

TGF- β_1 体外对人眼眶成纤维细胞³H-Pro 掺入的影响

高自清, 方丽, 周琦, 李娟, 岳晓丽, 李宁

作者单位: (233004) 中国安徽省蚌埠市, 蚌埠医学院第一附属医院眼科

作者简介: 高自清, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 高自清. gaozq70@163. com

收稿日期: 2010-09-15 修回日期: 2010-10-26

Influence of TGF- β_1 on human orbital fibroblasts by ³H-Pro absorption *in vitro*

Zi-Qing Gao, Li Fang, Qi Zhou, Juan Li, Xiao-Li Yue, Ning Li

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China

Correspondence to: Zi-Qing Gao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China. gaozq70@163. com

Received: 2010-09-15 Accepted: 2010-10-26

Abstract

• AIM: To investigate the influence of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) on human orbital fibroblast (OF) by ³H-Pro absorption *in vitro*.

• METHODS: Human OF were cultured *in vitro*. Different concentrations of TGF- β_1 (0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 μ g/L) were incubated with cultured human OF. The collagen synthesis was evaluated by ³H-Pro absorption.

• RESULTS: TGF- β_1 of 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μ g/L could promote the ³H-Pro absorption more than the control group while the concentration of TGF- β_1 of 100.0 μ g/L had a different result.

• CONCLUSION: There is a concentration-dependant effect between TGF- β_1 and collagen synthesis of OF.

• KEYWORDS: orbital fibroblast; transforming growth factor- β_1 ; collagen synthesis; proliferative vitreoretinopathy

Gao ZQ, Fang L, Zhou Q, *et al.* Influence of TGF- β_1 on human orbital fibroblasts by ³H-Pro absorption *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2271-2272

摘要

目的: 观察转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 对人眼眶成纤维细胞 (orbital fibroblast, OF) ³H-Pro 掺入的影响。

方法: 体外培养人 OF, 用 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 μ g/L TGF- β_1 对细胞进行处理, 用 ³H-Pro 掺入法测定细胞放射性强度来判断细胞胶原合成。

结果: 用 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μ g/L TGF- β_1 作用后 OF ³H-Pro 掺入量增加。100.0 μ g/L TGF- β_1 对 OF 作用相反。

结论: TGF- β_1 对人 OF 合成胶原有双相调节性。

关键词: 眼眶成纤维细胞; 转化生长因子 β_1 ; 胶原合成; 增生性玻璃体视网膜病变

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.013

高自清, 方丽, 周琦, 等. TGF- β_1 体外对人眼眶成纤维细胞³H-Pro 掺入的影响. 国际眼科杂志 2010;10(12):2271-2272

0 引言

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是孔源性视网膜脱离发生后, 成纤维细胞、视网膜色素上皮 (RPE) 细胞、神经胶质细胞和巨噬细胞等在生长因子的作用下, 从原位移行、增生并有表型变化到合成细胞外基质 (ECM)、形成具有收缩能力的增生膜^[1]。膜的收缩造成视网膜的固定皱褶, 为临床上常见的致盲性眼病。膜中 ECM 成分主要有大量的胶原和纤维连接蛋白 (FN), 而成纤维细胞是主要的效应细胞, 其过度增殖及合成分泌胶原的增多是 PVR 的重要特征。PVR 还与包括转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 在内的许多细胞因子有关^[2]。我们探讨 TGF- β_1 对人眼眶成纤维细胞 (orbital fibroblast, OF) 合成胶原的影响, 旨在深入了解 PVR 可能的发病机制, 为临床治疗 PVR 提供有效方法。

1 材料和方法

1.1 材料 眼球摘除术后二期行义眼植入者, 男, 13 岁, 手术在无菌条件下取眼眶内结缔组织。Eagle's MEM 培养液和胰蛋白酶 (Gibco); 胎牛血清 (Hyclone); rhTGF- β_1 (Cytolab); 鼠抗人 Vimentin mAb、鼠抗人 Keratin mAb、鼠抗人 Desmin mAb (福州迈新公司), ³H-TdR (北京原子高科核技术应用股份有限公司)。HW0301 型二氧化碳培养箱 (Harris); FJ-2107P 型液体闪烁计数器 (国营二六二厂); CK40-329H 倒置显微镜及照相系统 (Olympus)。

