

## 正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞 生长增殖状况的对比观察

安美霞 吴开力 林少春 李岱 潘竹娟 胡世兴

**【摘要】 目的** 对比观察相同的培养条件下翼状胬肉与正常结膜成纤维细胞的生长增殖状况,对两种成纤维细胞的生长增殖特性作出评价。**方法** 用 10% 胎生牛血清的 RPMI 1640 培养液,在相同的培养条件下分别培养正常球结膜与初发翼状胬肉组织成纤维细胞,倒置相差显微镜下观察培养的两种成纤维细胞的特点及生长增殖状况。对传第 3 代的两种成纤维细胞,分别于接种后 2、5、8d 行噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazol)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, MTT] 比色试验,检测细胞增殖活力(细胞数)。**结果** 翼状胬肉成纤维细胞较正常结膜成纤维细胞生长快,增殖旺盛,MTT 检测结果显示:5d 翼状胬肉成纤维细胞的细胞总数多于正常结膜成纤维细胞 ( $P < 0.05$ ),8d 更明显 ( $P < 0.01$ )。**结论** 体外翼状胬肉成纤维细胞的生长、增殖特性明显强于正常结膜成纤维细胞。提示治疗翼状胬肉药物的筛选和疗效评价的实验研究应直接应用翼状胬肉成纤维细胞为研究对象,才能作出较为符合客观实际的评价。

**【关键词】** 翼状胬肉; 结膜; 成纤维细胞

### Comparison of growth characteristics of fibroblast strains from pterygial and normal conjunctiva in vitro

AN Mei-xia, WU Kaili, LIN, Shao-chun, LI Dai, PAN Zhu-juan, HU Shi-xing State key laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**【Abstract】 Objective** To compare the growth and proliferative characteristic of cultured fibroblast cells taken from pterygial and normal conjunctival specimens. **Methods** Human conjunctival(HCF) and primary pterygium fibroblast cells(HPF) were cultured in medium RPMI 1640 enriched containing 10% fetal bovine serum. The growth characteristics of two kind cells were evidenced by phase microscope. The third passage of both HCF and HPF were measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) at various days of culture. **Results** In contrast to HCF, HPF grows much quicker under the same experimental conditions. The number of HPF showed significantly increases than that of HCF after 5th day of culture ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The proliferating characteristic of fibroblast of pterygium is different from that of normal conjunctiva in vitro.

**【Key words】** Pterygium; Conjunctiva; Fibroblast

翼状胬肉为临床常见病、多发病,流行病学调查表明其发生与紫外线辐射密切相关<sup>[1]</sup>,但确切的病因和发病机制尚未完全清楚,也无有效的治疗药物。病理研究显示,病变组织的主要成份是异常增生的成纤维细胞,并表现出一定侵袭性,因而有人

提出了翼状胬肉成纤维细胞转化的观点,认为成纤维细胞核中 DNA 被紫外线照射后致细胞生长特性发生变化而具有侵袭性<sup>[2]</sup>。也有研究显示,翼状胬肉样本与正常结膜组织的细胞增殖率基本一致,提出翼状胬肉的病变可能代表着细胞凋亡的异常<sup>[3]</sup>。本实验对比观察在相同的培养条件下来自翼状胬肉与正常结膜的成纤维细胞的生长增殖状况,对两种成纤维细胞的生长增殖特性作出评价,为进一步研究其发生机制、寻找治疗翼状胬肉药物的实验研究提供依据。

基金项目:广东省社会发展计划重大专项资助(2004A30801001)

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心,眼科学国家重点实验室(吴开力 林少春 李岱 潘竹娟 胡世兴);广东省中山市小榄人民医院眼科(安美霞)

通讯作者:胡世兴, E-mail: markhu@263.net

## 材料和方法

1. 实验仪器: 主要实验仪器设备有 CO<sub>2</sub> 培养箱 (WTB Binder)、超净工作台 (苏净集团安泰公司)、倒置显微镜 (ZEISS Axiovert200)、高速冷冻离心机 (德国 Universal 32R)、酶联免疫检测仪 (Multiskan mk3)。

2. 主要试剂: 主要试剂包括 RPMI1640 培养基 (Gibco 公司)、胎生牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)、胰蛋白酶 (生工生物工程上海有限公司)、小鼠抗人 Vi mentin 相关抗原抗体 (博士德公司)、即用型 SABC 试剂盒 (博士德公司)、DAB 显色试剂盒 (博士德公司)、四噻唑蓝 3-(4,5-dimethyl-2thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, MBCHEN 公司。

