

## · 实验研究 ·

## 雷帕霉素对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞增生、移行和纤维化的抑制作用

吴迪 孙晓楠 杜林 张晓宇 柳姗姗 孙晶 许林 张绍丹

110031 沈阳市第四人民医院眼科 沈阳市眼病中心重点实验室 (吴迪、孙晓楠、杜林、张晓宇、柳姗姗、孙晶、许林); 325027 温州医科大学附属眼视光医院 温州医科大学青光眼研究所 (张绍丹)

通信作者:张绍丹, Email: shaodan\_zhang\_wmu@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.002

**【摘要】目的** 观察哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)通路抑制剂雷帕霉素对人翼状胬肉成纤维细胞增生和移行的抑制作用。**方法** 收集 2015 年 5—7 月沈阳市第四人民医院初发翼状胬肉患者术中切除的胬肉组织,利用组织块贴壁法原代培养翼状胬肉组织成纤维细胞(PFBs),波形蛋白免疫荧光法进行细胞鉴定,取第 3~5 代细胞进行后续实验。利用甲基偶氮四唑(MTT)法检测不同摩尔浓度雷帕霉素处理条件下的细胞活力。将细胞分为正常对照组和雷帕霉素组,划痕试验观察各组细胞的迁移情况,实时定量 PCR 法检测各组细胞培养 24 h MKI67、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、fibronectin、caspase3、mTOR 及 LC3B mRNA 表达情况。

**结果** 体外培养的 PFBs 为长梭形,波形蛋白表达阳性。MTT 检测显示,雷帕霉素处理的 PFBs 细胞活力呈剂量依赖性。30  $\mu$ mol/L 雷帕霉素组细胞活力为 0  $\mu$ mol/L 雷帕霉素组的(76.67 $\pm$ 8.84)%,差异有统计学意义( $P<0.001$ ),30  $\mu$ mol/L 被选择为后续实验工作浓度。划痕后 48 h,正常对照组细胞相对划痕宽度为(2.45 $\pm$ 0.76)%,明显低于雷帕霉素组的(35.40 $\pm$ 11.62)%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。实时荧光定量 PCR 结果显示,雷帕霉素组细胞增生标志物 MKI67、细胞成肌纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 和细胞骨架蛋白 fibronectin、mTOR mRNA 相对表达量均明显低于正常对照组,自噬标志物 LC3B mRNA 相对表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。2 个组凋亡相关基因 caspase3 mRNA 的相对表达量比较,差异无统计学意义( $P=0.861$ )。**结论** 雷帕霉素可能通过阻断 mTOR 通路抑制翼状胬肉成纤维细胞的增生、移行和纤维化,其具体作用机制仍有待进一步研究。雷帕霉素可能成为预防翼状胬肉进展及术后复发的有效药物。

**【关键词】** 翼状胬肉; 成纤维细胞; 雷帕霉素; 抗纤维化**基金项目:** 辽宁省自然科学基金项目(2015020560); 沈阳市眼病中心重点实验室项目(F15-160-1-00); 沈阳市卫健委科研项目计划(2015-2018)**Inhibitory effect of rapamycin on proliferation, migration and fibrosis of human pterygium fibroblasts *in vitro***

Wu Di, Sun Xiaonan, Du Lin, Zhang Xiaoyu, Liu Shanshan, Sun Jing, Xu Lin, Zhang Shaodan

Department of Ophthalmology, The Fourth People's Hospital of Shenyang, Key Lab of Ophthalmology of Shenyang, Shenyang 110031, China (Wu D, Sun XN, Du L, Zhang XY, Liu SS, Sun J, Xu L); The Eye Hospital, School of Ophthalmology &amp; Optometry, Wenzhou Medical University, Glaucoma Institute of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China (Zhang SD)

