论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2454-05

不同浓度肿瘤细胞上清液对成纤维细胞生长及表型转化的影响

肖 衡,杜成友,罗诗樵,刘定志 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 利用含不同浓度肿瘤细胞上清液的条件培养液培养成纤维细胞,观察其对成纤维细胞的生长及表型变化的影响。**方法** 用MTT法和流式细胞凋亡术测定成纤维细胞的生长变化与凋亡率。用RT-PCR检测成纤维细胞转化为肌成纤维细胞后α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)与转化生长因子β_1(TGF-β_1)的表达。用Western blot检测α-SMA、TGF-β_1蛋白的表达。**结果** MTT法发现肿瘤细胞上清液与2×DMEM:F12比例为1:1时,对成纤维细胞的生长有明显的促进作用,其生长速度快于其他浓度($P<0.05$)。流式细胞凋亡术检测表明随着肿瘤细胞上清液浓度的提高,成纤维细胞的凋亡率也上升,1:1的凋亡率与1.5:1时有差异($P<0.05$)。RT-PCR、Western blot表明普通培养液培养的成纤维细胞α-SMA与TGF-β_1的表达高峰在第5天,第7天下降明显($P<0.05$)。当比例为1:1时,α-SMA与TGF-β_1的表达增加,高峰提前到第3天($P<0.05$),第3天以后α-SMA的表达稳定($P=0.96$,$P=0.21$)。**结论** 当肿瘤细胞上清液与2×DMEM:F12比例为1:1时,能有效促进成纤维细胞的生长,并促使成纤维细胞向肌成纤维细胞稳定的转化。

[关键词] 成纤维细胞;肿瘤细胞上清液;肌成纤维细胞;α-平滑肌肌动蛋白;转化生长因子β_1

[中图法分类号] R329.21; R329.28; R322.74 [文献标志码] A

Effect of different concentrations of tumor cell supernatant on growth and phenotypic transition of fibroblasts

Xiao Heng, Du Chengyou, Luo Shiqiao, Liu Dingzhi (Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of different concentrations of tumor cell supernatant on the growth and phenotype transition of fibroblasts. **Methods** Fibroblasts were cultured in conditioned medium containing different concentrations of tumor cell supernatant. Fibroblasts growth tendency was tested by MTT assay, and apoptotic rate was analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of α-SMA and TGF-β_1 were tested by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** MTT assay showed that when the ratio of tumor cell supernatant and 2×DMEM:F12 was 1:1, the growth of the fibroblasts was significantly promoted($P<0.05$), and when the ratio was 2:1 or the supernatant was completely used, the growth could be restrained. As the concentration of tumor cell supernatant increased, the cells apoptotic rate was rising. The apoptotic rate exhibited significant difference between the ratio of 1:1 and 1.5:1 ($P<0.05$). RT-PCR and Western blotting demonstrated that α-SMA and TGF-β_1 expressed by fibroblasts that were cultured in normal medium reached the peak level at the fifth day, and then decreased significantly at the seventh day ($P<0.05$). When the ratio of tumor cell supernatant and 2×DMEM:F12 was 1:1, the expressions of α-SMA and TGF-β_1 ($P=0.96$, $P=0.21$) increased and reached the peak at the third day ($P<0.05$), after that time the α-SMA expression was sustained. **Conclusion** When the ratio of tumor cell supernatant in 2×DMEM:F12 is 1:1, the growth of fibroblasts and fibroblasts transformation into myofibroblasts could be effectively promoted.

