

文章编号:1004-7220(2014)05-0447-07

机械牵张对兔角膜成纤维细胞 细胞外基质基因表达的影响

刘成星^{1,2}, 冯鹏飞¹, 李晓娜¹, 宋 婕¹, 安美文¹, 陈维毅¹

(1. 太原理工大学 应用力学与生物医学工程研究所, 太原 030024; 2. 山西医科大学 基础医学院, 太原 030001)

摘要: **目的** 研究机械牵张与白介素-1 β (IL-1 β)联合作用对兔角膜成纤维细胞细胞外基质相关基因表达的影响。**方法** 对原代提取的兔角膜成纤维细胞进行牵张幅度15%、频率0.1 Hz的周期性牵张12、24、36 h,同时给予IL-1 β 处理,采用实时荧光定量PCR检测细胞基质金属蛋白酶(MMPs)、基质金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP-1)和I型胶原 α 1(Collagen I α 1)mRNA表达变化水平。**结果** IL-1 β 单独作用可以诱导角膜成纤维细胞MMP-1、MMP-3和MMP-9 mRNA表达;MMP-1和MMP-3 mRNA表达随时间而降低,MMP-9、TIMP-1、Collagen I α 1 mRNA则随时间而增加;IL-1 β 与机械牵张联合作用使MMP-1、MMP-3、MMP-9 mRNA表达水平上调,TIMP-1和Collagen I α 1 mRNA表达下调,且具有时间依赖性。单独机械牵张使Collagen I α 1 mRNA表达下降,IL-1 β 与机械牵张联合作用使其表达进一步下调,且具有时间依赖性。**结论** 机械牵张与炎性因子联合作用可加剧角膜组织破坏,促进角膜膨隆的发生发展。

关键词: 周期性牵张; 基质金属蛋白酶; 胶原; 角膜成纤维细胞

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of mechanical stretch on gene expression of extracellular matrix in rabbit corneal fibroblasts

LIU Cheng-xing^{1,2}, FENG Peng-fei¹, LI Xiao-na¹, SONG Jie¹, AN Mei-wen¹, CHEN Wei-yi¹

(1. *Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China*; 2. *School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China*)

Abstract: Objective To explore the combined effects of mechanical stretch and interleukin-1 β (IL-1 β) on gene expression of extracellular matrix in rabbit corneal fibroblasts. **Methods** Isolated rabbit corneal fibroblasts were subjected to 15% equibiaxial stretch at frequency of 0.1 Hz for 12 h, 24 h and 36 h, respectively, in presence of IL-1 β . The gene expressions of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and collagen type I alpha 1 (Collagen I α 1) were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The mRNA levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 could be up-regulated by IL-1 β alone. However, MMP-1 and MMP-3 mRNA levels decreased with time, while MMP-9, TIMP-1 and collagen I α 1 increased with time. Compared with corresponding IL-1 β treatment with mechanical stretch groups, the mRNA levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 were increased and the mRNA levels of TIMP-1 and collagen I α 1 were decreased in a time-dependent manner. The mRNA level of Collagen I α 1 was decreased by loading mechanical stretch alone, and would further decrease time-dependently in combination with IL-1 β treatment. **Conclusions** Mechanical stretch combined with IL-1 β may facilitate the corneal tissue damage, thereby contribute to the development of keratectasia.

Key words: Cyclic stretch; Matrix metalloproteinases (MMPs); Collagen; Corneal fibroblasts

收稿日期:2013-10-26; 修回日期:2013-11-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11032008,31271005), 山西省自然科学基金资助项目(2012011046-2)。

通信作者:陈维毅,教授,博士研究生导师, E-mail: chenweiyi@tyut.edu.cn。

作为承载组织,角膜基质主要由 I、IV、V 型胶原纤维构成,约占整个角膜厚度的 90%。基质层中胶原的有序排列不仅保证了角膜的透明度,而且使其具有一定的抗张能力^[1]。角膜屈光手术通过切削角膜基质层、改变角膜中央厚度以达到矫正屈光不正、提高视力的目的。有限元模拟显示,角膜中央组织变薄后,在正常眼压的作用下,角膜张应力比手术前增大^[2]。干眼症是屈光术后最常见的并发症之一,部分患者有揉眼的习惯,用力揉眼则可使眼压瞬间大幅增高,并伴有蛋白酶表达异常,这可能会对继发性角膜膨隆的发生发展产生一定影响;病情的发展亦与眼压增高的频率、持续时间、幅度以及角膜抗拉强度降低的程度有关^[3]。此外,有研究表明,准分子激光原位磨削术(laser in situ keratomileusis, LASIK)术后角膜膨隆病例中,胶原纤维变细的同时彼此之间的空间距离变小,提示角膜残余基质床中的胶原纤维可能受到牵拉作用^[4]。由此可见,屈光手术后角膜力学环境发生的变化不容忽视。