Corresponding author: Zhang Shaodan, Email: shaodan\_zhang\_wmu@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the inhibitory effect of rapamycin, a mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway inhibitor, on the proliferation, migration and fibrosis of human pterygium fibroblasts (PFBs).**Methods** Pterygium tissues were collected from patients with primary pterygium who underwent surgical excision in Shenyang Fourth People's Hospital from May to July 2015. The tissues were cultured *in vitro* and the PFBs were identified by anti-human vimentin immunofluorescence assay. The 3 to 5 generation cells were used for the experiments. The viability of cells treated with different concentrations of rapamycin was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The cells were divided into normal control group and rapamycin group, and the scratch wound healing test was used to evaluate migration of the PFBs. The expressions of MKI67,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), fibronectin, caspase3, mammalian target of rapamycin (mTOR) and LC3B mRNA were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The cultured cells showed morphology of long spindle and were vimentin

immunopositive. The cell viability in rapamycin treated PFBs demonstrated a dose-dependent decrease. At 24 hours after culture, The cell viability in 30  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group was (76.67 $\pm$ 8.84)% of that in 0  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group ( $P<0.001$ ). The relative residual scratch width in 30  $\mu\text{mol/L}$  rapamycin group was (35.40 $\pm$ 11.62)% 48 hours after scratch, which was significantly greater than (2.45 $\pm$ 0.76)% in the normal control group ( $P<0.05$ ). Real-time quantitative PCR showed that the mRNA expressions of MKI67,  $\alpha$ -SMA, fibronectin and mTOR in rapamycin group were significantly decreased when compared with those in normal control group (all at  $P<0.05$ ). The expression of LC3B mRNA in rapamycin group was significantly higher than that in normal control group ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of caspase3 was not significantly different between the two groups ( $P=0.861$ ). **Conclusions** Rapamycin can effectively inhibit the proliferation, migration and fibrosis of PFBs without affecting the cell survival. Detailed mechanism remains to be further studied. Rapamycin may serve as an anti-fibrosis agent to prevent the progression and recurrence of pterygium in the future.

[Key words] Pterygium; Fibroblasts; Rapamycin; Anti-fibrosis

**Fund program:** Natural Science Foundation of Liaoning Province (2015020560); Shenyang Key Lab Construction Program (F15-160-1-00); Scientific Research Project of Shenyang Municipal Health and Family Planning Commission (2015-2018)

翼状胬肉是中国常见的眼表疾病,不仅能够引起患者的眼表不适及影响外观,还可因角膜散光和翼状胬肉遮挡瞳孔而引起视力下降。翼状胬肉的确切病因还不清楚,目前尚无有效的治疗药物,其主要治疗方法为手术切除。单纯翼状胬肉切除术后复发率可达 24%~89%<sup>[1-4]</sup>,联合羊膜移植或自体结膜瓣移植等方法大大提高了手术成功率,但仍存在 0.57%~27.27%的复发率<sup>[5-8]</sup>。翼状胬肉成纤维细胞的增生、新生血管生成和炎症反应是翼状胬肉进展和术后复发的主要原因。目前临床中常在术中使用丝裂霉素来降低术后的复发,但由于丝裂霉素毒性作用和非特异性作用机制,可能导致结膜切口不愈合、巩膜融解、角膜上皮及内皮损伤等不良反应<sup>[9]</sup>。寻找更加安全、有效的抗增生和抗纤维化药物是翼状胬肉治疗中亟待解决的问题。哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝氨酸/酪氨酸激酶,在调控细胞代谢、增生、存活以及老化方面起重要作用。最近的研究表明, mTOR 通路在肺脏、皮肤、肝脏、肾脏等组织的纤维化中起重要调控作用,抑制 mTOR 通路可以有效缓解上述组织的成纤维细胞增生与纤维化<sup>[10-13]</sup>。本研究拟观察 mTOR 通路抑制剂雷帕霉素对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞( pterygium fibroblasts, PFBs)增生和移行的影响,为翼状胬肉的治疗及减少术后的复发提供新的药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织取材** 翼状胬肉组织标本来自 2015 年 5—7 月于沈阳市第四人民医院眼科行手术切除的 7 例初发翼状胬肉患者,其中男 3 例,女 4 例;平均年龄

