

β -NGF 对人翼状胬肉成纤维细胞增生的影响

赵春明 张明昌 晏雪莹 毛晓春

The effects of β -NGF on proliferation of human pterygium fibroblasts

Zhao Chunming, Zhang Mingchang, Yan Xueying, Mao Xiaochun. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective Our previous research demonstrated that trkA and p75 receptors of nerve growth factor (β -NGF) are expressed in human pterygium fibroblasts (HPF), and trkA is expressed only in conjunctiva. The purpose of present study was to investigate the effects of β -NGF on proliferation of HPF and analyse the pathogenesis mechanism of pterygium. **Methods** The HPF specimen was obtained from Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology during the surgery. Explant culture technique was used for the primary culture of HPF tissue. The cells of confluent 80% were collected and digested using 0.25% trypsin + 0.02% EDTA (1:1) and the third to fifth generation of cells were utilized in the experiment. Different concentrations of β -NGF was added in medium. Cultured cells were identified using vimentin, keratin and α -SMA. MTT was used to determine the proliferation of HPF after addition of β -NGF. The expression of trkA and p75 in HPF was detected by immunofluorescence method. Cell proliferation also was semi-quantitatively analyzed by detect of expressions of PCNA protein and mRNA in HPF using Western blot and RT-PCR. **Results** Cultured HPF cells showed the positive responses for vimentin, α -SMA, trkA and p75 but absent reaction for keratin. MTT revealed that the OD value of HPF cells was gradually enhanced with the increase of β -NGF concentration in 12, 24, 48, 72 and 96 hours after β -NGF action with the maximum stimulation at 48 hours. The expression of PCNA protein and mRNA in HPF was significantly different among various concentrations of β -NGF groups ($F_{\text{protein}} = 24.980, P = 0.000; F_{\text{mRNA}} = 64.490, P = 0.000$) and increased from 5 ng/mL β -NGF group through 50 ng/mL β -NGF group in comparison with 0 and 1 ng/mL β -NGF group ($P < 0.05$). **Conclusion** The findings demonstrate the potential proliferative effect of β -NGF binding to trkA and p75 on HPF.

Key words pterygium; fibroblast; β -NGF; trkA; p75; NGF receptor

摘要 目的 观察神经生长因子 β (β -NGF) 对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞 (HPF) 增生的影响, 探讨翼状胬肉的发病机制。 **方法** 对翼状胬肉组织标本行组织块培养。待细胞生长汇合至 80% 后以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 1:1 混合消化细胞, 取 3~5 代细胞用于实验。通过细胞中波形蛋白、角蛋白及 α 平滑肌肌动蛋白的表达鉴定培养的细胞, 免疫荧光法检测 HPF 中 β -NGF 受体 trkA、p75 的表达, MTT 法检测不同质量浓度 β -NGF 对 HPF 的作用, Western blot 及 RT-PCR 法半定量检测细胞核抗原 (PCNA) 来评估 HPF 的增生。 **结果** 波形蛋白、 α 平滑肌肌动蛋白、trkA 和 p75 在 HPF 中呈阳性表达; MTT 结果显示, 在 β -NGF 作用 12、24、48、72 和 96 h 后, 48 h 为 β -NGF 促增生的高峰期; 在不同质量浓度 β -NGF (5~50 ng/mL) 作用下, HPF 中 PCNA 蛋白及 mRNA 的表达与 0 和 1 ng/mL β -NGF 作用组之间比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{protein}} = 24.980, P = 0.000; F_{\text{mRNA}} = 64.490, P = 0.000$)。 **结论** NGF 可能通过结合两受体 trkA、p75 促进了 HPF 的增生。

关键词 翼状胬肉; 成纤维细胞; β -神经生长因子; trkA; p75; 神经生长因子受体

分类号 R 777.33 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808 (2009)11-0955-05

翼状胬肉是局部球结膜纤维血管组织增生侵犯角

膜的一种疾病, 但目前发病机制尚不完全清楚。最近有研究发现, 翼状胬肉的生长形态与 P 物质具有相关性^[1], 因此我们推测神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 可能影响翼状胬肉的增生。我们前期实验研究发现, 翼状胬肉组织中成纤维细胞表达 trkA、

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科 (赵春明、张明昌、晏雪莹); 430032 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科 (毛晓春)