[**Key words**] fibroblasts; tumor cells supernatant; myofibroblast; α-SMA; TGF-β_1

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30972945). Corresponding author: Du Chengyou, Tel:86-23-89011182, E-mail: duchengyou@126.com

有研究表明,成纤维细胞在低细胞密度培养的条件下可以自动转化为以α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)作为标志性蛋白的肌成纤维细胞[1]。组织器官在受伤以后,受伤组织周围的成纤维细胞会受到组织损伤后释放的某些细胞因子如转化生长因子β_1(TGF-β_1)的刺激,使其转化为肌成纤维细胞[2-3]。但是以上形

[基金项目] 国家自然科学基金(30972945)

[通信作者] 杜成友,电话:(023)89011182, E-mail: duchengyou@126.com

成的肌成纤维细胞都不具有稳定性,最终会逆转为成纤维细胞。

在肿瘤相关的研究中表明,肿瘤间质部位的成纤维细胞会受到某些肿瘤生长因子的刺激,促使成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,从而促进肿瘤的生长和侵袭[4-5]。在体外,有相关研究表明肿瘤上清液培养的成纤维细胞可以转化为能促进 VEGF-A 的分泌的肌成纤维细胞[6]。但是在体外的研究中少见文献报道依靠肿瘤细胞上清液激活成纤维细胞后转化的肌成纤维细胞的表型是否稳定。关于肿瘤细胞上清液激活成纤维细胞的最佳浓度,以及不同肿瘤细胞上清液的浓度对其表型的转变和生长有何影响,目前国内外也少见相关的研究。

关于实体肿瘤的研究,它们的生长与侵袭过程都与间质部位的成纤维细胞受到肿瘤的旁分泌作用后转化为肌成纤维细胞相关,旁分泌作用主要是由于 TGF-β1、EGF、FGF、TNF 等相关细胞因子密切相关。而肝癌的生长与侵袭也与上述作用密切相关。目前也有相关研究用肝癌细胞培养的上清液培养成纤维细胞,观察成纤维细胞在肿瘤中发挥的作用。但是目前还少见就肝癌细胞上清液促进成纤维细胞表型转化,及其转化的可能机制作出相关研究。我们通过该研究,希望找到一个最适合成纤维细胞生长以及最利于成纤维细胞表型转化的肿瘤上清液的浓度,为促进成纤维细胞生长和促使成纤维细胞快速稳定的向肌成纤维细胞转化提供一种新的实践方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标本的来源:经患者及家属同意,无菌取重庆医科大学附属儿童医学院泌尿外科儿童包皮环切术后废弃包皮组织。SMMC-7721 人肝癌细胞株(中国科学院上海细胞生物学研究所)。DMEM: F12 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(GIBCO 公司),0.25% 胰酶(GIBCO 公司),青链霉素(HyClone 公司),Trizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司),Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒(TOYOBO 公司)。TGF-β_1 兔抗人单克隆抗体(abcam 公司),α-SMA 兔抗人单克隆抗体(abcam 公司),β-actin 兔抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司),兔抗人 IgG 二抗试剂盒(Santa Cruz 公司),Western blot 试剂盒(Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 条件培养基的制备 用 DMEM: F12 培养肝癌细胞,取 3 ml 含 5×10^5 细胞的细胞悬液在 50 ml 培养瓶中培养 3 d 后,收集培养上清液,将其在 3 000 r/min 离心 15 min,除去上清液中的死细胞及其他杂质,然后将上清液用无菌滤膜过滤,将其置于 -20 ℃保存。使用时将其与含 20% FBS 的 2 × DMEM: F12 按不同浓度混合组成条件培养基,混合比例分别为 0.5∶1、1∶1、1.5∶1、2∶1,以及完全肿瘤上清液用以培养成纤维细胞使用。

1.2.2 成纤维细胞的制备 成纤维细胞的分离、培养参见文献[7]。在细胞培养到第 2 代至第 8 代时[1],用条件培养液培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞生长 收集对数期成纤维细胞,分别用普通培养液,含不同浓度肿瘤细胞上清液的条件培养液以及无血清的 DMEM: F12 培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^3/ml(低密度)[1],取 200 μl 细胞悬液接种于 96 孔板,每组设 8 个复孔,各组细胞在 5% CO_2,37 ℃培养箱培养 2 h、1、2、3、5、7 d 后,每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml,即 0.5% MTT),继续培养 4 h 后,终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的光密度值,并绘制光密度值-时间的细胞生长曲线。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取各组生长于高峰期的成纤维细胞,将细胞悬浮于 500 ml 的 BindingBuffer 中,加入 FITC 标记的 Annexin-V (20 μg/ml) 5 μl 以及 PI 染液(50 μg/ml) 10 μl,轻轻混匀;室温、避光、孵育 10 min。在 1 h 内,进行流式细胞仪检测。