(59 $\pm$ 12)岁。本研究方案由沈阳市第四人民医院伦理委员会批准(批文号:SYSY2015003),所有手术患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);兔抗人波形蛋白(vimentin)多克隆抗体(北京博奥森公司);Alexa Fluor 488 标记抗兔 IgG(美国 Invitrogen 公司);DAPI、甲基偶氮四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);防淬灭封片剂(北京普利莱公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、雷帕霉素(美国 Sigma 公司);逆转录试剂盒、RT-PCR 检测试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);超净工作台(苏州净化设备公司);CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国 Thermo 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织块培养法体外培养 PFBs** 术中切除的翼状胬肉组织,用质量分数 0.9% 生理盐水冲洗 3 次,切成 0.5~1.0 mm<sup>2</sup> 的小块,平铺于 6 孔板内,每孔加入 3 ml 含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和 100 g/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养基,每 2 天换液 1 次,取 3~5 代对数生长期细胞用于本实验。

**1.2.2 免疫荧光法鉴定 PFBs** 细胞以 3 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔的密度接种于底部铺有圆形盖玻片的 24 孔板培养 24 h,吸去培养基, PBS 浸洗 3 次,用预冷的质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 浸洗 3 次,加入含体积分数 0.1% Triton X-100 的 PBS(PBST)配制的质量分数 5% BSA 室温封闭 1 h,弃去上清,加入兔抗人 vimentin 多克隆抗体(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;第 2 天以 PBST 浸

洗爬片 3 次,加入 Alexa Fluor 488 标记抗兔 IgG (1:1 000),室温避光条件下孵育 1 h, PBST 洗 2 次, DAPI 染 5 min, PBS 洗片后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察并采集图像。

**1.2.3 MTT 法检测不同摩尔浓度雷帕霉素处理组 PFBs 的细胞活力** 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板,细胞达 70% 融合时分别给予 0、10、30、50 及 100  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素处理 24 h, 每组设 6 个复孔。于每孔上清液加入 20  $\mu\text{l}$  MTT (终质量浓度为 0.5 g/L), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱内继续培养 4 h, 弃去孔内原有培养液, 每孔加入二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 150  $\mu\text{l}$ , 振荡 10 min, 摇匀后使用酶标仪读取 490 nm 波长处各孔吸光度 (A) 值, 计算不同摩尔浓度雷帕霉素处理组 PFBs 的细胞活力, 细胞活力 = 各雷帕霉素处理组 A 值 / 0  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素处理组 A 值  $\times 100\%$ 。

**1.2.4 划痕实验检测 PFBs 相对迁移距离** 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于 24 孔板, 细胞达 70% 融合时用无菌 200  $\mu\text{l}$  枪头垂直在单层细胞的表面划出一条无细胞的刮除带, 确保划痕宽度相同, PBS 漂洗脱落细胞及碎片。将细胞分为正常对照组和雷帕霉素组, 其中雷帕霉素组更换为含 10% 胎牛血清和 30  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素的 DMEM 培养基继续培养; 正常对照组用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。每组设 3 个复孔。分别于处理后的 6、12、24 和 48 h 在倒置相差显微镜下照相, 计算每个时间点上各组存留的划痕宽度与各自原始划痕宽度的比值。

**1.2.5 荧光定量 PCR 法检测细胞各基因的表达** 细胞以  $3 \times 10^6$ /孔的密度接种于 6 孔板, 分为正常对照组和雷帕霉素组, 其中雷帕霉素组加入 30  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素处理细胞; 于加药后 24 h 利用胰蛋白酶消化法收集各组细胞, 加入 150  $\mu\text{l}$  Trizol 提取总 RNA。每组设 4 个复孔。按照逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成, 反应体系: 5 倍 iScript 反应混合物 4  $\mu\text{l}$ , iScript 逆转录酶 1  $\mu\text{l}$ , RNA 15  $\mu\text{l}$ 。MKI67、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、fibronectin、caspase3、mTOR、S6K 和 LC3B 基因引物序列 (上海生工工程有限公司合成) 如表 1 所示。按照 RT-PCR 检测试剂盒说明书建立 20.0  $\mu\text{l}$  实时荧光定量 PCR 反应体系: cDNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , 2 倍 SYBR Green supermix 10.0  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{l}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min, 共进行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行定量分析, 计算药物处理后各目的基因相对表达量。

