

TGF- β 1 和 HSP-47 在翼状胬肉中的表达及其意义

阎 慧, 盘如刚, 姚莎莎, 杨志蓉

作者单位: (625000) 中国四川省雅安市人民医院眼科

作者简介: 阎慧, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼表疾病的相关研究。

通讯作者: 盘如刚, 博士, 主任医师, 副院长, 研究方向: 青光眼相关研究. pangrugang@tom.com

收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-05-28

TGF - β 1 and HSP - 47 expression in pterygium

Hui Yan, Ru - Gang Pan, Sha - Sha Yao, Zhi - Rong Yang

Department of Ophthalmology, Ya'an People's Hospital, Ya'an 625000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Ru-Gang Pan. Department of Ophthalmology, Ya'an People's Hospital, Ya'an 625000, Sichuan Province, China. pangrugang@tom.com

Received: 2013-12-18 Accepted: 2014-05-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and heat shock protein 47 (HSP-47), in pterygium and normal conjunctiva tissues, in order to study the roles of these cytokines played in the pathogenesis in human pterygium.

• **METHODS:** The expression difference of TGF- β 1, HSP-47 between human pterygium and normal conjunctive tissues were compared by immuno-histochemistry technique.

• **RESULTS:** The positive expression of TGF- β 1, HSP-47 was stronger than in normal conjunctive tissues ($P < 0.05$), the TGF- β 1 expressed in all layers of pterygium, especially in the squamous epithelium, in the inflammation cells and vascular endothelial cells also expressed. The HSP-47 showed higher expressed in the lamina propria layer of pterygium, and weakly expressed in epithelial layer, no obvious expression in normal conjunctive tissues.

• **CONCLUSION:** Over-expression of TGF- β 1 and HSP-47 in pterygium compared to the normal conjunctiva tissues may play a critical role during the occurrence, development and invasion of the pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; TGF- β 1; HSP-47

Citation: Yan H, Pan RG, Yao SS, et al. TGF- β 1 and HSP-47 expression in pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14 (7): 1203-1205

摘要

目的: 研究转化生长因子 β 1 (transforming growth factor - β 1, TGF- β 1) 和热休克蛋白 47 (heat shock protein 47, HSP-47) 在翼状胬肉和正常结膜组织表达的差异, 从而探讨它们在翼状胬肉发生、发展中的作用, 为翼状胬肉的治疗提供新的方向。

方法: 采用免疫组化方法比较翼状胬肉和正常结膜组织中 TGF- β 1 和 HSP-47 的表达差异。

结果: TGF- β 1 在翼状胬肉的鳞状上皮细胞中的表达水平明显高于正常结膜组织, 在其基质层和内皮层有中等量表达, 同时, 在翼状胬肉纤维层的炎症细胞和血管内皮细胞中 TGF- β 1 也有明显表达。与此相反, 在正常结膜组织中 TGF- β 1 表达较弱。HSP-47 在翼状胬肉的固有层高表达, 在上皮细胞表达较弱, 在正常结膜组织中则未见明显表达。

结论: 相比正常结膜组织, TGF- β 1 和 HSP-47 均在翼状胬肉组织中有较高水平的表达, 因此推测二者在诱导翼状胬肉的发生、发展中起着重要的作用。

关键词: 翼状胬肉; 转化生长因子 β 1; 热休克蛋白 47

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.07.06

引用: 阎慧, 盘如刚, 姚莎莎, 等. TGF- β 1 和 HSP-47 在翼状胬肉中的表达及其意义. *国际眼科杂志* 2014; 14(7): 1203-1205

0 引言

翼状胬肉是一种眼科常见病, 由于可造成角膜散光、角膜斑翳常导致患者视力明显下降。之前, 它一直被认为是结膜组织的一种退行性疾病, 目前研究表明, 翼状胬肉的形成与炎症和纤维血管组织的过度增生密切相关^[1-3]。而这种纤维血管组织的增生程度也被认为是翼状胬肉处于活动期或是静止期的重要依据。

