

凉血化瘀中药与曲安奈德对脉络膜新生血管动物模型中 MMP-9 及 TIMP-2 表达的影响

李学晶, 唐由之

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 30472229)
作者单位: (100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院
作者简介: 李学晶, 主治医师, 博士生, 研究方向: 中西医结合治疗眼底病。
通讯作者: 李学晶. zw71@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-02-18 修回日期: 2009-03-20

Expression of MMP-9 and TIMP-2 in experimental choroidal neovascularization utilizing liangxuehuayu decoction and triamcinolone acetonide

Xue-Jing Li, You-Zhi Tang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30472229)
Beijing Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China
Correspondence to: Xue-Jing Li. Beijing Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. zw71@yahoo.com.cn
Received: 2009-02-18 Accepted: 2009-03-20

Abstract

• **AIM:** To evaluate the changes of MMP-9 and TIMP-2 in rat model of choroidal neovascularization (CNV) taking liangxuehuayu decoction and triamcinolone acetonide (TA).

• **METHODS:** Both eyes of 48 rats received a series of 20 spots of laser irradiation (659nm, 360mW, 50 μ m, 0.05s). The rats were divided into three groups: the control group (received 9g/L physiological saline by gastric gavage, 16 rats), the TCM group (liangxuehuayu decoction drugs by gastric gavage, 16 rats) and TA group (intravitreal injection with TA 5 μ L, 0.2mg, 16 rats). Histopathologic examination (HE), MMP-9 and TIMP-2 staining by immunohistochemistry were performed on 7, 14, 21 and 28 days after photocoagulation.

• **RESULTS:** The staining intensity of MMP-9 in CNV showed that in control group the staining intensity was reaching the peak on day 7, and then decreased greatly. In TCM group the staining intensity was reaching the peak on day 14, the peak was lower than the control group and then decreased greatly. In TA group the staining intensity was reaching the peak on day 7, but the degree was between the control group and TCM group, then decreased. A platform stage occur on day 14-21. The TIMP-2's staining intensity showed that in control group the staining intensity was reaching the peak on day 14,

and then decreased greatly. In TCM group the staining intensity was reaching the peak on day 14, but the peak was higher than the control group and then decreased greatly. In TA group the staining intensity was reaching the peak on day 14, but the degree was between the control group and the TCM group, then decreased greatly.

• **CONCLUSION:** The liangxuehuayu decoction and TA can also suppress experimental CNV induced by Krypton laser through the regulation of MMP-9 and TIMP-2, and the liangxuehuayu decoction has a stronger effect to regulate the system of MMPs-TIMPs than TA.

• **KEYWORDS:** liangxuehuayu decoction; choroidal neovascularization; triamcinolone acetonide; MMP-9; TIMP-2

Li XJ, Tang YZ. Expression of MMP-9 and TIMP-2 in experimental choroidal neovascularization utilizing liangxuehuayu decoction and triamcinolone acetonide. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009; 9(4):656-659

摘要

目的: 评价凉血化瘀中药及曲安奈德对氩激光诱导 BN 大鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization CNV) 中基质金属蛋白酶 MMP-9 和基质金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2 表达的影响。

方法: 659nm 激光诱导 BN 大鼠 CNV 模型, 随机分成空白对照组 (每日生理盐水灌胃)、中药组 (每日中药灌胃) 和曲安奈德组 (激光后 1d 玻璃体腔注射曲安奈德 5 μ L, 0.2mg) 各 16 只。分别在光凝后 7, 14, 21, 28d 随机选取 4 只大鼠处死, 摘除眼球, 行病理切片及免疫组织化学检测 MMP-9 及 TIMP-2 蛋白在 CNV 组织中的表达。

