

肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 在结膜松弛症发病中的炎症机制及意义

柯梅青 张兴儒 周桂贞 马艳春 李青松 项敏泓

200062 上海中医药大学附属普陀医院眼科(柯梅青、张兴儒、周桂贞、李青松、项敏泓), 中心实验室(马艳春)

通信作者:张兴儒, Email: zhangxingru928@163. com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 04. 009

【摘要】 背景 结膜松弛症(CCh)是年龄相关性眼表疾病,研究发现 CCh 患者结膜组织及泪液中炎症细胞因子表达升高,推测炎症细胞因子可能参与 CCh 的发病,但其作用机制尚未完全阐明。研究还发现 CCh 患者结膜组织中基质金属蛋白酶(MMPs)的表达上调,而炎症因子与 MMPs 在 CCh 发病中是否有关联尚不清楚。目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 1β (IL- 1β)对 CCh 患者结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3 及 TNF- α 刺激产生的肿瘤坏死因子刺激基因 6(TSG-6)和穿透素 3(PTX3)表达的影响。方法 采用组织块培养法分别对 CCh 和白内障患者手术中采集的结膜组织进行培养,将培养的 2 种结膜成纤维组织各分为 3 个组,分别用含 20 ng/ml 的 PBS、TNF- α 或 IL- 1β 的细胞全培养基培养细胞 4 h,分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 及其蛋白的表达。结果 倒置显微镜下可见第 2 代细胞的形态和大小一致,为长梭形,呈放射状排列,细胞核呈卵圆形,细胞突起相互交联。CCh 组和白内障组间用 PBS、TNF- α 和 IL- 1β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义(MMP-1 mRNA: $F_{\text{分组}} = 2.611, P = 0.116; F_{\text{干预}} = 161.564, P = 0.000$; MMP-3 mRNA: $F_{\text{分组}} = 5.201, P = 0.029; F_{\text{干预}} = 211.021, P = 0.000$; TSG-6 mRNA: $F_{\text{分组}} = 47.209, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 119.340, P = 0.000$; PTX3 mRNA: $F_{\text{分组}} = 40.512, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 93.935, P = 0.000$)。与白内障组 PBS 干预后比较,CCh 组 PBS 干预后 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 的相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 CCh 组 PBS 干预后比较,CCh 组 TNF- α 和 IL- 1β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 的相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与白内障组 PBS 干预后比较,白内障组 TNF- α 和 IL- 1β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 相对表达量明显增高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。CCh 组和白内障组间用 PBS、TNF- α 和 IL- 1β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义(MMP-1: $F_{\text{分组}} = 84.702, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 48.900, P = 0.000$; MMP-3: $F_{\text{分组}} = 112.818, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 194.980, P = 0.000$; TSG-6: $F_{\text{分组}} = 56.867, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 70.356, P = 0.000$; PTX3: $F_{\text{分组}} = 1.488, P = 0.231; F_{\text{干预}} = 89.872, P = 0.000$)。各组细胞用 PBS、TNF- α 和 IL- 1β 干预后 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量的组间比较与其基因表达趋势一致。结论 CCh 患者结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 的表达量增加;TNF- α 和 IL- 1β 均可上调 CCh 结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 的表达。

【关键词】 结膜松弛症; 炎症; 炎症细胞因子; 基质金属蛋白酶; 肿瘤坏死因子刺激基因 6; 穿透素 3; 细胞培养; 人

基金项目:上海市卫生局科研基金项目(20124415)

Inflammatory mechanism and significance of tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β in pathogenesis of conjunctivochalasis Ke Meiqing, Zhang Xingru, Zhou Guizhen, Ma Yanchun, Li Qingsong, Xiang Minhong

Department of Ophthalmology (Ke MQ, Zhang XR, Zhou GZ, Li QS, Xiang MH), Central Laboratory (Ma YC), Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Corresponding author: Zhang Xingru, Email: zhangxingru928@163. com

