

全反式维甲酸对翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响

彭细峰, 姜文浩, 颜 坚, 邓江涛, 程 芳

作者单位: (518116) 中国广东省深圳市龙岗中心医院眼科
作者简介: 彭细峰, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼眶病、眼表疾病。
通讯作者: 姜文浩, 男, 主任医师, 研究方向: 眼科临床。jwhxxy@yahoo.com.cn
收稿日期: 2013-01-06 修回日期: 2013-04-12

Effect of all trans - retinoic acid on the proliferation of human pterygium fibroblasts

Xi-Feng Peng, Wen-Hao Jiang, Jian Yan, Jiang-Tao Deng, Fang Cheng

Department of Ophthalmology, Central Hospital of Longgang District, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wen-Hao Jiang. Department of Ophthalmology, Central Hospital of Longgang District, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China. jwhxxy@yahoo.com.cn
Received: 2013-01-06 Accepted: 2013-04-12

Abstract

- **AIM:** To investigate the effect of all trans- retinoic acid (ATRA) on proliferation of human pterygium fibroblasts (HPF) *in vitro* and search for a new method to prevent the recurrence after pterygium surgery.
- **METHODS:** HPF was cultivated *in vitro*. MTT assay was used to detect the effect on proliferation of HPF after incubation for 24 hours, 48 hours and 72 hours in the different concentration of ATRA. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in each group was detected by immunohistochemical staining.
- **RESULTS:** Administration of 10^{-8} mmol/L ATRA for 24 hours could significantly inhibit HPF proliferation in a dose- and- time dependent manner ($P < 0.05$). ATRA could inhibit the expression of PCNA in HPF in a dose - dependent manner ($P < 0.05$).
- **CONCLUSION:** ATRA can significantly inhibit HPF proliferation.
- **KEYWORDS:** all trans- retinoic acid; pterygium; human pterygium fibroblasts; proliferation

Citation: Peng XF, Jiang WH, Yan J, *et al.* Effect of all trans- retinoic acid on the proliferation of human pterygium fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(5):869-871

摘要

目的: 观察全反式维甲酸(ATRA)对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞(HPF)增殖的影响,寻找治疗和预防翼状胬肉复发的新途径。
方法: 体外培养翼状胬肉患者成纤维细胞;将不同浓度的ATRA作用于成纤维细胞分别达24,48h和72h后,MTT法检测ATRA对HPF的影响,免疫组织化学染色增生细胞核抗原(PCNA)检测细胞生长活性。
结果: MTT法显示 10^{-8} mmol/L ATRA作用24h后能抑制HPF的增殖($P < 0.05$),呈剂量和时间依赖性。ATRA能浓度依赖性地抑制细胞表达PCNA($P < 0.05$)。
结论: ATRA能够显著抑制HPF的增殖。
关键词: 全反式维甲酸;翼状胬肉;成纤维细胞;增殖
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.08

引用: 彭细峰,姜文浩,颜坚,等.全反式维甲酸对翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响.国际眼科杂志2013;13(5):869-871

0 引言

翼状胬肉是眼科的常见疾病,其确切发病机制目前尚未完全明了。研究表明,病变组织中含有大量增生的成纤维细胞,并由此进一步演变而导致相应的病理及临床变化。治疗翼状胬肉的手术方法很多,但均不能很有效地降低其复发率^[1]。临床至今也缺少根治的理想疗法。因此寻找有效的治疗措施抑制其发生发展,降低其复发率已经成为临床大家所关注的话题。全反式维甲酸(all trans-retinoic acid, ATRA)对某些正常细胞的增殖和凋亡具有很强的调节作用,特别是其具有抑制成纤维细胞的增殖、减少胶原合成等多项功能,这已经在很多动物实验和临床研究中得到证实^[2,3]。本实验以翼状胬肉患者成纤维细胞为实验对象,检测ATRA对翼状胬肉成纤维细胞(HPF)增殖的影响,从而为治疗翼状胬肉提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ATRA(Alfa aesar公司),RPMI 1640培养液(Gibco公司),胎牛血清、小牛血清(杭州四季青生物公司),MTT,DMSO,PBS液,胰蛋白酶,EDTA,青霉素,链霉素均为Sigma公司产品;小鼠抗人角蛋白及波形蛋白单克隆抗体、小鼠抗人PCNA单克隆抗体和羊抗鼠IgG为武汉博士德公司产品。恒温二氧化碳培养箱(Shellab公司),倒置显微镜(Olympus公司),DG-3022A型酶联免疫检测仪(FACS,美国BD公司)。新鲜翼状胬肉组织来自于深圳市龙岗中心医院手术室。

