

基质细胞衍生因子-1 及其受体 CXCR4 在翼状胬肉中的表达及意义

刘仓仓^{1,2}, 曹小彪³, 黄建波⁴, 高晓唯¹, 任兵¹, 任红燕¹, 蔡岩¹

引用:刘仓仓,曹小彪,黄建波,等. 基质细胞衍生因子-1 及其受体 CXCR4 在翼状胬肉中的表达及意义.国际眼科杂志 2020; 20(3):517-521

基金项目:新疆维吾尔自治区卫生与健康适宜技术推广资助项目(No.SYTG-201993);解放军第四七四医院重点扶持科研资助项目(No.2017474006,2018474008)

作者单位:(830013)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,中国人民解放军第474医院¹眼科;⁴心内科;²(830011)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆医科大学第五附属医院眼科;³(831100)中国新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州,中国人民解放军93864部队医院内科

作者简介:刘仓仓,女,毕业于新疆医科大学,眼科学硕士,住院医师,研究方向:眼表疾病、眼底病。

通讯作者:蔡岩,男,毕业于第四军医大学,眼科学博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病及眼底病。wlmqren101@126.com

收稿日期:2019-07-05 修回日期:2020-02-15

摘要

目的:探讨基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及其受体趋化因子受体(CXCR4)在不同年龄翼状胬肉患者中的表达及意义。

方法:收集2018-01/10在中国人民解放军第四七四医院行原发性翼状胬肉切除术的手术标本60例60眼(其中年龄<50岁30眼,年龄>50岁30眼),同时间收集年龄匹配的斜视矫正术和视网膜脱离复位术患者的正常结膜组织30例30眼(其中年龄<50岁15眼,年龄>50岁15眼)。采用HE染色和免疫组织化学法检测SDF-1和CXCR4在翼状胬肉组织标本中的表达和定位,分析SDF-1和CXCR4的表达与患者临床表现的关系。使用IPP 6.0软件定量测定SDF-1和CXCR4的平均光密度。

结果:SDF-1和CXCR4在正常结膜上皮基底细胞显示阳性或无阳性表达,而在翼状胬肉中全层结膜上皮细胞和血管内皮细胞均有阳性表达,其表达水平差异显著,基底细胞中表达更明显,显示出明显极性。翼状胬肉组织中SDF-1和CXCR4的表达量均高于正常结膜组织($P < 0.05$);年龄<50岁患者的CXCR4表达量大于年龄>50岁患者的表达量($P < 0.05$)。

结论:SDF-1和CXCR4在翼状胬肉中表达上调,提示SDF-1和CXCR4参与翼状胬肉的形成,抑制SDF-1/CXCR4信号通路,可能抑制翼状胬肉发生,也可能成为翼状胬肉的药物靶点,成为一个新的研究方向。年轻翼状胬肉患者CXCR4的表达更高,提示未来可能实现个体化给药,减少医疗资源的浪费。

关键词:翼状胬肉;基质细胞衍生因子-1;受体趋化因子受体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.3.25

Expression and significance of stromal cell-derived factor - 1 and its receptor CXCR4 in patients with pterygium

Cang - Cang Liu^{1,2}, Xiao - Biao Cao³, Jian - Bo Huang⁴, Xiao - Wei Gao¹, Bing Ren¹, Hong - Yan Ren¹, Yan Cai¹

Foundation items: Appropriate Technique Extension Project of Health Commission of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. SYTG - 201993); Key Scientific Research Project of No. 474 Hospital of Chinese PLA (No.2017474006, 2018474008)

¹Department of Ophthalmology; ⁴Department of Cardiology, No.474 Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, the Fifth Afiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Department of Internal Medicine, No.93864 Hospital of Chinese PLA, Changji 831100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Yan Cai. Department of Ophthalmology, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. wlmqren101@126.com
Received:2019-07-05 Accepted:2020-02-15

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression and significance of stromal cell-derived factor (SDF-1) and its receptor CXCR4 in patients with pterygium of different ages.

