



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 机械敏感离子通道 Piezo1 在结膜松弛症中的表达研究  
作者: 夷成龙, 陶霓霞, 杨灿, 赵怡, 项敏泓  
收稿日期: 2026-03-12  
网络首发日期: 2026-05-11  
引用格式: 夷成龙, 陶霓霞, 杨灿, 赵怡, 项敏泓. 机械敏感离子通道 Piezo1 在结膜松弛症中的表达研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260510.1307.006>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 机械敏感离子通道 Piezo1 在结膜松弛症中的表达研究

夷成龙<sup>1</sup>, 陶霓霞<sup>2</sup>, 杨 灿<sup>2,3</sup>, 赵 怡<sup>2</sup>, 项敏泓<sup>2</sup>

(上海市中医药大学附属普陀医院<sup>1</sup>动物实验中心、<sup>2</sup>眼科, 上海 200062; <sup>3</sup>安徽医科大学上海普陀中心临床学院眼科, 上海 200062)

2026-03-12 接收

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82074495）

作者简介：夷成龙，男，硕士研究生；

项敏泓，女，副教授，博士生导师，通信作者，E-mail:xiangminhong@sohu.com

**摘要** 目的 旨在观察球结膜成纤维细胞中 Piezo1 的表达是否参与结膜松弛症（CCH）的发生发展。方法 采用组织块贴壁法获得 CCH 患者和正常对照组（NC）的原代球结膜成纤维细胞，纯化后行成纤维细胞鉴定。免疫组化检测 NC 组和 CCH 组中 Piezo1 的表达情况。免疫荧光检测 CCH 组和 NC 组球结膜成纤维细胞中 Piezo1 的表达情况，以及 Piezo1 激动剂 Yoda1 干预后 MMP-9 的表达情况。qRT-PCR 检测 CCH 组和 NC 组中 Piezo1 与 MMP-9 的 mRNA 表达情况，以及 Yoda1 干预后 MMP-9 的 mRNA 表达情况。此外，Yoda1 干预后采用共聚焦显微镜检测 NC 组球结膜成纤维细胞中 Ca<sup>2+</sup>内流情况；Yoda1 干预后膜片钳检测 NC 组球结膜成纤维细胞的电流幅度，验证 Piezo1 功能性表达。结果 成功培养原代球结膜成纤维细胞。免疫组化发现 CCH 组中 Piezo1 蛋白表达升高（ $P<0.01$ ）；qRT-PCR 检测发现在 CCH 组中 Piezo1 的 mRNA 表达升高（ $P<0.01$ ），MMP-9 的 mRNA 表达升高（ $P<0.01$ ），CCH+Yoda1 组 MMP-9 的 mRNA 表达升高（ $P<0.01$ ）。免疫荧光检测 Piezo1 发现 CCH 组相对于 NC 组荧光增强（ $P<0.05$ ），加入 Yoda1 刺激后 MMP-9 的荧光较 CCH 组增强（ $P<0.05$ ）。NC 组球结膜成纤维细胞加入 Yoda1 后，共聚焦显微镜显示 Piezo1 的荧光增强（ $P<0.05$ ）；膜片钳检测 NC 组球结膜成纤维细胞加入 Yoda1 后激活的电流幅度增强（ $P<0.0001$ ）。结论 CCH 中结膜组织产生的机械损伤上调了 Piezo1 的表达，而 Piezo1 的激活可能放大了 CCH 造成的机械性损伤。

**关键词** 结膜松弛症；Piezo1；Yoda1；MMP-9；机械损伤；球结膜成纤维细胞

中图分类号 R 777.3

## Expression studies of the mechanosensitive ion channel Piezo1 in Conjunctivochalasis

Yi Chenglong<sup>1</sup>, Tao Nixia<sup>2</sup>, Yang Can<sup>2,3</sup>, Zhao Yi<sup>2</sup>, Xiang Minhong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Animal Experiment Center,<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Shanghai Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062;<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Shanghai Putuo Center Clinical College, Anhui Medical University, Shanghai 200062)

**Abstract Objective** To investigate whether the expression of Piezo1 in bulbar conjunctival fibroblasts contributes to the development of conjunctivochalasis (CCH). **Methods** Primary bulbar conjunctival fibroblasts from CCH patients and normal controls (NC) were obtained by tissue block appanation, purified and then subjected to fibroblast identification. Immunohistochemistry was used to detect the expression of Piezo1 in the NC and CCH groups. Immunofluorescence was used to detect the expression of Piezo1 in bulbar conjunctival fibroblasts in the CCH and NC groups, as well as the expression of MMP-9 after the intervention of the Piezo1 agonist, Yoda1. qRT-PCR was used to detect the expression of mRNA of *Piezo1* and *MMP-9* in the CCH and NC groups, as well as the expression of mRNA of *MMP-9* after the intervention of Yoda1. In addition, confocal microscopy was used to detect Ca<sup>2+</sup> influx in bulbar conjunctival fibroblasts in the NC group after Yoda1 intervention. Membrane clamp was used to detect the current amplitude of NC bulbar conjunctival fibroblasts after Yoda1 intervention to verify the functional expression of Piezo1. **Results** Primary bulbar conjunctival fibroblasts were successfully cultured. Immunohistochemistry revealed that Piezo1 protein expression was elevated in the CCH group ( $P<0.01$ ). qRT-PCR assay revealed that mRNA expression of *Piezo1* was elevated in the CCH group ( $P<0.01$ ), mRNA expression of *MMP-9* was elevated in the CCH group ( $P<0.01$ ), and mRNA expression of *MMP-9* was elevated in the CCH+Yoda1 group ( $P<0.01$ ). Immunofluorescence detection of Piezo1 revealed enhanced fluorescence in the CCH group relative to the NC group ( $P<0.05$ ), and the fluorescence of MMP-9 was enhanced by the addition of Yoda1 stimulation compared with that of the CCH group ( $P<0.05$ ). Confocal microscopy of NC group bulbar conjunctival fibroblasts after the addition of Yoda1 showed enhanced fluorescence of Piezo1 ( $P<0.05$ ). The addition of Yoda1 activated enhanced current amplitude, showed by membrane clamp detection of NC group bulbar conjunctival fibroblasts ( $P<0.0001$ ). **Conclusion**