1.2 方法 标本的处理与细胞原代及传代培养参照文献^[3]的方法进行。成纤维细胞的免疫细胞化学染色参照文献^[4]的方法进行。取对数生长期的细胞, 用 2.5g/L 胰蛋白酶 + 0.2g/L EDTA-2Na 的消化液将细胞消化成单个, 用含 100mL/L FBS 的 Eagle MEM 培养液调整细胞密度为 2×10^8 /L。取 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24h 待细胞贴壁后改用含 40mL/L FBS 的 Eagle MEM 培养液继续培养。24h 后取出培养板, 分为实验组和空白对照组, 空白对照组不加 TGF- β_1 , 实验组分别加入 0.1, 1.0, 5.0, 10, 100.0 μ g/L 的 TGF- β_1 , 每组设 4 个复孔, 继续培养 48h。取出培养板, 每孔加入 100 μ L ³H-Pro, 使之终浓度为 3.7×10^{10} Bq/L。继续培养 24h, 弃去培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 2.5g/L 胰蛋白酶的消化液将细胞消化成单个。用多头细胞收集器将细胞于 49 型玻璃纤维滤纸 (先用生理盐水洗 3 次, 再用 50g/L TCA 洗 2 次) 滤纸 80 $^{\circ}$ C 烘干, 放入闪烁瓶内, 加闪烁液 5mL, 置 FJ-2107P 液体闪烁计数器中闭光 1h, 然后测量每瓶放射性计数。

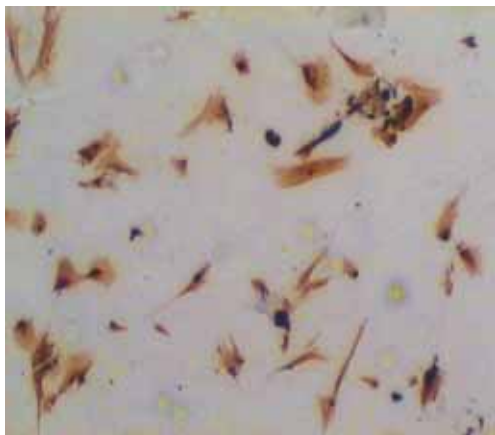


图1 人OF免疫组化示细胞Vimentin表达阳性(SABC × 100)。

统计学分析:数值用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 10.0统计软件进行统计分析,组间比较用单因素方差分析及两两比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

人OF眼眶成纤维细胞培养2wk后,倒置显微镜下人OF呈长梭形、三角形或不规则形态,体积大小不一,胞体狭长、透亮,胞核呈椭圆形,位于细胞中央,胞质丰富,胞膜清晰。细胞免疫组化可见Vimentin染色阳性(图1),Desmin, Keratin和S100染色阴性,证实为成纤维细胞。各实验组 $^3\text{H-Pro}$ 掺入值与对照组(123.2 ± 2.3)Bq相比较均有显著性差异,在TGF- β_1 浓度为0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$ 时 $^3\text{H-Pro}$ 掺入值($149.5 \pm 5.0, 178.2 \pm 5.2, 201.1 \pm 3.8, 186.6 \pm 3.4$ Bq, $P < 0.05$)较对照组增大,在TGF- β_1 浓度为100 $\mu\text{g/L}$ 时 $^3\text{H-Pro}$ 掺入值(75.0 ± 5.4)Bq较对照组减小。

3 讨论

PVR组织病理学研究表明,成纤维细胞、视网膜色素上皮细胞等参与了PVR的形成,其中成纤维细胞是主要的效应细胞,它的活化增殖在PVR形成过程中起到了先导的重要作用^[5],它合成细胞外基质,后者是PVR中增殖膜的主要成分。PVR的发生还与包括TGF- β 、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和白细胞介素(interleukin, IL)等在内的许多细胞生长因子有着直接或间接的联系。PVR发生的机制,目前已公认是一个细胞介导的病理过程,眼内尤其是视网膜内存在着多种生长因子及抑制因子,二者之间的平衡使眼内组织生长与死亡之间达到平衡。在病理情况下,眼内多种疾病导致视网膜释放多种生长因子,从而打破了这种平衡。这些生长因子具有趋化作用,促细胞增生作用,促细胞外基质合成作用等,参与了PVR形成的全部过程。实验证实,PVR过程中大量出现的胶原及纤维连接蛋白均与TGF- β 刺激有关^[6]。郭长梅等^[7]应用免疫组化和原位杂交方法证实PVR增生膜中有转化生长因子 β 受体的蛋白和mRNA的表达。

