

IGF-1 对 HSF 细胞分泌近视相关因子的影响及机制探索

晁荣荣, 丁芝祥, 范晶, 郑柳

引用: 晁荣荣, 丁芝祥, 范晶, 等. IGF-1 对 HSF 细胞分泌近视相关因子的影响及机制探索. 国际眼科杂志, 2025, 25(2): 198-205.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82160197)

作者单位: (541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科

作者简介: 晁荣荣, 女, 硕士研究生, 研究方向: 眼视光学。

通讯作者: 郑柳, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 白内障. 626838295@qq.com

收稿日期: 2024-03-19 修回日期: 2025-01-02

摘要

目的: 探讨胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 对人巩膜成纤维细胞 (HSF) 分泌转化生长因子- β 2 (TGF- β 2)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的影响及其机制。

方法: 分别使用 IGF-1 和 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 培养细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 确定药物的最佳作用浓度和时间。采用细胞划痕法观察细胞迁移活性。为明确 IGF-1 对 HSF 细胞的影响以及 PI3K/AKT 通路在其中的调控作用, 将细胞分为对照组 (不含药物)、IGF-1 (80 μ g/L) 组、IGF-1+LY294002 (80 μ g/L+5 mmol/L) 组、LY294002 (5 mmol/L) 组, 培养 24 h; Western blot 检测细胞中 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 的蛋白表达水平; 细胞免疫荧光检测 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的荧光表达。

结果: CCK-8 结果显示不同浓度 IGF-1 培养的细胞活力以 80 μ g/L IGF-1 组最高 (均 $P < 0.05$), 且在不同培养时间下, 以 24 h 时 80 μ g/L IGF-1 组细胞活力最高, 因此确定后续实验中 IGF-1 的浓度为 80 μ g/L, 作用时间为 24 h。不同浓度 LY294002 培养的细胞活力从 6 h 起逐渐降低 (均 $P < 0.05$), 根据 IC50 值确定后续实验中 LY294002 浓度为 5 mmol/L, 作用时间为 24 h。细胞划痕结果显示, 与对照组相比 40、80 μ g/L IGF-1 组细胞迁移率均升高 (均 $P < 0.05$)。与对照组相比 2.5、5 mmol/L LY294002 组细胞迁移率均降低 (均 $P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 与对照组相比, IGF-1 组细胞 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 的蛋白表达量均升高, LY294002 组的蛋白表达量均下降 (均 $P < 0.05$); 与 IGF-1 组比较, IGF-1+LY294002 组的 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 蛋白表达量均下降 (均 $P < 0.05$)。细胞免疫荧光结果显示, 与对照组相比, IGF-1 组细胞 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的荧光表达均升高, LY294002 组的荧光表达均下降 (均 $P < 0.05$); 与 IGF-1 组比较, IGF-1+LY294002 组的 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 荧光表达均显著下降 (均 $P < 0.05$)。

结论: IGF-1 促进了人 HSF 细胞增殖与迁移; IGF-1 可能通过 PI3K/AKT 信号通路上调人 HSF 细胞中 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的表达, 参与近视的发生与发展。

关键词: 近视; 人巩膜成纤维细胞 (HSF); 胰岛素生长因子-1 (IGF-1); 转化生长因子- β 2 (TGF- β 2); 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2); 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.2.04

Effects of insulin-like growth factor-1 on the mechanism of myopia-related factors secreted by human scleral fibroblasts

Chao Rongrong, Ding Zhixiang, Fan Jing, Zheng Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.82160197)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Zheng Liu. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 626838295@qq.com
Received: 2024-03-19 Accepted: 2025-01-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on the secretion of transforming growth factor β 2 (TGF- β 2), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in human scleral fibroblasts (HSF) and their mechanism.

• **METHODS:** The cells were cultured with IGF-1 and PI3K/AKT pathway inhibitor LY294002, respectively. CCK-8 method was used to detect cell viability and determine the optimal concentration and time of drug action. Cell migration activity was observed by cell scratch method. To determine the effects of IGF-1 on HSF cells and the regulatory role of PI3K/AKT pathway, HSF cells were divided into control group (without drugs), IGF-1 (80 μ g/L) group, IGF-1+LY294002 (80 μ g/L+5 mmol/L) group, and LY294002 (5 mmol/L) group, and were cultured for 24 h; the protein expression levels of TGF- β 2, MMP-2, HIF-1 α , PI3K and AKT were detected by Western blot; the fluorescence expression of TGF- β 2, MMP-2 and HIF-1 α was detected by cellular immunofluorescence.

• **RESULTS:** The results of CCK-8 showed that the cell viability of the 80 μ g/L IGF-1 group cultured with different

concentrations of IGF-1 was the highest (all $P < 0.05$), and the cell viability of the 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 group at 24 h was the highest under different culture times. Therefore, the concentration of IGF-1 was selected as 80 $\mu\text{g/L}$ for 24 h. The viability of cells cultured with different concentrations of LY294002 gradually decreased from 6 h (all $P < 0.05$). According to the IC50 value, therefore, the concentration of LY294002 was selected as 5 mmol/L for 24 h. The cell scratch results showed that compared with the control group, the cell mobility of 40 $\mu\text{g/L}$ and 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 groups was increased (all $P < 0.05$). Compared with the control group, cell mobility in the 2.5 and 5 mmol/L LY294002 groups was decreased (all $P < 0.05$). Western blot results showed that compared with the control group, the protein expressions of TGF- β 2, MMP-2, HIF-1 α , PI3K and AKT in the IGF-1 group were increased, while those in the LY294002 group were decreased (all $P < 0.05$). Compared with the IGF-1 group, the expression levels of TGF- β 2, MMP-2, HIF-1 α , PI3K and AKT in the IGF-1+LY294002 group were decreased (all $P < 0.05$). The results of cell immunofluorescence showed that compared with the control group, the fluorescence expressions of TGF- β 2, MMP-2 and HIF-1 α in the IGF-1 group were increased, while those in the LY294002 group were decreased (all $P < 0.05$). Compared with the IGF-1 group, the fluorescence expressions of TGF- β 2, MMP-2 and HIF-1 α in the IGF-1+LY294002 group were significantly decreased (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** IGF-1 promoted the proliferation and migration of human HSF. IGF-1 may up-regulate the expression of TGF- β 2, MMP-2 and HIF-1 α in HSF through the PI3K/AKT signaling pathway, and participate in the occurrence and development of myopia.

• **KEYWORDS:** myopia; human scleral fibroblasts (HSF); insulin growth factor-1 (IGF-1); transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2); matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)

Citation: Chao RR, Ding ZX, Fan J, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the mechanism of myopia-related factors secreted by human scleral fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(2): 198-205.