表 1 引物序列

引物	引物序列 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: ACCCACTCTCCACCTTTGA R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCC
<i>MKI67</i>	F: CTGACCCTGATGAGAGTGAGGG R: TCTCCCCTTTTGAGAGGGCT
$\alpha$ -SMA	F: CCGACCGAATGCAGAAGGA R: ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA
<i>fibronectin</i>	F: GCTCATCATCTGGCCATTTT R: ACCAACCTACGGATGACTCG
<i>caspase3</i>	F: GGCATTGAGACAGACAGTGCTG R: GGCACAAAGCGACTGGATGA
<i>mTOR</i>	F: TCGCTGAAGTCACACAGACC R: CTTTGGCATATGCTCGGCAC
<i>LC3B</i>	F: GAAGGGCTTACAGCTCAAT R: AACGTCTCTGGGAGGCATA

注: *GAPDH*: 磷酸甘油醛脱氢酶;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; *mTOR*: 哺乳动物雷帕霉素靶点

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。各测量指标的计数资料数据经 K-S 检验呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 Levene 检验证实方差齐。不同摩尔浓度雷帕霉素处理的细胞活力值比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 正常对照组和雷帕霉素组相对划痕宽度随时间的变化比较采用重复测量两因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 2 个组间各目的基因表达量的比较采用独立样本 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

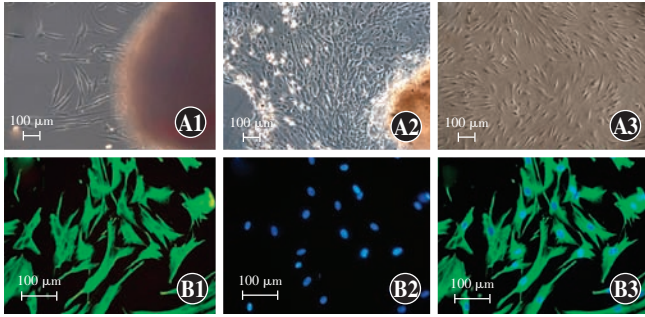
### 2.1 PFBs 的培养和鉴定

组织块培养后的第 3 天开始可以观察到有少量长梭形细胞自组织块边缘长出, 培养后第 7 天梭形细胞数量明显增多并相互融合, 紧密排列; 经 2 次传代后可以得到形态和大小均匀一致的细胞, 呈长梭形, 细胞核呈卵圆形 (图 1A)。免疫组织化学染色显示细胞为 vimentin 强阳性, 细胞质可见绿色荧光; 结合细胞形态和生长特性, 鉴定为成纤维细胞 (图 1B)。

### 2.2 不同摩尔浓度雷帕霉素对细胞活力的影响

MTT 检测结果显示, 不同摩尔浓度雷帕霉素处理组 PFBs 细胞活力呈剂量依赖性降低, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 183.703, P < 0.001$ )。10  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组细胞活力值稍低于 0  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组, 差异无统计学意义 ( $P = 0.073$ ); 30  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组细胞活力值均较 0  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素组明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ );





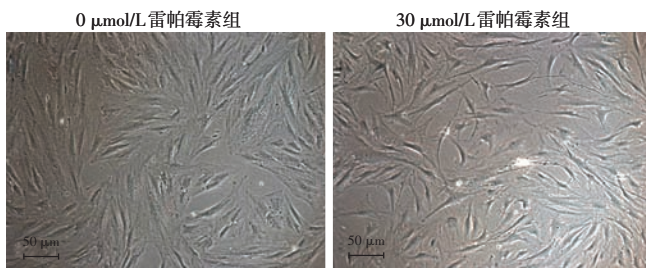
**图 1 PFBs 的培养及鉴定** A: 光学显微镜下观察组织块培养法培养的 PFBs (标尺 = 100 μm) A1: 培养第 3 天时可见少量细长梭形细胞自组织块边缘爬出 A2: 培养后第 7 天可见爬出的细胞数量明显增加, 相互连接, 融合成片 A3: 第 2 代细胞显示出均匀一致的长梭形细胞形态 B: 荧光显微镜观察细胞 vimentin 表达 (FITC, 标尺 = 100 μm) B1: 成纤维细胞标志物 vimentin 在所有细胞的细胞质内呈强阳性表达 B2: DAPI 染色细胞核 B3: B1 与 B2 融合图

