能与诱导肿瘤细胞凋亡相关。

参考文献：

[1] 杨玲，李连弟，陈育德，等. 中国肺癌死亡趋势分析及发病、死亡的估计与预测[J]. 中国肺癌杂志，2005，8(4)：274－278.

[2] Moghissi K, Dixon K. Update on the current indications, practice and results of photodynamic therapy (PDT) in early central lung cancer (ECLC) [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008, 5(1): 10－18.

[3] Lee J E, Park H S, Jung S S, *et al*. A case of small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy followed by photodynamic therapy [J]. Thorax, 2009, 64(7): 637－639.

[4] Friedberg J S. Photodynamic therapy as an innovative treatment for malignant pleural mesothelioma [J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 21(2): 177－187.

[5] 赵玉沛，杨波，张太平，等. 血卟啉衍生物光动力作用杀伤人胰腺癌细胞的实验研究[J]. 中华外科杂志，2000，38(3)：204－207.

[6] Eljamel M S. Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008, 5(1): 29－35.

[7] Xia Y, Huang Y, Lin L, *et al*. A comparative study on the enhancement efficacy of specific and non- specific iron chelators for protoporphyrin IX production and photosensitization in HaCat cells [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(6): 765－770.

[8] Kiyotoki S, Nishikawa J, Tanimoto H, *et al*. A case of effective photodynamic therapy for local recurrence after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2009, 36(12): 2055－2057.

[9] Nikitina R G, Mardynskaja V P, Morozova T G, *et al*. A method for improving the efficiency of therapy for melanoma [J]. Bull Exp Biol Med, 2009, 148(2): 238－240.

[10] 温子龙，薛平，卢海武，等. 血卟啉光动力作用杀伤人胆管癌细胞的实验研究[J]. 中华普通外科文献，2008，2(1)：17－20.

[11] Nishiyama N, Morimoto Y, Jang W D, *et al*. Design and development of dendrimer photosensitizer- incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(4): 327－338.

（**收稿**：2009-07-20；**修回**：2009-09-15）

（编辑　王小寒）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)05-496-03

转化生长因子-β和结缔组织生长因子在翼状胬肉中的表达

刘　鹢[1]，董利群[1]，陈　菲[1]，邵志华[2]　（201800 上海，嘉定区中心医院眼科[1]；200092 上海，同济大学医学院生物学教研室[2]）

[摘要]　目的　研究正常结膜组织、原发性和复发性翼状胬肉组织中转化生长因子-β(transforming growth factor-β，TGF-β)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor，CTGF)的表达，探讨翼状胬肉的发病机制。**方法**　采用免疫组化法检测10例正常结膜组织、30例原发性和20例复发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF表达情况，Spearman等级相关分析翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达间关系。**结果**　正常结膜组织中TGF-β和CTGF没有或轻度表达。翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF的表达均明显高于正常对照组，差异有显著性意义($\chi^2=7.593$，$\chi^2=13.187$，$P<0.01$)。原发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为66.7%和70.0%，复发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为80%和85%。翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达间存在显著正相关($r=0.4$，$P<0.01$)。**结论**　TGF-β和CTGF在翼状胬肉中高表达，提示这两种细胞因子可能参与了翼状胬肉的发生、发展过程。

[关键词]　翼状胬肉；转化生长因子β；结缔组织因子；免疫组织化学

[中图法分类号]　R777.33；R341；R446.8　　**[文献标志码]**　A

翼状胬肉(pterygium)是眼科的常见病和多发病。表现为睑裂区局部球结膜纤维血管组织呈三角形膜样增生及变性侵犯角膜，多见于鼻侧睑裂区，常双眼发病，术后易复发。发展到一定程度时可引起散光、视力下降、眼部不适感及美容问题，严重影响患者的身心健康。但翼状胬肉的确切发病机制至今不清楚。近年研究表明，翼状胬肉组织中有多种细胞因子(cytokines，CKs)异常表达，并且对翼状胬肉的发生、发展有重要调控作用[1-3]。转化生长因子-β(transforming growth factor-β，TGF-β)和组结缔组织生长因子(connective tissue growth factor，CTGF)在多种眼科疾病发生、发展的病理过程中起关键作用[4-6]。本研究采用免疫组化法比较正常结膜组织与翼状胬肉CTGF、TGF-β的表达差异，以探讨翼状胬肉的发病机制，为其进一步预防及治疗提供依据。