3. 正常球结膜及初发翼状胬肉组织成纤维细胞的体外培养

(1) 原代培养: 翼状胬肉组织标本取自中山眼科中心手术的原发翼状胬肉患者, 术前无特殊用药史。正常球结膜组织来自本院角膜移植的供体眼球 (无眼疾), 年龄匹配。取材后尽量去净结膜上皮组织, 用 0.01mol/L PBS 洗去血渍, 然后用眼科小剪刀将组织块剪碎, 加入大约 5 倍体积的按 1:3 稀释的 0.25% 胰蛋白酶, 室温消化约 8min。加入含 10% 胎生牛血清的培养液中中止消化, 将组织小块及液体成分移入离心管, 以 1000/min 离心 8min 后去除上清。将沉淀的组织小块及细胞成分接种入培养瓶中, 后将培养瓶瓶底朝上放置, 向瓶内注入适量 10% 胎生牛血清的培养液, 培养于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。24h 待组织小块贴附后, 将培养瓶慢慢翻转平放, 静置培养。RPMI 1640 培养基内含 10% 胎生牛血清及 100 U/mL 青霉素和 100U/mL 链霉素。原代接种后第 5 天换培养液 1 次, 后平均 3 天更换 1 次。在倒置相差显微镜下观察接种组织块及培养液情况。

(2) 传代培养: 培养的原代细胞生长至 80% 汇合时, 以适量的 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 倒置相差显微镜下观察, 见胞质回缩, 细胞间隙增大后, 立即加入适量的含 10% 胎牛血清的培养液中中止消化, 并用吸管轻轻吹打培养瓶壁制成细胞悬液, 1000/min 离心 10min 后去除上清, 再加入适量含 10% 胎生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 混匀制成细胞悬液, 按 1:3 分瓶接种, 完成一次细胞传代。

4. 培养的成纤维细胞的纯化: 利用上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶的耐受性不同, 即常是成

纤维细胞先脱壁, 而上皮细胞要消化相当长的时间才脱壁, 加入胰蛋白酶后显微镜下观察, 见成纤维细胞胞质回缩, 细胞间隙增大后, 中止消化, 用吸管轻轻吹打成纤维细胞生长的区域 (事先在培养瓶上划出记号), 使制成的细胞悬液中尽量不含上皮细胞, 加之成纤维细胞的增殖优势, 第二代即可基本纯化。

5. 成纤维细胞的鉴定: 倒置相差显微镜观察细胞生长不同时期的细胞生长特点及形态, 拍照记录。结合链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术 (streptavidin-biotin peroxidase complex technique, SABC) 进行抗原波形蛋白检测及细胞鉴定 (按试剂盒说明操作)。

6. 正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞生长增殖状况的对比观察

(1) 倒置相差显微镜观察体外培养的两成纤维细胞的特点及生长增殖状况。

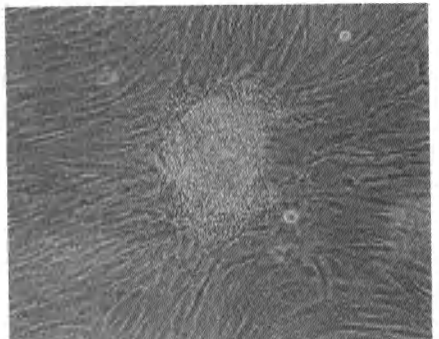
(2) MTT 比色法分析细胞增殖活性: 取传第三代的翼状胬肉与正常结膜成纤维细胞, 用含 10% 胎生牛血清的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液, 以  $1.2 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度分别接种于 3 块 96 孔板中, 每孔 200 $\mu$ l, 不含细胞只加培养液的作为空白对照孔, 每组 5 个孔, 分别于接种后第 2、5、8 天行 MTT 检测 (期间按正常细胞培养更换培养液): 每孔加入 5mg/mL 的 MTT 20 $\mu$ L, 培养箱中继续孵育 4h, 吸弃各孔中的液体, 相应各孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 $\mu$ l, 振荡 10min, 以空白对照孔调零, 于酶联免疫检测仪上选双波长模式 (570nm、630nm) 测各孔吸光度 A 值, 检测细胞的生长情况。吸光度值与细胞数成正比。

