

体外诱导翼状胬肉成纤维细胞向平滑肌细胞的分化*★◆

石颖颖, 李永平, 张文忻, 郑建樑, 林建贤

Induced differentiation of pterygium fibroblasts into smooth muscle cells *in vitro*

Shi Ying-ying, Li Yong-ping, Zhang Wen-xin, Zheng Jian-liang, Lin Jian-xian

Abstract

BACKGROUND: Our previous findings have demonstrated that smooth muscle exists in pterygium, but its origin remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the origin of smooth muscle in pterygium.

METHODS: Pterygial tissue was harvested from 26 patients. Cells were primary cultured and identified. Cells in good growth state were divided into two groups after first reproduction, and then subcultured in the medium with or without 20 µg/L basic fibroblast growth factors (induction group and control group). Morphological change of cells in two groups was observed through the use of inverted microscope. The expression of vimentin and α-smooth muscle actin in cells in two groups was detected by immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: Immunohistochemical staining showed that all cells expressed vimentin and were identified as fibroblasts. Under inverted microscope, cells from the control group exhibited shuttle-shaped appearance and weaved together, and cells from the induction group became plump with large cytones and grew in a "peak-valley" way. Confocal microscopy showed that in the control group, cells expressed vimentin, but did not express α-smooth muscle actin; in the induction group, cells expressed α-smooth muscle actin to different extents besides vimentin and exhibited myofilament in the cytoplasm, confirming smooth muscle cells. These findings indicate that fibroblasts from pterygium can differentiate into smooth muscle cells after induced by basic fibroblast growth factors *in vitro*.

Shi YY, Li YP, Zhang WX, Zheng JJ, Lin JX. Induced differentiation of pterygium fibroblasts into smooth muscle cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2589-2592. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 作者前期研究发现翼状胬肉组织中存在平滑肌成分, 但此平滑肌的来源并不清楚。

目的: 探讨翼状胬肉组织平滑肌成分的起源。

方法: 组织块法对 26 例翼状胬肉进行原代细胞培养及鉴定。生长状态较好的原代细胞传代后分为诱导组 and 对照组, 分别置于含或不含 20 µg/L 碱性成纤维细胞生长因子的培养基中培养。倒置显微镜下对比观察两组细胞的形态学变化; 共聚焦显微镜下观察免疫荧光染色波形纤维蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白在两组细胞中的表达情况。

结果与结论: 免疫组织化学染色显示所有细胞均表达波形纤维蛋白, 鉴定为成纤维细胞。倒置显微镜下观察: 对照组细胞呈长梭形, 编织状排列; 诱导组细胞饱满, 胞体增大, 呈“峰-谷样”生长。共聚焦显微镜观察: 对照组细胞均表达波形纤维蛋白, 不表达 α-平滑肌肌动蛋白; 诱导组细胞除表达波形纤维蛋白外, 还不同程度地表达 α-平滑肌肌动蛋白, 胞浆内可见伸向细胞两极的肌动蛋白丝, 证实为平滑肌细胞。结果表明翼状胬肉来源的成纤维细胞在体外经碱性成纤维细胞生长因子诱导可以向平滑肌细胞分化。

关键词: 翼状胬肉; 成纤维细胞; 碱性成纤维细胞生长因子; 平滑肌; 起源

缩略语注释: bFGF: basic fibroblast growth factor, 碱性成纤维细胞生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.025

石颖颖, 李永平, 张文忻, 郑建樑, 林建贤. 体外诱导翼状胬肉成纤维细胞向平滑肌细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2589-2592. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

State Key Laboratory of Pathology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Shi Ying-ying★, Studying for master's degree, State Key Laboratory of Pathology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China syjulin@yahoo.com

Corresponding author: Li Yong-ping, Master, Professor, Doctoral supervisor, State Key Laboratory of Pathology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China yongpingli1961@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30672276*

Received: 2011-11-24 Accepted: 2012-02-02

0 引言

翼状胬肉发病与紫外线、风尘等外界环境及遗传因素相关^[1-3], 但发病机制目前尚不清楚^[4-5]。作者之前的研究已发现翼状胬肉组织中存在平滑肌成分, 为了进一步探讨翼状胬肉中平滑肌细胞的起源, 本实验取翼状胬肉组织进行成纤维细胞的体外培养, 同时向平滑肌细胞诱导分化。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察

时间及地点: 实验于2010-07/2011-09在中山大学中山眼科中心病理室完成。

材料:

试剂	来源
碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)	博理生物科技公司
荧光抗体 FITC	Dako 公司
Hoechst、抗荧光衰减剂	碧云天公司
波形蛋白(VIM)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、NSE、CK、S-100、Desmin、SY、LYA、免疫组织化学试剂盒	迈新公司

26例翼状胬肉组织收集于中山大学中山眼科中心门诊手术切除者, 供者对实验知情同意。

中山大学中山眼科中心国家重点实验室病理室, 广东省广州市 510060

石颖颖★, 女, 1985年生, 山东省临沂市人, 汉族, 中山大学眼科学在读硕士, 主要从事眼疾病发病机理等研究。
syjulin@yahoo.com

通讯作者: 李永平, 硕士, 教授, 博士生导师, 中山大学中山眼科中心国家重点实验室病理室, 广东省广州市 510060
yongpingli1961@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02589-04

收稿日期: 2011-11-24
修回日期: 2012-02-02
(20111124009/W · S)

所有标本均在术后离体1 h内进行处理。标本一半用于细胞培养, 另一半进行常规病理检查。

实验方法:

原代培养翼状胬肉: 组织块法对翼状胬肉进行原代培养。新鲜组织用无菌PBS清洗3次, 反复剪切成1.0 mm×1.0 mm×1.0 mm大小, 弯头吸管吸取若干组织小块并将其均匀分布在培养瓶底部。轻轻翻转培养瓶使瓶底朝上, 静置于37℃细胞培养箱中2 h, 取出培养瓶, 加入含体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养液使其慢慢覆盖瓶壁的组织小块, 再放于培养箱中培养。倒置显微镜下观察到有细胞爬出时, 补加培养液, 3 d换液。细胞达80%融合时进行传代继续培养。

诱导翼状胬肉成纤维细胞向平滑肌细胞分化: 取6例生长状态良好的原代细胞进行诱导分化。已消毒的盖玻片置于培养皿中。细胞传代后接种于不同的培养皿中进行爬片, 分别用含或不含20 μg/L bFGF的高糖DMEM培养液(含体积分数10%胎牛血清)培养并标记为诱导组和对照组, 细胞接种终浓度均为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 置于37℃、体积分数5%CO₂的细胞培养箱中继续培养观察。

免疫荧光染色: 细胞分组培养15 d后, 取出爬片, PBS洗, 40 g/L多聚甲醛室温固定细胞20 min, PBS洗, 0.3%TritonX-100破膜10 min, PBS洗, 血清封闭20 min, 一抗波形蛋白、α-SMA 4℃过夜, PBS清洗, FITC 37℃避光孵育30 min, PBS洗, Hoechst染核20 min, 抗荧光衰减淬灭剂封固, 共聚焦显微镜下观察细胞。阳性结果判定以胞核染成深蓝色, 胞质出现绿色荧光为标准。

免疫组织化学染色: 细胞爬片用PBS洗, 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min, PBS洗, 0.3%TritonX-100破膜10 min, PBS洗, 体积分数3% H₂O₂室温孵育15 min, PBS洗, 血清封闭20 min, 一抗波形蛋白、α-SMA、NSE、S-100、CK、Desmin、SY、LYA 37℃孵育1 h, PBS清洗, 增强剂A液37℃孵育15 min, PBS洗, B液孵育20 min, DAB室温下显色9 min, 水洗, Mayer苏木精复染2 min, 水洗, 晾干, 中性树胶封固。阳性表达的细胞胞浆染成棕黄色, 胞核呈蓝色。

细胞α-SMA阳性表达率的计算: 采用半定量方法判断细胞α-SMA染色结果, 将细胞爬片置于200倍光镜下观察, 每个爬片随机取等距的5个视野, 以胞浆染成绿色荧光判为阳性细胞, 计算阳性细胞占视野细胞总数的百分率。以5个视野阳性细胞百分率的算术平均数为该例细胞α-SMA的阳性表达率。