【Abstract】 Background Conjunctivochalasis (CCh) is a common age-related ocular surface diseases. Researches showed that the inflammatory factors are upregulated in conjunctiva and tear of CCh patients, inferring inflammation participates in the pathogenesis of CCh, however, its mechanism is unclear now. Studies also showed that the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in CCh conjunctiva is elevated. However, the association between

inflammatory factors and MMPs is unknown. **Objective** This research was to observe the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) on the expression of MMP-1, MMP-3, tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) and pentraxin-3 (PTX3) in cultured CCh fibroblasts. **Methods** Conjunctival fibroblasts were isolated and cultured from CCh-derived and cataract-derived human conjunctiva explants. The cells were treated using 20 ng/ml PBS, TNF- α or IL-1 β for 4 hours, respectively. The expression levels of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 genes and proteins were detected by quantitative real time PCR and Western blot assay, respectively. **Results** The second-generation cells showed a long and fusiform shape with ovoid nucleus and radial agreement, and the cell processors connected each other. The differences of the relative expression levels of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 mRNA in the cells were significantly different between CCh group and cataract group after being treated by PBS, TNF- α and IL-1 β (MMP-1 mRNA: $F_{\text{group}} = 2.611, P = 0.116; F_{\text{intervene}} = 161.564, P = 0.000$; MMP-3 mRNA: $F_{\text{group}} = 5.201, P = 0.029; F_{\text{intervene}} = 211.021, P = 0.000$; TSG-6 mRNA: $F_{\text{group}} = 47.209, P = 0.000; F_{\text{intervene}} = 119.340, P = 0.000$; PTX3 mRNA: $F_{\text{group}} = 40.512, P = 0.000; F_{\text{intervene}} = 93.935, P = 0.000$). Compared with the cataract group with PBS treatment, the expression levels of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 mRNA were significantly elevated in the CCh group with PBS treatment or the cataract group with TNF- α and IL-1 β treatment (all at $P < 0.05$). Compared with the CCh group with PBS treatment, the expression levels of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 mRNA were significantly elevated in the CCh group with TNF- α and IL-1 β treatment (all at $P < 0.05$). The differences of the relative expression levels of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 proteins in the cells were significantly different between CCh group and cataract group after being treated by PBS, TNF- α and IL-1 β (MMP-1: $F_{\text{group}} = 84.702, P = 0.000; F_{\text{intervene}} = 48.900, P = 0.000$; MMP-3: $F_{\text{group}} = 112.818, P = 0.000; F_{\text{intervene}} = 194.980, P = 0.000$; TSG-6: $F_{\text{group}} = 56.867, P = 0.000; F_{\text{intervene}} = 70.356, P = 0.000$; PTX3: $F_{\text{group}} = 1.488, P = 0.231; F_{\text{intervene}} = 89.872, P = 0.000$), and the expression changes of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 proteins were coincident with the genes among the groups with various treatments. **Conclusions** The expressions of MMP-1, MMP-3, TSG-6 and PTX3 in conjunctival fibroblasts are upregulated in CCh eyes. The interaction of TNF- α and IL-1 β with MMPs is probably involved with the pathogenesis and development MMPs probably.

[Key words] Conjunctivochalasis; Inflammation; Inflammatory cytokines; Matrix metalloproteinases; Tumor necrosis factor-stimulated gene-6; Pentraxin-3; Cells cultured; Humans

Fund program: Shanghai Municipal Health Bureau Research Project (20124415)

结膜松弛症 (conjunctivochalasis, CCh) 是球结膜过度松弛堆积在睑缘及内外眦之间而形成皱褶,引起眼表泪液学异常,并伴有眼部干涩、异物感、溢泪等不适症状的眼表疾病。CCh 常伴有不同程度的角膜炎、睑板腺炎、干眼以及相关眼表炎症,患者泪液中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎性细胞因子呈高表达^[1-5],提示炎症过程参与 CCh 的发生和发展,但这些炎性因子在 CCh 发病中的作用机制仍不清楚。研究发现 CCh 组织及泪液中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达上调,其与金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 的比例失衡,导致弹性纤维变性、胶原纤维溶解、细胞外基质降解,引起结膜松弛^[5-10]。TNF- α 刺激产生的肿瘤坏死因子刺激基因 6 (tumor necrosis factor-stimulated gene-6, TSG-6) 和穿透素 3 (pentraxin-3, PTX3) 是新近发现的组织炎症反应标志物,在多数正常组织中不表达,但在炎症性疾病的组织中表达上调,发挥炎症保护作用,并能抑制 MMPs 活性,参与细胞外基质的重建^[11-14]。有研究证实,结膜松弛症局部组织

