网络出版时间:2016 - 8 - 10 11:04:49 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.021.html

# 翼状胬肉中 MMP-9、TIMP-1 及 VEGF 的表达及意义

李盈龙,马 应,王李松,蒋正轩

**摘要** **目的** 比较金属基质蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)、新生血管因子(VEGF)在翼状胬肉中的表达,探讨3者在翼状胬肉中的作用。**方法** 收集复发性翼状胬肉患者翼状胬肉标本38例、初发性翼状胬肉患者翼状胬肉标本47例和斜视患者球结膜标本32例。采用免疫组化法检测85例翼状胬肉和32例正常人球结膜中MMP-9、TIMP-1及VEGF的表达,比较MMP-9、TIMP-1及VEGF在3组中的表达差异,分析3者在翼状胬肉中表达的相关性。**结果** 复发性翼状胬肉和初发翼状胬肉标本均有MMP-9、TIMP-1和VEGF的表达,MMP-9、TIMP-1和VEGF在复发翼状胬肉和初发翼状胬肉中阳性表达均显著高于正常球结膜。经相关检验分析,在翼状胬肉中,MMP-9和VEGF的阳性表达存在相关性;而TIMP-1与VEGF表达间无显著相关性。**结论** MMP-9在翼状胬肉发生和复发过程中发挥重要作用。其可能通过破坏细胞外基质的屏障和促进VEGF产生来调控翼状胬肉的发生和复发。细胞外基质屏障的打破可能是翼状胬肉发病的基础。

**关键词** 细胞外基质;翼状胬肉;复发;免疫组织化学;新生血管

**中图分类号** R 382.33

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2016)10 - 1490 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2016.10.021

翼状胬肉是我国眼科常见病和多发病。眼球的睑裂部球结膜和结膜下组织变性增生,并向角膜侵润,外观呈三角形[1]。翼状胬肉的病因复杂,是环境因素和自身因素共同作用的结果,但其确切的发病机制至今尚不完全清楚。一致认为,在紫外线等外界因素的作用下,睑裂区的球结膜变性及纤维血管组织大量增生,且有较强侵袭能力;同时外界的危险因素损伤了角膜缘的干细胞,使增生的组织侵入透明的角膜组织,逐渐增大覆盖角膜[1-2]。由此可见,在翼状胬肉发病过程中,纤维血管组织的增生和不断的侵袭是翼状胬肉形成的基础,细胞间基质屏障和角膜缘屏障的破坏可能是该病进展的主要原因。

金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)是降解细胞外基质的重要酶类,几乎能降解细胞外基质中的全部成分。其可能通过破坏细胞外基质的降解平衡而促进病变的组织增生侵袭,突破细胞外基质的组织屏障,从而侵袭周围的组织[3]。MMP-9是依赖金属锌离子的金属酶,其底物广泛,是当今研究热点[4]。基质金属蛋白酶抑制剂(matrix metalloproteinase inhibitor,TIMP)是MMP的抑制剂,能抑制MMP活性及其生物学功能,防止细胞外组织屏障的破坏。人体内发现4种TIMP,其中TIMP-1被广泛研究[5]。然而,这2种蛋白酶在复发、初发翼状胬肉中的作用及机制尚不清楚。该研究利用免疫组化法检测复发、初发翼状胬肉及正常球结膜组织中MMP-9、TIMP-1及新生血管的表达差异,从而阐明MMP在翼状胬肉发病机制中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 标本收集** 收集2012年7月~2015年2月行

2016 - 07 - 21 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2013A147)

作者单位:安徽医科大学第三附属医院、合肥市第一人民医院眼科,合肥 230061

作者简介:李盈龙,男,硕士,副主任医师,责任作者,E-mail:Lylong3760@sohu.com

family history ($OR = 0.90$, $P = 1.01 \times 10^{-1}$). The frequencies distribution of genotypes and alleles for AIM2 rs2276405 were not significant in skin lesion group, severity and family history group and control. ***Conclusion*** AIM2 (rs2276405) is significantly associated with susceptibility of psoriasis in Han Chinese population. In all subtypes of psoriasis, the dominant model provides the best fit for AIM2. The data support that AIM2 may be associated with mild-moderate and sporadic psoriasis and might contribute to the complexity of clinical feature of psoriasis.

