

文章编号:1004-7220(2012)01-0072-05

力学刺激对角膜成纤维细胞碱性成纤维细胞生长因子表达的影响

李晓娜¹, 王晓君¹, 贺瑞², 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. 山西省眼科医院 准分子激光科, 太原 030002)

摘要: 目的 研究在体及离体条件下不同力学环境对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的影响,探索力学因素在准分子激光原位角膜磨镶术(laser assisted in situ keratomileusis, LASIK)术后角膜损伤修复中的作用。方法 建立不同切削量的LASIK手术动物模型,使在体角膜处于不同力学环境中,并于LASIK术后1周和1月处死实验动物提取组织蛋白。此外,采用Flexcell 4 000细胞力学加载系统对原代提取的兔角膜成纤维细胞施加频率为0.1 Hz、拉伸幅度分别为5%、10%和15%的周期性机械拉伸,并于拉伸后6 h和24 h后取细胞培养液上清。采用ELISA方法检测bFGF含量。结果 LASIK术后1周,角膜基质床残余30%组与对照组相比,bFGF含量显著增高($P < 0.05$);术后1月回落至正常水平,各组之间无显著性差异。不同时间点同一手术方式之间比较发现,仅30%组1周和1月有显著差异($P < 0.05$)。体外周期性拉伸实验表明拉伸6 h后,15%拉伸组bFGF含量较对照组显著增高($P < 0.05$),24 h后显著性降低($P < 0.05$)。结论 力学因素参与了早期角膜组织及角膜成纤维细胞bFGF表达的调节,bFGF在LASIK术后角膜组织修复中发挥了一定作用。

关键词: 力学刺激;角膜成纤维细胞;角膜组织;周期性拉伸;细胞表达;生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of mechanical stimulation on basic fibroblast growth factor expression of corneal fibroblasts

LI Xiao-na¹, WANG Xiao-jun¹, HE Rui², CHEN Wei-yi¹ (1. Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. Excimer Laser Department, Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different mechanical environment (*in vivo* and *in vitro*) on expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and explore the role of mechanical stimulation in corneal tissue repair after laser assisted in situ keratomileusis (LASIK) surgery. **Methods** Animal models by LASIK surgery were established to keep the corneas under different mechanical environment. The experimental animals were killed at the first week or the first month after LASIK surgery to obtain the corneas. In addition, the primary corneal fibroblasts were subjected to cyclic mechanical stretch (0.1 Hz; 5%, 10%, 15% stretch; 6 h or 24 h) using Flexcell 4 000 tension system. Expression of bFGF was determined by ELISA method. **Results** At the first week after LASIK surgery, expression of bFGF was increased significantly in 30% group (residual stroma bed accounting for 30% of the whole cornea), as compared with the control group ($P < 0.05$), and then it was decreased to the normal level in all groups at the first month after LASIK surgery. Analysis on the same surgery method at different time showed that there were significant differences only in 30% group at the first week and month ($P < 0.05$). Cyclic stretch experiment *in vitro* indicated that bFGF expression in 15% stretch group was significantly in-

收稿日期:2011-09-28; 修回日期:2011-11-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872140,11032008),山西省自然科学基金资助项目(2008012013-8,2010021004-2)。

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

creased after 6 h than that in the control group ($P < 0.05$), with a significant decrease after 24 h ($P < 0.05$).

Conclusions Mechanical stimulation can regulate bFGF expression of corneal tissues and corneal fibroblasts, and bFGF plays a positive role in the early corneal tissue repair after LASIK surgery.

Key words: Mechanical stimulation; Corneal tissue; Corneal fibroblasts; Cyclic stretch; Cell expression; Biomechanics

准分子激光原位角膜磨镶术 (laser assisted in situ keratomileusis, LASIK) 是目前临床眼科开展较为广泛、有效的治疗近视的角膜屈光纠正手术;但其术后仍有一些并发症出现,继发性圆锥角膜时有报道^[1]。LASIK 术后角膜基质层变薄,在眼内压作用下,所受的应力明显增大,角膜细胞所受的力学环境发生了变化。因此,生物力学因素对角膜屈光术后角膜组织的损伤修复及在继发性圆锥角膜发生发展中的影响逐渐得到了重视^[2]。

