

# 糖尿病模型兔眼结膜损伤的病理机制研究

葛 健<sup>1</sup>, 朱彩红<sup>1</sup>, 吴彦霖<sup>1</sup>, 吴永杰<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院眼科, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海市高血压研究所,  
上海市高血压重点实验室, 上海 200025)

**[摘要]** 目的 通过检测高脂高糖饲料饲喂加链佐菌素诱发的糖尿病兔结膜组织细胞的基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs), 分析二者与眼结膜病变间关系。方法 选取日本大耳白兔 20 只, 随机分成 2 组。对照组喂饲普通实验兔饲料; 实验组喂饲高脂高糖饲料 8 周后, 耳缘静脉注射链佐菌素制备糖尿病模型。在完成模型制作后 2 周, 2 组兔经全身麻醉后分别选取双眼的球结膜组织(2 mm × 3 mm)各 1 片。右眼球结膜用于常规病理观察; 左眼球结膜用于 MMP-1、MMP-3、MMP-9 测定, 以及 TIMP-1、TIMP-3 的检测。结果 实验组中 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 表达高于对照组( $P < 0.05$ )。实验组中 TIMP-1 表达略高于对照组( $P > 0.05$ ), 但 TIMP-3 表达明显低于对照组( $P < 0.05$ )。实验组兔眼结膜上皮排列整齐, 上皮下组织明显减少, 结膜组织疏松, 可见萎缩的筋膜组织, 结膜固有层细胞松散, 且细胞间炎性细胞增多。结论 糖尿病兔结膜组织 MMPs 和 TIMPs 的平衡打破, 使结膜组织中产生弹力纤维减少, 结膜下组织疏松; 筋膜萎缩的病理改变, 使糖尿病兔眼表微环境产生改变。

**[关键词]** 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶组织抑制剂; 糖尿病模型; 兔; 结膜损伤

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)02-0136-05

糖尿病患者角膜知觉减退, 可能是糖尿病患者的感觉神经病变引起的; 糖尿病患者角膜的愈合能力下降, 角膜上皮易出现点状上皮的缺损; 同时基础泪液的分泌量减少, 更易出现结膜和角膜表面的干燥; 从而使眼表微环境发生变化, 损害眼表组织<sup>[1-2]</sup>。本实验应用人工诱导的糖尿病兔模型来检测其结膜的基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金

属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的表达, 结合结膜的病理检查探讨糖尿病兔眼表微环境改变的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

普通级雄性日本大耳白兔 20 只, 8 周龄, 体重 2.66 ~ 3.44 kg, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK 沪 2017-0005]。20 只兔随机分成 2 组, 每组 10 只。对照组全程给予兔专用配合普通饲料喂养; 实验组给予高脂高糖饲料(普通基础饲料 53%, 猪油 10%, 蔗糖 37%)喂养 8 周后, 以 2% 链佐菌素制备糖尿病模型。兔饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部[SYXK 沪 2018-0027]。

### 1.2 主要试剂和仪器

MMPs 和 TIMPs 的 ELISA 试剂盒购自上海明

**[收稿日期]** 2019-11-23

**[作者简介]** 葛 健(1964-), 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病的临床和机制研究。

E-mail: gj10420@rjh.com.cn

共同第一作者: 朱彩红(1968-), 硕士, 副主任医师, 从事眼科临床眼底疾病临床和机制研究。

E-mail: zch10703@rjh.com.cn

**[通信作者]** 吴永杰(1967-), 副研究员, 研究方向: 动物实验和实验动物。E-mail: wyj10506@rjh.com.cn

睿生物有限公司。成纤维细胞生长添加剂(FGS)购自北京裕恒丰生物科技有限公司。DMEM培养基和胰蛋白酶溶液均购自上海博谷生物科技有限公司。多克隆抗兔一抗试剂盒购自北京博奥申生物工程有限公司。多克隆抗兔二抗二步法检测试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。ELX808酶标仪购自美国Bio-Tec公司; Moti-cam3000显微摄影成像系统购自美国Motic公司; 倒置显微镜购自日本Olympus公司。

### 1.3 糖尿病模型的制备<sup>[3]</sup>

高脂高糖饲料喂养8周的实验组兔10只, 进行口服糖耐量试验及胰岛素释放试验, 对出现胰岛素抵抗的兔禁食12 h。以3%戊巴比妥钠按30 mL/kg体质量麻醉后, 经耳缘静脉注射现配2%链脲佐菌素溶液(65 mL/kg体质量), 72 h后再次注射同等剂量链脲佐菌素溶液。每2周测1次空腹血糖, 连续2次血糖高于11.0 mmol/L视为造模成功。本研究中糖尿病实验组最终造模成功9只。造模成功后的糖尿病实验组兔与正常对照组一样喂以专用配合普通饲料。

