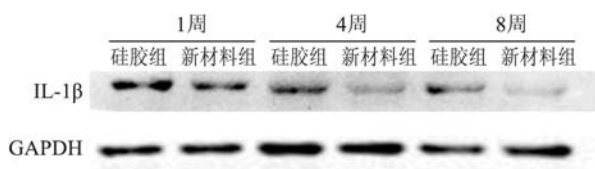


图4 两组不同时期 Western blot 检测 IL-1 β 表达结果

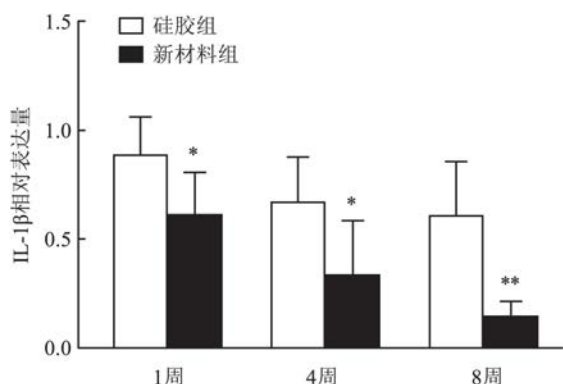


图5 统计分析比较两组不同时期 IL-1 β 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)
与硅胶组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 相关性分析 高倍镜(400 \times)下计数单位面积(150 $\mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$) HE 染色切片中的成纤维细胞数,分析统计同一组织相同的视野下免疫组化中 IL-1 β 的平均光密度值,计算 4 周和 8 周的 IL-1 β 的

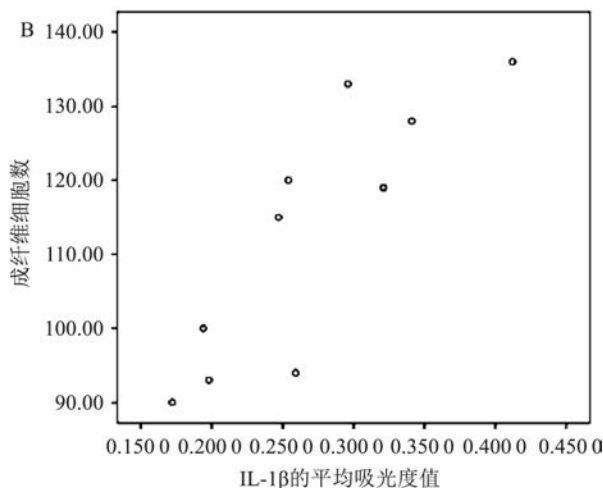
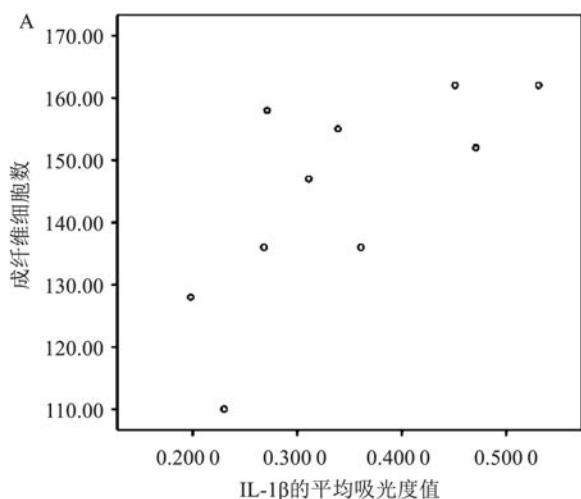


图6 两组 IL-1 β 的平均吸光度与成纤维细胞数散点图
A: 4 周; B: 8 周

3 讨论

青光眼是以视力降低、视野缺损及眼球疼痛为主要症状的一组疾病,眼内压升高是其主要的危险因素。青光眼具有高发病率(总人群发病率为 1%,45 岁以后为 2%^[2])、不可逆性视力损伤及难治性

(手术成功率约 70% ~ 90%^[3]) 等特征。特别是难治性青光眼, 目前青光眼引流阀的植入为主要治疗手段^[4-5], 引流阀作为异物植入人体后将引起免疫反应, 加剧炎症反应及瘢痕的形成, 手术后成功率较低, 治疗相当棘手。因此探讨炎症因子 IL-1 β 在青光眼引流阀术后的表达及其对瘢痕化的影响有重要的意义。

