

翼状胬肉纤维组织起源于间充质干细胞的证据

李永平¹, 朱哲¹, 张文忻¹, 刘琳², 梁丹¹

(1. 中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 广州陆军总医院, 广东 广州 510120)

摘要: **【目的】**研究翼状胬肉组织病理学特征, 探讨多能干细胞在翼状胬肉发生过程中的作用。 **【方法】**对 218 例手术切除翼状胬肉标本, 进行形态学、免疫组织化学和免疫荧光共聚焦显微镜观察其形态学变化及 CD34、波形纤维蛋白(VIM)、平滑肌肌动蛋白(SMA), S-100在翼状胬肉中的表达。 **【结果】**纤维组织增生及新生血管形成成为翼状胬肉的主要病理改变。增生的纤维组织不同区域变化不一, 主要呈现两类变化: 一为排列致密, 类似巩膜纤维组织; 另外就是疏松区: 仅见一些梭形、多角形、星状具有一些突起的纤维母细胞样的细胞, 疏松排列, 之间无明显的胶原纤维存在。免疫组织化学和免疫荧光显示一些增生活跃的纤维母细胞明显表达 CD34, 成熟的纤维组织内的纤维细胞 CD34 则为阴性。此外, 218 例中 56 例显示了平滑肌的存在, 44 例有脂肪组织。 **【结论】**翼状胬肉组织中的纤维组织源自于间充质干细胞, 并可向平滑肌及脂肪组织分化。

关键词: 翼状胬肉; 病理学; 间充质干细胞; 纤维组织; 细胞起源

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0127-04

Evidence of Fibrous Tissue in Pterygium Originated from Mesenchymal Stem Cells

LI Yong-ping¹, ZHU Zhe¹, ZHANG Wen-xin¹, LIU Lin², LIANG Dan¹

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Guangzhou Military Hospital, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **【Objective】** To investigate the histopathological feature of pterygium and the significance of multipotent stem cells in pterygium. **【Methods】** A total of 218 cases of pterygium were collected after the clinic operation, and these specimen were studied under the light microscope by HE, PAS, immunohistochemical stain and confocal scanning laser ophthalmoscope by immunofluorescent staining with CD34, VIM, VEGF, SMA, S-100. **【Results】** Fibroplasia and neovascularization were the main changes in pterygium. Fibroplasia varied in different region, two main presentation were observed: First, the tissue arrange compactly like the scleral fibre; Second, in some ramified and loose region, a few of spindle-shape, polygonal, asteroid fibroblast-like cells could be seen only, and arranged loosely. No apparent collagen fibers were identified between them. Immunohistochemistry and immunofluorescence illustrated that CD34 were positively detected in some region where the fibroblast actively proliferated, but the fibrocyte in mature fibrous tissue were negatively expressed. Besides, 56 cases had smooth muscle and 44 cases had adipocyte in pterygium. **【Conclusion】** The fibrous tissues in pterygium originated from mesenchymal stem cells, they can differentiate into smooth muscle and adipose tissue.

Key words: pterygium; pathology; mesenchymal stem cells; fibrous tissue; cell origination

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):127-130;136]

翼状胬肉是眼科较为常见的眼表面疾病之一。根据流行病学的调查结果显示^[1], 它与阳光、风尘等各种外界因素的慢性刺激和局部慢性炎症反应有关。目前关于翼状胬肉发病机制有多种理论

和学说, 但均未得到公认。本研究从组织病理学出发, 结合免疫组化及免疫荧光共聚焦显微镜对翼状胬肉进行研究, 旨在探讨间充质干细胞在翼状胬肉发生过程中的可能机制。

收稿日期: 2006-12-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30672276); 广东省社会发展攻关项目(2003A3020302); 广州市科委领域专项资助项目(2004B30901011)

作者简介: 李永平(1961-), 男, 湖南郴州人, 硕士, 教授。E-mail: yongpingli1961@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 标本

