

引文格式:朱然,梁舒,钱晶晶,李豪亮,张希熹.高糖和糖浓度波动对人角膜上皮细胞中 MMP-9 表达及真菌黏附的影响[J].眼科新进展,2021,41(6):534-539. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0111

【实验研究】

高糖和糖浓度波动对人角膜上皮细胞中 MMP-9 表达及真菌黏附的影响[△]

朱然 梁舒 钱晶晶 李豪亮 张希熹

作者简介:朱然(ORCID: 0000-0002-2573-0363),女,1994年出生,江苏南通人,硕士。主要研究方向:角膜病。E-mail:591665357@qq.com
通信作者:梁舒(ORCID: 0000-0003-0028-8086),女,1971年出生,江苏南通人,主任医师,副教授,博士,硕士研究生导师。主要研究方向:眼表疾病。E-mail: maggie7766@163.com

收稿日期:2021-02-03

修回日期:2021-04-25

本文编辑:方红玲

△基金项目:江苏省卫健委医学科面上项目(编号:H2019083);南通市市级科技计划项目(编号:MSZ19054)
作者单位:226001 江苏省南通市,南通大学附属医院眼科研究所

【摘要】 目的 探讨不同浓度葡萄糖环境下茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌对人角膜上皮细胞(HCEC)的黏附能力和 HCEC 中 MMP-9 表达的影响。**方法** 将处于对数生长期的 HCEC 分为 3 组:低糖组($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基培养)、高糖组($25.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基培养)和糖波动组($5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基交替培养),根据干预真菌的不同共分 9 小组(低糖-对照组、高糖-对照组、糖波动-对照组、低糖-茄病镰刀菌组、高糖-茄病镰刀菌组、糖波动-茄病镰刀菌组、低糖-尖端赛多孢子菌组、高糖-尖端赛多孢子菌组、糖波动-尖端赛多孢子菌组)。真菌干预组均加入相应真菌孢子悬液,且孢子与 HCEC 的比例为 10:1,对照组加入等量的无菌生理盐水。观察真菌在培养板上的生长状况,倒置显微镜下观察每组 HCEC 的形态,荧光白染色法和平板稀释涂布法用于 HCEC 的黏附真菌计数,利用 qRT-PCR 检测各组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 的表达,Western blot 检测各组 HCEC 中 MMP-9 蛋白的表达。**结果** 倒置显微镜下可见与真菌共培养的 HCEC 出现不同程度的形变和脱落,尤以高糖-茄病镰刀菌组和糖波动-茄病镰刀菌组最为显著。荧光白染色法和平板稀释涂布法计数结果显示,两种真菌高糖组和糖波动组对 HCEC 的黏附量均大于低糖组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);高糖和糖波动条件下,尖端赛多孢子菌黏附量大于茄病镰刀菌,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,MMP-9 mRNA 和蛋白在各组 HCEC 中均有表达,与低糖组相比,高糖组和糖波动组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 和蛋白表达均增多;高糖和糖波动条件下,真菌干预组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 和蛋白表达均高于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),而两种真菌干预组之间差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。**结论** 高糖和糖波动环境能够促进 HCEC 分泌更多的 MMP-9,并增加真菌对 HCEC 的黏附。

【关键词】 茄病镰刀菌;尖端赛多孢子菌;人角膜上皮细胞;高糖;糖浓度波动

【中图分类号】 R772.2

真菌性角膜炎是一种由致病真菌引起的常见的致盲疾病,发病率在我国呈逐年上升的趋势,其致病菌至少有 70 属,最主要的有镰刀菌属、弯孢菌属、曲霉菌属和念珠菌属四种^[1-2]。我院近期角膜刮片真菌培养结果显示,一种致病性较强的真菌——尖端赛多孢子菌的检出率增高,以往对这种真菌眼部感染的报道相对较少。糖尿病患者免疫能力低下,机体修复能力较差,角膜上皮损伤时有发生,极易感染糖尿病性真菌性角膜炎^[3]。当真菌入侵时,开始表现为真菌对角膜上皮缺损处基底膜的黏附,黏附后基质金属蛋白酶(MMPs)的表达增高,MMPs 可降解细胞外基质成分,诱导分生孢子黏附,有助于介导真菌侵袭,从而引起角膜溃烂或穿孔^[4]。近年来大量流行病学调查证实,糖尿病可促进 MMPs 的表达,且血糖大幅波动较持续高血糖有更强的细胞毒性,餐后高血糖较恒定血糖水平更能加剧糖尿病相关并发症的发生^[5-6]。当糖尿病患者血糖浓度变化时,人眼房水中葡萄糖含量也随之变化,这种角膜生长环境稳态的改变可能与糖尿病性真菌性角膜炎多发有一定关系。因此,本研究通过对低糖、高糖和糖浓度波动环境下的人角膜