不同植入材质因其组织相容性不同, 引起的炎症及免疫反应程度亦不相同。本次研究的新材料组是 Parylene C 薄层涂层于 PMMA 表面作为新的青光眼引流阀材料。Parylene C 是一种热塑性的高分子材料, 为惰性的高分子聚合物, 因具有良好的生物相容性、耐腐蚀性、化学稳定性^[6], 已广泛用于胶塞镀膜、心脏封堵器、口腔填充物等器材植入人体内, 且相关临床研究亦验证其具有良好的组织相容性、临床有效性及安全性^[7-9]。且研究^[10]显示, Parylene C 具有很好地抑制炎症作用, 涂层于植入物表面有很好地抑制炎症反应作用, 若涂层于青光眼引流阀表面会因抑制炎症作用, 可能会有抑制成纤维细胞增生, 减少瘢痕形成的作用。本实验使用 Parylene C 涂层包裹的 PMMA 作为新材料, 和硅胶分别植入大白兔球结膜下, 术后结果显示新材料组炎症反应及成纤维细胞增生明显轻于硅胶组, 成功造出不同的瘢痕模型。同时本研究也证实了 Parylene C 具有抑制炎症反应及成纤维细胞增生的作用。

IL-1 β 是一种具有多种生物活性的细胞因子, 既能从局部及系统两方面调节炎症反应, 又能在组织损伤过程中发挥极其重要的作用。Santak et al^[11]发现 IL-1 β 能够抑制 I 型前胶原的 mRNA 生成, 可以从转录和翻译两个水平影响成纤维细胞合成, 促进胶原蛋白的分解。然而 Kim et al^[12]研究发现 IL-1 β 有促进炎症因子浸润和瘢痕形成的作用。本研究显示, IL-1 β 的表达水平与成纤维细胞在硅胶组明显增多, 提示可能参与了瘢痕化的过程; 同时 IL-1 β 分子主要表达于成纤维细胞周围, 提示 IL-1 β 可能参与了成纤维细胞的增生; 进一步分析显示 IL-1 β 与成纤维细胞的增生成正相关性。这些结果表明 IL-1 β 可以促进成纤维细胞的增生, 促进瘢痕形成。

IL-1 β 是由巨噬细胞、内皮细胞、小胶质细胞及成纤维细胞等多种细胞分泌一种炎症因子, 由 Toll 样受体、Nod 样受体通路以及 Caspase-1 通路进行调节和激活。首先, IL-1 β 可促进前列腺素、一氧化氮合酶等炎症介质的释放, 诱导加剧炎症反应, 参与炎

症反应的发生及发展^[13], 从而延长术后愈合时间, 加重成纤维细胞增生。其次, IL-1 β 又可通过促进成纤维细胞因子生成、基质金属蛋白酶的释放, 特别是与基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的有相互促进的作用。MMP-9 是一种糖蛋白, 因具有 V 型胶原功能域, 又被称作明胶酶 B, 属于明胶酶类^[14], 其主要作用是分解细胞外基质, 加重瘢痕作用。IL-1 β 促进 MMP-9 的释放, 破坏细胞外基质而加重瘢痕化的作用。再次, 损伤后 IL-1 β 可以与血管内皮细胞表面受体结合, 可上调凋亡蛋白 Bax 以及下调 Bcl2, 诱导释放细胞色素 C, 从而活化 Caspase-3 而致内皮细胞凋亡^[15], 加重出血及炎症因子的释放, 亦可加重成纤维细胞的增生。

综上所述, 本实验结果显示 IL-1 β 在类青光眼引流阀植入术后表达明显增高, 且与成纤维细胞的增生成正相关性, 提示 IL-1 β 可能有促进青光眼引流阀植入术后成纤维细胞增生、加重瘢痕化的作用。后期仍需更多的研究明确 IL-1 β 通过何种通路促进成纤维细胞的增生。