218 例经临床及病理诊断为翼状胬肉的石蜡标本,均来自中山大学中山眼科中心病理室。其中 50 例标本进行了免疫组织化学染色。另外,新近收到的新鲜标本除一半进行常规的石蜡处理外,另一半改用多聚甲醛固定,冰冻切片,免疫荧光染色共聚焦显微镜观察。

1.2 主要试剂

一抗 SMA、VIM、CD34、S-100,迈新公司。荧光抗体 FITC 抗鼠,Dako 公司。Hoechst,碧云天公司。

1.3 染色方法

1.3.1 PAS 染色 常规连续切片脱蜡至水,5 g/L 高碘酸氧化 10 min,蒸馏水稍洗,雪夫试剂(Schiff's 液)避光染色 20 min,5 g/L 偏重亚硫酸钠滴洗 3 min × 3 次,蒸馏水稍洗,苏木素复染 5 min,流水浸洗,脱水、透明、常规中性树胶封片。阳性表现为紫红色。

1.3.2 石蜡切片免疫组织化学染色 标本经 100 g/L 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,作 4 μm 连续切片。切片脱蜡至水,抗原修复 95 °C 10 min, PBS 3 min × 3 次,30 mL/L H₂O₂,37 °C 10 min, PBS 3 min × 3 次,正常山羊血清封闭 10 min,擦干后加一抗,37 °C 孵育 60 min, PBS 3 min × 3 次, Post-blocking 37 °C 20 min, PBS 3 min × 3 次, poly- HRP Anti- Ms/Rb IgG 37 °C 30 min, PBS 3 min × 3 次, DAB 显色,苏木素复染 5 min,流水浸洗,脱水、透明、常规中性树胶封片。阳性表现为棕色。

1.3.3 免疫荧光染色共聚焦显微镜观察 标本经 40 g/L 多聚甲醛固定,经过 100 g/L、200 g/L、300 g/L 的蔗糖溶液各 8 h 梯度脱水后,作 8 μm 连续切片。冰冻切片复温入水,30 mL/L H₂O₂,37 °C 10 min, PBS 3 min × 3 次,正常山羊血清封闭 10 min,擦干后加一抗,37 °C 孵育 60 min,二抗 FITC 37 °C 水育箱中孵育 40 min。Hoechst 染核,室温 5 min, PBS 3 min × 3 次,透明,体积分数为 75% 的甘油封片,激光共聚焦显微(Zeiss,510 Meta)镜下观察。阳性表现为苹果绿色。

2 结果

翼状胬肉在组织学上主要由纤维血管组织构

成,其上为来自结膜或角膜的鳞状上皮覆盖。一些表面上皮内能见到杯状细胞,故主要来自结膜上皮;一些上皮细胞内生,植入到其下增生的纤维结缔组织中,在纤维组织内形成上皮条索或上皮团,并围成一些上皮衬里的囊腔。

218 例翼状胬肉中均能见到增生的纤维组织,不同病例增生纤维组织的量变化不完全相同,同一病例不同区域变化也不完全一致。一些纤维排列排列密,较为成熟,类似巩膜中的纤维结缔组织(图 1A);一些区域表现为增生活跃,为梭形、多角形、星状具有一些突起的纤维母细胞样的细胞(图 1B),疏松排列,其间无明显的胶原纤维存在。在成熟的巩膜样纤维与增生活跃区间可有过渡区,即纤维母细胞样细胞伴有少量纤维小束或散在的纤维存在。一些纤维呈嗜碱性样变性,这些变性的纤维多分布在上皮下;纤维组织中的纤维及血管所占的比例可因人而异,血管的性质不同病例也不完全一致:218 例中除 1 例未见到明显的血管外,所有病例均出现新生的毛细血管。毛细血管形态大小极不一致,有单个细胞围成的血管、小毛细血管和中毛细血管,95 例能见到静脉性血管,31 例尚有一些动脉性血管存在(图 1C)。