上皮细胞(HCEC)进行真菌孢子干预,观察并比较了两种真菌在不同葡萄糖浓度下对 HCEC 的黏附能力以及干预后 HCEC 中 MMP-9 的表达变化,为预防和治疗糖尿病性真菌性角膜炎提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 HCEC 冻存于南通大学附属医院眼科实验室,茄病镰刀菌(BNCC 121547,中国),尖端赛多孢子菌(BNCC 226228,中国);DMEM(Gibco,美国),体积分数 10% 胎牛血清(Natocor,阿根廷), $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶(Gibco,美国);细胞培养板(Corning,美国),沙氏培养板(安图生物工程,中国);卡氏科弗卢尔荧光增白剂(Sigma,美国),Trizol 试剂(Invitrogen,美国),Real-time 反转录试剂盒(Thermo Scientific,美国),快速裂解液(RIPA)(索莱宝科技有限公司,中国),BCA 蛋白分析试剂盒(碧云天有限公司,中国);兔抗 MMP-9 多克隆一抗抗体(Abcam 38898,英国)。

1.2 方法

1.2.1 HCEC 的培养 HCEC 用 DMEM 培养基(含

体积分数 10 % 胎牛血清和 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉素) 培养于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中,待细胞融合 80% ~ 90% 后用 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶进行消化后传代,取对数生长期的 HCEC 用于实验。

1.2.2 真菌的培养及真菌孢子的收集 在超净台中,用接种铲将茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌分别接种于事先准备好的沙氏培养板上,于 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 7 d 后用无菌生理盐水冲洗菌面收集真菌孢子,无菌纱布滤除菌丝后,血细胞计数板进行孢子计数,反复吹打后调整孢子浓度为 $10 \times 10^6\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,7 d 内使用。

1.2.3 HCEC 的预处理及实验分组 在真菌干预前,先对 HCEC 进行预处理,分为 3 组:低糖组($5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基处理 24 h)、高糖组($25.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基处理 24 h)、糖波动组($5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基先后各处理 12 h)。24 h 后,设置真菌干预组,分为 6 组:低糖-茄病镰刀菌组、高糖-茄病镰刀菌组、糖波动-茄病镰刀菌组、低糖-尖端赛多孢子菌组、高糖-尖端赛多孢子菌组和糖波动-尖端赛多孢子菌组,每孔按孢子数量与细胞数量 10 : 1 的比例加入真菌孢子悬液。同时设置未加真菌的对照组(低糖-对照组、高糖-对照组、糖波动-对照组),每孔加入与真菌悬液等量的无菌生理盐水,低糖组和高糖组分别用 $5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $25.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基培养 6 h,糖波动组用 $5.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基处理 3 h 后,更换 $50.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基处理 3 h。

1.2.4 荧光白染色法 取 24 孔板,每孔接种 100×10^3 个 HCEC,不同浓度葡萄糖预处理 24 h 后真菌干预 6 h,PBS 洗去未结合的孢子, $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 30 min,洗去固定液。每孔加入一滴荧光白染色剂和一滴 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾避光染色 1 min,荧光显微镜下随机选取 5 个视野拍照,ImageJ 软件分析并记录各组 HCEC 黏附孢子数,取平均值。

1.2.5 平板稀释涂布法 取 24 孔板,每孔接种 100×10^3 个 HCEC,不同浓度葡萄糖预处理 24 h 后真菌干预 6 h,PBS 洗去未结合的孢子,每孔加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 细胞裂解液,8 min 后转入 1.5 mL EP 管离心去上清,加入 1 mL 无菌生理盐水吹打混匀,再稀释 100 倍后取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 用玻璃棒涂布于沙氏培养板, $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48 h,拍照并计算各组 HCEC 形成的菌落数。

1.2.6 qRT-PCR 法检测各组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 的表达 Trizol 提取各组 HCEC 总 RNA,Narodrop 200 微量分光光度仪测定浓度后按逆转录试剂盒说明书操作,将 RNA 逆转录成 cDNA,八连管内加入 cDNA 后进行 PCR 反应。使用上海生工有限公司合成引物。MMP-9 上游引物为 $5'\text{-CAGTACCGAGAGAAAGCCTATT-3'}$ (22 bp),下游引物为 $5'\text{-CAGGATGTCATAGGTCACGTAG-3'}$ (22 bp);GADPH

上游引物为 $5'\text{-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'}$ (20 bp),下游引物为 $5'\text{-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'}$ (18 bp)。反应过程为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,持续 40 个循环,最终延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。每组 3 个复孔,以 GAPDH 的表达为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 MMP-9 mRNA 的相对表达量。

