文章编号:1000-5404(2005)01-0031-05

论著

肿瘤基质成纤维细胞模型的建立及生物学特性研究

朱红梅[1],汤为学[2],周卫平[1],张晓艳[2],马 静[2],郑维萍[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院,重庆医科大学肝炎研究所,[2]基础医学部病理生理学教研室,重庆 400010)

提 要:目的 建立肿瘤基质成纤维细胞模型并探讨其恶性生物学特性,为研究其恶性转化机制、开发靶向肿瘤基质的抗癌药物提供有价值的细胞模型。**方法** 用小鼠肝癌细胞 H_{22} 培养上清液诱导小鼠成纤维细胞 L_{929},获得能稳定生长的 L_{929}-H_{22} 细胞。用光镜、电镜观察其形态改变,MTT 法检测其生长情况,免疫细胞化学测定其 PCNA、bcl-2 、MMP-9、TN 表达变化,RT-PCR 测定其端粒酶活性,并分析其核型、蛋白合成能力、对常用抗癌药物的反应性及其条件培养基(conditioned medium, CM)对 H_{22} 细胞生长的影响。**结果** L_{929}-H_{22} 细胞出现多核和畸形核,染色体众数略有增加。细胞群体倍增时间较亲代细胞缩短($t=2.6541$, $P<0.05$),分裂指数增高($\chi^2=4.525$, $P<0.05$),PCNA、bcl-2、MMP-9、TN 表达增强($t\geqslant3.305\,5$, $P<0.01$)。端粒酶活性增高($t=-40.416\,3$, $P<0.001$)。L_{929}-H_{22} 细胞对作用于 S 期或 S 期和 M 期或细胞骨架的抗癌药物较 L_{929} 敏感($q\geqslant3.015\,2$, $P<0.05$)。蛋白质合成能力增强($q=-5.901\,1$, $P<0.001$)。其 CM 促进 H_{22} 细胞生长。**结论** L_{929}-H_{22} 细胞较亲代细胞增殖快,核型发生变化,存活能力强,功能活跃,表达并分泌促进肿瘤细胞生长与侵袭的因子增强,具有肿瘤基质成纤维细胞的某些特性,可作为开发抗癌药物的理想细胞模型。

关键词:肿瘤;成纤维细胞;细胞模型;L_{929}-H_{22}

中图法分类号:R-331; R73-354; R730.2 **文献标识码**:A

Establishment and identification of tumor fibroblast model

ZHU Hong-mei[1], TANG Wei-xue[2], ZHOU Wei-ping[1], ZHANG Xiao-yan[2], MA Jing[2], ZHENG Wei-ping[2] ([1]Institute of Hepatitis, Second Affiliated Hospital, [2]Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objectives To establish the cell model of fibroblast in tumor and explore its malignant bionomics for providing valuable cell model for studying their transforming mechanism and developing drugs targeting the tumor stroma in the future. **Methods** The murine normal fibroblast cells, L_{929}, were cultured with the supernatant of murine hepatocellular carcinoma cells, H_{22}, for three and a half months, and L_{929}-H_{22} cells were acquired with stable growth. Then the changes of their biological characteristics were determined by light microscopy, electron microscopy, karyotype analysis, and MTT assay. The expressions of PCNA, bcl-2, MMP-9, TN, and tolomerase activity were detected by immunocytochemistry and RT-PCR, respectively. The ability to synthesize proteins and the effects of their supernatant on H_{22} growth were determined. **Results** Abnormal nuclei and multinuclei were observed in L_{929}-H_{22} cells, and their chromatosome modes increased slightly. As compared with the parental cells, the population doubling time of L_{929}-H_{22} cells shortened ($t=2.654\,1$, $P<0.05$), mitotic indices increased ($\chi^2=4.525$, $P<0.05$), the expressions of PCNA, bcl-2, MMP-9, and TN enhanced ($t\geqslant3.305\,5$, $P<0.01$). L_{929}-H_{22} cells were more sensitive than L_{929} to anticancer drugs with inhibitory effect on S-phase or S- and M-phase or cell skeleton ($q\geqslant3.015\,2$, $P<0.05$). The ability to synthesize proteins and telomerase activity enhanced ($q=-5.901\,1$, $P<0.001$; $t=-40.416\,3$, $P<0.001$). Their supernatant promoted H_{22} cells growth. **Conclusion** The results suggest that L_{929}-H_{22} cells have some biological characteristics of the fibroblasts derived from tumors, including more quick proliferation, longer survival time and more functions, stronger expression and secretion of some growth factors, and can act as a cell model for developing drugs targeting tumor stroma in the future.

