

# 视网膜下液基质金属蛋白酶双向电泳分离酶谱鉴定分析

刘健平<sup>1\*</sup> 陈百华<sup>2</sup> 陈国华<sup>1</sup> 陈本美<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中南大学湘雅医学院现代分析测试中心,长沙 410078)

<sup>2</sup>(中南大学湘雅附二医院眼科,长沙 410011)

**摘 要** 以增生性玻璃体视网膜病变患者视网膜下液为研究对象,结合单向明胶酶谱法和双向电泳分离技术创建了基质金属蛋白酶双向电泳分离酶谱鉴定技术,该技术具有很高的分辨率和灵敏度,重复性好,能够提供蛋白质的相关修饰信息。通过该技术初步发现在增生性玻璃体视网膜病变患者的视网膜下液中存在有 4 种基质金属蛋白酶,其中 2 种是由 3 或 4 种分子量相同但等电点不同的同分异构体蛋白质组成。

**关键词** 增生性玻璃体视网膜病变,视网膜下液,基质金属蛋白酶,固相 pH 梯度,双向电泳

中图分类号 Q5-33, R77 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0613-05

在增生性玻璃体视网膜病变(Proliferative vitreoretinopathy, PVR)中由于眼内细胞移行、增生和转化在视网膜前面、后面及玻璃体内形成一层增生的细胞膜,其过程牵涉到胶原酶(Collagenase)对细胞外基质(Extra cellular matrix, ECM)中胶原(Collagen)的降解和重塑<sup>[1-3]</sup>,因此对 PVR 患者视网膜下液中(Subretinal fluid, SRF)聚集的基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)种类和含量进行分析有助于全面地了解病理发展过程。我们根据单向明胶酶谱法(Gelatin zymography)的基本原理结合双向电泳分离技术(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)创建了一种新型的双向电泳分离酶谱鉴定技术,为 MMPs 研究提供了新方法,也初步展现了蛋白质组学(Proteomics)方法在 PVR 研究中的新应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要实验仪器和软件**: Beckman LE-80 K 冷冻超速离心机(美国 Beckman 公司), IPGphor 固相 pH 梯度电聚焦仪, MultiTemp III 恒温仪, Protean II Xi Cell 垂直电泳仪(美国 BioRad 公司), PowerLook III 扫描仪(美国 Umax 公司), ImageMaster 2D Elite v3.01 图像分析软件(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司), Adobe Photoshop 6.0 图像扫描软件。

**1.1.2 试剂、材料和样品** 0.5 mm 厚 18 cm 长 pH 3

~ 10 L IPG 预制干胶条、pH 3~10 L IPG 缓冲液和等电聚焦覆盖液购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素购自 Amresco 公司, DTT(二硫苏糖醇)购自 ProgeMa 公司, CHAPS (3-[3-cholamidopropyl]-dimethylammonio-1-propanesulfonate), Triton X-100、Tris 碱、明胶、甘氨酸购自 Sigma 公司, 其它试剂都为国产分析纯试剂。样品来源于湘雅附二医院眼科, PVR 患者巩膜外放液手术中采集约 0.5 mL SRF, 用红细胞计数器计数, 选用每微升 SRF 中红细胞个数小于 4 的样品, 共 9 例, 其中 PVR A 级 2 例、C1 级 2 例、C2 级 2 例、C3 级 2 例、未知级别 1 例。

### 1.1.3 溶液配方:

(1) 样品裂解液: 9 mol/L 尿素、4 % CHAPS、40 mmol/L Tris 碱和 60 mmol/L DTT。

(2) 样品水化液: 9 mol/L 尿素、4 % CHAPS、0.5 % (V/V) pH 3~10 L IPG 缓冲液、20 mmol/L DTT 和微量溴酚蓝。

(3) 样品平衡液: 50 mmol/L pH 8.8 Tris-HCl、6 mol/L 尿素、30 % (V/V) 甘油、2 % SDS 和微量溴酚蓝。

(4) 胶条琼脂糖固定液: 0.5 % 琼脂糖和微量溴酚蓝。

(5) SDS-PAGE 明胶凝胶: 1 mm 厚 20 cm × 20 cm 凝胶, 分离胶浓度为 10%, 成层胶浓度为 5%, 两者

均含 1 g/L 明胶。

(6) SDS-PAGE 电泳缓冲液 :25 mmol/L Tris 碱、192 mmol/L 甘氨酸和 0.1% SDS。

(7) 凝胶洗脱液 2.5% (V/V) Triton X-100。

(8) 凝胶孵育液 :50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl、10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、2 mmol/L Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、50 mmol/L NaCl 临用前添加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(V/V), 滤纸过滤除去杂质后使用。