结果: 空白对照组在光凝后 7d MMP-9 达到高峰, 此后逐渐下降; 中药组在光凝后 14d 达到高峰, 但峰值低于空白对照组, 此后逐渐下降; 曲安奈德组在光凝后 7d 达到高峰, 峰值介于空白对照组和中药组之间, 此后逐渐下降, 在 14~21d 出现平台期。空白对照组在光凝后 14d TIMP-2 达到高峰, 此后逐渐下降; 中药组在光凝后 14d 达到高峰, 峰值高于空白对照组, 此后逐渐下降; 曲安奈德组在光凝后 14d 达到高峰, 峰值介于空白对照组和中药组之间, 此后下降。

结论: 在下调 MMP-9、上调 TIMP-2 的表达进而抑制 CNV 形成方面, 凉血化瘀中药的作用强于曲安奈德。

关键词: 凉血化瘀中药; 脉络膜新生血管; 曲安奈德; MMP-9; TIMP-2

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.04.014

李学晶, 唐由之. 凉血化瘀中药与曲安奈德对脉络膜新生血管动物模型中 MMP-9 及 TIMP-2 表达的影响. 国际眼科杂志 2009; 9(4):656-659

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是导致年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性脉络膜视网膜病变和高度近视等多种眼底疾病视力丧失的主要原因。探讨 CNV 的发病机制与有效治疗是目前国内外学者的研究热点。凉血化瘀中药对年龄相关性黄斑变性和中心性渗出性脉络膜视网膜病变的 CNV 均有良好的治疗效果^[1,2], 我们应用免疫组化方法观察分别给予凉血化瘀中药灌胃和曲安奈德(triamcinolone acetone, TA)玻璃体腔注射治疗后大鼠 CNV 组织中 MMP-9 及 TIMP-2 表达,以期部分了解中药抑制 CNV 的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 BN 大鼠 48 只, 9~11 周龄, 体质量 200~250g, 雄性(北京维通利华实验动物有限公司提供)。实验前双眼前节和眼底检查均正常。凉血化瘀中药^[1]由中国中医科学院眼科医院中药房负责煎制。TA 40g/L(昆明积大制药有限公司); 兔抗 MMP-9 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), 羊抗 TIMP-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), SP 试剂盒及 AEC 显色试剂盒(福州迈新公司)。

1.2 方法 实验前 100g/L 水合氯醛溶液 3.5mL/kg 行大鼠 ip, 双眼散瞳, 用 659nm 氮激光(功率 360mW, 直径 50 μ m, 曝光时间 0.05s)环绕视盘光凝 2 排(20 个光斑), 以光凝后有气泡产生或伴有轻度出血(有时伴有轻响)标志击破 Bruch 膜, 记为有效点。按随机数字表将大鼠分为空白对照组、中药组和 TA 组 3 组, 每组 16 只。空白对照组动物模型制作后 1d 开始给予生理盐水 1.5mL 灌胃, 2 次/d; 中药组给予凉血化瘀的中药 1.25g/kg 灌胃, 2 次/d; TA 组在动物模型制作后 1d 给予 TA 5 μ L(0.2mg)玻璃体腔内注射。分别于光凝后 7, 14, 21, 28d 随机选取 4 只大鼠处死, 摘除眼球, 立即置于 40g/L 多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 24h, 经梯度乙醇脱水后石蜡包埋, 平行于角膜至视盘的矢状位连续 4 μ m 切片切至激光斑处, 常规 HE 染色。MMP-9 及 TIMP-2 相关抗原免疫组织化学检测按试剂盒说明书进行, 采用 SP 法染色, AEC 显色, 经苏木素复染后封片。羊抗人 MMP-9 多克隆抗体的工作浓度为 1:100, 兔抗人 TIMP-2 多克隆抗体的工作浓度为 1:500, 高压热修复 1min, 着色部位为红色。通过 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统半定量测定 MMP-9 及 TIMP-2 在 CNV 组织的表达, 所得数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行正态性检验、方差齐性检验后用单因素方差分析的方法, 其均数的两两比较用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 MMP-9 在 CNV 中的表达 空白对照组光凝后 7d, 在 CNV 组织上可见 MMP-9 在色素上皮样细胞表达, 同时散在于 CNV 的基质中(图 1A), 光凝后 14d, MMP-9 在色素上皮样细胞及成纤维细胞中表达, 有的 MMP-9 染色包绕呈管腔状(图 1D), 此后, MMP-9 表达逐渐减弱, 至 28d, MMP-9 在少量成纤维细胞表达。凉血化瘀中药组 MMP-9 表达与空白对照组类似, 但 7d 吸光度(A)较低(图 1B), 14d 时 MMP-9 表达达到高峰, 此后表达减弱。TA 组 7d(图 1C), 14d 时 MMP-9 表达与空白对照组类似, 但 A 较低, 21d 时 MMP-9 的表达强于空白对照组和中药组, 出现一平台期(表 1)。