100 μmol/L 雷帕霉素组细胞活力值严重降低, 提示 PFBs 严重损伤(表 2)。基于 MTT 结果, 选择 30 μmol/L 雷帕霉素作为后续实验的工作浓度。形态学观察结果显示, 0 μmol/L 雷帕霉素组 PFBs 在培养后 24 h 已达高度融合, 细胞呈梭形、放射状或旋涡状紧密排列; 30 μmol/L 雷帕霉素组细胞密度明显低于 0 μmol/L 雷帕霉素组, 细胞呈细长梭形, 细胞体更加延长伸展, 细胞间相互连接, 但未达紧密融合(图 2)。

**表 2 不同摩尔浓度雷帕霉素组 PFBs 细胞活力值的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	细胞活力值
0 μmol/L 雷帕霉素组	6	100.00 ± 0.00
10 μmol/L 雷帕霉素组	6	91.72 ± 6.73 <sup>a</sup>
30 μmol/L 雷帕霉素组	6	76.67 ± 8.84 <sup>b</sup>
50 μmol/L 雷帕霉素组	6	67.61 ± 6.93 <sup>b</sup>
100 μmol/L 雷帕霉素组	6	2.34 ± 3.25 <sup>b</sup>
F 值		183.703
P 值		0.001

注: 与 0 μmol/L 雷帕霉素组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) PFBs: 猪肉组织成纤维细胞



**图 2 光学显微镜下观察 0 μmol/L 和 30 μmol/L 雷帕霉素处理组培养 24 h 细胞形态的差异 (标尺 = 50 μm)** 0 μmol/L 雷帕霉素组 PFBs 在 24 h 的细胞形态, 可见细胞呈梭形, 相互连接、紧密排列; 30 μmol/L 雷帕霉素组 PFBs 细胞数量少于 0 μmol/L 雷帕霉素组, 细胞呈细长梭形, 细胞之间有连接, 但未达紧密融合

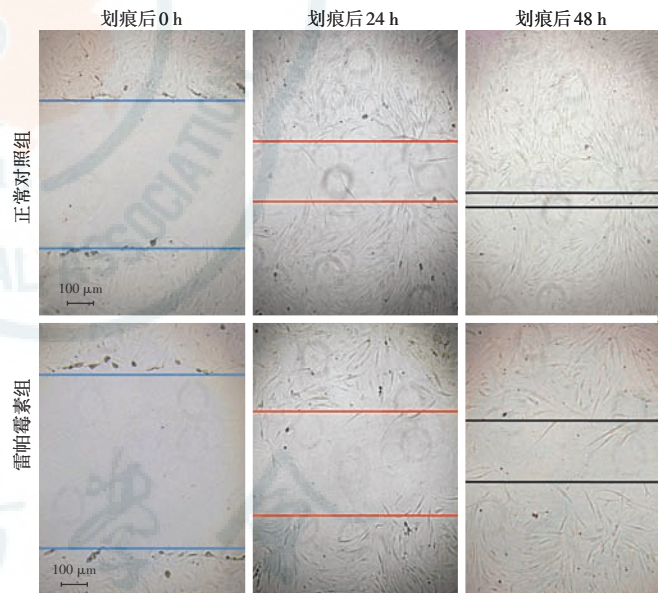
### 2.3 雷帕霉素组和正常对照组不同时间点细胞迁移距离比较

划痕实验显示, 正常对照组 PFBs 于划痕后 6 h 已可见到少量细胞向划痕内迁移。划痕前后各时间点正常对照组和雷帕霉素组相对划痕宽度总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 27.035, P = 0.007; F_{\text{时间}} = 259.464, P < 0.001$ ), 其中划痕后 12、24、48 h 雷帕霉素组相对划痕宽度均大于相应时间正常对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3, 图 3)。

