

· 实验研究 ·

结膜松弛症患者结膜成纤维细胞中穿透素 3 和肿瘤坏死因子- α 刺激基因 6 的表达

韩竹梅 张振永 张兴儒 柯梅青 李青松 项敏泓

【摘要】 背景 结膜松弛症是老年人中常见的眼表疾病,目前发病机制尚未明确,研究表明结膜松弛症常伴有局部炎症反应,炎性细胞因子在其发生和发展过程中发挥一定的作用。目的 探讨穿透素 3(PTX-3)和肿瘤坏死因子- α 刺激基因 6(TSG-6)在结膜松弛症患者结膜成纤维细胞中的表达。方法 纳入 2011 年 1 月至 2012 年 6 月在上海中医药大学附属普陀医院确诊的结膜松弛症患者 13 例 13 眼、年龄相关性白内障患者 16 例 16 眼及翼状胬肉患者 15 例 16 眼,在相应的手术治疗过程中收集结膜组织标本进行成纤维细胞的原代培养和传代。选取 3~6 代对数生长期细胞用于实验,采用(ELISA)法检测并比较 3 种细胞培养液上清中 PTX-3 和 TSG-6 蛋白的质量浓度。结果 倒置显微镜下观察组织块透亮性差,呈暗黑色区域,周围有细胞溢出,传至第 3 代,为形态一致的纤维样细胞,大小均一,呈放射状排列,长梭形或两头尖的长条状,细胞质中有一个卵圆形的细胞核,周围有长短不等的细胞突起相互交联。结膜松弛症组患者成纤维细胞培养液上清中 PTX-3 的质量浓度为 (2182.33 ± 738.68) pg/ml,明显高于年龄相关性白内障组的 (738.32 ± 335.00) pg/ml 和翼状胬肉组的 (981.37 ± 416.04) pg/ml,3 个组间总体差异有统计学意义 ($F = 6.474, P = 0.032$) ;结膜松弛症组、翼状胬肉组和年龄相关性白内障组患者成纤维细胞培养液上清中的 TSG-6 的质量浓度分别为 (59.10 ± 6.52) 、 (53.99 ± 11.16) 和 (35.01 ± 5.33) pg/ml,3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 7.421, P = 0.024$) ,其中年龄相关性白内障组患者成纤维细胞培养液上清中 TSG-6 的质量浓度明显低于结膜松弛症组和翼状胬肉组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),但结膜松弛症组与翼状胬肉组间 TSG-6 的质量浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 炎症反应参与结膜松弛症的发生和发展过程,PTX-3、TSG-6 在局部组织中的表达上调发挥一定作用。

【关键词】 结膜疾病; 成纤维细胞; Tenon 囊; 细胞培养; 酶联免疫吸附测定法; 结膜松弛症; 抗炎剂

Expressions of pentraxin-3 and tumor necrosis factor- α stimulated gene-6 proteins in fibroblasts of conjunctivochalasis patients Han Zhumei, Zhang Zhenyong, Zhang Xingru, Ke Meiqing, Li Qingsong, Xiang Minhong. Department of Ophthalmology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Corresponding author: Zhang Xingru, Email: zhangxingru928@hotmail.com

[Abstract] **Background** Conjunctivochalasis is an age-related inflammatory ocular surface disease manifesting redundant, loose conjunctiva folds. Studies showed that conjunctivochalasis often accompanies with inflammatory response, indicating that a variety of inflammatory cytokines are involved in pathogenesis of conjunctivochalasis. **Objective** This study attempted to investigate the expressions of pentraxin-3 (PTX-3) and tumor necrosis factor- α stimulated gene-6 (TSG-6) proteins in fibroblasts of conjunctivochalasis. **Methods** The protocol was approved by Ethic Committee of Putuo Hospital affiliated Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Thirteen eyes of 13 patients with conjunctivochalasis, 16 eyes of 16 patients with age-related cataract and 16 eyes of 15 patients with pterygium were included in Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Medicine from January, 2011 to June, 2012. The samples of conjunctival tissue were collected in the patients during surgery under the informed consent, and fibroblasts were cultured and passaged by explant culture method. Content of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.010

基金项目: 上海市教委计划内项目(2011JW63); 上海市卫生局科研基金项目(A-175)