Mechanical damage produced by conjunctival tissues in conjunctivochalasis upregulates Piezo1 expression, and Piezo1 activation may amplify the mechanical damage caused by CCH.

**Key words** conjunctivochalasis; Piezo1; Yoda1; MMP-9; mechanical injury; bulbar conjunctival fibroblasts

**Found programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82074495)

**Corresponding author** Xiang Minhong, E-mail: xiangminhong@sohu.com

结膜松弛症 (conjunctivochalasis, CCH) 是最常见的老年性眼病之一, 其特点是结膜皱褶冗余和松弛, 通常出现在下方的球结膜<sup>[1]</sup>。CCH 可引起一系列症状, 轻度时有轻微不适, 中度时可导致泪液流出受阻, 重度时可导致暴露性角膜病变, 进而导致视力下降<sup>[2]</sup>。球结膜的松弛冗余在眼表造成慢性机械摩擦与炎症反应可进一步加重结膜松弛症状<sup>[3]</sup>。Piezo1 是一类参与感知和传递机械力的重要分子——机械敏感离子通道。机械传导是将机械力转化为生化信号的关键过程, 对细胞生理功能的维持至关重要<sup>[4]</sup>。近年来在眼科领域, Piezo1 在眼组织中的表达和功能逐渐被揭示。整个眼球中都可检测到 Piezo1, 其在结膜、角膜、小梁网、视网膜等眼内组织中均有发现, 并参与调控眼压、视觉信号传导、眼表稳态等重要生理过程<sup>[5]</sup>。松弛的结膜意味着组织对机械负荷的适应性反应异常, 可能导致异常的  $Ca^{2+}$  信号和炎症反应的失调。因此, 该研究将以机械敏感离子通道 Piezo1 为切入点, 探讨其与 CCH 发病的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本收集

收集上海中医药大学附属普陀医院眼科 2024 年 9 月—2025 年 3 月的病例资料。CCH 诊断标准: ① 患者出现干涩、异物感以及泪溢等症状; ② 裂隙灯显微镜检查发现松弛的球结膜堆积在眼球及下睑缘之间; ③ 出现泪河残缺、泪膜不稳定、泪液清除延缓等泪液动力学异常。以上 3 条全部符合即可诊断为 CCH。确诊具有手术适应证的 CCH 患者以及未患有 CCH 的单纯白内障患者共 20 例 (20 眼)。其中 CCH 组 10 例 10 眼, NC 组 10 例 10 眼, 年龄 59~81 岁, 平均 (68.43±8.24)

岁。CCH 患者手术采用松弛结膜新月形切除术收集 CCH 患者手术切除的松弛结膜组织，NC 组采用相同部位切取部分结膜组织。所有标本皆由同一术者采集，术前均获得上海市中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准及患者知情同意，伦理批件号：PTEC-A-2025-31(S)-1。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂：胎牛血清、DMEM 细胞培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液、青-链霉素溶液（货号：10099-141C、C11995500BT、25200-072、15140122、美国 Gibco 公司）；成纤维细胞生长因子（货号：3252，美国 Sciencell 公司）；冻存液（货号：430659，日本 ZENOAQ 公司）；1×PBS 缓冲液（货号：BL302A，北京兰杰柯科技有限公司）；EZ-press RNA Purification Kit、4×EZscript Reverse Transcription MixII(with gDNA Remover)、2×SYBR Green qPCR Master Mix(ROX2 plus)（货号：B0004DP、EZB-RT2GQ、A0001-R2，美国 EZBioscience 公司）；Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗、DEPC 水、免疫染色通透液 (Triton X-100)、山羊血清、抗荧光淬灭封片液（货号：A503、R0022、P0096、C0265、P0131，上海碧云天生物科技有限公司），Piezo1 特异性激动剂 Yoda1（批号：T7506，美国 TargetM 公司）；引物：Actin、Piezo1、MMP-9（货号：H510001-0002，上海生工生物工程股份有限公司）。