中 TSG-6 和 PTX3 表达量上调,体外培养的结膜松弛症患者结膜囊成纤维细胞分泌的 TSG-6 和 PTX3 蛋白增加, TSG-6 和 PTX3 参与 CCh 的发病过程^[15],而目前有关炎性因子与 MMPs 关系的研究鲜见报道。本研究检测 TNF- α 和 IL-1 β 对结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 表达的影响,探讨 TNF- α 和 IL-1 β 在 CCh 中的炎症机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 纳入 2014 年 6—12 月于上海中医药大学附属普陀医院眼科拟行新月形松弛结膜切除术的 CCh 患者 10 例 10 眼,其中男 3 例,女 7 例;年龄 43~72 岁,平均 (64.00 \pm 9.01) 岁。同期纳入年龄匹配的拟行白内障超声乳化手术的年龄相关性白内障患者 10 例 10 眼,其中男 6 例,女 4 例;年龄 51~71 岁,平均 (63.00 \pm 6.38) 岁。CCh 诊断参照文献 [16] 中的标准并符合 CCh 手术适应证^[17]。分别于手术中收集结膜组织标本,均取 CCh 患者距角膜缘后 5~6 mm、正下方 6:00 位的球结膜组织,大小为 1.0 mm \times 1.5 mm,年龄

相关性白内障患者球结膜取材区域为下睑覆盖区。本研究遵循赫尔辛基宣言,该研究获得上海中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准(普伦审[2010]7号),患者进入研究组前均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、青-链霉素溶液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶溶液(含质量分数 0.02% EDTA)(美国 Gibco 公司);胎牛血清、成纤维细胞生长添加物(fibroblasts growth supplement, FGS)(美国 ScienCell 公司);TNF- α 、IL-1 β (美国 PeproTech 公司);Trizol(日本 TaKaRa 公司);cDNA 第一条链合成试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(瑞士罗氏公司);引物、荧光探针(MMP-1、MMP-3、TSG-6、PTX3、GAPDH)(上海生工公司);兔抗人 MMP-1 单克隆抗体(ab52631)、兔抗人 MMP-3 单克隆抗体(ab52915)(英国 Abcam 公司);小鼠抗人 TSG-6 单克隆抗体(sc-377277)、小鼠抗人 PTX3 单克隆抗体(sc-373951)(美国 Santa Cruz 公司);HRP 标记的马抗小鼠 IgG 二抗(#7076)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(#7074)(美国 CST 公司);RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、BeyoECL Plus(上海碧云天公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(美国 Sigma 公司)。CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);超净工作台(中国安泰公司);低温高速离心机、分光光度计、梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);酶标检测仪、垂直电泳槽、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);化学发光分析系统仪(上海培清公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织块贴壁法原代培养结膜成纤维细胞 参照韩竹梅等^[18]描述的结膜成纤维细胞培养方法,将手术中切取各组球结膜组织用质量分数 0.9% 生理盐水漂洗 3 遍,用眼科显微剪刀将组织剪成 0.58 mm × 0.58 mm ~ 1.00 mm × 1.00 mm,平铺于 6 孔板内,将 6 孔板方向调整至底面向上,然后置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中,待组织块周边接近干燥(1 ~ 3 min)时将 6 孔板翻转,于超净台中缓慢加入 3 ml 含质量分数 10% BSA、体积分数 1% 青链霉素双抗和质量分数 1% FGS 的完全培养基继续培养,勿使组织浮起,每 3 天换液 1 次,倒置显微镜下观察细胞贴壁及生长情况。

1.2.2 实验分组 将第 3 ~ 6 代 90% 融合的对数生长期 CCh 来源和年龄相关性白内障来源的结膜成纤维细胞分别用 PBS、TNF- α 和 IL-1 β 处理,于无血清培养基中培养后 24 h 在 CCh 组和白内障组细胞中分别加入含 20 ng/ml 的 PBS、TNF- α 或 IL-1 β 的完全培养

基,继续培养 4 h。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 的相对表达量 分别提取各组结膜成纤维细胞的 RNA,以 oligdT18 为引物,以提取的 RNA 为模板(1 μ g)合成 cDNA 第一链;总反应体系为 20 μ l,包括 10 倍 PCR 缓冲液 10 μ l,上下游引物各 1 μ l,荧光探针 1 μ l,cDNA 模板 1 μ l 及 PCR 级 ddH₂O 6 μ l。反应条件:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 反应 30 s,共 40 个循环。样品和内参均设复孔,实验重复操作 3 次,引物探针由上海生工生物工程有限公司合成,引物探针序列见表 1。以 GAPDH 为内参照,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各目的蛋白的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 目的基因引物序列及产物长度