Key words: tumor; fibroblast; cell model; L_{929}-H_{22}

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的主要疾病之一,全世界每年因恶性肿瘤死亡的人数达 700 万[1]。实体瘤直径超过 1~2 mm,若继续生长必须依赖于支持肿瘤的基质,包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)

作者简介:朱红梅(1975-),女,重庆市人,硕士,助教,主要从事肿瘤病理生理方面的研究。电话:(023)63706512-804
通讯作者:汤为学,电话:(023)68485478
收稿日期:2004-05-11;修回日期:2004-10-18

蛋白、新形成的血管、活化的基质成纤维细胞。Mersmann等[2]2001年提出靶向成纤维细胞的治疗策略。目前国内外尚无肿瘤基质成纤维细胞株，为了解它的恶性生物学特性，我们用小鼠肝癌细胞H_{22}上清液诱导正常小鼠成纤维细胞L_{929}，传30代后，与亲代细胞比较；也为进一步探寻其恶变机制、进行靶向治疗研究提供细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞系

小鼠肝癌细胞系H_{22}与小鼠成纤维细胞系L_{929}由本室提供(购自上海细胞生物研究所并保存)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H_{22}、L_{929}细胞：接种于含10%小牛血清(bovine serum, BS)的DMEM培养液中，置37 ℃、5%CO_2饱和湿度孵箱内培养。传代时用0.1%胰蛋白酶-0.02% EDTA溶液消化，台盼蓝拒染法计数活细胞数。

1.2.2 肿瘤基质成纤维细胞模型的建立

1.2.2.1 H_{22}细胞培养上清液的制备 收集H_{22}细胞，调整细胞浓度为2.5×10^5/ml，取10 ml接种至150 ml培养瓶中。3 d时收集上清液，2 000 r/min离心40 min以去除细胞碎片，0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，-20 ℃保存备用。

1.2.2.2 最适细胞浓度与肿瘤基质成纤维细胞模型的建立

取L_{929}细胞5×10^4/ml、2.5×10^4/ml、1.25×10^4/ml、5×10^3/ml 4个浓度，用制备的上清液与20% BS DMEM完全培养基1∶1(v/v)制成的培养液培养。每3 d传代，发现L_{929}细胞在浓度为5×10^4/ml、2.5×10^4/ml长势好，前者更好，于是选定细胞浓度为5×10^4/ml作传代培养，每3 d传1代，历时3个半月，至30代，用L_{929}-H_{22}表示，之后仍用该培养液培养。调整L_{929}细胞浓度为5×10^4/ml作同步培养。

1.3 细胞形态学观察

1.3.1 光镜观察 制备细胞爬片，瑞氏染液染色，光镜下观察。

1.3.2 透射电镜观察 收集对数生长期的L_{929}-H_{22}与L_{929}细胞，PBS洗2次，固定、脱水、包埋、切片、染色按常规处理，透射电镜(HTTACHI-600型，日本)观察。

1.4 细胞增殖动力学测定

1.4.1 生长曲线及群体倍增时间测定 取5×10^4/ml 2 ml L_{929}-H_{22}与L_{929}细胞悬液接种至15 ml培养瓶中，各21瓶。置37 ℃、5%CO_2饱和湿度孵箱内培养；自第1天起开始用台盼蓝拒染法计数活细胞数，每天各取3瓶细胞，每瓶计数2次，取均值，连续观察7 d；在半对数坐标纸上绘制细胞生长曲线，并按下列公式计算群体倍增时间(TD)[3]。

$$TD = T\times \log2/(\log Nt - \log N_0)$$

N_0：初始细胞数 Nt：终末细胞数 T：Nt-N_0时间

1.4.2 细胞生长曲线 采用MTT法测定。

1.5 细胞染色体的制备和分析

在对数生长期L_{929}-H_{22}与L_{929}细胞的培养液中加入5 μg/ml秋水仙素，使其终浓度为0.05 μg/ml，37 ℃作用2 h；胰酶消化收获细胞，加入37 ℃预热的0.075 mol/L KCl溶液6 ml，低渗处理20 min；1 000 r/min离心5 min，去上清液，加入3 ml新鲜固定液(甲醇∶冰醋酸=3∶1)，固定20 min；1 000 r/min离心5 min，去上清液，加入适量新鲜固定液，吹打均匀，滴片；Gimesa染色，油镜下观察，计数100个分裂细胞的染色体数；低倍镜下随机取10个视野，每个视野随机计数50个细胞，其中分裂细胞所占百分比为该细胞的分裂指数。