### 1.4 组织取材及处理

实验组造模成功后2周, 2组兔以3%戊巴比妥钠(30 mL/kg体质量)麻醉后, 逐一将每只兔的双眼经消毒铺巾后, 每一眼球取结膜2 mm × 3 mm组织, 缝合结膜伤口。同时将左眼球结膜剪成2片1 mm × 3 mm大小, 置于4℃冰箱保存; 右眼球结膜组织置于体积分数10%中性甲醛溶液中备用。结膜组织解剖上可分为球结膜和睑结膜, 球结膜便于手术取材, 本实验所取结膜均为兔球结膜组织。

### 1.5 球结膜组织的病理检查

将2组兔右球结膜组织19份在体积分数10%中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色后, 在光学显微镜下观察记录。

### 1.6 免疫组织化学法测定球结膜的MMP-1、MMP-3和MMP-9

将2组19份兔左球结膜组织经切片常规脱蜡, 在3% $H_2O_2$ 中孵育10 min, 用PBS冲洗2 min共3次; 将切片放入枸橼酸盐缓冲液(pH=6), 微波炉中加热5 min共2次, 间隔10 min, 冷却至室温; 滴加一抗, 4℃冰箱放置10 h, PBS

冲洗2 min共3次, 再滴加二抗, 37℃孵育30 min, 冲洗2 min共3次; DBA显色5~10 min, 蒸馏水充分冲洗, 再用苏木精复染1 min, 常规脱水至透明, 中性胶封片。最后用Motic3000显微摄影系统在400倍下摄片, 采用Image-pro plus6.0病理图像分析系统对阳性表达进行定量分析, 以积分吸光度代表蛋白相对的表达量, 记录列表。

### 1.7 ELISA法检测球结膜组织细胞培养上清液中TIMP-1和TIMP-3<sup>[4-5]</sup>

将2组19份左眼球结膜组织经清洗干净, 修剪组织小于1 mm<sup>2</sup>后, 放入6孔板中, 在CO<sub>2</sub>培养箱中待干, 以后将板翻转后浸入4 mL含青霉素-链霉素, 10%胎牛血清和0.1%FGS的DMEM培养液中。每2日换培养液1次; 同时用倒置显微镜观察细胞形态, 用免疫荧光法对成纤维细胞的特异性蛋白进行检测, 以此鉴别成纤维细胞。然后选取4~6代呈对数生长期的细胞, 把生长至90%的细胞消化后, 用含10%胎牛血清的培养液配成细胞悬液; 再以 $3 \times 10^5$ 个/mL细胞密度接种在24孔板上, 每孔注液1 mL。培养24 h后, 更换无血清的DMEM培养液, 每孔1 mL, 置于含5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养, 48 h后收集各孔的培养液, 经高速离心机以800 r/min离心25 min; 取上清液放入无菌EP管中, 分装置-20℃冷冻保存。最后用试剂ELISA盒, 在酶标仪的450 nm波长检测各孔的吸光度(A)值; 利用标准品的A值和其相对应的质量浓度, 以A值为横坐标, 质量浓度为纵坐标, 把样本的A值代入计算得相应的样本质量浓度(ng/mL), 记录列表。

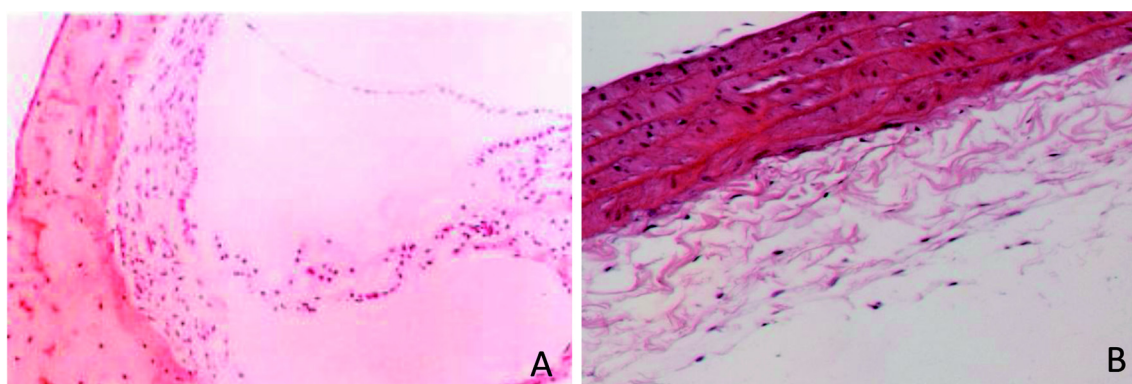
### 1.8 实验数据分析

采用统计软件SPSS 23.0对数据进行统计学分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用配对t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织学观察

