

# 翼状胬肉细胞之间的相互作用

郝尚臣 刘祖国

## Interaction between endothelial cells and fibroblasts in pterygium

Hao Shangchen, Liu Zuguo. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract Objective** Pathohistological study showed that pterygium consists mainly of new blood vessels and fibroblast tissue, indicating a closely relation of neovascularization and fibroblast tissue with pterygium development. The aim of present study was to investigate the interactions between capillary endothelial cell and fibroblast in pathogenesis of pterygium. **Methods** Pterygial samples were obtained during the surgery, and normal conjunctival samples were obtained from donors dead for 2 hours. The samples were cultured using tissue explant technique to obtain pterygium vascular endothelial cells (PVEC), pterygium fibroblasts (PFC) and conjunctival fibroblasts. Then culture alone, conditional culture and coculture of PVEC and PFC were used to form different culture systems. The location and level of protein and mRNA of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured cells and culture medium were determined by immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Cultured vascular endothelial cells showed the positive response for CD34 and factor VIII antigen, and the fibroblast cells showed the positive response for vimentin. The expression of VEGF protein in cell supernatant was low in cultured alone system group but increased significantly in conditional and cocultured system groups ( $P < 0.05$ ). The RNA level of VEGF in cell supernatant in coculture system group was significantly increased in comparison with conditional and culture alone system groups ( $P < 0.05$ ). Expressions of bFGF protein and RNA in cell supernatant followed the same trend to VEGF. **Conclusion** The pterygium vascular endothelial cells and fibroblasts present a promoting effect each other, and they play a synergic role in the formation of pterygia.

**Key words** pterygium; vascular endothelial cell; fibroblast; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor

**摘要 目的** 探讨翼状胬肉中血管内皮细胞和成纤维细胞之间的相互作用。**方法** 收集翼状胬肉标本,采用血管内皮细胞和成纤维细胞单独培养、条件培养和共同培养的方法构建培养体系,采用 ELISA 和 RT-PCR 法检测 3 种体系培养上清液和细胞中血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)蛋白及 mRNA 含量的变化。**结果** 单独培养、条件培养和共同培养各组培养上清液中 VEGF 和 bFGF 的质量浓度增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );细胞单独培养、条件培养和共同培养三者相比,VEGF 和 bFGF 的 mRNA 表达升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 内皮细胞和成纤维细胞有相互上调作用,2 种细胞在翼状胬肉的发生发展过程中相互促进。

**关键词** 翼状胬肉; 血管内皮细胞; 成纤维细胞; 血管内皮细胞生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

**分类号** R 777.33 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0801-04

翼状胬肉是眼科的常见病之一,其发病机制和复发原因仍然是眼科研究的热点之一。病理学和病理生理学研究证实翼状胬肉是增生性病变<sup>[1-3]</sup>,翼状胬肉上皮主要是新生血管和纤维结缔组织,尤其是复发性翼状胬肉<sup>[4]</sup>,提示新生血管和纤维组织与翼状胬肉发生发展间有重要联系。本研究探讨翼状胬肉组织中细胞之间的相互作用,从新生血管的角度来探讨翼状胬肉的发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2006 年 6 月—12 月在郑州大学第一附属医院眼科手术切除的原发性翼状胬肉 20 例,均位于鼻侧,其中男 12 例,女 8 例;年龄 25 ~ 73 岁,平均 50.6 岁。另取正常供体结膜 10 例,均在死亡后 2 h 内取得。

### 1.2 方法

经组织块培养法<sup>[5]</sup>培养翼状胬肉微血管内皮细胞、成纤维细胞和结膜成纤维细胞(内皮细胞表达 CD34 分子阳性、因子 VIII 相关抗原阳性,成纤维细胞表

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院眼科(郝尚臣);361000 厦门大学医学院 眼科研究所(刘祖国)

通讯作者:郝尚臣 (Email:qhahsc@163.com)