**Key words** psoriasis; AIM2; genotype; phenotype; genetic model

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

翼状胬肉切除手术获得38例复发翼状胬肉组织、47例初发翼状胬肉组织及32例正常人球结膜组织。3组人群年龄、性别均相互匹配。

**1.2 试剂** 鼠抗促血管生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)及兔抗MMP-9多克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂及DAB试剂盒购自北京中衫金桥公司;兔抗TIMP-1多克隆抗体购自北京生物合成技术公司。

**1.3 方法**

**1.3.1 HE染色** 翼状胬肉及正常球结膜组织用10%福尔马林固定，石蜡包埋，常规组织切片，HE染色，镜下观察并比较各组织的病理状况。在同一个显微镜下对切片的着色颗粒进行检测计数，比较其是否有差异。免疫组织化学方法采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法，即SP法。

**1.3.2 免疫组化** 复发、初发翼状胬肉及正常人球结膜组织收集后，立即采用10%福尔马林固定，然后石蜡包埋，再进行标记切片。运用二步法进行染色，步骤如下:常规脱蜡，水化组织切片，将切片放入3%过氧化氢去离子水中孵育5 min(阻断内源性过氧化物酶)，再用PBS冲洗;滴加一抗，4 ℃过夜，PBS冲洗，每次2 min，冲洗3次;滴加通用型IgG抗体-HRP多聚体，37 ℃孵育20 min，PBS冲洗，每次2 min，冲洗3次;DAB显色，再用苏木精复染，然后封片观察。在光学显微镜下进行染色参数分析，并做统计。

**1.3.3 免疫组化着色颗粒的计数** 在100倍显微镜下观察切片中的着色细胞数，记录每个切片中的数量。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 13.0软件进行分析，计量资料使用方差分析，计数资料使用 $\chi^2$ 检验。$P<0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 复发翼状胬肉、初发翼状胬肉和人类正常球结膜组织病理学变化** 通过对复发、初发的翼状胬肉和正常人球结膜的HE染色结果示:复发翼状胬肉的表层上皮层明显增厚，上皮细胞排列紊乱，细胞体积增大，基底上皮边界模糊，间质中大量血管。初发翼状胬肉的上皮细胞排列紊乱，细胞体积及细胞核增大，基底层边界不清，间质层可见较多的血管。正常人球结膜表层上皮层较翼状胬肉组薄，上皮细胞排列极为整齐，基底细胞边界清晰，间质中血管较少，见图1。

**2.2 复发翼状胬肉、初发翼状胬肉和正常人球结膜中TIMP-1、MMP-9及VEGF的表达** TIMP-1表达主要位于细胞质中，在复发胬肉、初发胬肉和正常人球结膜组织中表达阳性率约90%。在复发的翼状胬肉组织中，TIMP-1大量表达于近基底膜的上皮细胞质中，间质的成纤维细胞也有染色。在初发翼状胬肉中，TIMP-1阳性颗粒主要位于上皮细胞中，集中于基底膜，较复发胬肉组少。在正常球结膜组织中TIMP-1阳性表达主要位于上皮细胞，分布较为弥散，基底膜较前两组少，见图2。

MMP-9免疫组化结果显示:MMP-9表达主要位于炎症细胞和血管内皮细胞的细胞核膜上，细胞质也有染色，呈棕黄色颗粒。在复发翼状胬肉组织中，可见大量的棕黄色颗粒。在初发翼状胬肉组织中，基底膜下方及血管周围均有棕黄色的颗粒着色，较复发组少。在正常球结膜组织中MMP-9仅有少量阳性表达，见图3。