(9) 0.25% 凝胶考马斯亮蓝 R250 染色液和脱色液 :0.25 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 100 mL 溶液(甲醇:水:冰乙酸 = 45:45:10, 体积比)中, 过滤后使用, 脱色液中甲醇:水:冰乙酸 = 30:60:10, 体积比。

(10) Bradford 法蛋白质浓度测定液 :0.1 g 考马斯亮蓝 G250 溶于 50 mL 95% 乙醇, 加入 100 mL 85% (W/V) 磷酸, 将溶液用水稀释到 1 L, 过滤后使用。准确配制 50 g/L 的标准牛血清清蛋白溶液, 分别取出 0.2 μL、0.4 μL、0.6 μL、0.8 μL、1 μL 补加水至总体积为 1 μL 然后加于 5 mL 蛋白质浓度测定液中, 建立其在 595 nm 处浓度-吸光度标准曲线<sup>[4]</sup>。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 视网膜下液的裂解及蛋白质浓度的测定** :将样品先 1 000 r/min 离心 10 min, 吸取 200 μL 离心液加到 400 μL 样品裂解液中, 混合后在 20 °C 室温下放置 2 h, 再 4 °C 200 000 g 离心 1 h, 弃沉淀, 留取上清液。取 1 μL 上清液加到 5 mL 蛋白质浓度测定液中, 595 nm 比色, 根据牛血清清蛋白浓度-吸光度标准曲线计算出其蛋白质浓度大约为 7 ~ 11 g/L。

**1.2.2 样品的水化及等电聚焦** :取出 18 cm pH 3 ~ 10 线性 IPG 预制干胶条, 按每根胶条蛋白质总上样量为 1 mg 的要求吸取所需体积的裂解视网膜下液, 再补加样品水化液使总体积达到 350 μL, 混合后滴加到等电聚焦槽中, 再将胶条胶面朝下放入槽内并使水化液均匀铺开, 在胶条背面滴加 500 μL 覆盖液后进行等电聚焦, 其时间程序是 :step-n-hold 模式, 30V 16 h, 500V 1 h, 1 000V 1 h, 3 500V 1 h, 8 000V 6 h。

**1.2.3 样品的平衡** :等电聚焦后将胶条置于 10 mL 样品平衡液中平衡 2 次, 每次 15 min。

**1.2.4 SDS-PAGE** :将胶条放置在第二向明胶凝胶顶端, 用温热的琼脂糖固定液固定并排除气泡, 4 °C 电泳, 先 20 mA 电泳 30 min, 然后再 40 mA 电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。

**1.2.5 凝胶的洗脱** :电泳后将凝胶取出置于 250 mL 洗脱液中洗脱 2 次, 每次 30 min。

**1.2.6 凝胶的孵育** :洗脱后将凝胶置于 500 mL 孵育液中 37 °C 孵育 16 h。

**1.2.7 凝胶的染色和脱色** :孵育后将凝胶置于 250 mL 考马斯亮蓝 R250 溶液中染色 30 min, 然后用脱色液多次脱色直至蓝色背景下出现白色亮点为止。

**1.2.8 凝胶图像的扫描和软件分析** :300 dpi 透射扫描凝胶, 用 ImageMaster 2D Elite 软件进行点识别、点计数、背景消除和相对百分含量计算处理。

**1.2.9 蛋白质相对分子量和等电点计算** :测量各个蛋白质斑点的相对迁移率, 根据同样条件下标准蛋白质迁移率-相对分子量曲线<sup>[4]</sup>计算各种蛋白质的相对分子量(MW), 根据 18 cm pH 3 ~ 10 线性 IPG 干胶条 pH 值线性分布的规律计算各种蛋白质的等电点(pI)。

