

· 实验研究 ·

临床常用药物对体外培养的复发性翼状胬肉成纤维细胞的抑制效果比较

孙亚杰 林婷婷 何彦津 朱利民 高扬 周波

300000 天津医科大学眼科医院

通信作者:何彦津, Email: yanjinhe88@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.006

【摘要】 背景 翼状胬肉是眼科常见的眼表疾病,临床上常用的防治翼状胬肉复发的药物包括地塞米松(DXM)、干扰素 α -2b(IFN- α 2b)、丝裂霉素C(MMC)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环孢素A(CsA)和他克莫司(FK506),但鲜见关于这6种药物对复发性翼状胬肉成纤维细胞生物学行为抑制作用的比较研究。目的 观察DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA和FK506对体外培养的人复发性翼状胬肉成纤维细胞的抑制作用,筛选治疗复发性翼状胬肉的最佳药物。方法 收集2015年5月至2016年7月在天津医科大学眼科医院行复发性翼状胬肉切除术的患者术中切除的组织标本7例7眼,采用组织块培养法分离和培养成纤维细胞,采用免疫组织化学法对培养细胞进行鉴定。分别在培养液中添加DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA和FK506作用48h,未添加药物的培养细胞作为对照组。采用CCK-8法检测各种药物对培养细胞的生长抑制率,分别计算药物的半数抑制浓度(IC50)。在药物IC50剂量下作用48h,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡比例和细胞周期的变化;采用免疫组织化学法检测细胞中增生细胞核抗原(PCNA)的表达变化。结果 培养的细胞为长梭形,呈旋涡状排列,细胞中波形蛋白表达阳性,角蛋白无表达。DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA和FK506对成纤维细胞的IC50分别为 $(3.5 \times 10^3 \pm 2.83 \times 10^{-2})$ 、 $(6.1 \times 10^2 \pm 3.6 \times 10^{-3})$ 、 $(3.2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-4})$ 、 $(2.2 \times 10^1 \pm 1.2 \times 10^{-3})$ 、 $(6.3 \times 10^1 \pm 2.5 \times 10^{-3})$ 和 $(6.0 \times 10^1 \pm 0.0 \times 10^0)$ mg/L。在IC50剂量下分别作用后48h,IFN- α 2b组、CsA组、MMC组、FK506组、DXM组和5-FU组凋亡细胞比例分别为 $(35.00 \pm 3.21)\%$ 、 $(30.37 \pm 1.67)\%$ 、 $(26.11 \pm 0.75)\%$ 、 $(22.01 \pm 0.07)\%$ 、 $(20.95 \pm 1.68)\%$ 和 $(19.85 \pm 0.52)\%$,与对照组的 $(11.38 \pm 2.18)\%$ 比较细胞凋亡比例均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组 G_0/G_1 期、S期和 G_2/M 期细胞比例分别为 $(85.64 \pm 2.62)\%$ 、 $(5.29 \pm 1.56)\%$ 和 $(2.73 \pm 2.66)\%$,各药物组 G_0/G_1 期细胞比例明显下降,S期和 G_2/M 期细胞比例明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),对细胞周期阻滞效果由强到弱依次为MMC、CsA、5-FU、DXM、IFN- α 2b和FK506。对照组细胞中可见有大量PCNA阳性表达,各药物组细胞中PCNA表达强度均弱于对照组。对照组、FK506组、DXM组、5-FU组、IFN- α 2b组、CsA组和MMC组细胞中PCNA的阳性表达率分别为 $(95.00 \pm 2.00)\%$ 、 $(82.67 \pm 5.04)\%$ 、 $(80.00 \pm 2.78)\%$ 、 $(64.00 \pm 6.55)\%$ 、 $(38.00 \pm 3.00)\%$ 、 $(32.00 \pm 4.36)\%$ 和 $(29.67 \pm 3.02)\%$,总体比较差异有统计学意义($F = 25.995, P = 0.000$),各药物组细胞中PCNA阳性表达率均明显低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA和FK506均可抑制复发性翼状胬肉成纤维细胞的增生并促进细胞凋亡,其中MMC和CsA的作用更为显著。

【关键词】 翼状胬肉/手术;翼状胬肉/药物治疗;复发;成纤维细胞;地塞米松;干扰素 α ;丝裂霉素C;5-氟尿嘧啶;环孢素A;他克莫司;细胞培养

基金项目: 天津市自然科学基金青年项目(16JQJNC12300);天津医科大学眼科研究所科研临床基金项目(15YKYJS003)

A comparative study on the inhibitory effects of commonly used clinical drugs on *in vitro* fibroblasts from recurrent pterygium Sun Yajie, Lin Tingting, He Yanjin, Zhu Limin, Gao Yang, Zhou Bo

Tianjin Medical University Ophthalmological Hospital, Tianjin 300000, China

Corresponding author: He Yanjin, Email: yanjinhe88@126.com

[Abstract] **Background** Pterygium is one of the common ocular surface disorders, and the main drugs for pterygium include dexamethasone (DXM), interferon α -2b (IFN- α 2b), mitomycin C (MMC), 5-fluorouracil (5-FU), cyclosporin A (CsA) and tacrolimus (FK506). However, the efficacy of these drugs on the fibroblasts from