• **METHODS:** From January 2018 to October 2018, surgical specimens of 60 patients with primary pterygium and 60 eyes (including 30 eyes younger than 50 years old and 30 eyes older than 50 years old) were collected from the No. 474 Hospital of Chinese PLA, at the same time collect age matched strabismus diorthosis and normal conjunctiva tissues of 30 patients with retinal detachment repairs (including 15 eyes younger than 50 years, older than 50 years of age 15 eyes). The expression and localization of SDF - 1/CXCR4 in pterygium tissue specimens were detected by HE staining and immunohistochemistry, and the relationship between the expression of SDF - 1/CXCR4 and the clinical characteristics of patients was analyzed. The mean optical density of SDF-1 /CXCR4 was measured by IPP 6.0 software.

• **RESULTS:** SDF-1/CXCR4 showed slightly positive or no

positive expression in normal conjunctival basal cells, but positive expression in both full-layer conjunctival epithelial cells and vascular endothelial cells in pterygium, with significant difference in expression level, and more obvious expression in basal cells, showing obvious polarity. The expression levels of SDF-1 and CXCR4 in pterygium tissues were higher than those in normal conjunctival tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of CXCR4 in patients younger than 50 years old was greater than that in patients older than 50 years old, and the difference was statistically significant ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** SDF-1 and CXCR4 expression is up-regulated in pterygium, suggesting that SDF-1 and CXCR4 participates in the formation of pterygium and inhibits the SDF-1/CXCR4 signaling pathway, which may inhibit the occurrence of pterygium, and may also become a drug therapeutic target for pterygium, and become a new research direction. The higher expression of CXCR4 in young pterygium patients suggests that individualized drug administration may be realized in the future to reduce the waste of medical resources.

• **KEYWORDS:** pterygium; stromal cell-derived factor-1; CXCR4

Citation: Liu CC, Cao XB, Huang JB, et al. Expression and significance of stromal cell-derived factor-1 and its receptor CXCR4 in patients with pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(3):517-521

0 引言

翼状胬肉是一种呈翼状增生并侵及角膜的良性纤维血管病变,其发病机制包括紫外线的生物学效应、免疫学说、成纤维细胞转化、角膜缘干细胞移行学说、细胞凋亡等^[1]。近来研究表明,翼状胬肉的发生发展与新生血管有关^[2]。研究发现基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor, SDF-1)通过与特异性受体趋化因子受体(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)结合,趋化CD34⁺细胞增殖并诱导血管生成,从而参与了许多血管新生性疾病的发病过程^[3-4]。本研究探讨翼状胬肉组织中SDF-1/CXCR4在其发生和发展中的作用及其意义。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 标本的来源及收集 收集2018-01/10在解放军第四七四医院行翼状胬肉切除术的标本60例60眼,均来源于鼻侧静止期翼状胬肉,男24例,女36例;其中年龄<50岁组30眼,年龄27~49(平均40.23±6.56)岁,年龄>50岁组30眼,年龄52~82(平均62.23±8.47)岁。纳入标准:(1)按照诊断标准确诊的位于鼻侧静止期的翼状胬肉;(2)头部长入角膜2~4mm。排除标准:(1)复发性翼状胬肉;(2)活动性眼部炎症;(3)假性翼状胬肉;(4)单眼多发的翼状胬肉。

同期收集视网膜脱离术或斜视矫正手术中切除的多余正常结膜组织30例30眼,其中男12例,女18例;年龄<50岁组15眼,年龄26~44(平均37.40±5.50)岁,年龄>50岁组15眼,年龄55~71(平均60.60±4.62)岁。纳入标准:年龄相匹配单纯孔源性视网膜脱离术或斜视矫正手术

中患者的鼻侧角巩缘结膜组织。排除标准:(1)术眼或对侧眼有翼状胬肉或睑裂斑;(2)既往有手术史;(3)术眼有角结膜病史;(4)术眼有外伤史者。所有翼状胬肉患者均采用翼状胬肉切除+自体球结膜移植术治疗。两组性别、年龄、有无全身病及病史等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1、2。而室外工作者翼状胬肉的患病率更高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。本研究经中国人民解放军第四七四医院医学伦理委员会批准(批文号:2014-伦审字-27),所有患者均被告知并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗人SDF-1单克隆抗体(英国abcam有限公司);山羊抗人CXCR4多克隆抗体(英国abcam有限公司);SP兔二步法试剂盒(北京中杉金桥公司)、SP山羊二步法试剂盒(北京中杉金桥公司)、DAB试剂盒(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 将收集的组织标本用生理盐水冲洗干净,用质量分数4%多聚甲醛溶液固定用于免疫组织化学检测。