7. 统计分析: 统计学分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行, 结果均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。结果分析用两独立样本 t 检验, 计算 P 值, 检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 结 果

1. 显微镜下体外培养的两成纤维细胞的特点: 两种组织块分别接种后 5d 左右见少量散在的细胞由组织块边缘游出, 细胞多为长梭形、三角形, 然后细胞数量逐渐增多, 此时细胞以细长梭形为主, 细胞完全汇合时排列紧密, 可呈漩涡状、放射状排列, 细胞间边界不清 (图 1, A)。比较观察发现, 在相同的培养条件下翼状胬肉成纤维细胞生长快, 旺盛, 于传代接种后 4d 左右即可形成单层, 而正常结膜成纤维细胞生长、增殖较慢, 相同数量传代接种后一般 6d 左右才可形成单层。传第 3 代的同样数量

的二种细胞,培养至 8 d 时细胞的密度存在差异,翼状胬肉成纤维细胞的细胞总数显著多于正常结膜成纤维细胞(图 1, C、D)。培养的细胞经免疫组化染色,波形蛋白表达阳性,胞浆呈棕色(图 1, B),结合细胞形态及生长特征,可鉴定为成纤维细胞。



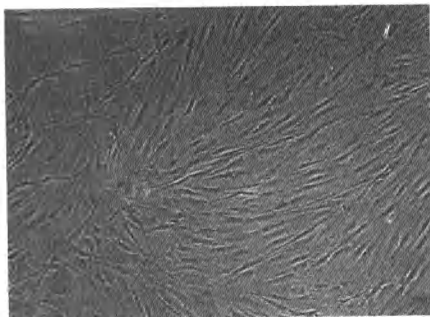
A



B



C



D

图 1 成纤维细胞观察: A: 原代成纤维细胞从翼状胬肉组织块爬出( $\times 100$ ); B: 免疫组化染色显示翼状胬肉成纤维细胞波形蛋白表达阳性,胞浆呈棕色( $\times 200$ ); C, D: 传第 3 代培养至第 8 天的正常结膜成纤维细胞(C)较翼状胬肉成纤维细胞密度(D)低( $\times 100$ )。

2. MTT 检测正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞生长增殖活性: 对第三代的翼状胬肉与正常结膜成纤维细胞分别于接种后第 2、5、8 天进行 MTT 比色分析,结果见表 1。接种后 2d,两种细胞的光吸收值差别不大,比较无统计学差异( $P>0.05$ )。但于第 5 和第 8d,两种细胞的光吸收值出现明显差异,以后者的差别更甚( $P$ 分别 $<0.05$ 和 $<0.01$ )。

表 1 MTT 法检测翼状胬肉与正常结膜成纤维细胞的生长状况

细胞分组	A 值 ( $\bar{x} \pm s$ )		
	2d	5d	8d
HCF (n=5)	0.2262 $\pm$ 0.0068	0.2344 $\pm$ 0.0109	0.2826 $\pm$ 0.0206
HPF (n=5)	0.2304 $\pm$ 0.0129	0.2668 $\pm$ 0.0190	0.3454 $\pm$ 0.0129
t	0.646	3.312	5.778
p	0.537	0.011	0.000

## 讨 论

本文利用显微镜观察及 MTT 检测比较了正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞的生长增殖状况。比较观察发现,在相同的培养条件下见翼状胬肉成纤维细胞生长增殖旺盛,而正常结膜成纤维细胞生长、增殖较慢。从检测结果可以看出,接种第三代细胞后第 2 天的翼状胬肉与正常结膜成纤维细胞的细胞数相比无统计学意义( $P>0.05$ ),说明对两种成纤维细胞的接种数量控制较好,二者具有可比性;第 5 天检测结果显示:翼状胬肉成纤维细胞的细胞总数多于正常结膜成纤维细胞( $P<0.05$ ),说明其生长较快、增殖能力强;至第 8 天时,翼状胬肉成纤维细胞的细胞总数显著多于正常结膜成纤维细胞( $P<0.01$ ),与显微镜观察结果一致,表明翼状胬肉成纤维细胞的增殖能力明显加快、增强。