VEGF免疫组化结果显示:呈棕黄色的颗粒，位于间质层、上皮层和血管壁上。在复发翼状胬肉组织中，可见大量的棕黄色颗粒位于复发翼状胬肉间

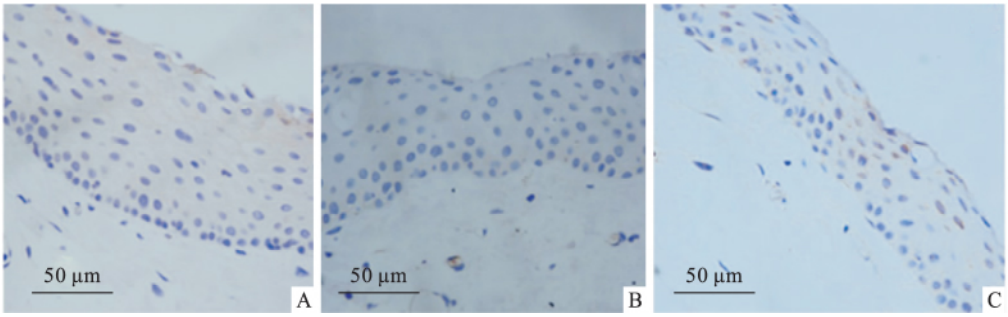


**图1 复发、初发翼状胬肉和正常球结膜组织** HE×400
A:复发翼状胬肉组织;B:初发翼状胬肉组织;C:正常球结膜组织

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

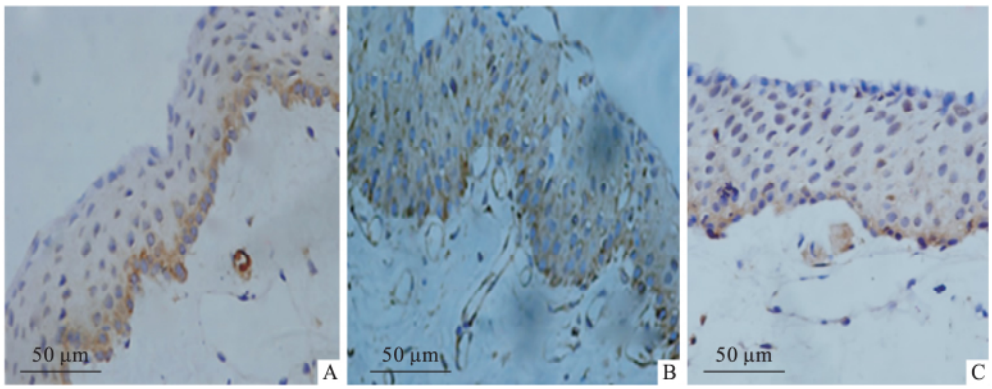


**图2 人正常球结膜与翼状胬肉中 TIMP-1 的表达 免疫组化 ×400**

**A: 复发翼状胬肉组织; B: 初发翼状胬肉组织; C: 正常球结膜组织**

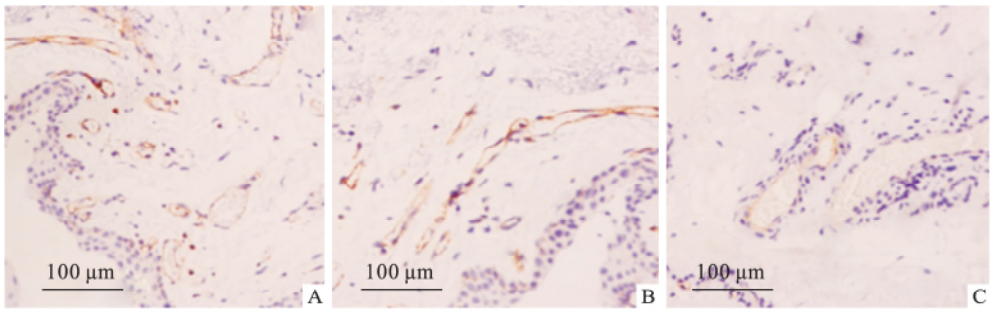


**图3 人正常球结膜与翼状胬肉中 MMP-9 的表达 免疫组化 ×200**

**A: 复发翼状胬肉组织; B: 初发翼状胬肉组织; C: 正常球结膜组织**

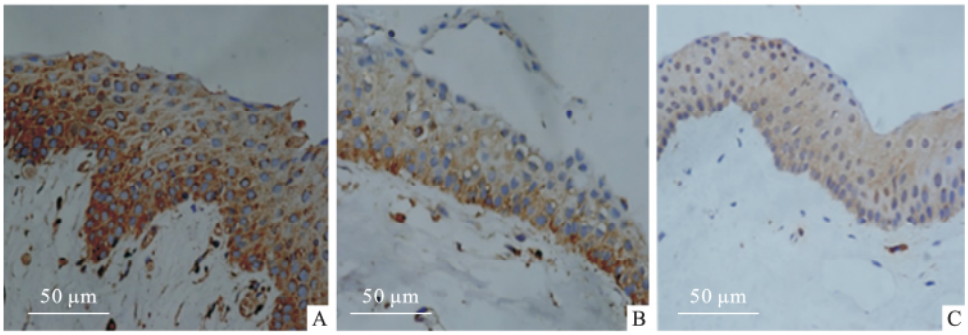


**图4 人正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF 的表达 免疫组化 ×400**

**A: 复发翼状胬肉组织; B: 初发翼状胬肉组织; C: 正常球结膜组织**

质层中，上皮层中均有表达。在初发翼状胬肉组织中，间质层有 VEGF 棕黄色的颗粒物表达，上皮层中有表达。在正常球结膜组织中上皮层有表达，间质层中表达很少，见图4。

显微镜下相同倍率的视野下着色颗粒的计数见表1。结果表明 TIMP-1、MMP-9 和 VEGF 在复发翼状胬肉和初发翼状胬肉组织明显高于正常球结膜组织；进一步分析，其在复发翼状胬肉组织的表达明显高于初发翼状胬肉组织。

**表1 TIMP-1、MMP-9 和 VEGF 在复发、初发翼状胬肉和正常球结膜表达着色颗粒计数比较($\bar{x} \pm s$)**

| 项目 | 复发翼状胬肉 ($n=38$) | 初发翼状胬肉 ($n=47$) | 正常球结膜 ($n=32$) | *F* 值 | *P* 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| TIMP-1 | 35.2 ± 8.7 | 26.2 ± 10.3 | 21.2 ± 6.8 | 18.04 | 0.019 |