0 引言

近视是指在调节放松的状态下,外界平行光线经过眼屈光介质成像于视网膜之前,造成视远不清的现象。流行病学统计显示,当前全球近视患病率超过 28.3%,预测到 2050 年近视人群将占世界人口的 49.8%^[1],截至 2020 年,我国青少年儿童近视率达到了 52.7%,预计到 2050 年将高达 84%^[2],近视的患病率不仅逐年上升,且逐渐趋向低龄化^[3-4]。根据国际近视协会的分类方法,在眼调节放松的前提下,等效球镜度超过 -0.50 D 的即发生近视,超过 -6.00 D 的视为高度近视^[5]。高度近视常见并发症有视网膜脱离、黄斑病变、青光眼等眼底病理变化,具有致盲风险,危害巨大^[6]。因此,寻找近视的发病原因和有效地防控手段尤为重要。近视的发生是基因与环境共同作用的结果,关于近视的发病机制,学者们曾提出了遗传学说、调

节学说、周边离焦以及巩膜缺氧等多种理论^[7],而目前研究认为近视主要通过局部“视网膜-脉络膜-巩膜”途径进行信号传递,导致巩膜主动重塑,眼轴伸长而产生^[8-9],这一学说肯定了多种生长因子在近视发生中的重要作用^[10-11]。目前发现关于巩膜重塑的因子众多,其中转化生长因子- β 2 (transforming growth factor- β 2, TGF- β 2) 在近视患者房水中有明显升高,并与眼轴长度呈正相关^[12], TGF- β 2 可在视网膜色素上皮层、巩膜等眼内组织中广泛表达,是影响巩膜重塑的关键信号分子之一。而胶原的合成与降解是巩膜重塑的一个重要代谢变化,基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一类能降解细胞外基质的蛋白水解酶,其中 MMP-2 能降解巩膜中的 I 型胶原^[13],在临床研究中,高度近视患者玻璃体中 MMP-2 表达水平显著升高^[14],除此之外,研究还发现一种缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 能对 MMP-2 进行调控,影响巩膜胶原的合成, HIF-1 α 作为一种转录因子,能通过增强纤维化转录过程,导致纤维化的胶原纤维形成,使细胞外基质重塑^[7]。上述研究表明 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 均是近视性巩膜重塑的关键因素^[10],那么通过干预其上游的信号及转导通路,减少上述信号因子在眼部的表达,或有助于延缓近视。近年发现胰岛素生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 是一种调控细胞增殖、分化及凋亡的重要细胞生长因子,与近视的发展密切相关^[15-16]。为探究 IGF-1 在近视中的作用机制,本研究应用 IGF-1 对人巩膜成纤维细胞 (human scleral fibroblasts, HSF) 进行体外培养,检测在 IGF-1 刺激下细胞的增殖、迁移以及分泌 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的表达,进而探索 IGF-1 在近视发展过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HSF 购自广州市杏海生物科技有限公司。实验主要试剂与仪器:胎牛血清、DMEM 基础培养基、青霉素、0.5 g/L 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); IGF-1、PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 (美国 MCE 公司); TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 抗体 (武汉三鹰生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度定量试剂盒 (上海碧云天试剂公司); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 (莫纳生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (美国 Glpbio 公司); CO₂ 培养箱 (美国赛默公司); 酶标仪 (德国艾本德公司); 倒置显微镜 (日本尼康映像仪器销售公司)。

1.2 方法

1.2.1 HSF 细胞培养和分组 HSF 细胞使用完全培养基 (DMEM 基础培养基+体积分数 10% 胎牛血清) 培养,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合至 80% 左右传代。倒置显微镜下观察细胞形态并拍照,取复苏后 2-5 代对数生长期的 HSF 细胞,用于后续实验。将 HSF 细胞以每孔 3 \times 10³ cells/mL 的密度接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,弃上清,使用无血清基础培养基配制 40、80、100、160 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组和 1.25、2.5、5、10 mmol/L LY294002 组,加入细胞孔板中,对照组细胞只加入不含药物的无血清基础培养基。

1.2.2 CCK-8 法检测不同浓度 IGF-1 和 LY294002 对 HSF 细胞增殖活性的影响 每个分组均设置 3 个以上复孔。分别在药物作用 6、12、24、48 h 时,弃上清,每孔加入

100 μL 含有 10% CCK-8 溶液的基础培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 吸光度值, 计算不同浓度的细胞活力, 确定药物对 HSF 细胞的作用浓度与作用时间。每组实验均至少重复 3 次。细胞活力 (%) = $[(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ ($A_{\text{加药}}$ 为含有细胞、药物、CCK8 溶液的孔板吸光度值, $A_{\text{空白}}$ 为不含细胞, 只含有基础培养基、CCK8 溶液的孔板吸光度值, $A_{\text{对照}}$ 为含有细胞、CCK8 溶液, 不含药物的孔板吸光度值)。

1.2.3 细胞划痕法检测 IGF-1 和 LY294002 对 HSF 细胞迁移的影响 首先使用记号笔在 6 孔板背面用直尺划 5 条间距相等的横线横穿过孔, 取对数生长期细胞, 以每孔 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ 浓度接种细胞, 使 24 h 后融合率达到 90% 左右为佳, 待细胞贴壁后使用 200 μL 枪头垂直于孔板背面的横线在细胞层中划痕, 弃上清, PBS 冲洗 3 次, 除去脱落的细胞和杂质。然后将细胞分为对照组、40、80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组进行培养。对照组只加入无血清基础培养基, 40、80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组分别加入含 40、80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 的无血清基础培养基。另外, 将细胞分为对照组、2.5、5 mmol/L LY294002 进行培养, 对照组只加入无血清基础培养基, 2.5、5 mmol/L LY294002 组分别加入含 2.5、5 mmol/L LY294002 的无血清基础培养基。加药后的 0、24 h 时使用倒置显微镜拍照记录, 使用 Image J 软件测量每组细胞划痕区的面积, 计算出每组细胞迁移率进行统计分析 [细胞迁移率 = $(0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$]。