[基金项目]　上海市嘉定区科学技术委员会基金(2006JKK022)

[通信作者]　董利群，电话：(021)69987008-3259，E-mail：lulu_z@live.cn

1 材料与方法

1.1 标本与分组

2006年7月至2008年4月本科原发翼状胬肉切除标本30例,患者年龄48~71(61.8±5.2)岁,复发性翼状胬肉切除标本20例,患者年龄54~71(64.5±4.7)岁,正常结膜组织10例,患者年龄44~68(58.1±10.5)岁。实验分正常结膜组织、原发性和复发性翼状胬肉组织3组,所有病例均无其他角膜、结膜疾病。各组患者年龄、性别经统计学处理无显著差异($P>0.05$)。

1.2 主要试剂

鼠抗人TGF-β单克隆抗体(Abcam公司,1∶500),鼠抗人CTGF单克隆抗体(R&D公司,16 μg/ml),PBS缓冲液(pH 7.2~7.4),0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),DAB显色剂(Sigma公司),3% H_2O_2,山羊血清封闭液,辣根过氧化物酶标记IgG(山羊抗鼠1∶1 000)。

1.3 免疫组化染色

石蜡切片5 μm常规脱蜡和水化,PBS漂洗后用0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲溶液抗原热修复,3% H_2O_2消除内源性过氧化物酶活性,山羊血清封闭非特异性抗原。依次加入一抗、二抗孵育后DAB显色,苏木精复染,盐酸酒精分化。常规脱水、透明、封片,显微镜下观察。用PBS代替一抗作阴性对照。

以细胞质出现黄色或棕黄色着色颗粒为阳性细胞,在高倍镜下(×400)使用网形计数格(5 mm×5 mm,各分为10等份)每片随机选择10个视野进行细胞计数,取平均值。根据阳性细胞的比例分为阴性(-):10个高倍视野未见或偶见1个阳性细胞;弱阳性(+):计数格内阳性细胞数<5个;中度阳性(++):计数格内阳性细胞6~10个;强阳性(+++):计数格内阳性细胞>11个。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.0软件进行统计学处理。计数资料用率表示,采用 χ^2 检验。采用 t 检验、Spearman等级相关分析TGF-β、CTGF在翼状胬肉中表达的相关性。

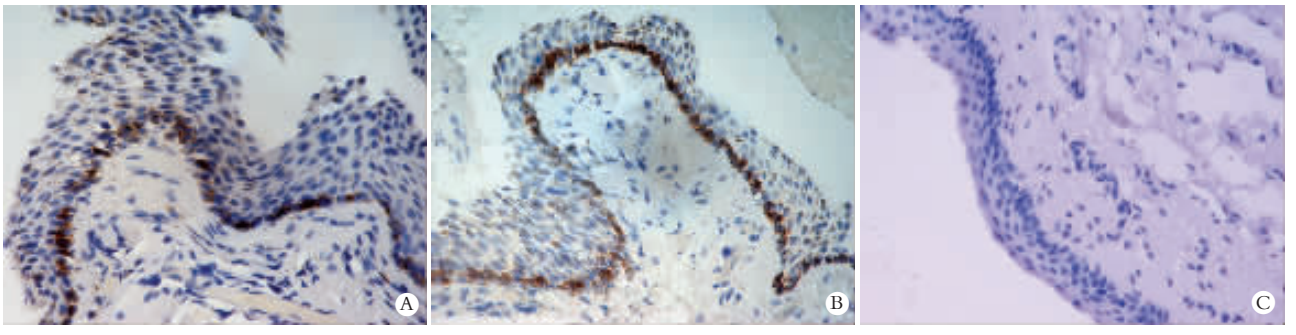
2 结果

正常结膜组织中TGF-β和CTGF没有或轻度表达。翼状胬肉组织中,TGF-β和CTGF阳性细胞增多,上皮细胞、基底细胞、血管内皮和成纤维细胞均有不同程度的染色(图1、2)。翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF的表达均明显高于正常结膜组织($\chi^2=7.593$, $\chi^2=13.187$, $P<0.01$,表1)。原发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为66.7%、70.0%,复发性翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达分别为80.0%、85.0%,提示原发和复发翼状胬肉与TGF-β和CTGF阳性表达有关($P<0.05$)。经Spearman等级相关分析,翼状胬肉组织中TGF-β和CTGF阳性表达间存在显著正相关($r=0.4$, $P<0.01$)。

