

## · 实验研究 ·

# 单侧与双侧翼状胬肉成纤维细胞生物学行为的差异及紫外线对其的影响

彭娟 毛雁 姚达强 董舒婷 沙翔垠

广州医科大学附属第二医院眼科 510260

通信作者: 彭娟, Email: sweetin245@163.com

**【摘要】 目的** 探讨单侧与双侧翼状胬肉成纤维细胞(HPFs)增生和移行的差异及紫外线对不同部位成纤维细胞增生和移行的影响。**方法** 收集 2017 年 3 月至 2018 年 3 月于广州医科大学附属第二医院行翼状胬肉切除+自体结膜瓣转位术的双侧及单侧翼状胬肉患者各 19 例 19 眼的翼状胬肉组织。6 例 12 眼正常结膜组织来源于同期供体眼球。根据病种和培养取材部位分为鼻侧 HPFs(HPFs-N) 19 例、颞侧 HPFs(HPFs-T) 19 例、单侧 HPFs 19 例和正常人正常结膜成纤维细胞(HCFs) 12 例,分别取自双侧翼状胬肉的鼻侧、双侧翼状胬肉的颞侧、单侧翼状胬肉和正常结膜。将以上成纤维细胞分为紫外线照射组和普通光照组,分别接受紫外线 B(UVB)和普通光照照射。采用 MTT 法检测细胞生长曲线,细胞划痕试验检测 48 h 细胞划痕愈合率,免疫荧光法检测  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达。比较各成纤维细胞增生和移行能力的差异。比较紫外线照射组和普通光照组细胞划痕愈合率、生长曲线及  $\alpha$ -SMA 表达的改变。**结果** 组织块培养法可见 HCFs 及 HPFs 呈梭形生长。各成纤维细胞体外培养 1~7 d 生长速度逐渐加快,HPFs-N 生长最快,HCFs 生长速度最慢。在紫外线照射下各成纤维细胞生长速度较普通光照组明显加快。4 种成纤维细胞不同光照条件下细胞划痕愈合率、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达率比较差异均有统计学意义( $F_{组别} = 158.064, P < 0.05; F_{细胞类型} = 326.582, P < 0.05; F_{组别} = 4.731, P < 0.05; F_{细胞类型} = 172.813, P < 0.05$ ),其中普通光照条件下,48 h 后 HPFs-N 的细胞划痕愈合率为  $(79.67 \pm 0.86)\%$ ,明显高于 HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 的  $(54.04 \pm 0.33)\%$ 、 $(64.12 \pm 0.21)\%$  和  $(58.86 \pm 0.41)\%$ ,HPFs-N 的  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达率为  $(28.87 \pm 1.02)\%$ ,明显高于 HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 的  $(13.67 \pm 0.23)\%$ 、 $(20.35 \pm 1.72)\%$  和  $(5.12 \pm 0.45)\%$ ,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与普通光照组比较,紫外线照射组各成纤维细胞的细胞划痕愈合率、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达率明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** 双侧翼状胬肉鼻侧的成纤维细胞增生移行能力大于单侧翼状胬肉和 HCFs, $\alpha$ -SMA 表达增多,紫外线照射可以加强体外培养 HPFs 的增生移行能力。

**【关键词】** 翼状胬肉; 成纤维细胞; 细胞培养; 增生; 移行; 紫外线

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81100649); 广东高校优秀青年创新人才培养项目(LYM10112)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200326-00211

## Difference in cell biological behavior and ultraviolet radiation effect between double-head and unilateral pterygium fibroblasts cultured *in vitro*

Peng Juan, Mao Yan, Yao Daqiang, Dong Shuting, Sha Xiangyin

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Peng Juan, Email: sweetin245@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the difference in the proliferation, migration and ultraviolet radiation effect between double-head and unilateral pterygium fibroblasts (HPFs) cultured *in vitro*. **Methods** Pterygium tissue was obtained from patients who underwent pterygium excision with conjunctival transposition from March 2017 to March 2018 in the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University. Nineteen cases with bilateral pterygium and 19 cases with unilateral pterygium were selected for this research. Twelve cases of normal conjunctival tissue were obtained from donor eyes. The fibroblasts were divided into HPFs-nasal (HPFs-N), HPFs-temporal (HPFs-T), unilateral HPFs and human conjunctiva fibroblasts (HCFs), which was taken from the nasal side of the bilateral pterygium, the temporal side of the bilateral pterygium, the unilateral pterygium and the normal conjunctiva, respectively. Human pterygium and normal conjunctival fibroblasts were isolated and cultured by tissue culture method. The fibroblasts were divided into an ultraviolet irradiation group and a normal light illumination group. The cell growth curve was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cell scratch healing rate was detected by the cell scratch test after 48 hours. The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) was detected by immunofluorescence staining, and the number of positive cells in each group was compared. The fibroblasts cultured *in vitro* were irradiated with ultraviolet irradiation, and the cell scratch healing rate, growth curve and expression of