通讯作者: 张明昌 (Email: mingchangzhang@hotmail.com)

p75, 而正常结膜组织成纤维细胞仅表达 *trkA*^[2]。NGF 结合高亲和力受体 *trkA*, 在低亲和力受体 p75 的成熟形式辅助作用下可放大 *trkA* 效应使细胞存活或增生, p75 可单独与 NGF 结合发挥作用, 优先激活 p75 介导凋亡的发生^[3]。本实验通过在体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞 (human pterygium fibroblasts, HPF), 研究 β -NGF 对 HPF 增生的影响, 探讨翼状胬肉的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

β 神经生长因子 (β nerve growth factor, β -NGF) (美国 Peptotech 公司); 小鼠抗人角蛋白及波形蛋白单克隆抗体、小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、兔抗人 α -SMA、*trkA* 及 p75 多克隆抗体 (武汉博士德公司); Hochst33258、羊抗兔罗丹明荧光二抗、兔抗鼠罗丹明荧光二抗及噻唑蓝 (MTT) (美国 Sigma 公司); DMEM 培养基及新生牛血清 (美国 Gibco 公司)。

1.2 方法

1.2.1 β -NGF 储存液的配制 加入 DMEM 配制成 200 ng/mL 的贮存液, -20°C 避光分装保存。使用时用 DMEM 培养液稀释至所需质量浓度, 4°C 保存 1 周有效。

1.2.2 HPF 的培养、鉴定与传代及免疫荧光检测 翼状胬肉组织标本为华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科手术切除组织, 采用组织块培养法原代接种, 每 3~4 d 更换 1 次培养液, 待细胞生长汇合至 80% 后以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 1:1 混合消化细胞, 按 1:3 分种传代, 取 3~5 代细胞用于实验。

取传代细胞接种于预置盖玻片的 24 孔板, 待细胞长满盖玻片, 取出用无水乙醇 + 冷丙酮 1:1 混合固定 15 min, 按照试剂盒说明完成免疫荧光步骤, 通过荧光显微镜 (Leica DFC300FX) 检测 HPF 中波形蛋白、角蛋白、*trkA*、p75 和 α -SMA 的表达。

1.2.3 β -NGF 对 HPF 增生的影响 采用 MTT 法检测。取处于对数生长期的 HPF, 以 10% 小牛血清的 DMEM 制备为 1×10^5 个/mL 细胞悬液, 每孔 100 μL 分别接种于 5 块 96 孔培养板中 (置于 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养), 分别在细胞中加入质量浓度为 2、10、20、100、200 ng/mL 的 β -NGF 100 μL , 空白对照组加入 10% 小牛血清 100 μL , 同时设立只加培养液的空白对照, 每组设 4 个复孔。分别培养 12、24、48、72、96 h 后每孔中加入 20 μL MTT 继续培养 4 h, 弃上清, 加入 150 μL DMSO 振荡 10 min, 于自动酶标读

数仪 490 nm 处测定各孔 OD 值。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测 PCNA 以 10% 小牛血清的 DMEM 配制终质量浓度为 1、5、10、50、100 ng/mL 的 β -NGF 加入细胞培养瓶中 48 h, 对照组为 10% 小牛血清的 DMEM, 收获细胞, 提取总蛋白, 考马斯亮蓝蛋白定量分析后分装, -70°C 保存。10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后, 4°C 下 90 V 电转移 75 min 至硝酸纤维素滤膜, 7% 脱脂奶粉封闭过夜, 加小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体一抗 (1:400) 稀释, 37°C 孵育 2 h, 加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗, 37°C 孵育 1 h, 氮蓝四唑盐/5 溴 4 氯 3 吡啶磷酸 (NBT/BCIP) 显色 20 min, 用 SQ9636 扫描系统及 HPIAS21000 型全自动图像分析仪分析硝酸纤维素膜上蛋白条带吸光度 (A) 值, 并用相应的 β -actin 吸光值与其作比较。