## 2 结 果

### 2.1 PVR A 级样品视网膜下液 Z-DE MMPs 酶谱结果

图 1 是 PVR A 级 1<sup>#</sup> 样品视网膜下液 2-DE MMPs 酶谱图, 由图可见在黑色背景下共有 8 个亮点, 其中最亮的一个点位于凝胶中部偏酸性端, 分子量大约为 46 kD, pI 值大约为 4.2, 另外 7 个亮点位于凝胶上部中间略偏酸性端, 分成两排平行排列, 上排 4 个点, 分子量大约为 98 kD, 下排 3 个点, 分子量大约为 91 kD, 两排亮点 pI 值大约分别为 5.6、5.7、5.8、5.9。

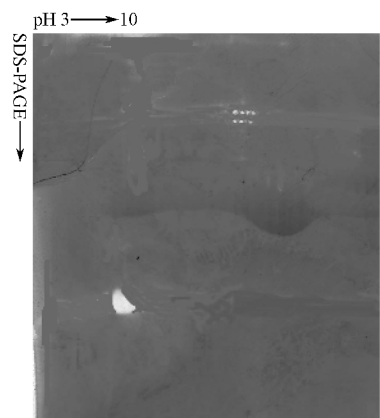


图 1 PVR-A 1<sup>#</sup> 样品的基质金属蛋白酶 2-DE 酶谱图

Fig.1 The 2-DE image of MMPs in SRF of PVR-A 1<sup>#</sup> samples From top left to right : spot 1<sup>#</sup> , 2<sup>#</sup> , 3<sup>#</sup> , 4<sup>#</sup> , from bottom left to right : spot 5<sup>#</sup> , 6<sup>#</sup> , 7<sup>#</sup> , the brightest spot in the middle of the image is spot 8<sup>#</sup>

图 2 中左图是用 Adobe Photoshop 软件对图 1 进行反相和灰度化处理后 7 个亮点的细节图谱, 中间图和右图分别是这两排亮点经过 ImageMaster 2D

Elite 软件进行峰识别和峰高值测量处理后的图谱, 可见共有 7 个明显的蛋白质峰。

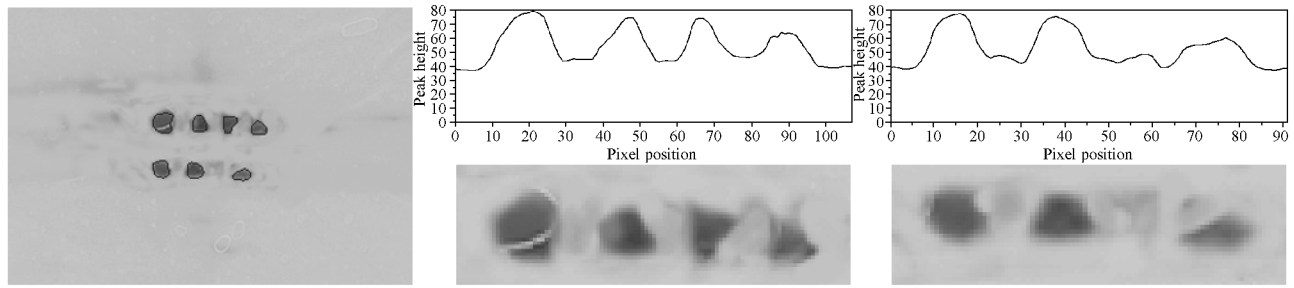


图 2 图 1 中平行两排的 7 个亮点细节图(左), 上排 4 个点的峰高值图(中), 下排 3 个点的峰高值图(右)

Fig. 2 The detailed image of 7 spots of Fig. 1 (left), the image of 4 spots in the top row (middle), the image of 3 spots in the bottom row (right)

经过 ImageMaster 2D Elite 软件消除背景和进行相对百分含量计算后, 得出各个点的蛋白质表达量 (volume)、峰高值 (peak height)、背景值 (background) 和相对百分含量 (normalization volume) 的数据, 见表 1。可见最亮的一个点 (8<sup>#</sup>) 表达量占该样品中所有 MMPs 表达量的 89.75%, 其它 7 个点的相对百分含量和峰高值都比较接近。

## 2.2 其它 8 例样品视网膜下液 2-DE MMPs 酶谱结果

表 2 中列出了其它 8 例样品的 2-DE MMPs 酶谱图结果 (均未给出图谱), 可见在 6 例 C 级样品中都出现了 1 个位于凝胶中上部中间略偏酸性端的亮点, 其分子量大约为 62 kD, 等电点大约为 5.3, 而没有出现分子量大约在 46 kD、91 kD 和 98 kD 的蛋白质。在另外 1 个 A 级样品中凝胶上部中间略偏酸性端也发现了 6 个亮点, 也是平行排列成两排, 每排 3 个, 分子量大约为 100 kD 和 93 kD, 等电点大约为 5.6~5.9。