1.2.2 免疫组织化学法检测标本中SDF-1和CXCR4的表达 将组织用石蜡包埋,行3 μ m连续切片,每个组织取5张切片,用作免疫组织化学染色和HE染色。石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,去除过氧化氢酶活性,微波修复,羊血清封闭,滴加兔抗人SDF-1单克隆抗体(稀释浓度1:100)或山羊抗人CXCR4多克隆抗体(稀释浓度1:150),湿盒内4 $^{\circ}$ C过夜;滴加生物素标记的二抗,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。用已知的SDF-1和CXCR4阳性表达组织切片作为阳性对照;空白对照选用0.01mol/L PBS缓冲液代替一抗。置于显微镜下观察标本的上皮细胞以及血管内皮细胞出现棕黄色颗粒为阳性表达,采用image-pro plus 6.0图像分析软件测量随机5个视野的光密度值,取平均值,所得值为该区域的光密度值。HE染色切片了解组织的大体结构。

统计学分析:利用统计软件SPSS19.0进行分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述,采用独立样本 t 检验。计数资料采用 $n(\%)$ 描述,运用 χ^2 检验和Fisher确切概率法。相关分析采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 翼状胬肉组织病理学特征 显微镜下,正常结膜组织可分为上皮层和基质层,上皮层下基质层血管较疏松,有散在的毛细血管和少量的成纤维细胞和炎性细胞(图1A,细箭头所示)。翼状胬肉组织的上皮层鳞状上皮增生明显,基质层有较多纤维组织和新生血管组织,伴有较多炎性细胞的浸润(图1B,细箭头所示),部分切片中还可看到嗜碱性物质和变性物质的存在(图1C,粗箭头所示)。

2.2 SDF-1和CXCR4在不同年龄的翼状胬肉患者中的表达 通过免疫组化方法,可以观察到SDF-1和CXCR4蛋白在正常结膜中仅见上皮基底细胞有少量阳性表达或不表达,而在翼状胬肉组织的全层上皮细胞以及血管内皮细胞内均出现SDF-1和CXCR4阳性染色的棕黄色颗粒,见图2、3。

2.3 SDF-1和CXCR4在不同年龄的翼状胬肉患者中的平均光密度值 SDF-1和CXCR4在翼状胬肉组织中的表达量明显高于正常结膜组织,差异均有统计学意义($P<0.01$,表3)。SDF-1在不同年龄翼状胬肉组中的表

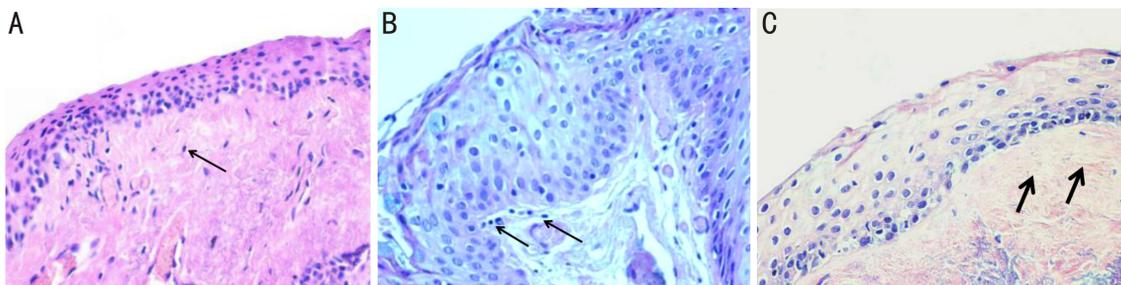


图1 正常结膜和翼状胬肉的组织结构(HE染色×400) A:正常结膜,箭头所示炎性细胞;B:小于50岁的翼状胬肉患者,箭头所示为炎性细胞;C:年龄大于50岁的翼状胬肉患者,粗箭头指变性物质。