在对PVR增殖膜的超微结构观察中发现,I和III型

胶原呈弥漫性分布;II型局限在边缘部及内界膜附近;IV型的分布常常与I和III型及内界膜相关联。在体内,成纤维细胞具有合成及分泌胶原的功能,胶原是组成细胞外基质的重要成分,细胞外基质又是细胞移行的支架,细胞与细胞外基质的相互作用使增殖膜具有牵拉视网膜的作用,它是PVR发生的危险因素。胶原中有含量极高的脯氨酸,因而用 ^3H 标记成纤维细胞合成的胶原中的脯氨酸($^3\text{H-Pro}$),液体闪烁计数器中测定放射性计数,就可以间接了解细胞中胶原的含量。我们将人OF进行体外培养代替眼内的成纤维细胞用于实验,用外源性的TGF- β_1 进行干预,通过不同浓度TGF- β_1 作用后用 $^3\text{H-Pro}$ 对细胞胶原合成进行测定,本实验方法得到的结果显示低浓度(0.1 $\mu\text{g/L}$)TGF- β_1 对人OF合成胶原即有促进作用,且随着TGF- β_1 浓度的增加,成纤维细胞合成胶原速度加快,但过高浓度TGF- β_1 (100.0 $\mu\text{g/L}$)作用后细胞合成胶原发生抑制。TGF- β_1 浓度为0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$ 时cpm值较对照组增大,在TGF- β_1 浓度为100.0 $\mu\text{g/L}$ 时cpm值较对照组减小,其结果与TGF- β_1 作用后细胞增殖的情况十分相似,可以推定,TGF- β_1 对成纤维细胞合成胶原的影响是通过影响细胞增殖,进而影响细胞对胶原的合成来实现的。

TGF- β 是通过碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对成纤维细胞起作用的,较低浓度的TGF- β 诱导成纤维细胞bFGF mRNA和蛋白质合成,促进细胞增殖,而过高浓度的TGF- β 导致bFGF受体数目减少或bFGF与受体亲和力降低,从而降低了bFGF与受体结合,进而抑制了细胞的增殖^[8]。这与本结果有着较高的一致性,因而我们推测PVR病例的眼内可能TGF- β 浓度远未达到抑制成纤维细胞增殖所需的高浓度,故表现为促成纤维细胞增殖,进而促进胶原蛋白的产生和增殖膜形成,对PVR的发生具有诱导作用。未来临床上如果用抗TGF- β 抗体来消减TGF- β 的作用,即抑制成纤维细胞的增殖和由其产生的增殖膜的收缩,可能会为临床治疗PVR提供一种简单高效的方法。

参考文献

- 1 惠延年. 眼科学. 第6版. 北京:人民卫生出版社 2004:162-168
- 2 Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, et al. TGF-beta 1, TGF-beta receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2336-2342
- 3 吴中耀,刘桂琴,杨华胜,等. 白介素1 α 和白介素受体拮抗剂对培养的Graves'眼眶成纤维细胞增殖作用的影响. *眼科研究* 2003;21(6):561-564
- 4 潘晓勤,黄文彦,陈荣华. 人胚胎肾间质成纤维细胞培养及鉴定. *南京医科大学学报自然科学版* 2003;23(1):11-13
- 5 Kähler CM, Herold M, Kaufmann G, et al. Induction of arachidonic acid metabolite release by human fibroblasts in proliferative vitreoretinopathy. *Eur J Pharmacol* 1998;341(1):111-117
- 6 Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF-beta 2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1210-1216
- 7 郭长梅,惠延年,马吉献,等. 转化生长因子- β 受体II在增生性玻璃体视网膜病变增生膜中的表达. *眼科学报* 2003;19(4):244-247
- 8 Frank F, Zeisberg M, Renziehausen A. TGF- β induces proliferation in human retinal fibroblast via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 2001;59(2):579-592