2.2 TIMP-2 在 CNV 中的表达 空白对照组光凝后 7d 在 CNV 组织上可见 TIMP-2 散在表达于 CNV 基质中(图 2A),

表 1 BN 大鼠光凝后视网膜 MMP-9 和 TIMP-2 阳性反应物吸光度 ($\bar{x} \pm s, A$)

时间(d)	MMP-9		
	对照组	中药组	TA 组
7	234 \pm 187	91 \pm 73 ^e	189 \pm 112
14	153 \pm 103 ^a	137 \pm 92	106 \pm 86 ^a
21	57 \pm 48 ^{a,c}	48 \pm 35 ^{a,c}	119 \pm 84 ⁱ
28	9 \pm 7 ^{a,c,e}	37 \pm 29 ^{a,c}	24 \pm 19 ^{a,c,e}
时间(d)	TIMP-2		
	对照组	中药组	TA 组
7	618 \pm 374	1415 \pm 871 ^e	812 \pm 402 ^k
14	644 \pm 618	1240 \pm 891 ^e	943 \pm 715 ^e
21	27 \pm 15 ^{ac}	18 \pm 15 ^{ac}	37 \pm 22 ^{ac}
28	3 \pm 2 ^{ac}	13 \pm 9 ^{ac}	9 \pm 5 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 7d; ^c $P < 0.05$ vs 14d; ^e $P < 0.05$ vs 21d; ^f $P < 0.05$ vs 对照组; ⁱ $P < 0.05$ vs 对照组和中药组, ^k $P < 0.05$ vs 中药组

14d TIMP-2 在成纤维细胞中表达, 有的 TIMP-2 染色包绕呈管腔状(图 2B), 至 21~28d TIMP-2 表达明显减弱。凉血化瘀中药组 TIMP-2 表达与空白对照组类似, 但 7d(图 2C), 14d TIMP-2 表达明显强于空白对照组, 至 21, 28d, 未见 TIMP-2 的明显表达。TA 组 7, 14d 时部分激光斑 TIMP-2 表达与空白对照组类似, 部分激光斑处形成无定形胶冻样瘢痕组织, 瘢痕组织可着染 TIMP-2(图 2D), TIMP-2 表达介于空白对照组和中药组之间, 至 21, 28d, 未见 TIMP-2 的明显表达(表 1)。