1.2.7 Western blot 检测各组 HCEC 中 MMP-9 蛋白的表达 预冷的 PBS 漂洗各组 HCEC 5 min \times 3 次,每孔加入 $80\text{ }\mu\text{L}$ 细胞裂解液后置于冰上裂解 10 min,用刮棒将细胞刮入裂解液中,将细胞转移至 1.5 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床摇 30 min 使细胞成分裂解, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,剩余蛋白液加 4 \times 上样缓冲液,金属浴 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,蛋白变性 5 min。混合液上样于胶孔中, 80 V 电压电泳 20 ~ 30 min,调节电压至 120 V 电泳 2 h 停止电泳,恒流 250 mA 转膜 2 h 至 PVDF 膜上。 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜 5 min \times 1 次,一抗中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。TBST 洗 5 min \times 3 次,二抗中室温摇床孵育 2 h。TBST 洗 15 min \times 3 次。将 GAPDH 作为内参,滴加显影液后,ChemiDoc 显影仪扫描成像,用 ImageJ 软件分析 MMP-9 表达的灰度值,实验重复 3 次取平均值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析,研究不同浓度葡萄糖和不同真菌对 HCEC 孢子黏附量的影响采用双因素方差分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,自变量之间存在交互作用时,采用简单主效应和成对比较分析。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 真菌的培养 茄病镰刀菌生长迅速,菌落呈棉絮状扁平生长,菌丝较长,正面呈浅黄色或米白色(图 1A),菌落背面与正面颜色基本一致,呈浅黄色或白色。7 d 后对其菌丝进行镜检,可见透明分隔菌丝和两种分生孢子,小型分生孢子体积小且数量丰富,一般生长在菌丝顶端,呈假头状,形态多变,呈卵圆形或柱形(图 1B);大型分生孢子体积较大且形似镰刀(图 1C)。尖端赛多孢子菌生长迅速,培养 1 d 即有白色短绒毛样菌落形成,绒毛较致密;刚开始时菌落背面呈现乳白色,3 d 时菌落背面逐渐变为灰黑色;5 ~ 7 d 时菌落背面呈黑色。尖端赛多孢子菌生长成熟时,菌落表面中央变为褐色,边缘呈浅褐色,边缘一圈内可见白色放射样菌丝,呈同心圆状(图 1D)。涂片镜检,可见透明分生孢子梗、黄褐色分生孢子,且孢子数量极多,呈卵圆形(图 1E),荧光染色可见孢子体积小,形似水滴,呈卵圆形(图 1F)。

2.2 不同环境下 HCEC 的生长状态 倒置显微镜下对 HCEC 进行形态观察发现,对照组:低糖环境下 HCEC 呈短梭形,细胞间紧密连接,呈典型的铺路石状生长;高糖环境下 HCEC 稍增大,细胞间隙增大;

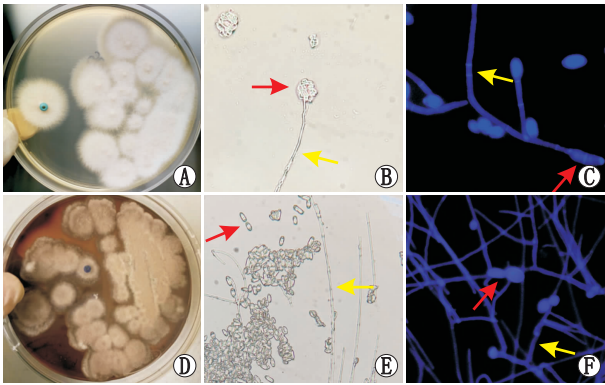


图1 真菌培养情况 A: 茄病镰刀菌菌落;B: 茄病镰刀菌菌丝涂片,分隔菌丝(黄色箭头),假头状小型分生孢子(红色箭头)($\times 200$);C: 茄病镰刀菌荧光白染色,分隔菌丝(黄色箭头),大型分生孢子(红色箭头)($\times 400$);D: 尖端赛多孢子菌菌落正面;E: 尖端赛多孢子菌菌丝涂片,分生孢子梗(黄色箭头),分生孢子(红色箭头)($\times 200$);F: 尖端赛多孢子菌荧光白染色,分生孢子梗(黄色箭头),分生孢子(红色箭头)($\times 400$)。

糖浓度波动环境下 HCEC 数量减少,细胞变小,排列紊乱。茄病镰刀菌干预组:镜下可见 3 种糖浓度下 HCEC 均有不同程度的拉长变形,形成细胞间空洞,尤其是高糖和糖波动环境下的 HCEC 相比于低糖条件下皱缩和脱落明显增多。尖端赛多孢子菌干预组:尖端赛多孢子菌干预 6 h 后观察可见尖端赛多孢子菌的孢子部分向菌丝相转化,高糖和糖波动环境下的孢子相比于低糖条件下略有增多,3 种糖浓度环境下 HCEC 形态均出现皱缩,细胞内颗粒增多,细胞状态逐渐变差(见图 2)。