recurrence pterygium is unelucidated. **Objective** This study was to compare the efficacy of DXM, IFN- α 2b, MMC, 5-FU, CsA and FK506 on proliferation and apoptosis of recurrent pterygium-derived fibroblasts *in vitro*. **Methods** The specimens of recurrence pterygium were collected during surgery in Tianjin Medical University Ophthalmological Hospital from May 2015 to July 2016 under the written informed consent. Fibroblasts were isolated and cultured by explant culture method and identified by immunocytochemistry. DXM, IFN- α 2b, MMC, 5-FU, CsA and FK506 were added into the medium for 48 hours, respectively, and the cells cultured without drug were used as the control group. The inhibitory efficiency of different concentrations of DXM, IFN- α 2b, MMC, 5-FU, CsA and FK506 on the cell proliferation was assayed by cell counting kit-8 (CCK-8), and 50% inhibiting concentration (IC50) of the drugs was calculated. The cells were treated by the IC50 dose of drugs for 48 hours, and cell apoptotic proportion and cell cycle were assessed by flow cytometry analysis. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the cells after treated by drugs was detected by immunocytochemistry. **Results** Cultured cells grew well with the fusiform shape and radial arrangement. Vimentine showed the positive expression and keratin was absently expressed in the cells. The IC50 to the cells was $(3.5 \times 10^3 \pm 2.83 \times 10^{-2})$ mg/L, $(6.1 \times 10^2 \pm 3.6 \times 10^{-3})$ mg/L, $(3.2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-4})$ mg/L, $(2.2 \times 10^1 \pm 1.2 \times 10^{-3})$ mg/L, $(6.3 \times 10^1 \pm 2.5 \times 10^{-3})$ mg/L and $(6.0 \times 10^1 \pm 0.0 \times 10^0)$ mg/L in the DXM, IFN- α 2b, MMC, 5-FU, CsA and FK506, respectively. In the 48 hours after treated by the IC50 drugs, the apoptotic ratio was $(35.00 \pm 3.21)\%$, $(30.37 \pm 1.67)\%$, $(26.11 \pm 0.75)\%$, $(22.01 \pm 0.07)\%$, $(20.95 \pm 1.68)\%$ and $(19.85 \pm 0.52)\%$ in the IFN- α 2b group, CsA group, MMC group, FK506 group, DXM group and 5-FU group, which was significantly higher than $(11.38 \pm 2.18)\%$ in the control group (all at $P < 0.05$). The cell proportion of G₀/G₁ phase, S phase and G₂/M phase was $(85.64 \pm 2.62)\%$, $(5.29 \pm 1.56)\%$ and $(2.73 \pm 2.66)\%$ in the control group, and the cell proportion of G₀/G₁ phase was reduced, while that of S phase or G₂/M phase was considerably increased in various drug groups (all at $P < 0.05$), with the blocking efficiency of cell cycle was in turn MMC, CsA, 5-FU, DXM, IFN- α 2b and FK506. The expressional rate of PCNA in the cells was $(95.00 \pm 2.00)\%$, $(82.67 \pm 5.04)\%$, $(80.00 \pm 2.78)\%$, $(64.00 \pm 6.55)\%$, $(38.00 \pm 3.00)\%$, $(32.00 \pm 4.36)\%$ and $(29.67 \pm 3.02)\%$ in the control group, FK506 group, DXM group, 5-FU group, IFN- α 2b group, CsA group and MMC group, showing a significant difference among the groups ($F = 25.995, P < 0.01$), and the expressional rate of PCNA was significant lower in various drug groups than that in the control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** DXM, IFN- α 2b, MMC, 5-FU, CsA and FK506 are all able to inhibit the proliferation and promote the apoptosis of recurrent pterygium-derived fibroblasts *in vitro*, and MMC and CsA appear to have a stronger effect.

[Key words] Pterygium/surgery; Pterygium/drug therapy; Recurrence; Fibroblasts; Dexamethasone; Interferon- α ; Mitomycin C; 5-Fluorouracil; Cyclosporin A; Tacrolimus; Cells, cultured

Fund program: Tianjin Municipal Natural Science Foundation of China Youth Foundation (6JCQNJC12300); Science Research Foundation of Tianjin Medical University Ophthalmological Hospital Institute (15YKYJS003)

翼状胬肉是眼科常见的眼表疾病,其手术治疗方法包括翼状胬肉切除术联合准分子激光抛光术、翼状胬肉切除术联合自体结膜移植术、准分子激光术、翼状胬肉切除术联合自体角膜干细胞移植术,但均存在一定的复发率^[1-2],且复发后二次手术的难度加大,患者接受能力差。临床上常用的预防和治疗翼状胬肉术后复发的局部应用的药物主要有抗细胞增生药物、免疫抑制剂和糖皮质激素类药物,但是各种药物对翼状胬肉的疗效仍缺乏足够的评价依据。本研究拟对临床常用药物对人翼状胬肉成纤维细胞的抑制能力进行对比,为临床上翼状胬肉的药物选择提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU)、环孢素 A (cyclosporin, CsA)、他克莫司 (Tacrolimus, FK506)、干扰素 α -2b (interferon α -2b, IFN- α 2b)、地塞米松磷酸钠 (Dexamethasone sodium phosphate, DXM) 粉末 [Aladdin 试剂(上海)有限公司]; DMEM 培养液、青-链霉素 (美国 HyClone 公司); 体积分数 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、质量分数 0.02% EDTA (美国 Gibco 公司); 小鼠抗人增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体 (7H4F8) (武汉博士德公司); 小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体 (ZM-0260)、小鼠抗人角蛋白单克隆抗体 (ZM-0069)、生物素-链霉卵白素免疫组织化学检测试剂盒 (SP-9002)、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术

有限公司);细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)(上海碧云天生物技术有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)。酶标检测仪(瑞士 Tecan 公司);自动 CO₂ 恒温培养箱、超净工作台(美国 Thermo 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药品配制 以细胞基础培养液 DMEM-F12 为溶剂,按照药品说明书将所用药物配制成高质量浓度(DXM: 2.00×10^4 mg/L、IFN- α 2b: 1.00×10^4 mg/L、MMC: 1.6 mg/L、5-FU: 2.5×10^4 mg/L、CSA: 6.26×10^2 mg/L、FK506: 2.4×10^2 mg/L) 储存液,其中 FK506 储存液加入 50 μ l 助溶剂 DMSO,终浓度 < 0.05%,采用 2 倍或 4 倍稀释法用 DMEM-F12 培养液将各种药物稀释成 5 个浓度梯度(表 1)。

1.2.2 复发性翼状胬肉成纤维细胞的分离培养 于 2015 年 5 月至 2016 年 7 月收集在天津医科大学眼科医院行复发性翼状胬肉切除术的患者术中切除组织标本 7 例 7 眼,收集标本前患者均自愿签署标本处理知情同意书。将新鲜标本剪成 2 cm \times 2 cm 组织块,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 的恒温箱中,采用组织块培养法用含 20% FBS 和质量分数 5% 青-链霉素双抗的 DMEM-F12 培养液分离和培养翼状胬肉成纤维细胞 48 h,细胞爬出后每 3 天换液 1 次,采用酶消化法进行人工纯化。待纯化的细胞生长融合至 80% 后用质量分数 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,并以 1:3 的比例传代,改用含 10% FBS 和 5% 双抗的 DMEM-F12 培养液培养,每 2 天更换培养液 1 次,取第 3~6 代细胞以用于进一步实验。