各种炎症因子、细胞生长因子以及基质金属蛋白酶及其抑制剂等诸多因素相互关联共同参与了 LASIK 术后角膜损伤修复和组织重塑的调控^[2]。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 作为一类多肽生长因子,具有广泛的生物学作用,在角膜损伤修复中发挥了重要作用。角膜上皮细胞、基质细胞、后弹力膜和内皮细胞均有 bFGF 及其受体的分布和表达,正常情况下主要以无或低活性形式存在。角膜损伤后伤口处 bFGF 表达增强,可通过自分泌和旁分泌方式影响角膜损伤的修复。bFGF 能够促进角膜上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的增殖及角膜细胞迁移^[3-4];还能降低炎症反应程度,改善基质修复质量,维持角膜透明,并促进损伤区角膜基质纤维的板层化排列趋势,从而加快角膜伤口的修复^[5]。在角膜损伤早期使用 bFGF 滴眼液可以缩短修复时间。此外,bFGF 在离体角膜保存^[6]及神经修复^[7]中也发挥了一定作用。bFGF 在角膜屈光纠正手术后及圆锥角膜组织中表达增强^[8-9]。

研究表明力学刺激能够调节血管内皮细胞^[10]、骨细胞^[11]、口腔细胞^[12]等不同类型细胞 bFGF 的表达。而有关力学因素对角膜 bFGF 表达的影响目前尚未见报道。本研究分别以兔角膜组织和角膜成纤维细胞为对象,研究在体及离体力学环境对角膜 bFGF 表达的影响,探讨力学因素在 LASIK 术后角膜修复中的作用。

1 材料和方法

1.1 不同切削量 LASIK 实验动物模型的建立

选取成年新西兰大白兔 42 只,年龄 6~9 月,体重 3.0~3.5 kg,雌雄兼有,健康无眼病。术前行裂隙灯及检眼镜检查排除眼前、后节病变;气流眼压计测量眼内压;角膜地形图分析。术前 2 d 以 0.3% 妥布霉素眼药水滴眼,术前沿兔耳缘静脉用 2% 戊巴比妥钠进行全身麻醉,并用 0.4% 盐酸奥布卡因眼液表面麻醉。将实验动物随机分组进行如下操作:

A 组(正常组):不进行手术。B 组(单纯切瓣组):手术方法同 C 组,但只制备角膜瓣,不切削基质层。C 组(50% 组):将麻醉好的实验动物置于手术台上,无菌生理盐水冲洗双结膜囊。以直径为 9.5 mm 的负压吸引环,厚度设置为 90~110 μm 的微型角膜板层刀(租借于无锡市康宁医疗器械有限公司)制备一完整的角膜瓣,将瓣掀起,以 193 nm 的准分子激光(NIDEK EC-5000CXII,日本)切削瓣下基质层,直至残留的基质床厚度为整体角膜厚度的 50%。切削区域的直径为 5.5~8.0 mm,修边区宽度为 2 mm,层间生理盐水反复冲洗干净后,将瓣复位,条纹试验(-),手术完成后滴 0.3% 妥布霉素眼液 2 或 3 滴。D 组(30% 组):手术方法同 C 组,但瓣下残留基质床厚度为整体角膜厚度的 30%。

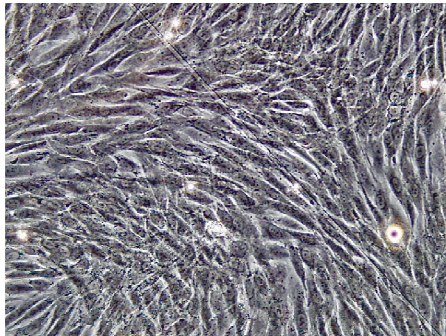
术后对滴加 0.3% 妥布霉素滴眼液进行预防感染处理,术后实验动物均健康无感染。分别于术后 1 周和 1 月空气栓塞处死实验动物,摘取角膜全层,将角膜组织剪碎、匀浆、离心取上清,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。Bradford 法检测总蛋白含量,每组 6 个样本。

1.2 角膜成纤维细胞的原代提取、培养及鉴定

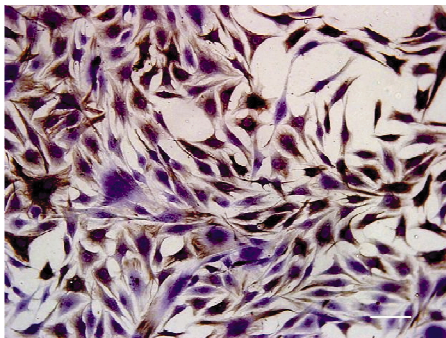
采用酶消化法获取原代角膜成纤维细胞^[13]。细胞传代爬片后采用波形蛋白(武汉博士德)对角膜成纤维细胞进行鉴定。细胞经 4% 甲醛固定后,5% BSA 封闭,1:100 小鼠抗兔波形蛋白单克隆抗体(武汉博士德)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,生物素化山羊抗小