表1 各组TGF-β和CTGF的表达

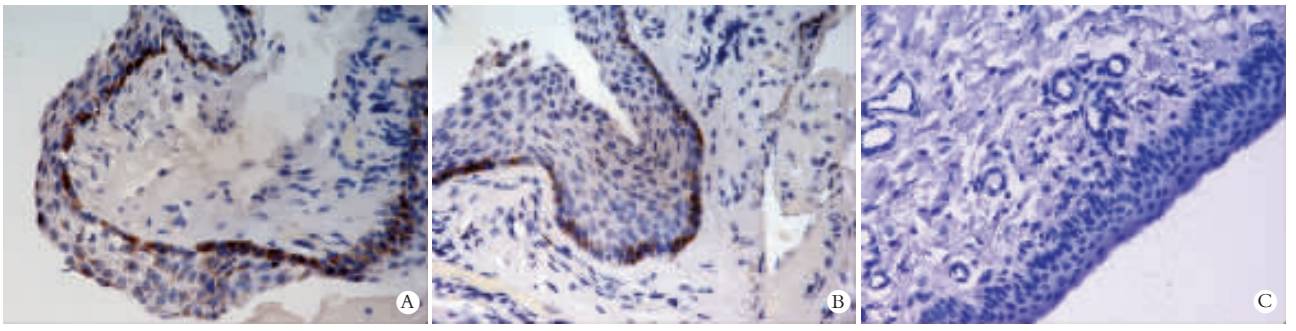
组织	n	TGF-β					CTGF				
		-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)
原发翼状胬肉组织	30	10	6	7	7	66.7[a]	9	6	7	8	70.0[a]
复发翼状胬肉组织	20	4	4	5	7	80.0[a]	3	4	6	7	85.0[a]
正常结膜组织	10	8	2	0	0	20.0	9	1	0	0	10.0

a: $P<0.01$,与正常结膜组织比较



A:原发性翼状胬肉组织;B:复发性翼状胬肉组织;C:正常结膜组织

图1 免疫组化染色观察各组TGF-β表达 (S-P ×400)



A:原发性翼状胬肉组织;B:复发性翼状胬肉组织;C:正常结膜组织

图2 免疫组化染色观察各组CTGF表达差异 (S-P ×400)