1.2.5 RT-PCR 分析 α-SMA、TGF-β_1 的表达 细胞处理同 MTT 法。所有引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列分别为:GAPDH 基因序列:上游引物 5′-AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3′,下游引物 5′-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3′,退火温度 59 ℃,产物长度 532 bp。α-SMA 基因序列:上游引物 5′-AGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGC-3′,下游引物 5′-CTCTCTGTCCACCTTCCAGCAG-3′,退火温度 57 ℃,产物大小为 199 bp。TGF-β_1 基因序列:上游引物 5′-CACGACAACATGTCCCGCT-3′,下游引物为 5′-CTCCGGTGACATCAAAAGAT-3′,退火温度 59 ℃,产物大小为 379 bp。逆转录(RT)条件为 37 ℃反应 15 min,85 ℃反应 5 s 合成 cDNA。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 30 s,按各自退火温度退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,扩增 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,PCR 扩增产物取 3 μl,2% 琼脂糖凝胶电泳。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 α-SMA、TGF-β_1 蛋白的表达 制蛋白样品后置于 -20 ℃保存备用。变性后用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,TTBS 洗涤 3 次,分别用人 α-SMA 单克隆抗体 1∶500、人 TGF-β_1 单克隆抗体 1∶400 孵育 4 ℃过夜,TTBS 洗涤 3 次后,与兔抗人 IgG 二抗 1∶500 室温孵育 2 h。TTBS 洗涤 3 次后,使用 ECL 发光液进行反应,暗室曝光。使用 β-actin 作为阳性对照。

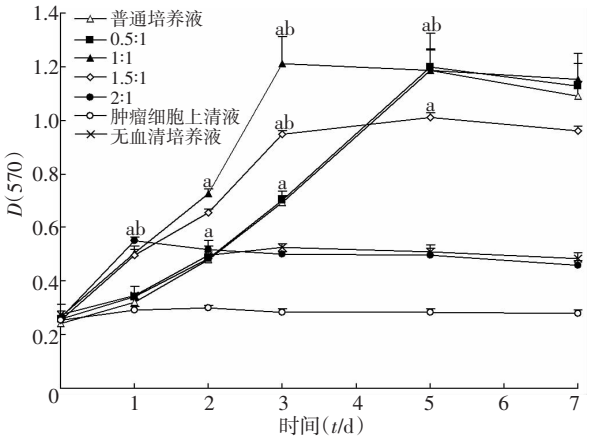
1.2.7 统计学分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 SPSS 17.0 软件进行分析,用单因素方差分析各组内数据。将目的基因条带 α-SMA 与 TGF-β_1 mRNA 和内参 GAPDH 的平均光密度值作半定量分析。将目的蛋白条带 α-SMA 与 TGF-β_1 和内参 β-actin 的平均光密度值作半定量分析。

2 结果

2.1 MTT 法检测不同浓度肿瘤上清液对成纤维细胞的生长影响

0.5∶1浓度的条件培养液培养的成纤维细胞的生长情况与普通培养液无明显差异。1∶1与 1.5∶1浓度的条件培养液能使成纤维细胞的生长对数期由第 5 天提前到第 3 天($P<0.05$)。1∶1浓度时相对应时间点的细胞数量多于普通培养液培养的细胞($P<0.05$)。但是 1.5∶1浓度时,细胞在生长高峰期总数量

减少($P<0.05$)。2∶1浓度的条件培养液、完全肿瘤细胞上清液及无血清的DMEF∶F12培养基对成纤维细胞的生长无明显作用($P=0.51$,$P=0.82$,$P=0.61$)。如图1。

