

bFGF 不能调节人结膜下 Tenon's 囊成纤维细胞表型改变

谢冰叶纹^{1*} 钟一声 沈玺

(上海交通大学附属瑞金医院眼科, 上海 200025; ¹复旦大学附属华山医院眼科, 上海 200040)

摘要 探讨了碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能否对人结膜下 Tenon's 囊成纤维细胞(human subconjunctival Tenon's capsule fibroblast, HTCF)表型改变起诱导作用。在 5 例白内障手术中取人结膜下 Tenon's 囊组织块培养成纤维细胞。用不同浓度 bFGF(0、5、10、20 ng/ml)诱导 HTCF 48 h。免疫细胞化学技术、蛋白质印记免疫技术检测其平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达与正常 HTCF 有否差异。实验结果表明用不同浓度(0~20 ng/ml) bFGF 诱导 HTCF 48 h, 虽能明显促进 HTCF 细胞的生长, 但均不能上调细胞内 α -SMA 的表达。在 0~20 ng/ml 范围内, 体外用 bFGF 诱导 HTCF 48 h, 不能诱导其改变为肌成纤维细胞。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子; 人结膜下 Tenon's 囊成纤维细胞; 平滑肌肌动蛋白; 肌成纤维细胞; 表型改变

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), 是一种与肝素相结合的生长因子, 17.2 kDa 大小, 由 155 个氨基酸组成的多肽。成纤维细胞(fibroblast, FB)则是来源于间充质的细胞, 对于局部创伤后的组织重塑有重要作用。bFGF 具有刺激细胞生长和增殖的作用已得到广泛认可, 这些细胞包括来源于间充质, 中外胚层和内胚层的细胞。在局部组织重塑过程中, 除了局部损伤组织的 FB 增殖和迁移外, FB 在细胞因子和细胞外基质共同作用下表型改变为肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)也在组织重塑过程中起到重要作用。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在体外诱导人结膜下 Tenon's 囊成纤维细胞(human subconjunctival Tenon's capsule fibroblast, HTCF)改变为 MF, 并特异性的表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)已得到肯定, 但 bFGF 是否也具有同样作用尚有争论^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料及样本来源

选自人眼白内障手术中所取的人结膜下 Tenon's 囊组织, 共 5 例(每例单独培养 HTCF), 其中男 2 例, 女 3 例, 年龄 59~75 岁, 平均 65 岁, 所取组织均为 4 mm × 6 mm 大小, 厚约 1 mm。

1.2 主要试剂与仪器

(1) DMEM 培养液(Gibco BRL 公司)。(2)重组人 bFGF (PeproTech EC Ltd)。(3)重组人 TGF- β 1 (PeproTech EC Ltd)。(4)鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体(Clone 1A4, A2527)(Sigma)。(5)羊抗鼠 IgG(Sigma)。(6)辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(Santa Cruz)。(7) DAB 试剂盒(武汉博士德公司)。

1.3 HTCF 培养、分组及观察细胞增殖情况

采用文献报道的组织贴块法^[2]进行细胞原代培养, 无菌人眼白内障手术中取人结膜下 Tenon's 囊组织 4 mm × 6 mm 大小, 置于 DMEM 培养液中, 使用直镊分离结缔组织和血迹, 将 Tenon's 囊组织剪成 1 mm² 大小的组织, 置于 24 孔培养板(Gibco BRL 公司)中加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行贴壁培养, 待细胞长至汇合状态, 用 0.25% 胰蛋白酶(Trypsin-EDTA, Gibco BRL 公司)消化、传代、扩增, 实验取第 5 至第 9 代 HTCF, $n=5$ 。取对数生长期 HTCF 悬液, 密度为 1×10^6 个/ml, 接种于 5 个六孔板中, 每孔 2.5 ml; 每组设 6 个复孔, 接种 6 h 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 bFGF (0、5、10、20 ng/ml); 培养 48 h, 采用

收稿日期: 2004-05-18 接受日期: 2005-08-25

上海市科委发展基金科技攻关项目资助(No.024119015)