作者单位: 200062 上海中医药大学附属普陀医院眼科

通信作者: 张兴儒, Email: zhangxingru928@hotmail.com

PTX-3 和 TSG-6 蛋白在细胞上清液中检测到。 **Results** 透明的暗黑色区域围绕在细胞溢出周围。培养的第三代细胞显示为长梭形，大小均匀，向所有方向辐射，椭圆形核位于细胞质中，被交叉连接的细胞突起包围。PTX-3 蛋白在细胞上清液中的浓度为 (2182.33 ± 738.68) pg/ml，在结膜松弛症组中最高，高于年龄相关性白内障组 (738.32 ± 335.00) pg/ml 和翼状胬肉组 (981.37 ± 416.04) pg/ml，显示三组间有显著差异 ($F=6.474$, $P=0.032$)。TSG-6 蛋白在细胞上清液中的含量为 (59.10 ± 6.52) pg/ml, (53.99 ± 11.16) pg/ml 和 (35.01 ± 5.33) pg/ml 在结膜松弛症组、翼状胬肉组和年龄相关性白内障组中，显示三组间有显著差异 ($F=7.421$, $P=0.024$)，而 TSG-6 蛋白在年龄相关性白内障组中的含量最低，然而，翼状胬肉组与结膜松弛症组之间无显著差异 ($P>0.05$)。 **Conclusions** 炎症反应参与结膜松弛症的发病机制，PTX-3 和 TSG-6 在纤维细胞中的表达上调可能与炎症过程有关。

[Key words] 结膜松弛症；成纤维细胞；Tenon 囊；细胞培养；酶联免疫吸附试验；翼状胬肉；抗炎药物

结膜松弛症是老年人常见的眼表疾病^[1-2]，常伴不同程度的角膜结膜炎和睑板腺炎^[3]，患者泪液中白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、IL-6 和 IL-8 等炎性因子含量高于正常人群^[4-5]，提示局部炎症反应可能参与结膜松弛症的发生和发展。穿透素 3 (pentraxin-3, PTX-3) 和肿瘤坏死因子-α 刺激基因 6 (tumor necrosis factor-α stimulated gene-6, TSG-6) 均是新近发现的组织炎症反应标志物，影响炎症过程和转归^[6-7]。TSG-6 和 PTX-3 在正常组织不表达，而在炎症性疾病发生和发展过程中表达上调以发挥抗炎作用，TSG-6 可通过抑制基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的活化而对角膜发挥保护作用。翼状胬肉和结膜松弛症都属于眼表炎症性疾病^[8-9]，患者的结膜组织和培养的成纤维细胞中存在 MMPs 与组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 间的表达失衡^[10-11]。有研究发现翼状胬肉组织成纤维细胞中的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 呈高表达^[12]。另有研究发现，PTX-3 在结膜松弛症患者的结膜下组织和 Tenon 囊中呈阳性表达，TSG-6 表达阳性的成纤维细胞比例增加^[13-14]，但 PTX-3 和 TSG-6 在结膜松弛症结膜成纤维细胞中的表达情况鲜有报道。本研究检测结膜松弛症患者结膜囊成纤维细胞中 PTX-3、TSG-6 的表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本的采集

纳入 2011 年 1 月至 2012 年 6 月在上海中医药大学附属普陀医院确诊的拟行结膜切除术的结膜松弛症

患者 13 例 13 眼，年龄 54~82 岁，平均 (68.08 ± 8.42) 岁，按照 Zhang 等^[15] 的结膜松弛症分级标准分为Ⅱ级 3 眼、Ⅲ级 9 眼和Ⅳ级 1 眼；纳入同期拟行超声乳化白内障摘除术单纯年龄相关性白内障患者 16 例 16 眼作为年龄相关性白内障组，年龄 56~85 岁，平均 (70.14 ± 8.43) 岁；另纳入同期拟行单纯性翼状胬肉切除术的患者 15 例 16 眼为翼状胬肉组，年龄 53~79 岁，平均 (67.43 ± 8.28) 岁。分别收集患者术中切除的结膜组织样本进行研究。该研究获得上海中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准，患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、青链霉素溶液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶溶液（上海博谷生物科技有限公司）；成纤维细胞生长添加物 (fibroblast growth supplement, FGS)（北京裕恒丰生物科技有限公司）；ELISA 试剂盒 (人 PTX-3、人 TSG-6)（上海明睿生物有限公司）。CO₂ 培养箱（日本 SANYO 公司）；超净工作台（苏净集团安泰公司）；倒置显微镜（德国 WILOVERT 公司）；低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；酶标检测仪（美国 BIO-RAD 公司）。