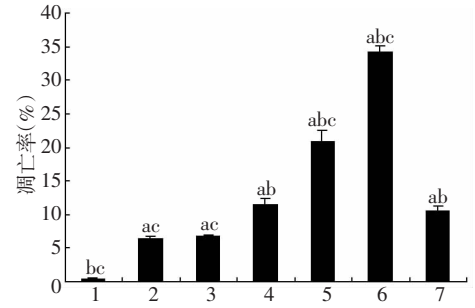


a:$P<0.05$,同一时间不同浓度比较;b:$P<0.05$,同一培养液相邻时间点比较

图1　不同浓度肿瘤细胞上清液培养成纤维细胞的生长趋势

2.2　流式细胞仪检测成纤维细胞的凋亡

随着肿瘤细胞上清液浓度的不断提高,成纤维细胞的凋亡率也随之升高。0.5∶1与1∶1浓度的条件培养液培养的成纤维细胞的凋亡率比较无差异($P=0.609$)。1.5∶1浓度的条件培养液培养的成纤维细胞的凋亡率与无血清的DMEN∶F12培养基培养的成纤维细胞的凋亡率比较无差异($P=0.221$)。其余各组间均有统计学意义($P<0.05$)(图2)。

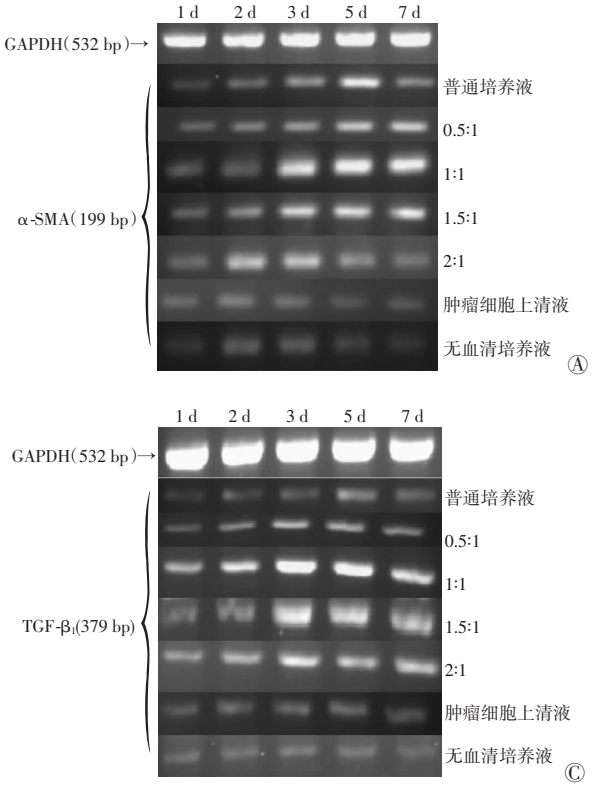


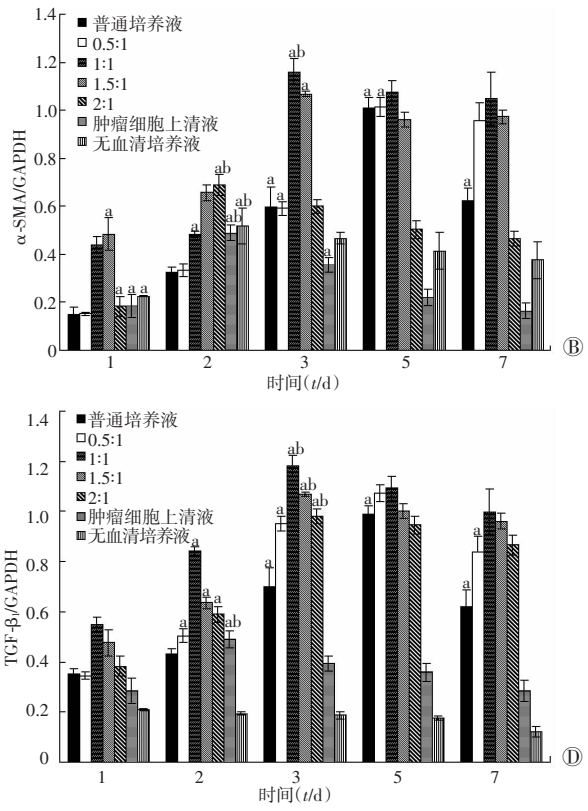
1:普通培养液;2~5:肿瘤细胞上清液与2×DMEM∶F12比例分别为0.5∶1、1∶1、1.5∶1、2∶1组成的条件培养液;6:完全肿瘤细胞上清液;7:无血清的DMEM∶F12培养基　a:$P<0.05$,与1比较;b:$P<0.05$,与2或3比较;c:$P<0.05$,与7比较