未受损的角膜上皮能够持续表达白介素-1(interleukin-1, IL-1)。IL-1 受体主要存在于角膜基质细胞中。在受到外源性 IL-1 刺激后,角膜基质细胞亦可合成 IL-1^[5]。屈光手术后,角膜受损,角膜上皮合成并释放 IL-1 到泪液及基质层中。作为一种重要的炎症因子,IL-1 及其受体系统主要参与角膜基质细胞凋亡、肌成纤维细胞的存亡、炎症细胞反应、胶原酶与基质金属蛋白酶等多种酶的合成、基质与上皮层之间的相互作用以及上皮结构重建和功能恢复的调节等^[6]。屈光术后的角膜膨隆病变过程与圆锥角膜相似。尽管圆锥角膜被视为一种非炎性、角膜进行性变薄疾病,但有文献报道炎症因子可能参与了圆锥角膜的发生和发展^[7]。干燥环境下泪液和角膜中的炎症因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α 表达亦明显增高^[8]。

作为一类锌离子及钙离子依赖的内肽酶,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能够降解各种细胞外基质。其中,MMP-1(I型胶原酶)主要降解 I 型胶原;MMP-9(明胶酶 B)主要降解 IV、V 和 VII 型胶原,MMP-3(基质降解素-1)虽然不直接降解胶原,但参与 MMP-1 和 MMP-9 的激活^[9]。研究表明,MMPs 参与了屈光术后角膜的损伤修复^[10-11]、角膜溃疡^[12]、LASIK 术后圆锥角膜的发

生^[13-15]及干眼症的病理过程^[8]。IL-1 可以诱导角膜成纤维细胞表达 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9,并进一步增加 MMP-2(明胶酶 A)的表达,参与角膜胶原蛋白的降解^[16-19]。

细胞所处力学微环境对细胞生长、增殖、分化和凋亡等生命活动均有重要影响^[20]。力学载荷与白介素参与了跟腱^[21-22]、韧带^[23]及滑膜^[24]细胞 MMPs 和基质金属蛋白酶的抑制组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)基因表达的调节,并在巩膜和小梁组织的重塑中发挥重要作用^[25-27]。然而,有关机械应力对角膜基质重塑的影响尚不清楚。处于胶原板层之间主要是角膜基质细胞,在受到如损伤等刺激后激活为成纤维细胞,而成纤维细胞是力敏感细胞^[28],角膜成纤维细胞也不例外^[29]。本课题组前期工作发现,机械牵张参与了角膜细胞因子分泌的调节^[30]。探索角膜成纤维细胞对力学刺激响应,有助于更好了解屈光手术后角膜愈合过程及继发性角膜膨隆等疾病的发生发展机制。

本研究通过对角膜成纤维细胞同时给予 IL-1 β 和周期性机械牵张处理,探讨两者共同作用对 MMPs、TIMP-1 和 I 型胶原 $\alpha 1$ (Collagen I $\alpha 1$) mRNA 表达的影响。结果表明,与 IL-1 β 单独作用比较,IL-1 β 和周期性机械牵张联合作用可使 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 的 mRNA 表达上调,但使 TIMP-1 和 Collagen I $\alpha 1$ 的 mRNA 表达下调。

1 实验方法

1.1 原代角膜成纤维细胞的分离与培养

无菌条件下取成年家兔(约 3 月龄,体重 3.5 kg)眼球,用含 0.5% 庆大霉素的 PBS 溶液清洗 3 次,机械剥离角膜上皮及内皮层,将剩余的基质层剪碎,用含 2 g/L II 型胶原酶的 DMEM/F12 培养基消化组织块,直到镜下可见单个悬浮细胞时终止消化,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,在获得的兔角膜成纤维细胞内加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养^[31]。