主要观察指标: 观察翼状胬肉原代培养细胞的形态、生长特性及波形蛋白表达情况。对比观察对照组和诱导组细胞形态学变化及波形蛋白、α-SMA表达情况。

2 结果

2.1 翼状胬肉原代培养 培养的第3~5天, 细胞以单个出芽方式从组织块的边缘底层爬出, 呈现为梭形、星状, 胞体较肥, 排列稀疏。随着培养时间的延长, 长出的细胞越来越多, 细胞由单层转向多层重叠, 并以组织块为中心呈星芒状向周围生长, 见图1a。细胞多呈长梭形, 胞质均匀透亮, 胞核圆形或椭圆形。约15 d细胞长满瓶底, 排列密集, 见图1b。波形纤维蛋白免疫组织化学染色显示细胞浆均匀染成棕黄色, 胞核蓝色, 表明所有细胞均表达波形纤维蛋白, 见图1c。其他免疫组织化学α-SMA、NSE、S-100、CK、Desmin、SY、LYA均呈现阴性反应。

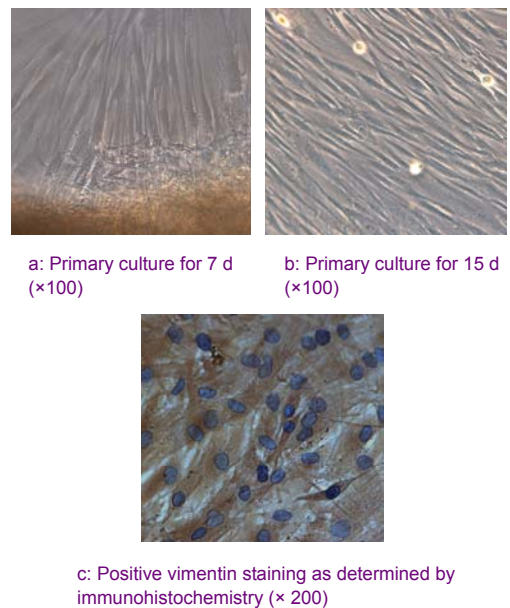


Figure 1 Morphology and growth pattern of primary pterygium cells and immunohistochemical staining of vimentin

图1 翼状胬肉原代细胞的形态、生长方式及波形蛋白免疫组织化学染色

2.2 传代后对照组细胞的观察及鉴定 细胞贴壁后呈长梭形或星状, 胞体纤细, 中央圆形或椭圆形的结构为细胞核, 细胞胞体透亮, 见图2a。细胞于接种后第15天长满瓶壁, 平行排列呈编织状, 见图2b。细胞经免疫荧光染色在共聚焦显微镜下观察可见所有细胞均表达波形纤维蛋白, 见图2c; 细胞经α-SMA免疫荧光染色仅胞核染成蓝色, 胞体未见绿色荧光, 见图2d。

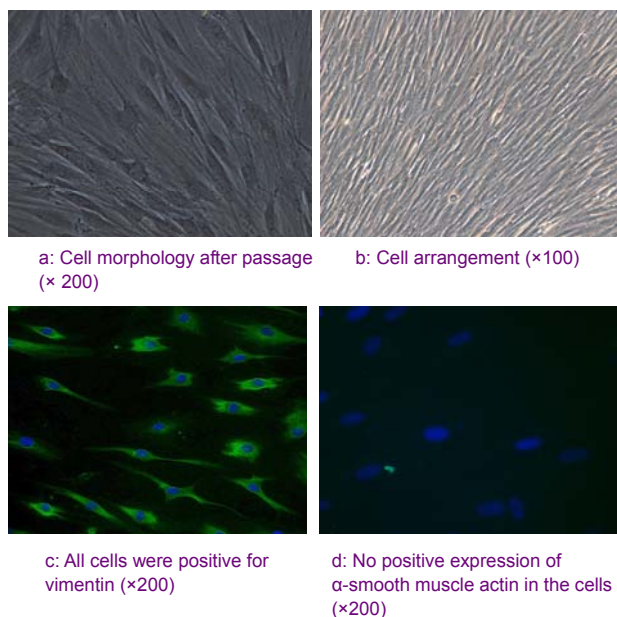


Figure 2 Morphological observation of cells and immunofluorescence staining of vimentin and α-smooth muscle actin in cells in the control group
图 2 对照组细胞的形态学观察及波形蛋白、α-平滑肌肌动蛋白免疫荧光染色