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
MMP-1	F:GATGTGGAGTGCCTGATGTG	207
	R:TGATGTCTGCTTGACCCTCA	
	探针:TGGGAGCAAACACATCTGACCTACAGG	
MMP-3	F:TCTGGGAAGAGGTGACTCCA	181
	R:TCATCATCAAAGTGGGCATC	
	探针:TCCAGGCTGTATGAAGGAGAGGCTGAT	
TSG-6	F:TCACATTTGAGCCACTGCTC	214
	R:GTATTTGCCAGACCCGTCTT	
	探针:TGCTATGGGAAGACACTCAAGGATGGG	
PTX3	F:TGAGACCAATGAGGCTTGAG	158
	R:TCCACCCACCACAAACACTA	
	探针:TGCATTTGGGTCAAAGCCACAGATGTA	
GAPDH	F:TGGTATCGTGAAGGACTCA	132
	R:CCAGTAGAGGCAGGGATGAT	
	探针:ATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGAT	

注:MMP:基质金属蛋白酶;TSG:肿瘤坏死因子刺激基因;PTX:穿透素;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白的相对表达量 提取 CCh 组和白内障组用不同因子培养的结膜成纤维细胞,BCA 法检测各组细胞中相应蛋白质质量浓度,并调整各组蛋白质质量浓度至相同水平,蛋白变性后各组各取 50 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,上层胶设定为质量分数 5%,电压 80 V,下层胶设定为质量分数 10%,电压 80 V,下层胶电压 100 V,垂直电泳 1.5 h。半干式转膜 1 h,电压 15 V,将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% BSA 室温封闭 2 h,滴加相应一抗(MMP-1、MMP-3 为 1:1 000;TSG-6、PTX3 为 1:100)4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 4 次,每次 10 min;滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000)室温下孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,再用 TBS 漂洗 10 min;ECL 化学发光法曝光,化学发光分析系统拍照。以 GAPDH

为内参,采用 Image J 分析软件对条带进行半定量分析,计算 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 IMB 公司)进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。同一指标组间数据资料均数经 Levene 检验方差齐。CCh 组与白内障组 PBS、TNF- α 和 IL-1 β 干预后结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 及其蛋白相对表达量的总体比较采用区组设计两因素方差分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的结膜成纤维细胞形态

倒置显微镜下观察显示,CCh 来源的组织块培养 2~5 d 后紧密贴附于 6 孔板,组织块透亮性差,呈暗黑色避光区域,周围有细胞移出(图 1A),培养后 10~15 d 可见细胞增生,组织块周围的细胞逐渐向周围扩散,细胞呈马赛克样,界线不清。培养后 20 d 细胞长满并紧密接触(图 1B)。第 2 代细胞的形态和大小一致,为梭形或两头尖的长条状纤维样细胞,呈放射状排列,细胞核呈卵圆形,细胞突起长短不等并相互交联(图 1C)。本研究取 10 例结膜组织进行原代培养,因培养过程中有 4 例出现后期生长状态不佳,提取的 mRNA 及蛋白质不够后续实验,故将其舍弃,仅对其余 6 例结膜组织实验结果进行分析。

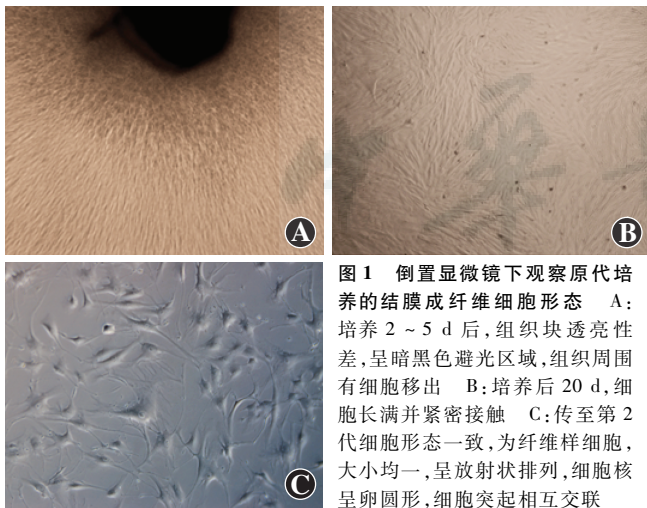


图 1 倒置显微镜下观察原代培养的结膜成纤维细胞形态 A: 培养 2~5 d 后,组织块透亮性差,呈暗黑色避光区域,组织周围有细胞移出 B: 培养后 20 d,细胞长满并紧密接触 C: 传至第 2 代细胞形态一致,为纤维样细胞,大小均一,呈放射状排列,细胞核呈卵圆形,细胞突起相互交联

2.2 各组结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 相对表达量的比较

CCh 组和白内障组用 PBS、TNF- α 、IL-1 β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义(MMP-1 mRNA:

$F_{\text{分组}} = 2.611, P = 0.116; F_{\text{干预}} = 161.564, P = 0.000$. MMP-3 mRNA: $F_{\text{分组}} = 5.201, P = 0.029; F_{\text{干预}} = 211.021, P = 0.000$. TSG-6 mRNA: $F_{\text{分组}} = 47.209, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 119.340, P = 0.000$. PTX3 mRNA: $F_{\text{分组}} = 40.512, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 93.935, P = 0.000$)。PBS 干预后,CCh 组 MMP-1、MMP-3 和 TSG-6、PTX3 mRNA 相对表达量明显高于白内障组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);TNF- α 和 IL-1 β 干预后 CCh 组成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 的相对表达量显著高于 PBS 干预后的 CCh 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);白内障组 TNF- α 和 IL-1 β 干预后成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 mRNA 相对表达量显著高于白内障组 PBS 干预后,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2~5)。

表 2 各组用不同因子干预后细胞中 MMP-1 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 MMP-1 mRNA 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	1.02 \pm 0.08	2.37 \pm 0.18 ^a	3.00 \pm 0.11 ^a
白内障组	6	0.28 \pm 0.05 ^b	2.90 \pm 0.13 ^a	3.84 \pm 0.19 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 2.611, P = 0.116; F_{\text{干预}} = 161.564, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较,^a $P < 0.05$;与 PBS 干预的 CCh 组比较,^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析,LSD- t 检验) MMP:基质金属蛋白酶;CCh:结膜松弛症;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素

表 3 各组用不同因子干预后细胞中 MMP-3 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 MMP-3 mRNA 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	1.01 \pm 0.13	2.63 \pm 0.37 ^a	3.78 \pm 0.42 ^a
白内障组	6	0.23 \pm 0.06 ^b	2.70 \pm 0.37 ^a	3.64 \pm 0.43 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 5.201, P = 0.029; F_{\text{干预}} = 211.021, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较,^a $P < 0.05$;与 PBS 干预的 CCh 组比较,^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析,LSD- t 检验) MMP:基质金属蛋白酶;CCh:结膜松弛症;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素

表 4 各组用不同因子干预后细胞中 TSG-6 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 TSG-6 mRNA 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	1.02 \pm 0.06	5.59 \pm 0.29 ^a	7.31 \pm 0.17 ^a
白内障组	6	0.46 \pm 0.03 ^b	11.06 \pm 0.22 ^a	13.46 \pm 0.27 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 47.209, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 119.340, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较,^a $P < 0.05$;与 PBS 干预的 CCh 组比较,^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析,LSD- t 检验) TSG:肿瘤坏死因子刺激基因;CCh:结膜松弛症;TNF:肿瘤坏死因子;IL:白细胞介素

表 5 各组用不同因子干预后细胞中 PTX3 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 PTX3 mRNA 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	1.04 \pm 0.06	4.51 \pm 0.24 ^a	5.43 \pm 0.30 ^a
白内障组	6	0.34 \pm 0.05 ^a	8.99 \pm 0.20 ^b	10.52 \pm 0.20 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 40.512, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 93.935, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 干预的 CCh 组比较, ^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) PTX: 穿透素; CCh: 结膜松弛症; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素

表 6 各组用不同因子干预后细胞中 MMP-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 MMP-1 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	0.57 \pm 0.10	0.84 \pm 0.11 ^a	1.10 \pm 0.12 ^a
白内障组	6	0.17 \pm 0.06 ^b	0.57 \pm 0.05 ^a	0.62 \pm 0.21 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 84.702, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 48.900, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 干预的 CCh 组比较, ^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) MMP: 基质金属蛋白酶; CCh: 结膜松弛症; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素

2.3 各组结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量的比较

不同因子干预后 CCh 组和白内障组 MMP-1、MMP-3 和 TSG-6 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 (MMP-1: $F_{\text{分组}} = 84.702, P = 0.000$; MMP-3: $F_{\text{分组}} = 112.818, P = 0.000$; TSG-6: $F_{\text{分组}} = 56.867, P = 0.000$), 不同因子干预后 CCh 组和白内障组 PTX3 蛋白相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 1.488, P = 0.231$), PBS 干预后, CCh 组细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白的相对表达量明显高于白内障组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 各组经 PBS、TNF- α 、IL-1 β 干预后 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 (MMP-1: $F_{\text{干预}} = 48.900, P = 0.000$; MMP-3: $F_{\text{干预}} = 194.980, P = 0.000$; TSG-6: $F_{\text{干预}} = 70.356, P = 0.000$; PTX3: $F_{\text{干预}} = 89.872, P = 0.000$), CCh 组 TNF- α 和 IL-1 β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白相对表达量显著高于 PBS 干预后, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 白内障组 TNF- α 和 IL-1 β 干预后细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白的相对表达量显著高于 PBS 干预后, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2, 表 6~9)。