* 通讯作者。Tel: 021-62489999-6650, E-mail: yewen0412@hotmail.com

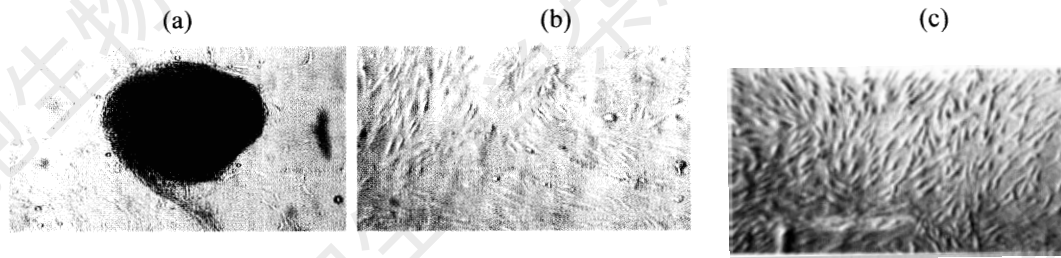


图1 HTCF 细胞生长

a: 组织块贴壁培养约 5~7 天($\times 200$); b: HTCF 传至第 3 代后 5~7 天 ($\times 200$); c: 传至第 3 代后加 10 ng/ml bFGF 处理 3~4 天($\times 100$)。

细胞计数法观察 bFGF 对 HTCF 细胞增殖的影响。

1.4 细胞分组及表型鉴定

培养 HTCF, 直至 7 个 60 mm 培养皿(Corning Ltd) 中的 HTCF 达到 70 %~80 % 汇合度, 用 bFGF 刺激 60 mm 培养皿里贴壁生长并已静止(不含血清 DMEM 培养液)48 h 的 HTCF, 分别设阳性对照人血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)及 10 ng/ml TGF- β 1 诱导 48 h 后的 HTCF; 以及终浓度为 0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml 的 bFGF, 每个培养皿中加入的 DMEM 量为 3 ml, 则需加入的 bFGF 分别 0 ng, 6 ng, 15 ng, 30 ng, 60 ng, 以此终浓度刺激 48 h。

1.4.1 免疫细胞化学技术鉴定细胞表型 将 HTCF 悬液滴种于盖玻片上, 细胞贴壁于玻片后 95 % 冰乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定, -20°C 保存; 0.25 % Triton X-100 覆盖 4 min, 破细胞膜; 山羊血清室温下封闭 30 min; 一抗采用 1 : 100 鼠抗 α -SMA 单克隆抗体; 二抗采用 1 : 200 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG; DAB 显色; 常规透明脱水; 中性树脂封片保存。

1.4.2 蛋白质免疫印记检测(Western blotting)细胞中 α -SMA 的表达 细胞总蛋白抽提和定量, 考马斯亮蓝 G-250 法测得蛋白质浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。每一个电泳槽中蛋白质加样量为 5 μg 。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE); 转膜(垂直平板蛋白质电泳及转膜装置, Bio-Rad); 染色, 封闭; 免疫杂交; 化学发光检测杂交信号; 暗房 X 光片感光。

1.5 统计学方法

计量数据以均数 \pm 标准差表示。应用 SAS 6.04 版统计软件进行统计分析。两组间差异用 t 检验, 多组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 HTCF 细胞生长

人结膜下 Tenon's 囊组织块贴壁培养, 约 5~7

表1 加入不同浓度 bFGF 对 HTCF 生长的增殖作用

bFGF (ng/ml)	细胞数 (个)
0	103000 \pm 10400
1	155000 \pm 10500
5	164000 \pm 12400
10	224300 \pm 24300
20	145000 \pm 11000

天可以见到梭形的 HTCF 从组织块边缘长出(图 1 a); 经 1 : 2 传代, 约 3~4 天长满培养瓶底; 约 5~7 天 HTCF 可达到汇合状态(图 1 b); 在添加终浓度为 10 ng/ml 的 bFGF 后, 细胞生长和达到汇合的速度加快, 约 3~4 天(图 1 c)。

2.2 bFGF 对 HTCF 增殖的影响

HTCF 加入不同浓度 bFGF (0、1、5、10、20 ng/ml)与未加 bFGF(0 ng/ml bFGF)HTCF 比较, 加 bFGF 组细胞增殖加快, 其中 10 ng/ml bFGF 处理 HTCF 组增殖最为明显, $P < 0.01$, $n = 5$, 差异非常显著(表 1)。

2.3 免疫细胞化学检测 HTCF 细胞中 α -SMA 表达

α -SMA 表达的细胞免疫组化染色显示: 对照细胞人血管外 VSMC, α -SMA 呈强阳性表达(图 2a)。用 10 ng/ml 的 TGF- β 1 处理 HTCF 细胞 48 h, 明显诱导 HTCF 细胞表达 α -SMA(图 2b), 胞浆内可见到 α -SMA 表达的棕黄色阳性染色; 未经处理的 HTCF 细胞(图 2c)无阳性染色。同时结果显示: 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml bFGF 诱导 HTCF 48 h 后, HTCF 细胞无棕黄色染色, 无 α -SMA 表达(图 2d~图 2g)($n = 5$)。