1.6 MTT法检测多种抗癌药的细胞毒作用

收集H_{22}、L_{929}-H_{22}、L_{929}细胞，调整细胞浓度为5×10^4/ml；每孔种200 μl入96孔培养板内，加入体外药敏实验单用药(5-氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素、长春新碱、足叶乙甙)各20 μl，每种药重复4孔，设试剂对照组与细胞对照组，MTT法测定，重复3次。计算每种药的抑制率。

$$抑制率 = \left(1 - \frac{实验组平均A值}{对照组平均A值}\right)\times100\%$$

1.7 细胞总蛋白测定

①标准液制备：以PBS配制0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1 mg/ml共8个浓度的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)工作液。②标本处理：分别取1×10^6个L_{929}-H_{22}与L_{929}细胞，1 000 r/min离心5 min，去上清液，加入0.3 mol/L NaOH 0.5 ml，于100 ℃裂解30 min。每种细胞重复3管。③吸取每个浓度工作液、每管裂解液100 μl分别置于试管中，各设2个平行管。加入0.1 g/L的考马司亮蓝G-250液4 ml，混匀，比色。④绘制标准曲线，求出线性方程与样品蛋白浓度。

1.8 免疫细胞化学法(SP)检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、bcl-2、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、细胞粘合素(tenascin, TN)的表达

PCNA、MMP-9、TN单克隆抗体购自福州迈新生物技术发展公司，bcl-2多克隆抗体购自北京中山生物有限公司，按试剂盒说明书操作，以PBS代替一抗作阴性对照。胞浆黄(棕)色着色为阳性(PCNA阳性部位在胞核)，按着色强弱分为4个等级：无着色0分，淡黄色1分，棕黄色2分，棕褐色3分，并计算HSCORE得分[4][HSCORE=$\sum$Pi(i+1)；i=0,1,2,3；Pi表示评分为i的比例]。

1.9 测定端粒酶活性

端粒酶检测试剂盒购自德国Promega公司，按说明书操作。结果判定：阴性对照$A<0.2$，阳性对照$A>1.0$为有效测定。

1.10 L_{929}-H_{22}细胞条件培养基(conditioned-medium, CM)对肿瘤细胞生长的影响

收集L_{929}-H_{22}与L_{929}细胞的CM，方法同前；分别用DMEM、25%与50% L_{929}-H_{22}、L_{929}细胞的CM调整H_{22}细胞浓度为5×10^4/ml，每孔种200 μl入96孔培养板内，设4个平行孔与试剂对照，共4块培养板，MTT法测定H_{22}细胞的生长情况。

1.11　统计学处理

计量资料采用 t 检验、方差分析(进而作两两比较的 q 检验)、线性相关分析，计数资料采用 χ^2 检验。数据用 SAS 统计软件包分析。

2　结果

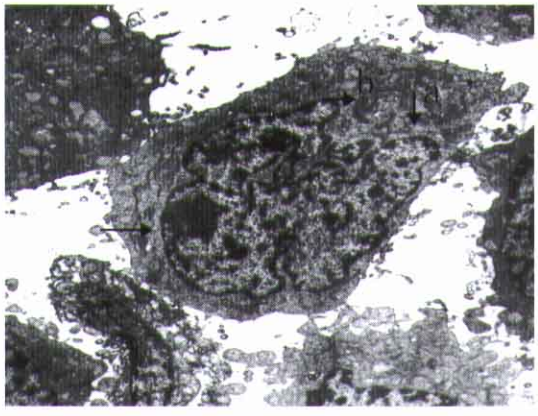
2.1　细胞形态学观察

光镜下 L_{929} 细胞呈梭长形，大小一致，可见双核细胞；L_{929}- H_{22} 细胞能重叠生长，胞体变大，且大小不一，多见大胞体细胞、双核及多核细胞(图 1)。电镜下 L_{929} 细胞结构未见异常；L_{929}- H_{22} 细胞内可见畸形核，多个核仁且核仁边集，核浆比例增加，线粒体、滑面内质网增多，能见高尔基复合体、粗面内质网、较多低电子密度块状物，且线粒体肿胀、粗面内质网轻度扩张(图 2)。