仪器设备：全细胞膜片钳系统（型号：700B，美国 Axon 公司），激光共聚焦显微镜（型号：LSM880，德国 Zeiss 公司），CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（型号：HERAcell 240i，美国 Thermo Fisher 公司），水浴锅（型号：501，德国 Leica Microsystems 有限公司），倒置光学显微镜（型号：DMiL，日本 Olympus 公司），超净工作台（型号：SW-CJ-1DF，苏州安泰空气技术有限公司），高速冷冻离心机（型号：Sorvall WX 100+，美国 Thermo Fisher 公司），涡旋混合器（型号：OSE-VX-01，上海沪西分析仪器厂有限公司），实时荧光定量 PCR 仪（型号：VIA 7 DX，美国 ABI 公司），高精度电子分析天平（型号：CPA225D，德国 Sartorius 公司），超低温冰箱（型号：902，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

## 1.2 方法

### 1.2.1 球结膜原代细胞培养

收集 CCH 患者和 NC 组的结膜标本，采用组织块贴壁法行原代球结膜成纤维细胞的分离培养。修剪结膜组织约 1 mm×1 mm，移入 6 孔板中，将结膜组织平铺于培养瓶底，待其微微干燥时，贴壁缓缓加入 2 mL 含体积分数 10%胎牛血清、1%青-链霉素、1%成纤维细胞

生长因子的 DMEM 完全培养液。将培养瓶置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中静置培养，每 2 天换液 1 次，倒置显微镜下观察并拍照记录。待细胞生长至 80%融合时进行传代，经过 2~3 次传代可获得较纯的结膜成纤维细胞，经过 Vimentin 免疫荧光染色鉴定为成纤维细胞，即可用于后续实验。

### 1.2.2 免疫组化检测

将制备好的组织样本脱蜡至水后，PBS 洗 3 次，每次 3 min；柠檬酸钠溶液微波修复抗原（100%火力，10 min；转换 50%火力，5 min），恢复室温，PBS 洗 3 次；样本上滴加 3%过氧化氢，37 °C 孵育 15 min；PBS 洗；滴加 5% BSA，37 °C 封闭 30 min；滴加 Piezo1 一抗（1: 100），4 °C 过夜；PBS 洗 3 次；次日二抗兔抗（1:200）37 °C 孵育 30 min；PBS 洗 3 次；滴加 A+B 试剂，37 °C 孵育 30 min；PBS 洗 3 次；滴 DAB 镜验；苏木精复染 20 s，水洗；脱水；透明；封片；显微镜下 200 倍观察，采用 ImageJ 软件对阳性表达分析。

### 1.2.3 细胞免疫荧光检测

利用免疫荧光检测各组球结膜成纤维细胞中 Piezo1 的免疫荧光强度。将培养的球结膜成纤维细胞第 4~6 代细胞铺板至培养皿中，贴壁生长。24 h 后取出培养皿，加入 PBS 洗 3 次，5 min/次。用 4%多聚甲醛固定 20 min，PBS 冲洗 1 次，10%山羊血清封闭，MMP-9 先用 Triton X-100 穿膜 30 min，PBS 冲洗 1 次，分别加入 piezo1 抗体(1:50)和 MMP-9 抗体(1:200)放入冰箱过夜；第二天加入 PBS 洗涤后，加入山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1:200)室温避光孵育 60 min。PBS 洗涤后，加入 DAPI 溶液染 15 min，PBS 冲洗 1 次，再加入 PBS，立即在荧光显微镜下观察成纤维细胞的染色结果，ImageJ 软件分析免疫荧光表达强度值。

### 1.2.4 实时定量聚合酶链反应（qRT-PCR）

取各组第 4~6 代的细胞，提取各组细胞中的总 RNA，测定总 RNA 浓度及纯度，按照 Hifair® II 1 st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书步骤，将总 RNA 反转录成 cDNA，然后将 cDNA 作为模板，GAPDH 作为内参，按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。PCR 结束后，采用 2- $\Delta\Delta C_t$  法分析结果，计算 Piezo1 在各组的相对表达量。每次实验的比较量都是通过 SPSS 25.0 软件的比较定量功能自动计算，引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列长度

Tab.1 Primer sequence of target genes

Primer name	Sequence
Actin	F: CTCGCCTTTGCCGATCC
	R: ATCCTTCTGACCCATGCCC
MMP-9	F: GGGACGCAGACATCGTCATC
	R: TCGTCATCGTCGAAATGGGC
Piezo1	F: AGGAACAGGCAGGACAGCTA
	R: GCGTGTCAGCTCATCCACTA

### 1.2.5 Ca<sup>2+</sup>成像实验

配制 5 μmFluo-4/AM 工作液，取 NC 组球结膜成纤维细胞原代细胞传代至第 3~6 代，去除培养基，使用 HBSS 洗涤细胞 3 次，将 1 mL 工作液加入细胞，将培养皿放入恒温摇床避光 37 °C 孵育 30 min，然后除去 Fluo-4/AM 工作液，用 HBSS 洗涤细胞 3 次，再加入 1 mL HBSS ,37 °C 孵育 30 min，充分去除 Fluo-4AM 工作液。加入 20 μm 的 Piezo1 特异性激动剂 Yoda1，用激光共聚焦检测细胞，激发波长 488 nm，记录数据，对给药前后细胞内钙荧光强度进行比较。