$\alpha$ -SMA were observed. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University. Written informed consent was obtained from each subject. **Results** The pterygium and conjunctival fibroblasts were spindle shaped, and the growth rate was gradually increased from day 1 to day 7. The growth rate of HPFs-N was the fastest, and the growth rate of HCFs was the slowest. The growth rate of the four types of fibroblasts was significantly increased after exposure to ultraviolet. There were significant differences in the cell scratch healing rates and  $\alpha$ -SMA positive cell expression rates among the four fibroblast types under different lighting conditions ( $F_{\text{group}} = 158.064, P < 0.05; F_{\text{cell type}} = 326.582, P < 0.05. F_{\text{group}} = 4.731, P < 0.05; F_{\text{cell type}} = 172.813, P < 0.05$ ), of which the scratches healing rate in the HPFs-N cells after 48 hours under the normal light conditions was  $(79.67 \pm 0.86)\%$ , which was significantly higher than HPFs-T ( $[54.04 \pm 0.33]\%$ ), unilateral HPFs ( $[64.12 \pm 0.21]\%$ ) and HCFs ( $[58.86 \pm 0.41]\%$ ), the  $\alpha$ -SMA positive cell expression rate in the HPFs-N cells after 48 hours under the normal light conditions was  $(28.87 \pm 1.02)\%$ , which was significantly higher than that in HPFs-T ( $[13.67 \pm 0.23]\%$ ), unilateral HPFs ( $[20.35 \pm 1.72]\%$ ) and HCFs ( $[5.12 \pm 0.45]\%$ ) (all at  $P < 0.05$ ); the cell scratch healing rates and  $\alpha$ -SMA positive cell expression rates were significantly increased in the ultraviolet irradiation group than those in the normal light illumination group (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The nasal side of double-head pterygium fibroblasts is more proliferous and more migratory than that of the unilateral pterygium, the expression of  $\alpha$ -SMA is also increased, which can be further enhanced by ultraviolet irradiation.

[Key words] Pterygium; Fibroblasts; Cell culture; Proliferation; Migration; Ultraviolet

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81100649); Guangdong University Outstanding Young Innovative Talent Cultivation Project (LYM10112)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200326-00211

翼状胬肉是眼科常见的眼表疾病,常先发生于球结膜的鼻侧,鼻颞侧同时生长者较少见<sup>[1-2]</sup>。紫外线光照、缺氧、炎症浸润等多种因素均是翼状胬肉发生的诱因<sup>[3-4]</sup>。双侧翼状胬肉较单侧翼状胬肉侵袭角膜面积更大,对视力影响更显著,且术后更易复发。但是目前对双侧翼状胬肉发病机制及双侧和单侧翼状胬肉发病机制的差异研究鲜见报道。本研究拟通过体外培养人正常结膜成纤维细胞(human conjunctiva fibroblasts, HCFs)、单侧人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts, HPFs)以及双侧人翼状胬肉的鼻侧 HPFs (HPFs-nasal, HPFs-N)及颞侧 HPFs (HPFs-temporal, HPFs-T),探讨双侧和单侧 HPFs 增生移行的差异及紫外线对不同部位成纤维细胞增生移行的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源** 收集 2017 年 3 月至 2018 年 3 月于广州医科大学附属第二医院行翼状胬肉切除+自体结膜瓣转位术的双侧及单侧翼状胬肉患者各 19 例 19 眼的翼状胬肉组织。双侧翼状胬肉患者男 7 例,女 12 例;年龄 50~83 岁,平均 $(67.00 \pm 10.17)$ 岁。单侧翼状胬肉患者男 6 例,女 13 例;年龄 46~83 岁,平均 $(61.00 \pm 10.58)$ 岁。6 例正常结膜组织取自眼库中捐献者死后 24 h 内非角膜缘正常球结膜组织。根据病种和培养取材部位分为 HPFs-N 19 例、HPFs-T 19 例、单侧 HPFs 19 例和 HCFs 12 例,分别取自双侧翼状胬肉的鼻侧、双侧翼状胬肉的颞侧、单侧翼状胬肉和正常

结膜。纳入标准:(1)翼状胬肉患者,鼻侧或颞侧球结膜肥厚增生,遮盖角膜 2 cm 以上;(2)能耐局部麻醉手术者。排除标准:(1)复发性翼状胬肉;(2)合并其他眼部炎症和干眼及其他角膜、结膜病变等疾病者;(3)既往有眼部手术史;(4)长期佩戴角膜接触镜;(5)有高血压及糖尿病等全身疾病者;(6)服用抗凝药物者。本研究通过广州医科大学附属第二医院伦理委员会批准通过(伦审号:20130228112),患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM/F12 高糖培养基、质量分数 0.25% 胰蛋白酶(含质量分数 0.06% EDTA)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、P/S(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);兔抗人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)一抗(编号:19245T,美国 CST 公司);羊抗兔二抗-FITC(编号:F6258,美国 Sigma 公司);DAPI 染色试剂盒(上海贝博生物公司);四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(上海生工生物工程有限公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HCFs 及 HPFs 的原代培养及传代** 所有患眼接受常规翼状胬肉切除+结膜瓣转位术,手术由同一术者实施。术中分离切除翼状胬肉头部、颈部组织,分离剪除体部结膜上皮下层组织。制作上方结膜瓣,转位后 10-0 缝线固定于浅层巩膜上。术后佩戴角膜接触镜,常规抗生素滴眼液点眼,2 周后拆除缝线。术中取