图 1　L_{929}-H_{22} 细胞光镜观察　(瑞氏染色 × 200)

Fig 1　Morphology of L_{929}-H_{22} cells observed by light microscopy (Wright's staining × 200)



Long pike: Abnormal nuclei, nucleoli edging, the nuclei/cytoplasm value getting larger, the mitochondrion getting more but swelling (pike a); golgi complex (pike b)

图 2　L_{929}-H_{22} 细胞形态电镜观察　(TEM × 6 000)

Fig 2　Morphology of L_{929}-H_{22} cells　(TEM × 6 000)

2.2　细胞增殖动力学测定

2.2.1　计数法测定细胞的生长曲线及群体倍增时间　1 ~ 7 d 的细胞生长曲线见图 3。L_{929}、L_{929}- H_{22} 细胞的群体倍增时间分别为 34.992 h、27.579 h，L_{929}- H_{22} 较亲代细胞缩短了 7 h，两者比较差异有显著性($t = 2.654\ 1$，$P < 0.05$)。

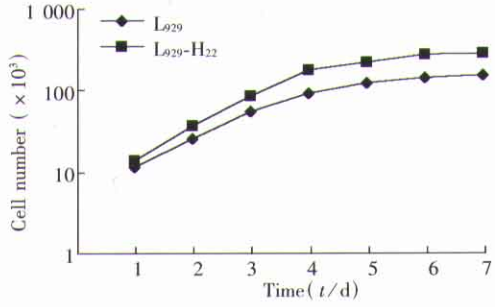


图 3　计数法测得 L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞的生长曲线

Fig 3　Cell growth curves of L_{929} and L_{929}-H_{22} cell lines by counting method

2.2.2　MTT 法测定细胞的生长曲线　吸光度值 A 越高表示活细胞数越多，L_{929}- H_{22} 细胞生长较亲代细胞 L_{929} 明显增快，差异非常显著($F = 343.03$，$P < 0.001$)。其生长曲线见图 4。

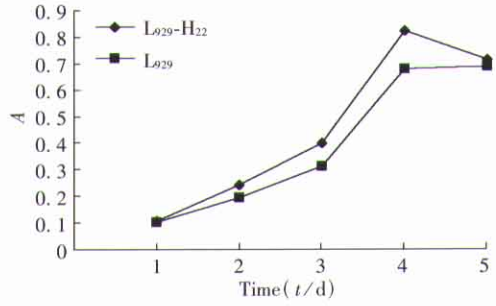


图 4　MTT 法测得细胞生长曲线

Fig 4　Cell growth curves by MTT assay

2.3　细胞染色体分析

L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞的染色体众数分别为 40、41，分布分别集中于 39 ~ 42、41 ~ 47。分裂指数分别为 7.8%、11.8%，L_{929}-H_{22} 细胞明显高于 L_{929} 细胞($\chi^2 = 4.525$，$P < 0.05$)。

2.4　抗癌药的细胞毒作用

抗癌药对 H_{22}、L_{929}-H_{22}、L_{929} 细胞的细胞毒作用见表 1。主要作用于 S 期或 S 期和 M 期或细胞骨架的 5-Fu、MMC、EPI、VCR 对 L_{929}-H_{22} 细胞的抑制作用，明显强于对 L_{929} 细胞。

表 1　抗癌药对 H_{22}、L_{929}-H_{22}、L_{929} 的细胞毒作用[$n = 12$，$(\bar{x} \pm s)\%$]

Tab 1　Cytotoxic effect of anticancer drugs on H_{22}, L_{929}-H_{22}, and L_{929} cell lines [$n = 12$, $(\bar{x} \pm s)\%$]

Cell	5-Fu	MMC	Vpl6	EPI	VCR
H_{22}	87.933 ± 1.546	16.907 ± 2.823	88.367 ± 0.877	88.757 ± 1.310	16.760 ± 4.227
L_{929}-H_{22}	82.760 ± 2.900▽	47.143 ± 4.337▽	67.830 ± 0.021	89.317 ± 3.031▽	40.227 ± 5.498△
L_{929}	75.913 ± 2.546	36.820 ± 5.096	81.023 ± 1.630	83.493 ± 1.314	26.903 ± 2.298