表1 ATRA对成纤维细胞增殖的影响

组别	24h		48/h		72h	
	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	A 值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
对照组	0.512±0.022	0	0.385±0.012	0	0.297±0.032	0
10 ⁻⁸ mmol/L组	0.488±0.025 ^a	4.68	0.359±0.023 ^a	6.75	0.228±0.015 ^a	23.23
10 ⁻⁷ mmol/L组	0.414±0.031 ^a	19.14	0.287±0.016 ^a	25.45	0.175±0.032 ^a	41.07
10 ⁻⁶ mmol/L组	0.387±0.012 ^a	24.41	0.248±0.042 ^a	35.58	0.139±0.017 ^a	53.19
10 ⁻⁵ mmol/L组	0.255±0.016 ^a	50.19	0.164±0.031 ^a	57.40	0.093±0.014 ^a	68.68

^aP<0.05 vs 对照组。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养 利用组织块培养法采用含200mL/L小牛血清的DMEM培养基将细胞常规培养于温箱中。待细胞长满瓶底80%后按1:3传代。取第3~4代细胞进行实验。制备细胞爬片,SP法染色进行鉴定。

1.2.2 MTT检测 ATRA对细胞增殖的影响 实验分为:将消化好的第3代成纤维细胞按1×10⁴/mL转移到96孔板内,共设5组,每组设复孔4孔,培养24h待细胞贴壁后加药。全反式维甲酸设阴性对照组、10⁻⁸mmol/L、10⁻⁷mmol/L、10⁻⁶mmol/L和10⁻⁵mmol/L组,另一组为空白对照组用于调零。分别继续培养24,48h和72h。吸去上清液,每孔加入MTT 20μL,孵育4h,加120μL DMSO,震荡后用酶标仪测490nm波长处的各孔光吸收值(A值)。计算细胞生长抑制率,求其平均值。实验组细胞抑制率(%)=(阴性对照组平均A值-实验组平均A值)/阴性对照组平均A值×100%。

1.2.3 免疫组化检测 ATRA对PCNA表达的影响 做6孔板细胞爬片后用10⁻⁸mmol/L、10⁻⁷mmol/L、10⁻⁶mmol/L和10⁻⁵mmol/L的ATRA作用48h,对照组不加药。免疫组织化学SABC法染色检测PCNA的表达。随机计数(放大倍率×200)100个细胞,数出全部阳性细胞及阴性细胞并列表。

统计学分析:所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同浓度、不同时间 ATRA对细胞作用结果与对照组的差异用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理。各组数据采用重复测量的方差分析,各实验组与对照组的比较用t检验;细胞PCNA阳性表达数采用卡方检验。以P<0.05为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 翼状胬肉成纤维细胞免疫组织化学鉴定 体外培养的翼状胬肉成纤维细胞经SP法染色可见波形蛋白表达阳性,位于胞浆,呈现与成纤维细胞长轴方向一致棕黄色束状或网状结构;细胞角蛋白表达阴性。

2.2 ATRA对HPF增殖的影响 倒置相差显微镜下观察对照组细胞呈长梭形或分枝状,胞膜有光泽,胞体狭长、透亮,胞浆丰富、均匀,中央有圆形或椭圆形的胞核,且随着时间的延长,细胞密度显著增高。用药组部分细胞形态发生改变,细胞数较对照组明显减少,形态不规则且折光性

表2 不同浓度 ATRA对HPF表达PCNA的影响

组别	PCNA表达细胞数		标记指数(%)
	-	+	
对照组	15	85	85
10 ⁻⁸ mmol/L组	18	82	82 ^a
10 ⁻⁷ mmol/L组	26	74	74 ^a
10 ⁻⁶ mmol/L组	40	60	40 ^a
10 ⁻⁵ mmol/L组	67	33	33 ^a

^aP<0.05 vs 对照组。

减弱,胞浆中出现颗粒样物质。不同浓度 ATRA干预成纤维细胞24,48h和72h后,采用t检验法分别比较各作用时间点,浓度组与对照组细胞A值的差别,各作用时间点各浓度组与对照组细胞A值的差异均有统计学意义(P<0.05,表1)。

2.3 免疫组化检测 ATRA对HPF表达PCNA的影响 细胞阳性表达显示为棕黄色、黄色或浅黄色细小均匀颗粒,分布于整个细胞核;细胞核无着色,胞浆呈淡黄色为阴性。ATRA浓度≥10⁻⁸mmol/L即能浓度依赖性地抑制HPF表达PCNA(P<0.05,表2)。