翼状胬肉体部结膜上皮组织,大小约 4 mm×4 mm。尽量分离上皮组织,保留结膜下筋膜组织。放置于无菌含双抗 DMEM 培养基的培养皿中备用。正常结膜组织取自眼库中捐献者死后 24 h 内正常眼,无菌条件下于供体眼球角膜缘后 4 mm 处剪取 4 mm×4 mm 大小方形结膜上皮及结缔组织。将供体正常球膜组织及接受手术患者的翼状胬肉组织剪成 1 mm<sup>2</sup> 组织块均匀置于培养瓶中,然后将培养瓶翻转朝上。向瓶内加入约 1 ml 完全培养基,轻轻放入体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 ℃ 下培养 3 h,待组织小块贴附后将培养瓶慢慢翻转平放,静置培养过夜。次日,再追加培养基,4~5 d 可见有细胞从组织块边缘爬出。当成纤维细胞基本长满瓶底时按 1:2~1:4 传代培养,利用上皮细胞和成纤维细胞消化时间的差异传代纯化成纤维细胞。第 2~5 代细胞形态为梭形或不规则形,有伪足,行常规苏木精-伊红染色和波形蛋白免疫染色鉴定,均阳性表达者证实为成纤维细胞。

**1.2.2 紫外线照射体外培养的成纤维细胞** 取 HPFs-N、HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 各 12 眼培养的细胞,分成普通光照组和紫外线照射组,每组 6 眼。取 4 种对数生长的成纤维细胞分别置于超净台培养皿中,打开培养皿盖,紫外线照射组细胞接受 20 mJ/cm<sup>2</sup> 紫外线照射,经计算为距离紫外线 B (ultraviolet B, UVB) 紫外灯 20 cm,约 4 min;普通光照组细胞接受相同时间普通光线照射约 4 min。照射后盖好培养皿盖。

**1.2.3 细胞划痕试验检测 48 h 细胞划痕愈合率** 取 HPFs-N、HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 各 12 眼培养的细胞,将 4 种细胞悬液分别加入 6 孔板中,每孔约 5×10<sup>5</sup> 个细胞。待细胞贴壁后,紫外线照射组进行 UVB 照射,普通光照组采用普通光线照射;之后更换无血清培养基饥饿 24 h。次日,用移液枪头划痕,加入低血清培养基。放入 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,48 h 后于倒置相差显微镜下任意选取 5 个视野(×400)拍照。利用 Image J 软件进行愈合面积计算,测定划痕宽度,计算划痕愈合率=(初始划痕面积-现划痕面积)/初始划痕面积×100%。实验重复 3 次,取平均值。

**1.2.4 MTT 法检测细胞生长曲线** 将 4 种成纤维细胞分为紫外线照射组和普通光照组,按 1×10<sup>4</sup>/ml 分别接种于 7 块 96 孔板中,每组设 5 个复孔,待细胞贴壁后,紫外线照射组中每块板同时接受相同强度的 UVB 照射,每孔加入 50 μl MTT,继续培养 4 h 后,每孔加入 150 μl DMSO,以空白对照孔调零;将 96 孔板置于酶标仪测量各孔波长 490 nm 处吸光度(A)值。

**1.2.5 免疫荧光法检测 α-SMA 的表达** 将 4 种成纤

维细胞分为紫外线照射组和普通光照组,分别接种于 24 孔板中。在细胞爬片上滴加牛血清白蛋白,室温封闭 30 min,加入兔抗人 α-SMA 一抗(1:100),使用 PBS 代替一抗作为空白对照,4 ℃ 孵育过夜。次日, FITC 二抗(1:100)室温下避光孵育 2 h, DAPI 染色标记细胞核,用抗荧光猝灭剂的封片液封片后,在荧光显微镜下观察采集图像。绿色荧光为阳性表达,蓝色荧光为细胞核染色。用 Image pro-Plus 彩色病理图像分析系统进行图像分析。于高倍镜下任意取 10 个视野,分析不同标本间 α-SMA 阳性细胞表达率。

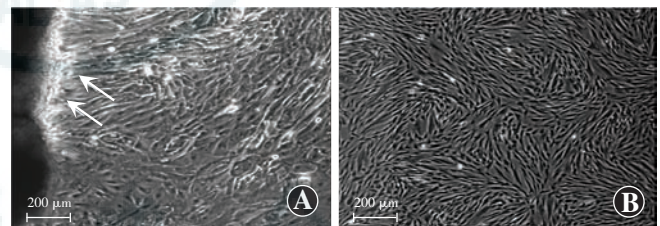
**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。定量数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表示。紫外线照射组与普通光照组 HPFs-N、HPFs-T、单侧 HPFs、HCFs 细胞划痕愈合率、α-SMA 表达阳性细胞表达率比较均采用两因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 体外培养 HPFs 的特点**

翼状胬肉组织块接种后第 4~5 天可见少量成纤维细胞从组织块边缘爬出,细胞以长梭形为主,逐渐向外延伸,当细胞完全融合时,细胞呈漩涡状,其间夹杂部分类圆形上皮细胞(图 1)。



**图 1 HPFs 的形态学观察(标尺=200 μm)** A: 原代培养翼状胬肉组织块边缘成纤维细胞(箭头)生长情况 B: 经过传代纯化后的 HPFs

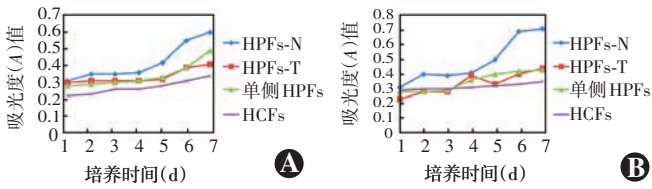
**Figure 1 Observation of the shape of HPFs(bar=200 μm)** A: The primary fibroblasts growth from the pterygium tissue B: The HPFs after generation and purification