达波形蛋白阳性)。采用翼状胬肉微血管内皮细胞和成纤维细胞单独培养、条件培养和共同培养的方法形成不同的培养体系,即将翼状胬肉血管内皮细胞(ptyerygium vascular endothelial cells, PVEC)、成纤维细胞(ptyerygium fibroblast cells, PFC)分为3个培养体系共计5组。单独培养体系:1组(PVEC)、3组(PFC);条件培养体系:2组(PVEC + PFC 上清液)、4组(PFC + PVEC 上清液);共同培养体系:5组(PVEC + PFC 共同培养)。通过ELISA和RT-PCR法检测3种培养体系中细胞培养上清液和细胞中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的蛋白及mRNA含量的变化。以ELISA法测量蛋白的实验分3个时间点采样,RT-PCR法测量mRNA的实验重复进行3次;VEGF和bFGF蛋白的质量浓度以450 nm波长下测量的OD值来表示,两者mRNA的含量以260 nm波长下测量的mRNA每微克拷贝数为单位表示。

1.3 统计学方法

采用SPSS 10.0统计学软件进行统计学处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。5个组细胞上清液中VEGF、bFGF的质量浓度变化、细胞间VEGF mRNA和bFGF mRNA含量的总体变化采用单因素方差分析,组间相应指标的两两比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA法检测细胞上清液中VEGF和bFGF质量浓度的改变

根据试剂盒标准品制作VEGF和bFGF的标准曲线(图1,2),测量不同培养体系培养上清液中VEGF和bFGF的质量浓度,组间两两比较,1组与2组相比,2组与5组相比,3组与4组相比,4组与5组相比VEGF的质量浓度明显上升,差异均有统计学意义( $P$

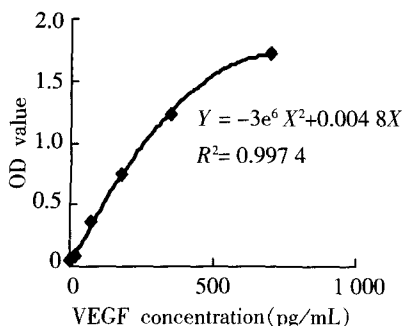


图1 VEGF的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of VEGF

$< 0.05$ ) (表1),而bFGF的质量浓度出现同样趋势,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表2)。

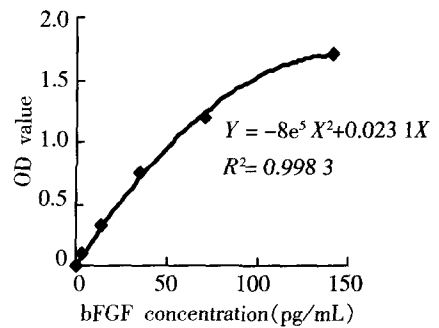


图2 bFGF的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of bFGF

表1 不同培养体系培养上清液中VEGF的质量浓度变化( $\bar{x} \pm s$ , OD值)

Table 1 VEGF level in different cell supernatants( $\bar{x} \pm s$ , OD value)

Group	Contents of VEGF in different time points		
	24 h	48 h	72 h
PVEC	0.89 ± 0.10	1.57 ± 0.08	2.28 ± 0.05
PVEC + PFC supernatant	1.26 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.88 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.05 <sup>b</sup>
PFC	0.68 ± 0.10	1.44 ± 0.05	1.90 ± 0.04
PFC + PVEC supernatant	1.25 ± 0.14 <sup>c</sup>	1.70 ± 0.08 <sup>c</sup>	2.34 ± 0.06 <sup>c</sup>
PVEC + PFC co-culture	1.45 ± 0.10 <sup>hk</sup>	2.12 ± 0.07 <sup>hk</sup>	2.82 ± 0.07 <sup>hk</sup>
F	3.254	4.372	4.021
P	0.043	0.031	0.039

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC group, <sup>h</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC + PFC supernatant, <sup>k</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC + PVEC supernatant (One-way ANOVA, SNK-q test)

表2 不同培养体系培养上清液中bFGF的质量浓度变化( $\bar{x} \pm s$ , OD值)

Table 2 bFGF level in different cell supernatants( $\bar{x} \pm s$ , OD value)

Group	Contents of bFGF in different time points		
	24 h	48 h	72 h
PVEC	0.52 ± 0.10	1.02 ± 0.06	1.43 ± 0.05
PVEC + PFC supernatant	0.90 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.07 <sup>b</sup>
PFC	0.69 ± 0.07	1.16 ± 0.05	1.56 ± 0.08
PFC + PVEC supernatant	1.28 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.77 ± 0.04 <sup>c</sup>	2.11 ± 0.06 <sup>c</sup>
PVEC + PFC co-culture	1.29 ± 0.08 <sup>hk</sup>	1.91 ± 0.06 <sup>hk</sup>	2.40 ± 0.05 <sup>hk</sup>
F	5.632	3.267	7.235
P	0.037	0.047	0.021