| MMP-9 | 23.7 ± 6.1 | 18.5 ± 8.6 | 15.3 ± 7.4 | 14.15 | 0.035 |
| VEGF | 16.2 ± 8.2 | 12.2 ± 6.3 | 7.4 ± 5.8 | 16.67 | 0.024 |

### 2.3 MMP-9、TIMP-1 表达与 VEGF 在翼状胬肉

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中的表达的相关性　在38例复发翼状胬肉和47例初发翼状胬肉中MMP-9、TIMP-1和VEGF蛋白阳性表达分别是69、73和57例。MMP-9和VEGF蛋白在翼状胬肉中的表达关系见表2。TIMP-1和VEGF蛋白在翼状胬肉中的表达关系见表3。经$\chi^2$检验后，VEGF与MMP-9蛋白表达相关($\chi^2=6.91$，$P=0.013$)；VEGF与TIMP-1蛋白表达相关($\chi^2=0.09$，$P=0.623$)。

**表2　MMP-9和VEGF蛋白在翼状胬肉中的表达关系($n$)**

| VEGF | MMP-9 | | 总计 | $\chi^2$值 | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| | + | − | | | |
| + | 52 | 5 | 57 | 6.91 | 0.013 |
| − | 17 | 11 | 28 | | |
| 总计 | 69 | 16 | 85 | | |

**表3　TIMP-1和VEGF蛋白在翼状胬肉中的表达关系($n$)**

| VEGF | TIMP-1 | | 总计 | $\chi^2$值 | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| | + | − | | | |
| + | 50 | 7 | 57 | 0.09 | 0.623 |
| − | 23 | 5 | 28 | | |
| 总计 | 73 | 12 | 85 | | |