2.3 荧光白染色法/平板稀释涂布法计数各组 HCEC 黏附真菌孢子数 分析荧光显微镜下观察 HCEC 黏附的孢子数量发现,葡萄糖浓度和菌种存在交互作用,不同糖浓度和菌种对孢子黏附量的影响差异有统计学意义($F = 132.38, P < 0.001$)。低糖环境下每个视野茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌黏附孢子数分别为(36.00 ± 5.35)个和(75.33 ± 14.52)个;与低糖组相比,高糖组茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌黏附孢子数分别为(84.33 ± 4.99)个($P = 0.009$)和(197.00 ± 14.70)个($P = 0.015$),糖波动组分别为(108.00 ± 5.35)个($P = 0.045$)和(307.33 ± 23.30)个($P = 0.012$)。

通过平板稀释涂布法对黏附于 HCEC 表面的真菌总量进行分析发现,葡萄糖浓度和菌种存在交互作

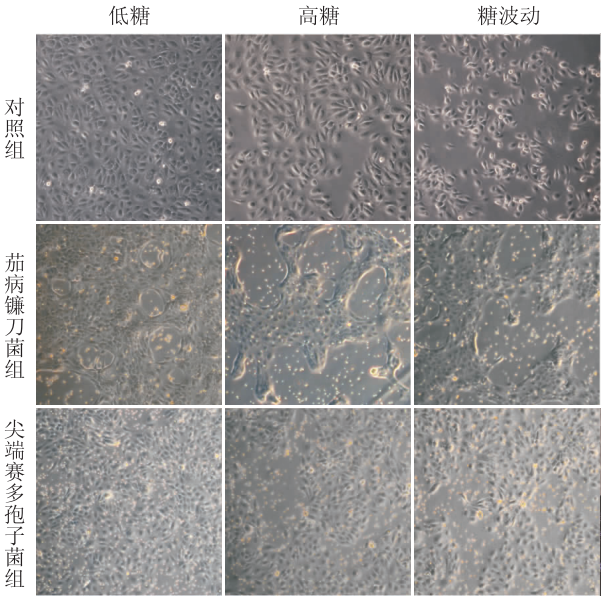


图2 各组 HCEC 在不同糖浓度环境下的生长情况($\times 100$)

用,各组培养所得真菌的集落数间差异有统计学意义($F = 20.815, P < 0.001$)。低糖组茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌黏附数量分别为(0.97 ± 0.17) $\times 10^3$ CFU 和(1.09 ± 0.11) $\times 10^4$ CFU,与低糖组相比,高糖组茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌黏附数量分别为(2.23 ± 0.13) $\times 10^3$ CFU ($P = 0.038$)、(1.64 ± 0.50) $\times 10^4$ CFU ($P = 0.048$),糖波动组分别为(2.70 ± 0.16) $\times 10^3$ CFU ($P = 0.028$)、(1.92 ± 0.16) $\times 10^4$ CFU ($P = 0.020$),与荧光白染色法结果趋势一致。

两种真菌相比,在高糖环境下,尖端赛多孢子菌干预组真菌黏附数多于茄病镰刀菌干预组,差异有统计学意义($P_{\text{荧光白染色法}} = 0.011, P_{\text{平板稀释涂布法}} = 0.001$);糖波动时,尖端赛多孢子菌组真菌黏附量大于茄病镰刀菌组,差异有统计学意义($P_{\text{荧光白染色法}} = 0.025, P_{\text{平板稀释涂布法}} = 0.012$)(见表 1 和图 3)。

2.4 各组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 和蛋白的相对表达水平 qRT-PCR 检测结果显示,各组 HCEC 中 MMP-9 mRNA 表达比较,差异有统计学意义($F = 11.73, P < 0.001$);真菌干预组相对于对照组,高糖和糖波动条件下 HCEC 中 MMP-9 mRNA 的相对表达水平均升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),两种真菌干预组之间差异无统计学意义($P =$

表1 不同方法计算不同浓度葡萄糖环境下真菌干预后 HCEC 表面真菌黏附量比较

组别	荧光白染色法/个			平板稀释涂布法/CFU		
	低糖	高糖	糖波动	低糖	高糖	糖波动
茄病镰刀菌组	36.00 ± 5.35	84.33 ± 4.99^a	108.00 ± 5.35^a	$(0.97 \pm 0.17) \times 10^3$	$(2.23 \pm 0.13) \times 10^3^a$	$(2.70 \pm 0.16) \times 10^3^a$
尖端赛多孢子菌组	75.33 ± 14.52	197.00 ± 14.70^{ab}	307.33 ± 23.30^{ab}	$(1.09 \pm 0.11) \times 10^4$	$(1.64 \pm 0.50) \times 10^4^{ab}$	$(1.92 \pm 0.16) \times 10^4^{ab}$