2.4 蛋白质免疫印迹(Western blotting)检测细胞中 α -SMA 的表达

图 3 显示, VSMC 强表达 α -SMA; 不同浓度 bFGF (0、1、5、10、20 ng/ml) 刺激 HTCF 48 h 后, 不能诱导 α -SMA 表达 ($n = 5$)。而 10 ng/ml TGF- β 1 处理 HTCF 细胞, 明显诱导 α -SMA 表达。

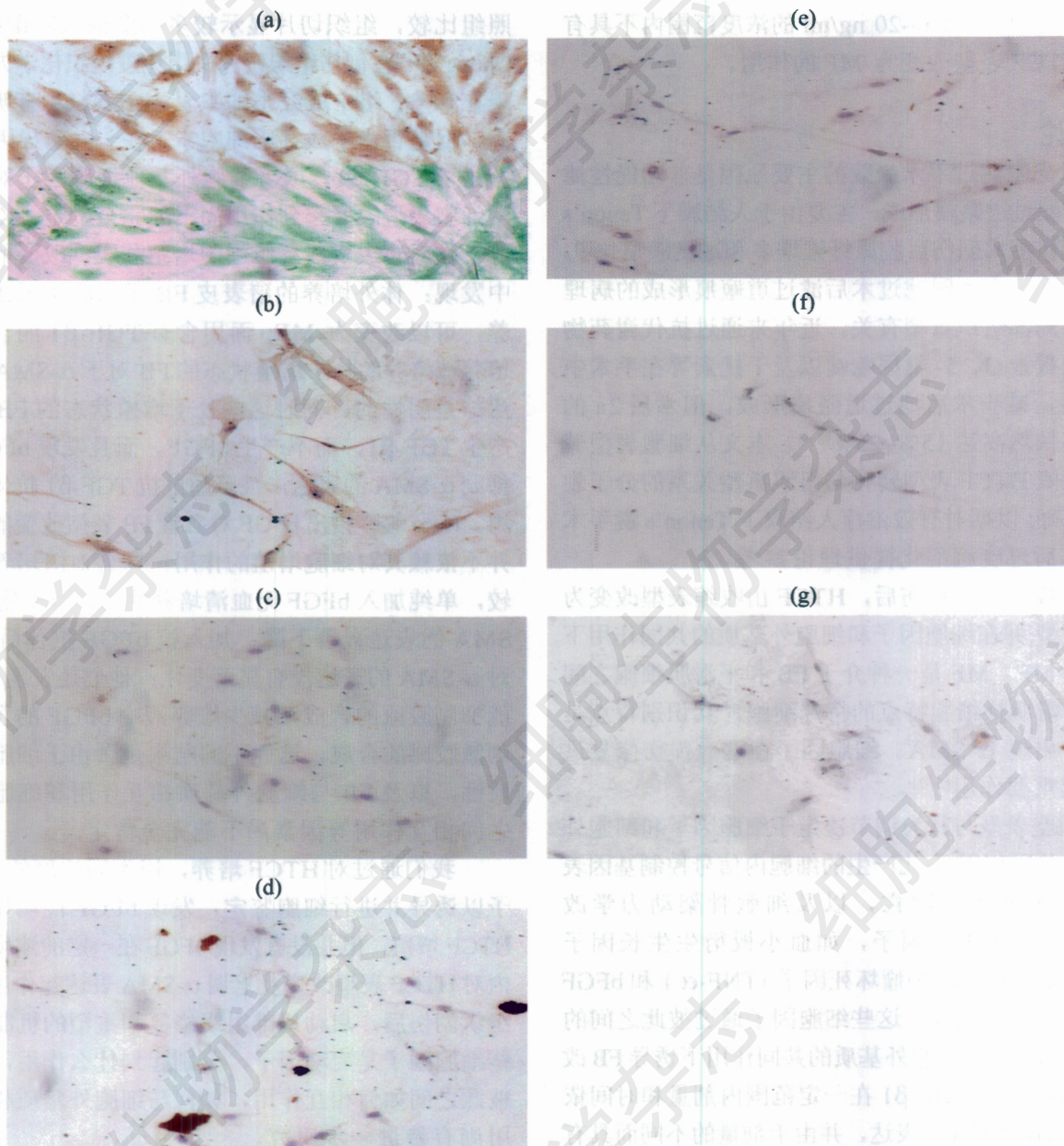


图2 对照人血管外 VSMCs、HTCF、 α -SMA 表达检测及 TGF- β 1、bFGF 作用后 HTCF 细胞中 α -SMA 表达检测 ($\times 200$)
 a: α -SMA 表达阳性; b: 10 ng/ml TGF- β 1 处理 48 h HTCF 细胞; c: HTCF 对照。d~g: 分别为用终浓度为 1 ng/ml bFGF, 5 ng/ml bFGF, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml bFGF 处理 48 h HTCF。