## 3　讨论

翼状胬肉是眼科一种常见的眼表疾病，常表现为鼻侧球结膜组织增厚的病变。其通过破坏角膜前弹力层和角膜的基质层，造成视觉质量的下降和外观缺陷。目前临床上对翼状胬肉的主要治疗方式是翼状胬肉切除术，但患者术后复发率较高[4]。关于翼状胬肉的发病机制，研究[2]表明细胞外基质和角膜缘干细胞屏障的破坏是翼状胬肉进展的基础。当翼状胬肉组织中的细胞外基质等屏障受到破坏，胬肉组织进展迅速，侵入角膜组织。MMP-9是基质金属蛋白家族的重要成员之一，主要功能是降解和重塑细胞外基质[3,5]。在正常的组织中，一方面，MMP-9通过分解和重塑，实现细胞外基质的重建，同时其还能调控其他蛋白酶、细胞因子及炎症介质的活性；另一方面，MMP-9刺激血管内皮细胞及成纤维细胞分泌VEGF来调控新生血管的发生。TIMP是MMP的天然抑制剂，阻止MMPs酶原活化，抑制已活化的MMPs酶的活性。TIMP-1是多功能分子，不仅能抑制MMPs酶的活性，还能刺激皮质类固醇的生成、抑制血管发生、改变细胞形态学作用[5]。研究[5-7]表明，新生血管在翼状胬肉中发挥重要作用，翼状胬肉中存在大量VEGF及新生血管的表达，这一结果证实了新生血管的发生是翼状胬肉形成的重要机制。其中角膜成纤维细胞产生的VEGF能够促进局部组织毛细血管网的形成，被认为是新生血管生成的最重要的生长因子之一[7]。鉴于MMP-9和TIMP-1在维持细胞外基质动态平衡和新生血管生成等方面的作用，以及这两个因素在翼状胬肉的发生的重要作用[8]，本实验通过研究MMP-9、TIMP-1和VEGF在翼状胬肉发病中的作用，并进一步分析其内在关系。

本研究随机收集手术后的复发翼状胬肉、初发翼状胬肉及正常球结膜组织标本。HE染色结果显示，复发翼状胬肉组织上皮层明显最厚，细胞体积增大，上皮细胞排列紊乱，上皮基底部呈不规则样改变，间质中新生血管数量明显增加；初发翼状胬肉次之。结果表明球结膜组织细胞的增殖和侵袭性生长是翼状胬肉发展的重要原因。可能与细胞外基质屏障的破坏紧密相连[3]。本研究通过检测翼状胬肉组织中MMP-9和TIMP-1的表达情况来评价细胞外基质的动态平衡，结果显示MMP-9和TIMP-1在翼状胬肉组织中表达明显高于正常球结膜，且在复发翼状胬肉中表达最高。研究[9-10]表明，MMP-9在翼状胬肉中表达增高，这一结果与本研究的结果一致。结果表明，MMP-9参与了翼状胬肉的发生及复发。然而，与本研究结果不同是，TIMP-1被报道在翼状胬肉中表达无明显增加[5,11]。结果的差异可能有以下原因：首先，术前患者接受的治疗可能不同；其次，标本的收集、处理以及患者的年龄不完全相同，导致结果的不同；再次，胬肉标本收取时疾病所处时间不相同会造成结果的差异[7]。当外界因素刺激翼状胬肉组织，MMP-9表达增加，TIMP-1也相应地增加来维持细胞外基质的平衡；随着疾病的进展，MMP-9表达进一步增加，细胞外基质平衡打破，翼状胬肉组织侵袭性增加，导致翼状胬肉的快速生长和复发[11]。本实验进一步分析MMP-9和TIMP-1与VEGF的关系，显示MMP-9与VEGF相关，而TIMP-1与VEGF无相关性。这一结果提示，MMP-9可能通过破坏细胞外基质和促进VEGF的产生这两个方面引起翼状胬肉的发生和复发。