1.2 方法

1.2.1 结膜囊成纤维细胞的培养 参照文献[16]的方法，将切取的球结膜组织置于 9 g/L 生理盐水中漂洗 3 次，用眼科显微剪刀将组织剪成 $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 或 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小，平铺于 6 孔板内，将 6 孔板翻转为底朝上，然后置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养，待组织块接近干燥时将 6 孔板翻转至底向，缓慢加入 3 ml 含体积分数 10% 胎牛血清、青链霉素、0.1% FGS 的 DMEM 培养液，勿使组织浮起，继续培养

并传代,每 3 天换液 1 次,在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁及培养情况。

1.2.2 ELISA 法检测培养液上清中 PTX-3、TSG-6 的质量浓度 选取 3~6 代对数生长至 90% 融合细胞,用含 10% 牛血清的 DMEM 培养液配制成 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,接种于 24 孔板,每孔 1 ml。于培养后 24 h 弃培养液,加无血清 DMEM 培养液,每孔 1 ml,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集各孔培养上清,离心半径 6 cm,1 500 r/min 离心 20 min,取上清,分装于无菌 EP 管中,后 -20 °C 保存,按照 ELISA 试剂盒说明书的步骤检测 PTX-3、TSG-6 质量浓度。用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A_{450}) 值,根据标准品 A_{450} 值及其相对应的质量浓度作标准曲线计算培养上清液中 PTX-3、TSG-6 的质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件(序列号 4106532834)进行统计分析。本研究测试指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。本研究测试指标的数据资料采用均衡分组单因素三水平实验设计,3 个组培养液上清中 PTX-3、TSG-6 质量浓度的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 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

组织块贴壁法原代培养 2~5 d 见组织块能贴壁长生,倒置显微镜下可见组织块透亮性差,呈暗黑色,周围有细胞溢出,10~15 d 可见细胞增生,组织块周围的细胞环逐渐向周围扩散,细胞形态不均,界线不清。培养 20 d 细胞融合至 80%。第 3 代的细胞形态一致,大小均一,呈放射状排列,呈长梭形,可见卵圆形的细胞核及细胞周围的突起(图 1,2)。

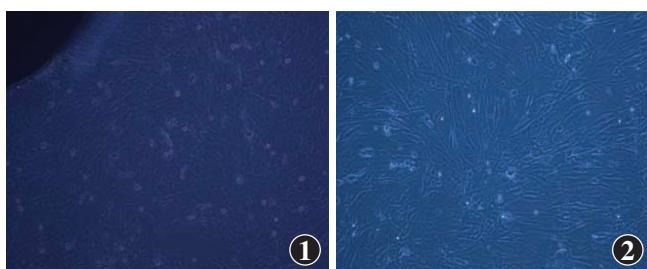


图 1 球结膜组织成纤维细胞原代培养球结膜组织块周围有细胞溢出($\times 100$) 图 2 球结膜第 3 代成纤维细胞形态均匀、大小一致的纤维样细胞,放射状排列($\times 100$)

2.2 各组细胞培养液上清中 PTX-3 质量浓度比较

3 个组细胞培养液上清中 PTX-3 蛋白质量浓度的总体差异有统计学意义($F = 6.474, P = 0.032$),其中结膜松弛症组细胞培养上清液中 PTX-3 蛋白质量浓度明显高于年龄相关性白内障组和翼状胬肉组,差异均有统计学意义($P = 0.015, 0.031$),而年龄相关性白内障组与翼状胬肉组间 PTX-3 蛋白质量浓度的比较差异无统计学意义($P = 0.592$)(表 1)。

2.3 各组细胞培养液上清中 TSG-6 质量浓度比较

3 个组细胞培养液上清中 TSG-6 质量浓度的总体比较差异有统计学意义($F = 7.421, P = 0.024$),其中结膜松弛症组细胞培养上清液中 TSG-6 质量浓度明显高于年龄相关性白内障组,差异有统计学意义($P = 0.011$),年龄相关性白内障组细胞上清液中 TSG-6 质量浓度明显低于翼状胬肉组,差异有统计学意义($P = 0.028$),而结膜松弛症组与翼状胬肉组间细胞上清液中 TSG-6 质量浓度的差异无统计学意义($P = 0.468$)(表 1)。