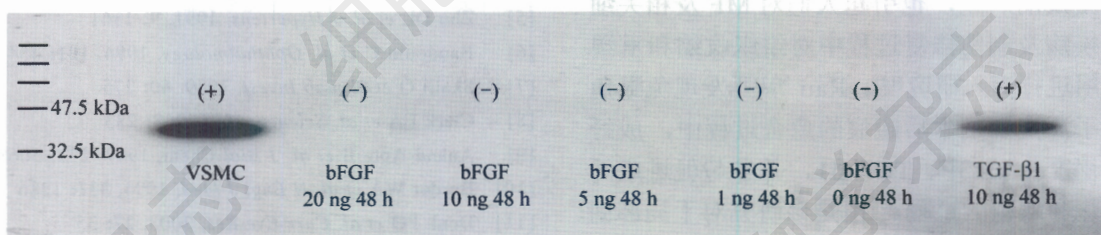


图3 Western 印迹检测 VSMC、不同浓度 bFGF 及 10 ng/ml TGF- β 1 诱导 HTCF 48 h 后 α -SMA 的表达

结果表明 bFGF 在 0~20 ng/ml 的浓度范围内不具有诱导 HTCF 表型改变为 MF 的作用。

3 讨论

青光眼滤过手术失败的主要原因是非功能性滤过泡和滤过道瘢痕形成, 主要由于人结膜下 Tenon's 囊组织在手术创伤后胶原纤维增多和过度瘢痕化^[2]。研究证实, 青光眼滤过术后滤过道瘢痕形成的病理机制与局部组织重塑有关。近年来通过抗代谢药物如丝裂霉素 C、5- 氟尿嘧啶以及干扰素等在手术中的应用, 减少术后滤过道瘢痕形成, 但术后 2a 的失败率依然高达 15%~25%^[3,4]。本文从细胞表型着手, 探索 HTCF 表型转化与组织重塑关系的分子生物学基础; 以期对有效治疗人结膜下 Tenon's 囊手术或损伤后过度瘢痕化提供理论参考。

结膜下组织损伤后, HTCF 由收缩表型改变为合成表型, 并在细胞因子和细胞外基质的共同作用下改变为 MF。MF 是一种介于 FB 和平滑肌细胞之间具有平滑肌样细胞特点的特殊细胞, 其识别特点是胞浆中出现 α -SMA。细胞因子在这一损伤修复过程中起重要作用^[5-7]。

细胞表型与行为调节决定于细胞因子和细胞外基质的共同作用, 由此产生的细胞内信号控制基因表达、细胞增生、凋亡, 以及细胞骨架动力学改变^[8,9]。许多生长因子, 如血小板衍生生长因子 (PDGF), TGF- β 1, 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和 bFGF 等参与了这一过程。这些细胞因子通过彼此之间的相互作用, 并在细胞外基质的共同作用下诱导 FB 改变为 MF^[10,11]。TGF- β 1 在一定范围内剂量和时间依赖性增加 α -SMA 的表达, 并由于剂量的不同而具有双向性已得到证实^[12]。bFGF 促进细胞的分裂与增殖, 对成纤维细胞有很强的促有丝分裂及刺激增生、趋化移行的作用^[13], 但 bFGF 是否也能单独诱导 FB 改变为 MF 尚无定论。

临床上一些疾病, 如肝硬化、肾和肺纤维化以及各种瘢痕的产生, 也引起人们对 MF 及相关细胞因子在疾病及创伤修复过程中对组织收缩和重塑所起的作用进行深入研究^[14]。Rao 等^[15]发现兔眼角膜在准分子激光切削术后瘢痕的愈合过程中, 成纤维细胞分泌产生 bFGF、TGF- β 1, 并参与促进成纤维细胞活化和增殖的过程。但是该研究对于局部创伤组织 FB 表型改变的作用没有进行深入地研究。Rieck 等^[16]在兔角膜激光切削术后局部用 bFGF 与对