翼状胬肉是结膜及其结膜下组织的增殖性病变，尤其结膜下组织增生明显，本研究仅观察结膜组织MMP-9和TIMP-1与VEGF分子的表达，具有一定片面性，在以后的研究中，需进一步完善。尽管如

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

此,本实验表明 MMP-9 在翼状胬肉发生和复发过程中发挥重要作用,其可能通过破坏细胞外基质的屏障和促进 VEGF 的产生来调控翼状胬肉的发生和复发,这一结果将为治疗人类翼状胬肉这一眼表常见疾病提供新的理论依据。

## 参考文献


[1] Dushku N, John M K, Schultz G S, et al. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells [J]. Arch Ophthalmol, 2001,119(5): 695 – 706.

[2] Bradley J C, Yang W, Bradley R H, et al. The science of pterygia [J]. Br J Ophthalmol, 2010,94(7): 815 – 20.

[3] Schellini S A, Hoyama E, Oliveira D E, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in pterygium [J]. Arq Bras Ophthalmol, 2006,69(2): 161 – 4.

[4] 顾秋艳. 翼状胬肉标本中 RhoC 和 MMP-9 的表达及相关性研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014,23(24): 2634 – 7.

[5] 彭 畅, 蒋正轩, 梁 坤, 等. 翼状胬肉中血管内皮生长因子、内皮抑素的表达以及新生血管生成情况 [J]. 安徽医科大学学报, 2014,34(5): 645 – 8.

[6] Todani A, Melki S A. Pterygium: current concepts in pathogenesis and treatment [J]. Int Ophthalmol Clin, 2009,49(1): 21 – 30.

[7] Liang K, Jiang Z, Zhao B, et al. The expression of vascular endothelial growth factor in mast cells promotes the neovascularisation of human pterygia [J]. Br J Ophthalmol, 2012,96(9): 1246 – 51.

[8] Anguria P, Carmichael T, Ntuli S, et al. Chronic inflammatory cells and damaged limbal cells in pterygium [J]. Afr Health Sci, 2013,13(3): 725 – 30.

[9] 张丹娜, 杨桂芳, 刘钊臣. Bcl-2 和 MMP-9 在翼状胬肉中的表达及意义 [J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(9): 1729 – 30.

[10] 王建文, 郑建秋, 罗 丹. 基质金属蛋白酶-2、-9 在眼部翼状胬肉组织中的表达及意义 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2015, 49(5): 412 – 5.

[11] Tsai Y Y, Chiang C C, Yeh K T, et al. Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3462 – 7.


# Expression and significance of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and matrix metalloproteinase inhibitor 1 in the pterygium


Li Yinglong, Ma Ying, Wang Lisong, et al

(*Dept of Ophthamology, The Thind Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The First People's Hospital of Hefei, Hefei* 230061)



**Abstract** ***Objective*** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and matrix metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) in pterygium and find the roles of them in this disease. ***Methods*** Thirty-eight recurrent pterygium, forty-seven early onset pterygium and thirty-two normal bulbar conjunctivas were obtained in present study. The expressions of MMP-9, TIMP-1 and VEGF were tested in 85 cases of pterygium and 32 cases of normal conjunctival by using immune histochemical method. The expressions of the MMP-9, TIMP-1 and VEGF were compared in the three groups of patients and the relations among them were analyzed. ***Results*** The MMP-9, TIMP-1 and VEGF were expressed in the recurrent pterygium and early pterygium specimens. The positive rates of MMP-9, TIMP-1 and VEGF significantly increased in the recurrent and early pterygium pterygium samples compared with the normal conjunctiva samples. In pterygium, there was a relation between expression MMP-9 and VEGF correlation exists, but there was no correlation between TIMP-1 and VEGF by using the $\chi^2$ analysis. ***Conclusion*** MMP-9 plays an important role in the pathogenosis of occurrence and recurrence pterygium. It may destroy the extracellular matrix barriers and promote VEGF production to control the occurrence and recurrence of pterygium. Breaking down the extracellular matrix barriers may be the basis in human pterygium pathogenesis.



**Key words** extracellular matrix; pterygia; recurrent; immunohistochemical; neovascularisation


(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net