1.2.3 免疫组织化学法检测培养的成纤维细胞中细胞标志物的表达 将细胞接种于预置盖玻片的 6 孔板中,待细胞长满盖玻片后取出,以 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,用质量分数 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 2 遍,用质量分数 0.5% Triton X-100 处理 10 min,再用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。然后按照免疫组织化学试剂盒说明操作,体积分数 3% H₂O₂ 孵育 10 min, PBS 洗涤,封闭,分别滴加鼠抗人波形蛋白一抗(1:150)和小鼠抗人角蛋白一抗(1:150),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗涤,滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG(二抗),37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 洗涤,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 洗涤,滴加 DAB 显色液显色 2 min, PBS 洗涤,苏木素染核,蒸馏水洗涤,脱水,封片。重复 3 次,细胞标志物的阳性表达为细胞质内棕

黄色、黄色或浅黄色染色的细小颗粒。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增生能力及药物的 IC₅₀

将培养的细胞以 1×10^4 /ml 的密度接种于 96 孔板,每孔加 100 μ l 培养液培养 24 h,用无血清 DMEM-F12 培养液同步化 24 h,然后分别将不同质量浓度的药物加入培养液,每孔加入 100 μ l,仅用 DMEM-F12 培养的细胞作为对照组,以不含细胞的培养液作为空白对照组,每组设 3 个复孔。在 96 孔板周边孔添加 PBS 防止液体蒸发,细胞培养后 48 h 每孔加入 10 μ l CCK-8,继续培养 4 h,用酶标仪于波长 490 nm 处测定各孔的吸光度(A_{490})值。细胞抑制率 = (对照组 A_{490} - 实验组 A_{490}) / (对照组 A_{490} - 空白组 A_{490}) \times 100%,用 SPSS 软件计算各种药物的 IC₅₀。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期时相和凋亡细胞比例 培养的成纤维细胞以 1×10^5 /ml 密度接种于 6 孔培养板,每孔 2 ml,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h,细胞培养液中分别加入终浓度为 IC₅₀ 的各种药物,同时设置仅用 DMEM-F12 培养的细胞作为阴性对照组,药物处理后 24 h 用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞,用预冷的 PBS 离心洗涤 2 次后把细胞分为 2 个部分,一部分用结合缓冲液按 1×10^5 /ml 的密度重悬细胞,加入 4 μ l Annexin V-FITC 混匀,添加 PI 4 μ l,室温避光反应 10 min 后上机检测;另一部分细胞用 PBS 按 1×10^6 密度重悬,离心半径 6 cm,取 1 ml 重悬液离心去上清,用体积分数 70% 冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,检测前 PBS 洗去固定液,加入 100 μ l RNase A 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,再加入 400 μ l PI 染色混匀,4 $^{\circ}$ C 避光放置 30 min,经 200 目筛网过滤,制备成单细胞悬液,上机检测,记录激发波长 488 nm 处的红色荧光。以细胞周期和细胞凋亡比例为判断标准。

1.2.6 免疫组织化学检测细胞中 PCNA 表达 将培养的成纤维细胞按 1×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板内的盖玻片上,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱,培养后 2 h 每孔加入培养液 2 ml,继续培养后 24 h 细胞中分别加入终浓度为 IC₅₀ 的各种药物,同时设置仅用 DMEM-F12 培养的细胞作为阴性对照组。处理后 24 h 取出盖玻片,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min,然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 2 次,用 0.5% Triton X-100 处理 10 min,再用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。然后按照免疫组织化学试剂盒说明操作,3% H₂O₂ 孵育 10 min, PBS 洗涤,封闭,滴加小鼠抗人 PCNA 单克隆抗体(1:75),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗涤,滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 洗涤,滴加辣根酶标记链霉卵白

素工作液 37 °C 孵育 20 min, PBS 洗涤, 滴加 DAB 显色液显色 2 min, PBS 洗涤, 苏木素染核, 蒸馏水洗涤, 脱水, 封片。PCNA 的阳性表达为细胞质内棕黄色、黄色或浅黄色染色的细小颗粒, 400 倍光学显微镜下计数阳性细胞数, 并计算阳性表达率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行表达。采用均衡分组单因素干预多水平分组研究设计, 对照组及 DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA、FK506 组间细胞增生抑制率、细胞凋亡率、各周期细胞阻滞率和细胞中 PCNA 阳性率的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较均采用 SNK-*q* 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态

复发性翼状胬肉成纤维细胞培养后 5 d 组织块周围有细胞爬出 (图 1A), 细胞多为长梭形和三角形。细胞培养后 13 d 组织块间细胞长满培养瓶, 可以传代, 第 3 代成纤维细胞完全纯化 (图 1B), 此时细胞为长梭形, 排列紧密, 呈旋涡状。培养的细胞波形蛋白表达阳性, 定位于细胞质, 呈与成纤维细胞长轴一致的棕黄色束状或网状结构 (图 1C); 细胞中角蛋白无表达, 细胞质呈浅紫蓝色 (图 1D)。

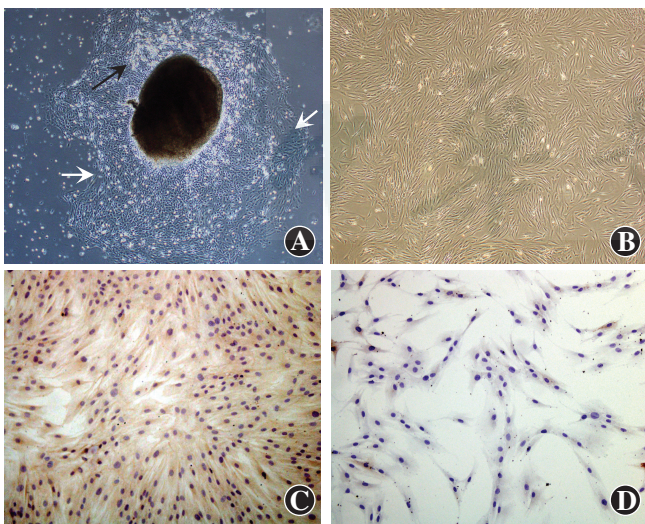


图 1 培养细胞的形态及鉴定 A: 原代培养的复发性翼状胬肉成纤维细胞呈长梭形 (白箭头), 其中夹杂上皮细胞 (黑箭头) ($\times 40$) B: 第 3 代成纤维细胞已纯化, 呈长梭形, 细胞长满后呈旋涡状 ($\times 40$) C: 培养的细胞波形蛋白表达阳性, 细胞质内呈棕黄色染色 (DAB $\times 400$) D: 培养的细胞角蛋白表达阴性 (DAB $\times 400$)