1.2.5 RT-PCR 检测 PCNA RT-PCR 检测 HPF 中 PCNA 的表达, 用一步法提取总 RNA, 检测总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA, 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应参数为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 55°C 退火 55 s, 72°C 延伸 60 s, 32 个循环, 72°C 后延伸 10 min。PCNA sense: 5'-CCTGCTGGGACATCAGTTCG-3', antisense: 5'-GGAGACAGTGGAGTGGC TTT-3', 产物长度 592 bp; β -actin sense: 5'-ACACTGTGCCATCTACGAGG-3', antisense: 5'-AGGGCCGGACTCGTCATACT-3', 产物长度 252 bp。

取各扩增产物 5 μL , 加 $6 \times$ 上样缓冲液 1 μL , 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 鉴定 RT-PCR 产物。结果用 Gel-ProAnalyzer 凝胶成像系统照相, BIO2RAD QualityOne 数据分析软件分析光密度值。以各组的 PCNA 的 PCR 产物条带与其相应的 β -actin 条带的光密度比值作为 PCNA 表达的相对量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对实验结果进行统计学分析。实验检测指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间测定指标的数据资料采用 Levene 法进行方差齐性检验, 证实方差齐 ($P > 0.05$)。各质量浓度 β -NGF 作用后不同时间 HPF 的增生比较采用两因素方差分析, 组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。各质量浓度 β -NGF 作用 48 h 后 PCNA 蛋白和 mRNA 在成纤维细胞中表达的半定量检测比较采用单因素方差分析, 组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果

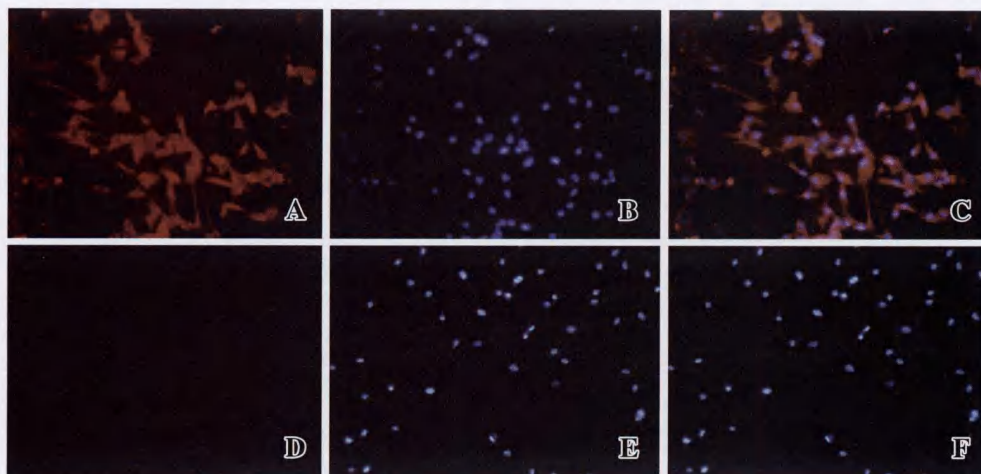


图 1 HPF 鉴定 (×100) A: 原代培养细胞中的波形蛋白表达呈阳性 B: 为 Hoechst 染色以示核 C: 波形蛋白和 Hoechst 双染色 D: 原代培养细胞中角蛋白表达呈阴性 E: 为 Hoechst 染色以示核 F: 角蛋白和 Hoechst 双染色

Fig. 1 Identification of pterygial fibroblasts (×100) A: Vimentin is stained by TRITC-labelled red color under the immunofluorescence microscopy B: Nuclei are stained by Hoechst-labelled blue color under the immunofluorescence microscopy C: This panel shows merged image of double-staining of vimentin and Hoechst D: Keratin is absently expressed in primery cultured cells E: Nuclei are stained with Hoechst-labelled blue color under the immunofluorescence microscopy F: This panel shows merged image of double-staining of keratin and Hoechst