### 1.2.6 全细胞膜片钳

打开 Clampex 10 的 Membrane Test, 设定封接测试脉冲电流方波的幅度与频率, 此时为 V-Clamp 模式。将 NC 组贴壁的球结膜原代细胞的培养基弃去，在培养皿中加入 3 mL 细胞外液，显微镜下寻找合适的细胞，置于视野中央。填充细胞内液至玻璃电极，将电极插入 Holder 中固定。在 Membrane Test 中可见方波。电极电阻约 2~5 MΩ。电极入水后，先电位补偿，在视野中出现刺激方波。并记住此时的电极电阻值，在显微镜下找到电极后接触细胞，接触细胞后电阻值升高 0.5 MΩ 时，缓慢给予负压。增加到 100 MΩ 时，在 Clampex 的 Membrane Test 中，将钳制电位 Holding 设在负的钳制电位（-60 ~ -70 mV）。电阻值达到 GΩ 以上后，封接形成后补偿电极电容，使电流反应为 1 条

直线；点击 ZAP 进行破膜，破膜后选择设定好的 Clampex 采样软件的 Protocol，开始记录细胞最初的电信号，记录完成加入 20  $\mu\text{m}$  的 Piezo1 特异性激动剂 Yoda1 观察并记录电信号的变化。

### 1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，计量数据均采用  $\bar{x} \pm s$  来呈现，满足正态分布及方差齐性，两组间比较采用  $t$  检验，多组间比较采用单因素方差分析，用 Tukey 事后检验进行两两比较，不满足时采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Piezo1 在结膜松弛症中的表达情况

#### 2.1.1 免疫组化检测 Piezo1 在球结膜组织中的表达

对比 NC 组与 CCH 组的免疫组化结果表明，CCH 组球结膜组织的 Piezo1 蛋白的阳性表达高于 NC 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见图 1。

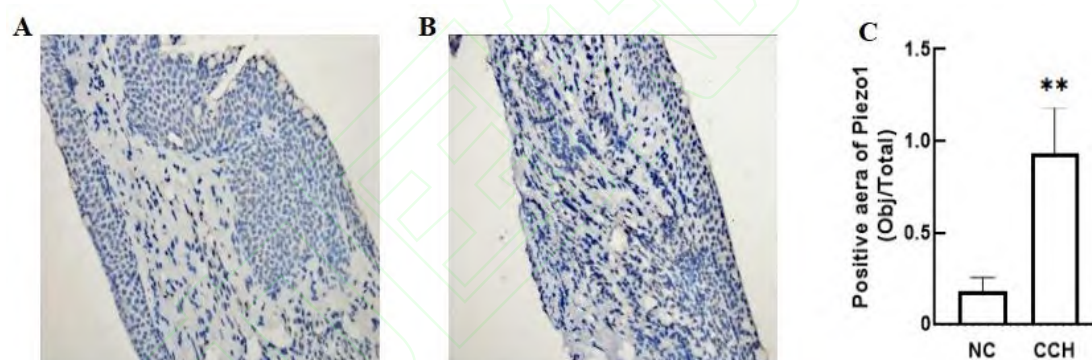


图 1 免疫组化检测结膜组织中 Piezo1 的表达情况  $\times 400$

Fig.1 Immunohistochemical detection of Piezo1 expression in conjunctival tissue  $\times 400$

注：A: Protein expression of Piezo1 in normal tissue; B: Protein expression of Piezo1 in CCH tissue; C: Statistical analysis of Piezo1 protein expression; \*\* $P < 0.01$  vs NC group.

#### 2.1.2 免疫荧光检测 Piezo1 在球结膜成纤维细胞中的表达

经免疫荧光检测 NC 组与 CCH 组的 Piezo1 表达情况显示，CCH 组培养的球结膜成纤维细胞中 Piezo1 的荧光强度高于 NC 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见图 2。

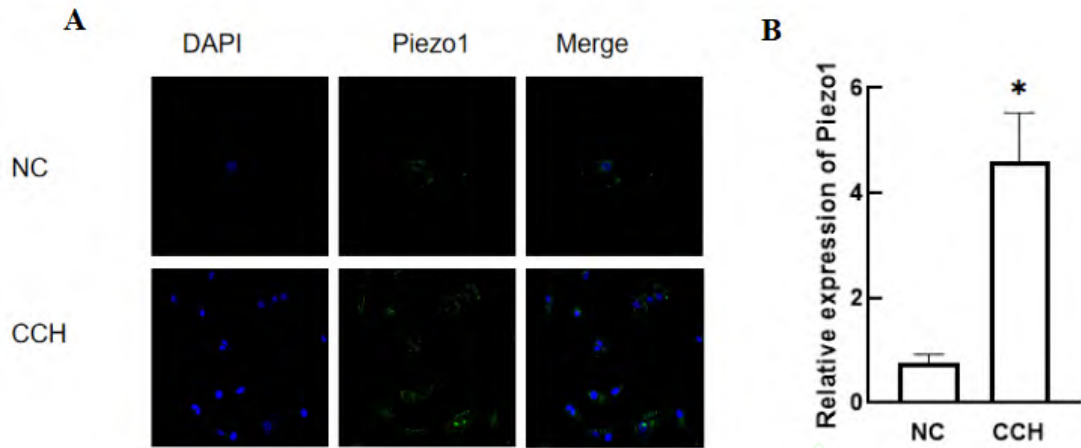


图 2 免疫荧光检测培养的结膜成纤维细胞中 Piezo1 的表达情况 ×200

Fig.2 Immunofluorescence detection of Piezo1 expression in cultured conjunctival fibroblasts

×200

注: A: Fluorescent expression of Piezo1 in the NC and CCH groups; B: Statistical analysis of Piezo1 fluorescence intensity in the NC and CCH groups; \* $P < 0.05$  vs NC group.