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC group, <sup>h</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC + PFC supernatant, <sup>k</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC + PVEC supernatant (One-way ANOVA, SNK-q test)

2.2 RT-PCR法检测细胞中VEGF和bFGF的mRNA含量的改变

RT-PCR结果显示:细胞中VEGF和bFGF的

mRNA 拷贝数均有明显增加。组间两两比较,1 组与 2 组相比,2 组与 5 组相比,3 组与 4 组相比,4 组与 5 组相比 VEGF 的 mRNA 含量明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 3),而 bFGF 的 mRNA 含量出现同样趋势,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 4)。

**表 3 不同组细胞中 VEGF mRNA 含量( $\bar{x} \pm s$ , 拷贝数/ $\mu\text{g}$ )**  
Table 3 RNA contents of VEGF in different groups  
( $\bar{x} \pm s$ , copy number/ $\mu\text{g}$ )

Group	VEGF RNA level in samples from different times		
	1st time	2nd time	3rd time
PVEC	7 089 ± 376	7 834 ± 356	7 561 ± 382
PVEC + PFC supernatant	12 651 ± 398 <sup>b</sup>	11 973 ± 411 <sup>b</sup>	12 704 ± 407 <sup>b</sup>
PFC	12 302 ± 220	12 274 ± 221	11 907 ± 220
PFC + PVEC supernatant	17 711 ± 257 <sup>c</sup>	17 205 ± 253 <sup>c</sup>	17 439 ± 221 <sup>c</sup>
PVEC + PFC co-culture	29 740 ± 350 <sup>hk</sup>	29 429 ± 366 <sup>hk</sup>	30 129 ± 332 <sup>hk</sup>
F	2.370	11.200	13.260
P	0.003	0.000	0.000

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC group,

<sup>h</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC + PFC supernatant, <sup>k</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC + PVEC supernatant(One-way ANOVA, SNK-q test)

**表 4 不同组细胞中 bFGF mRNA 含量( $\bar{x} \pm s$ , 拷贝数/ $\mu\text{g}$ )**  
Table 4 RNA contents of bFGF in different groups  
( $\bar{x} \pm s$ , copy number/ $\mu\text{g}$ )

Groups	bFGF RNA level in samples from different times		
	1st time	2nd time	3rd time
PVEC	2 254 375 ± 31 067	2 194 782 ± 31 122	2 239 810 ± 31 001
PVEC + PFC supernatant	5 341 880 ± 20 753 <sup>b</sup>	5 300 398 ± 20 335 <sup>b</sup>	5 319 873 ± 20 887 <sup>b</sup>
PFC	5 207 623 ± 24 973	5 189 372 ± 24 782	5 238 761 ± 24 988
PFC + PVEC supernatant	6 724 670 ± 13 247 <sup>c</sup>	6 708 736 ± 13 266 <sup>c</sup>	6 698 371 ± 13 210 <sup>c</sup>
PVEC + PFC co-culture	8 041 666 ± 27 275 <sup>hk</sup>	8 018 934 ± 27 253 <sup>hk</sup>	7 987 354 ± 27 221 <sup>hk</sup>
F	11.380	10.650	12.470
P	0.000	0.000	0.000

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC group,

<sup>h</sup> $P < 0.05$  vs respective PVEC + PFC supernatant, <sup>k</sup> $P < 0.05$  vs respective PFC + PVEC supernatant(One-way ANOVA, SNK-q test)

### 3 讨论

VEGF 是一种具有强烈促进血管内皮细胞增生和迁移作用的细胞因子,同时也是能够促进毛细血管新生的细胞因子,而 bFGF 是成纤维细胞分泌的主要细胞因子,具有较强的促细胞有丝分裂的功能。本研究选取 VEGF 和 bFGF 这 2 种细胞因子的原因:(1)它们是成纤维细胞和血管内皮细胞分泌的主要因子,同时也是对这 2 种细胞增生和迁移影响较大的细胞因子。(2)这 2 种细胞因子及其相应受体研究的比较清楚,抗体试剂等易于选购。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂

素,其生物学功能主要为选择性增强血管内皮细胞有丝分裂,刺激内皮细胞增生并促进血管形成。其生物学效应是通过与特异性 VEGF 受体结合实现的。目前已经证实 VEGF 及其受体参与了体内诸多生理、病理过程,比如胚胎发育、器官形成、炎症创伤修复以及肿瘤发生发展等,VEGF 及其受体的研究一直都是研究热点<sup>[6-12]</sup>。bFGF 最初是从牛脑和牛脑垂体中提取出来的,因其对 3T3 细胞有强烈的促进增生和有丝分裂作用而得名<sup>[13-14]</sup>。bFGF 相应受体是 FGF 受体 1, bFGF 与 FGF 受体结合后除了激活下游信号分子外还可以形成一个复合体进入细胞内,最终定位于核内视<sup>[15]</sup>。

本实验研究 PFC 和 PVEC 之间的相互作用,采用了单独培养、条件培养和共同培养 3 种培养方式。单独培养体系中只有 1 种细胞和相应的培养液,例如 PVEC 单独培养体系中为 PVEC 和内皮细胞培养液;条件培养体系中有 1 种细胞和另外 1 种细胞的培养上清液,例如 PVEC 条件培养体系中为 PVEC 和 PFC 的培养上清液;共同培养体系中有 2 种细胞和 2 种培养液,例如 PVEC 和 PFC 共同培养体系中有 PVEC 和 PFC 2 种细胞。为了在研究上尽量达到一致性,细胞在接种时经细胞计数以相同的数量接种,共同培养的 2 种细胞总量和单独培养、条件培养均相等。本研究表明,PVEC 的条件培养体系中 VEGF 的质量浓度及其 mRNA 含量均高于单独培养体系( $P < 0.05$ ),说明存在于 PFC 培养上清液中的 bFGF 对 PVEC 的确有促进 VEGF 合成和分泌的作用,而共同培养体系中 VEGF 的质量浓度及其 mRNA 含量均高于条件培养体系( $P < 0.05$ ),进一步说明 PFC 细胞本身对 PVEC 的促进作用更强一些,而且此促进作用不仅通过细胞因子发挥,可能还和细胞之间的接触传递相关。在 PFC 的培养体系中也存在同样的趋势,说明 PVEC 对 PFC 也有促进作用,而且共同培养高于条件培养,条件培养又高于单独培养。从结果中还可以看出,PFC 对 PVEC 的作用大于 PVEC 对 PFC 的作用。周琳瑛等<sup>[16]</sup>的研究指出翼状胬肉中血管增生和弹性纤维增生间存在某种关系。

另外,本实验中关于细胞中 mRNA 的研究,国内外一般的做法是在条件改变 6 h 后取样,因为从 DNA 转录产生 mRNA,大约在 6 h 左右,时间过短则不能正确反映 mRNA 的变化;关于细胞因子尤其是分泌型细胞因子的研究,一般是在条件改变 24 h 后取样较好,因为从 DNA 转录到 mRNA,之后蛋白质翻译,所需时间大于 24 h。

## 参考文献

- Lin A, Stern G. Correlation between pterygium size and induced corneal astigmatism[J]. *Cornea*, 1998, 17: 28 - 30
- 刘祖国, 谢玉环, 张梅, 等. 表皮生长因子受体家族在翼状胬肉上皮内的异常表达[J]. *中华眼科杂志*, 2000, 36(5): 372 - 375
- 张梅, 刘祖国, 李永平, 等. 翼状胬肉上皮细胞 p53 蛋白的表达及其功能状态的研究[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(2): 115 - 116
- 郑卫东, 徐国兴, 胡建章, 等. 翼状胬肉中细胞增殖与凋亡相关基因蛋白的表达及其意义[J]. *中国实用眼科杂志*, 2003, 21(9): 649 - 651
- 郝尚臣, 刘祖国. 人翼状胬肉细胞的分离和培养[J]. *眼科学报*, 2006, 17(1): 25 - 29
- Luo H, Kimura K, Aoki M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(11): 967 - 971
- LeCouter J, Lin R, Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis[J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 913 - 917
- Kurylczyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement[J]. *Clin Rheumatol*, 2005, 24(2): 111 - 116
- Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D expression by the organ microenvironment in human colon carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(10): 1604 - 1609
- Garvin S, Nilsson UW, Dabrosin C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(31): 1005 - 1010
- Longatto FA, Martins A, Costa SM, et al. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels[J]. *Pathol Res Pract*, 2005, 201(2): 93 - 99
- Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, et al. Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3[J]. *Lung Cancer*, 2004, 46(1): 11 - 19
- Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1974, 71(6): 2295 - 2299
- Luo Y, Lu W, Mohamedali KA, et al. The glycine box: a determinant of specificity for fibroblast growth factor[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 953
- Camina JP, Diaz-Rodriguez E, Harks EG, et al. Lipid factor (bVLF) from bovine vitreous body evokes in EGFR-T17 cells a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^{+}$  current associated with inositol 1, 4, 5-trisphosphate-independent  $Ca^{2+}$  mobilization[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(1): 108 - 118
- 周琳瑛, 梁平, 徐国兴, 等. 进行期翼状胬肉的透射电镜观察[J]. *电子显微学报*, 1997, 16(2): 93 - 96