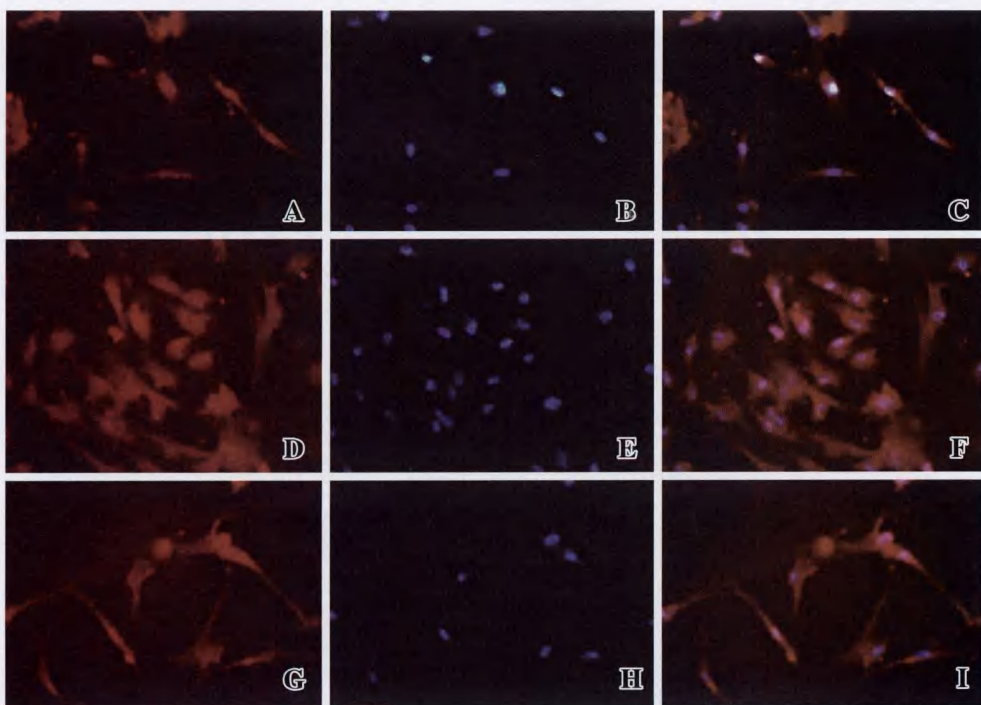


图 2 β-NGF 受体在成纤维细胞中的表达 (×400) A: 成纤维细胞中 trkA 表达呈阳性 B: 为 Hoechst 染色以示核 C: A, B 合成图 D: 成纤维细胞中 p75 表达呈阳性 E: 为 Hoechst 染色以示核 F: D, E 合成图 G: 成纤维细胞中 α-SMA 表达呈阳性 H: 为 Hoechst 染色以示核 I: G, H 合成图

Fig. 2 Expression of β-NGF receptors (×400) A: trkA in HPF is stained by TRITC-labelled red color under the immunofluorescence microscopy B: Nuclei are stained by Hoechst-labelled blue color under the immunofluorescence microscopy C: This panel shows merged image of A and B D: p75 in HPF is stained by TRITC-labelled red color under the immunofluorescence microscopy E: Nuclei are stained by Hoechst-labelled blue color under the immunofluorescence microscopy F: This panel shows merged image of D and E G: α-SMA is stained by TRITC-labelled red color under the immunofluorescence microscopy H: Nuclei are stained by Hoechst-labelled blue color under the immunofluorescence microscopy I: This panel shows merged image of G and H

通过荧光显微镜观察,胞浆罗丹明染色代表阳性,不染色代表阴性;细胞核 Hoechst 染为蓝色。波形蛋白阳性,角蛋白阴性证明原代培养的细胞为成纤维细胞(图1)。trkA 和 p75 阳性说明 HPF 中存在 NGF 的受体,α-SMA 阳性证明 HPF 为肌成纤维母细胞(图2)。

2.2 MTT 检测结果

不同质量浓度组在 β-NGF 作用 48 h 后 OD 出现峰值,48 h 后 OD 值呈下降趋势,表明 48 h 为 β-NGF 促 HPF 母细胞增生的最佳时间点(表1);β-NGF 作用 48 h 时,在 50 ng/mL 的质量浓度范围,随着质量浓度的增加,其促肌成纤维母细胞增生的效应加强,超过此质量浓度范围呈现饱和和动力学特征,促增生效应不再增强。β-NGF 质量浓度 0 ng/mL、1 ng/mL 时 2 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),50 ng/mL 与 100 ng/mL 2 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其余各组间比较均差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)(表1)。