2.2 不同质量浓度药物作用后细胞增生情况

对照组细胞生长未受到抑制。DXM、IFN- α 2b、MMC、5-FU、CsA、FK506 的 IC50 分别为 ($3.5 \times 10^3 \pm 2.83 \times 10^{-2}$)、($6.1 \times 10^2 \pm 3.6 \times 10^{-3}$)、($3.2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-4}$)、($2.2 \times 10^1 \pm 1.2 \times 10^{-3}$)、($6.3 \times 10^1 \pm 2.5 \times 10^{-3}$) 和 ($6.0 \times 10^1 \pm 0.0 \times 10^0$) mg/L (表 1 ~ 6)。

表 1 不同质量浓度 DXM 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
1.00×10^4	3	79.68 ± 4.86
5.00×10^3	3	56.89 ± 1.75
2.50×10^3	3	44.15 ± 3.89
1.25×10^3	3	25.49 ± 9.49
6.25×10^2	3	25.97 ± 2.64

注: DXM: 地塞米松

表 2 不同质量浓度 IFN- α 2b 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
5.000×10^3	3	89.88 ± 1.68
2.500×10^4	3	74.51 ± 1.16
1.250×10^3	3	59.28 ± 1.60
6.250×10^2	3	43.75 ± 4.69
3.125×10^2	3	34.20 ± 7.30

注: IFN- α 2b: 干扰素 α -2b

表 3 不同质量浓度 MMC 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
1.600	3	72.90 ± 2.29
0.400	3	57.80 ± 7.64
0.200	3	55.44 ± 9.75
0.050	3	46.60 ± 9.80
0.025	3	1.06 ± 0.35

注: MMC: 丝裂霉素 C

表 4 不同质量浓度 5-FU 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
0.250×10^4	3	80.53 ± 0.71
0.125×10^4	3	75.02 ± 0.50
0.156×10^3	3	63.08 ± 1.52
0.977×10^1	3	39.63 ± 0.29
0.488×10^1	3	39.24 ± 1.09

注: 5-FU: 5-氟尿嘧啶

表 5 不同质量浓度 CsA 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
3.130×10^2	3	88.08 ± 0.02
1.560×10^2	3	89.83 ± 4.38
0.781×10^2	3	83.12 ± 0.70
0.391×10^2	3	70.54 ± 14.51
0.195×10^2	3	38.54 ± 11.66

注: CsA: 环孢素 A

表 6 不同质量浓度 FK506 对培养细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

药物质量浓度 (mg/L)	样本量	抑制率
1.200×10^2	3	77.12 ± 0.62
0.600×10^2	3	55.18 ± 1.81
0.300×10^2	3	28.21 ± 0.06
0.150×10^2	3	7.30 ± 2.03
0.075×10^2	3	0.08 ± 0.01

注: FK506: 他克莫司

2.3 不同药物在 IC50 剂量作用后细胞的凋亡和细胞周期变化

不同药物在 IC50 剂量下作用 48 h 细胞凋亡比例由大到小依次为 IFN- α 2b、CsA、MMC、FK506、DXM、5-FU, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 63.734, P < 0.01$); 与对照组比较, 各种药物作用后细胞凋亡率均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), FK506、DXM、5-FU 作用后细胞凋亡率差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 7, 图 2)。

表 7 不同药物在 IC50 剂量作用下 48 h 细胞凋亡比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	凋亡细胞比例
对照组	3	11.38±2.18
CsA 组	3	30.37±1.67 ^a
IFN-α2b 组	3	35.00±3.21 ^{ab}
MMC 组	3	26.11±0.75 ^{abc}
FK506 组	3	22.01±0.07 ^{abcd}
DXM 组	3	20.95±1.68 ^{abcd}
5-FU 组	3	19.85±0.52 ^{abcd}
F 值		63.734
P 值		0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 CsA 组比较,^b $P < 0.05$;与 IFN-α2b 组比较,^c $P < 0.05$;与 MMC 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验) IC50:药物半数抑制浓度;CsA:环孢素 A;IFN:干扰素;MMC:丝裂霉素 C;FK506:他克莫司;DXM:地塞米松;FU:氟尿嘧啶

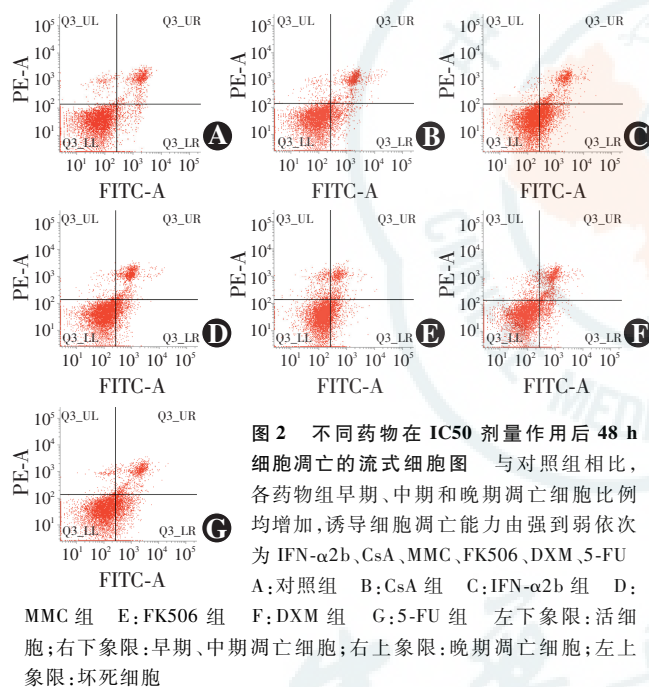


图 2 不同药物在 IC50 剂量作用下 48 h 细胞凋亡的流式细胞图 与对照组相比,各药物组早期、中期和晚期凋亡细胞比例均增加,诱导细胞凋亡能力由强到弱依次为 IFN-α2b、CsA、MMC、FK506、DXM、5-FU A:对照组 B:CsA 组 C:IFN-α2b 组 D:MMC 组 E:FK506 组 F:DXM 组 G:5-FU 组 左下象限:活细胞;右下象限:早期、中期凋亡细胞;右上象限:晚期凋亡细胞;左上象限:坏死细胞