表 1 图 1 中 8 个 MMPs 亮点的蛋白质表达量、峰高值、背景值和相对百分含量数据

Table 1 The volume, peak height, background and normalization volume of 8 MMPs spots in Fig. 1

Spot number	Volume	Peak height	Background	Normalization volume/%
1 #	14 407.000	113.000	10 300.000	2.339
2 #	8 278.000	98.000	5 610.000	1.344
3 #	8 425.000	103.000	6 960.000	1.368
4 #	7 138.000	97.000	4 264.000	1.159
5 #	9 854.000	98.000	6 149.000	1.600
6 #	10 030.000	110.000	5 240.000	1.629
7 #	5 020.000	82.000	4 365.000	0.814
8 #	552 748.000	155.000	195 510.000	89.746

表 2 其它 8 例样品的 2-DE MMPs 酶谱图结果

Table 2 The 2-DE MMPs results of the other 8 samples

Sample	Spot	Volume	Normalization volume/%	Peak height	MW/kD	pI
2 <sup>#</sup> of PVR-A	6 spots in two parallel lines, each 3 spots, in the up-middle of the gel	25 289.000	20.150	129.000	99.700	5.6
		21 178.000	16.874	122.000	99.700	5.7
		20 044.000	15.971	118.000	99.700	5.9
		21 719.000	17.306	123.000	93.400	5.6
		19 248.000	15.337	117.000	93.400	5.7
		18 025.000	14.362	117.000	93.400	5.8
1 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>1</sub>	1 spot, in the middle of the gel	84 115.000	100	135.000	64.000	5.4
2 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>1</sub>		79 508.000	100	131.000	61.400	5.2
1 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>2</sub>		64 327.000	100	130.000	64.700	5.2
2 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>2</sub>		85 733.000	100	136.000	60.900	5.3
1 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>3</sub>		89 023.000	100	136.000	61.200	5.4
2 <sup>#</sup> of PVR-C <sub>3</sub>		77 371.000	100	130.000	62.800	5.2
PVR sample, classification unknown	1 spot, in the middle-right of the gel	443 897.000	100	149.000	47.100	4.3

由表可见在此 9 例 SRF 样品中共发现了 4 种基质金属蛋白酶,第 1 种分子量 46 kD,  $pI \approx 4.2$ , 出现在 PVR A 级等 2 例样品中,6 例 C 级样品中都没有出现,第 2 种分子量 62 kD,  $pI \approx 5.3$ , 出现在 PVR C 级 6 例样品中,2 例 A 级样品中没有出现,第 3 种分子量 91 kD,第 4 种分子量 98 kD,这两种酶分子总是同时出现,每次都平行排列成两排,每排 3 或 4 个亮点,在同一排之内各个亮点之间分子量相同但等电点不同,从 5.6 到 5.9,相互差别约 0.1 个 pH 单位,它出现在 2 例 A 级样品中,6 例 C 级样品中都没有出现。另外 C 级样品都只出现了 1 种基质金属蛋白酶,而 A 级样品出现 2 或 3 种,没有发现能同时出现 4 种 MMPs 的样品。