2.3 Western-blot 和 RT-PCR 检测结果

2.3.1 Western blot 法检测 β-NGF 在 10 ng/mL 时出现了促肌成纤维母细胞增生的效应,并在 50 ng/mL 质量浓度范围内 PCNA 蛋白表达量呈递增趋势 ($F = 24.980, P = 0.000$)。空白对照组与 1 ng/mL 组 PCNA/β-actin 值比较差异无统计学意义 ($q = 0.646$,

$P > 0.05$), 50 ng/mL组与 100 ng/mL组 PCNA/ β -actin值的比较差异无统计学意义($q = 0.592, P > 0.05$),其余各组与 0 质量浓度组比较差异均有统计学意义(图 3A、B)

表 1 β -NGF 促 HPF 增生的影响($\bar{x} \pm s, OD$ 值)
Table 1 Proliferative effects of β -NGF on pterygium fibroblasts ($\bar{x} \pm s, OD$)

β -NGF (ng/mL)	OD value of HPF after acting of β -NGF				
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.143 \pm 0.018	0.196 \pm 0.018	0.250 \pm 0.019	0.297 \pm 0.065	0.273 \pm 0.042
1	0.137 \pm 0.010	0.209 \pm 0.016	0.301 \pm 0.060	0.289 \pm 0.034	0.262 \pm 0.030
5	0.208 \pm 0.013	0.235 \pm 0.012	0.386 \pm 0.047	0.362 \pm 0.029	0.338 \pm 0.016
10	0.228 \pm 0.010	0.252 \pm 0.009	0.452 \pm 0.070	0.414 \pm 0.038	0.387 \pm 0.022
50	0.308 \pm 0.035	0.361 \pm 0.015	0.529 \pm 0.051	0.484 \pm 0.032	0.440 \pm 0.033
100	0.351 \pm 0.032	0.353 \pm 0.018	0.521 \pm 0.050	0.460 \pm 0.059	0.447 \pm 0.060

$F_{time} = 119.900, P = 0.000; F_{concentration} = 62.470, P = 0.004; F_{interaction} = 3.252, P = 0.033$ (Two-way ANOVA, SNK-q test)

2.3.2 PCNA mRNA 的表达(RT-PCR 法) 空白对照组中 PCNA mRNA 表达量较低,在质量浓度 50 ng/mL 以内随着 β -NGF 质量浓度的递增 PCNA mRNA 表达量增加($F = 64.490, P = 0.000$)。PCNA mRNA 和 PCNA 蛋白的 PCNA/ β -actin 值在整体趋势上一致(图 3C、D)。

3 讨论

翼状胬肉作为一种可能包含了眼表疾病中所有关键机制的疾病,国内外众多学者对其进行了大量研究,认为紫外线、干燥、风沙、粉尘、人类乳头状病毒与其发生、发展具有相关性。目前研究认为,翼状胬肉发病的可能原因为角膜缘干细胞微环境变化,出现端粒酶的表达增高,促进细胞增生;有学者在翼状胬肉中检测到可引起细胞增生的一些因子,如成纤维生长因子、表皮生长因子、肿瘤坏死因子 α 、胰岛素样生长因子结合蛋白、生长转化因子等;另有研究发现基质金属蛋白酶(MMPs)可溶解细胞间半桥粒连接,使翼状胬肉细胞易于移行^[4]。

翼状胬肉侵犯角膜,必然引起角膜缘以及角膜微环境的变化。角膜富含神经组织,NGF 存在其中对于维持角膜生理平衡起着重要作用^[5]。有研究发现 NGF 在非神经源性细胞,如上皮细胞、角膜细胞及平滑肌细胞中均有表达^[6-8],提示 NGF 在神经系统以外可起作用。NGF 在不同物种是一高度保守的分子,包括 3 个亚单位($\alpha_2, \beta, \gamma_2$)。 β -NGF 具有对 NGF 生物激活效应, γ -NGF 是一种高效特异性激活蛋白酶,能够使 NGF 前体转化为成熟形式, α -NGF 在静止期出现。