**表 3 雷帕霉素组和正常对照组不同时间点相对划痕宽度比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	不同时间点相对划痕宽度				
		划痕后 0 h	划痕后 6 h	划痕后 12 h	划痕后 24 h	划痕后 48 h
正常对照组	3	100.00 ± 0.00	70.96 ± 8.28	50.24 ± 8.85	17.04 ± 3.13	2.45 ± 0.76
雷帕霉素组	3	100.00 ± 0.00	81.59 ± 8.60	68.56 ± 3.82 <sup>a</sup>	45.99 ± 1.53 <sup>a</sup>	35.40 ± 11.62 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 27.035, P = 0.007; F_{\text{时间}} = 259.464, P < 0.001$ 。与同时时间点正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验)



**图 3 光学显微镜下观察 PFBs 的细胞移行 (标尺 = 100 μm)** 划痕后 24 h (橙色标记) 和 48 h (黑色标记) 雷帕霉素组存留的划痕宽度显著大于正常对照组, 细胞移行明显减慢

### 2.4 30 μmol/L 雷帕霉素处理后各基因表达变化

雷帕霉素组细胞内增生相关基因 MKI67、纤维化相关基因 α-SMA、细胞骨架蛋白 fibronectin 和 mTOR mRNA 相对表达量分别为 0.36 ± 0.19、0.36 ± 0.15、0.68 ± 0.13 和 0.52 ± 0.06, 均较正常对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 雷帕霉素组自噬标志物 LC3B mRNA 相对表达量为 3.06 ± 0.86, 较正常对照组明显增加, 差异有统计学意义 ( $t = 4.805, P = 0.001$ ); 雷帕霉素组细胞内凋亡相关基因 caspase3

mRNA 相对表达量为  $0.99 \pm 0.16$ , 与正常对照组比较差异无统计学意义 ( $t=0.190$ ,  $P=0.861$ ) (图 4)。

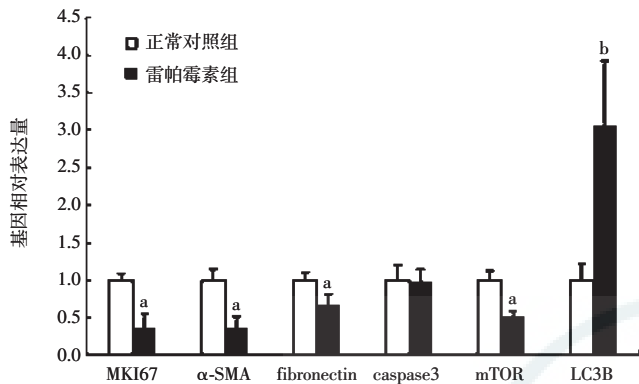


图 4 雷帕霉素组与正常对照组各目的基因相对表达量比较 与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n=4$ ) α-SMA: α 平滑肌肌动蛋白; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶点

### 3 讨论

雷帕霉素是一种新型大环内酯类抗生素和强效免疫抑制剂,可影响细胞的分化和凋亡,抑制多种前炎症因子基因的表达和延缓衰老<sup>[14-15]</sup>。临床研究结果显示,雷帕霉素及其衍生物对抑制肾细胞癌、胶质瘤等肿瘤生长具有一定疗效<sup>[16]</sup>,可以显著缓解肝脏、肾脏、肺脏和皮肤等组织器官的纤维化<sup>[9-11]</sup>,同时被用于抑制器官移植术后的免疫排斥反应<sup>[17-19]</sup>。结合雷帕霉素的作用特性以及成纤维细胞增生、移行在翼状胬肉发生和术后复发的作用,推测这一药物很可能对翼状胬肉的生长和复发起到抑制作用。本研究针对这一假说进行了验证,结果显示雷帕霉素确实能够有效抑制翼状胬肉成纤维细胞的增生、移行和纤维化,提示其可能在抑制翼状胬肉进展和复发中发挥重要作用。