### 2.1.3 CCH 结膜成纤维细胞中 Piezo1 相关 mRNA 的表达变化

经 qRT-PCR 检测 CCH 组与 NC 组的 mRNA 表达情况显示, 与 NC 组相比, CCH 组 Piezo1 的 mRNA 表达高于 NC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 3A。CCH 组 MMP-9 的 mRNA 表达量高于 NC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 3B。

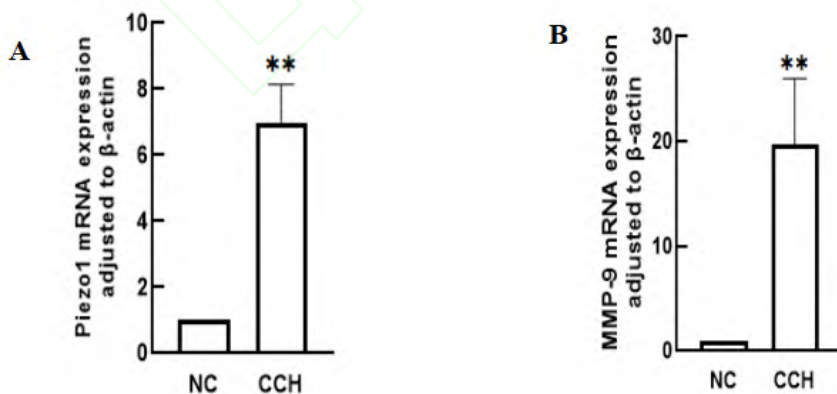


图 3 CCH 结膜成纤维细胞中 Piezo1 相关 mRNA 的表达情况

Fig. 3 Expression of Piezo1 related mRNA in CCH conjunctival fibroblasts

注：A: mRNA expression of *Piezol* in the NC and CCH groups; B: mRNA expression of *MMP-9* in the NC and CCH groups; \*\* $P < 0.01$  vs NC group.

## 2.2 Yoda1 干预后正常对照组球结膜成纤维细胞的改变

### 2.2.1 球结膜成纤维细胞中 Yoda1 触发 Piezo1 介导的钙内流

使用 Fluo-4 AM 标记的 NC 组球结膜成纤维细胞经 Piezo1 特异性激动剂 Yoda1 (20  $\mu\text{mol}$ ) 刺激后, 5~10 s 内细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光信号较加入 Yoda1 前显著增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

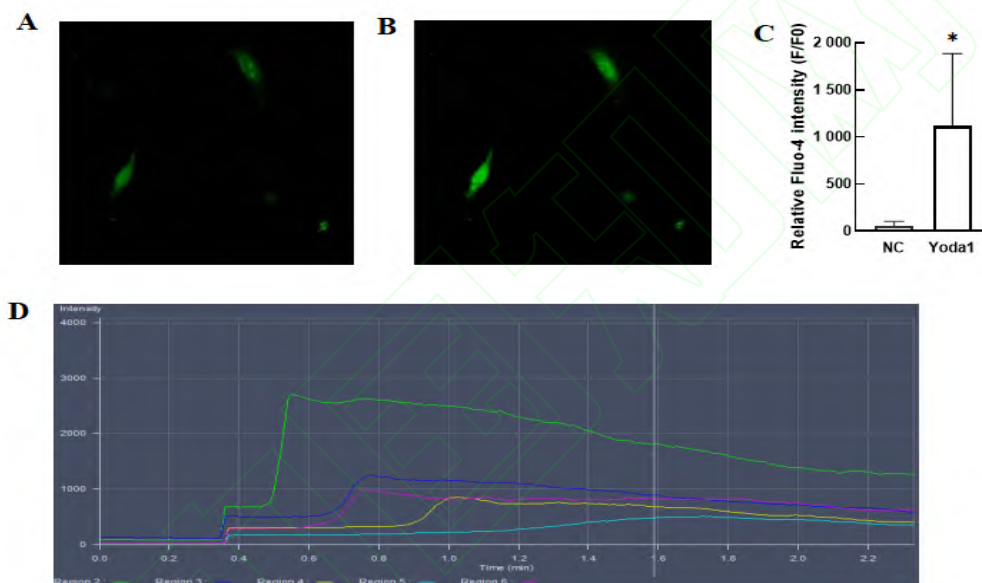


图 4 Yoda1 干预前后钙离子荧光信号的变化  $\times 20$

Fig. 4 Changes in calcium ion fluorescence signal before and after Yoda1 intervention  $\times 20$

注：A: Calcium ion fluorescence intensity in fibroblasts in the NC group; B: Calcium ion fluorescence intensity in fibroblasts after adding Yoda1 in the NC group; C: Statistical analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity changes; D: Graph of  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity changes; \* $P < 0.05$  vs NC group.