流式细胞仪检测显示,药物作用于培养细胞后 48 h 细胞周期发生明显变化,与对照组相比各种药物组 G₀/G₁ 期细胞比例均不同程度降低,S 期和 G₂/M 期细胞比例均不同程度升高,细胞周期阻滞在 S 期和 G₂/M 期。不同药物对细胞周期的阻滞能力由强到弱依次为 MMC、CsA、5-FU、DXM、IFN-α2b、FK506,而对照组 G₀/G₁ 期细胞比例 > 80%,各组间 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期的细胞比较总体差异均有统计学意义 ($F = 93.811, 59.268, 34.243$, 均 $P < 0.01$) (表 8, 图 3)。

2.4 不同药物在 IC50 剂量作用下培养细胞中 PCNA 的表达及定位

对照组细胞中可见有大量 PCNA 阳性表达,为细

胞核的棕黄色染色和细胞质中出现细小棕黄色颗粒,各药物组细胞中 PCNA 表达强度均弱于对照组 (图 4)。

表 8 不同药物在 IC50 剂量作用下 48 h 各细胞周期的细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	3	85.64±2.62	5.29±1.56	2.73±2.66
CsA 组	3	71.49±1.30 ^a	24.10±4.21 ^a	20.67±2.41 ^a
IFN-α2b 组	3	80.04±1.75 ^{ab}	9.65±2.55 ^{ab}	2.92±3.85 ^b
5-FU 组	3	71.59±2.41 ^{ac}	12.46±2.92 ^{abc}	11.29±4.12 ^{abc}
MMC 组	3	47.96±0.78 ^{abcd}	26.21±1.74 ^{abcd}	21.53±3.91 ^{abcd}
FK506 组	3	80.54±2.73 ^{abde}	10.05±1.23 ^{abde}	2.92±0.73 ^{bde}
DXM 组	3	75.77±1.45 ^{abcef}	11.30±0.65 ^{abce}	5.89±2.18 ^{abdef}
F 值		93.811	59.268	34.243
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与各自的对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的 CsA 组比较,^b $P < 0.05$;与各自 IFN-α2b 组比较,^c $P < 0.05$;与各自 5-FU 组比较,^d $P < 0.05$;与各自 MMC 组比较,^e $P < 0.05$;与各自 FK506 组比较,^f $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验) IC50:药物半数抑制浓度;CsA:环孢素 A;IFN:干扰素;FU:氟尿嘧啶;MMC:丝裂霉素 C;FK506:他克莫司;DXM:地塞米松

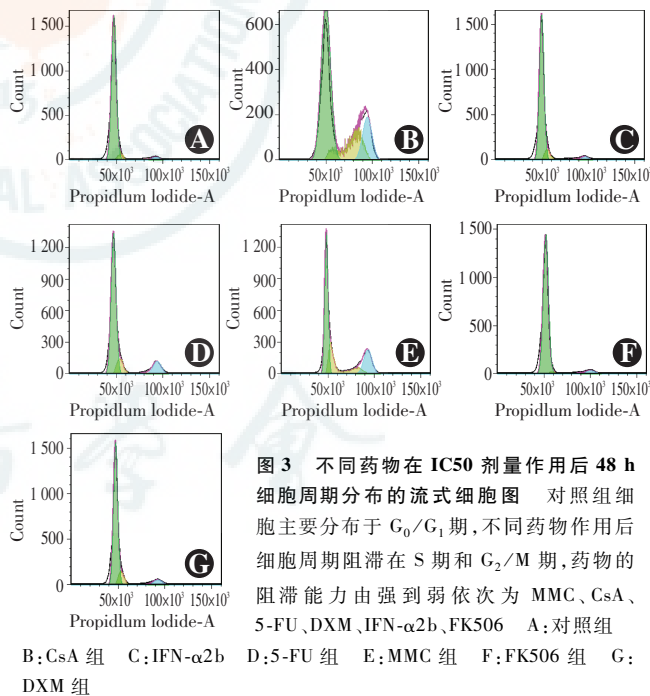


图 3 不同药物在 IC50 剂量作用下 48 h 细胞周期分布的流式细胞图 对照组细胞主要分布于 G₀/G₁ 期,不同药物作用下细胞周期阻滞在 S 期和 G₂/M 期,药物的阻滞能力由强到弱依次为 MMC、CsA、5-FU、DXM、IFN-α2b、FK506 A:对照组 B:CsA 组 C:IFN-α2b 组 D:5-FU 组 E:MMC 组 F:FK506 组 G:DXM 组

与对照组比较,各种药物培养的细胞中 PCNA 表达阳性率均明显下降,各组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 25.995, P < 0.01$),各药物组细胞中 PCNA 阳性表达率均明显低于对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),不同药物组细胞中 PCNA 阳性表达率由高到低依次为 FK506、DXM、5-FU、IFN-α2b、CsA 和 MMC (表 9)。