图2　肿瘤细胞上清液对成纤维细胞凋亡的影响

2.3　RT-PCR检测α-SMA与TGF-β_1的表达

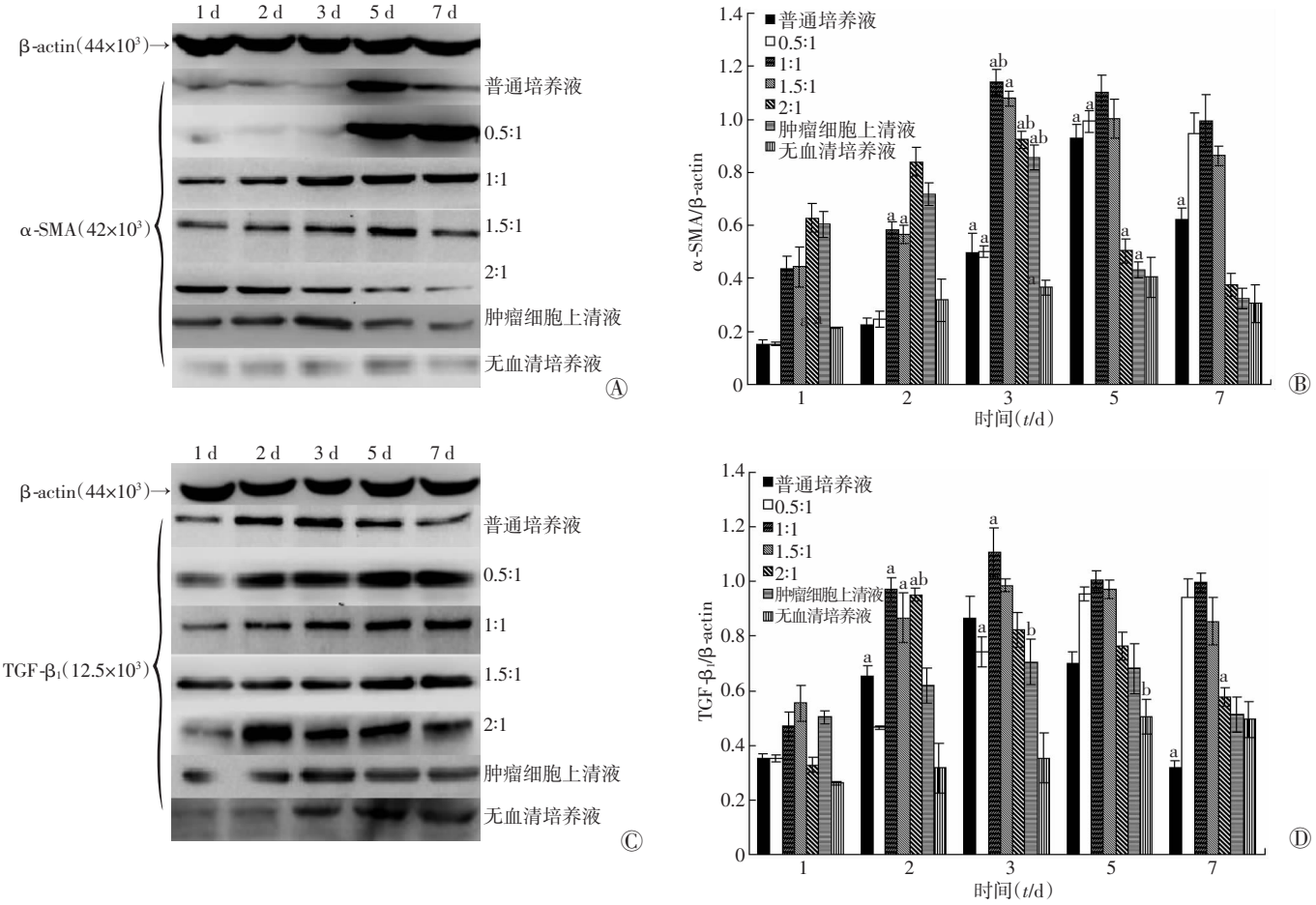
用普通培养液培养的成纤维细胞在第5天α-SMA与TGF-β_1的表达最高,第7天下降($P<0.05$)。当条件培养液的比例为0.5∶1时,α-SMA与TGF-β_1在第5天达到高峰之后,α-SMA与TGF-β_1表达稳定($P=0.08$,$P=0.10$)。当比例为1∶1与1.5∶1时,α-SMA与TGF-β_1的表达高峰提前到第3天,高峰表达量有增高($P<0.05$),高峰之后,表达稳定($P=0.96$,$P=0.75$;$P=0.21$,$P=0.07$)。2∶1比例时,α-SMA表达量在第2天达到高峰后,逐渐下降($P=0.02$);TGF-β_1表达量在第1、2天变化不明显,第3天达到高峰,第5、7天明显下降($P=0.04$,$P<0.05$)。用完全肿瘤细胞上清液与无血清的DMEN∶F12培养基培养,α-SMA与TGF-β_1表达均较低,变化不明显($P>0.05$)。见图3。