鼠 IgG(武汉博士德)37 ℃ 孵育 30 min, SABC(武汉博士德)37 ℃ 孵育 20 min, DAB(北京中山)显色, 苏木素复染, 显微镜下观察。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

消化培养法获得的兔角膜成纤维细胞 24 h 左右大部分细胞开始贴壁生长, 1 周左右融合。倒置相差显微镜下观察, 可见细胞呈典型的梭形, 单层、涡旋状生长(见图 1(a))。取经传代培养的第 2 代细胞进行免疫细胞化学染色显示: 波形蛋白染色阳性, 细胞胞浆内可见棕黄色的、与细胞长轴方向一致的丝网状和束状纤维(见图 1(b)), 说明所提取的细胞为角膜成纤维细胞。



(a) 相差显微镜图像



(b) 波形蛋白染色阳性

图 1 兔角膜成纤维细胞原代培养及鉴定(标尺:20 μm)

Fig.1 The primary culture and identification of rabbit corneal fibroblasts (Scale bar: 20 μm) (a) Inverted phase contrast micrograph, (b) Positive immunocytochemical staining with anti-vimentin

1.3 周期性力学加载

体外力学加载采用 Flexcell 4 000 (Flexcell, 美国) 柔性基底拉伸系统以模拟角膜成纤维细胞的力学环境。在眼内压作用下, 不同切削量的 LASIK 术

使角膜组织所处的力学环境发生改变, 切削越深, 角膜受到的牵拉作用越大。因此, 选择适当的周期性拉伸能够模拟在体 LASIK 术后角膜的力学环境。

将 2~3 代角膜成纤维细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 3×10^5 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 48 h。待细胞 80% 融合时, 换成含 2% 胎牛血清进行力学加载实验。

本实验采用频率为 0.1 Hz、拉伸幅度分别 5%、10% 和 15% 的周期性机械拉伸, 并于拉伸后 6 h 和 24 h 后收集培养液, 4 ℃ 离心取上清。未加载组作为各自的静态对照, 细胞代数、培养条件和接种密度与加载组完全相同。拉伸后细胞进行台盼蓝染色, 细胞活性在 95% 以上。

1.4 bFGF 含量检测

采用兔 bFGF ELISA 试剂盒 (RapidBio Lab, 美国) 检测角膜组织及细胞培养液中 bFGF 含量。操作步骤严格按说明书进行。采用 ELX800 酶标仪 (Bio-Tek, 美国) 于 450 nm 处读取 OD 值, 通过标准曲线获得待测样本 bFGF 浓度。

1.5 数据分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计分析软件以及单因素方差分析数据, 检测各组之间是否存在差异, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 在体不同力学环境对兔角膜组织 bFGF 表达的影响

裂隙灯观察手术各组眼角膜瓣复位良好, 角膜清, 无浑浊。术前及术后眼压均在正常范围, 无继发性青光眼。角膜地形图检查术前未发现异常角膜; 术后 1 周及 1 月观察未见圆锥角膜。

如图 2 所示, 随着切削量加深, bFGF 含量有上升趋势, 1 月后回落至正常水平。同一时间点不同组之间进行比较发现: 术后 1 周, D 组(基质床残余 30%) bFGF 含量显著高于正常组 ($P < 0.05$), 约为正常组的 4.7 倍, 其他组之间无统计学差异; 术后 1 月, 各组之间无显著性差异。同一手术方式不同时间点比较发现: D 组术后 1 月较 1 周显著下降 ($P < 0.05$), 约为术后 1 周的 22%, 其他组之间无统计学差异。

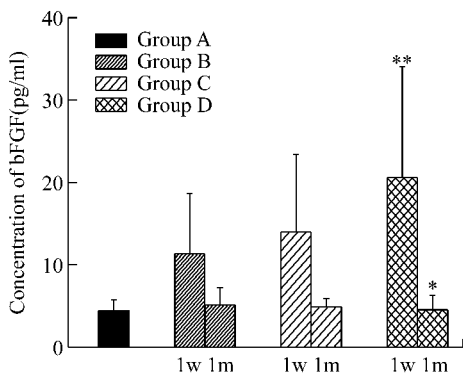


图2 不同切削量 LASIK 术后角膜组织 bFGF 含量比较(1 w: 术后 1 周, 1 m: 术后 1 月)