### 2.2.2 Yoda1 干预后球结膜成纤维细胞的机械敏感性电流情况

NC 组球结膜成纤维细胞中, 加入 Yoda1 (20  $\mu\text{mol}$ ) 刺激后机械敏感性电流的相对值显著增加,

差异有统计学意义 ( $P < 0.0001$ )，见图 5。

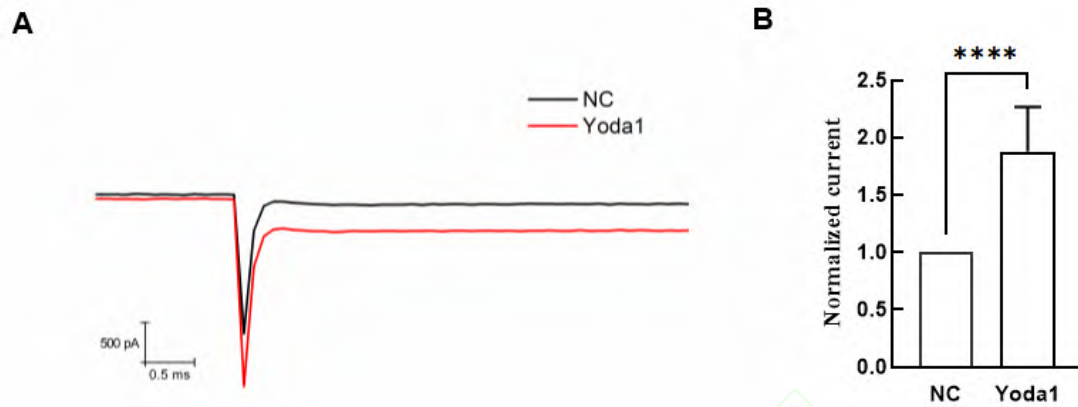


图 5 机械敏感性电流情况

Fig. 5 Mechanical sensitivity current situation

注：A: Graph showing current changes in NC-derived fibroblasts after Yoda1 addition; B: Statistical analysis of current changes in NC-derived fibroblasts after Yoda1 addition; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs NC group.

### 2.2.3 Yoda1 干预后 CCH 成纤维细胞中相关蛋白的表达情况

对 Yoda1 刺激后的 CCH 组成纤维细胞进行免疫荧光检测显示，与 NC 组相比，CCH 组 MMP-9 蛋白的荧光增强 ( $P < 0.05$ )；CCH+Yoda1 组中 MMP-9 的荧光强度较 CCH 组明显上调，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见图 6。

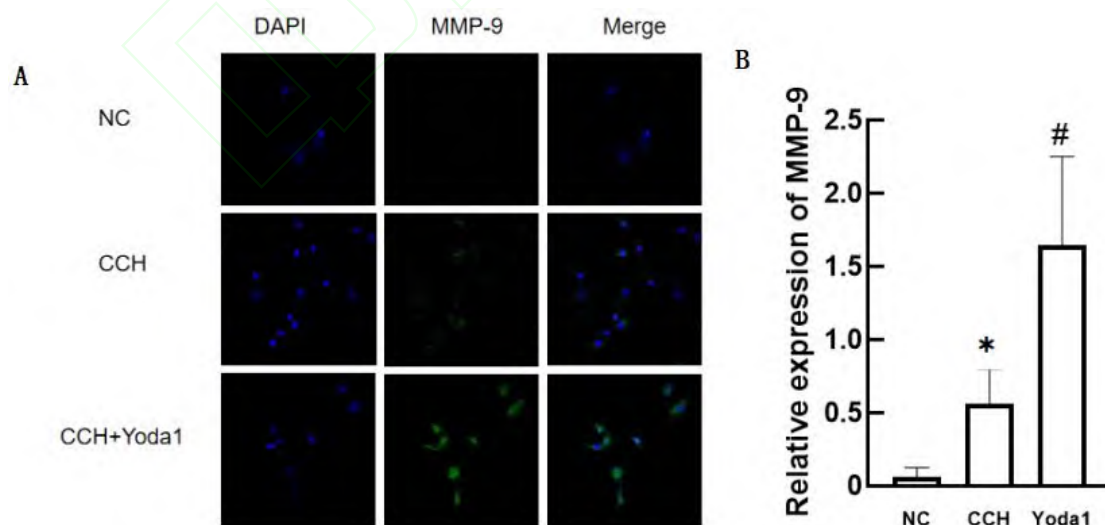


图 6 各组中 MMP-9 的免疫荧光表达情况 ×20

**Fig. 6 Immunofluorescence expression of MMP-9 in each group ×20**

注：A: Immunofluorescence expression of MMP-9 in the NC, CCH, and CCH+Yoda1 groups; B: Statistical analysis of MMP-9 immunofluorescence expression in the NC, CCH, and CCH+Yoda1 groups; \* $P<0.05$  vs NC group; # $P<0.05$  vs CCH group.