**2.2 各成纤维细胞的生长曲线改变**

各成纤维细胞体外培养 1~7 d 生长速度均逐渐加快,HPFs 较 HCFs 生长速度加快,其中 HPFs-N 生长速度最快,在紫外线照射下各成纤维细胞生长趋势与普通光照下一致,趋势更为明显。各成纤维细胞均在培养 6~7 d 生长速度变缓(图 2)。

**2.3 各成纤维细胞不同光照条件下细胞划痕愈合率比较**

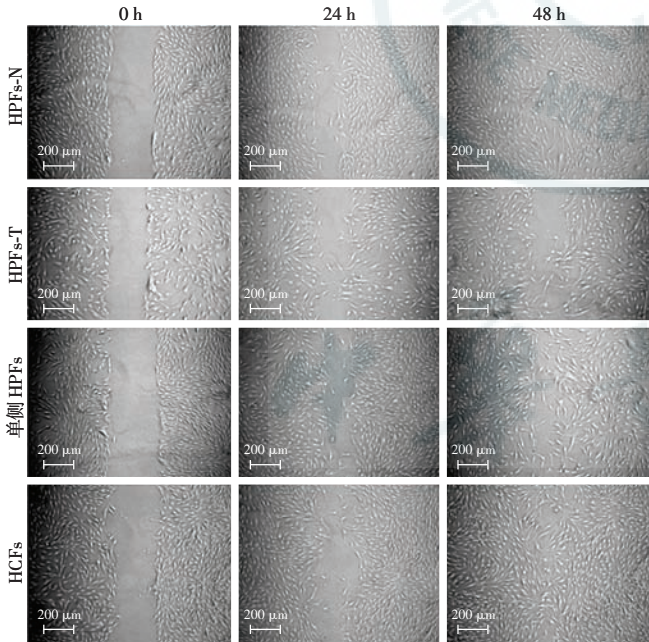
4 种成纤维细胞不同光照条件下细胞划痕愈合率比较差异均有统计学意义(F<sub>组别</sub> = 158.064, P<0.05;



**图 2 各成纤维细胞经普通光照和紫外线照射后生长曲线图** 各成纤维细胞体外培养 1~7 d 生长速度逐渐加快,其中 HPFs-N 生长速度最快,在紫外线照射下趋势更加明显 A:普通光照射下细胞生长曲线图 B:紫外线照射后细胞 1~7 d 的生长曲线图 HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞

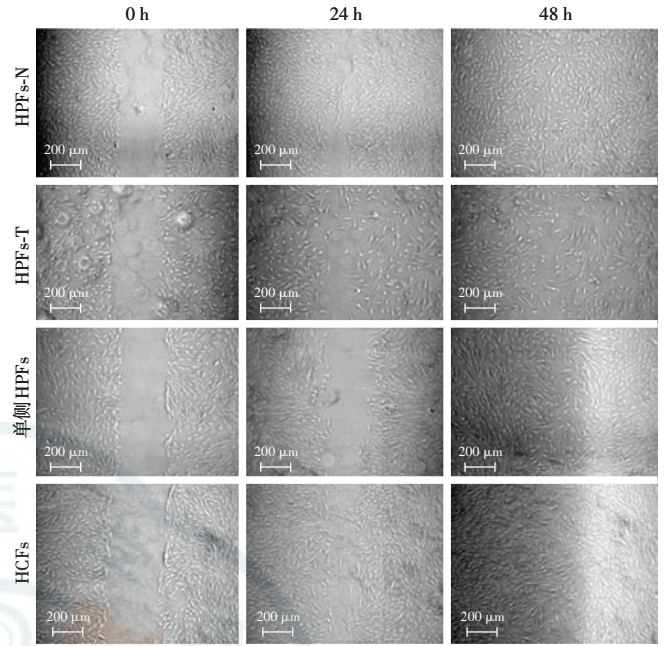
**Figure 2 The growth curve of the fibroblasts after irradiation with ultraviolet and normal light** The fibroblasts grew rapidly from 1 to 7 days, especially for HPFs-N after irradiation with UVB radiation A: The growth curve of fibroblasts after irradiation with ultraviolet B: The growth curve of fibroblasts after irradiation with normal light HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts

$F_{\text{细胞类型}} = 326.582, P < 0.05$ ),其中普通光照条件下,48 h 后 HPFs-N 细胞划痕愈合率均较 HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与普通光照组比较,紫外线照射组各成纤维细胞的细胞划痕愈合率明显提高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 3,4,表 1)。



**图 3 各成纤维细胞普通光照后细胞移行情况**(标尺 = 200 μm) 普通光照条件下,48 h 后 HPFs-N 细胞划痕愈合率较高 HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞

**Figure 3 Cell migration of the fibroblasts under normal light illumination** (bar = 200 μm) In the normal light illumination group, the healing rate was higher in HPFs-N than that in other 3 kinds of fibroblasts after 48 hours HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts



**图 4 各成纤维细胞紫外线照射后细胞移行情况**(标尺 = 200 μm) 紫外线光照条件下,48 h 后 HPFs-N 细胞划痕愈合率较高 HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞

**Figure 4 Cell migration of the fibroblasts after UVB radiation** (bar = 200 μm) In the ultraviolet irradiation group, the healing rate was higher in HPFs-N than that in other 3 kinds of fibroblasts after 48 hours HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts

**表 1 各成纤维细胞不同光照条件下细胞划痕愈合率比较 (mean±SD, %)**

**Table 1 The comparison of wound healing rate of the fibroblasts under different lighting conditions (mean±SD, %)**

组别	样本量	HPFs-N	HPFs-T	单侧 HPFs	HCFs
普通光照组	6	79.67±0.86	54.04±0.33 <sup>a</sup>	64.12±0.21 <sup>a</sup>	58.86±0.41 <sup>a</sup>
紫外线照射组	6	89.45±1.21 <sup>b</sup>	63.27±1.31 <sup>b</sup>	69.94±1.56 <sup>b</sup>	61.39±1.96 <sup>b</sup>

注:  $F_{\text{组别}} = 158.064, P < 0.05$ ;  $F_{\text{细胞类型}} = 326.582, P < 0.05$ 。与同组内 HPFs-N 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与普通光照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞

Note:  $F_{\text{group}} = 158.064, P < 0.05$ ;  $F_{\text{cell type}} = 326.582, P < 0.05$ . Compared with HPFs-N in the normal light illumination group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with the ultraviolet irradiation group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (two-way ANOVA, LSD-*t* test) HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts

**2.4 各成纤维细胞 α-SMA 阳性细胞表达率比较**

各成纤维细胞免疫荧光染色结果显示,α-SMA 阳性表达于细胞的细胞质,表现为绿色荧光,细胞核经 DAPI 染色表现为蓝色荧光。各成纤维细胞不同光照条件下 α-SMA 阳性细胞表达率比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{组别}} = 4.731, P < 0.05$ ;  $F_{\text{细胞类型}} = 172.813, P < 0.05$ ),其中普通光照条件下,HPFs-N 的 α-SMA 阳性

细胞表达率均较 HPFs-T、单侧 HPFs 和 HCFs 明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与普通光照组比较,紫外线照射组 4 种成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达率明显提高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (图 5,6,表 2)。

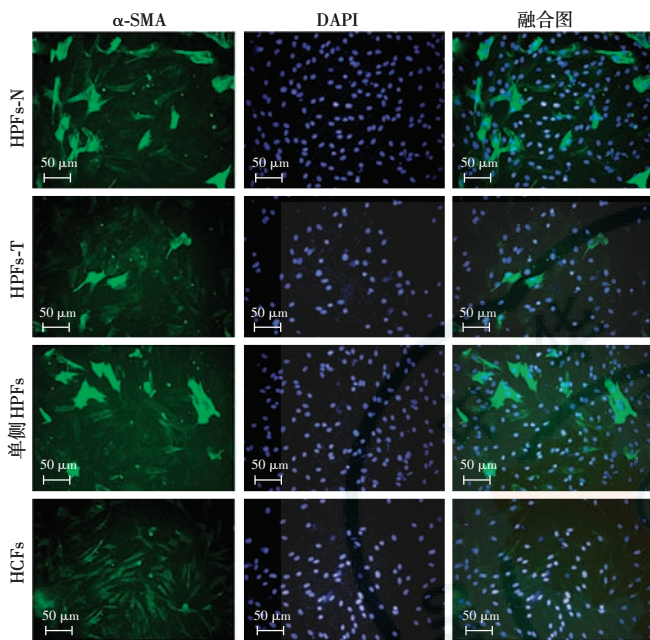


图 5 各成纤维细胞普通光照时  $\alpha$ -SMA 表达情况 (FITC, DAPI, 标尺 = 50  $\mu$ m) 绿色荧光为  $\alpha$ -SMA 阳性表达,蓝色荧光为细胞核 DAPI 染色, $\alpha$ -SMA 阳性表达于细胞的细胞质,HPFs-N 中  $\alpha$ -SMA 阳性细胞较多 HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚

Figure 5 The  $\alpha$ -SMA expression in the fibroblasts under normal light illumination (FITC, DAPI, bar = 50  $\mu$ m) More positive expression was found in the HPFs-N than that in the other 3 kinds of fibroblasts HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

表 2 各成纤维细胞不同光照条件下  $\alpha$ -SMA 表达阳性细胞表达率比较 (mean $\pm$ SD, %)

Table 2 The comparison of the  $\alpha$ -SMA positive cells expression rates in the fibroblasts under different lighting conditions (mean $\pm$ SD, %)

组别	样本量	HPFs-N	HPFs-T	单侧 HPFs	HCFs
普通光照组	6	28.87 $\pm$ 1.02	13.67 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	20.35 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	5.12 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
紫外线照射组	6	34.21 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>	15.25 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>	22.67 $\pm$ 2.31 <sup>b</sup>	8.56 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>

注:  $F_{组别} = 4.731, P < 0.05; F_{细胞类型} = 172.813, P < 0.05$ 。与同组内 HPFs-N 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与普通光照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)  $\alpha$ -SMA: $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白;HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞

Note:  $F_{group} = 4.731, P < 0.05; F_{cell type} = 172.813, P < 0.05$ . Compared with HPFs-N in the normal light illumination group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with the ultraviolet irradiation group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (two-way ANOVA, LSD-*t* test)  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin; HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts

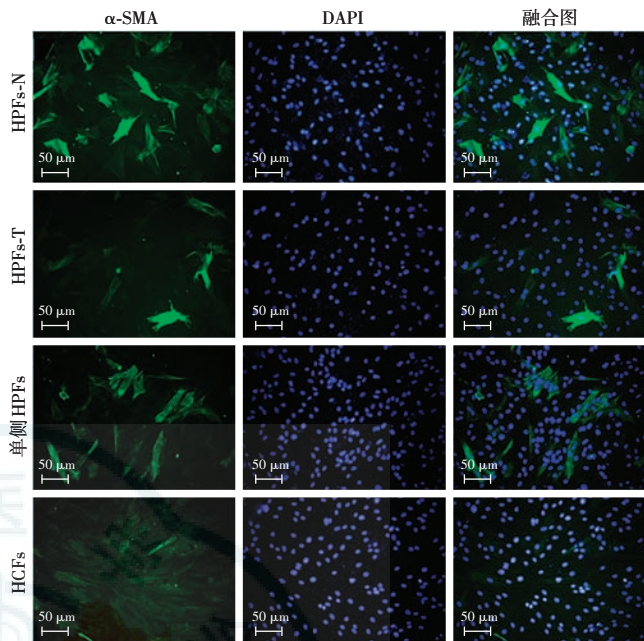


图 6 各成纤维细胞紫外线照射时  $\alpha$ -SMA 表达情况 (FITC, DAPI, 标尺 = 50  $\mu$ m) 绿色荧光为  $\alpha$ -SMA 阳性表达,蓝色荧光为细胞核 DAPI 染色, $\alpha$ -SMA 阳性表达于细胞的细胞质,HPFs-N 中  $\alpha$ -SMA 阳性表达最多 HPFs-N:鼻侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs-T:颞侧人翼状胬肉成纤维细胞;HPFs:人翼状胬肉成纤维细胞;HCFs:人正常结膜成纤维细胞; $\alpha$ -SMA: $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚

Figure 6 The  $\alpha$ -SMA expression in the fibroblasts after UVB radiation (FITC, DAPI, bar = 50  $\mu$ m) More positive expression was found in HPFs-N than that in other 3 kinds of fibroblasts HPFs-N: human pterygium fibroblasts-nasal; HPFs-T: human pterygium fibroblasts-temporal; HPFs: human pterygium fibroblasts; HCFs: human conjunctiva fibroblasts;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

### 3 讨论

成纤维细胞的增生和移行是翼状胬肉发生和复发的关键因素之一。大多数关于翼状胬肉的研究均强调其生长于鼻侧球结膜,而对于颞侧球结膜生长的翼状胬肉则较少关注<sup>[5]</sup>。翼状胬肉为何先生长于鼻侧球结膜,目前尚不明确。鼻侧和颞侧翼状胬肉发病机制的差异国内外研究甚少。

本研究显示双侧翼状胬肉较单侧翼状胬肉成纤维细胞的细胞划痕愈合率更高,生长速率更快,证明双侧翼状胬肉的成纤维细胞迁徙能力更强,以鼻侧更显著,与临床观察到的双侧翼状胬肉侵袭角膜范围更大一致。本研究推测其可能的原因是双侧翼状胬肉角膜缘干细胞破坏较多,翼状胬肉组织范围较大,对眼表的影响显著,从而使眼表的炎性因子和细胞因子分泌增多,导致成纤维细胞的迁徙能力更强<sup>[6-7]</sup>。有研究表明这种差异也可能与双侧翼状胬肉接收的紫外线强度不同有关<sup>[8]</sup>。一方面,睑裂区鼻侧接收到更多的紫外线,

可使鼻侧角膜缘受损范围更大;另一方面,较多的紫外线量能够刺激细胞分泌更多的炎性因子,进而促使鼻侧较颞侧先出现翼状胬肉。另外,双侧翼状胬肉患者可能存在一定的遗传易感性也可能是其发生双侧翼状胬肉的原因,其具体机制仍有待进一步研究。

本研究也发现,经紫外线照射诱导后 HPFs 的迁移和增生能力明显增强,其中双侧翼状胬肉的鼻侧更明显。紫外线是翼状胬肉公认的诱发因素<sup>[9]</sup>,可能与双侧翼状胬肉中成纤维细胞对紫外线更易感且作用更大有关。既往研究表明,紫外线能够促使翼状胬肉分泌致炎细胞因子,使泪液中出现炎性细胞。白细胞介素-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 能激发 HPFs 表达广泛蛋白水解酶,这些蛋白水解酶与成纤维细胞的增生有密切关系<sup>[10]</sup>。本研究推测双侧翼状胬肉中紫外线能够通过刺激 HPFs 分泌更多细胞因子,从而明显促进其增生。

本研究还发现双侧 HPFs 表达  $\alpha$ -SMA 明显上调,以鼻侧更为显著。 $\alpha$ -SMA 在肌成纤维细胞中的表达量较高,是一种间质分化和高度侵袭性的标志。作为细胞的骨架蛋白, $\alpha$ -SMA 是成纤维细胞收缩的典型标志<sup>[11-12]</sup>。本研究推测双侧 HPFs 的迁移能力增强,导致  $\alpha$ -SMA 分泌增多。本研究结果证实翼状胬肉的成纤维细胞表达  $\alpha$ -SMA,具有间充质细胞的特点,与既往研究结果一致<sup>[13-14]</sup>。 $\alpha$ -SMA 也是上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的推动者。EMT 是指上皮细胞在形态学上发生间充质细胞表型的转变,并获得转移能力的过程。目前 HPFs 的起源尚不明确,上皮细胞获得间充质细胞的特性可能在翼状胬肉致病中发挥关键作用<sup>[15]</sup>。