Fig. 2 Concentration of bFGF in rabbit corneal tissues after LASIK surgery

** D 组术后 1 周与 A 组比较 $P < 0.05$, * D 组术后 1 周与 1 月比较 $P < 0.05$

3.2 周期性力学加载对角膜成纤维细胞 bFGF 表达的影响

由于各对照组含量有所不同, 为了方便比较, 将各组值分别除以各自对照组的均值, 使对照组为 1。体外力学加载结果如图 3 所示: 与未加载组相比, 频率为 0.1 Hz、拉伸幅度为 5% 时, 拉伸 6 h 和 24 h 对培养液中的 bFGF 含量均无显著影响。拉伸幅度 10% 组与 5% 结果相似。当拉伸幅度达 15% 时, 拉伸 6 h 培养液中的 bFGF 含量显著增高 ($P < 0.05$), 为未加载组的 3.9 倍, 拉伸 24 h 后, bFGF 含量较拉伸 6 h 显著降低 ($P < 0.05$), 约为 6 h 时的 5.3%。

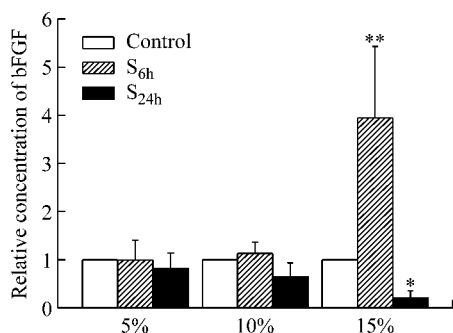


图3 周期性力学加载对兔角膜成纤维细胞 bFGF 表达的影响

Fig. 3 Effects of mechanical stimulus on the expression of bFGF in corneal fibroblasts

** 15% 拉伸组 6 h 与对照组比较 $P < 0.05$, * 15% 拉伸组 6 h 与 24 h 拉伸组比较 $P < 0.05$

4 讨论

力学环境的改变对 LASIK 术后角膜组织的修复及继发性圆锥角膜病变的发生发展是一个不可忽视的因素^[2,14-15]。而有关力学刺激对 LASIK 术后角膜修复的影响尚未见相关报道。本文通过不同切削量 LASIK 术建立在体角膜不同力学环境的研究发现, 虽然单纯手术损伤(单切瓣组)、以及基质不同切削量之间比较 bFGF 含量之间比较无统计学差异, 但术后 1 周当切削量达整个角膜厚度 70% 时, 与正常组相比, bFGF 表达明显增高 ($P < 0.05$), 且 1 周和 1 月相比, bFGF 表达明显增高 ($P < 0.05$), 而其他组未见统计学差异, 说明当力学刺激达到一定水平时对术后早期 bFGF 的调节发挥了作用。

但在体环境相对复杂, LASIK 术后角膜细胞损伤、死亡以及各种炎症因子的释放等均可能激活 bFGF, 因此有必要单独进行体外力学加载实验, 验证力学因素对 bFGF 表达的影响。从本文的研究结果可以看出: 角膜成纤维细胞能够对 0.1 Hz、拉伸幅度 15%、拉伸 6 h 的力学刺激作出反应, 促进 bFGF 的表达, 拉伸 24 h 后又下降。这与在体表达趋势基本一致, 说明力学因素在短期内同样能够引起角膜成纤维细胞释放 bFGF。bFGF 可能通过促进角膜成纤维细胞的增殖与迁移、改善基质修复质量等途径参与角膜损伤早期组织的修复。

LASIK 术后角膜损伤的恢复及其并发症的发生和发展是一个多因素介导的过程, bFGF 与其他各种蛋白、细胞因子、炎症因子及力学因素协同作用参与了此过程。本文的研究结果显示: 在 LASIK 术角膜基质残留低至基质床厚度的 30% 时, 机体能够对力学刺激做出积极响应, 通过增加 bFGF 的表达参与术后早期角膜组织的修复。力学因素引起 bFGF 的变化对角膜组织修复所产生的生物学效应, 以及力学因素对与基质重塑相关生物大分子(如基质金属蛋白酶及其抑制因子)的调控等均有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Comaish IF, Lawless MA. Progressive post-LASIK keratectasia: Biomechanical instability or chronic disease process [J]. J Cataract Refract Surg, 2002, 28(12): 2206-2213