1.2.4 Western blot 检测 IGF-1 对 HSF 细胞中相关蛋白表达的影响 取对数生长期细胞, 以每孔 $1.5 \times 10^5 / \text{mL}$ 接种于 6 孔板, 轻轻晃动培养板, 使细胞分布均匀, 放置培养箱待细胞完全贴壁, 将 HSF 细胞分为对照组, IGF-1 组, IGF-1+LY294002 组, LY294002 组, 分别加入药物培养 24 h (对照组只加入无血清基础培养基, IGF-1 组加入含 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 的无血清基础培养基, IGF-1+LY294002 组同时加入含 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 和 5 mmol/L LY294002 的无血清基础培养基, LY294002 组加入含 5 mmol/L LY294002 的无血清基础培养基)。将 RIPA 细胞裂解液、PMSF 溶液、蛋白磷酸酶抑制剂按 100:1:1 裂解细胞, 使用超声仪使细胞裂解充分, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 30 min 后, BCA 法测定蛋白浓度并计算样品上样量, 取蛋白上清液, 加入对应体积的 4 \times 蛋白上样缓冲液, 混匀后 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 使蛋白变性, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。SDS-PAGE 电泳、转膜后, 使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 1 \times TBST 充分洗去封闭液后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗 (TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT) 过夜, 1 \times TBST 充分洗膜后室温孵育二抗 1-2 h, 1 \times TBST 充分洗膜后进行化学发光, 使用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参计算 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 的蛋白相对表达量。

1.2.5 细胞免疫荧光 (1) 样本提取: 首先将无菌的细胞爬片放置于 24 孔板中, 每孔提前加入 500 μL 完全培养基, 取对数生长期的细胞, 以每孔 $4 \times 10^4 / \text{mL}$ 接种在 24 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 观察细胞生长状态与密度, 加药培养细胞 24 h (分组方法同 1.2.4)。(2) 细胞固定: 取出 24 孔板, 用移液枪弃去旧的培养基, 每孔沿壁注入足量的 PBS, 轻柔的晃动孔板清洗 3 次, 每次 5 min, 加入预冷的

4% 多聚甲醛孵育 10 min 固定细胞, 结束后每孔加入足量的 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。(3) 通透: 每孔加入 500 μL 0.5% 的 Triton-100 室温孵育 20 min, 去除细胞的脂质和部分蛋白, 更好的暴露抗原, 再加入 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。(4) 封闭: 每孔加入 5% 的 BSA 牛血清白蛋白, 封闭 30 min。(5) 一抗孵育: 弃掉 BSA 溶液, 直接加入配制好的一抗, 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日取出后需恢复室温 30 min, 再加入 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。(6) 荧光二抗孵育: 在孔内加入荧光二抗工作液, 室温避光孵育 1 h 后, 加入 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。(7) 封片: 取出载玻片并用酒精棉球擦拭干净, 滴加 DAPI 封片液, 用镊子小心取出 24 孔板中的细胞爬片, 将爬片的细胞面覆盖在载玻片上面, 注意此过程中不能产生气泡, 将玻片摆放于湿盒中, 避光孵育 10 min, 使细胞核染色。(8) 发光成像: 在荧光显微镜下观察, 拍摄免疫荧光图像, 使用 Image J 软件分析荧光表达量。

统计学分析: 采用 GraphPad Prism 9 统计学软件进行统计分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSF 细胞形态特征 HSF 细胞系来源于人巩膜组织, 贴壁生长, 倒置显微镜下观察细胞形态为成纤维细胞样, 呈突起的纺锤形, 扁平分布, 胞质较少, 细胞核大 (图 1)。

2.2 IGF-1 对 HSF 细胞增殖和迁移的影响 CCK-8 法检测显示 40、80、100、160 $\mu\text{g/L}$ 的 IGF-1 培养 HSF 细胞后, 与对照组相比, IGF-1 组细胞活力逐渐升高, 以 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组细胞活力最高。随着 IGF-1 作用时间的延长, 细胞活力逐渐升高, 且 24 h 时 80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组细胞活力最高, 因此选取 IGF-1 的药物浓度为 80 $\mu\text{g/L}$, 作用时间为 24 h (图 2A)。

细胞划痕实验结果显示, IGF-1 培养细胞 24 h 时, 对照组、40 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组、80 $\mu\text{g/L}$ IGF-1 组细胞迁移率分别为 24.37% \pm 1.05%、40.37% \pm 1.77%、56.92% \pm 4.03%, 细胞迁移率随着 IGF-1 浓度的升高而升高, IGF-1 明显促进了细胞迁移 (图 2B、C)。

2.3 LY294002 对 HSF 细胞增殖和迁移的影响 CCK-8 法结果显示, 1.25、2.5、5、10 mmol/L LY294002 作用于 HSF 细胞时, 与对照组比较, LY294002 组细胞活力逐渐降低 (均 $P < 0.01$), 根据 IC50 值, 选择后续实验中 LY294002 最佳药物浓度为 5 mmol/L, 作用时间为 24 h (图 3A)。

细胞划痕实验结果显示, LY294002 培养细胞 24 h 时, 对照组、2.5 mmol/L LY294002 组、5 mmol/L LY294002 组细胞迁移率分别为 16.82% \pm 2.12%、7.70% \pm 0.80%、2.68% \pm 0.76%, 与对照组比较, LY294002 明显抑制了细胞迁移, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3B、C)。

2.4 Western blot 检测 HSF 细胞中相关蛋白的表达 IGF-1 及 LY294002 培养 HSF 细胞 24 h 后, 与对照组相比, IGF-1 组的 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 蛋白表达量均升高, LY294002 组的蛋白表达均下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 IGF-1 组相比, IGF-1+LY294002 组的 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 、PI3K、AKT 蛋白表达量均下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1, 图 4)。