此外,翼状胬肉组织中 56 例尚能见到一些粉红色、略带嗜碱性的小团状、梭形或不规则形的细胞束(图 1D),束中细胞呈长梭形、两端略圆钝,细胞边界欠清晰,核也呈两端钝圆的短梭形。44 例组织中出现分化好、典型的脂肪细胞(图 1E)。4 例组织中能见到神经纤维束。

VIM 免疫组织化学染色在大部分纤维细胞(图 2A)、血管内皮细胞、血管壁及周细胞呈阳性反应。CD34 免疫组织化学染色:增生活跃区的纤维母细胞样细胞呈阳性反应(图 2B),但成熟的纤维组织为阴性反应。血管内皮细胞及周细胞呈阳性反应,内皮细胞与周细胞间的血管壁则为阴性。S-100 染色神经纤维丝及脂肪细胞均呈阳性反应。SMA 染色显示上述 HE 染色中略带嗜碱性的小团状、梭形或不规则形的细胞束呈阳性反应(图 2C),证明为平滑肌。各种上述抗体免疫荧光染色共聚焦显微镜进一步证明增生活跃的细胞为阳性反应,呈现为苹果绿色(图 2D、E)。

3 讨论

3.1 翼状胬肉病变性质

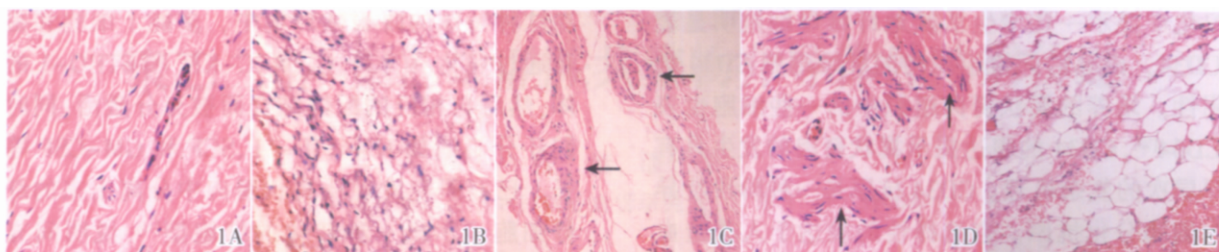


图1 翼状胬肉组织的 HE 染色

Fig.1 HE stain of pterygium

A: Sclera-like fibrous tissues in pterygium (×200); B: Some loose region in pterygium (×200); C: Some proliferative artery-like vessels in pterygium (Arrow showed,×100); D: Proliferative smooth muscle in pterygium (Arrow showed, ×200); E: Mature adipocyte in pterygium (×200)

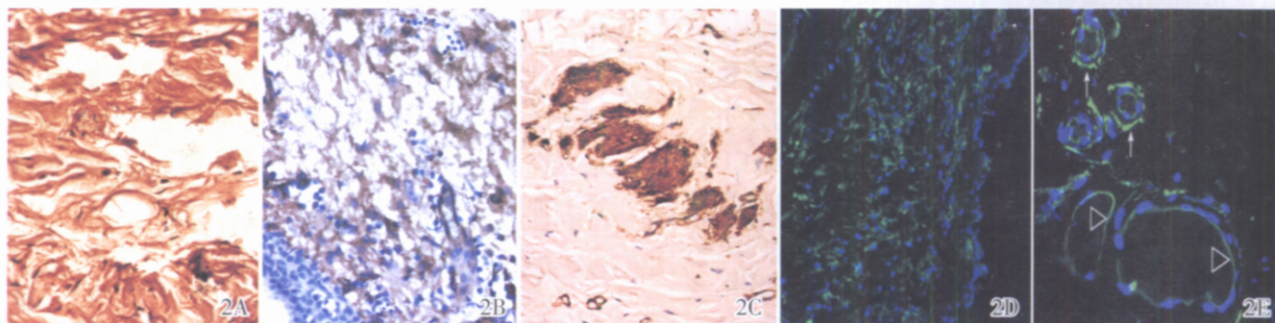


图2 翼状胬肉组织的免疫组化及免疫荧光染色

Fig.2 Immunohistochemical and immunofluorescent stain of pterygium (×200)