1.2 周期性牵张加载及 IL-1 β 处理

体外牵张加载采用 Flexcell 4000 柔性基底牵张系统(Flexcell 公司,美国)。该系统通过真空泵产生的负压抽吸特制的柔性培养膜,使黏附生长在培

养膜上的细胞受到张应变作用。针对由于生理活动引起的眼内压周期性变化和在体角膜基质床过薄或病理情况(如圆锥角膜)角膜成纤维细胞所受张力变大的情况,本实验采用频率 0.1 Hz、15% 牵张幅度进行周期性牵张加载。

将 2~4 代角膜成纤维细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,以 3×10^5 个/mL 的密度接种于裱衬有 I 型胶原蛋白的 BioFlex® 6 孔培养板上,置于孵箱内培养 24~48 h。待细胞 80% 融合时,换成含 1% FBS 的 DMEM/F12 培养基和 1 ng/mL 重组人白介素-1 β (recombinant human IL-1 β) 的 DMEM/F12 培养基(含 1% FBS)进行周期性牵张加载。分别于 12、24 和 36 h 后收集细胞。牵张组与静态组样本采集时间相同。分组如下:静态培养对照组;IL-1 β 处理静态培养组;15% 牵张组;IL-1 β + 15% 牵张组。为了

保证细胞活性,所有组细胞培养基中均含 1% FBS。牵张组细胞代数、培养条件和接种密度与静态组完全相同。乳酸脱氢酶(LDH)试验显示,牵张组与静态对照组之间细胞毒性无差别。

1.3 荧光实时定量 PCR

卸载后 12、24、36 h 收集细胞,TRIZOL 提取总 RNA,PrimeScript™ RT 试剂盒进行反转录获得 cDNA。采用荧光实时定量 PCR (Applied Biosystems StepOne, 美国) 检测 MMP-1、MMP-3、MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达,管家基因 GAPDH 作为内参。引物设计如表 1 所示。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 30 s,1 个循环;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火、延伸 30 s,35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对基因表达进行相对定量分析。PCR 试剂均购于大连宝生物工程有限公司。

表 1 家兔目的基因引物

Tab. 1 *Oryctolagus cuniculus* gene primer of the rabbit

基因	基因库	上游引物	下游引物	扩增产物大小/bp
MMP-1	NM_001171139	GAGGAAAATTCCAAGCAGAGAGG	GGAGTGAGGACGAACTGAGCCA	168
MMP-3	NM_001082280	GTGCGTGGCGCTTTGCTCAG	GCCACACCTGGGCTTGCGTA	253
MMP-9	NM_001082203	GTGAAGACGCAGACGGTGGATT	AGAAGCGGCTCTGGCAGAAGTA	127
TIMP-1	NM_001082232	TTTGCCTGTGCATCCATCCC	GAGCAGCCTTCAGTCTTTCCG	177
Collagen I α 1	AY633663	CATCAAGGTCTTCTGCGACA	CTTGGGGTTCTTGCTGATGT	100
GAPDH	NM_001082253	AAGGTCGGAGTGAACGGATTG	CTCGCTCTGGAAGATGGTGA	229

1.4 数据分析

实验数据以均值 \pm 标准差表示,实验重复 3 次。采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 机械牵张与 IL-1 β 联合作用上调 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达

静态对照组或单独机械牵张条件下,检测不到角膜成纤维细胞 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 的 mRNA 表达。而在静态培养条件下,采用 IL-1 β 处理后可诱导 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 的 mRNA 表达。MMP-9 mRNA 表达随时间而增加,24 h 和 36 h 后,MMP-9 mRNA 表达量分别是 12 h IL-1 β 处理静态培养组的 21 和 52 倍($P < 0.05$,见图 1(a))。MMP-1

和 MMP-3 的 mRNA 表达则随时间而降低。24 h 和 36 h 的 MMP-1 mRNA 表达量分别为 12 h IL-1 β 处理静态培养组的 87% 和 43% ($P < 0.05$,见图 1(b));MMP-3 则分别为 12 h IL-1 β 处理静态培养组的 49% 和 19% ($P < 0.05$,见图 1(c))。

15% 牵张与 IL-1 β 联合作用 12、24 和 36 h,与各自 IL-1 β 处理静态培养组比较,MMP-9 mRNA 上调了 33%、189% 和 197% ($P < 0.05$,见图 1(d));MMP-1 mRNA 分别上调了 38%、167% 和 306% ($P < 0.05$,见图 1(e));MMP-3 mRNA 分别上调了 162%、307% 和 453% ($P < 0.05$,见图 1(f))。15% 牵张与 IL-1 β 联合作用后,MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达均显著高于 IL-1 β 处理静态培养组,且具有时间依赖性。