3 讨论

TGF-β是一种调节细胞生长和分化的多肽,对细胞的生长分化呈双向调控作用[7],正常表达时能抑制炎症和细胞增生,调节细胞的生长、分化和免疫功能而起正面作用;而过度表达则起致纤维化的负面作用。Chen等[8]对培养的翼状胬肉成纤维细胞的生长特性进行分析发现,外源性TGF-β能促进翼状胬肉成纤维细胞增殖并呈剂量依赖性,这与TGF-β对正常结膜成纤维细胞起抑制作用完全不同,这就说明翼状胬肉中TGF-β的表达增加不仅不能抑制其生长分化,反而起促增殖作用,这与我们的研究相一致。我们研究发现,TGF-β在原发翼状胬肉中表达阳性率为66.7%,在复发翼状胬肉中表达阳性率达80.0%,在翼状胬肉上皮细胞中TGF-β呈强阳性表达,在基质成纤维细胞、血管内皮细胞和血管基底膜中也有TGF-β表达,而在正常结膜组织中TGF-β表达甚少,有显著差异($P < 0.01$),可见在翼状胬肉组织中,TGF-β表达明显增加,并且在复发翼状胬肉中更加明显,失去了其双向调控作用。然而抑制TGF-β虽可能对抑制翼状胬肉的生成和复发有益,但也有导致免疫性疾病的可能,因此,单纯干扰TGF-β的负面效应限制了抗TGF-β抗体的应用,可能引起许多难以预料的副作用,故不能成为临床上抗结膜纤维化的有效措施。寻找TGF-β下游的效应分子作为治疗的靶点将更有实用价值。近年来国内外的研究[9-11]表明CTGF是TGF-β发挥生物效应的下游因子,对纤维细胞的分化增生及细胞外基质的合成和降解具有很强的调控作用,其在各种类型的纤维化疾病中的过度异常表达可能是引起组织纤维化的重要机制之一。临床和实验研究[12]均已证实CTGF的表达与纤维化程度积分呈显著正相关,作为TGF-β的特异性下游分子,TGF-β对CTGF基因转录有明显的调控作用[13]。研究[14]表明如在结缔组织纤维化,病理性瘢痕形成,肝、肾、肺、心、脊髓等多种组织器官纤维化疾病中TGF-β与CTGF大多协同表达增加,同时CTGF对TGF-β的生物效应起介导和加强作用,介导TGF-β的促ECM聚集和组织纤维化效应,CTGF的存在可提高低浓度TGF-β与其受体的结合力,提升TGF-β的促纤维化效应;而在缺少CTGF时,TGF-β不能单独促进组织纤维化进程[15]。因此,CTGF可能仅介导TGF-β的促纤维化作用,生物学效应较单一。我们研究表明,CTGF在正常结膜中呈低表达,在翼状胬肉中的表达明显高于正常结膜组织,复发性翼状胬肉患者CTGF表达高于原发性翼状胬肉患者。在翼状胬肉中,TGF-β和CTGF的表达呈显著正相关,结果提示结膜中由于各种因素刺激,TGF-β表达上调,TGF-β诱导CTGF分泌,从而促进细胞有丝分裂和增生、趋化细胞、诱导细胞黏附、促进细胞外基质(ECM)的合成,从而促进翼状胬肉的发生、发展和复发过程。由此我们可以推测,CTGF可能成为治疗翼状胬肉的新靶点。

参考文献:

[1] 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.

[2] 肖诗艺,袁静,朱格非,等. 明胶A及血管内皮细胞生长因子在翼状胬肉组织中的表达[J]. 眼科新进展,2006, 26(8): 577-580.

[3] 司马晶,Ma J X, Fant J, 等. 翼状胬肉与正常角膜和结膜的PEDF和VEGF水平[J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22(5): 333-334.

[4] 郭长梅,韩全洪,赵俊宏,等. 结缔组织生长因子在体外视网膜色素上皮细胞损伤模型中的表达和促移行作用[J]. 中华眼底病杂志, 2005, 21(5): 306-309.

[5] 郭长梅,惠延年,王雨生,等. 结缔组织生长因子在增生性玻璃体视网膜病变增生膜中的表达[J]. 眼科研究, 2005, 23(2): 128-131.

[6] 马建民,赵家良. 转化生长因子β及其青光眼术后滤过瘢痕化中作用的研究进展[J]. 国外医学:眼科学分册, 2004, 28(5): 320-323.

[7] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000, 103(2): 295-309.

[8] Chen J K, Tsai R J, Lin S S. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994, 30A(4): 243-248.

[9] Bradham D M, Igarashi A, Potter R L, *et al*. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10[J]. J Cell Biol, 1991, 114(6): 1285-1294.

[10] Esson D W, Neelakantan A, Iyer S A, *et al*. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(2): 485-491.

[11] 黄琼,胡燕华,张明昌,等. 羊膜对角膜成纤维细胞CTGF表达及凋亡的影响[J]. 眼科研究, 2006, 24(2): 125-128.

[12] Ihn H, Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF[J]. Curr Opin Rheumatol, 2002, 14(6): 681-685.

[13] Grotendorst G R, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene[J]. Cell Growth Differ, 1996, 7(4): 469-480.

[14] Beddy D, Mulsow J, Watson R W, *et al*. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease[J]. Br J Surg, 2006, 93(10): 1290-1296.

[15] Abreu J G, Ketpura N I, Reversade B, *et al*. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(8): 599-604.

(收稿:2009-07-30;修回:2009-11-03)

(编辑 邓强庭)