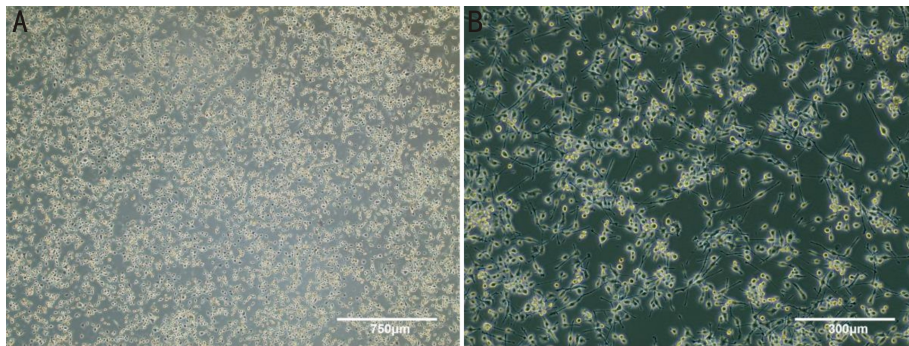


图1 倒置显微镜下观察 HSF 细胞形态 A:放大倍数为 4×;B:放大倍数为 10×。

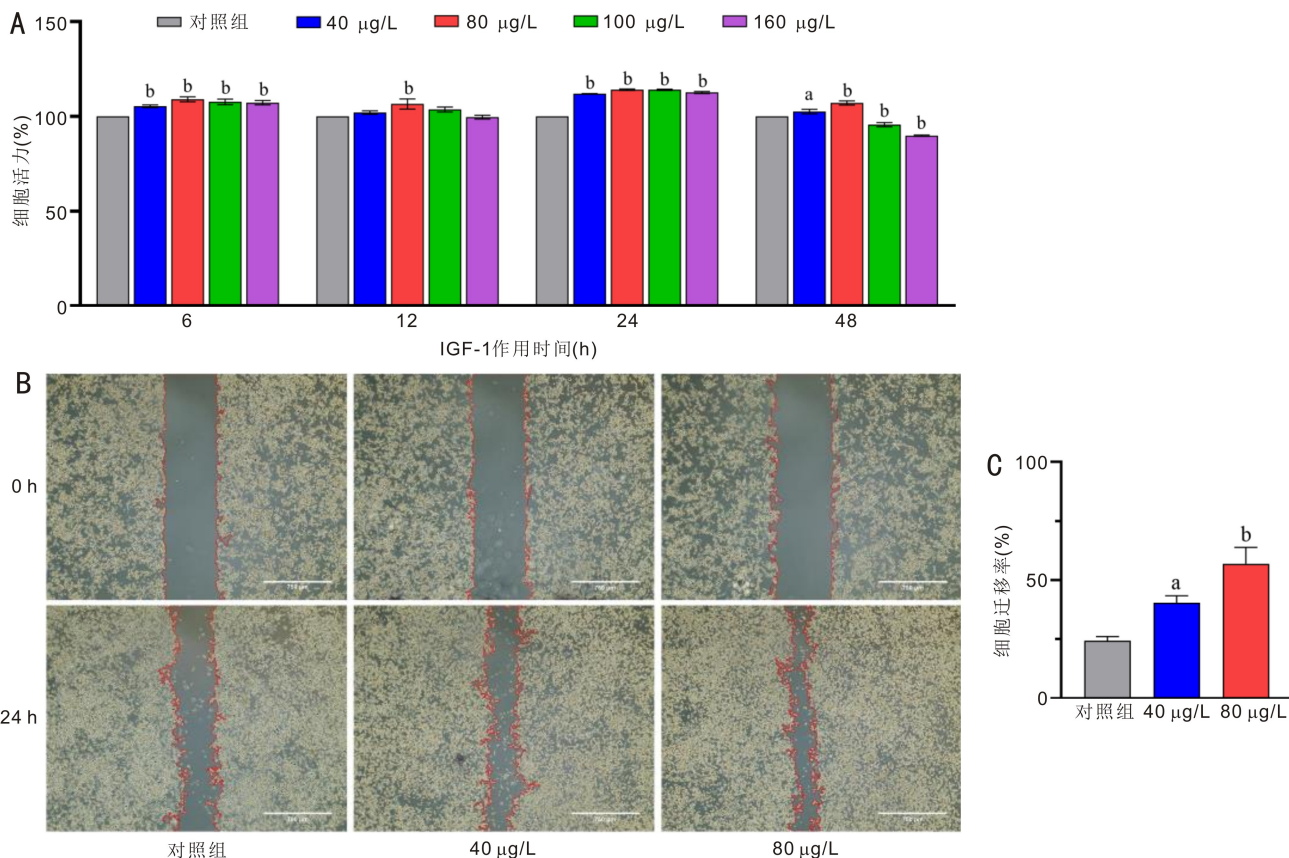


图2 IGF-1 对 HSF 细胞增殖和迁移的影响 A:CCK-8 法检测不同浓度 IGF-1 对 HSF 细胞增殖活性的影响;^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 对照组;B:细胞划痕法检测不同浓度 IGF-1 对 HSF 细胞迁移的影响;C:不同浓度 IGF-1 培养 HSF 细胞的迁移率;^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表1 Western blot 检测 HSF 细胞中相关蛋白的蛋白相对表达量

分组	TGF-β2	MMP-2	HIF-1α	PI3K	AKT	$\bar{x} \pm s$
对照组	0.62±0.03	0.54±0.03	0.34±0.03	0.51±0.05	0.57±0.03	
IGF-1 组	0.79±0.02 ^b	0.67±0.03 ^a	0.69±0.01 ^b	0.68±0.03 ^a	0.81±0.02 ^b	
IGF-1+LY294002 组	0.56±0.03 ^d	0.49±0.03 ^d	0.58±0.03 ^c	0.47±0.01 ^d	0.66±0.02 ^c	
LY294002 组	0.45±0.02 ^b	0.39±0.01 ^b	0.48±0.01 ^b	0.31±0.01 ^b	0.43±0.04 ^a	
<i>F</i>	35.36	27.54	44.61	27.37	30.38	
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

注:^a $P < 0.05$ vs 对照组;^b $P < 0.01$ vs 对照组;^c $P < 0.05$ vs IGF-1 组;^d $P < 0.01$ vs IGF-1 组。

2.5 免疫荧光检测各组 HSF 细胞中 TGF-β2 和 MMP-2 及 HIF-1α 的表达 细胞免疫荧光结果显示,在 IGF-1 和 LY294002 作用 24 h 后,与对照组比较,IGF-1 组的 TGF-β2、MMP-2、HIF-1α 荧光表达均升高,LY294002 组的

TGF-β2、MMP-2、HIF-1α 荧光表达均降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与 IGF-1 组比较,IGF-1+LY294002 组的 TGF-β2、MMP-2、HIF-1α 荧光表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与 WB 结果趋势相符(表 2,图 5-7)。