#### 2.2.4 Yoda1 干预后 CCH 成纤维细胞中相关 mRNA 的表达变化

对 Yoda1 刺激后的 CCH 组成纤维细胞进行 qRT-PCR 检测细胞中 mRNA 的表达变化显示, CCH 组成纤维细胞经 Yoda1 刺激后能明显上调 MMP-9 的 mRNA 的表达, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ), 见图 7。

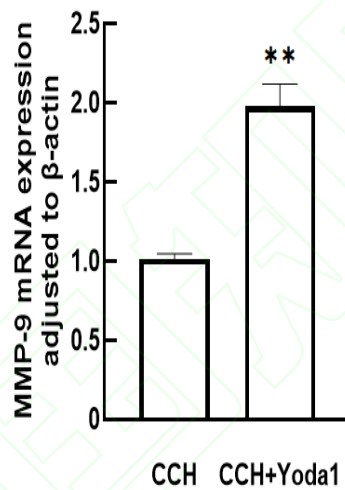


图 7 Yoda1 干预后 CCH 成纤维细胞中相关 mRNA 的表达情况

**Fig 7. Expression of related mRNA in CCH fibroblasts after Yoda1 intervention**

注: \*\* $P<0.05$  vs CCH group.

### 3 讨论

CCH 是位于眼球和下眼睑之间的松弛、多余的结膜组织, 临床并不罕见。然而, 它常常可能被误认为是正常的老年性变化而被忽视<sup>[6]</sup>。自 1995 年以来, 临床发现 CCH 在上海地区 60 岁以上老人发病率高达 98%<sup>[7]</sup>。CCH 不仅严重影响老年人生活质量, 且患者眼表环境差, 内眼手术后眼表的恢复时间明显延长<sup>[8]</sup>。CCH 的手术有一定的治疗效果, 但手术迄今未有统一标准, 且该手术

具有对术后要求高，易复发，有一定的致盲风险等<sup>[9]</sup>。在 CCH 疾病呈现年轻化及人均寿命日趋延长的大背景下，无疑成为了严峻的形势。因此，深入研究改善 CCH 的关键作用机制，可为改善 CCH 探索新的治疗靶点。

CCH 发病与眼球运动等机械损伤同样密切相关。研究表明，眼睑对结膜反复机械摩擦使结膜褶皱形成，阻碍泪液的引流，导致 CCH 出现溢泪表现，引起炎症细胞因子在角膜与结膜面积聚，刺激 MMPs 的过表达<sup>[10]</sup>。切除松弛的结膜半月皱襞、泪液排泄恢复正常后，泪液中 MMP-9 水平降低，因此可将 MMP-9 作为判定 CCH 严重程度的标志物<sup>[11]</sup>。

Piezo1 是一种对机械敏感的离子通道蛋白，它通过将机械应力与生物信号联系起来，控制着一系列广泛的生物过程<sup>[12]</sup>。所有细胞均具备机械敏感性，并能将机械信号转化为电信号或化学信号<sup>[13]</sup>。研究表明，将 Piezo1 过表达会导致 MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平升高，相反下调 Piezo1 会降低 MMP-9 的 mRNA 和蛋白的表达水平<sup>[14]</sup>。本研究结果显示，与 NC 组相比，CCH 组免疫组化 Piezo1 表达显著升高，免疫荧光证实 Piezo1 定位于细胞膜，且 CCH 组荧光强度明显高于 NC 组，qRT-PCR 检测也显示 CCH 组 Piezo1 的 mRNA 表达上升，提示 CCH 病理状态下 Piezo1 上调可能与眼球运动等机械刺激损伤相关。在 NC 组成纤维细胞中加入 Piezo1 特异性激动剂 Yoda1 后，细胞内  $Ca^{2+}$  内流显著增加，证实该通道被成功激活，膜片钳记录也显示通道在细胞中功能活跃。同时，CCH 组 MMP-9 mRNA 水平显著高于 NC 组；在 CCH 细胞中经 Yoda1 激动后，免疫荧光显示 MMP-9 蛋白荧光强度较未处理的 CCH 组明显增强，qRT-PCR 也证实 MMP-9 mRNA 水平进一步显著升高，表明 Piezo1 激活可有效上调 MMP-9 表达。综上，Piezo1 在 CCH 病理状态下的球结膜成纤维细胞中表达增加，其激活可能放大 CCH 所致机械性损伤并产生级联放大效应。

同时，Piezo1 在结膜上皮细胞中功能性表达，其激活可触发 p38 MAPK 通路，而该通路是上调 MMP-9 表达的关键环节<sup>[15-16]</sup>。因此，Piezo1 可能通过激活 p38 MAPK 上调 MMP-9，导致结膜组织过度降解与松弛。虽然该通路在结膜松弛症中尚待补充，但其他眼表疾病模型已证实阻断 p38 MAPK 通路可有效降 MMP-9 并减轻炎症<sup>[17-18]</sup>。虽然本文的样本量存在一定局限性，今后将扩大样本量深入探索“机械应力-Piezo1-p38 MAPK-MMP-9”这一信号轴在结膜松弛症中的作用，其很可能是一个创新性很强的研究方向。