3 讨论

翼状胬肉不仅发病率较高,单纯手术治疗后复发率也高。眼部成纤维细胞异常增殖在多种增生性眼病中担任重要角色,如各种原因所致的眼内纤维组织过度增殖而引起的PVR、抗青光眼术后滤过口瘢痕组织增生所致的滤过道阻塞、甲状腺相关眼病球后成纤维细胞增生等。病理学研究表明成纤维细胞在翼状胬肉的发生发展中起重要作用,是翼状胬肉发病中的靶细胞和效应细胞。寻找高效低毒用于翼状胬肉治疗和术后复发的药物已是一项重要的研究课题。

研究证实全反式维甲酸有抗纤维增生等作用。近年来,围绕抗增殖作用、抗纤维化,人们尝试了多种药物,其中多数为抗肿瘤药物,如5-氟尿嘧啶^[4]、丝裂霉素^[5]等。由于这些药物对正常组织毒副作用较大,因此限制了其临床应用。维甲酸是维生素A在体内氧化代谢的中间产物,亦可人工合成。现在已知维甲酸受体广泛存在于全身各种组织,眼部组织如角膜、结膜和视网膜细胞中亦存在相应的维甲酸受体,为维甲酸在眼部的应用提供了理论依据。有学者认为,ATRA可抑制Ca²⁺进入细胞内,使细胞

内 Ca^{2+} 浓度下降,从而影响了其增殖能力。其中成纤维细胞是 ATRA 重要的靶细胞,ATRA 能抑制成纤维细胞增殖。本实验用体外细胞培养的方法^[6,7]观察了 ATRA 对翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响。我们发现,ATRA 能显著抑制成纤维细胞的生长,ATRA 对成纤维细胞生长的抑制率随着药物作用时间的延长和作用浓度的升高而增大。 10^{-8} mmol/L, 10^{-7} mmol/L, 10^{-6} mmol/L 和 10^{-5} mmol/L 浓度的 ATRA 作用于成纤维细胞 72h 后,细胞生长的抑制率分别为 23.23%, 41.07%, 53.19% 和 68.68%; 10^{-5} mmol/L 浓度的 ATRA 作用于成纤维细胞 24, 48, 72h 后,其抑制率分别为 50.19%, 57.40% 和 68.68%。即 ATRA 是以时间、剂量依赖性方式抑制成纤维细胞的生长。抑制作用在干预 24h 后即可观察到,并随着药物浓度以及作用时间的增加而增强。我们的研究结果与其他学者的研究一致。PCNA 是一种核内蛋白,直接参与核内 DNA 的合成,与细胞增生活动密切相关,可作为一种准确、简便地研究细胞增生状况的指标^[8]。ATRA 浓度 $\geq 10^{-8}$ mmol/L 即能浓度依赖性地抑制 HPF 表达 PCNA,与 MTT 检测结果一致。因此我们可以推测当 ATRA 作用于成纤维细胞较长时间及浓度较高时,可能参与了诱导成纤维细胞的凋亡来抑制其增殖。

本实验结果表明,ATRA 能抑制翼状胬肉成纤维细胞

细胞的生长和增殖,且呈时间和剂量依赖性,提示 ATRA 在治疗翼状胬肉方面有良好的应用前景,为今后翼状胬肉的临床研究提供了新的思路。但目前研究仅限于离体实验,但体内试验的效果如何,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Yalcin TO, Burcu NA, Ergun G, *et al.* Topical cyclosporine A in the prevention of pterygium recurrence. *Ophthalmologica* 2008; 222: 391-396
- 2 Xu G, Bochaton-Piallat ML, Andreutti D, *et al.* Regulation of alpha-smooth muscle actin and CRBP-1 expression by retinoic acid and TGF-beta in cultured fibroblasts. *J Cell Physiol* 2001; 187(3): 315-325
- 3 Pasquali D, Bellastella A, Colantuoni V. All-trans retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide-induced growth arrest and apoptosis in orbital fibroblasts in Graves disease. *Metabolism* 2003; 52(11): 1387-1392
- 4 Valczi VG, Schellini SA, Viveiros MM, *et al.* Safety and efficacy of intraoperative 5-fluorouracil infiltration in pterygium treatment. *Arq Bras Oftalmol* 2009; 72(2): 169-173
- 5 Donnenfeld ED, Perry HD, Fromer S, *et al.* Subconjunctival mitomycin C as adjunctive therapy before pterygium excision. *Ophthalmology* 2003; 110: 1012-1016
- 6 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司 2004: 71
- 7 郝尚臣, 刘祖国. 人翼状胬肉细胞的分离和培养. 眼科学报 2006; 22(1): 25-29
- 8 Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 1046-1048