参考文献

- [1] Riva I, Roberti G, Oddone F, et al. Ahmed glaucoma valve implant: surgical technique and complications [J]. Clin Ophthalmol, 2017, 11: 357-67.
- [2] Kang J Y, Nam K Y, Lee S J, et al. The effect of intravitreal bevacizumab injection before Ahmed valve implantation in patients with neovascular glaucoma [J]. Int Ophthalmol, 2014, 34(4): 793-9.
- [3] Gandham S B, Costa V P, Katz L J, et al. Aqueous tube-shunt implantation and pars plana vitrectomy in eyes with refractory glaucoma [J]. Am J Ophthalmol, 1993, 116(2): 189-95.
- [4] Gedde S J, Schiffman J C, Feuer W J, et al. Treatment outcomes in the Tube Versus Trabeculectomy (TVT) study after five years of follow-up [J]. Am J Ophthalmol, 2012, 153(5): 789-803.
- [5] Gedde S J, Heuer D K, Parrish R K, et al. Review of results from the Tube Versus Trabeculectomy study [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2010, 21(2): 123-8.
- [6] Miksa B J, Sochacki M, Sroka-Bartnicka A, et al. Application of parylene for surface (polymer) enhanced laser desorption/ionization of synthetic polymers [J]. Rapid Commun Mass Spectrom: RCM, 2013, 27(7): 767-72.
- [7] 秦莉, 易岂建, 李谧, 等. Parylene 涂层封堵器治疗儿童先天性心脏病疗效观察 [J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(10): 1403-9.
- [8] Fergus C, Santos M, Soo S, et al. The effect of different chemical intra-oral prostheses cleansers on the surface properties of Parylene-coated PMMA [J]. Dent Mater J, 2017, 36(2): 129-34.

- [9] Park C J , Yang D S , Cha J J , et al. Polymeric check valve with an elevated pedestal for precise cracking pressure in a glaucoma drainage device[J]. *Biomed Microdevices* ,2016 ,18(1) : 20.
- [10] Robinson E , Kaushal S , Alaboson J , et al. Combinatorial release of dexamethasone and amiodarone from a nano-structured parylene-C film to reduce perioperative inflammation and atrial fibrillation [J]. *Nanoscale* ,2016 ,8(7) : 4267 - 75.
- [11] Santak G , Santak M , Forcic D. The role of interleukin-1 β and platelet-derived growth factor-AB in antifibrosis mediated by native human interferon alpha[J]. *Surgery* ,2010 ,148 (3) : 490 - 8.
- [12] Kim K H , Ko A Y , Ryu J S , et al. Effect of electrocauterization on the inflammation of the conjunctiva in experimental animal model [J]. *Korean J Ophthalmol* ,2013 ,27(4) : 282 - 7.
- [13] 黄云帆 ,彭礼波 ,张志坚. 细胞焦亡与炎症反应的研究进展 [J]. *海南医学* ,2016 ,27(21) : 3533 - 5.
- [14] Wang J J , Huan S K , Hsieh K H , et al. Inhibitory effect of midazolam on MMP-9 , MMP-1 and MMP-13 expression in PMA-stimulated human chondrocytes *via* recovery of NF- κ B signaling [J]. *Arch Med Sci* ,2013 ,9(2) : 332 - 9.
- [15] Zhu X , Xie M , Wang K , et al. The effect of puerarin against IL-1 β -mediated leukostasis and apoptosis in retinal capillary endothelial cells (TR-1BRB2) [J]. *Mol Vis* ,2014 ,20: 1815 - 23.

Role of interleukin-1 β in scarring after implantation of glaucoma drainage valve-like

Zhang Kangyu , Jiang Zhengxuan , Liu Chao , et al

(*Dept of Ophthalmology , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601*)

Abstract *Objective* To observe interleukin-1 β (IL-1 β) expression on scarring after implantation of glaucoma drainage valve-like , and to explore its effect on scarring. *Methods* Thirty New Zealand white rabbits were randomly assigned to silicone group and new material group with 15 rabbits in each group , which implanted silicone and PMMA (Polymethyl methacrylate) coated Parylene C respectively under the conjunctiva. In the two groups , the whole tissues from conjunctiva to sclera were collected at 1 week , 4 week and 8 week respectively after surgery. The expression of inflammatory cell infiltration and fibroblast proliferation in each group were observed by HE staining , and fibroblasts were counted by advanced microscope. Western blot and immunohistochemistry were used to detect IL-1 β expression and location in tissues. The correlation coefficient was statistical analyzed between IL-1 β protein and fibroblasts. *Results* According to HE staining result , silicone group showed significantly higher expression of inflammatory cell infiltration and fibroblast proliferation compared with the new material group. According to Western blot and immunohistochemistry results , the concentrations of IL-1 β were higher in silicone group than that in new material group at each time point ($P < 0.05$). According to immunohistochemistry result , increased IL-1 β was located around the proliferated fibroblasts on surface of the sclera. Correlation coefficient showed that the expression of IL-1 β was positively correlated with the fibroblasts in 4 week and 8 week tissues ($P < 0.05$).

Conclusion IL-1 β may promote the formation of scars after implantation of glaucoma drainage valve.

Key words refractory glaucoma; glaucoma drainage valve; IL-1 β ; silicone; PMMA; Parylene C