目前调查研究表明翼状胬肉的发生与紫外线照射密切相关,认为成纤维细胞核中 DNA 被紫外线照射后细胞生长特性发生了变化。Chen 等<sup>[2]</sup>曾报道培养的翼状胬肉成纤维细胞生长特性有异于正常结膜成纤维细胞,如细胞密度显著增大、对血浆的需求下降、在软琼脂上克隆形成率提高。并且对生长因子的反应不同,即在有外源性转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 作用下,培养的正常结膜成纤维细胞表现为轻度抑制,而对培养的翼状胬肉成纤维细胞表现为促增殖作用,并呈剂量依赖性,认为翼状胬肉成纤维细胞发生了转化。一些学者对这种转化现象作了进一步的研究,如 Nolan 等<sup>[4]</sup>研究了翼状胬肉上皮细胞在紫外线照射下,肝素结合表皮生长因子样生长因子(heparin-binding epidermal growth fac-

tor-like growth factor, HB-EGF)的变化,结果显示紫外线照射 6 小时后, HB-EGF mRNA 表达增加了 6.8 倍,且在细胞培养上清液中的 HB-EGF 含量也明显上升,这种现象没有在培养的正常角膜缘上皮细胞中出现。他们也观察到了 HB-EGF 对翼状胬肉上皮细胞和成纤维细胞的生长增殖有显著促进作用<sup>[5]</sup>。Maini 等<sup>[6]</sup>研究发现,组胺和 EGF 受体广泛表达于翼状胬肉成纤维细胞表面。这些研究结果说明了紫外线照射通过眼表组织细胞因子及其受体的过度表达,最终使翼状胬肉成纤维细胞异常增生。

胰岛素样生长因子结合蛋白-2 (Insulin-like growth factor-binding protein, IGFBP)的高表达见于许多肿瘤细胞,它们通过调节 IGF 发挥促进肿瘤细胞的生长、抑制凋亡、诱导转化和转移的作用, Solomon 等<sup>[7]</sup>发现与正常结膜成纤维细胞相比,其在翼状胬肉成纤维细胞的表达明显增高,结合 TGF- $\beta$ 、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、bFGF 等在翼状胬肉及其成纤维细胞表达增强<sup>[8]</sup>的现象,该学者认为这些发现都进一步解释了翼状胬肉成纤维细胞的转化性质。亦有学者认为翼状胬肉的发病机制是凋亡控制失调所致,他们的实验提示翼状胬肉的形成是由于正常组织细胞凋亡过程的破坏,使得细胞凋亡与细胞增殖失衡导致的病变。本实验所使用 MTT 法是一种快速、简便、准确的测定方法,可间接反映活细胞数目,结果显示翼状胬肉成纤维细胞的增殖活性比正常结膜的明显增强。本实验只单独观察了翼状胬肉成纤维细胞的生长增殖特性,如果加上来自病变细胞周围环境中增多的生长因子、细胞因子

等刺激,其生长增殖能力的加强可想而知。

实验结果说明翼状胬肉成纤维细胞的生长、增殖特性与正常结膜成纤维细胞不同,其生长增殖明显强于正常结膜成纤维细胞。该结果提示我们进行抑制翼状胬肉成纤维细胞增殖的药物的筛选和疗效评价的实验研究时,应直接以翼状胬肉成纤维细胞为研究对象,才能作出较为符合客观实际的评价。

#### 参考文献

- 1 Threlfall TJ, English DR. Sun exposure and pterygium of the eye a dose-response curve. *Am J Ophthalmol*, 1999, 128(3):280-287.
- 2 Chen JK, Tsai RJ, Lin SS. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1994, 30A(4):243-248.
- 3 Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW, et al. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol*, 1995, 79(4):304-305.
- 4 Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, et al. The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol*, 2003, 162(2):567-574.
- 5 Nolan TM, Di Girolamo N, Coroneo MT, et al. Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(1):110-113.
- 6 Maini R, Collison DJ, Maidment JM, et al. Pterygial derived fibroblasts express functionally active histamine and epidermal growth factor receptors. *Exp Eye Res*, 2002, 74(2):237-244.
- 7 Solomon A, Grueterich M, Li DQ, et al. Overexpression of Insulin-like growth factor-binding protein-2 in pterygium body fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(2):573-580.
- 8 Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor platelet derived growth factor transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem*, 1996, 98(2):195-201.

(收稿时间 2007-05)