### 3 讨 论

单向明胶酶谱法能够测量明胶酶的分子量和含量,不能测定等电点,使用该法有时还会在凝胶上形成长长的从顶端一直拖延到酶分子电泳前沿的纵向亮片,而不是理想的狭窄亮带,这是由于明胶酶活性没有被完全抑制,酶分子一边纵向电泳迁移一边降解所经区域明胶的缘故。我们创建的 2-DE MMPs 酶谱法<sup>①</sup>不但能鉴定分子量、表达量和等电点,还能从根本上避免不良亮片的出现,这是因为酶分子与裂解液、平衡液及水化液中的尿素和/或 DTT 发生了非共价和/或共价的反应,在第一向和第二向电泳时失去了活性不能降解明胶,只是到了洗脱阶段用洗脱液洗脱掉凝胶中的 SDS 和孵育阶段在孵育液中添加  $H_2O_2$  重新氧化酶分子的二硫键之后,酶的活性才又恢复起来,并在各自特定的 2-DE 凝胶位置上水解明胶形成亮点,这些亮点是被等电聚焦的圆点,不带水平或垂直方向的拖迹;<sup>②</sup>具有非常高的分辨率和灵敏度,具有很好的重复性和可比性,这是因为裂解液和水化液中的 DTT 将二硫键拆开,舒展了整个酶分子,CHAPS 和高浓度尿素又使酶分子去折叠和去团聚,这样在等电聚焦中酶就根据各自的等电点在胶条中被第一次分离,平衡液帮助酶分子从胶条转移到凝胶,在 SDS-PAGE 中酶又根据各自的分子量被第二次分离,两次连续的分选使得即使在等电点和/或分子量上只有细微差别(如 0.1 个 pH 单位或几个 kD)也能够在 2-DE 凝胶不同位置上被区分开来,本文正是利用该法才发现了 MMPs 分子的 3 或 4 种不同等电点形式,这是单向明胶酶谱法所不能检测到的;<sup>③</sup>能够提供蛋白质不同修饰状态的信息,蛋白质分子水平的修饰,如磷酸化、糖基化等往

往与某些重要功能的发挥有关<sup>[5,6]</sup>,研究翻译后修饰或病理状态下修饰显得越来越重要,依靠 MMPs 酶联免疫(ELISA)、免疫组织化学法在蛋白质表达水平和 RT-PCR 法在 mRNA 水平<sup>[7]</sup>是难以发现这些不同修饰状况的同分异构体的,而 2-DE 法在发现差异方面具有优势,若再结合蛋白质组学的质谱鉴定技术,如采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行修饰种类、位点和程度的鉴定,则对这类研究的开展提供了一套较完备的技术体系。总之 2-DE MMPs 法由于具备上述优点,可以推广应用到组织、细胞等样品的 MMPs 检测上去,值得一提的是在处理这些样品时必须在样品裂解液中添加蛋白酶抑制剂(如 Phenylmethylsulphonyl fluoride, PMSF)以防止 MMPs 被降解失活,还要添加核酸酶以排除核酸对样品处理和等电聚焦的影响,蛋白质进入胶条的总上样量也需要注意。

迄今发现的 MMPs 家族包括 20 种成员,其中 MMP-2 和 MMP-9 就是明胶酶 A 和 B, MMP-1 就是胶原酶-1,三者都能够降解明胶,根据赵云阁<sup>[8]</sup>对各成员的分类和描述结合 PVR 样品的来源及 ExPASy 专家蛋白质分析系统提供的信息和计算工具,我们认为第 1 种酶可能是 MMP-1,它与原酶(pro-MMP-1)的理论全序列等电点(6.5)和分子量(52 kD)有一定差异,这也许是酶分子被化学基团(如磷酸基团)修饰和/或去掉了前肽段的 MMP-1 分子或进一步裂解的超活性分子(SA-MMP-1)的缘故;第 2 种酶可能是 MMP-2,它的相对分子量和等电点都与理论推算值较为接近;第 3 种和第 4 种酶可能都是 MMP-9,因为它们总是同时出现,表现形式相似,分子量相差 7 kD,可能是原酶的一种裂解活性形式。

MMPs 是降解细胞外基质的酶,它们在正常玻璃体和视网膜中极少表达,在 PVR 中由于视网膜色素上皮细胞及其它类型的细胞在多种细胞因子的刺激下发生移行、增殖和转化, MMPs 才被大量地合成和分泌,并在多种调控因子激活后降解细胞外基质,完成创伤组织的重建和增生膜的形成,另一方面它也暴露新抗原,加重免疫和炎症反应<sup>[1-3]</sup>。我们的实验结果反映出在 PVR-A 级阶段首先表达 MMP-9,还可能表达 MMP-1,这两种酶基因先被启动,因为在后阶段中没有再发现它们,所以估计在此阶段它们的表达量就已达到了高峰,在 PVR-C 级阶段只表达 MMP-2,它的基因后启动并在后阶段达到表达量的最高峰,这说明在 PVR 中 MMPs 的表达在种类、时间和数量上是有差异的。PVR 的致病机理至今仍不清