3 讨论

CNV 的形成是基底膜降解, 内皮细胞增殖、迁移和毛细血管管腔形成的多步骤过程, 其形成受到促血管生成因子和血管生成抑制因子的严格调控, 还受到血管内皮细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)交互作用的影响。目前已证实, 损伤 Bruch 膜, 扰乱视网膜色素上皮(RPE)细胞的 ECM, 或扰乱内源性抑制剂, 是 CNV 生成的条件^[3]。Bruch 膜及其周围基质的变化, 以及基质金属蛋白酶(MMP)的活化是 CNV 发生的早期重要步骤^[4]。MMP-9 为明胶酶, 是分泌型 MMP 的一种, 可以降解体内血管壁基质中的 IV 型和 V 型胶原。研究发现, MMP-9 主要表达于膜边缘的 RPE 样细胞, 位于 RPE 细胞下增厚的 Bruch 膜样基质及血管结构中, 并且认为, PDT 抑制 CNV 形成的机制与抑制 MMP-9 的活性有关^[5,6]。但动物实验结果并不统一, Kvanta 等^[7]认为, MMP-9 mRNA 在激光光凝前的大鼠眼中低表达, 激光光凝后表达也不升高。而张士胜等^[8]观察到, MMP-9 mRNA 在用半导体二极管激光器(810nm)诱导的 C57BL/6J 小鼠 CNV 模型中的早期明显增加, 增长趋势于激光后 1wk 停止, 后期则保持在较稳定水平。我们发现, 空白对照组 MMP-9 在光凝后 7d 达到高峰, 主要位于色素上皮样细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞周围基质上, 此后表达逐渐下降, 提示 MMP-9 的活化在 CNV 发生早期起重要作用, 可以促进 CNV 的形成。凉血化瘀中药作用后 7d 时 MMP-9 的表达较空白对照组显著下降, 提示在 CNV 发生早期, 中药可以通过抑制 MMP-9 来抑制 CNV 形成; 14d 时与空白对照组比较, MMP-9 表达略低, 但统计学无差异, 提示中药不能持续抑制 MMP-9 的表达, 其持续抑制 CNV 的作用尚与其他因子有关。TA 作用后, 7~14d 时 MMP-9 表达持续低于空白对照组, 提示 TA 可以通过持