- [2] Dupps WJ Jr, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83 (4): 709-720
- [3] 钟一声,程枫,周颖明,等. PKR 术后兔角膜表达 bFGFmRNA 的变化 [J]. *眼外伤职业眼病杂志*, 1999, 21 (5): 428-430.
- [4] 赵桂秋,刘绍辉,姜涛,等. 圆锥角膜组织中 EGF 和 bFGF 变化免疫组织化学的研究 [J]. *眼科研究*, 2003, 21 (3): 273-275
- [5] Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(2) : 115-120
- [6] Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(7) : 3128-3136.
- [7] Hu C, Ding Y, Chen J, *et al.* Basic fibroblast growth factor stimulates epithelial cell growth and epithelial wound healing in canine corneas [J]. *Vet Ophthalmol*, 2009, 12(3) : 170-175.
- [8] Hosoda Y, Nakayasu K. A pathological study on rabbit corneas after laser in situ keratomileusis [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2000, 44(3) : 317.
- [9] 闫超,王立,潘志强,等. 碱性成纤维细胞生长因子和表皮生长因子对角膜中期保存液保存人角膜内皮细胞的影响 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(2) : 166-170.
- [10] 陈槐卿. 流体切应力对血管内皮细胞的作用 [J]. *医用生物力学*, 2000, 15 (2): 72-75.
- Chen HQ. Influence of fluid shear stress on endothelial cells [J]. *J Med Biomech*, 2000, 15(2) : 72-75.
- [11] 孙晓江,戴冠戎,汤亭亭. 流体剪切应力对骨细胞分子活动的影响 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(1) : 109-114.
- Sun XJ, Dai GR, Tang TT. Flow shear stress induced molecular events of bone cells [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22 (1): 109-114.
- [12] 赵志河,李宇. 正畸牙移动细胞生物力学研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25 (6): 393-398.
- Zhao ZH, Li Y. Advances in cytomechanics in orthodontic tooth movement [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25 (6): 393-398.
- [13] 张建华,苏波,张素贞. 兔角膜成纤维细胞的两种培养方法 [J]. *第二军医大学学报*, 1998, 19 (4): 389-390
- [14] 祝雅利,陈维毅. LASIK 术后眼球受力变形的有限元模拟研究 [J]. *太原理工大学学报*, 2008 (S2): 257-260
- [15] Gefen A, Shalom R, Elad D, *et al.* Biomechanical analysis of the keratoconic cornea [J]. *Mech Behav Biomed Mater*, 2009, 2(3) : 224-236.
- [10] Linari M, Reedy MK, Reedy MC, *et al.* Ca-activation and stretch-activation in insect flight muscle [J]. *Biophys J*, 2004, 87(2) : 1101-1111.
- [11] Hertz H. *Über den Kontakt elastischer Körper* [J]. *J Reine Angew Mat*, 1881, 92 : 156-171.
- [12] Yoshikawa Y, Yasuike T, Yagi A, *et al.* Transverse elasticity of myofibrils of rabbit skeletal muscle studied by atomic force microscopy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256(1) : 13-19.
- [13] Nyland LR, Maughan DW. Morphology and transverse stiffness of drosophila myofibrils measured by atomic force microscopy [J]. *Biophys J*, 2000, 78(3) : 1490-1497.
- [14] Zhu J, Guo LH, Wang GD. Study on the original height and compression elasticity of the DNA strands with atomic force microscopy [J]. *Chin J Appl Mech*, 2008, 25 : 172-177.
- [15] Huxley HE. Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271 (8): 1043-1415.
- [16] Tiribilli B, Bani D, Quercioli F, *et al.* Atomic force microscopy of histological sections using a chemical etching method [J]. *Ultramicroscopy*, 2005, 102 (3): 227-232.
- [17] Zhu J, Sabharwal T, Guo L, *et al.* Gloss phenomena and image analysis of atomic force microscopy in molecular and cell biology [J]. *Scanning*, 2009, 31(2) : 49-58.
- [18] Zhu J, Sabharwal T, Guo L, *et al.* Effects of probe pollutants on morphological and mechanical measurements of muscle and collagen fibers using atomic force microscopy [J]. *Scanning*, 2010, 32(3) : 113-121.
- [19] 黄艳,樊瑜波. 剪切应力与心肌细胞裂解液联合诱导骨髓间充质干细胞向心肌分化的研究 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(3) : 211-216.
- Huang Y, Fan YB. Research on cardiomyogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by shear stress combined with lysate of myocardial cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(3) : 211-216.
- [20] 姜宗来. 心血管生物力学研究的新进展 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5) : 313-315.
- Jiang ZL. Recent advances in cardiovascular biomechanics [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5) : 313-315.
- [21] Zhu J, Sabharwal T, Kalyanasundaram A, *et al.* Topographic mapping and compression elasticity analysis of skinned cardiac muscle fibers in vitro with atomic force microscopy [J]. *J Biomech*, 2009, 42(13) : 2143-2150.

(上接第 50 页)