A: VIM immunohistochemical stain (brown) . Fibrous tissue in pterygium were positive expressed with VIM; B: CD34 immunohistochemical stain (brown) . Fibroblast-like cells were CD34-positive in meshwork region of pterygium; C: SMA immunohistochemical stain (brown) . Proliferative smooth muscles were positive with SMA in pterygium; D: CD34 immunofluorescence stain (green). The cells of loose meshworks were stained into apple-green; E: CD34 immunofluorescence stain (green) . Endothelial cells (Δ)of blood vessels, perivascular cells (Arrow showed) were stained into apple-green, the vessel walls were negative expressed with CD34

翼状胬肉病变是一种增生和变性并存、以纤维血管组织增生为主的病变^[2],表现为睑裂区呈三角形增厚的灰白色组织,其头部能越过角膜缘,向角膜内侵袭生长,重者达中央或遮盖整个角膜,影响视力。手术切除仍是主要的治疗措施,但病变复发率较高,且术后生长能力更强^[3]。有关翼状胬肉病变的性质,有两种截然不同的观点:(1)翼状胬肉为一种增生性、变性疾病;(2)翼状胬肉不仅表现为纤维血管组织的大量增生,同时又具有较强的侵袭能力,破坏角膜缘的完整结构侵入角膜内呈进行性生长,故为一种肿瘤性病变^[2,4]。炎症介质或生长因子参与了 this 病变形成过程。近年来注意到翼状胬肉的发生与干细胞有关^[5-7]。Coroneo等^[8]提出翼状胬肉发病的两阶段假说,将翼状胬肉的发病过程分为两个阶段。第一阶段:角膜缘上皮干细胞减少、消失或功能丧失,角结膜屏障功能发生障碍;第二阶段:角膜的结膜化。结膜上皮、结膜下成纤维细胞增生活跃,侵入角膜上皮,并发炎

症,新生血管形成,结缔组织重塑,从而胬肉形成。Dushku^[9]指出改变的角膜缘上皮干细胞的移位是翼状胬肉的病因之一,而血管纤维增生是对这种改变的细胞发出信号的反应,因此角膜缘上皮基底干细胞可能也参与了翼状胬肉组织的发生。覆盖翼状胬肉组织表面的角膜缘上皮的病理性变化有可能有助于其纤维组织向角膜内侵入生长,但毕竟角结膜上皮复层鳞状上皮并非翼状胬肉组织的主体,故上述观点并没有较合理解释翼状胬肉病变过程中增生的纤维血管组织的来源。

3.2 翼状胬肉与间充质干细胞的关系

病理形态学观察表明纤维组织增生及新生血管形成为翼状胬肉的主要病理改变,增生的纤维组织不同区域变化不一,主要呈现两类变化:一为排列排致密,类似角巩膜纤维结组织,组织中的纤维细胞少、长梭形;另外就是疏松区:仅见一些梭形、多角形、星状具有一些突起的纤维母细胞样的细胞,疏松排列,间无明显的胶原纤维存在。免疫