表 7 各组用不同因子干预后细胞中 MMP-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 MMP-3 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	0.43 \pm 0.03	0.78 \pm 0.02 ^a	0.57 \pm 0.04 ^a
白内障组	6	0.23 \pm 0.04 ^b	0.60 \pm 0.03 ^a	0.49 \pm 0.04 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 112.818, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 194.980, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 干预的 CCh 组比较, ^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) MMP: 基质金属蛋白酶; CCh: 结膜松弛症; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素

表 8 各组用不同因子干预后细胞中 TSG-6 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 TSG-6 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	0.48 \pm 0.17	0.78 \pm 0.07 ^a	0.70 \pm 0.06 ^a
白内障组	6	0.25 \pm 0.04 ^b	0.50 \pm 0.01 ^a	0.67 \pm 0.03 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 56.867, P = 0.000; F_{\text{干预}} = 70.356, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 干预的 CCh 组比较, ^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) TSG: 肿瘤坏死因子刺激基因; CCh: 结膜松弛症; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素

表 9 各组用不同因子干预后细胞中 PTX3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同因子干预后 PTX3 相对表达量		
		PBS	TNF- α	IL-1 β
CCh 组	6	0.52 \pm 0.09	0.70 \pm 0.02 ^a	0.89 \pm 0.04 ^a
白内障组	6	0.31 \pm 0.03 ^b	0.79 \pm 0.10 ^a	0.91 \pm 0.06 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 1.488, P = 0.231; F_{\text{干预}} = 89.872, P = 0.000$. 与各自组内 PBS 干预后比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 干预的 CCh 组比较, ^b $P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) PTX: 穿透素; CCh: 结膜松弛症; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素

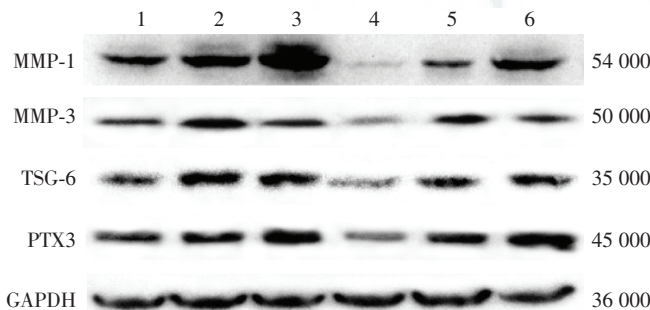


图 2 Western blot 法检测各组结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 蛋白表达 1: CCh 组 PBS 干预后 2: CCh 组 TNF- α 干预后 3: CCh 组 IL-1 β 干预后 4: 白内障组 PBS 干预后 5: 白内障组 TNF- α 干预后 6: 白内障组 IL-1 β 干预后 MMP: 基质金属蛋白酶; TSG: 肿瘤坏死因子刺激基因; PTX: 穿透素

3 讨论

已有研究表明, CCh 患者结膜组织中 MMP-1、MMP-3 呈高表达状态^[6-10], 本研究的结果显示, CCh 患者结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3 mRNA 和蛋白

的相对表达量均明显高于白内障组,验证了先前的研究结果,进一步证实 CCh 细胞外基质及 Tenon 囊的溶解、变薄与 MMPs 的过表达有关。此外,本研究中结果显示成纤维细胞中 TSG-6 和 PTX3 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于白内障组,与韩竹梅等^[15]的研究结果一致,进一步证实 TSG-6 和 PTX3 参与 CCh 的发病过程。TSG-6 在正常组织中不表达,但在炎症细胞因子及有关因素的刺激下组织中 TSG-6 表达升高,因此被认为是一个保护性炎症反应蛋白,在多种炎症反应过程中起负反馈调节作用。多项研究证实 TSG-6 可与丝氨酸蛋白酶抑制剂 I α I 蛋白形成稳定复合物,通过抑制 MMPs 的活化来发挥抗炎作用^[11-12];此外,TSG-6 可与透明质酸、硫酸软骨素、蛋白聚糖聚合物以及丝氨酸蛋白酶抑制剂等结合,参与细胞外基质的重建^[12]。PTX3 又称 TSG-14,当机体受到损伤或发生炎症反应时主要由树突状细胞、巨噬细胞、纤维母细胞、激活的内皮细胞等骨髓源细胞所产生。作为一种可溶性模式识别受体,PTX3 可与多种可溶性受体配体相结合,进而参与免疫防御、调节炎症反应、细胞凋亡、细胞外基质的重建等多种生物效应,能反映局部组织的炎症及损伤状态^[13-14]。