A、B:α-SMA半定量分析;C、D:TGF-β_1半定量分析;a:$P<0.05$,同一培养液相邻时间点比较;b:$P<0.05$,不同培养液成纤维细胞表达峰值比较

图3　不同浓度的肿瘤细胞上清液培养的成纤维细胞在不同时间点α-SMA与TGF-β_1 mRNA的表达



A、B:α-SMA 半定量分析;C、D:TGF-β_1 半定量分析;a:$P<0.05$,同一培养液相邻时间点比较;b:$P<0.05$,不同培养液成纤维细胞表达峰值比较

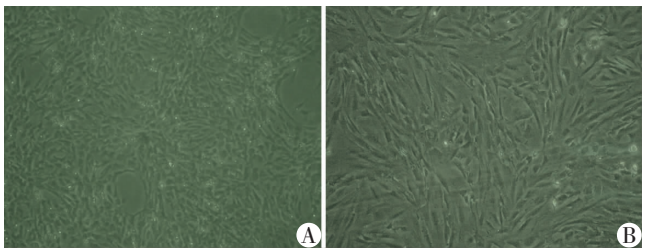
图 4　不同浓度的肿瘤细胞上清液培养的成纤维细胞在不同时间点 α-SMA 与 TGF-β_1 蛋白的表达