表 1 各组细胞培养上清液中 PTX-3 和 TSG-6 质量浓度比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	样本量	PTX-3	TSG-6
结膜松弛症组	3	2 182. 33 ± 738. 68	59. 10 ± 6. 52
年龄相关性白内障组	3	738. 32 ± 335. 00 ^a	35. 01 ± 5. 33 ^a
翼状胬肉组	3	981. 37 ± 416. 04 ^a	53. 99 ± 11. 16 ^b
<i>F</i>		6. 474	7. 421
<i>P</i>		0. 032	0. 024

注:与各自的结膜松弛症组比较,^a $P < 0.05$;与各自的年龄相关性白内障组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-t 检验) PTX-3:穿透素 3;TSG-6:肿瘤坏死因子-α 刺激基因 6

3 讨论

结膜松弛症中球结膜组织的弹力纤维减少,胶原纤维溶解,结膜成纤维细胞中 MMP-1 和 MMP-3 的表达明显上调^[17],推测结膜松弛症与结膜成纤维细胞中 MMPs 的过度表达有关。研究还发现,结膜松弛症患者中结膜组织的慢性炎症普遍存在^[18],结膜组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 等炎性细胞因子的上调可能参与结膜松弛症的发生和发展^[4~5]。Zhang 等^[19]研究发现,结膜松弛症患者的结膜组织中可表达调节凋亡相关蛋白,由此可见,这些凋亡及炎症相关蛋白和结膜松弛症有一定的关联。

PTX-3 是一组具有免疫防御特性的钙结合蛋白家族,由 5 个相同的亚基形成环状五聚体^[20~21]。PTX-3 是最初从人皮肤 FS-4 成纤维细胞系中分离和鉴定出来的分泌型糖结合蛋白,相对分子质量为 45 000。PTX-3 参与机体的天然免疫、炎症反应的调节、细胞外

基质的重建和女性的生殖功能的维持^[22]。PTX-3 主要表达于骨髓源性树突状细胞、内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、滑膜细胞、软骨细胞中并在相应的组织局部发挥作用,也可在产生后储存于中性粒细胞中,当组织损伤或者发生炎症反应时迅速释放出来^[23]。在正常人血清中 PTX-3 表达水平很低,在正常结膜下组织和 Tenon 囊中均不表达,但在结膜松弛症患者的结膜下组织和 Tenon 囊中呈阳性表达^[13]。TSG-6 最初是从体外培养的人皮肤 FS-4 成纤维细胞分离出来的、相对分子质量为 35 000 的分泌型糖结合蛋白^[24],在大多数正常组织细胞中不表达,但是在炎性因子,如 TNF- α 、IL-1 β 和多种生长因子^[25],参与疾病的炎症反应过程。研究表明,TSG-6 在正常结膜组织中有表达,但在结膜松弛症患者的结膜下组织和 Tenon 囊中表达上调,主要表达于上皮细胞和成纤维细胞的细胞质和细胞外基质。结膜松弛症患者结膜组织中 TSG-6 阳性成纤维细胞的比例高于正常结膜组织^[14]。

本研究发现结膜松弛症患者结膜组织中 2 种抗炎因子的质量浓度均高于年龄相关性白内障患者的正常结膜组织,证实炎症反应可能参与了结膜松弛症的发生和发展,但同为炎症相关性疾病的翼状胬肉组织与年龄相关性白内障患者的正常结膜组织细胞培养液上清中 PTX-3 质量浓度接近,而 TSG-6 质量浓度却显著高于年龄相关性白内障患者的正常结膜组织,提示 TSG-6 均参与了结膜松弛症及翼状胬肉的形成。

本研究组的系列研究结果提示,结膜松弛症的发生和发展过程中存在多种病理改变,包括 MMPs/TIMPs 的平衡失调、泪液中炎性因子表达显著升高、细胞凋亡和调节凋亡相关蛋白的改变、炎症反应相关蛋白的改变以及 PTX-3 及 TSG-6 表达上调。我们需要关注 PTX-3 和 TSG-6 是通过何种信号通路影响 MMPs 异常表达,进而导致结膜发生胶原溶解、弹力纤维变性等结膜松弛症的特征性改变。