▽：$q \geq 3.015\ 2$，$P < 0.05$，*vs* L_{929}；△：$q = 3.868\ 7$，$P < 0.01$，*vs* L_{929}

2.5 细胞总蛋白测定

BSA 标准液各浓度与吸光度值 A 高度相关($r = 0.994\ 0$, $P < 0.01$)。一元线性方程为 $y = 0.6897x + 0.0229$。在该条件下测得 1×10^6 个 L_{929}-H_{22} 细胞蛋白浓度明显高于亲代细胞 L_{929},分别为(0.555 ± 0.031) mg/ml 和(0.467 ± 0.019) mg/ml($t = -5.901\ 1$, $P < 0.001$)。标本品 A 值在标准曲线直线范围内,结果可靠。

2.6 细胞 PCNA、MMP-9、TN、bcl-2 的表达

L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞表达 PCNA 强阳性,尤其 L_{929}-H_{22} 细胞以棕褐色为主,明显强于亲代细胞 L_{929}($P < 0.001$),阳性率分别为 98.7% 和 100%。L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞 100% 表达 MMP-9,呈强阳性,后者更强($P < 0.001$)。L_{929}-H_{22} 细胞表达 TN 明显强于 L_{929}($P < 0.001$),阳性率分别为 100%、95.4%。L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞表达 bcl-2 强阳性,均 100% 表达,但 L_{929}-H_{22} 明显强于亲代细胞 L_{929}($P < 0.001$)。它们的 HSCORE 得分见表 2。

表 2 L_{929}、L_{929}-H_{22} 细胞表达 MMP-9、PCNA、TN、bcl-2 的 HSCORE 得分($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 HSCORE of MMP-9, PCNA, TN, and bcl-2 by L_{929} and L_{929}-H_{22} cell lines ($\bar{x} \pm s$)

Cell	n	MMP-9	PCNA	TN	bcl-2
L_{929}	10	2.738 ± 0.092	2.808 ± 0.061	2.286 ± 0.176	3.096 ± 0.124
L_{929}-H_{22}	10	3.076 ± 0.153	3.152 ± 0.126	2.806 ± 0.143	3.298 ± 0.100
t		5.989 6	7.771 9	7.254 0	5.011 1
P		< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1

2.7 端粒酶活性测定

L_{929}-H_{22} 与 L_{929} 细胞的端粒酶活性分别为 0.875 ± 0.026 和 0.684 ± 0.012,前者明显增强($t = -40.416\ 3$, $P < 0.001$)(阴性对照 $A = 0.02$,阳性对照 $A = 1.07$)。

2.8 条件培养基(CM)促进 H_{22} 细胞生长

在第 3 天 25% L_{929}-H_{22} 细胞的 CM 促进 H_{22} 细胞生长 1.182 倍,差异有统计学意义($F = 19.41$, $P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 肿瘤基质成纤维细胞模型建立的意义

肿瘤生长与发展必须依赖于支持肿瘤的基质形成,成纤维细胞是产生基质的重要细胞与主要的基质细胞成分。它基因稳定,受肿瘤微环境影响,活化出现异常表达,调节与控制肿瘤细胞的有丝分裂和形态变化。因此提出靶向成纤维细胞的抗肿瘤基质治疗策略[2]。

现有研究手段主要是用肿瘤细胞与成纤维细胞合并培养方法来观察肿瘤基质成纤维细胞的表型变化情况[5],国内袁枚等用肝癌细胞培养上清液诱导人脐静脉内皮细胞,多次传代后免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合,获得的单克隆抗体 BVE-1 对小鼠肝癌疗效很好[6,7],表明肿瘤细胞培养上清液能使正常基质细胞发生类似肿瘤微环境下基质细胞的变化。小鼠肝癌细胞 H_{22} 能以实体瘤或腹水瘤形式生长,因此我们用 H_{22} 细胞培养上清液诱导小鼠成纤维细胞 L_{929},获得能稳定生长且具有肿瘤基质成纤维细胞某些生物学特性的 L_{929}-H_{22} 细胞,为研究肿瘤基质成纤维细胞的异常表型以及其相应功能提供理想的细胞模型,为将来研究其恶性转化机制、开发靶向肿瘤基质成纤维细胞药物提供有价值的细胞模型。