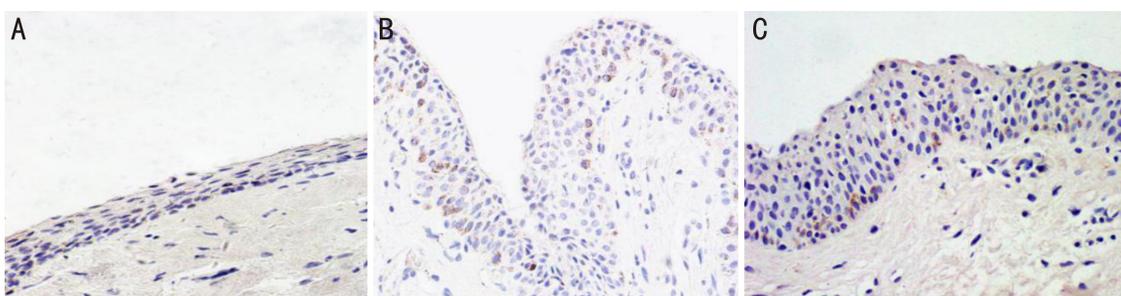


图2 SDF-1在正常结膜和翼状胬肉中的表达(免疫组织化学法×400) A:正常结膜;B:年龄<50岁的翼状胬肉患者;C:年龄>50岁的翼状胬肉患者。

表1 翼状胬肉与正常结膜组患者的一般资料

| 一般资料 | 翼状胬肉组 | 正常结膜组 | χ^2/t | <i>P</i> |
|-------------------------|-------------|----------|------------|----------|
| 性别(例,%) | | | 1.440 | 0.230 |
| 男 | 24(40) | 16(53) | | |
| 女 | 36(60) | 14(47) | | |
| 民族(例,%) | | | - | 0.343 |
| 汉族 | 44(73) | 25(83) | | |
| 维吾尔族 | 7(12) | 1(3) | | |
| 其他民族 | 9(15) | 4(14) | | |
| 年龄($\bar{x} \pm s$,岁) | 51.23±13.40 | 49±12.81 | 0.870 | 0.452 |
| 有无全身疾病(例,%) | | | - | 0.537 |
| 有 | 5(8) | 3(10) | | |
| 无 | 55(92) | 27(90) | | |
| 室外作业(例,%) | | | 4.582 | 0.032 |
| 是 | 32(53) | 23(77) | | |
| 否 | 28(47) | 7(23) | | |

注:-表示采用 Fisher 确切概率法。

表2 不同年龄翼状胬肉组间病史的差异性分析

| 组别 | ≤5a | >5~10a | >10a | 眼(%) | <i>P</i> |
|-------|--------|--------|-------|------|----------|
| <50岁组 | 18(60) | 11(37) | 1(3) | | 0.250 |
| >50岁组 | 21(70) | 6(20) | 3(10) | | |

表3 SDF-1和CXCR4在翼状胬肉与正常结膜组间的差异性分析

| 指标 | 翼状胬肉组 | 正常结膜组 | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------|-------------|-------------|----------|----------|
| SDF-1 | 0.478±0.056 | 0.005±0.014 | 4.06 | <0.01 |
| CXCR4 | 0.049±0.058 | 0.011±0.045 | 3.19 | <0.01 |

达无明显差异($P>0.05$),但是年龄<50岁组翼状胬肉表达量的均值高于年龄>50岁翼状胬肉组(表4)。年龄<50岁组翼状胬肉CXCR4表达量高于年龄>50岁翼状胬肉组,差异有统计学意义($P<0.01$,表4)。不同年龄正常结

表4 SDF-1和CXCR4在翼状胬肉与正常结膜组不同年龄的差异性分析

| 组别 | 年龄(岁) | SDF-1 | CXCR4 |
|----------|-------|-------------|-------------|
| 翼状胬肉组 | <50 | 0.059±0.008 | 0.070±0.053 |
| | >50 | 0.036±0.012 | 0.031±0.060 |
| <i>t</i> | | 1.59 | 2.96 |
| <i>P</i> | | 0.12 | <0.01 |
| 正常结膜组 | <50 | 0.011±0.012 | 0.021±0.063 |
| | >50 | 0.001±0.012 | 0.001±0.002 |
| <i>t</i> | | 1.85 | 1.26 |
| <i>P</i> | | 0.08 | 0.22 |