本研究还发现紫外线照射后 HPFs 中  $\alpha$ -SMA 表达增强,以双侧翼状胬肉的鼻侧更显著;HCFs 中  $\alpha$ -SMA 表达较弱,移行较慢。通过紫外线照射,HPFs 中  $\alpha$ -SMA 表达增强,并获得了更强的移行能力、侵入性潜能及间充质表型<sup>[16-17]</sup>。既往研究显示,UVB 暴露能够使成纤维细胞中基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、MMP-3 表达上调,MMPs 在翼状胬肉组织中的表达强于正常结膜组织,且与翼状胬肉的复发有关<sup>[18-21]</sup>。本研究推测低剂量 UVB 照射 HPFs 可推进 EMT 过程,可能通过刺激其产生 MMPs 从而促进翼状胬肉形成及复发。这一作用在双侧翼状胬肉中更为显著,这也是双侧翼状胬肉更易复发的可能原因。

综上所述,本研究结果表明双侧翼状胬肉鼻侧的成纤维细胞增生移行能力大于单侧翼状胬肉,成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA 表达增加,紫外线照射可以加强体外培

养 HPFs 的增生移行能力。这一发现将有助于发现双侧翼状胬肉有别于单侧翼状胬肉的不同点。因样本量有限,对调节双侧翼状胬肉中成纤维细胞增生和迁移能力上调的具体机制还未明确,进一步的研究将探讨这一机制,为临床降低双侧翼状胬肉手术复发率或研发相关阻断药物提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [1] 刘祖国. 眼表疾病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:361.
- [2] 李凤鸣. 中华眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:11.
- [3] 宋寅伟,蔡小军. 翼状胬肉新生血管形成机制及其治疗的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志,2012,30(2):172-175. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.02.020.  
Song YW, Cai XJ. Research progress in angiogenesis mechanism and management of pterygium[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(2):172-175. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.02.020.
- [4] 赵博,吴江,景红,等. DNA 氧化损伤在翼状胬肉发病中的作用[J]. 中华实验眼科杂志,2013,31(2):160-163. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.013.  
Zhao B, Wu J, Jing H, et al. Effects of oxidative damage of DNA on pathogenesis of pterygium[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(2):160-163. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.013.
- [5] Seet LF, Tong L, Su R, et al. Involvement of SPARC and MMP-3 in the pathogenesis of human pterygium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(2):587-595. DOI:10.1167/iovs.11-7941.
- [6] Achigbu E, Ezepeue UF. Prevalence and severity of pterygium among commercial motorcycle riders in south eastern Nigeria[J]. Ghana Med J, 2014, 48(3):153-157. DOI:10.4314/gmj.v48i3.6.
- [7] Howell BG, Wang B, Freed I, et al. Microarray analysis of UVB-regulated genes in keratinocytes: downregulation of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1[J]. J Dermatol Sci, 2004, 34(3):185-194. DOI:10.1016/j.jdermsci.2004.01.004.
- [8] McKnight CM, Sherwin JC, Yazar S, et al. Pterygium and conjunctival ultraviolet autofluorescence in young Australian adults: the Raine study[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2015, 43(4):300-307. DOI:10.1111/ceo.12455.
- [9] Walsh JE, Bergmanson JP, Wallace D, et al. Quantification of the ultraviolet radiation (UVR) field in the human eye *in vivo* using novel instrumentation and the potential benefits of UVR blocking hydrogel contact lens[J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(9):1080-1085. DOI:10.1136/bjo.85.9.1080.
- [10] Tsai YY, Lee H, Tseng SH, et al. Evaluation of TNF-alpha and IL-1beta polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium[J]. Eye (Lond), 2005, 19(5):571-574. DOI:10.1038/sj.eye.6701580.
- [11] Sha X, Wen Y, Liu Z, et al. Inhibition of  $\alpha$ -smooth muscle actin expression and migration of pterygium fibroblasts by coculture with amniotic mesenchymal stem cells[J]. Curr Eye Res, 2014, 39(11):1081-1089. DOI:10.3109/02713683.2014.900806.
- [12] 程雪娟,张少斌,林林,等. 麦考酚酸抑制翼状胬肉成纤维细胞的作用机制[J]. 中华实验眼科杂志,2013,31(9):839-844. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.009.  
Cheng XJ, Zhang SB, Lin L, et al. The inhibitory effect of mycophenolic acid on pterygium fibroblast[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(9):839-844. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.009.
- [13] Kim KW, Park SH, Kim JC. Fibroblast biology in pterygia[J]. Exp Eye Res, 2016, 142:32-39. DOI:10.1016/j.exer.2015.01.010.
- [14] Kato N, Shimmura S, Kawakita T, et al. Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(4):1511-1517. DOI:10.1167/iovs.06-1060.

[15] Kim KW, Park SH, Wee SW, et al. Overexpression of angiogenin in pterygium body fibroblasts and its association with proliferative potency [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(9) : 6355-6362. DOI: 10.1167/iov.13-12141.

[16] Tyagi N, Bhardwaj A, Srivastava SK, et al. Development and characterization of a novel *in vitro* progression model for UVB-induced skin carcinogenesis [J/OL]. Sci Rep, 2015, 5 : 13894 [2019-03-01]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563561/. DOI: 10.1038/srep13894.