2.3 传代后诱导组细胞的观察及鉴定 见图3。

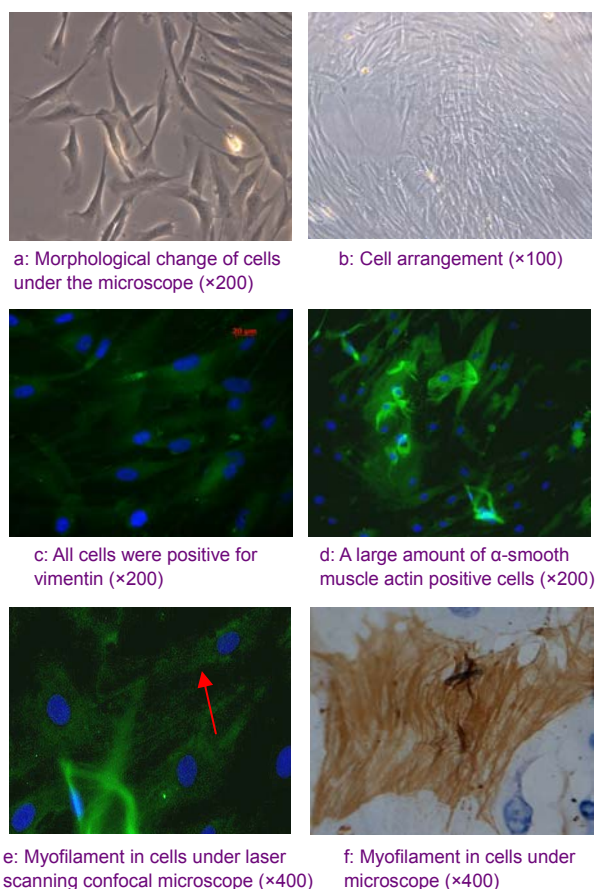


Figure 3 Morphological observation of cells and vimentin and α-smooth muscle actin expression in cells in the induction group
图 3 诱导组细胞的形态学观察及波形蛋白、α-平滑肌肌动蛋白表达情况

细胞经诱导培养后胞体变肥大、饱满, 呈短梭形、星状、卵圆形, 见图3a。细胞密集处与稀疏处交错, 呈“峰-谷样”生长, 见图3b。继续生长部分细胞体积明显变大, 多角形、不规则形或蝶翼形。免疫荧光染色发现6例细胞均表达波形蛋白, 见图3c, 同时不同程度地表达α-SMA, 见图3d, 阳性表达率分别为85.7%, 87.5%, 64.5%, 33.7%, 44%, 59.6%。阳性细胞多为上面提到的一些体积较大的细胞, 一些梭形细胞胞质也见阳性表达。共聚焦显微镜高倍下观察细胞可见胞质内大量条丝状物向两极放射并与细胞长轴平行, 即α-肌动蛋白丝, 见图3e, 一些肌丝可延伸至细胞突起内。对这部分细胞进行α-SMA免疫组织化学染色, 胞质同样也呈现强阳性, 见图3f, 鉴定为平滑肌细胞。

3 讨论

翼状胬肉在组织病理学上主要表现为纤维血管组织的异常增生^[6-8]。李永平等^[9]对218例翼状胬肉进行免疫组织化学染色时发现其中56例翼状胬肉的纤维血管组织中还存在一些胞质嗜伊红、略带嗜碱性的梭形细胞束并且表达α-SMA, 证实为平滑肌细胞或组织, 但其起源并不清楚。

近年来, 翼状胬肉成纤维细胞由于表达多种干细胞标记而成为研究的热点^[10-13]。bFGF作为一种多肽类的有丝分裂原, 其主要的生物学作用是促进细胞(如成纤维细胞)的增殖分化, 对干细胞的定向分化也有良好的促进作用^[14-16]。桑爱民等^[17]利用免疫组织化学方法比较bFGF在翼状胬肉和正常结膜中的表达, 发现bFGF在前者中的表达明显高于后者。有研究在培养基中添加25 μg/L bFGF、25 μg/L血管内皮生长因子诱导人骨髓间充质干细胞表达α-SMA, 向平滑肌细胞分化, 但其研究中因血管内皮生长因子的浓度过高, 掩盖bFGF的生物学作用^[18]。考虑到bFGF和血管内皮生长因子在诱导平滑肌生成过程中作用类似、相互协同的特点, 本实验在此基础上做了适当调整: 诱导组添加20 μg/L bFGF培养翼状胬肉来源的成纤维细胞, 与在体翼状胬肉组织中高bFGF状态相对应。结果显示与对照组成纤维细胞相比, 诱导组细胞呈“峰-谷样”生长, 不同程度地表达α-SMA, 胞质内还可见伸向细胞两极的α-肌动蛋白丝, 为平滑肌细胞的典型表现。因此作者认为体外条件下翼状胬肉组织来源的成纤维细胞经bFGF诱导可以获得α-SMA的表达并向平滑肌细胞分化。