糖尿病实验组中可见眼结膜上皮排列整齐, 上皮组织明显减少, 结膜组织疏松, 可见萎缩的筋膜组织, 结膜固有层细胞松散, 且细胞间炎性细胞增多, 甚至出现多量的炎性细胞灶状聚集, 少见有弹力纤维(图A)。正常对照组可见结



A: 实验组(HE × 400), B: 对照组(HE × 400)

图 1 兔球结膜组织学观察

膜上皮层排列整齐, 上皮层下组织致密且组织层次清晰, 结膜组织细胞间炎性细胞少见(图 B)。

## 2.2 MMPs 表达

对照组 10 只兔球结膜的 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 表达值分别为( $465.32 \pm 76.78$ ) ng/mL、( $687.15 \pm 82.34$ ) ng/mL 和( $697.45 \pm 89.56$ ) ng/mL; 实验组 9 只兔球结膜 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 表达值分别为( $1\ 565.48 \pm 98.78$ ) ng/mL、( $1\ 789.45 \pm 90.26$ ) ng/mL 和( $1\ 679.35 \pm 103.12$ ) ng/mL, 实验组兔球结膜的 MMPs 表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 TIMPs 表达

对照组 10 只兔球结膜 TIMP-1 和 TIMP-3 含量分别为( $0.53 \pm 0.01$ ) ng/mL 和( $0.23 \pm 0.01$ ) ng/mL; 实验组 9 只兔球结膜细胞 TIMP-1 和 TIMP-3 含量分别为( $0.65 \pm 0.01$ ) ng/mL 和( $0.13 \pm 0.01$ ) ng/mL。

TIMP-1 的表达略高于对照组, 但组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。TIMP-3 的表达实验组明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

# 3 讨论

糖尿病以高血糖为最主要临床表现, 高血糖可以使组织细胞分泌的细胞因子发生改变, 从而改变细胞代谢, 使细胞的原有功能发生改变<sup>[6-8]</sup>。高血糖可以使眼表的角膜知觉度降低, 眼表的泪湖高度减低。本实验主要观察了高血糖和球结膜 MMPs 和 TIMPs 表达间的关系, 进一步从球结膜

病理上说明了球结膜 MMPs 和 TIMPs 的表达和糖尿病实验组兔结膜的损害之间的联系。

MMP-1 主要水解纤维类的胶原, MMP-3 能溶解蛋白多糖、纤连蛋白、弹性蛋白等多种胶原蛋白。高血糖也能促进结膜 MMP-3 和 MMP-9 的高表达<sup>[9-10]</sup>。MMP-9 有明胶酶活性, 可水解变性的胶原和 IV、V 型胶原蛋白<sup>[11]</sup>。

糖尿病实验组的兔球结膜 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 都高于对照组, 说明这些胶原酶释放出成纤维细胞较多, 使原细胞内储存减少。球结膜 TIMP-1 和 TIMP-2 具有抑制 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 的活性作用, 正常结膜组织的弹性和组织形态的维护需要 MMP-1/TIMP-1 平衡处于正常状态。但糖尿病实验组球结膜 TIMP-1 的表达与正常对照组的表达差异无统计学意义, 说明 MMP-1/TIMP-1 的平衡被破坏。另外, 糖尿病实验组兔球结膜 TIMP-3 的表达明显低于正常对照组, 说明释放到成纤维细胞外的胶原酶减少了, MMP-3/TIMP-3 的平衡也被破坏<sup>[12]</sup>。这些 MMPs/TIMPs 失衡过程使球结膜下组织, 眼筋膜组织产生过度的降解, 造成结膜组织的损害, 从而临床上出现结膜松弛<sup>[13]</sup>; 结膜松弛可造成泪液膜的不稳定, 也造成了泪湖的实际容积量减少, 从而使角膜结膜组织表面出现干糙, 结膜上皮出现易损现象。结膜角膜组织的干燥、泪液膜的不稳定和结膜松弛都会进一步促进结膜和角膜的炎症发生。本实验中实验组兔结膜在光镜下可以观察到结膜上皮下组织明显减少、结膜组织疏松、筋膜组

织萎缩、结膜固有层细胞松散，且细胞间炎症细胞增多。

本实验中实验组兔结膜实验取材时并没有出现结膜炎的表现，但是病理上证实有不同程度的炎症细胞浸润，这与 Ward 等<sup>[14]</sup>的发现有异，然而作者认为早期的炎症细胞浸润程度可能和 MMP-9 的表达程度有关，也可认为是早期的炎症细胞变化促进了 MMPs 的表达，从而更促进了后期球结膜下组织和眼筋膜组织的降解过程。高血糖促进了兔结膜 MMPs 的表达，促进实验兔的结膜和眼筋膜出现弹力纤维的减少，结膜上皮组织疏松，结膜松弛；从而改变了糖尿病兔的眼表微环境，出现结膜角膜的干糙和角膜结膜组织的损害。