转化生长因子 β 1 (transforming growth factor - β 1, TGF- β 1) 在各领域被广泛研究, 是目前所知作用最为复杂多样的生长因子之一, 心、肝、肾的纤维化及炎症疾病常伴有 TGF- β 1 水平升高。目前所知, 活化的 TGF- β 1 对中性粒细胞、T 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等具有强大的趋化作用, 同时还能诱导血管性细胞因子及其受体的表达, 促进翼状胬肉的发生、发展^[4]。

热休克蛋白 47 (heat shock protein 47, HSP-47) 是一种定位于内质网, 分子量为 47kDa 的胶原结合糖蛋白, 参与多种类型前胶原在内质网的加工、折叠、聚合、分泌等过程, 起质量监控作用, 防止应急时未折叠和错误构型的前胶原的产生和分泌。已经证实 HSP-47 的过度表达与多种胶原异常沉积有关。TGF- β 1 是诱导翼状胬肉上皮细胞上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的最重要的细胞因子, 而 HSP-47 主要受 TGF- β 1 的调控, 推测 HSP-47 可能通过参与正常结膜上

皮细胞 EMT 促进翼状胬肉上皮细胞 EMT 的发生、发展。当前研究发现, HSP-47 的增加与胶原纤维的累积导致的如肺部、肾脏、肝脏的纤维变性密切相关^[5]。与翼状胬肉密切相关的环境刺激因素可以导致眼表上皮细胞、泪液分泌多种炎性介质, 这些炎性介质反过来促进翼状胬肉的纤维血管化, 从而导致表达各种与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑、纤维血管化有关的蛋白酶, 这些特征对于研究翼状胬肉的原发以及不完整的翼状胬肉切除术后复发都是非常重要的。因此, 本研究的目的是进行翼状胬肉中眼表源性细胞因子和生长因子与正常结膜组织中表达的对比研究。通过探讨 TGF- β 1 和 HSP-47 在翼状胬肉发生、发展中的作用, 为了解翼状胬肉的分子生物学发病机制提供依据, 从而为翼状胬肉的治疗开辟新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象 收集 2009-12/2010-01 就诊于我院的翼状胬肉患者 20 例, 男 10 例, 女 10 例, 右眼 8 例, 左眼 12 例, 年龄 38 ~ 58 (平均 44.5) 岁, 病程 2mo ~ 3a, 平均 12.5mo。患者纳入标准: (1) 符合翼状胬肉的诊断; (2) 否认外伤史、眼部手术史、角膜接触镜配戴史及眼部感染史; (3) 排除其他免疫性疾病; (4) 符合手术指征。所有手术均由同一医生在显微镜下完成, 切除的翼状胬肉和因外伤摘除眼球的正常结膜组织 10 个采用石蜡包埋法保存。

1.1.2 实验材料 I 抗, TGF- β 1 sc-146, 兔抗 IgG, lot12608, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; HSP-47, 小鼠 IgG 抗体, lot B501536, stressgen 公司。II 抗, 山羊抗小鼠 IgG/生物素化 IB-2020, ot \times 0702 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(HSP-47 用); 山羊抗兔 IgG/生物素化 IB 2010, lot \times 1104, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(TGF- β 1 用)。III 抗, 辣根酶标记链亲和素 IB 2404, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB; AR 1022, 购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 通过免疫组化方法选择特异性抗体检测 TGF- β 1, HSP-47 在翼状胬肉及正常结膜组织的表达。石蜡切片微波修复抗原染色程序; 捞片后置烤箱 58 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C 30min 以使切片紧密黏附; 30% H₂O₂ 一份+蒸馏水 10 份混合, 室温 5 ~ 10min 以灭活内源性酶, 蒸馏水洗 3 次; 将切片浸入 0.01mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0), 微波炉中高火加热至沸腾后断电, 间隔 5 ~ 10min 后, 反复 1 ~ 2 次, 冷却后 PBS (pH 7.2 ~ 7.6) 洗涤 1 ~ 2 次; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20min, 甩去多余液体; 滴加适当的 I 抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS (pH 7.2 ~ 7.6) 洗 2min \times 3 次。(I 抗稀释度: TGF- β 1 1:100, HSP-47 1:50); 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG (1:50) 或兔 IgG (1:100), 37 $^{\circ}$ C 30min, PBS (pH 7.2 ~ 7.6) 洗 2min \times 3 次; 滴加试剂辣根酶标记链亲和素 (1:100) 37 $^{\circ}$ C 30min, PBS (pH 7.2 ~ 7.6) 洗 5min \times 4 次; DAB 显色: 使用 DAB 显色试剂盒 (AR1022)。取 1mL 蒸馏水, 加试剂盒中 A, B, C 试剂各一滴, 混合后加至切片。室温显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察。