2.4　Western blot 检测 α-SMA 与 TGF-β_1 蛋白的表达

用普通培养液培养的成纤维细胞在第 5 天 α-SMA 的表达最高,第 7 天出现下降($P<0.05$)。当条件培养液的比例为 0.5∶1 时,α-SMA 在第 5 天达到高峰之后,α-SMA 表达稳定($P=0.75$)。当比例为 1∶1 与 1.5∶1 时,α-SMA 的表达高峰提前到第 3 天,表达量有明显增高($P<0.05$),高峰之后,表达稳定($P=0.12$,$P=0.31$)。2∶1 比例时,α-SMA 表达量在前 3 d 表达较高,第 3 天后逐渐下降($P=0.01$),用完全肿瘤细胞上清液培养,α-SMA 表达同 2∶1 比例时一致。无血清的 DMEN∶F12 培养基培养,α-SMA 表达均较低,变化不明显($P>0.05$)。TGF-β_1 无论用什么浓度都是从第 2 天开始升高。普通培养液培养的成纤维细胞在第 7 天 TGF-β_1 的表达出现下降($P=0.00$)。条件培养液培养时,TGF-β_1 在第 2 天表达升高之后,表达稳定($P>0.05$)。无血清的 DMEN∶F12 培养基培养,TGF-β_1 表达均较低,在第 3 天升高($P=0.04$)。见图 4。

2.5　普通培养液与条件培养基培养的成纤维细胞的形态变化

从形态学上看用含肿瘤上清液的条件培养基培养的成纤维细胞的细胞形态与原代培养的成纤维细胞的细胞形态出现一定的差异,条件培养基培养的成纤维细胞变得细长,并且细胞更易出现双核或多个细胞核。见图 5。



A:普通培养液培养;B:条件培养液培养

图 5　普通培养液与条件培养基培养的成纤维细胞的形态对比观察　(×40)

3　讨论

在肿瘤细胞的生长过程中,会分泌一些生长因子,如成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGF)等[8];同时也会分泌因子如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)等激活某些促凋亡系统[9-10]。

在研究成纤维细胞的生长曲线中发现,含有适当肿瘤细胞上清液的条件培养液对成纤维细胞的生长有促进作用。在肿瘤上清液与 2×DMEM∶F12 的比例为 0.5∶1、1∶1 时,其对成纤维细胞的整个生长过程有明显的促进作用;在条件培养液的比例达到 1.5∶1 时,条件

培养液对成纤维细胞的早期生长也有一定的促进作用，这种作用可能与肿瘤细胞上清液中分泌FGF、IGF-Ⅱ等一系列细胞因子相关。

在条件培养液比例达到1.5∶1、2∶1以及完全用肿瘤细胞上清液培养成纤维细胞时，流式结果表明成纤维细胞的凋亡指数随着肿瘤细胞上清液浓度的升高而升高，这说明了肿瘤细胞上清液在较高浓度时，上清液中含有的TNF-α、IL-1β等促进凋亡系统激活的细胞因子的浓度也较高，同时肿瘤细胞上清液还可以抑制正常细胞的生长，这种细胞凋亡和细胞生长抑制的调控机制可能与肿瘤细胞在机体组织中对肿瘤组织周围正常细胞组织发挥的作用相似[11]。当比例达到2∶1以及完全用肿瘤细胞上清液培养成纤维细胞的时候，成纤维细胞的生长明显减慢或停滞生长，这可能还与条件培养液中含有胎牛血清量等营养因子较低相关，正如本次研究中用无血清的DMEM∶F12培养成纤维细胞，其生长基本停滞。

关于成纤维细胞的表型转化，已经有研究表明成纤维细胞在低密度时可以自主的转化为肌成纤维细胞。普通培养液培养的低细胞密度成纤维细胞可以自主的转化为肌成纤维细胞，主要是因为在低密度的条件下，细胞之间不能相互接触，为成纤维细胞转化过程中提供了更多的TGF-β_1受体[12]，随着细胞的生长密度逐渐增加，暴露的TGF-β_1受体部位减少，自主转化形成的肌成纤维细胞也逆分化为成纤维细胞，这与我们的研究结果一致。这说明低密度的成纤维细胞的自主分化原因主要是由于细胞之间不能相互接触。