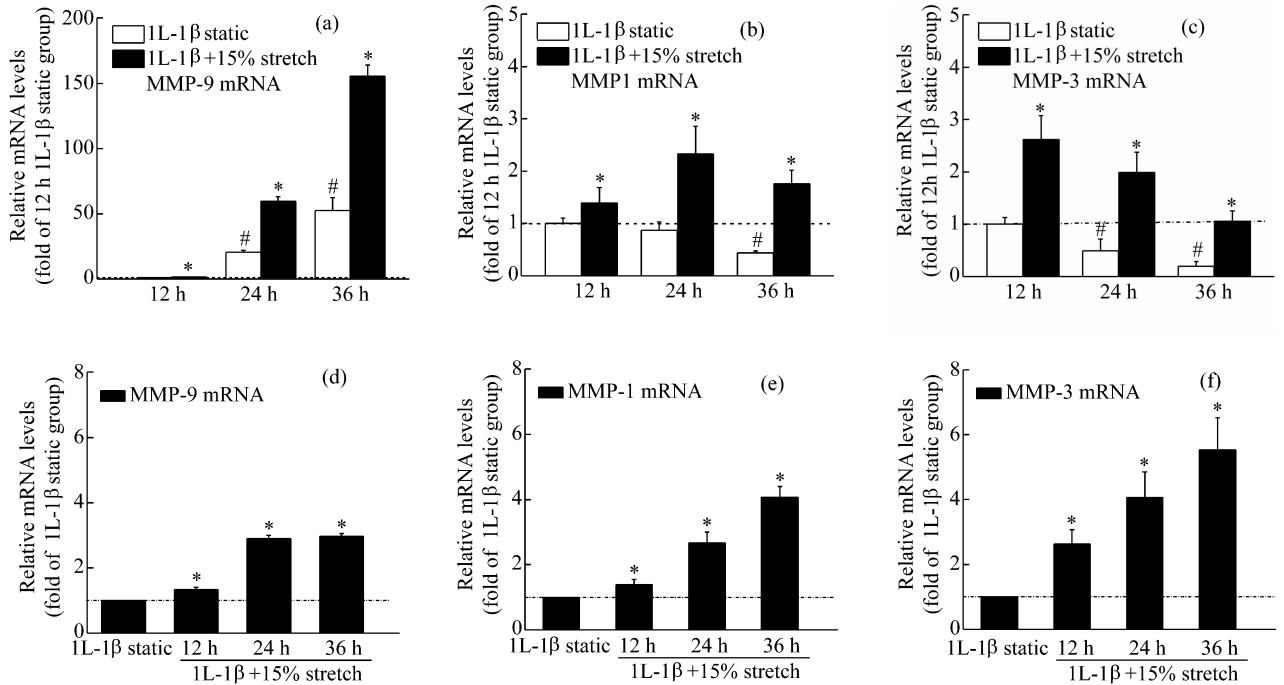


图1 IL-1 β 与机械牵张联合作用对角膜成纤维细胞 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达的影响 (a)、(b)、(c)与 12 h IL-1 β 处理静态培养组比较, MMP-9, MMP-1, MMP-3 mRNA 的相对表达水平;(d)、(e)、(f)与各自 IL-1 β 处理静态培养组比较, MMP-9, MMP-1, MMP-3 mRNA 的相对表达水平(# $P < 0.05$, 与 12 h IL-1 β 处理静态培养组比较; * $P < 0.05$, IL-1 β + 牵张组与各自 IL-1 β 处理静态培养组比较)

Fig. 1 Combined effects of IL-1 β and mechanical stretch on the expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 mRNA in corneal fibroblasts (a), (b), (c) Relative mRNA levels of MMP-9, MMP-1, MMP-3 compared to 12 h IL-1 β static group; (d), (e), (f) Relative mRNA levels of MMP-9, MMP-1, MMP-3 compared to their own IL-1 β static group