综上所述，本研究证实了 Piezo1 机械敏感性离子通道在球结膜成纤维细胞中的功能性表达及其在 CCH 发生发展中的作用。同时通过 Piezo1 特异性激动剂 Yoda1 的刺激，证实 Yoda1 可在 CCH 成纤维细胞中上调 MMP-9 的表达，为 CCH 的  $Ca^{2+}$  通道的研究中提供了较好的理论依据，也为后

续阻断通路从而治疗 CCH 的相关研究提供了实验基础。

## 参考文献

- [1] Yvon C, Patel B, Malhotra R. Conjunctivochalasis[J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2023, 63(3): 209-23. doi:10.1097/IIO.0000000000000474.
- [2] 陶霓霞, 孔雪晴, 夷成龙, 等. 结膜松弛症发病机制的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2024, 21(25): 46-51. doi:10.20047/j.issn1673-7210.2024.25.08.
- [2] Tao N X, Kong X Q, Yi C L, et al. Research progress on the pathogenesis of conjunctivochalasis[J]. *Chin M Herald*, 2024, 21(25): 46-51. doi:10.20047/j.issn1673-7210.2024.25.08.
- [3] Marmalidou A, Kheirkhah A, Dana R. Conjunctivochalasis: a systematic review[J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63(4): 554-64. doi:10.1016/j.survophthal.2017.10.010.
- [4] Nourse J L, Pathak M M. How cells channel their stress: interplay between Piezo1 and the cytoskeleton[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 71: 3-12. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.018.
- [5] Zhu L, Ren S, He S, et al. Piezo in the eye: expression, distribution and roles in ocular diseases[J]. *Front Physiol*, 2025, 16: 1651258. doi:10.3389/fphys.2025.1651258.
- [6] Meller D, Tseng S C. Conjunctivochalasis: literature review and possible pathophysiology[J]. *Surv Ophthalmol*, 1998, 43(3): 225-32. doi:10.1016/s0039-6257(98)00037-x.
- [7] Zhao Y, Huang L, Xiang M, et al. Trends in conjunctivochalasis research from 1986 to 2017: a bibliometric analysis[J]. *Medicine*, 2018, 97(39): e12643. doi:10.1097/MD.00000000000012643.
- [8] Zhang X R, Zhang Z Y, Hoffman M R, et al. The effect of age and conjunctivochalasis on conjunctival thickness[J]. *Curr Eye Res*, 2013, 38(3): 331-4. doi:10.3109/02713683.2012.749916.
- [9] 于雅婕, 黎 彪, 邵 毅. 老年性结膜松弛症的现代治疗策略[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(8): 1772-5. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2021.08.058.
- [9] Yu Y J, Li B, Shao Y. Modern treatment strategies for senile conjunctivochalasis[J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(8): 1772-5. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2021.08.058.

- [10] Ballesteros-Sánchez A, Sánchez-González J M, Borrone M A, et al. The influence of lid-parallel conjunctival folds and conjunctivochalasis on dry eye symptoms with and without contact lens wear: a review of the literature[J]. *Ophthalmol Ther*, 2024, 13(3): 651-70. doi:10.1007/s40123-023-00877-9.
- [11] Acera A, Suárez T, Rodríguez-Agirretxe I, et al. Changes in tear protein profile in patients with conjunctivochalasis[J]. *Cornea*, 2011, 30(1): 42-9. doi:10.1097/ICO.0b013e3181dea7d7.
- [12] Satoh K, Hata M, Takahara S, et al. A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233 is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes[J]. *Brain Res*, 2006, 1108(1): 19-27. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.050.
- [13] Fang X Z, Zhou T, Xu J Q, et al. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 13. doi:10.1186/s13578-020-00522-z.
- [14] Li Z, Hao L, Chen S, et al. Corrigendum to “Forkhead box C1 promotes the pathology of osteoarthritis in subchondral bone osteoblasts *via* the Piezo1/YAP axis” [Cellular Signalling 124 (2024) 111463][J]. *Cell Signal*, 2025, 132: 111838. doi:10.1016/j.celsig.2025.111838.
- [15] Fukuoka S, Adachi N, Ouchi E, et al. Mechanoreceptor Piezo1 channel-mediated interleukin expression in conjunctival epithelial cells: linking mechanical stress to ocular inflammation[J]. *Ocul Surf*, 2025, 36: 56-68. doi:10.1016/j.jtos.2025.01.001.
- [16] Wang X, Xie B, Guo Y, et al. Agonism of PIEZO1 prevents aggravated periodontitis with traumatic occlusion *via* MAPK signaling pathway[J]. *iScience*, 2025, 28(11): 113688. doi:10.1016/j.isci.2025.113688.
- [17] Zhu D, Wu X Y, Li L C. Obtusifolin ameliorates dry eye model in rats by reducing inflammation and blocking MAPK/NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Int J Ophthalmol*, 2025, 18(8): 1426-32. doi:10.18240/ijo.2025.08.02.
- [18] 董 慧, 刘 佳, 赵天祺, 等. 基于Wnt/ $\beta$ -catenin通路探讨干眼症的发病机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(12): 2246-51. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.025.
- [18] Dong H, Liu J, Zhao T Q, et al. The pathogenesis of dry eye disease was explored based on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(12): 2246-51. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.025.