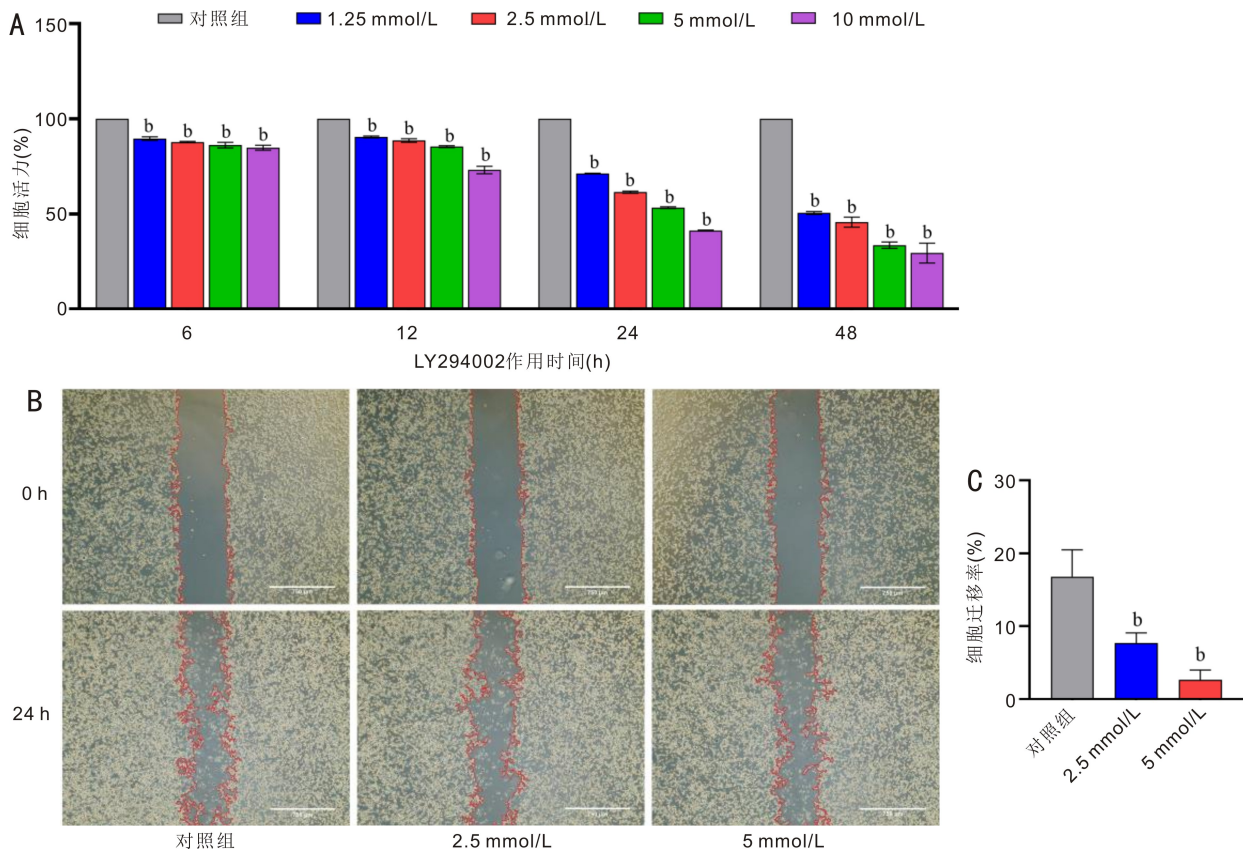


图3 LY294002对HSF细胞增殖和迁移的影响 A:CCK-8法检测不同浓度LY294002对HSF细胞增殖活性的影响;^b*P*<0.01 vs 对照组;B:细胞划痕法检测不同浓度LY294002对HSF细胞迁移的影响;C:不同浓度LY294002培养HSF细胞的迁移率;^b*P*<0.01 vs 对照组。

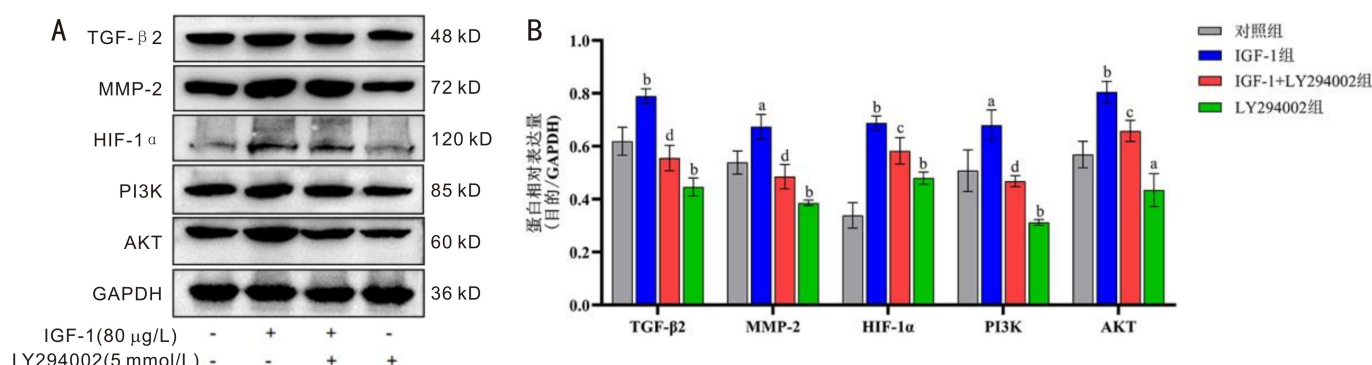


图4 Western blot检测HSF细胞中相关蛋白的表达 A:Western blot法检测HSF细胞中TGF-β2、MMP-2、PI3K、AKT蛋白相对表达量;B:蛋白相对表达量的统计学结果;^a*P*<0.05,^b*P*<0.01 vs 对照组;^c*P*<0.05,^d*P*<0.01 vs IGF-1组。

表2 免疫荧光检测各组HSF细胞中TGF-β2和MMP-2及HIF-1α免疫荧光表达量

分组	TGF-β2	MMP-2	HIF-1α	$\bar{x} \pm s$
对照组	1.00±0.004	1.01±0.02	1.00±0.03	
IGF-1组	1.15±0.03 ^b	1.31±0.01 ^b	1.37±0.07 ^b	
IGF-1+LY294002组	1.03±0.004 ^d	1.10±0.03 ^d	1.18±0.03 ^c	
LY294002组	0.92±0.01 ^a	0.84±0.01 ^b	0.71±0.01 ^b	
<i>F</i>	30.56	108.9	50.90	
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	

注:^a*P*<0.05,^b*P*<0.01 vs 对照组;^c*P*<0.05,^d*P*<0.01 vs IGF-1组。

3 讨论

巩膜位于眼球的外壁,主要由表层的致密结缔组织和巩膜基质层组成,在眼球的生长过程中,巩膜对眼球起着保护与支撑的作用,决定了眼球的大小和眼的屈光状态,

是各类视觉刺激信号的最终靶点,巩膜重塑可导致眼球生长过度,引起近视的发生^[8-9]。巩膜成纤维细胞位于巩膜板层之间,主要功能是巩膜细胞外基质,并受到多种信号和通路的调控^[17]。在LIM豚鼠中,随着诱导时间的延长,