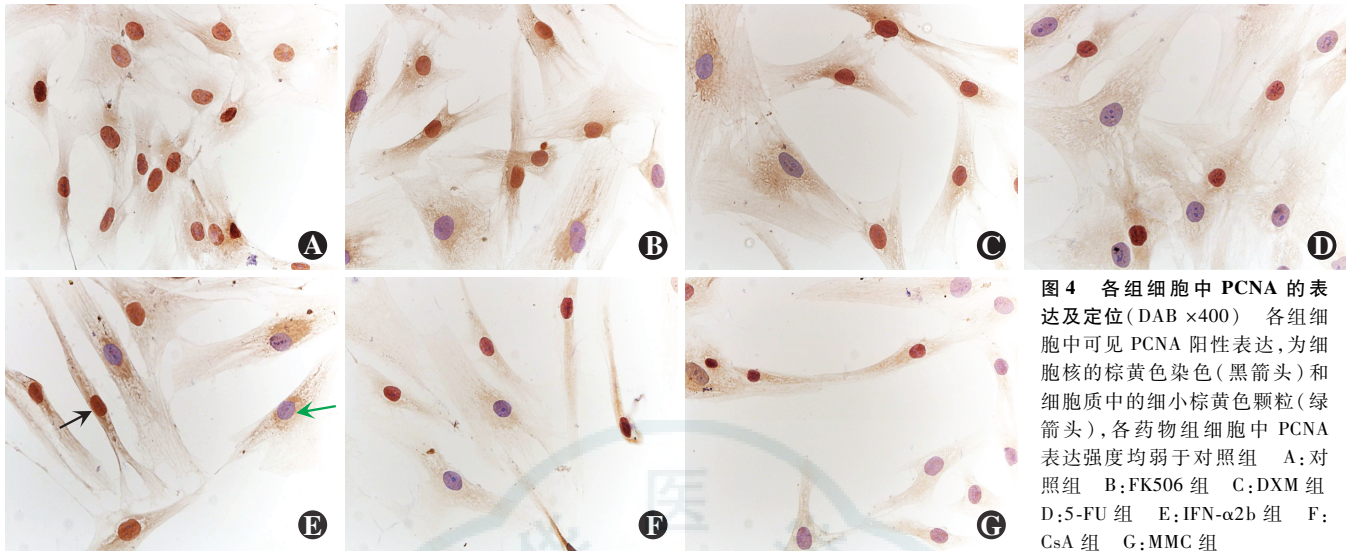


图 4 各组细胞中 PCNA 的表达及定位 (DAB ×400) 各组细胞中可见 PCNA 阳性表达,为细胞核的棕黄色染色(黑箭头)和细胞质中的细小棕黄色颗粒(绿箭头),各药物组细胞中 PCNA 表达强度均弱于对照组 A;对照组 B:FK506 组 C:DXM 组 D:5-FU 组 E:IFN-α2b 组 F:CsA 组 G:MMC 组

表 9 不同药物在 IC50 剂量作用后 48 h 细胞中 PCNA 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	PCNA 表达阳性率
对照组	3	95.00±2.00
CsA 组	3	32.00±4.36 ^a
IFN-α2b 组	3	38.00±3.00 ^a
5-FU 组	3	64.00±6.55 ^{abc}
MMC 组	3	29.67±3.02 ^{ad}
FK506 组	3	82.67±5.04 ^{abede}
DXM 组	3	80.00±2.78 ^{abede}
F 值		25.995
P 值		0.000

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 CsA 组比较,^b $P < 0.05$;与 IFN-α2b 组比较,^c $P < 0.05$;与 5-FU 组比较,^d $P < 0.05$;与 MMC 组比较,^e $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK- q 检验) IC50:药物半数抑制浓度;CsA:环孢素 A;IFN-α2b:干扰素 α-2b;5-FU:5-氟尿嘧啶;MMC:丝裂霉素 C;FK506:他克莫司;DXM:地塞米松

3 讨论

翼状胬肉是眼科常见疾病,不同的手术方法均存在一定的复发率,其病理改变主要为鳞状上皮、成纤维细胞和毛细血管的增生以及炎性细胞浸润^[3],在复发性翼状胬肉的基质层中,成纤维细胞增生尤其活跃,成纤维细胞表现出一定的侵袭性,并具有某种转化细胞特性,推测翼状胬肉的复发与具有转化性的成纤维细胞的残留有关^[4]。因此翼状胬肉的研究多聚焦于成纤维细胞的生物学行为及其对药物的反应,寻找治疗及预防翼状胬肉复发的高效低毒的药物。

近年来临床上比较常用的预防翼状胬肉复发的药物有 CsA、IFN-α2b、5-FU、MMC、FK506 和 DXM。MMC 是一种抗代谢药物,能够使细胞的 DNA 解聚,并与 DNA 链形成交联,以阻碍 DNA 的复制,对 RNA 也有抑制作用,眼科广泛用于预防翼状胬肉复发、抗青光眼

术后滤过泡瘢痕化等^[5]。5-FU 是一种抗代谢药物,可干扰 DNA、RNA 及蛋白质的合成,抑制组织生长,对翼状胬肉的治疗有一定疗效^[6-7]。CsA 是免疫抑制剂,既可抑制细胞介质反应,又可抑制 T 淋巴细胞依赖的抗体生成及包括白细胞介素(interleukin, IL)-2 等的淋巴因子的生成与释放,翼状胬肉的发病机制与多种炎症介质有关,所以其对胬肉的增生有一定的抑制作用^[8]。FK506 是一种强力新型免疫抑制剂,主要通过抑制 IL-2 的释放,抑制 T 淋巴细胞功能,对翼状胬肉有一定抑制作用^[9]。IFN-α2b 是一种免疫调节剂,可抑制新生血管和成纤维细胞的增生,从而抑制翼状胬肉的生长^[10-11]。此外研究表明,病毒感染(单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒)可能也是翼状胬肉的发病原因之一^[12],而 IFN 对病毒的繁殖有明显的抑制作用。DXM 为免疫调节剂,具有抗炎、抗新生血管作用,并可抑制成纤维细胞增生和新生血管形成。上述各种药物的效果和不良反应不尽相同,通过比较寻找出疗效显著而不良反应较小的药物是本研究的目的。

本研究显示,上述药物在 IC50 剂量作用于培养的成纤维细胞后 48 h 均可促进细胞凋亡,但其作用由强到弱依次为 IFN-α2b、CsA、MMC、FK506、DXM、5-FU,其中 FK506、DXM、5-FU 的促凋亡效果接近。本研究还表明,各种药物作用后培养的成纤维细胞的细胞周期阻滞于 S 期和 G₂/M 期,使细胞复制过程受到抑制,不同药物对细胞周期的阻滞效果由强到弱依次为 MMC、CsA、5-FU、DXM、IFN-α2b、FK506,其中 MMC、CsA、5-FU 和 DXM 对于 S 期和 G₂/M 期均有阻滞作用,且对每个周期的阻滞效果较为接近,推测这些药物可能是通过阻滞细胞周期而抑制细胞增生的;此外 IFN-α2b 和 FK506 对细胞 G₂/M 期的阻滞作用与对照

组相比差异无统计学意义,但 2 种药物对细胞 S 期的阻滞作用强于对照组,说明 IFN- α 2b、FK506 可能通过对细胞 S 期的阻滞来发挥抑制细胞增生的作用。