#### 参考文献:

- [1] Viso E, Rodriguez-Ares MT, Gude F. Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study)[J]. *Ophthalmic Epidemiol* 2009, 16:15-21.
- [2] Chouhan D, Janani G, Chakraborty B, et al. Functionalized PVA-silk blended nanofibrous mats promote diabetic wound healing via regulation of extracellular matrix and tissue remodeling[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3): e1559-e1570.
- [3] Ba evi M, Brkovi B, Lambert F, et al. Leukocyte-and platelet-rich fibrin as graft material improves microRNA-21 expression and decreases oxidative stress in the calvarial defects of diabetic rabbits [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 102: 231-237.
- [4] Acera A, Rocha G, Vecino E, et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease[J]. *Ophthalmic research*, 2008, 40(6):315-321.
- [5] Guo P, Zhang SZ, He H, et al. TSG-6 controls transcription and activation of matrix metalloproteinase1 in conjunctivochalasia[J]. *Invest ophthalmol Vis Sci*, 2010, 53(3):1372-1380.
- [6] Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37:768-784.
- [7] Simsek S, Schalkwijk CG, Wolffenbuttel BH, et al. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on glycaemic control in type-2 diabetes- the corall study [J] *Diabet Med*, 2012, 29(5):628-631.
- [8] Yildiz A, Gullulu CB, Ocak N, et al. Flurastatin decreases oxidative stress in kidney transplant patients[J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(10):2870-2874.
- [9] Van Der eid KR, SU SP, Ward KW, et al. Correlation of tear inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases with four dry eye diagnostic test[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3):1512-1518.
- [10] Shetty R, Ghosh A, Lim RR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinases-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(2):738-750.
- [11] Mimura T, Usui T, Yamamoto H, et al. Conjunctivochalasis and contact lenses[J]. *Am J Ophthalmol*, 2009, 148(1):20-25.
- [12] De Groef L, Andries L, Lemmens K, et al. Matrix metalloproteinases in the mouse retina :a comparative study of expression patterns and MMP antibodies[J]. *BMC Ophthalmol*, 2015, 29, 15:187.
- [13] Fodor E, Barabino S, Montaldo E, et al, Quantitative evaluation of ocular surface inflammation in patients with different grade of conjunctivochalasis[J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(8):665-660.
- [14] Ward SK, Wakamatsu TH, Dogru M, et al. The role of oxidative stress and inflammation in conjunctivochalasis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(4):1994-2002 .

## Pathological Mechanism of Conjunctival Injury in Diabetic Model Rabbits

GE Jian<sup>1</sup>, ZHU Caihong<sup>1</sup>, WU Yanlin<sup>1</sup>, WU Yongjie<sup>2</sup>

(1. Ophthalmology, RuiJin Hospital, Shanghai Jiao Tong University

Medical School, Shanghai 200025, China;

2. RuiJin Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai Institute of Hypertension, Shanghai Key Laboratory of Hypertension, Shanghai 200025, China)

**[Abstract] Objective** To analyze matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) in the conjunctival tissue cells of diabetic rabbits, and to analyze the relationship between MMPs and TIMPs. **Methods** Twenty Japanese white rabbits were randomly divided into 2 groups, the rabbits in control group were fed with the normal experimental rabbit diet, while the diabetic experiment group was fed with high fat and high sugar diet for 8 weeks, and then injected with streptozotocin by auricular vein for establishing diabetic model rabbits. Two weeks after the model was made, two groups of rabbits were anesthetized with general anesthesia, and one piece of 2 mm × 3 mm bulbar conjunctiva tissue of each eye was sampled respectively. The right conjunctiva was used for pathological observation, and left eye conjunctiva was used for detecting the MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-3. **Results** The expressions of MMP-1, MMP-3, MMP-9 in the experiment group were high compared with those of the control group ( $P < 0.05$ ), and the expression of TIMP-1 in the experimental group was slightly higher compared with that of the control group ( $P < 0.05$ ), but TIMP-3 was significantly lower ( $P > 0.05$ ). In the diabetic experimental group rabbits, the conjunctival epithelium was arranged in order, subepithelial tissue was obviously reduced, conjunctival tissue was loose, atrophic fascia tissue was observed, the cells of the lamina propria of conjunctiva were loose, and the inflammatory cells between the cells were increased. **Discussion** Break down of the balance between MMPs and TIMPs expression may produce elastic fibers in bulbar conjunctiva, and pathological changes of hypoconjunctiva tissue, the fascia atrophy changed the microenvironment of diabetic rabbit.

**[Key words]** Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase;  
Model of diabetic; Rabbit; Pathological examination of conjunctiva