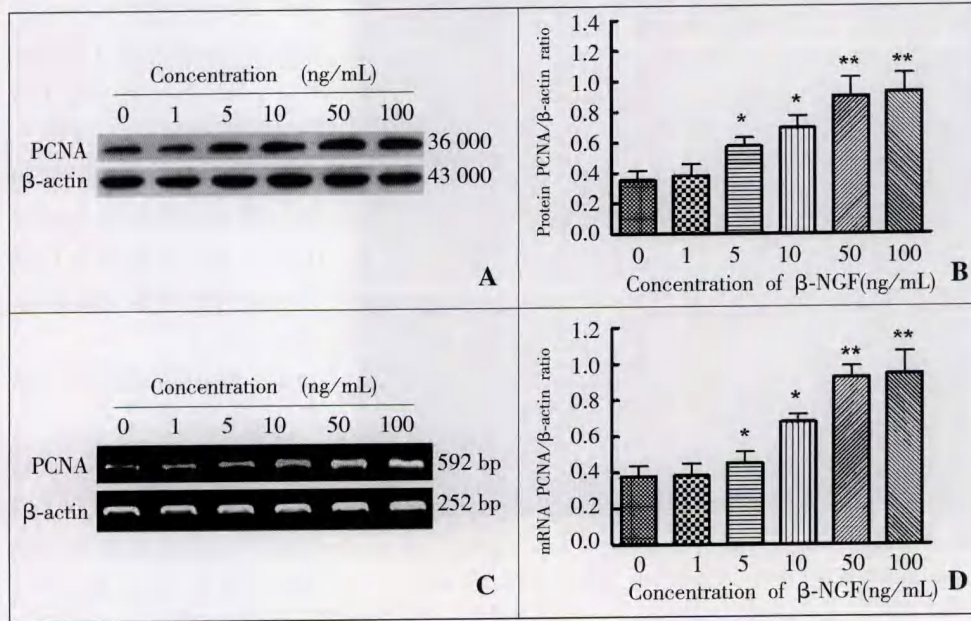


图 3 不同质量浓度 β -NGF 作用 48 h 时对肌成纤维母细胞 PCNA 表达的影响 A: Western blot 检测表明 β -NGF 质量浓度越高, PCNA 蛋白表达越强 B: 6 个组间 PCNA 蛋白在肌成纤维母细胞中的表达比较差异有统计学意义($F = 28.60, P = 0.00$)。与 β -NGF 质量浓度组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ C: RT-PCR 检测表明 β -NGF 质量浓度越高, PCNA mRNA 表达越强 D: 6 个组间 PCNA mRNA 在肌成纤维母细胞中的表达比较差异有统计学意义($F = 28.08, P = 0.00$)。0 ng/mL 与 1 ng/mL β -NGF 组间的表达差异无统计学意义($q = 1.16, P = 0.31$)。与 β -NGF 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 The expression of PCNA in HPF in 48 hours after β -NGF

action A: Western blot showed that expression of PCNA protein in cultured cells was gradually enhanced with the increase of β -NGF concentration B: The statistically significant difference was seen in expression of PCNA protein among different concentrations of β -NGF group ($F = 28.60, P = 0.00$). There was no significant difference in expression of PCNA protein between 0 concentration of β -NGF group and 1 ng/mL β -NGF group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 concentration of β -NGF group C: RT-PCR showed that expression of PCNA mRNA in cultured cells was gradually enhanced with the increase of β -NGF concentration D: The statistically significant difference was seen in expression of PCNA mRNA among different concentrations of β -NGF groups ($F = 28.08, P = 0.00$). There was no significant difference between 0 concentration of β -NGF group and 1 ng/mL β -NGF group ($q = 1.16, P = 0.31$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 concentration of β -NGF group

NGF 具有介导 2 种不同受体(高亲和力受体 trkA 和低亲和力受体 p75)特异性/单独地激活细胞的特性^[9]。NGF 触发细胞活性包括迁移、增生、分化、生存甚至凋亡,这些效应和 NGF 受体关系密切。 β -NGF 促增生的机制可能是 NGF 促有丝分裂需要 trkA 的存在,p75 能促进 NGF 对 trkA 的选择性识别,或在 NGF 和 trkA 共同存在的条件下提高 trkA 的反应性,促进细胞增生。NGF 介导的生物激活(从分化/激活到增生/存活)配体依赖的 trkA 自动磷酸化和几个信号转导级联反应的并发激活,通过 MAPK-Ras-Erk 通路促进细胞增生^[9-10]。目前关于 β -NGF 促 HPF 增生的研究国内外尚未见报道。