我们通过RT-PCR、Western blot对α-SMA表达的研究发现当含有肿瘤细胞上清液的条件培养液的浓度比例为1∶1、1.5∶1时，α-SMA的表达高峰由第5天提前到第3天，并且第3天以后α-SMA表达量相对稳定，这说明适当浓度的肿瘤上清液可以有效的促进成纤维细胞转化为肌成纤维细胞，并且转化后的肌成纤维细胞的表型更为稳定，这可能与肿瘤细胞上清液中的TGF-β_1密切相关[13-14]。通过RT-PCR、Western blot对TGF-β_1的研究发现，TGF-β_1能够增加成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的速度，并且可以稳定肌纤维细胞的表型。TGF-β_1与α-SMA之间的相互作用可能是因为TGF-β_1能够快速的接触成纤维细胞表面的TGF-β_1受体，从而促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化[12]。在该实验中，当条件培养液的浓度比例为1∶1、1.5∶1时培养成纤维细胞，随着时间的延长，激活后形成的肌成纤维细胞并不会逆分化为成纤维细胞，这说明TGF-β_1具有维持肌成纤维细胞表型的作用。目前关于TGF-β_1在成纤维细胞转化为肌成纤维细胞的作用，主要是说明了TGF-β_1能够更有效地加快其转化速度[1]，而在维持肌成纤维细胞表型的作用上还少见相关报道，关于其维持表型的作用机制有待进一步研究。同时随着肿瘤细胞上清液浓度达到2∶1，以及用完全肿瘤细胞上清液培养成纤维细胞时，即使TGF-β_1有相对较高的表达，但是α-SMA的表达量较低且不稳定，这可能与高浓度时肿瘤细胞上清液中含有的某些凋亡因子干扰成纤维细胞向肌成纤维细胞转化以及成纤维细胞的生长受限相关，至于它们是怎样发挥作用的，有待进一步研究。

通过该研究我们发现，当肿瘤细胞上清液浓度比例为1∶1时，更有利于成纤维细胞的生长及向肌成纤维细胞快速稳定的转化。通过该项研究，我们找到了对成纤维细胞损伤最小，最适合成纤维细胞生长、向肌成纤维细胞转化最为快速稳定的肿瘤细胞上清液浓度，能为我们利用肿瘤细胞上清液培养成纤维细胞，将激活的成纤维细胞作为一种新的可用于促进血管再生的可移植细胞使用奠定实践基础，这将为成纤维细胞的研究和临床应用开阔更好的前景。

参考文献：

[1] Masur S K, Dewal H S, Dinh T T, *et al*. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(9): 4219-4223.

[2] Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, *et al*. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(6): 2508-2519.

[3] Phan S H. Biology of fibroblasts and myofibroblasts[J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(3): 334-337.

[4] Xouri G, Christian S. Origin and function of tumor stroma fibroblasts[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(1): 40-46.

[5] Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(17): 2713-2722.

[6] Guo X, Oshima H, Kitmura T, *et al*. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer[J]. J Biol Chem, 2008, 283(28): 19864-19871.

[7] 刘爱军，靳俊峰. 人皮肤成纤维细胞的高效分离培养及鉴定[J]. 广东医学，2008，29(12)：1969-1970.

[8] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(2): 116-129.

[9] Hahm E R, Singh S V. Bim contributes to phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2011, [Epub ahead of print].

[10] Xiao D, Zeng Y, Choi S, *et al*. Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(7): 2670-2679.

[11] Bandapalli O R, Hariri N, Macher-Goppinger S, *et al*. Increased apoptosis of host cells and tumor cells in the invasion front of colorectal liver metastases[J]. Anticancer Res, 2011, 31(4): 1215-1224.

[12] Rizzino A, Kazakoff P, Ruff E, *et al*. Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor beta, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor[J]. Cancer Res, 1988, 48(15): 4266-4271.

[13] Yang L, Pang Y, Moses H L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression[J]. Trends Immunol, 2010, 31(6): 220-227.

[14] Meyer-Ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, *et al*. p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(4): 1500-1509.

（**收稿**：2011-08-09；**修回**：2011-09-06）

（编辑 张 维）