组织化学显示一些增生活跃地纤维母细胞明显表达 CD34, 成熟的纤维组织内的纤维细胞 CD34 则为阴性。培养的翼状胬肉组织中的一些细胞也表达 CD34^[10]。CD34 的表达提示翼状胬肉的发生具有更深层次的复杂机理。CD34 抗原是一种阶段特异性白细胞分化抗原。它选择性的表达于人类造血干细胞(HSC)、祖细胞(PC)和血管内皮细胞(EC)表面^[11]等。它是分子量为 105~120ku 的高度糖基化型跨膜蛋白。CD34 阳性细胞(表达 CD34 抗原的细胞)既含有造血干细胞也存在不同分化阶段的各系造血祖细胞,并随着造血细胞逐渐成熟,CD34 的表达量逐渐减少,直至消失。CD34 在正常及肿瘤性的小血管内皮中都有表达,是一种与新生小血管相关的抗原^[12],由于其在新生血管内皮中表达远大于非新生血管内皮,提示其作用与血管生成有关;CD34 还是最敏感的血管内皮标记物,它作为内皮细胞的表面受体在发育的早期就出现。翼状胬肉组织中增生活跃的梭形细胞表达 CD34,提示多分化潜能的干细胞可能是由间充质干细胞分化而来。

间充质干细胞是多潜能干细胞,在脐血、外周血、脂肪、皮肤等多种组织中都有分布。在成体的很多器官和组织中存在着间充质干细胞,以备修复和再生所用^[13]。间充质干细胞形似成纤维细胞而不同于成纤维细胞^[14],在于其具有增殖分化潜能。间充质干细胞来源于早期中胚层和外胚层的一类多能干细胞,理论上可分化为所有中胚层来源的细胞,在发育的不同阶段和特定环境条件下,可向骨、软骨、肌肉、神经、血管及血液细胞等多种方向分化。本研究形态学观察除增生的纤维血管组织外,218 例病例中还发现 56 例中纤维组织内存在平滑肌成分,44 例病变中有灶性成熟的脂肪组织,这些成分在正常的结膜下组织均不能见到,表明胬肉组织中具有向肌肉、脂肪等组织分化的多潜能干细胞,提示该干细胞可能是间充质干细胞。

3.3 翼状胬肉组织中间充质干细胞的来源

至于翼状胬肉组织中间充质干细胞来源何处并不十分清楚,有人^[5,6]提出骨髓源性间充质干细胞可能参与到了翼状胬肉的病因学当中,环境因素比如紫外线、炎症和破损的细胞等激起了诸如 TGF- β 、IL-1、b-FGF、MMPs 等这类生长因子和细胞因子的增生,这些介质和细胞因子对角膜缘的损伤作为信号传到骨髓刺激了多能干细胞和祖细胞的多阶修复和再生反应,一旦多能干细胞和祖细胞被激活便可通过外周血迁移至角膜缘区,

在这种特殊的眼表微环境中,多能干细胞和祖细胞通过表达 AC133、CD34、C-KIT 和 STRO-1 的受体,然后与相应的配体结合而被充分激活,同时它们还分泌诸如 IL-6、IL-11、SCF 和 GM-CSF 等因子。已有研究发现从翼状胬肉中分离出来的纤维母细胞显示出一种转化的细胞型^[15],说明间充质干细胞在受到外在因素作用后趋向分化为纤维母细胞。

我们通过免疫组织化学等在一些纤维增生活跃区发现一些胞质丰富、具有突起的星形、梭形、不规则形的细胞呈明显的 CD34 阳性反应,而成熟的纤维组织区 CD34 表达是阴性的。基于这些 CD34 阳性细胞周围并未见到明显的炎症细胞,我们认为这些翼状胬肉组织中的间充质干细胞可能是发育过程中潜伏在巩膜上或结膜上皮下的间充质干细胞。

参考文献:

- [1] AI-BDOUR M, AI-LATAYFEH MM. Risk factors for pterygium in an adult Jordanian population [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2004, 82(6): 642-671.
- [2] 张梅, 刘祖国, 李永平, 等. 翼状胬肉上皮细胞 p53 蛋白的表达及其功能状态的研究[J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(2): 115-116.
- [3] LIN A, Stern G. Correlation between pterygium size and induced corneal astigmatism[J]. *Cornea*, 1998, 17(1): 28-30.
- [4] WEINSTEIN O, ROSENTHAL G, ZIRKIN H, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia [J]. *Eye*, 2002, 16(5): 619-621.
- [5] LEE J K, SONG Y S, HA H S. Endothelial progenitor cells in pterygium pathogenesis[J]. *Yonsei Med J*, 2006, 46(5): 687-692.
- [6] YE J, SONG Y S, KANG S H, et al. Involvement of bone marrow-derived stem and progenitor cells in the pathogenesis of pterygium[J]. *Eye*, 2004, 18(8): 839-843.
- [7] DI IORIO E, BARBARO V, RUZZA A. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(27):9523-8.
- [8] CORONEO M T, GIROLAMO N D, WAKEFIELD D. The pathogenesis of pterygia [J].*Curr Opin Ophthalmol*, 1999, 10(4): 282-288.
- [9] DUSHKU N, JOHN M K, SCHULTZ G S, et al. Pterygia

(下转第 136 页 to page 136)

- versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92 (16):7297- 7301.
- [4] NGYUGEN H K, LEMIEUX P, VINOGRADOV S V, et al. Evaluation of polyether - polyethylenimine graft copolymers as gene transfer agents [J]. Gene Ther, 2000, 7(2):126- 138.
- [5] FISHER K D, ULBRICH K, SJBR V, et al. A versatile system for receptor - mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression [J]. Gene Ther, 2000, 7(15):1337- 1343.
- [6] MERDAN T, KOPECEK J, KISSEL T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(5): 715- 758.
- [7] 张璇, 潘仕荣, 吕澍, 等. 聚乙二醇-聚乙炔亚胺共聚物的制备及其表征[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6):53- 57.
- [8] OGRIS M, STEINLEIN P, KURSA M, et al. The size of DNA/transferring- PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells [J]. Gene Ther, 1998, 5 (10):1425- 1433.
- [9] TANG G P, ZENG J M, GAO S J, et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent [J]. Biomaterials, 2003, 24(13):2351- 2362.
- [10] LUO D, SALTZMAN W M. Synthetic DNA delivery systems [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18 (1):33- 37.
- [11] PETERSEN H, KUNATH K, MARTIN A L, et al. Polyethylenimine- graft- poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system [J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(4):845- 854.
- [12] PUTNAM D, ZELIKIN A N, IZUMRUDOV V A, et al. Polyhistidine-PEG: DNA nanocomposites for gene delivery [J]. Biomaterials, 2003, 24 (24):4425- 4433.
- [13] SUNG S J, MIN S H, CHO K Y, et al. Effect of Polyethylene Glycol on Gene Delivery of Polyethylenimine [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(4):492- 500.
- [14] GUY J, DRABEK D, ANTONIOU M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor- mediated endocytosis and gene therapy [J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3):237- 248.

(编辑 黄小延)

(上接第 130 页 from page 130)

- pathogenesis: corneal invasion by matrix metallo- proteinase expressing altered limbal epithelial basal cells[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(5): 695- 706.
- [10] 郝尚臣, 刘祖国. 人翼状胬肉细胞的分离和培养[J]. 眼科学报, 2006, 22(1): 25- 29.
- [11] SCHATTEMAN G C, AWAD O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors[J]. Anat Rec A, 2004, 276(1):13- 21.
- [12] 柏树令, 赵丹. CD34 抗原的生物学特性及其临床应用[J]. 解剖科学进展, 2005, 11 (1) : 54- 56, 60.
- [13] 仵敏娟, 刘善荣, 刘厚奇. 间充质干细胞特性与应用前景[J]. 生命科学, 2004, 16(3) : 135- 137.
- [14] 吴北燕, 黄绍良, 陈惠芹, 等. 胎肝造血期胎肝间充质干细胞的分离、培养及生物学特性[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(5) : 498- 501.
- [15] KRIA L, OHRIA A, AMEMIYA T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor- and tumor necrosis factor- in the pterygium [J]. Acta Histochem, 1996, 98(2) : 195- 201.

(编辑 刘清海)