注:与同一真菌干预下的低糖环境相比,^a $P < 0.05$;与同一葡萄糖浓度下的茄病镰刀菌组相比,^b $P < 0.05$ 。

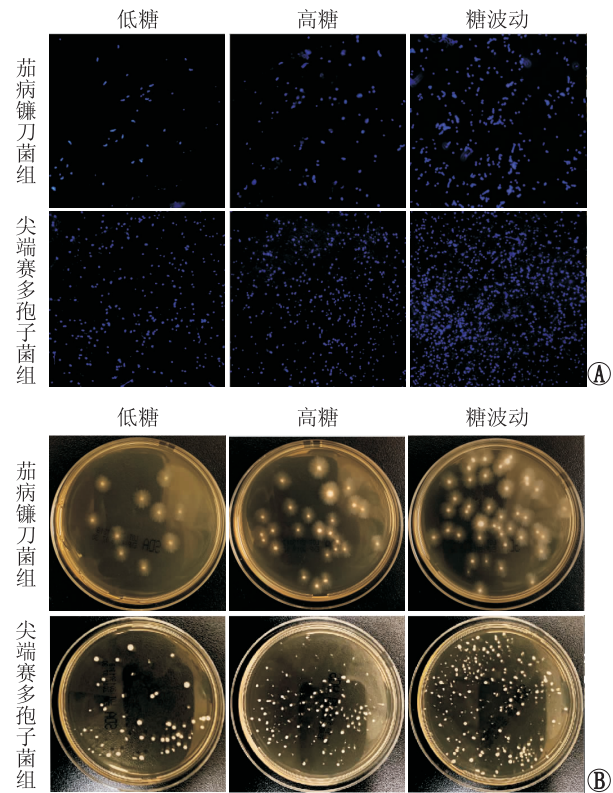


图3 真菌对HCEC的黏附情况 A:真菌黏附细胞的荧光白染色照片(×100);B:真菌平板稀释涂布照片。

表2 不同浓度葡萄糖环境下真菌干预后各组HCEC中MMP-9的mRNA和蛋白表达

组别	MMP-9 mRNA			MMP-9 蛋白		
	低糖	高糖	糖波动	低糖	高糖	糖波动
对照组	1.07 ± 0.10	1.49 ± 0.14	1.69 ± 0.19	1.00 ± 0.04	2.58 ± 0.07 ^a	3.32 ± 0.26 ^a
茄病镰刀菌组	2.56 ± 0.18	3.60 ± 0.30 ^{ac}	4.78 ± 0.20 ^{abc}	2.42 ± 0.15	4.00 ± 0.20 ^{ac}	5.07 ± 0.21 ^{abc}
尖端赛多孢子菌组	3.54 ± 0.23	4.55 ± 0.19 ^{ac}	4.90 ± 0.33 ^{ac}	2.25 ± 0.14	4.20 ± 0.34 ^{ac}	7.37 ± 0.39 ^{abc}

注:与同一真菌干预下的低糖组相比,^a*P* < 0.05;与同一真菌干预下的高糖组,^b*P* < 0.05;与同一浓度葡萄糖下的对照组相比,^c*P* < 0.05。

3 讨论

茄病镰刀菌是丝状真菌性角膜炎中分离出的最常见的一种病原菌,生长快,且致病性强^[7-9]。而尖端赛多孢子菌是一种相对少见的顽固性条件致病菌,好发于免疫功能缺陷者^[10]。近年来研究表明,尖端赛多孢子菌可侵犯脑、肺、骨、关节、眼和皮肤等组织^[11]。眼部的尖端赛多孢子菌感染常由外伤引起,发展较为迅速^[12-13]。本研究对茄病镰刀菌和尖端赛多孢子菌干预的HCEC进行观察,发现与真菌孢子共培养的HCEC会出现不同程度的形变和脱落,尤以高糖和糖波动条件下的茄病镰刀菌组最为显著。曾庆延等^[14]在电镜下观察到镰刀菌能通过分泌某种物质来诱导上皮细胞产生伪足,通过肌动蛋白包绕而被摄入细胞内。我们认为真菌分泌的酶类具有特异性,茄病镰刀菌的分泌酶可加强自身对角膜细胞基质的黏附和降解能力,而尖端赛多孢子菌可能不能分泌此酶,因此造成了彼此的差异。

本研究发现,在不同浓度葡萄糖环境下,真菌对

0.465、0.087)。在茄病镰刀菌组内,糖波动环境下HCEC中MMP-9 mRNA相对表达水平与高糖环境下相比明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)(见表2)。

Western blot 检测结果显示,各组HCEC中MMP-9蛋白相对表达量比较,组间差异有统计学意义(*F* = 29.23, *P* < 0.001)。高糖和糖波动环境下,茄病镰刀菌组和尖端赛多孢子菌组中MMP-9蛋白相对表达水平均高于相应对照组,差异均有统计学意义(均为*P* < 0.05),但两种真菌干预组之间差异无统计学意义(*P* = 0.201、0.021)。在茄病镰刀菌干预组和尖端赛多孢子菌组,糖波动环境下MMP-9的蛋白表达水平高于持续高糖环境,差异有统计学意义(*P* < 0.05)(见图4和表2)。