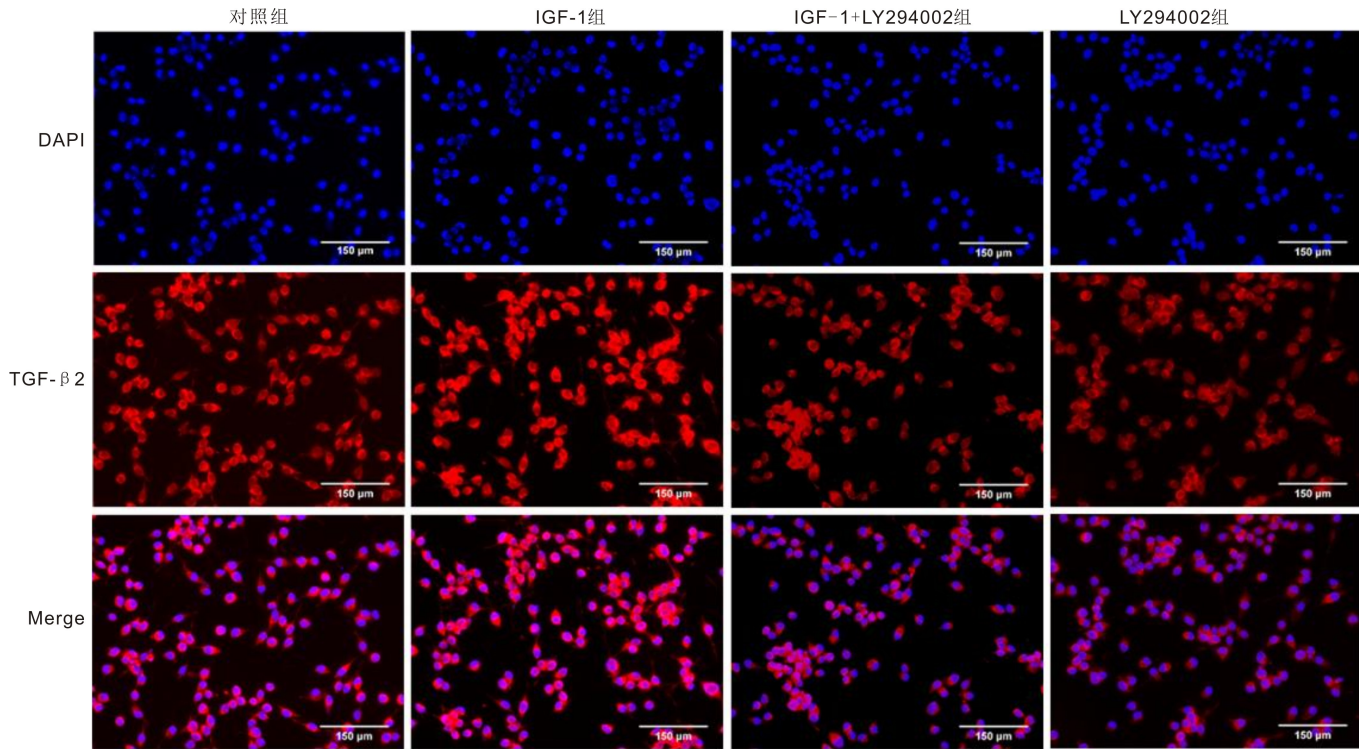


图5 各组 HSF 细胞中 TGF-β2 的表达量 蓝色荧光 DAPI 核染,红色荧光标记 TGF-β2 蛋白。

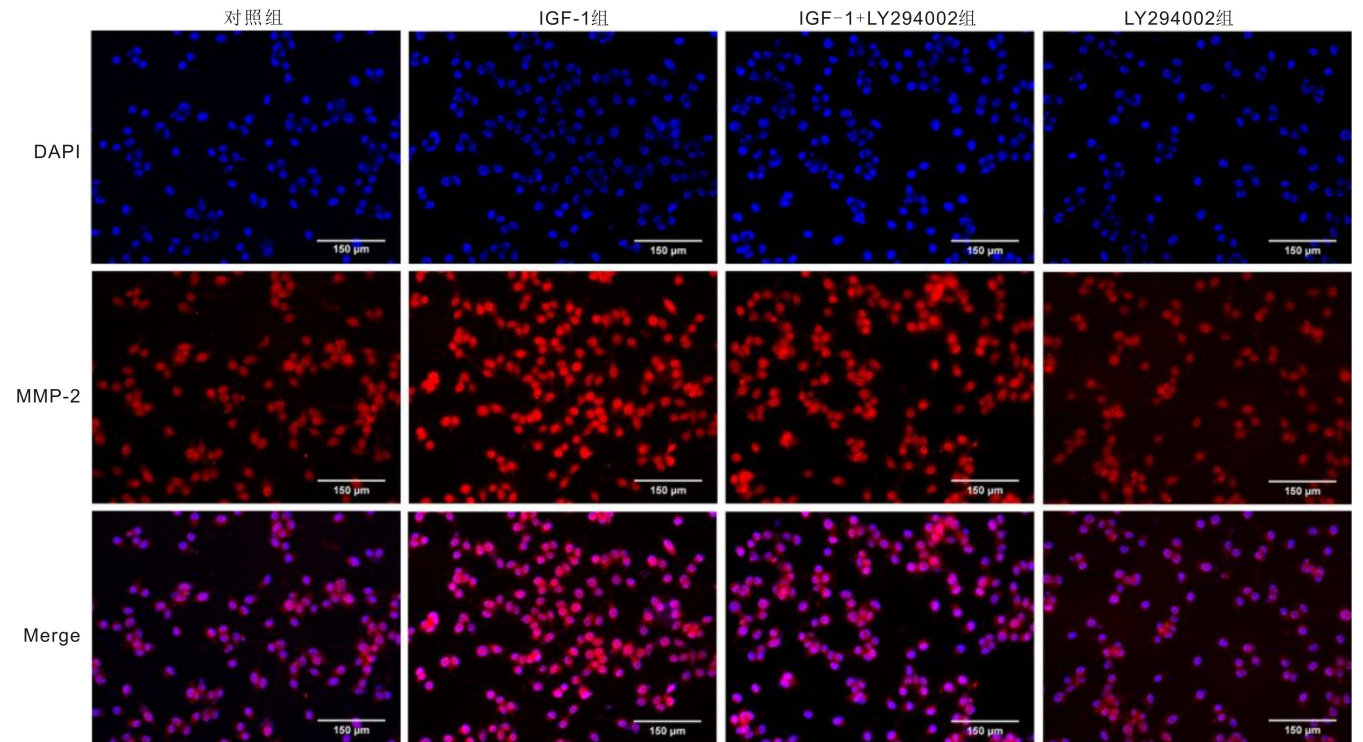


图6 各组 HSF 细胞中 MMP-2 的表达量 蓝色荧光 DAPI 核染,红色荧光标记 MMP-2 蛋白。

巩膜成纤维细胞的黏弹性显著增加,而细胞黏弹性主要由细胞骨架、结构以及外部压力所决定,说明在实验性近视形成的过程中,巩膜成纤维细胞的形态结构做出了相应的改变^[18],可能与巩膜重塑密切相关。