2.2 机械牵张与 IL-1 β 联合作用下调 TIMP-1 mRNA 表达

TIMP-1 可以与 MMP-9 特异性结合, 抑制 MMP-9 的活性表达。在 IL-1 β 处理静态培养条件下, 角膜成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 表达随时间增加而增加。24 h 和 36 h, TIMP-1 mRNA 表达量分别是 12 h IL-1 β 处理静态培养组的 114% 和 151% ($P < 0.05$, 见图 2(a))。但在 IL-1 β 和 15% 机械牵张联合作用下, TIMP-1 mRNA 的表达则随时间而降低, 12、24、36 h 分别为各自 IL-1 β 静态培养组的 71%、66% 和 52% ($P < 0.05$, 见图 2(b))。

2.3 机械牵张与 IL-1 β 联合作用进一步下调 Collagen I α 1 mRNA 的表达

静态培养条件下, 角膜成纤维细胞表达 Collagen I α 1 mRNA 随时间增加而增加。未给予 IL-1 β 条件下, 24 h 和 36 h, Collagen I α 1 mRNA 表达量分

别为 12 h 静态培养对照组的 120% 和 152% ($P < 0.05$)。给予 IL-1 β 处理静态培养条件下, 24 h 和 36 h, Collagen I α 1 mRNA 表达量分别为 12h IL-1 β 处理静态培养组的 141% 和 210% ($P < 0.05$)。与同一时间点静态培养对照组比较, IL-1 β 处理静态培养组 Collagen I α 1 mRNA 表达下降, 12、24 和 36 h 分别下降了 36%、31% 和 18% ($P < 0.05$, 见图 3(a))。

与各自相应静态组相比, 15% 单独牵张 12 h Collagen I α 1 mRNA 略有下降, 为静态对照组的 89%, 无统计学意义; 牵张 24 h 和 36 h, Collagen I α 1 mRNA 则明显下降, 分别为静态对照组的 80% 和 76% ($P < 0.05$)。IL-1 β 和 15% 机械牵张联合作用使 Collagen I α 1 mRNA 表达进一步下降, 12、24 和 36 h 分别为 IL-1 β 处理静态培养组的 80%、59% 和 57% ($P < 0.05$, 见图 3(b))。

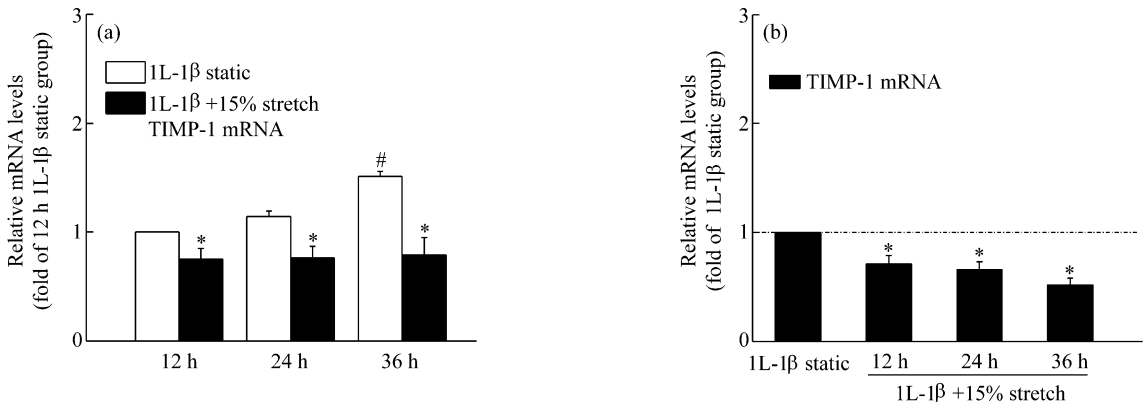


图2 IL-1 β 与机械牵张联合作用对角膜成纤维细胞TIMP-1 mRNA表达的影响 (a)与12 h IL-1 β 处理静态培养组比较,TIMP-1 mRNA的相对表达水平;(b)与各自IL-1 β 处理静态培养组比较,TIMP-1 mRNA的相对表达水平(# $P < 0.05$,与12 h IL-1 β 处理静态培养组比较; * $P < 0.05$,IL-1 β +牵张组与各自相应IL-1 β 静态培养组比较)

Fig.2 Combined effects of IL-1 β and mechanical stretch on the expression of TIMP-1 mRNA in corneal fibroblasts (a) Relative mRNA levels of TIMP-1 mRNA compared to 12h IL-1 β static group, (b) Relative mRNA levels of TIMP-1 compared to their own IL-1 β static group