膜的SDF-1和CXCR4的表达无明显差异,差异均无统计学意义($P>0.05$,表4)。

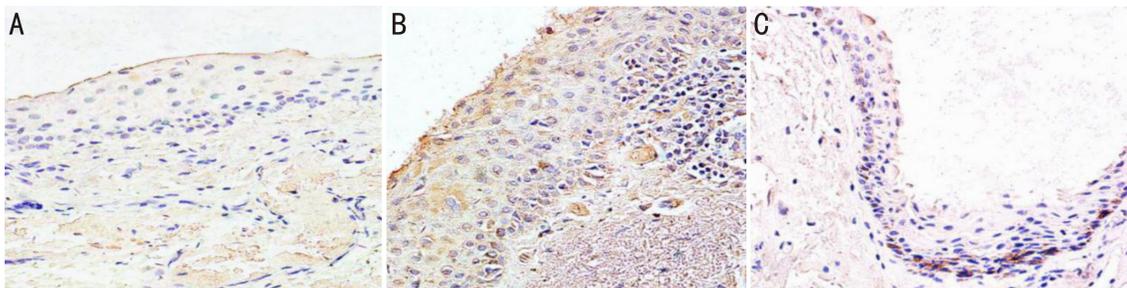


图3 CXCR4在正常结膜和翼状胬肉中的表达(免疫组织化学法×400) A:正常结膜;B:年龄<50岁的患者;C:年龄>50岁的患者。

2.4 SDF-1和CXCR4在翼状胬肉组织和正常结膜组织中表达的相关性 翼状胬肉患者中SDF-1蛋白和CXCR4蛋白进行Pearson相关性分析显示两者呈正相关($r=0.412, P=0.001$)。正常结膜组织中SDF-1和CXCR4表达的平均光密度相关性分析显示两者呈正相关($r=0.946, P<0.001$)。

3 讨论

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病,发生的主要环境因素是暴露于紫外线,这与我们的一般资料结果分析中室外作业者翼状胬肉的发生率高结果一致^[5]。正常人眼中鼻侧结膜的血管低于其他位置的结膜血管(颞侧、上方和下方)^[6],鼻侧结膜更容易缺氧。发生缺氧损伤后,来自内皮细胞的缺氧诱导因子-1(hypoxia induced factor-1, HIF-1)导致体内SDF-1在缺血组织中的表达,SDF-1介导骨髓衍生的CXCR4的募集,将祖细胞表达达到损伤部位,从而促进了翼状胬肉的增生。

病理形态学观察,正常结膜组织结构简单,基质层细胞数量较少,翼状胬肉中的炎性细胞数则明显增多,成纤维细胞增殖活跃,且新生血管丰富,提示炎性细胞浸润,成纤维细胞增殖,新生血管增生与翼状胬肉的发生发展息息相关。

SDF-1是新近发现的一种趋化因子,主要在骨髓基质细胞中表达^[7],作为器官的修复器而引起人们的注意^[8],在人体的外周血细胞、内皮细胞、成纤维细胞和神经元中表达^[9]。SDF-1将表达CXCR4的细胞募集到损伤部位来促进损伤愈合^[10]。然而过量的SDF-1/CXCR4信号传导能促进纤维血管瘢痕形成^[11],相反,抗SDF-1治疗可减轻体内组织纤维化^[12]。SDF-1可能通过双重过程介导纤维血管瘢痕为特征的翼状胬肉:SDF-1表达的上调和通过与CXCR4的相互作用参与肌成纤维细胞的转化。SDF-1是众所周知的CXCR4表达细胞的募集者^[13],因此, Kim等^[12]认为CXCR4+细胞可能跨内皮迁移到翼状肉中诱导纤维化而发生翼状胬肉。他们还使用特异性CXCR4阻断剂和SDF-1的小分子干扰RNA体外下调SDF-1/CXCR4的信号传导通路,均降低了 α -SMA表达。因此认为这种轴的下调可能潜在地暗示了翼状胬肉成纤维细胞活性的可逆。Ding等^[14]认为在SDF-1/CXCR4生物轴被抑制的条件下,肌成纤维细胞转化可能不会完全受损。该假设推测其他机制可能参与翼状胬肉的肌肉成纤维细胞转化,并且还提出了在翼状胬肉发生期间在体内早期抑制SDF-1/CXCR4轴的要求。