IGF-1 是具有调控细胞增殖、分化及凋亡的功能的生长因子,能与 IGF-1 受体(IGF-1R)结合,活化 IGF-1R 的胞内酪氨酸蛋白激酶,激活下游信号通路^[19],具有调控细胞增殖分化以及巩膜重塑等生理作用,在 FDM、LIM 豚鼠视网膜和巩膜中,IGF-1 的表达均升高^[20],在小鸡的玻璃

体内注射 IGF-1 后,发现其前房、玻璃体腔深度加深,眼轴伸长^[15,21],以上研究表明 IGF-1 与近视具有相关性。为进一步研究 IGF-1 影响近视的具体作用机制,本研究应用 IGF-1 体外培养 HSF 细胞,观察 IGF-1 对 HSF 细胞增殖与迁移的影响,结果显示,加入 IGF-1 组的细胞活力以及迁移率均逐渐升高,初步说明 IGF-1 对 HSF 细胞的增殖与迁移能力均具有促进作用,表明 IGF-1 能够改变 HSF 细胞的细胞活性,这可能会对巩膜的生长过程具有一定的影响。

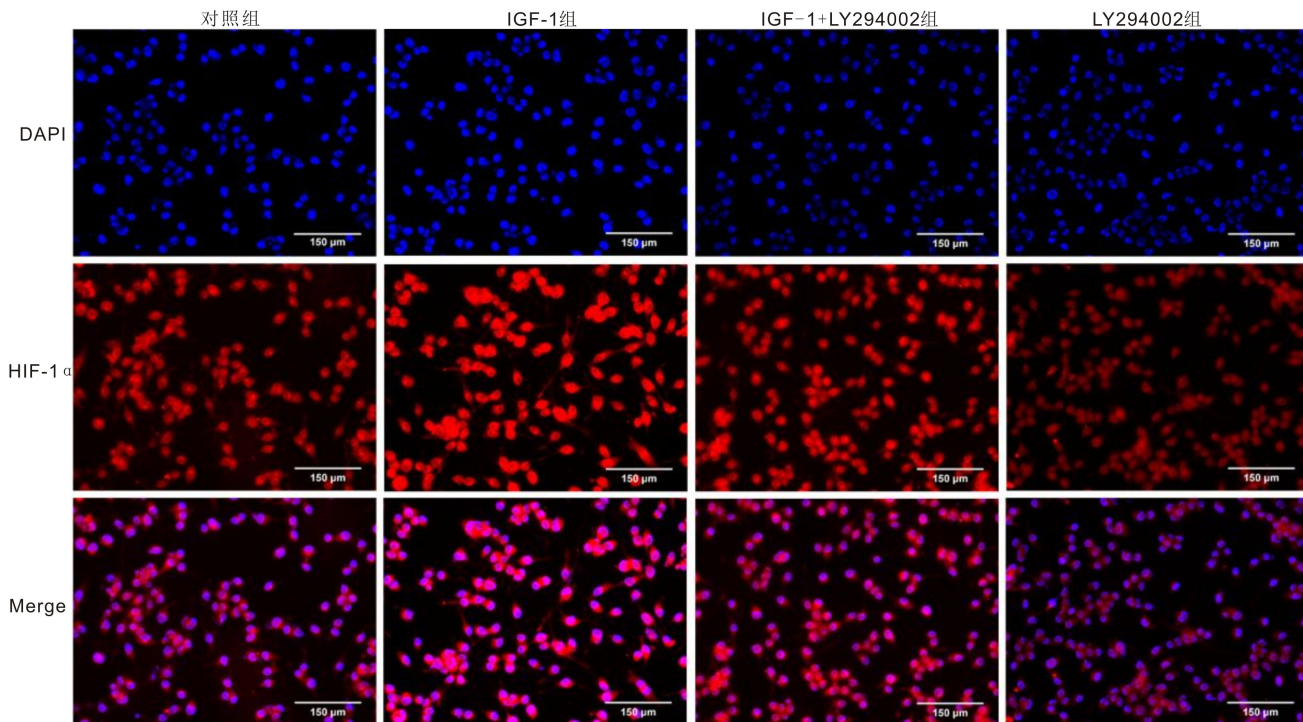


图7 各组 HSF 细胞中 HIF-1 α 的表达量 蓝色荧光 DAPI 核染,红色荧光标记 HIF-1 α 蛋白。

目前发现与 IGF-1 相关的信号通路众多,其中 PI3K/AKT 通路具有调控细胞的生长、增殖、凋亡以及葡萄糖转运的作用^[22],且在近视动物模型中被发现表达持续升高^[21,23-24],而在青光眼的兔模型中,PI3K/AKT 通路 与兔巩膜 I 型胶原的降解联系密切^[25],在近视相关研究中,IGF-1 可通过 STAT3 信号通路使豚鼠巩膜成纤维细胞调控 MMP-2 的表达升高^[26],通过 PI3K/AKT 通路保护人 ARPE-19 细胞免受氧化损伤^[27-28]。结合以往研究,本研究推测 IGF-1 可能通过 PI3K/AKT 通路,调控某些近视相关因子的表达,参与近视的发展过程。

TGF- β 2 是影响巩膜重塑的关键信号分子之一,可在视网膜色素上皮层、巩膜等眼内组织中广泛表达,TGF- β 2 在近视患者房水中有明显升高,并与眼轴长度呈正相关^[12],在动物实验中,2 周龄 FDM 豚鼠巩膜的 TGF- β 2 活性随诱导时间增加而逐渐升高^[29]。在巩膜的重塑过程中,胶原的合成与降解是一重要代谢变化,基质金属蛋白酶是一类能降解细胞外基质的蛋白水解酶,其中 MMP-2 能降解巩膜中的 I 型胶原^[13],在临床研究中,高度近视患者玻璃体中 MMP-2 表达水平显著升高^[14],此外,人们还发现 HIF-1 α 能对 MMP-2 进行调控^[7],影响巩膜胶原的合成,Zhao 等^[30]通过调控小鼠体内的 HIF-1 α 表达,发现 HIF-1 α 下调后表现出远视状态,上调则导致了近视发生。HIF-1 α 作为一种转录因子,能通过增强纤维化转录过程,导致纤维化的胶原纤维形成,使细胞外基质重塑。综上所述,TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 是近视性巩膜重塑的关键因子,有研究证明 IGF-1 能使 RPE 细胞中 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平升高^[31],使豚鼠巩膜成纤维细胞的 MMP-2 表达上调^[16]。为了进一步研究 IGF-1 对上述因子的影响,本研究使用 IGF-1 体外培养 HSF 细胞,检测了 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的表达,发现 IGF-1 促进了 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的蛋白和荧光表达,而在加入 LY294002 后,细胞 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的蛋白和荧