雷帕霉素是 mTOR 通路的特异性阻断剂,与细胞内受体 FK506 结合蛋白 12 (FK506 binding protein 12, FKBP12) 结合形成 RAPA-FKBP12 复合物,直接作用于 mTOR 复合物 1 中的 FRB (FKBP-12-rapamycin binding) 结构域,从而抑制蛋白活性<sup>[20]</sup>。最近的研究显示, mTOR 通路在肝脏、肾脏、肺脏、心脏和皮肤等组织器官纤维化中起重要作用<sup>[12-13]</sup>。mTOR 的激活可使下游核糖体 s6 蛋白激酶 (ribosomal S6 kinases, S6K) 和真核细胞始动因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic initiation factor binding protein 1, 4E-BP1) 磷酸化并激活而 S6K 和 4E-BP1 是蛋白翻译的关键调节因子,其激活将最终导致细胞增生<sup>[21]</sup>。除此之外, mTOR 信号传导通路的激活还能够影响肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[22]</sup>。

mTOR 信号通路与翼状胬肉的发生和发展以及术后复发的关系目前国内外尚无相关报道。本研究结果显示,雷帕霉素处理可以显著下调翼状胬肉成纤维细胞 mTOR mRNA 的表达,同时伴随细胞增生标志物 MKI67、肌成纤维标志物 α-SMA 以及细胞骨架蛋白 fibronectin mRNA 表达的降低,提示雷帕霉素对翼状胬肉成纤维细胞增生和移行的抑制作用可能通过 mTOR 通路介导。这一结论尚需通过对 mTOR 信号通路上下游其他关键因子的研究,以及对初发和复发翼状胬肉患者翼状胬肉组织的免疫组织化学和蛋白印迹等研究进一步验证。

与 Romero 等<sup>[12]</sup>在特发性肺纤维化中的研究相一致,本研究发现雷帕霉素对于成纤维细胞的抑制作用并不影响 caspase3 的表达水平,提示其抗纤维化作用可能是通过改变细胞本身的生理特性而实现的,并不引起细胞凋亡。另一方面,作为自噬的诱导剂,本研究还观察到雷帕霉素显著上调自噬相关基因 LC3B mRNA 的表达,但自噬的调节与翼状胬肉成纤维细胞增生、移行等特性之间的关系还有待进一步研究。

综上所述,本研究发现雷帕霉素可能通过 mTOR 通路影响体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞的增生、移行、肌成纤维细胞转化、细胞外基质分泌等生理过程,从而起到抗纤维化和抑制翼状胬肉生长的作用,但其具体的作用机制仍有待进一步研究。雷帕霉素可能成为有效抑制翼状胬肉进展和预防术后复发的药物。

### 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] 钟蕾,张晓峰,付心怡,等. 远期追踪观察翼状胬肉三种手术方式的复发率[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2016, 38(2): 96-99. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-1477. 2016. 02. 004. Zhong L, Zhang XF, Fu XY, et al. Long-term follow-up on the recurrence rate of three surgical techniques for pterygium[J]. Chin J Ocul Trauma Occupat Eye Dis, 2016, 38(2): 96-99. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-1477. 2016. 02. 004.
- [3] Ozer A, Yildirim N, Erol N, et al. Long-term results of bare sclera, limbal-conjunctival autograft and amniotic membrane graft techniques in primary pterygium excisions [J]. Ophthalmologica, 2009, 223(4): 269-273. DOI: 10. 1159/000210444.
- [4] Sánchez-Thorin JC, Rocha G, Yelin JB. Meta-analysis on the recurrence rates after bare sclera resection with and without mitomycin C use and conjunctival autograft placement in surgery for primary pterygium [J]. Br J Ophthalmol, 1998, 82(6): 661-665.
- [5] Kocamis O, Bilgec M. Evaluation of the recurrence rate for pterygium treated with conjunctival autograft [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2014, 252(5): 817-820. DOI: 10. 1007/s00417-014-2581-y.
- [6] Masters JS, Harris DJ. Low recurrence rate of pterygium after excision with conjunctival limbal autograft: a retrospective study with long-term follow-up [J]. Cornea, 2015, 34(12): 1569-1572. DOI: 10. 1097/