3.2 L_{929}-H_{22} 细胞恶性转化

我们的实验发现受肿瘤细胞培养上清液持续作用的 L_{929}-H_{22} 细胞在多方面有异于其亲代细胞的恶性化特征。首先形态上出现大胞体、双核及多核、畸形核细胞,多核与畸形核是恶性细胞的特征;增殖明显增快,这可能与其 PCNA 表达增强和线粒体、粗面内质网、滑面内质网增多等功能活跃改变有关,也与受到来自 H_{22} 细胞分泌的内皮细胞生长因子刺激生长作用有关。有报道肝癌细胞与成纤维细胞联合培养促进成纤维细胞生长,或发现成纤维细胞线粒体肿胀、溶酶体增多等结构改变[8,9]。其次,其染色体众数由 40 增加到 41,这是细胞恶性转化的三大表型证据之一,且端粒酶活性明显增高与 bcl-2 表达增强,表明 L_{929}-H_{22} 细胞的存活能力增强。端粒酶活性与细胞周期有关:永生化细胞在 G_1/G_0 期开始表达端粒酶活性,至 S 期达高峰,G_2/M 期降低[10],这与 L_{929}-H_{22} 增殖明显增快和它对作用于 S 期的抗癌药较敏感一致。最后,促进肿瘤细胞生长与转移,其超微结构显示蛋白合成、分泌功能活跃,且经蛋白测定也证实其总蛋白量明显增加,据报道活化的基质细胞反过来分泌生长因子以旁分泌方式刺激肿瘤细胞生长[11]。我们也发现其条件培养基对 H_{22} 细胞生长有一定的促进作用,免疫细胞化学显示 MMP-9、TN 表达增强,TN 可为游走侵袭的肿瘤细胞提供支持作用,有报道联合培养时乳腺瘤来源成纤维细胞表达 MMP-9 促其生长与发展[12]。

我们建立的异于正常成纤维细胞的肿瘤基质成纤维细胞模型 L_{929}-H_{22},它能稳定生长,有某些恶性转化特征,对某些抗癌药较敏感,为进一步研究其转化机制和开发靶向肿瘤基质的抗瘤药物提供了有价值的细胞模型。

参考文献:

[1] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 1-7.

[2] Mersmann M, Schmidt A, Rippmann J F, *et al*. Human antibody derivatives against the fibroblast activation protein for tumor stroma targeting of carcinomas[J]. Int J Cancer, 2001, 92(2): 240 - 248.
[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版社西安公司，1996. 136 - 137.
[4] Harrington D J, Lessey B A, Rai V, *et al*. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. J Pathol, 1999, 187(2): 242 - 248.
[5] Anderson I C, Mari S E, Broderick R J, *et al*. The angiogenic factor interleukin 8 is induced in non-small cell lung cancer/pulmonary fibroblast cocultures[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 269 - 272.
[6] 袁　玫，李沛雨，李　力，等. 一个肿瘤区新生血管内皮细胞的标志物[J]. 细胞与分子免疫学杂志，1998，14(3)：171 - 174.
[7] 夏洪天，黄志强，袁　玫，等. 靶向血管内皮细胞治疗肝癌的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志，2000，6(4)：294 - 296.
[8] 张　华，高福云，赵天德，等. 人肝癌细胞与成纤维细胞共育时细胞增殖率的动态变化[J]. 解剖科学进展，1998，4(2)：153 - 156.
[9] 张　华，孙海梅，郭崇洁，等. 人肝癌细胞和成纤维细胞共育时超微结构的改变[J]. 首都医科大学学报，2001，22(1)：10 - 12.
[10] Holt S E, Wright W E, Shay J W. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(6): 2932 - 2939.
[11] Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, *et al*. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7318 - 7324.
[12] Shekhar M P, Werdell J, Santner S J, *et al*. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1320 - 1326.