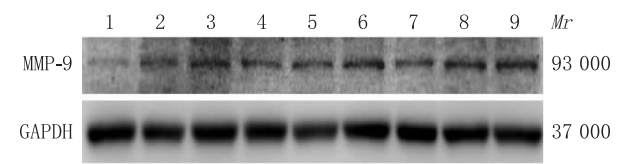


图4 各组HCEC中MMP-9蛋白表达 1:低糖-对照组;2:高糖-对照组;3:糖波动-对照组;4:低糖-茄病镰刀菌组;5:高糖-茄病镰刀菌组;6:糖波动-茄病镰刀菌组;7:低糖-尖端赛多孢子菌组;8:高糖-尖端赛多孢子菌组;9:糖波动-尖端赛多孢子菌组。

HCEC的黏附量有明显差别,高糖和糖浓度波动能促进真菌孢子对HCEC的黏附。一方面可能由于高糖和糖波动条件下HCEC糖基化终末产物增加和蛋白激酶通路增强,影响了细胞本身黏附能力的调节^[15]。Segal等^[16]在早期研究发现,假丝酵母菌对糖尿病患者的阴道上皮细胞的黏附能力比普通对照组更强,说明高糖使宿主细胞发生改变进而使真菌更容易黏附。另一方面我们推测高糖和糖波动环境能促进HCEC分泌某些因子,该因子的过表达能促进真菌的黏附。Mikamo等^[17]研究发现,高糖能刺激阴道上皮细胞中ICAM-1高表达,进而导致念珠菌黏附增加。此外,在黏附实验中我们还发现茄病镰刀菌对HCEC的黏附数量明显少于尖端赛多孢子菌,这与Pinnock等^[18]的研究结果一致。造成这种情况的具体原因尚不清楚,可能与茄病镰刀菌菌丝平行于角膜表面的生长方式有关,相比垂直于角膜生长,这种平行生长方式侵入组织速率较慢,也可能与茄病镰刀菌激活FAK信息通路缓慢有关^[4]。

真菌引起角膜感染的先决因素是真菌对于上皮

的黏附,以往有大量研究探讨了真菌黏附的分子机制,角膜上皮基底膜和角膜基质的暴露可能为真菌黏附提供了场所^[6]。角膜基质IV型胶原蛋白的降解主要与MMP-9有关,MMP-9又称为明胶酶B,可降解IV型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 链,激活炎症细胞,诱导炎症反应,对角膜细胞外基质造成降解^[19-21]。Dos Reis等^[22]认为在角膜溃疡的早期阶段,MMP-9选择性调节溃疡进程,与病变进展呈正相关。本研究结果显示,经真菌孢子处理的HCEC中的MMP-9 mRNA和蛋白表达均高于对照组,这表明在真菌性角膜溃疡的形成中MMP-9可能起着重要作用,这与Rohini等^[20]的研究结果一致。此外,我们还发现无论是否进行真菌孢子干预,在高糖和糖浓度波动的作用下,HCEC中MMP-9 mRNA和蛋白表达水平始终均高于低糖环境,说明持续的高糖刺激和糖浓度大幅波动的情况下,也会促进HCEC分泌MMP-9,这可能与高糖状态下细胞氧化应激增强有关:高糖环境能激活蛋白激酶RKC,促进氧自由基的产生,诱发细胞氧化应激反应,激活细胞因子启动MMP-9基因转录,增加MMP-9表达。糖浓度的不断波动使细胞自身调节能力受损,氧化应激加剧,分泌更多的MMP-9^[23]。所以,相比于无全身病患者,血糖控制不佳的糖尿病患者普遍体内MMP-9表达偏高,尤其在与真菌接触后,MMP-9的分泌进一步升高,患真菌性角膜炎的比例明显增高^[24]。Ceriello等^[25]研究发现,相比于慢性持续性高血糖,血糖波动更能促进糖尿病并发症的发生,正如本研究中茄病镰刀菌干预组的HCEC在糖浓度波动情况下比持续高糖时MMP-9表达水平更高。因此,糖尿病性真菌性角膜炎临床上在降低患者血糖时,还应尽量减少血糖漂移。

综上所述,本研究发现,真菌对于HCEC的黏附数量与细胞中MMP-9表达水平呈正相关。在高糖和糖浓度波动的刺激下,MMP-9表达增高,同时真菌对HCEC的黏附增强。且两种真菌相比,尖端赛多孢子菌相比于茄病镰刀菌具有更强的黏附性。这为糖尿病性真菌性角膜炎的预防提供了新的实验依据,也为不同菌种所致的真菌感染的治疗提供了指导意见。但尖端赛多孢子菌黏附力明显大于茄病镰刀菌的具体原因还不清楚,且目前本实验中所用的体外细胞模型无法完全模拟体内环境,MMP-9与角膜表面真菌黏附的关系仍需在糖尿病性真菌性角膜炎大鼠模型中进一步探讨。