- ICO. 000000000000597.
- [7] Kaufman SC, Jacobs DS, Lee WB, et al. Options and adjuvants in surgery for pterygium; a report by the american academy of ophthalmology [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(1): 201-208. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.06.066.
- [8] Hovanesian JA, Starr CE, Vroman DT, et al. Surgical techniques and adjuvants for the management of primary and recurrent pterygia [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2017, 43(3): 405-419. DOI: 10.1016/j.jcrs.2017.03.002.
- [9] 孙亚杰, 林婷婷, 何彦津, 等. 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 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(6): 512-519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.006. Sun YJ, Lin TT, He YJ, et al. A comparative study on the inhibitory effects of commonly used clinical drugs on *in vitro* fibroblasts from recurrent pterygium [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(6): 512-519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.006.
- [10] Ferguson KT, Torr EE, Bernau K, et al. The novel mTOR complex 1/2 inhibitor P529 inhibits human lung myofibroblast differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2241-2249. DOI: 10.1002/jcb.25878.
- [11] Bohm M, Stegemann A, Metz D, et al. The mTOR inhibitor everolimus suppresses proliferation, metabolic activity and collagen synthesis of human fibroblasts *in vitro* and exerts antifibrogenic effects *in vivo* [J]. *Br J Dermatol*, 2017, 177(4). DOI: 10.1111/bjd.15421.
- [12] Romero Y, Bueno M, Ramirez R, et al. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(6): 1103-1112. DOI: 10.1111/ace.12514.
- [13] Ai F, Chen M, Yu B, et al. Berberine regulates proliferation, collagen synthesis and cytokine secretion of cardiac fibroblasts via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12509-12516.
- [14] Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, et al. Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 103-114. DOI: 10.1172/JCI37964.
- [15] Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice [J]. *Nature*, 2009, 460(7253): 392-395. DOI: 10.1038/nature08221.
- [16] Le TC, Faivre S, Serova M, et al. mTORC1 inhibitors; is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1197-1203. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604636.
- [17] Franco A, Más-Serrano P, Perez CJ, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor monotherapy: efficacy in renal transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(8): 2364-2367. DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.09.006.
- [18] Jones RG, Pearce EJ. MenTORing Immunity: mTOR signaling in the development and function of tissue-resident immune cells [J]. *Immunity*, 2017, 46(5): 730-742. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.04.028.
- [19] Dao V, Liu Y, Pandeswara S, et al. Immune-stimulatory effects of rapamycin are mediated by stimulation of antitumor  $\gamma\delta$  T cells [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 5970-5982. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0091.
- [20] Mukherjee S, Mukherjee U. A comprehensive review of immunosuppression used for liver transplantation [J/OL]. *J Transplant*, 2009, 2009: 701464 [2017-06-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130772>. DOI: 10.1155/2009/701464.
- [21] Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and-independent mechanisms of mTOR regulation in cancer [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(5): 656-664. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.01.004.
- [22] 吴燕峰, 梁新军, 王鹏, 等. 雷帕霉素对人骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(10): 1789-1791. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2011.10.060. Wu YF, Liang XJ, Wang P, et al. Effects of rapamycin on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cells *in vitro* [J]. *Chin J Exp Surg*, 2011, 28(10): 1789-1791. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2011.10.060.

(收稿日期: 2018-05-20 修回日期: 2018-10-28)

(本文编辑: 张宇)

读者·作者·编者

## 本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿: 登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>) → 点击页面右上角的“注册” → 选项注册账号 → 返回首页 → 点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意保留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中署名的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

## 本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)