参考文献

- [1] Zhang X, Li Q, Zou H, et al. Assessing the severity of conjunctivochalasis in a senile population: a community-basedepidemiology study in Shanghai, China[J]. BMC Public Health, 2011, 11 (31) : 198–204. doi:10.1186/1471-2458-11-198.
- [2] 韩竹梅,张兴儒,周欢明,等.两种结膜松弛症诊断与分级标准对老年人群患病率的调查[J].中华眼视光学与视觉科学杂志,2012,14(8):494–498. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2012.08.011.
- [3] 张兴儒,周欢明,李青松,等.结膜松弛症睑板腺功能的临床观察[J].中华眼视光学与视觉科学杂志,2011,13(5):378–381. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2011.05.013.
- [4] 项敏泓,张兴儒,张迅轶,等.结膜松弛症泪液中细胞因子的检测[J].国际眼科杂志,2010,10(9):1702–1703. doi:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.020.
- [5] 张兴儒,项敏泓,吴庆庆,等.结膜松弛症患者泪液蛋白质组学研究[J].中华眼科杂志,2009,45(2):135–140. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2009.02.010.
- [6] Okutani D. The role of long pentraxin 3, a new inflammatory mediator in inflammatory responses [J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2006,29(3):107–113.
- [7] Milner CM, Higman VA, Day AJ. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34 (3) : 446–450. doi:10.1042/BST0340446.
- [8] Anguria P, Carmichael T, Ntuli S, et al. Chronic inflammatory cells and damaged limbal cells in pterygium[J]. African Health Sciences, 2013, 13 (3) : 725–730. doi:10.4314/ahs.v13i3.29.
- [9] Ward SK, Wakamatsu TH, Dogru M, et al. The role of oxidative stress and inflammation in conjunctivochalasis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010,51(4):1994–2002. doi:10.1167/ios.09-4130.
- [10] An MX, Wu KL, Lin SC. Detection and comparison of matrix metalloproteinase in primary and recurrent pterygium fibroblasts [J]. Inter J Ophthalmol, 2011,4(4):353–356. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2011.04.05.
- [11] 韩竹梅,张兴儒,柯梅青,等.基质金属蛋白酶及其组织抑制剂在结膜松弛症成纤维细胞中的表达[J].中国眼耳鼻喉科杂志,2013,13(11):365–367.
- [12] Siak JJ, N9 SL, Seet LF, Beuerman RW, et al. The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterygium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011,52(1):230–236. doi:10.1167/ios.10-5735.
- [13] Guo P, Zhang SZ, He H, et al. PTX3 controls activation of matrix metalloproteinase 1 and apoptosis in conjunctivochalasis fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012,53 (7) : 3414–3423. doi:10.1167/ios.11-9103.
- [14] Guo P, Zhang SZ, He H, et al. TSG-6 controls transcription and activation of matrix metalloproteinase 1 in conjunctivochalasis [J]. Thalmol Vis Sic, 2012,53 (3) : 1372–1380. doi:10.1167/ios.11-8738.
- [15] Zhang XR, Zou HD, Li QS, et al. Comparison study of two diagnostic and grading systems for conjunctivochalasis [J]. Chin Med J, 2013, 126 (16) : 3118–3123.
- [16] 韩竹梅,张兴儒,张隆,等.结膜松弛症患者球结膜成纤维细胞的培养和鉴定[J].眼科,2013,22(2):105–109.
- [17] Li D, Meller D, Liu Y, et al. Overexpression of MMP-1 and MMP-3 by cultured conjunctivochalasis fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000,41(2):404–410.
- [18] 张兴儒,项敏泓,李青松,等.结膜松弛症的发病机理研究[J].国际眼科杂志,2008,8(5):1001–1005.
- [19] Zhang XR, Xiang MH, Wu QQ, et al. The tear proteomics analysis of conjunctivochalasis[J]. Speaktrum der Augenheilkund, 2009,45 (2) : 135–140.
- [20] Mantovani A, Garlanda C, Doni A, et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3 [J]. J Clin Immunol, 2008,28(1):1–13. doi:10.1007/s10875-007-9126-7.
- [21] Ye L, Mora R, Akhayani N, et al. Growth factor and cytokine-regulated hyaluronan-binding protein TSG-6 is localized to the injury-induced rat neointima and confers enhanced growth in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1997, 81 (3) : 289–296. doi:10.1161/01. RES. 81.3.289.
- [22] Willeke F, Assad A, Findeisen P, et al. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma[J]. Eur J Cancer, 2006,42 (15) : 2639–2646.
- [23] Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23 : 337–366. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756.
- [24] Wisniewski HG, Vilcek J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1997, 8 (2) :143–156. doi:10.1016/S1359-6101(97)00008-7.
- [25] Lee TH, Lee GW, Ziff EB, et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts[J]. Mol Cell Biol, 1990,10 : 1982–1988. doi:10.1128/MCB.10.5.1982.

(收稿日期:2014-12-19)

(本文编辑:尹卫婧 杜娟)