本研究还发现,TNF- α 和 IL-1 β 可进一步上调 CCh 及单纯白内障结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3 和 TSG-6、PTX3 mRNA 及蛋白的表达。CCh 松弛结膜堆积在睑缘及内外眦部之间,引起泪液动力学异常,泪液清除延迟^[19-20],IL-1 β 、TNF- α 等降解酶在泪液中蓄积,CCh 泪液中高质量浓度的炎症细胞因子对眼表存在长期作用,导致 CCh MMPs、TSG-6 和 PTX3 的过表达^[1-5,8-9];进而引起其转录、翻译水平的表达失衡,导致降解酶合成增加,酶活性增强,引起细胞外基质及 Tenon 囊的降解,促进 CCh 的发生和发展,进一步加重眼表炎症,形成恶性循环。在脑胶质瘤及真皮成纤维细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 可通过激活核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 细胞信号通路而上调 MMPs、TSG-6 和 PTX3 的表达^[21-22],在关节炎中 NF- κ B 可介导 IL-1 β 激活 MMPs 发挥降解作用,NF- κ B 抑制剂 I κ B α 可抑制 NF- κ B 活性,减轻 MMP-1、MMP-3 引起的类风湿炎症及组织损伤,阻断 NF- κ B 细胞信号传导通路亦可抑制 PTX3 的合成^[23],但 TNF- α 和 IL-1 β 上调结膜成纤维细胞表达 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 的细胞信号通路暂无相关研究报道,因此 TNF- α 及 IL-1 β 是否与关节炎、脑胶质瘤细胞等疾病一样通过 NF- κ B 细胞信号通路介导调节结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 基因的转录和表达有

待进一步研究。TSG-6 和 PTX3 在 CCh 中是否可抑制 MMPs 活性而发挥炎症调节作用亦或是通过其他途径参与 CCh 的发病机制尚不清楚,这是进一步研究 CCh 发病机制的方向之一。

本研究通过探讨炎症细胞因子对 CCh 患者结膜成纤维细胞中 MMPs、TSG-6 及 PTX3 表达的影响,验证了炎症反应参与 CCh 的发病过程,并发现 TNF- α 和 IL-1 β 可通过抑制 MMPs 诱导细胞外基质的降解,这个结果对临床治疗 CCh 具有参考意义,也为今后进一步研究阻断 CCh 结膜组织中 MMPs 的表达及活化提供了新的思路。但本研究也存在一定的局限性:(1)本研究中纳入的样本量尚不够大,今后的研究中可增加样本量并对 CCh 进行分级研究,进一步细化 CCh 的严重程度与炎症反应的关系;(2)文献报道,20 ng/ml 质量浓度的 TNF- α 和 IL-1 β 对真皮成纤维细胞蛋白表达的影响最显著^[17],因此本研究借鉴该浓度探讨 TNF- α 和 IL-1 β 对 CCh 结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 表达的影响,但暂不能明确不同质量浓度的 TNF- α 和 IL-1 β 对其表达是否存在差异。