我们先前研究发现 HPF 细胞中 NGF、trkA 和 p75 表达阳性;而在正常结膜组织成纤维细胞中 p75 表达阴性。有研究发现,NGF 不诱导角膜和结膜成纤维细胞的增生^[11-12]。本研究显示:p75 在 HPF 增生的病理变化中可能起到重要作用。

本实验首先培养鉴定 HPF,检测发现 HPF 中 trkA、p75 表达呈阳性,为 NGF 促进 HPF 增生提供了实验基础。有研究发现,成纤维细胞可分化为肌成纤维母细胞,分泌大量纤维结合素,进一步促进细胞黏附并为胶原纤维定向沉积提供合适条件,并且他们产生的 MMPs 和 TIMPs 参与了基质的降解^[13-14]。此理论符合翼状胬肉的病理变化。肌成纤维母细胞作为翼状胬肉的特征性细胞已经得到证实^[15]。本研究通过免疫组织化学发现,培养细胞表达 α -SMA 阳性,说明翼状胬肉增生的细胞为肌成纤维母细胞。

MTT 结果显示, β -NGF 对 HPF 增生在 48 h 出现高峰,并且 0 ~ 50 ng/mL 呈质量浓度依赖关系。本研究通过 Western blot 及 RT-PCR 法检测 HPF PCNA 表达变化,发现不同质量浓度的 β -NGF 作用 48 h 时,0 ~ 50 ng/mL PCNA 表达呈质量浓度依赖关系,50 ng/mL 与 100 ng/mL 比较差异无统计学意义。PCNA 是一种核内蛋白,是 DNA 复制时 δ 聚合酶的辅酶,直接参与核内 DNA 的合成,主要表达在细胞增生周期的 S 期,与细胞增生活动密切相关,可作为一种准确、简便、直观地研究细胞增生状况的指标^[16]。另外本实验中发现,传代 6 代以后的细胞在 β -NGF 的作用下细胞增生效应下降,甚至出现相反趋势。其机制可能是细胞中 p75 的表达发生了变化,影响细胞的增生。

基于以上实验结果显示在一定质量浓度范围内,

β -NGF 可能通过介导其受体促进翼状胬肉中肌成纤维母细胞的增生,p75 的表达变化可能是细胞增生或凋亡的决定性因素,关于 p75 调控变化的具体机制尚需进一步深入研究。

参考文献

- 1 Chui J, di Girolamo N, Coroneo MT, et al. The role of substance P in the pathogenesis of pterygia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(10): 4482 - 4489
- 2 赵春明, 张明昌, 黄邦杏, 等. NGF 及其受体 TRKA、p75 在翼状胬肉组织中的表达[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2008, 17(6): 555 - 559
- 3 Hempstead BL. The many faces of p75 NTR[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12(3): 260 - 267
- 4 张明昌, 王勇. 重视翼状胬肉的基础与临床研究[J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(10): 868 - 872
- 5 Gong N, Pleyer U, Vogt K, et al. Local overexpression of nerve growth factor in rat corneal transplants improves allograft survival[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(3): 1043 - 1052
- 6 Micera A, Puxeddu I, Aloe L, et al. New insights on the involvement of nerve growth factor in allergic inflammation and fibrosis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5): 369 - 374
- 7 Micera A, Lambiase A, Aloe L, et al. Nerve growth factor involvement in the visual system; implications in allergic and neurodegenerative diseases[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(6): 411 - 417
- 8 Lambiase A, Micera A, Sgrulletta R, et al. Nerve growth factor and the immune system; old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004, 4(5): 425 - 430
- 9 Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 1217 - 1281
- 10 Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(35): 32687 - 32695
- 11 Micera A, Puxeddu I, Lambiase A, et al. The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta326[J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(5): 650 - 656
- 12 Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, et al. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes; possible mechanism during corneal healing[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(4): 747 - 757
- 13 Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(1): 7 - 12
- 14 Lorena D, Uchio K, Costa AM, et al. Normal scarring: importance of myofibroblasts[J]. *Wound Repair Regen*, 2002, 10(2): 86 - 92
- 15 Touhami A, di Pascuale MA, Kawatika T, et al. Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia[J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(3): 269 - 274
- 16 Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000, 109(11): 1046 - 1048

(收稿:2008-12-06 修回:2009-09-30)

(本文编辑:尹卫靖)