楚, 它的病理过程在细胞水平虽然取得了一定程度的共识, 但是在蛋白质水平却了解程度有限, 我们的结论扩大了对其在蛋白质水平的了解, 对进一步研究会有帮助。

在建立了基质金属蛋白酶双向电泳酶谱鉴定技术后, 我们将扩大收集各个阶段的 PVR 组织样本, 利用质谱仪来鉴定蛋白质及其修饰状况, 还将进一步尝试用蛋白质组学的技术在蛋白质水平去研究 PVR。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Hunt R C, Fox A, Rakalnis V *et al.* Cytokines cause cultured retinal pigment epithelial cells to secrete metalloproteinases and to contract collagen gels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, **34**( 11 ): 3179 - 3186
- [ 2 ] WANG K (王方), ZHANG X (张哲). PVR membrane traction :cell-induced collagen traction. *Chinese Application Journal of Ophthalmology*( 中国实用眼科杂志 ), 2002, **20**( 4 ) : 249 - 252

- [ 3 ] Weller M, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy is it anything more than wound healing at the wrong place?. *Int Ophthalmol*, 1990, **14** : 105 - 117
- [ 4 ] ZHANG L X (张龙翔). Biochemistry experiment methods and techniques( 生化实验方法和技术 ), 2<sup>nd</sup> ed. Beijing( 北京 ): High Education Press( 高等教育出版社 ), 1997. pp. 138 - 140
- [ 5 ] Marcus K, Immler D, Sternberger J *et al.* Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. *Electrophoresis*, 2000, **21** : 2622 - 2636
- [ 6 ] Sperling K. From proteomics to genomics. *Electrophoresis*, 2001, **22** : 2835 - 2837
- [ 7 ] ZHOU H X (周后德), LIAO E X (廖二元), DENG X G (邓小戈), *et al.* The synergistic action of estradiol and L-ascorbic acid on the osteoblast-like cell line MG-63. *Chinese Journal of Geriatr*( 中华老年医学杂志 ), 2001, **20**( 5 ) : 374 - 378
- [ 8 ] ZHAO Y G (赵云阁), Orbit Anwar, ZHU G (祝诚). Extra cellular matrix and matrix metalloproteinases. *Progress in Biochemistry and Biophysics*( 生物化学与生物物理进展 ), 1999, **26**( 3 ) : 223 - 228

## Two-dimensional Gel Electrophoresis of Matrix Metalloproteinases in Subretinal Fluids

LIU Jian-Ping<sup>1\*</sup> CHEN Bai-Hua<sup>2</sup> CHEN Guo-Hua<sup>1</sup> CHEN Ben-Mei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( The Central Testing Lab, Xiang Ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China )

<sup>2</sup>( The Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Xiang Ya School of Medicine of Central South University, Changsha 410011, China )

**Abstract** In this work, the experimental conditions for two-dimensional gel electrophoresis of subretinal fluids (SRF) matrix metalloproteinases were established. The conditions tested included the composition of lysis solution and lysis method, the composition of rehydration solution and isoelectric focusing program (IEF), the composition of equilibration buffer and equilibration process and the composition of incubation solution and incubation methods. The main equipments used were IPGphor™ isoelectric focusing system from Amersham pharmacia and PROTEAN II xi cell from Bio-Rad, the gel strips used were the 18 cm long, pH 3 ~ 8 Linear immobiline DryStrips. Among the 9 samples analyzed, 2 were PVR-A, 2 were PVR-C<sub>1</sub>, 2 were PVR-C<sub>2</sub>, 2 were PVR-C<sub>3</sub> and the remaining one could not be classified definitely. The new 2-DE MMPs method is better than Gelatin SDS-PAGE zymography method, as it is higher in resolution, sensitivity and reproducibility. The experimental results suggested that the four types of MMPs expressed differently at different stages of PVR. Two of the MMPs isomers have same molecular weight (MW) but different in isoelectric points (pI). The four MMPs are determined to be MMP-1, MMP-2, MMP-9 and MMP-9, with MMP-9 has two active forms. In addition, MMP-9 and MMP-1 may be present in PVR-A samples but not in PVR-C samples, whereas MMP-2 is present in PVR-C but not in PVR-A samples. These results revealed the complex profiles of MMPs' expression in PVR. The new method can be applied to test MMPs expression in tissues, cells and other types of samples with a little modification in the protocol, and can be followed by mass spectroscopic analysis of MMPs.

**Key words** proliferative vitreoretinopathy, subretinal fluid, matrix metalloproteinases, immobilized pH gradient, two-dimensional gel electrophoresis