1.2.2 结果评判 在光学显微镜下观察细胞着色情况, 以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性, 阳性强弱以染色深浅来判断, 采用 HPLAS-100 高清晰彩色病理图文报告管理系统, 对每张切片随机选取 5 个完整而不重叠的高倍镜视野

(\times 400), 测定每个视野下阳性反应的平均光密度值。

统计学分析: 采用 SPSS 11.5 软件对各组免疫组化反应阳性颗粒的平均光密度行方差分析, 以 $P < 0.05$ 表明统计学差异。

2 结果

TGF- β 1 在翼状胬肉的鳞状上皮细胞中的表达水平高于正常结膜组织, 在基质层和内皮层有中等量表达 (图 1A), 同时, 在翼状胬肉纤维层的炎性细胞和内管内皮细胞中也有明显表达 (图 1B)。与此相反, 在正常结膜组织中 TGF- β 1 表达较弱 (图 1C)。图像分析结果显示: 翼状胬肉中 TGF- β 1 表达的平均光密度值是 0.3671 ± 0.0264 , 正常结膜组织中 TGF- β 1 表达的平均光密度值是 0.1578 ± 0.012 , 两者之间有统计学差异 ($P < 0.05$)。HSP-47 在翼状胬肉固有层高表达 (图 1D), 而上皮细胞中表达较弱, 在正常结膜组织中未见明显表达 (图 1E)。图像结果显示: 翼状胬肉中 HSP-47 表达的平均光密度值是 0.1627 ± 0.0285 , 正常结膜组织中的 HSP-47 表达的平均光密度值是 0.0452 ± 0.0132 , 两者之间有统计学差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

TGF- β 1 是眼部组织中一种十分重要的多功能细胞因子, 它能调节多种生理病理过程, 如胚胎发育, 细胞增殖、分化、细胞外基质合成、免疫、炎症和凋亡, 以及组织发育、创伤修复过程中的蛋白合成等。大多数情况下, TGF- β 1 主要增强细胞外基质的分泌合成, 同时抑制细胞增殖^[6]。TGF- β 1 能诱导多种细胞因子, 包括结缔组织生长因子, 血小板源生长因子、成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子, 以及 TGF- β 1 本身, 他们在组织创伤修复过程中均扮演着重要角色。

TGF- β 1 本身包含三个亚型 (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)。在正常的结膜组织中 TGF- β 1 广泛存在, 由结膜上皮细胞、角膜上皮细胞分泌产生^[7]。一方面, 如果在出生时 TGF- β 1 缺乏或者 TGF- β 1 信号传导通道受损, 小鼠很快就会因为大量的 T 淋巴细胞增生和各种免疫性疾病而死亡^[8], 另一方面, TGF- β 1 的过度活化会造成眼部组织自我修复过程中的纤维化, 扰乱眼表正常内环境。正是由于其作用的多样化, 可能 TGF- β 1 在协调免疫活动中起着重要的作用, 在眼表组织中, 它起着两个重要的作用, 一是维护内环境稳定, 二是对应急反应产生自动免疫^[9]。