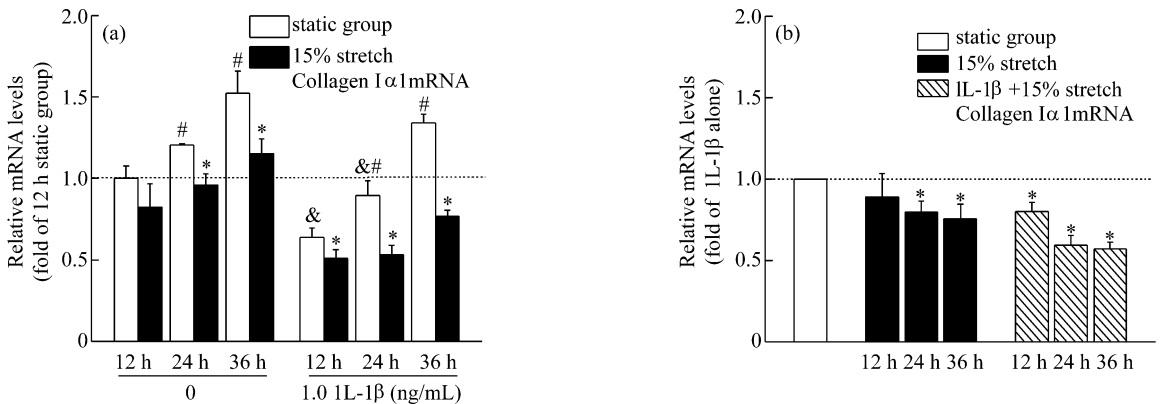


图3 IL-1 β 与机械牵张联合作用对角膜成纤维细胞Collagen I α 1 mRNA表达的影响 (a)与12 h静态培养对照组比较, Collagen I α 1 mRNA的相对表达水平;(b)与各自静态培养组比较, Collagen I α 1 mRNA的相对表达水平(# $P < 0.05$,与12h静态培养组比较; * $P < 0.05$,牵张组与各自相应静态培养组比较; & $P < 0.05$,IL-1 β 处理静态培养组与同一时间点静态培养对照组比较)

Fig.3 Combined effects of IL-1 β and mechanical stretch on the expression of Collagen I α 1 mRNA in corneal fibroblasts (a) Relative mRNA levels of Collagen I α 1 mRNA compared to 12 h static control, (b) Relative mRNA levels of Collagen I α 1 compared to their own static group

3 讨论

为什么探索角膜细胞对力学刺激的生物学响应?首先,由于眼压的作用,正常角膜会受到一定的机械牵拉,生理情况下眼压会发生周期性波动,角膜随着眼压的波动而发生周期性变形,在体角膜基质床过薄(如LASIK术过度切削、圆锥角膜)或眼压增高(如干眼症患者长期用力揉眼等)等条件下均可导致角膜所受张应力变大^[2]。其次,机械应力对不同组织基质重塑的影响已得到广泛研究^[20],且

眼组织的生长发育和结构功能均伴随机械应力的作用^[25-27]。既然角膜受力环境在一定条件下会发生改变,就有必要探索这种改变对角膜结构和组分会产生何种影响。此外,在上述角膜力学环境变化的同时常伴有炎症反应,如手术损伤会引起炎症反应;炎症因子在干眼症及圆锥角膜患者泪液或角膜组织中中长期存在,而炎症因子在组织修复机制中起着至关重要的作用。因此,本文探索了炎症因子IL-1 β 存在的情况下,角膜成纤维细胞对机械牵张的生物学响应,将有助于深入了解屈光术后角膜的损伤修复

机制以及角膜膨隆发生发展的可能机理。本研究发现,与单独 IL-1 β 作用相比,15%机械牵张与 IL-1 β 联合作用上调了 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达,同时使 TIMP-1 和 Collagen I α 1 mRNA 表达下调。

IL-1 可以上调角膜成纤维细胞胶原酶和基质金属蛋白酶等的表达。这些酶在角膜损伤修复过程中发挥了重要作用^[5-6]。本研究发现,IL-1 β 单独作用可诱导 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达,并上调 TIMP-1 mRNA 表达,同时使 Collagen I α 1 mRNA 表达下降,这与前人结果一致^[12,16-19]。此外,IL-1 β 调节 MMP-1、MMP-3、MMP-9、TIMP-1 和 Collagen I α 1 mRNA 具有时间依赖性。MMP-1 和 MMP-3 mRNA 表达随时间而降低;MMP-9、TIMP-1 及 Collagen I α 1 mRNA 表达随时间而增加,说明体外培养的角膜成纤维细胞不同基因表达时间点有差别。