PCNA 在细胞核内合成,为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白。细胞核内存在可溶性与不溶性 2 种 PCNA,前者在细胞周期各期中均有表达,在 DNA 合成过程中其含量无明显变化,易被去污剂提取、甲醇破坏;不溶性 PCNA 较稳定,不易破坏,在 $G_0 \sim G_1$ 期细胞中无明显表达,而在 G_1 晚期细胞中表达量增加,在 S 期细胞中表达量最高,在 $G_2 \sim M$ 期细胞中表达量明显下降,其变化趋势与 DNA 合成过程一致,其在细胞中的表达变化可作为评价细胞增生状态的一个指标。本研究中发现,药物作用后 PCNA 表达量均有不同程度下降,药物的抑制作用由强到弱依次为 MMC、CsA、IFN- α 2b、5-FU、DXM 和 FK506,其中 CsA、IFN- α 2b、MMC 或 DXM 与 FK506 药物作用接近,MMC、CsA、5-FU、DXM、FK506 阻滞细胞周期的强度与 PCNA 表达量结果相互支持,而 IFN- α 2b 作用后细胞 PCNA 表达量相对较低,与细胞周期阻滞情况有一定差异。有研究表明,翼状胬肉细胞中 PCNA 的表达量与细胞的凋亡有关,细胞凋亡受到抑制时显示高增生状态,PCNA 表达量相对较高,反之降低^[13]。所以推测虽然 IFN- α 2b 对细胞周期阻滞效果不佳,但是其诱导细胞凋亡的能力很强,因此可降低细胞增生能力。

本研究中的 6 种药物对复发性翼状胬肉成纤维细胞均有抑制作用,临床上应用于翼状胬肉术后的药物浓度各不相同,MMC 为 $2 \times 10^2 \sim 4 \times 10^2$ mg/L,通常用于翼状胬肉切除术中局部敷贴,如果行结膜下注射质量浓度应为 10 mg/L,但这些剂量均会引起结膜切口愈合延迟、角膜上皮损伤等,本次研究测得 MMC 对翼状胬肉成纤维细胞的 IC50 为 3.2×10^1 mg/L,比临床上的最低治疗剂量低 97%。临床上常用的 CsA 剂量为 5×10^2 mg/L,翼状胬肉术后局部点眼可明显降低翼状胬肉的复发率^[14]。本研究中测得 CsA 的 IC50 为 6.3×10^1 mg/L,比临床上常用剂量低 87%。临床上局部贴敷 5-FU 抑制翼状胬肉复发的常用剂量为 2.5×10^3 mg/L^[15]。5-FU 可抑制翼状胬肉的复发,但易致伤口愈合延迟、角膜上皮损伤、睑球粘连等,本次研究测得其 IC50 为 6.1×10^2 mg/L,比临床用药剂量约低 80%。临床上治疗翼状胬肉所用 DXM 剂量为 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ mg/L,用于翼状胬肉头颈部注射,有效率达 50%^[16],并且未见明显的并发症,本研究测得其 IC50 为 3.5×10^3 mg/L,在临床应用的质量浓度范围内。临床上 IFN- α 2b 用于术前防治翼状胬肉复发的药物剂量

为 5×10^3 mg/L,疗效较好,仅出现异物感、点状角膜炎等较轻的不良反应,本次研究测得其 IC50 为 6.1×10^2 mg/L,较临床常用剂量低 87%。FK506 目前很少有研究者用于治疗翼状胬肉,用于治疗春季卡他性结膜炎及眼睑湿疹的剂量为 3×10^2 mg/L,未见明显不良反应^[17],本次研究测得其 IC50 为 6.0×10^1 mg/L,约比临床应用剂量低 83%。总之,本研究中测得 6 种药物的 IC50 普遍低于临床应用剂量,可能与检测 IC50 的细胞学实验中药物持续作用于细胞不同于局部点眼用药有关,后者持续作用时间短,存在药物流失以及药物透过组织吸收的问题,其中 MMC 的临床应用不良反应较严重,其临床所用剂量高于 IC50 31 倍,因此建议适当降低临床应用剂量。MMC 和 CsA 对于促进细胞凋亡和抑制细胞增生作用最为显著,综合比较 2 种药物效果无明显差异。目前临床上常将 MMC 用于翼状胬肉术后,虽然效果显著,但易引起结膜切口愈合延迟、角膜水肿、结膜充血、角巩膜溃疡和巩膜穿孔等^[18]。CsA 是一种新型强效免疫抑制剂,除有抑制细胞生长效应外还具有抗增生作用,适当剂量下能有效地抑制血管内皮细胞、成纤维细胞、表皮角质细胞、结膜成纤维细胞、晶状体上皮细胞的增生^[19-20]。CsA 是亲脂性化合物,能迅速透过角膜上皮,但眼内通透性差^[14,21],房水中药物浓度很低,所以不易引起角膜内皮毒性。李勇等^[14]报道,翼状胬肉术后应用 CsA 和 MMC 抑制翼状胬肉复发的效果相近,而 CsA 滴眼液的不良反较轻,仅有烧灼感、刺痛感和球结膜轻度充血等,对于复发性翼状胬肉具有良好的治疗和预防作用。

总之,本研究发现 6 种临床常用的局部防治复发性翼状胬肉的药物中 MMC 和 CsA 效果接近且较好,但是临床现应用的 MMC 不良反应明显,而 CsA 安全性好,故推荐 CsA 作为防治翼状胬肉复发的药物。此外,适当降低 MMC 剂量也是防治翼状胬肉复发的较好选择。

参考文献

- [1] 刘祖国,王华. 努力提高我国翼状胬肉的手术水平[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(10): 865-867.
Liu ZG, Wang H. To improve the surgical level in pterygium[J]. Chin J Ophthalmol, 2007, 43(10): 865-867.
- [2] Mutlu FM, Sobaci G, Tatar T, et al. A comparative study of recurrent pterygium surgery: limbal conjunctival autograft transplantation versus mitomycin C with conjunctival flap[J]. Ophthalmology, 1999, 106(4): 817-821.
- [3] Amer R, Rabinowich L, Maftsir G, et al. Mycophenolic acid suppresses human pterygium and normal tenon fibroblast proliferation *in vitro*[J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94(10): 1373-1377. DOI: 10.1136/bjo.2009.177857.
- [4] Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic basis for the