综上所述,本研究显示 CCh 可能与炎症反应有关,CCh 患者眼表中的炎症细胞因子可能刺激结膜成纤维细胞中 MMP-1、MMP-3、TSG-6 和 PTX3 的表达,导致炎症和 Tenon 囊细胞外基质降解之间的相互作用,促进 CCh 的发生和进展。然而,CCh 所伴随的炎症反应是原发性还是 CCh 的伴随症状、炎症反应参与了 CCh 发病的全过程还是 CCh 某一阶段的表现以及炎症与 MMPs 表达间的相互作用问题还需进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang XR, Xiang MH, Wu QQ, et al. The tear proteomics analysis of conjunctivochalasis[J]. Spektrum der Augenheilkund, 2008, 22(5): 288-294.
- [2] Erdogan-Poyraz C, Mocan MC, Bozkurt B, et al. Elevated tear interleukin-8 levels in patients with conjunctivochalasis [J]. Cornea, 2009, 28(2): 189-193. DOI:10.1097/ICO.0b013e3181861d0c.
- [3] 项敏泓,张兴儒,张迅轶,等.结膜松弛症泪液中细胞因子的检测[J].国际眼科杂志,2010,10(9):1702-1703. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.020.
- [4] Xiang MH, Zhang XR, Zhang XY, et al. Tears cytokines in conjunctivochalasis[J]. Int J Ophthalmol, 2010, 10(9): 1702-1703. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.020.
- [5] Acera A, Suárez T, Rodríguez-Agirretxe I, et al. Changes in tear protein profile in patients with conjunctivochalasis [J]. Cornea, 2011, 30(1): 42-49. DOI:10.1097/ICO.0b013e3181dea7d7.
- [6] Acera A, Vecino E, Duran JA. Tear MMP-9 levels as a marker of ocular surface inflammation in conjunctivochalasis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(13): 8285-8291. DOI:10.1167/iovs.13-12235.
- [7] 李青松,张兴儒,项敏泓,等.基质金属蛋白酶在结膜松弛症球结膜组织中的表达[J].中华眼科杂志,2010,46(9):838-840. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.09.014.
- [8] 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) : 665-669. DOI: 10.3109/02713681003770738.
- [8] Guo P, Zhang SZ, He H, et al. TSG-6 controls transcription and activation of matrix metalloproteinase 1 in conjunctivochalasis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3) : 1372-1380. DOI: 10.1167/iov.11-8738.
- [9] Guo P, Zhang SZ, He H, et al. PTX3 controls activation of matrix metalloproteinase 1 and apoptosis in conjunctivochalasis fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7) : 3414-3423. DOI: 10.1167/iov.11-9103.
- [10] 韩竹梅, 张兴儒, 柯梅青, 等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂在结膜松弛症成纤维细胞中的表达 [J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2013, 13(6) : 365-367.
Han ZM, Zhang XR, Ke MQ, et al. Study of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) expression in fibroblasts of conjunctivochalasis [J]. *Chin J Ophthalmol Otorhinol*, 2013, 13(6) : 365-367.
- [11] Wisniewski HG, Vilcek J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997, 8(2) : 143-156.
- [12] Stöve J, Huch K, Günther KP, et al. Interleukin-1 beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes *in vitro* [J]. *Pathobiology*, 2000, 68(3) : 144-149.
- [13] Wisniewski HG, Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(2-3) : 129-146.
- [14] Bottazzi B, Garlanda C, Cotena A, et al. The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity [J]. *Immunol Rev*, 2009, 227(1) : 9-18. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00719.x.
- [15] 韩竹梅, 张振永, 张兴儒, 等. 结膜松弛症患者结膜成纤维细胞中穿透素 3 和肿瘤坏死因子- α 刺激基因 6 的表达 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(5) : 436-439. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.010.
Han ZM, Zhang ZY, Zhang XR, et al. Expressions of pentraxin-3 and tumor necrosis factor- α stimulated gene-6 proteins in fibroblasts of conjunctivochalasis patients [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(5) : 436-439. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.010.
- [16] Zhang XR, Zou HD, Li QS, et al. Comparison study of two diagnostic and grading systems for conjunctivochalasis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(16) : 3118-3123.
- [17] 张兴儒, 李青松, 项敏泓. 结膜松弛症的诊断与治疗 [J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(1) : 88-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.01.024.
- [18] 韩竹梅, 张兴儒, 张隆, 等. 结膜松弛症患者球结膜成纤维细胞的培养和鉴定 [J]. *眼科*, 2013, 22(2) : 105-109.
Han ZM, Zhang XR, Zhang L, et al. Cultivation and identification of fibroblasts of bulbar conjunctival in patients with conjunctivochalasis [J]. *Ophthalmol CHN*, 2013, 22(2) : 105-109.
- [19] Gumus K, Crockett CH, Pflugfelder SC. Anterior segment optical coherence tomography: a diagnostic instrument for conjunctivochalasis [J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 150(6) : 798-806. DOI: 10.1016/j.ajo.2010.06.014.
- [20] Erdogan-Poyraz C, Mocan MC, Irkec M, et al. Delayed tear clearance in patients with conjunctivochalasis is associated with punctal occlusion [J]. *Cornea*, 2007, 26(3) : 290-293. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31802e1e24.
- [21] Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, et al. Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(4) : 437-443. DOI: 10.1038/ni.1721.
- [22] Ko CY, Chang LH, Lee YC, et al. CCAAT/enhancer binding protein delta (CEBPD) elevating PTX3 expression inhibits macrophage-mediated phagocytosis of dying neuron cells [J/OL]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(2) : 422. e11-25 [2016-03-19]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197-4580\(10\)00397-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197-4580(10)00397-0). DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.017.
- [23] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes [J]. *Matrix Biol*, 2002, 21(3) : 251-262.

(收稿日期: 2016-08-09)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院 河南省眼科研究所承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组, 中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用, 但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)