参考文献

- [1] GUPTA M K, CHANDRA A, PRAKASH P, BANERJEE T, MAURYA O P, TILAK R. Fungal keratitis in north India: spectrum and diagnosis by Calcofluor white stain[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(3): 462-463.
- [2] JENG B H. Challenges in the management of fungal keratitis[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2017, 135(6): 525-526.
- [3] VIEIRA-POTTER V J, KARAMECHOS D, LEE D J. Ocular complications of diabetes and therapeutic approaches[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 3801570.
- [4] DONG X, SHI W, ZENG Q, XIE L. Roles of adherence and matrix metalloproteinases in growth patterns of fungal pathogens in cornea[J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30(8): 613-620.
- [5] NUSCA A, TUCCINARDI D, ALBANO M, CAVALLARO C, RICOTTINI E, MANFRINI S, et al. Glycemic variability in the development of cardiovascular complications in diabetes[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2018, 34(8): e3047.
- [6] 贾洪真, 彭秀军. 基质金属蛋白酶对圆锥角膜的影响[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(9): 1644-1647.
- [7] JIA H Z, PENG X J. Effect of matrix metalloproteinases in keratoconus[J]. *Int Eye Sci*, 2016, 16(9): 1644-1647.
- [7] 李妍, 李丽红, 刘海, 盛智超, 闵婕, 胡竹林. 树鼩茄病镰刀菌性角膜炎房水中Th1/Th2炎症因子的变化[J]. 眼科新进展, 2017, 37(9): 824-827.
- [8] LI Y, LI L H, LIU H, SHENG Z C, MIN J, HU Z L. Changes of Th1/Th2 inflammatory factors in the aqueous humor of tree shrews with fusarium solani keratitis[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(9): 824-827.
- [8] SAHAY P, SINGHAL D, NAGPAL R, MAHARANA P K, FARID M, GELMAN R, et al. Pharmacologic therapy of mycotic keratitis[J]. *Surv Ophthalmol*, 2019, 64(3): 380-400.
- [9] MANIKANDAN P, ABDEL-HADI A, RANDHIR B S Y, REVATHI R, ANITA R, BANAWAS S, et al. Fungal keratitis: epidemiology, rapid detection, and antifungal susceptibilities of fusarium and aspergillus isolates from corneal scrapings[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6395840.
- [10] GALVIS V, BERRIOSPI R, RELLO A, RAMIREZ D, VILLARREAL D. Mycotic keratitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent patient[J]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*, 2018, 93(12): 613-616.
- [11] CHEN T C, HO M W, CHIEN W C, LIN H H. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a near-drowning patient[J]. *J Formos Med Assoc*, 2016, 115(3): 213-214.
- [12] 李娟娟, 黎铎, 胡竹林. 眼外伤所致尖端赛多孢菌性眼内炎[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2011, 33(3): 161-162.
- [12] LI J J, LI H, HU Z L. Endophthalmitis caused by *scedosporium apiospermum* after eye injury[J]. *Chin J Ocul Traumatol Occupat Eye Dis*, 2011, 33(3): 161-162.
- [13] RAMAKRISHNAN S, MANDLIK K, SATHE T S, GUBERT J, KRISHNAN T, BASKANAN P. Ocular infections caused by *Scedosporium apiospermum*: A case series[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2018, 66(1): 137-140.
- [14] 曾庆延, 谢立信, 董晓光. 真菌毒力与角膜真菌感染[J]. 国外医学眼科学分册, 2004, 28(1): 18-21.
- [14] ZENG Q Y, XIE L X, DONG X G. Fungal virulence and corneal fungal infection[J]. *Section Ophthalmol Foreign Med Sci*, 2004, 28(1): 18-21.
- [15] 朱姝, 贾卉. 糖尿病角膜上皮和泪膜改变的研究进展[J]. 眼科新进展, 2007, 27(4): 318-320.
- [15] ZHU S, JIA H. Advanced study on the changes of corneal epithelium and tear film in diabetes mellitus[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2007, 27(4): 318-320.
- [16] SEGAL E, SOROKA A, SCHECHTER A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells *in vitro* and candidal vaginitis[J]. *Sabouraudia*, 1984, 22(3): 191-200.
- [17] MIKAMO H, YAMAGISHI Y, SUGIYAMA H, SADAKATA H, MIYAZAKI S, SANO T, et al. High glucose-mediated overexpression of ICAM-1 in human vaginal epithelial cells increases adhesion of *Candida albicans*[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2018, 38(2): 226-230.
- [18] PINNOCK A, SHIVSHETTY N, ROY S, RIMMER S, DOUGLAS I, MACNEIL S, et al. *Ex vivo* rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255(2): 333-342.
- [19] 梁庆丰, 李彬, 张阳, LABBE A. 兔铜绿假单胞菌性角膜感染后炎症失控反应发病机制及治疗研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(2): 125-131.
- [19] LIANG Q F, LI B, ZHANG Y, LABBE A. Pathogenesis and treatment of overwhelming inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in rabbit[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(2): 125-131.
- [20] ROHINI G, MURUGESWARI P, PRAJNA N V, LALITHA P, MUTHUKARUPPAN V. Matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in patients with fungal keratitis[J]. *Cor-*