对照组比较, 组织切片显示较多活跃的成纤维细胞。Cheng 等^[17]在创伤组织研究中用免疫组织化学方法发现在 bFGF 组中成纤维细胞表达 α -SMA 有明显提高, 但是否由于成纤维细胞本身在一些诱导因素下分泌了 TGF- β 1, 或者细胞外其他细胞因子对成纤维细胞表型改变起到作用尚不能完全确定。Khouw 等^[18]在对猪表皮成纤维细胞增殖和表型改变的研究中发现: 体外培养的猪表皮 FB 予以静止无血清培养, 可以改变为 MF; 而用含有 TGF- β 1 的含血清培养液培养的处于增殖状态的 FB 对于 α -SMA 的表达却是阴性的。同时这些处于增殖状态的 FB 能够产生 TGF- β 1, 而不产生 bFGF。而且发现 bFGF 能抑制 α -SMA 的表达, 甚至超过抗 TGF- β 1 抗体的作用。Kato 等^[19]指出 bFGF 对血管 FB 表型改变的影响并不依赖其对细胞增殖的作用; 与含血清培养相比较, 单纯加入 bFGF 无血清培养的成纤维细胞对 α -SMA 的表达显著下降; 加入抗 bFGF 抗体后, FB 对 α -SMA 的表达没有显著变化; 他们还发现 bFGF 能抑制胶原的合成, 减少培养液中 bFGF 的含量能刺激胶原的合成。这些不同结果是否由于细胞的异质性, 以及 FB 与细胞外基质相互作用和细胞因子之间相互作用等因素尚不能完全肯定。

我们通过对 HTCF 培养, 用不同浓度的 bFGF 予以诱导并进行细胞鉴定, 发现 bFGF 能明显促进 HTCF 增殖, 但并没有发现 bFGF 在一定的浓度范围内对 HTCF 表型改变及上调 α -SMA 表达起作用。在组织创伤后, 启动局部组织修复和重塑的机制中哪些细胞因子是启动因子, 分别起到什么作用, 以及彼此之间如何相互作用, 如何与细胞外基质相互作用尚有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Chang L et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, **42**: 1531
- [2] Chihara E et al. *J Glaucoma*, 2002, **11**: 127
- [3] You YA et al. *J Glaucoma*, 2002, **11**: 110
- [4] Khaw PT et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, **33**: 2043
- [5] Zhu DL et al. *J Hypertens*, 1991, **9**: 1161
- [6] Baudouin C et al. *Ophthalmology*, 1994, **101**: 454
- [7] Skalli O et al. *Lab Invest*, 1989, **60**: 275
- [8] Clark EA et al. *Science*, 1995, **268**: 233
- [9] Anand-Apte B et al. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 30688
- [10] Border WA et al. *N Engl J Med*, 1994, **331**: 1286
- [11] Denk PO et al. *Curr Eye Res*, 2003, **27**: 35
- [12] Li JH et al. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13**: 1464
- [13] Bhora FY et al. *J Surg Res*, 1995, **59**: 236

- [14] Seemayer TA *et al. Pathol Annu*, 1980, **15**: 443
[15] Rao RC *et al. J Ocul Pharmacol*, 1992, **8**: 77
[16] Rieck P *et al. Exp Eye Res*, 1992, **54**: 987
[17] Cheng B *et al. Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002, **82**: 1187
[18] Khouw IM *et al. Biomaterials*, 1999, **20**: 1815
[19] Kato S *et al. In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, **34**: 341

Human Basic Fibroblast Growth Factor may Have No Effect on the Phenotypic Converse of Human Tenon's Capsula Fibroblast

Bing Xie, Wen Ye^{1*}, Yi-Sheng Zhong, Xi Shen

(Department of Ophthalmology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Ruijin Hospital, Shanghai 200025, China;

¹Department of Ophthalmology, Fudan University Affiliated Huashan Hospital, Shanghai 200040, China)

Abstract The purpose of the present study was to explore whether human basic fibroblast growth factor (bFGF) had the effect on phenotypic transition of human subconjunctival Tenon's capsular fibroblast (HTCF) after operation or trauma. Cultured HTCF derived from 5 human cataract operation cases were induced by bFGF of different concentration (0, 5, 10, 20 ng/ml) for 48 h. Then α -smooth muscle actin (α -SMA) was detected by immunocytochemistry and Western blot procedure, and it could be observed whether there was differential expression in comparison with normal HTCF. Cultured HTCF stimulated with different concentration of bFGF for 48 h induced that bFGF could not up-regulate the expression of α -SMA. bFGF from 0–20 ng/ml for 48 h could not induce HTCF transit to myofibroblast *in vivo*.

Key words human basic fibroblast growth factor; human subconjunctival Tenon's capsular fibroblast; α -smooth muscle actin; myofibroblast; phenotypic transition

Received: May 18, 2004 Accepted: August 25, 2005

This work was supported by the Science & Technology Commission of Shanghai Municipality (No.024119015)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62489999-6650, E-mail: yewen0412@hotmail.com