Krai等^[19]发现多种生长因子如bFGF、转化生长因子、血小板衍生生长因子等在翼状胬肉组织中异常高表达, 提出翼状胬肉来源的成纤维细胞不同于正常结膜成纤维细胞, 其细胞型已发生转化。Ye等^[10]认为翼状胬肉的发病是由于外界环境因素损伤角膜缘, 刺激骨髓间充

质干细胞和一些前体细胞激活并迁移到受损部位进行组织修复, 在各种异常高表达的细胞因子作用下分化为成纤维细胞、上皮细胞和血管内皮细胞从而构成翼状胬肉。但考虑到上皮起源于表面外胚层组织^[20], 翼状胬肉的主体是纤维血管组织^[21], 其表面上皮为结膜表面上皮的增生和延伸, 所以作者认为上述观点并不十分准确。本实验中翼状胬肉来源的成纤维细胞体外经诱导向平滑肌分化, 说明其分子生物学已经发生改变并具有分化特性, 直接证实翼状胬肉组织中的成纤维细胞具有分化成平滑肌细胞的能力, 提示翼状胬肉实体组织观察到的平滑肌为组织中成纤维细胞分化而来。

翼状胬肉具有向角膜侵袭生长的能力, 复发后其侵袭能力更强^[22-24]。这种良性非肿瘤的增生性病变表现出类似恶性肿瘤的侵袭性生长方式, 其原因并不是十分清楚, 关于这方面的研究也是空白^[25-26]。眼肿瘤病理学家早就观察到发生于眼内睫状体的平滑肌瘤, 是一种以平滑肌增生为主的良性肿瘤, 肿瘤细胞可以侵及局部巩膜或穿透角膜缘组织向眼外生长^[27-29]。本实验揭示翼状胬肉的成纤维细胞体外诱导可向平滑肌细胞分化, 不仅证明了作者前期实体组织研究所发现的平滑肌成份源自于成纤维细胞的分化, 而不是来源于血管壁的平滑肌扩展, 同时也提示翼状胬肉组织中的平滑肌细胞或组织为翼状胬肉具有向角膜侵袭生长能力的形态学基础。

4 参考文献

- [1] Al-Bdour M, Al-Latayfeh MM. Risk factors for pterygium in an adult Jordanian population. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004;82(6): 642-671.
- [2] Anguria P, Ntuli S, Carmichael T, et al. Relationships of heredity and dry eye with pterygia in black African patients. *S Afr Med J*. 2011;101(2):110-115.
- [3] Lü W, Liang YB, Sun LP, et al. Guoji Yanke Zonglan. 2009;33(3): 170-173.
吕伟, 梁远波, 孙兰萍, 等. 翼状胬肉的患病率及危险因素[J]. 国际眼科纵览, 2009, 33(3): 170-173.
- [4] Yong Park, Jong Sun Choi, Sung Jun Lee, et al. Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. *Mol Vis*. 2011;17: 3468-3480.
- [5] Li JC, Zhang XF, Yanke Xinjinzhan. 2011, 31(6):590-593.
李景翠, 张雪菲. 翼状胬肉发病机制及治疗研究新进展[J]. 眼科新进展, 2011, 31(6):590-593
- [6] Liu ZG, Xie YH, Zhang M, et al. *Zhonghua Yanke Zazhi*. 2000;36(5): 372-375.
刘祖国, 谢玉环, 张梅, 等. 表皮生长因子受体家族在翼状胬肉上皮内的异常表达[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(5): 372-375.
- [7] Dekaris I, Gabric N, Karaman Z, et al. Limbal-conjunctival autograft transplantation for recurrent pterygium. *Eur J Ophthalmol*. 2002;12:177-182.
- [8] Bahar I, Kaiserman I, Weisbrod M, et al. Extensive versus limited pterygium excision with conjunctival autograft: Outcomes and recurrence rates. *Curr Eye Res*. 2008;33: 435-440.
- [9] Li YP, Zhu Z, Zhang WX, et al. Evidence of pterygial fibrous tissues derived from mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zhnzh Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(34):6771-6775.
- [10] Ye J, Song YS, Kang SH, et al. Involvement of bone marrow-derived stem and progenitor cells in the pathogenesis of pterygium. *Eye*. 2004;18:839-843.
- [11] Song YS, Ryu YH, Choi SR, et al. The involvement of adult stem cells originated from bone marrow in the pathogenesis of pterygia. *Yonsei Med J*. 2005;46:687-692.
- [12] Pascual G, Montes MA, Pérez-Rico C, et al. Expression of embryonic markers in pterygium derived mesenchymal cells. *ARCH SOC ESP OFTALMOL*. 2010;85(12):400-404.