（编辑　汪勤俭）

（上接 27 页）

2.2　正常组与糖尿病视网膜病变的各期比较

无糖尿病视网膜病变组的 CRA 流速减慢，平均流速减慢，CRV 流速加快，S/D 缩小，与正常组比较有显著差异（$P<0.05$），糖尿病性视网膜病变组，CRA 流速减低，CRV 流速成增加，S/D 缩小，与 NDRP 相比有显著差异（$P<0.01$），见表 2。

表 2　DRP 组 CRA，CRV 不同分期血流参数　（$\bar{x}\pm s$）

分组	眼数（只）	CRA			CRV		
		Vs	Vd	Vm	Vmax	Vmin	Vm
NDRP	16	11.82±3.01	3.16±1.12	5.48±1.72	9.71±1.30	6.21±1.30	7.46±1.30
DRP	48	8.66±2.21	1.46±0.34	5.06±1.18	9.84±1.28	6.36±1.24	7.78±1.11**
I	8	10.97±3.13	1.66±0.12	8.14±1.38	10.46±1.28	6.02±1.21	7.76±1.10
II	18	8.14±2.24	1.62±7.53	3.93±1.32	9.34±1.42	5.36±1.50	7.88±1.14
III	14	6.25±0.12	1.60±7.10	3.55±1.20	10.24±0.43	6.22±0.71	8.35±0.14
IV - VI	8	7.43±2.21	1.06±0.48	4.68±0.71	8.96±1.85	4.36±1.26	7.18±1.30

与 NDRP 比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

3　讨论

视网膜中央动脉是供养视网膜内层的动脉，它的血流动力学发生改变直接影响视网膜的微循环状态。而糖尿病性视网膜病变的病变主要是视网膜微循环发生障碍及微血栓形成，这些改变影响了视网膜的血流动力学，而直接影响视网膜功能。所以视网膜中央动、静脉血流测定能更进一步反映糖尿病视网膜病变的情况。本结果也证实了这一点。

正常情况下 CRA，CRV 血流动力学之间保持着相对稳定的动态平衡关系。虽然有随着年龄增加 CRA 流速逐渐减低，CRV 流速有上升趋势，但不同性别、年龄之间无显著差异（$P>0.05$）。

从结果分析，无糖尿病视网膜病变组患者的 CRA 收缩期峰值流速减低及平均流速减低，CRV 血流速度增快，与正常组比较有显著性差异（$P<0.05$），表明糖尿病在出现典型视网膜病变前确已发生血流动力学异常改变。糖尿病微小血管病变常以血流动力学异常改变始动[2]，故早期发现 CRA，CRV 血流动力学异常，对早期发现和预防微血管病变具有极重要的临床价值，同时对早期诊断糖尿病视网膜病变的防治有重要的价值。

糖尿病视网膜病变患者的视网膜中央动、静脉流速的变化：糖尿病性视网膜病变组 CRA 流速降低，CRV 血流速度增高，与无糖尿病视网膜病变组相比较，有显著差异（$P<0.01$）。表 2 显示，糖尿病性视网膜组的 CRA 收缩期峰值血流速度及平均速度下降，这与文献[3,4]报道一致，CRV 流速均高于正常组及无糖尿病视网膜组，而处高回流状态，这种长期的视网膜血管高回流状态最终将导致血管壁的损伤，特别是毛细血管的损伤，可能与糖尿病患者血液的理化性质有关。由于糖尿病患者血液常处于高粘状态，故 CRV 血流的加快可认为是病理性微循环的一种代偿性改变，并且这种改变需启动微循环的各种调节机制来完成。本结果显示：正常组与 NDRP 组，NDRP 组与 DRP 组流速测值存在着显著差异，提示在一定时期内随着 CRV 流速的增高，微循环在其进行功能调节的同时，其血管损害也愈加明显。因此糖尿病患者的视网膜病变发生、发展之间的关系是复杂的。动态检测视网膜中央动、静脉血流状态对于临床上评价糖尿病视网膜病变的程度有重要的参考价值。

关键词：彩色多普勒；糖尿病；视网膜中央动；静脉
中图法分类号：R445.1　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 中尊茂，李子良，谢立信. 眼科新编[M]. 北京：人民卫生出版社，1991. 411.
[2] 钟学礼，朱德星. 临床糖尿病学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1991. 90.
[3] Feke G T, Buzney S M, Ogasawara H, *et al*. Retinal circulatory abnormalities in type I diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(7): 2968 - 2975.
[4] Ogasawara H, Yoshida A, Feke G T. Analysis of optic nerve head circulation in diabetics using a laser Doppler technique[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1992, 96(10): 1311 - 1316.

（编辑　薛国文）