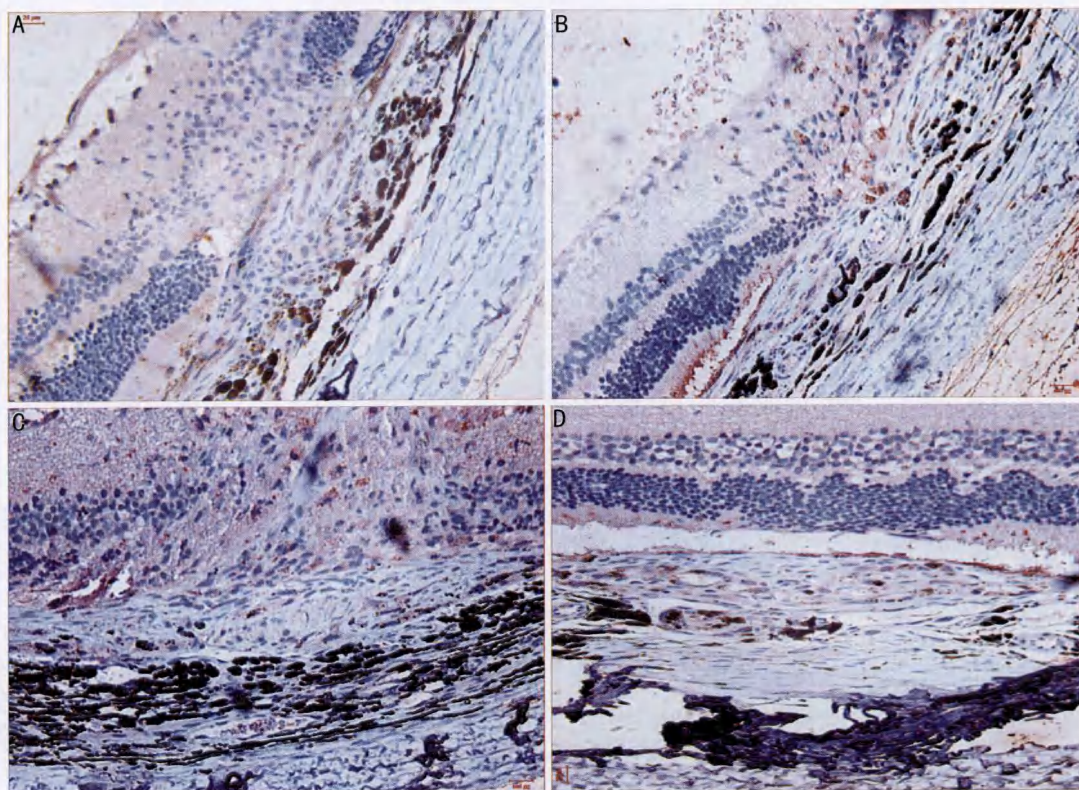


图1 大鼠视网膜 CNV MMP-9 表达 (SP ×400) A: 对照组 7d; B: 中药组 7d; C: TA 组 7d; D: 对照组 14d

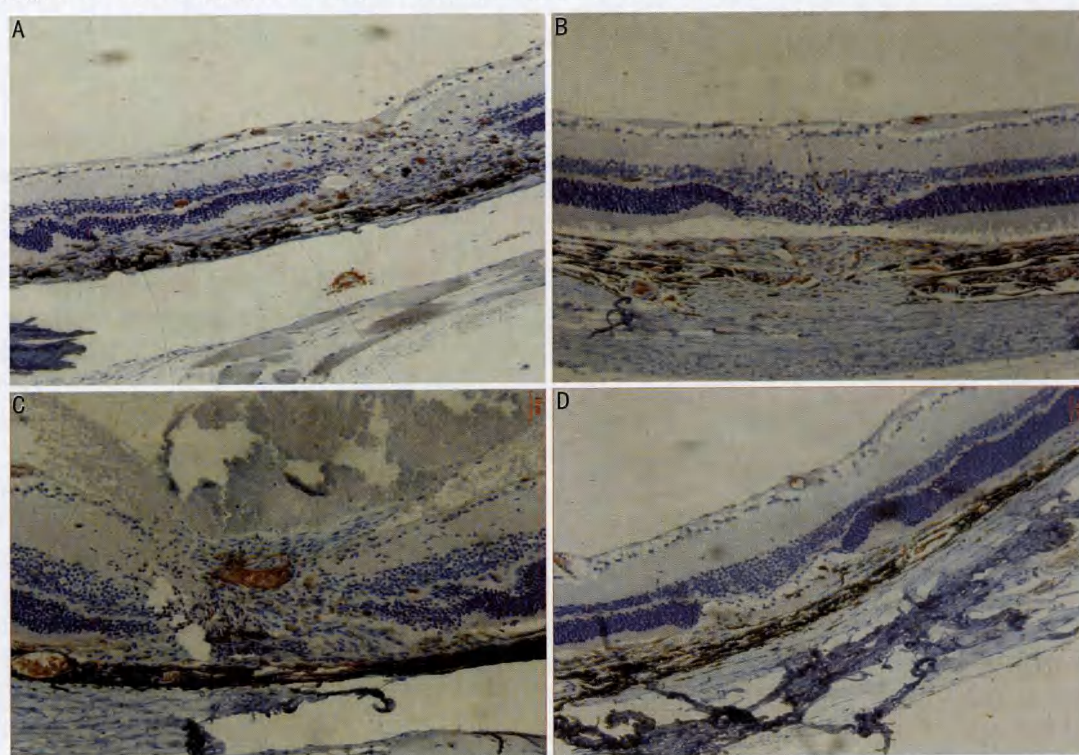


图2 大鼠视网膜 CNV TIMP-2 表达 (SP ×200) A: 对照组 7d; B: 对照组 14d; C: 中药组 7d; D: TA 组 7d

续抑制 MMP-9 的表达来抑制 CNV 形成和发展^[9]; 7d 时 MMP-9 表达介于空白对照组和中药组之间, 提示 TA 对 MMP-9 的抑制作用弱于中药组; 21d 时 MMP-9 的表达显著高于空白对照组和中药组, 出现一平台期, 可能与激素抑制炎症反应的同时, 也抑制了机体自身的免疫应答反应, 使本应下降的 MMP-9 出现了持续表达, 同时也提示 TA 对晚期 CNV 的抑制作用与其他因子有关^[23]。