- [13] Chui J, Coroneo MT, Tat LT, et al. Ophthalmic Pterygium: A Stem Cell Disorder with Premalignant Features. *The American Journal of Pathology*. 2010(8):817-827.
- [14] Li CM, Yang CY, Liu BL, et al. *Haerbin Yike Daxue Xuebao*. 2005; 39(1):637-645.
李春明, 杨春艳, 刘宝林, 等. bFGF对骨髓基质干细胞体外培养及诱导分化时生物学特性的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(1): 637-645.
- [15] Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem & Cell Biology*. 2007;32 (2):115-120.
- [16] Chen PF, Wu XL, Zhou W, et al. *Zhongguo Shengwuzhipinxue Zazhi*. 2011, 24(1):24-27.
陈鹏飞, 吴小翎, 周伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞向肝样细胞的定向诱导分化[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(1):24-27
- [17] Sang AM, Lu H. *Jiangsu Yiyao*. 2010, 36(9):1040-1042.
桑爱民, 陆宏. 碱性成纤维细胞生长因子表达及手术方式对翼状胬肉手术后复发的影响[J]. 江苏医药, 2010, 36(9):1040-1042.
- [18] Zhang JM, He T, Huang HJ, et al. *Zhongguo Linchuang Kangfu*. 2006;10(1)23-26.
张金明, 何涛, 黄红军, 等. 骨髓间充质干细胞体外诱导分化为平滑肌细胞的实验中国临床康复, 2006, 10(1)23-26.
- [19] Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α in the pterygium. *Acta Histochem*. 1996;98:195-201.
- [20] Fuchs E, Byrne C. The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4:725-736.
- [21] Hu NM, Li H, Wu YZ, et al. *Xiandai Yiyao Weisheng*. 2005;21(23): 3226-3227.
胡乃民, 李海, 巫宇舟, 等. 眼翼状胬肉临床病理分析[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(23):3226-3227.
- [22] Bai H, Teng Y, Wong L, et al. Proliferative and migratory aptitude in pterygium. *Histochem Cell Biol*. 2010;134:527-535.
- [23] Livezeanu C, Crăitoiu MM, Mănescu R, et al. Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(3): 837-844.
- [24] Liu HL, Wang Y. *Zhongguo Yiyao Zhinan*. 2011;9(32) :433-437.
刘海兰, 王云. 翼状胬肉治疗的研究进展[J]. 中国医药指南, 2011; 9(32): 433-437.
- [25] Kawano H, Kawano K, Sakamoto T. Separate limbal-conjunctival autograft transplantation using the inferior conjunctiva for primary pterygium. *Ophthalmol*. 2011;4(3): 120-124.
- [26] Zhu TT, Sun S, Yanke Xinjinzhan. 2011;31(3):1324-1326.
朱婷婷, 孙松. 翼状胬肉手术治疗方法研究进展[J]. 眼科新进展, 2011, 31(3):1324-1326
- [27] Biswas J, Kumar SK, Gopal L, et al. Leiomyoma of the ciliary body extending to the anterior chamber: clinicopathologic and ultrasound biomicroscopy correlation. *Surv Ophthalmol*. 2000; 44:336-342.
- [28] Heegaard S, Jensen PK, Scherfig E, et al. Leiomyoma of the ciliary body: report of 2 cases. *Acta Ophthalmol Scand*. 1999;77: 709-712.
- [29] Shields CL, Shields JA, Varenhorst MP. Transscleral leiomyoma. *Ophthalmology*. 1991;98:84-87.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金项目(30672276)。

作者贡献: 实验设计、实施、评估为第一、二作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 翼状胬肉组织采集患者均知情同意。

文章概要:

文章要点: 翼状胬肉组织来源的成纤维细胞在体外经诱导可表现出分化特性, 进一步证实其干细胞特性。

关键信息: 实验结果表明翼状胬肉来源的成纤维细胞在体外经碱性成纤维细胞生长因子诱导可以向平滑肌细胞分化。

研究的创新之处与不足: 关于成纤维细胞表现干细胞特性参与翼状胬肉发病的具体机制仍需进一步研究。