- pathogenesis of pterygium[J]. Am J Ophthalmol, 1984, 98(2): 225-228.
- [5] Akura J, Kaneda S, Matsuura K, et al. Measures for preventing recurrence after pterygium surgery[J]. Cornea, 2001, 20(7): 703-707.
- [6] 徐海龙, 李勇. 5-FU 联合自体角膜缘干细胞移植治疗复发性翼状胬肉[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(2): 380-381. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.51.
- Xu HL, Li Y. 5-FU combined with limbal stem cell autograft transplantation for recurrent pterygium[J]. Int Eye Sci, 2013, 13(2): 380-381. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.51.
- [7] Viveiros MM, Schellini SA, Candeias J, et al. Exposure of normal Tenon's capsule fibroblasts from pterygium to 5-fluorouracil and mitomycin C[J]. Arq Bras Oftalmol, 2007, 70(1): 73-77. DOI: 10.1590/S0004-27492007000100014
- [8] Hercules LA, Viveiros MM, Schellini SA, et al. Exposure of Tenon's capsule fibroblasts of pterygium to cyclosporin 0.05% [J]. Arq Bras Oftalmol, 2006, 69(6): 831-835.
- [9] Carvalho CS, Viveiros MM, Schellini SA, et al. Fibroblasts from recurrent pterygium and normal Tenon's capsule exposed to tacrolimus (FK-506) [J]. Arq Bras Oftalmol, 2007, 70(2): 235-238. DOI: 10.1590/S0004-27492007000200010.
- [10] 吕明, 张晓农. 重组人干扰素 $\alpha 1b$ 滴眼液对体外培养翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响[J]. 临床眼科杂志, 2002, 10(6): 506-509.
- Lyu M, Zhang XR. The effect of recombinant interferon $\alpha 1b$ ophthalmic solution on cultured pterygium fibroblasts's proliferation [J]. J Clin Ophthalmol, 2002, 10(6): 506-509.
- [11] Duncan MR, Berman B. Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation [J]. J Exp Med, 1985, 162(2): 516-527.
- [12] Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium[J]. Cornea, 2001, 20(2): 164-167. DOI: 10.1097/00003226-200103000-00010
- [13] 胡乃民, 李海, 巫宇舟, 等. PCNA 及凋亡相关基因蛋白在翼状胬肉中的表达及临床意义[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(19): 2690-2692.
- Hu NM, Li H, Wu YZ, et al. Expression and clinical significance of proliferating cell nuclear antigen and apoptosis gene associated protein in pterygium[J]. J Prac Med Tech, 2005, 12(19): 2690-2692.
- [14] 李勇, 岳章显, 刘钊臣, 等. 翼状胬肉术后应用环孢素 A 和 MMC 的临床对比研究[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(1): 179-180. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.57.
- Li Y, Yue ZX, Liu ZC, et al. Clinical comparison of CsA and MMC in postoperative application to pterygium [J]. Int Eye Sci, 2013, 13(1): 179-180. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.57.
- [15] 徐海龙, 李勇. 5-FU 联合自体角膜缘干细胞移植治疗复发性翼状胬肉[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(2): 380-381. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.51.
- Xu HL, Li Y. 5-FU combined with limbal stem cell autograft transplantation for recurrent pterygium [J]. Int Eye Sci, 2013, 13(2): 380-381. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.51.
- [16] 贺玮, 孙长青, 于建国, 等. 妥布霉素地塞米松-聚乙烯醇滴眼液联合预防翼状胬肉术后复发的疗效观察[J]. 安徽医药, 2016, 20(2): 380-382. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2016.02.052.
- [17] Attas-Fox L, Barkana Y, Iskhakov V, et al. Topical tacrolimus 0.03% ointment for intractable allergic conjunctivitis: an open-label pilot study [J]. Curr Eye Res, 2008, 33(7): 545-549. DOI: 10.1080/02713680802149115.
- [18] 赵方. 低浓度丝裂霉素治疗翼状胬肉的随机、对照研究[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(11): 2178-2181.
- Zhao F. Efficacy and safety of low-dose mitomycin-C in the treatment of pterygium [J]. Int J Ophthalmol, 2008, 8(11): 2178-2181.
- [19] 潘建兵, 冯一帆. 环孢素 A 在防止翼状胬肉术后复发中作用的 meta 分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 32(11): 1069-1073. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.11.016.
- Pan JB, Feng YF. Meta analysis of the topical administration of cyclosporine A in the prevention of pterygium recurrence [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 32(11): 1069-1073. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.11.016.
- [20] 马可, 吕仲平, 廖晋英, 等. 0.05% 环孢素 A 滴眼液治疗干眼的有效性和安全性临床评价[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(7): 655-659. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.018.
- Ma K, Lyu ZP, Liao JY, et al. Efficacy and safety of 0.05% cyclosporine A ophthalmic emulsion in treatment of dry eye [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(7): 655-659. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.018.
- [21] Turaçlı E, Gündüz K, Aktan G, et al. A comparative clinical trial of mitomycin C and cyclosporin A in trabeculectomy [J]. Eur J Ophthalmol, 1996, 6(4): 398-401.

(收稿日期: 2016-12-25)

(本文编辑: 尹卫靖)

消息

2017 眼科诊疗技术新进展高峰论坛 暨眼科诊疗规范及新进展高级研讨会将在郑州召开

近年来随着医学基础研究、临床研究和医学工程技术的不断发展,眼科诊疗技术的更新和进步日新月异,为了更好地传播眼科疾病诊疗的新技术,进一步规范眼科临床的诊疗流程,推进眼科诊疗新技术的普及和临床应用,加强眼科医师对各个亚专业专业知识的学习和培训,促进眼科临床诊疗水平的提高,《中华实验眼科杂志》、河南省立眼科医院、河南省眼科研究所主办,中国医药教育协会继续医学教育部协办,兰康医药信息咨询(北京)有限公司承办“2017 眼科诊疗技术新进展高峰论坛暨眼科诊疗规范及新进展高级研讨会”,将于 2017 年 8 月 4—6 日在河南省人民医院科教大厦四层报告厅召开,将有 20 余位各亚专业著名眼科专家莅临做专题报告,传授当前眼科治疗的新概念、新技术和新进展,展示手术视频操作技巧,并围绕眼科临床的热点问题、前沿问题进行讲解和讨论,为一线临床医生答疑解惑。注册本次会议的参会代表可获得国家级继续医学教育 I 类学分,欢迎国内从事眼科临床和相关专业的临床工作者及科研工作者积极参会。

联系人:刘益嘉(13439989795)、刘驰(0371-65580904)