(收稿: 2009-03-10 修回: 2009-07-16)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿的具体要求

- 1 文题** 文题应简洁、特异、明确, 具有可检索性, 用恰当的词组反映文章的特定内容, 不可过大或过小, 一般不超过 20 个汉字。应尽量避免使用不太为同行熟知的符号、简称、缩写、商品名称等。论著和综述文章应有英文文题, 放于中文文题之下, 不超过 15 个实词。
- 2 作者** 作者署名应符合 5 个条件: 参与论证、参与研究、参与写作、能够答辩、承担责任。作者名次按对论文贡献的大小排序列于文题下方, 一般不超过 8 名, 并应在投稿时确定, 在编排过程中不应再变更或增减。其他有贡献者可在文后列入致谢部分。有英文文题的论著和综述, 应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。作者中如有外籍作者, 应征得本人同意, 并附外籍作者同意刊登的信件。
- 3 作者单位** 应以完成论文研究和写作的单位为作者单位。作者单位放于文章首页左下角, 写法举例: “作者单位: 450003 郑州, 河南省眼科研究所(李×、王×); 510630 广州, 暨南大学医学院眼科(刘×)”。院所名体现城市名者不必重复, 例如“100005 北京市眼科研究所”。文稿中只 1 名作者或几名作者同属一个单位者, 只注邮政编码、城市、单位, 不必注姓名。作者中第一作者的工作单位变更时, 则用括号注出, 例如: “(陈×, 研究生, 现在××医院眼科)”。作者单位的英文译名放在英文文题之下、作者姓名的汉语拼音之后。论文如属国家自然科学基金资助项目、省部级以上重点攻关课题或其他基金资助项目, 请在首页左下脚注中注明“本课题为××基金资助(基金号: ×××××)”, 列在作者单位之前一行。来稿须有通讯作者及其 Email 地址, 列在作者单位的后一行。
- 4 摘要** 论著正文前附 300 字以内的中文结构式摘要, 包括目的、方法、结果、结论四要素, 关键词 3~8 个。英文摘要 400 个实词左右, 英文关键词 3~8 个。摘要中应提供样本量、分组信息、主要研究方法和手段、与方法对应的形态学或定量结果等信息。综述的中英文摘要各 200 字左右, 可写成指示性摘要, 亦给出中英文关键词各 3~8 个。摘要用第三人称撰写, 不用“本文”、“作者”等作主语。关键词请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表 (MeSH) 内所列的词; 或选用与文章直接相关的主题词组合、惯用的自由词等。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称, 如“HBsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。每个中英文关键词之间以分号分隔。
- 5 前言** 主要回答“为什么研究”这个问题, 简明扼要地介绍论文的研究背景, 即相关领域的研究历史与现状、研究目的、范围和方法等, 一般 250 字左右, 应有参考文献。知识性、常识性的叙述不要写入前言。
- 6 正文** 正文包括资料(材料)与方法、结果、讨论部分。研究方法中所使用的动物应遵循国家实验动物保护条例, 来自人体的样本应征得所在单位伦理委员会的批准并有患者或其家属的知情同意, 此类内容应在文中叙及。正文和图表内容尽量避免重复, 形态学研究应提供图片, 定量学研究应提供相关数据和图表, 统计学方法使用相关分析者请提供散点图。

(本刊编辑部)