在本研究中, 我们发现在翼状胬肉上皮层、上皮下纤维层及血管内皮细胞胞浆、中性粒细胞、浆细胞中 TGF- β 1 均有高表达, 以上皮层最为显著。而在正常球结膜中少数上皮细胞可见 TGF- β 1 表达, 两者阳性表达有显著差异。我们推测由于紫外线等环境因素的影响, 破坏了眼表的正常内环境, 正常结膜组织发生慢性炎症反应, 由角膜、结膜上皮细胞分泌的, 和泪液中的 TGF- β 1 增加, 从而趋化中性粒细胞到炎症反应部位, 促使胞浆内游离的钙离子浓度升高及胞质的 48kDa 蛋白磷酸化, 同时中性粒细胞可产生多种活性物质如氧自由基、白三烯和蛋白水解酶 (如 IL-1、血小板源性生长因子, 胶原酶, 强性蛋白酶等), 从而导致弹性纤维及胶原纤维变性^[10]。TGF- β 1 还能抑制 ECM 蛋白水解酶合成, 从而抑制 ECM 分解, 导致翼状胬肉中胶原纤维和弹性纤维异常增生和堆积, 从而导致翼状胬肉的发生、发展。

HSP-47 在翼状胬肉固有层中表达, 而在正常结膜组织中未见明显表达, 考虑与这个小分子热休克蛋白参与的应

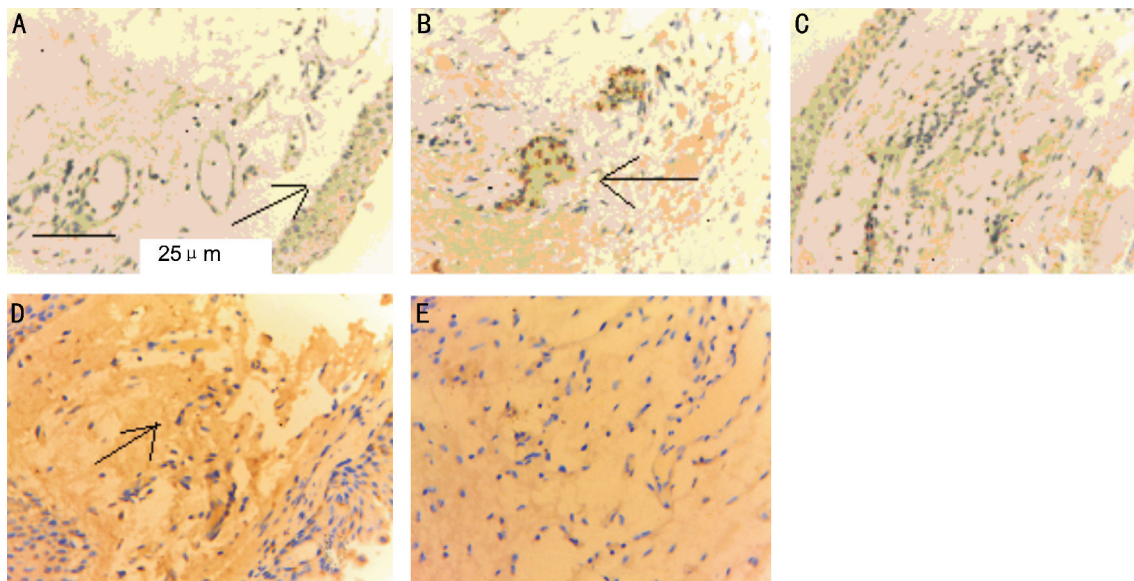


图1 免疫组织化学结果(DAB×400) A:翼状胬肉的鳞状上皮细胞中TGF-β1高表达(箭头);B:翼状胬肉的炎症细胞中TGF-β1高表达(箭头);C:正常结膜组织中TGF-β1弱表达;D:翼状胬肉固有层中HSP-47高表达(箭头);E:正常结膜组织中HSP-47未见明显表达。