组织抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) 可以通过与 MMP 的结合抑制 MMP 的活性。Bradey 等^[10]发现, 玻璃体腔注射 MMP 抑制剂 (Ag3340) 可以抑制 CNV 的早期形成。TIMP-2 主要由成纤维细胞表达, 可以抑制 MMP-2 的活性。在野生型小鼠, 腺病毒转染过表达的 TIMP-2 可以显著抑制激光诱发的 CNV 的发展^[11]。在实验性猴 CNV 模型, 视网膜下腔局部注射表达 TIMP-2 的

载体,可以显著减少 CNV 的荧光素渗漏^[12]。我们发现,空白对照组 TIMP-2 在光凝后 7d 即明显表达,14d 时达到高峰(MMP-9 在 7d 时达到高峰),提示在 CNV 的形成发展过程中,首先有 MMP 的活化,伴随着 MMP 的累积,TIMP 浓度增加以限制 MMP 的活化及扩散,CNV 发展的动态过程与 MMP-9 及 TIMP-2 表达变化的失衡有关^[13]。凉血化瘀中药作用后,7~14d 时 TIMP-2 的表达较空白对照组显著增加,提示中药可以通过促进 TIMP-2 的表达来抑制 CNV 形成。TA 作用后,7~14d 时 TIMP-2 表达持续高于空白对照组,但低于中药组,提示 TA 也可以通过促进 TIMP-2 的表达来抑制 CNV 形成和发展^[9],但刺激强度弱于中药组。

综上所述,凉血化瘀中药通过抑制 MMP-9 表达、促进 TIMP-2 表达进而达到抑制 CNV 的作用,其对基质金属蛋白酶系统的作用强于 TA,但其具体通过何种途径对基质金属蛋白酶系统发生影响尚需进一步实验证实,而且凉血化瘀中药对 CNV 的抑制作用也可能与血管内皮生长因子及色素上皮衍生因子等其他多种因子有关。

参考文献

- 1 唐由之,李学晶,王影. 凉血化瘀中药治疗中心性渗出性脉络膜视网膜病变 23 例. 中医杂志 2007;48(12):1099
- 2 张励,唐由之,冯俊. 中药治疗湿性老年性黄斑变性临床观察. 中国中医眼科杂志 2005;15(1):2-4
- 3 Campochiaro PA, Soloway P, Ryan SJ, et al. The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999;5(11):34-38
- 4 Hartnett ME, Lappas A, Darland D, et al. Retinal pigment epithelium

and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF dependent mechanism. *Exp Eye Res* 2003;77(5):593-599

5 Tatar O, Adam A, Shinoda K, et al. Matrix metalloproteinases in human choroidal neovascular membranes excised following verteporfin photodynamic therapy. *Br J Ophthalmol* 2007;91(3):1183-1189

6 曾军,姜德咏,刘湘平,等. MMP-2 和 MMP-9 在脉络膜新生血管膜的表达. 眼科新进展 2004;24(6):455-457

7 Kvant A, Shen WY, Sarman S, et al. Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization. *Cur Eye Res* 2000;21(3):684-690

8 张士胜,王康孙,王玲,等. MMP-9 及 TIMP-3 在小鼠脉络膜新生血管形成中的作用. 上海第二医科大学学报 2003;23(3):206-209

9 Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, et al. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 2000;123(4):698-709

10 Bradey M, Cheng L, Bartsch DU, et al. Preventive versus treatment effect of Ag3340, a potent matrix metalloproteinase inhibitor in a rat model of choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20(3):217-237

11 Lambert V, Wielockx B, Munaut C, et al. MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J* 2003;17(1):2290-2292

12 Murata T, Cui J, Taba KE, et al. The possibility of gene therapy for the treatment of choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2000;107(7):1364-1373

13 Zhang SS, Liao HP, Zhang L, et al. The role of MMP and TIMP-3 in induction of choroidal neovascularization in a murine model. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2008;8(8):1500-1503