[17] Lu J, Guo JH, Tu XL, et al. Tiron inhibits UVB-induced AP-1 binding sites transcriptional activation on MMP-1 and MMP-3 promoters by MAPK signaling pathway in human dermal fibroblasts [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(8) : e0159998 [2019-03-01]. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0159998. DOI: 10.1371/journal.pone.0159998.

[18] Di Girolamo N, Coroneo M, Wakefield D. Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix

metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation [J]. Am J Pathol, 2005, 167(2) : 489-503. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62992-6.

[19] Schellini SA, Hoyama E, Oliveira DE, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in pterygium [J]. Arq Bras Oftalmol, 2006, 69(2) : 161-164. DOI: 10.1590/s0004-27492006000200005.

[20] Kim YH, Jung JC, Jung SY, et al. Cyclosporine A downregulates MMP-3 and MMP-13 expression in cultured pterygium fibroblasts [J]. Cornea, 2015, 34(9) : 1137-1143. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000477.

[21] Seet LF, Tong L, Su R, et al. Involvement of SPARC and MMP-3 in the pathogenesis of human pterygium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(2) : 587-595. DOI: 10.1167/iov.11-7941.

(收稿日期:2019-09-12 修回日期:2020-03-30)

(本文编辑:刘艳)

· 病例报告 ·

### 脉络膜骨瘤合并视网膜下积液诊疗一例

孙阿利 秦秀虹 陶媛 马翔

大连医科大学附属第一医院眼科 116011

通信作者:马翔, Email: xma9467@vip.sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200422-00279

#### Diagnosis and treatment of choroidal osteoma with subretinal fluid: a case report

Sun Ali, Qin Xiuhong, Tao Yuan, Ma Xiang

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China

Corresponding author: Ma Xiang, Email: xma9467@vip.sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200422-00279

患者,女,21岁,以左眼视力下降2个月并加重1周于2017年9月13日至大连医科大学附属第一医院就诊。既往体健。入院查体:视力右眼0.5(-0.50 DS+0.75 DC×100°=1.0),左眼0.06(-2.00 DS=0.4)。眼压右眼16 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼15 mmHg。右眼眼前节及眼底未见异常。左眼视盘边界清晰,上方可见一约8 PD边界清楚的黄白色病灶,视网膜动脉走行形及管径大致正常,黄斑中心凹反光消失(图1A)。B型超声检查可见左眼视盘区轻度隆起的高反射灶(图1B)。光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)示左眼视盘上方视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层及脉络膜层不均匀增厚隆起,结构不清,视盘上方及黄斑区视网膜神经上皮层下积液(图1C)。荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)示动脉期瘤体内不均匀脉络膜荧光,晚期瘤体内高荧光,其内有低荧光区(图1D)。吲哚青绿血管造影(indocyanine green angiography, ICGA)示左眼早期视盘周围瘤体呈弱荧光,其内可见丝状异常脉络膜血管,晚

期瘤体呈相对弱荧光,其内可见点状强荧光(图1E)。彩色超声检查示左眼视神经视盘局限高回声(考虑钙化)。眼部CT检查示左侧眼球后壁小片状致密影。诊断:左眼脉络膜骨瘤。于2017年9月21日行左眼首次玻璃体腔注射康柏西普,术后1周左眼视力未见提高,OCT检查黄斑中心凹视网膜厚度(central macular thickness, CMT)未见下降,术后1个月CMT值

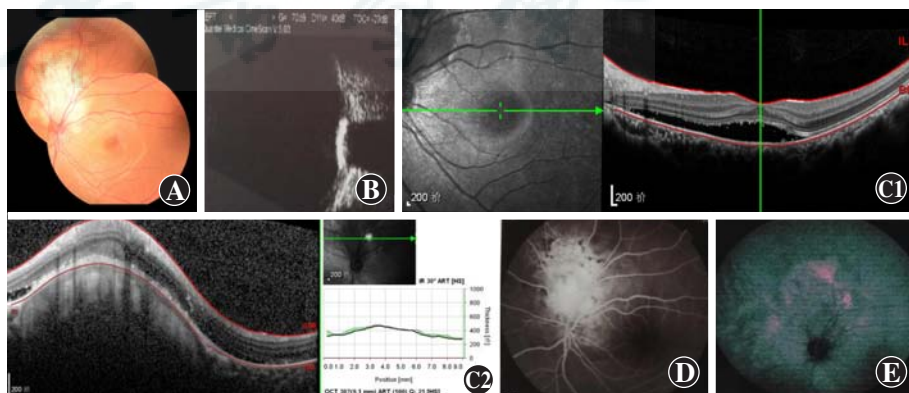


图1 治疗前患者左眼检查 A:彩色眼底照相示视盘上方可见边界清楚的黄白色病灶 B:B型超声检查示视盘区轻度隆起的高反射灶 C:OCT示左眼黄斑区及视盘区RPE层隆起,其下可见视网膜下积液,未见脉络膜新生血管(C1:黄斑区 C2:视盘上方瘤体) D:FFA示动脉期瘤体内充满不均匀脉络膜荧光,晚期瘤体内高荧光,其内有低荧光区 E:ICGA示早期视盘周围瘤体呈弱荧光,其内可见异常脉络膜血管,晚期瘤体呈相对弱荧光,其内可见点状强荧光