急反应导致的纤维组织过度增生有关。Tanaka等^[11]采用免疫印迹法检测不同时期胚胎大鼠眼球组织中的HSP-47表达情况,发现HSP-47在胚胎早期的眼球组织中显著表达,在生后14d,其主要分布在间质细胞和玻璃体血管,刺激I型胶原的合成,随着眼球发育的不断完善,HSP-47的表达量逐渐减少。然而在一些眼部疾病的纤维化病理进程中,HSP-47表达增加则导致胶原蛋白的大量沉积,促进病程的进展^[12]。在翼状胬肉的发生中,我们推测TGF-β1增加,诱导HSP-47表达增强,这两者可能通过参与正常结膜上皮细胞EMT促进翼状胬肉上皮细胞EMT的发生、发展,胶原纤维的增加,从而导致翼状胬肉的发生、发展。

综上所述,翼状胬肉的发生是多因素参与的复杂过程,各类因子之间形成一个复杂的网络来调节翼状胬肉的发生发展,每个因子不是孤立的发挥作用,而是同其他因子之间存在千丝万缕的联系。在眼部受到应激损伤时,炎症因子TGF-β1增加,刺激多种生长因子,包括HSP-47增加,小分子热休克蛋白能够迅速表达并参与多种复杂的功能活动,它们既可能作为对抗应激的蛋白质在眼部发挥重要的保护作用,也可促进过度纤维化导致疾病的进一步进展。TGF-β1和HSP-47在眼部的具体生物学机制尚不清楚,综合利用基因工程,免疫组化,免疫印迹等先进研究技术进一步阐明他们在眼部疾病中的作用机制具有重要意义,如何减少TGF-β1的表达,增强HSP-47在局部组织的保护作用,防止受损细胞的凋亡,同时控制其促纤维化机制,限制不利因素,为翼状胬肉的预防和治疗提供了新的思路。

参考文献

1 Bianchi E, Scarinci F, Grande C, *et al.* Immunohistochemical profile of VEGF, TGF-β and PGE₂ in human pterygium and normal conjunctiva; experimental study and review of the literature. *Int J*

Immunopathol Pharmacol 2012;25(3):607-615

2 Solomon A, Li DQ, Lee SB, *et al.* Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2154-2163

3 Kria L, Ohira A, Amemiya T. Growth factors in cultured pterygium fibroblasts; immunohistochemical and ELISA analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(9):702-708

4 罗雪娟,周辉. MMP-2及其抑制剂、TGF-β1与翼状胬肉. *实用临床医学* 2007;8(10):128-129

5 李异,吴畏,蒋永芳,等. HSP47在TGF-β1诱导肝星形细胞合成I型胶原蛋白中的作用. *中南大学学报:医学版* 2007;4:650-653

6 Li MO, Wan YY, Sanjabi S, *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146

7 Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest* 2006;86(2):106-115

8 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359(6397):693-699

9 Cintia S. De Paiva, Eugene A, *et al.* Disruption of TGF-β signaling improves ocular surface epithelial disease in experimental autoimmune keratoconjunctivitis sicca. *PLoS One* 2011;6(12):e29017

10 Yilmaz O, Dursun H, Gursan N, *et al.* Effects of the myeloperoxidase gene polymorphisms on development of atrophy in hpylori infected or noninfected gastroduodenal disease. *World Gastroenterol* 2007;13(8):1243-1246

11 Tanaka Y, Kobayashi K, Kita M, *et al.* Expression of 47kDa heat shock protein (HSP47) during development of mouse cornea. *Exp Eye Research* 1996;63(4):383-393

12 Razzaque MS, Foster CS, Ahmed AR. Role of collagen-binding heat shock protein 47 and transforming growth factor-beta1 in conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1616-1621