- nea, 2007, 26(2):207-211.
- [21] ROBERT M C, ARAFAT S N, SPURR-MICHAUD S, CHODOSH J, DOHLMAN C H, GIPSON I K. Tear matrix metalloproteinases and myeloperoxidase levels in patients with boston keratoprosthesis type I[J]. *Cornea*, 2016, 35(7):1008-1014.
- [22] DOS REIS C A, DE MIRANDA SOARES M A, GOMES J R. Expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9 in the rat small intestine during intrauterine and postnatal life[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2020, 303(11):2839-2846.
- [23] DEL PRATO S. In search of normoglycaemia in diabetes: controlling postprandial glucose[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26(Suppl 3):S9-17.
- [24] 黄晓明, 赵桂秋, 林静, 葛程, 胡丽婷, 姜楠, 等. 糖尿病真菌性角膜炎患者临床特征、病原学特点及预后的回顾性分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(7):621-626.
HUANG X M, ZHAO G Q, LIN J, GE C, HU L T, JIANG N, et al. A retrospective analysis of the clinical characteristics, etiology and prognosis of fungal keratitis with diabetes mellitus[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(7):621-626.
- [25] CERIELLO A, COLAGIURI S. International diabetes federation guideline for management of postmeal glucose: a review of recommendations[J]. *Diabet Med*, 2008, 25(10):1151-1156.

Effects of high glucose and fluctuating glucose on the expression of MMP-9 in human corneal epithelium cells and the adhesion of Fungi

ZHU Ran, LIANG Shu, QIAN Jingjing, LI Haoliang, ZHANG Xixi

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

[Abstract] Objective To investigate the adhesion ability of *Fusarium solani* (*F. solani*) and *Scenedosporium apiospermum* (*S. apiospermum*) to human corneal epithelium cells (HCEC) and their effects on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HCEC under different concentrations of glucose. **Methods** The cells in logarithmic growth were divided into 3 groups: low glucose group, in which cells were cultured with $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose concentration medium, high glucose group, in which cells were cultured with $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose concentration medium and fluctuating glucose group, in which cells were cultured with $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose concentration medium alternately. Then the cells were divided into 9 groups according to different fungal interventions, and they were low glucose-control group, high glucose-control group, fluctuating glucose-control group, low glucose-*F. solani* intervention group, high glucose-*F. solani* intervention group, fluctuating glucose-*F. solani* intervention group, low glucose-*S. apiospermum* intervention group, high glucose-*S. apiospermum* intervention group and fluctuating glucose-*S. apiospermum* intervention group. The fungal intervention groups were treated with corresponding fungal spores suspension and the ratio of spores to HCEC was 10 : 1. The control groups were given the sterile normal saline of equal volume. We observed the growth of fungi on the agar plate. The morphology of HCEC in each group was observed by the inverted microscope. Calcofluor white fluorescent staining and spread plate methods were used to count the adherent fungal spores of HCEC. Quantitative real-time PCR was used to determine the relative expression of MMP-9 mRNA and Western blot was used to determine the relative expression of MMP-9 proteins in HCEC. **Results** We observed that the HCEC co-cultured with fungi showed varying degrees of deformation and abscission, especially in the high glucose-*F. solani* intervention group and fluctuating glucose-*F. solani* intervention group. The results of Calcofluor white fluorescent staining and spread plate methods showed that the adhesion population of fungi to HCEC was higher in high glucose groups and fluctuating glucose groups than that in the low glucose groups (all $P < 0.05$). The adhesion population of *S. apiospermum* was higher than that of *F. solani* under the conditions of high glucose and fluctuating glucose, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The result of Quantitative real-time PCR and Western blot showed that both MMP-9 mRNA and protein were expressed in HCEC of each group. The expression of MMP-9 mRNA and protein in HCEC was higher in high glucose groups and fluctuating glucose groups than that in low glucose groups. under the conditions of high glucose and fluctuating glucose, the expression levels of MMP-9 mRNA and protein in HCEC of fungal intervention groups was higher than those of the control groups (all $P < 0.05$), but there was no statistically significant difference between the *F. solani* intervention group and *S. apiospermum* intervention group ($P > 0.05$). **Conclusion** High glucose and fluctuating glucose can promote MMP-9 secretion and increase the fungal adherence to the HCEC.

[Key words] *Fusarium solani*; *Scenedosporium apiospermum*; human corneal epithelium cells; high glucose; fluctuating glucose