光表达则下调。

综上所述,本研究通过细胞实验初步证实了 IGF-1 具有促进 HSF 细胞的增殖、迁移的作用,并初次验证了 IGF-1 能通过 PI3K/AKT 信号通路调控 HSF 细胞中 TGF- β 2、MMP-2、HIF-1 α 的表达水平。但由于本研究是基于体外培养的细胞模型而展开,培养过程受到环境和主观因素的影响,且样本量较小,实验具有一定的局限性,未来我们将通过动物实验,进一步在体内验证 IGF-1 参与近视发生与发展的作用机制,以期为近视的防控提供新的思路。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 晁荣荣论文选题与修改,初稿撰写;晁荣荣、丁芝祥、范晶文献检索,数据分析;郑柳选题指导,论文修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] Hopf S, Pfeiffer N. Epidemiology of myopia. *Ophthalmologe*, 2017, 114(1):20-23.
- [2] Dong L, Kang YK, Li Y, et al. Prevalence and time trends of myopia in children and adolescents in China: a systemic review and meta-analysis. *Retina*, 2020,40(3):399-411.
- [3] Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*, 2016,123(5):1036-1042.
- [4] Desmettre T, Gatinel D, Leveziel N. Epigenetics and myopia: Mechanisms and therapeutic targets. *J Fr Ophtalmol*, 2022, 45(10): 1209-1216.
- [5] Sankaridurg P, Berntsen DA, Bullimore MA, et al. IMI 2023 digest. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023,64(6):7.
- [6] Hsu CR, Igarashi-Yokoi T, Liang IC, et al. Ten-year longitudinal morphologic changes in dome-shaped maculas in highly myopic eyes. *Retina*, 2023,43(11):1852-1862.
- [7] Wu H, Chen W, Zhao F, et al. Scleral hypoxia is a target for

myopia control. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115 (30): E7091-E7100.

[8] Metlapally R, Wildsoet CF. Scleral mechanisms underlying ocular growth and myopia. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 134:241-248.

[9] Rada JA, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia. Exp Eye Res, 2006, 82(2):185-200.

[10] Brown DM, Mazade R, Clarkson-Townsend D, et al. Candidate pathways for retina to scleral signaling in refractive eye growth. Exp Eye Res, 2022, 219:109071.

[11] Wang X, Hui Q, Jin Z, et al. Roles of growth factors in eye development and ophthalmic diseases. Zhejiang da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2022, 51(5):613-625.

[12] Jia Y, Hu DN, Zhou JB. Human aqueous humor levels of TGF- β 2:relationship with axial length. Biomed Res Int, 2014, 2014:258591.

[13] García-López C, Rodríguez-Calvo-de-Mora M, Borroni D, et al. The role of matrix metalloproteinases in infectious corneal ulcers. Surv Ophthalmol, 2023, 68(5):929-939.

[14] 赵婷婷, 吴梦竹, 靳婧, 等. 高度近视患者玻璃体中 MMP-2 和 TGF- β 2 水平与眼轴的相关性. 国际眼科杂志, 2017, 17(4):587-591.

[15] Ritchey ER, Zelinka CP, Tang JH, et al. The combination of IGF1 and FGF2 and the induction of excessive ocular growth and extreme myopia. Exp Eye Res, 2012, 99:1-16.

[16] Liu YX, Sun Y. MMP-2 participates in the sclera of guinea pig with form-deprivation myopia via IGF-1/STAT3 pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9):2541-2548.

[17] McBrien NA, Jobling AI, Gentle A. Biomechanics of the sclera in myopia; extracellular and cellular factors. Optom Vis Sci, 2009, 86(1):E23-E30.

[18] Chen BY, Ma JX, Wang CY, et al. Mechanical behavior of scleral fibroblasts in experimental myopia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250(3):341-348.

[19] Mandel S. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein-3, growth hormone (GH)-binding protein, erythrocyte IGF-I receptors, and growth rate during GH treatment. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(1):190-194.

[20] Ohguro H, Umetsu A, Sato T, et al. Lipid metabolism regulators

are the possible determinant for characteristics of myopic human scleral stroma fibroblasts (HSSFs). Int J Mol Sci, 2023, 25(1):501.

[21] Li YQ, Jiang JL, Yang J, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling participates in insulin-mediated regulation of pathological myopia-related factors in retinal pigment epithelial cells. BMC Ophthalmol, 2021, 21(1):218.

[22] 於亭, 宋继科, 毕宏生, 等. 高糖饮食与近视相关信号通路关系的研究. 眼科新进展, 2020, 40(8):789-792.

[23] 李晓萌, 于颖欣, 胡贵丽, 等. PI3K/Akt 信号通路在眼科疾病发生发展过程中的调控作用研究进展. 眼科新进展, 2021, 41(6):588-592.

[24] Bao B, Liu JP, Li TL, et al. Elevated retinal fibrosis in experimental myopia is involved in the activation of the PI3K/AKT/ERK signaling pathway. Arch Biochem Biophys, 2023, 743:109663.

[25] Yu J, Luo HM, Li N, et al. Suppression of type I collagen expression by miR-29b via PI3K, Akt, and Sp1 pathway, part II: an *in vivo* investigation. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(10):6019-6028.

[26] 朱子诚, 张金嵩, 柯根杰. AG490 阻断 Stat3 信号蛋白活性对巩膜成纤维细胞 MMP-2 和 Integrin β 1 表达的影响. 中华眼科杂志, 2011, 4:332-335.

[27] Liao RF, Yan FX, Zeng ZP, et al. Insulin-like growth factor-1 activates PI3K/Akt signalling to protect human retinal pigment epithelial cells from amiodarone-induced oxidative injury. Br J Pharmacol, 2018, 175(1):125-139.

[28] Zheng WH, Meng Q, Wang HT, et al. IGF-1-mediated survival from induced death of human primary cultured retinal pigment epithelial cells is mediated by an Akt - dependent signaling pathway. Mol Neurobiol, 2018, 55(3):1915-1927.

[29] Chen BY, Wang CY, Chen WY, et al. Altered TGF- β 2 and bFGF expression in scleral desmocytes from an experimentally-induced myopia guinea pig model. Albrecht Von Graefes Arch Fur Klin Und Exp Ophthalmol, 2013, 251(4):1133-1144.

[30] Zhao F, Zhang DK, Zhou QY, et al. Scleral HIF-1 α is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis. EBioMedicine, 2020, 57:102878.

[31] 吕明良, 李敏. IGF-1 对人 RPE 细胞 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响. 眼科新进展, 2011, 31(7):625-628.