15%机械牵张作用下,炎症因子 IL-1 β 对角膜成纤维细胞 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 表达的影响远大于不受机械牵张时的作用,且随时间增加效果更明显,说明炎症因子与机械牵张联合作用对角膜成纤维细胞 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达有促进作用。在其他一些组织中亦发现机械牵张与 IL-1 联合作用促进 MMPs 表达。8%牵张进一步上调 IL-1 β 诱导的人跟腱细胞 MMP-1 的基因表达^[21]。与 1 nmol/L IL-1 β 单独作用相比,0.33 Hz、5%牵张 6 h 使兔跟腱细胞 MMP-3 基因表达明显上调^[22]。单独施加 12%机械压应力,滑膜细胞 MMP-2 活性增加,但对 MMP-9 活性没有显著影响;而机械压应力与炎症因子(IL-1 α 和 TNF- α) 共同作用对 MMP-2 和 MMP-9 的活性增加则有着显著的协同作用^[24]。以上研究均表明,一定强度的机械应力和炎症因子以协同的方式共同影响 MMPs 的表达,促进组织降解。

MMPs 的活性通常受 TIMPs 的调节。TIMP-1 与 MMP-9 能够特异性结合,调节 MMP-9 的活性^[31]。MMPs 与 TIMPs 不仅参与角膜损伤后的修复^[11],并与角膜病变(如角膜炎^[32]、圆锥角膜^[33]等)密切相关,两者平衡遭到破坏可导致组织降解。力学刺激可以通过调节 MMPs 和 TIMPs 之间平衡影响眼组织重塑方向。15%周期性牵张使巩膜成纤维细胞 MMP-2 蛋白活性增加的同时 TIMP-2 基因表达下

降^[26];10%静态牵张使小梁网细胞 MMP-2 和 MMP-14 基因表达增高,TIMP-2 基因表达降低^[34]。本研究发现,IL-1 β 单独作用可促进 TIMP-1 mRNA 表达,但在 15%牵张联合作用下,TIMP-1 mRNA 表达明显下降,且随时间增加而进一步降低。同时发现 MMP-9 基因表达均显著升高,两者的平衡状态遭到破坏将促进角膜组织的降解行为。

本研究还发现,单独 15%牵张即可使 Collagen I α 1 mRNA 表达明显下调,15%牵张与 IL-1 β 共同作用使 Collagen I α 1 mRNA 表达水平进一步下降,两者具有协同作用。Collagen I α 1 mRNA 表达降低可能与 MMPs 的升高有关。I 型胶原是构成角膜的重要成分,使角膜组织具有一定的机械强度。I 型胶原的降解可使角膜的正常结构遭到破坏,角膜变薄,抗张能力降低。

综上所述,推测 LASIK 术后角膜受损或干眼症,炎症因子分泌增加。如果基质床过薄,或眼压升高,导致角膜受到较大的张应力;如果两者长期共同作用,可导致角膜 MMPs 与 TIMPs 表达失衡,I 型胶原等基质承载成分降解,角膜组织遭到破坏,力学性能下降,在眼压的作用下则可能发生膨隆。

屈光术后角膜的损伤修复过程及继发性角膜膨隆的发生发展是一个复杂的、多因素参与的过程,本研究仅仅依据生理活动引起的眼内压周期性变化和在体角膜基质床过薄(如 LASIK 术过度切削、圆锥角膜)或眼压增高(如长期用力揉眼等)等角膜张力变大的情况,对角膜成纤维细胞进行力学加载,但不能代表角膜真实的生理或病理环境,故在结果解释时需谨慎。但本研究发现,在炎症因子存在的情况下,角膜成纤维细胞通过调节 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 的表达对机械牵张做出响应,而单独机械牵张或无 IL-1 β 存在的情况下,并没有检测到 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 mRNA 的表达。在炎症等因素启动 MMPs 表达后,机械牵张对 IL-1 β 诱导的 MMPs 有放大的作用,提示当角膜所受张力增大且伴有炎症时,应考虑积极的抗炎治疗,以减少 MMPs 进一步增加引起的角膜组织降解,降低角膜膨隆发生发展的几率。

参考文献:

- ing in the cornea [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83 (4): 709-720.
- [2] Asejczyk-Widlicka M, Srodka W, Krzyzanowska-Berkowska P. The biomechanical modeling of the refractive surgery [J]. *Optik*, 2009, 120(17): 923-933.
- [3] McMonnies CW. Management of chronic habits of abnormal eye rubbing [J]. *Contact Lens Anterior Eye*, 2008, 31 (2): 95-102.
- [4] Meghpara B, Nakamura H, Macsai M, *et al.* Keratectasia after laser in situ keratomileusis a histopathologic and immunohistochemical study [J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126 (12): 1655-1663.
- [5] Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, *et al.* The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2001, 20(5): 625-637.
- [6] Wilson SE, Esposito A. Focus on molecules: interleukin-1: A master regulator of the corneal response to injury [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89(2): 124-125.
- [7] Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1949-1957.
- [8] Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eye [J]. *Ocul Surf*, 2004, 2(2): 124-130.
- [9] Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 439-442
- [10] Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, *et al.* Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK) [J]. *Cornea*, 2002, 21(1): 95-100.
- [11] Mulholland B, Tuft SJ, Khaw PT. Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing [J]. *Eye*, 2005, 19(5): 584-588.
- [12] Xue ML, Wakefield D, Willcox MD, *et al.* Regulation of MMPs and TIMPs by IL-1beta during corneal ulceration and infection [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5): 2020-2025.
- [13] Maguen E, Maguen B, Regev L, *et al.* Immunohistochemical evaluation of two corneal buttons with post-LASIK keratectasia [J]. *Cornea*, 2007, 26(8): 983-991.
- [14] Maguen E, Rabinowitz YS, Regev L, *et al.* Alterations of extracellular matrix components and proteinases in human corneal buttons with INTACS for post-laser in situ keratomileusis keratectasia and keratoconus [J]. *Cornea*, 2008, 27(5): 565-573.
- [15] Esquenazi S, Esquenazi I, Grunstein L, *et al.* Immunohistological evaluation of the healing response at the flap interface in patients with LASIK ectasia requiring penetrating Keratoplasty [J]. *J Refract Surg*, 2009, 25(8): 739-746.
- [16] Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor- β and Interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32(9): 2441-2454.
- [17] Lu Y, Fukuda K, Liu Y, *et al.* Dexamethasone inhibition of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9): 2998-3004.
- [18] Lu Y, Fukuda K, Li Q, *et al.* Role of nuclear factor-kB in interleukin-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 560-568.
- [19] Zhou H, Kimura K, Orita T, *et al.* Inhibition by medroxyprogesterone acetate of interleukin-1 β -induced collagen degradation by corneal fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7): 4213-4219.
- [20] 吕守芹, 杨帆, 龙勉. 细胞-分子生物力学研究进展[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(2): 79-84.
- Lv SQ, Yang F, Long M. Advances in study on cellular and molecular biomechanics [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(2): 79-84.
- [21] Yang G, Im HJ, Wang JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 β induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts [J]. *Gene*, 2005, 363: 166-172.
- [22] Archambault J, Tszuzaki M, Herzog W, *et al.* Stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(1): 36-39.
- [23] Wang YQ, Tang ZY, Xue RY, *et al.* Combined Effects of TNF- α , IL-1 β , and HIF-1 α on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: An in vitro study [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(7): 1008-1014.
- [24] 王业全, 陈文琦, 钱宇娜, 等. 机械压应力作用下 IL-1 α 与 TNF- α 对滑膜细胞 MMP-2, -9 活性的影响[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(3): 165-168.
- Wang YQ, Chen WQ, Qian YN, *et al.* Effects of IL-1 α and TNF- α on the activities of MMP-2, -9 under mechanical compression in human synoviocytes [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(3): 165-168.
- [25] WuDunn D. Mechanobiology of trabecular meshwork cells [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(4): 718-723.
- [26] Shelton L, Rada JS. Effects of cyclic mechanical stretch on extracellular matrix synthesis by human scleral fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(2): 314-322.
- [27] Cui W, Bryant MR, Sweet PM, *et al.* Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(2): 275-284.
- [28] Wang JH, Thampatty BP, Lin JS, *et al.* Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts [J]. *Gene*, 2007, 391 (1-2): 1-15.