本研究免疫组织化学结果显示SDF-1和CXCR4在

在翼状胬肉组织的整个上皮细胞以及血管内皮细胞内都出现棕黄色的阳性表达,以基底层细胞中表达更为突出,呈现明显极性。在一些翼状胬肉组织中在基质中的相同位置中检测到SDF-1和CXCR4表达。此外,CXCR4+细胞主要在血管周围区域被发现,也可见于血管内区域。SDF-1和CXCR4在翼状胬肉中的表达水平上调,提示SDF-1/CXCR4可能参与翼状胬肉的形成。翼状胬肉有较强的血管增生性,SDF-1和CXCR4可作为评判血管新生能力的重要指标。

用IPP6.0软件分析光密度值,翼状胬肉组织中SDF-1和CXCR4的平均光密度明显高于正常结膜组织($P<0.05$),说明翼状胬肉的发生发展与新生血管密切相关。年龄<50岁翼状胬肉患者中CXCR4表达量高于年龄>50岁患者的表达量($P<0.05$),提示年轻患者的血管增生能力可能更强。而年龄<50岁翼状胬肉患者中SDF-1表达量与年龄>50岁的患者表达量无明显的统计学差异,但是年龄<50岁组翼状胬肉表达量的均值高于年龄>50岁翼状胬肉组(表4),可能与样本量相对较少有关。翼状胬肉患者中SDF-1蛋白和CXCR4蛋白进行Pearson相关性分析显示两者呈正相关,这与Kim等^[12]的研究结果相似,SDF-1是CXCR4+表达细胞的募集者,将CXCR4+细胞募集到伤口区域来促进损伤愈合。而正常结膜中SDF-1和CXCR4的表达相关更明显,可能是由于SDF-1和CXCR4在正常结膜均不表达,其光密度值都为0或者光密度值都很小,或正常结膜组织中的样本量较少造成的。

本研究初次研究了SDF-1和CXCR4在不同年龄的翼状胬肉组织中的表达结果,研究有一定的局限,因此,这种现象需要通过骨髓衍生的细胞特异性标记物,基因敲除和通过大规模的研究,大量病例和体内动物实验的进一步研究来验证我们的结论。

参考文献

- 1 Liu H, Zhang M. Vascular endothelial growth factor and chemokine receptor-3 in the pathogenesis of pterygium. *Int Eye Sci* 2019;19(4):551-554
- 2 刘慧,张敏. VEGF和CCR3在翼状胬肉组织中的表达及意义. *国际眼科杂志* 2019;19(4):551-554
- 3 林剑彪,黄国锋,叶文斌,等.SDF-1 α /CXCR4信号通路在轴向应力刺激促进骨再生中的作用研究. *中国修复重建外科杂志* 2019;33(6):689-696
- 4 Fang YY, Wan L, Dong Z. Effect of triptolide in improving platelet activation in patients with ankylosing spondylitis by regulating VEGFA, SDF-1, CXCR4 pathway. *Chin J Chin Materia Medica* 2019;44(16):

- 3520-3525
- 5 Garzón-Chavez DR, Quentin E, Harrison SL, *et al.* The geospatial relationship of pterygium and senile cataract with ambient solar ultraviolet in tropical Ecuador(Article). *Photochem Photobiolog Sci* 2018;17(8):1075-1083
- 6 Kim KW, Ha HS, Kim JC. Ischemic tissue injury and progenitor cell tropism; significant contributors to the pathogenesis of pterygium. *Histol Histopathol* 2015;30(3):311-320
- 7 束波, 范芳. 基质细胞衍生因子 1(SDF-1) 预处理的骨髓间充质干细胞移植减轻大鼠颈动脉内皮和平滑肌细胞增生. *细胞与分子免疫学杂志* 2019;35(4):320-326
- 8 Shi H, Lu RJ, Wang S, *et al.* Effects of SDF-1/CXCR4 on Acute Lung Injury Induced by Cardiopulmonary Bypass. *Inflammation* 2017;40(3):937-945
- 9 阎雯, 齐薛浩. 白藜芦醇对新生大鼠神经元缺血缺氧时 SDF-1/CXCR4 通路抗凋亡作用的调控机制. *中国病理生理杂志* 2018;34(7):1177-1182
- 10 He ZL, Jia M, Yu YJ, *et al.* Roles of SDF-1/CXCR4 axis in cartilage endplate stem cells mediated promotion of nucleus pulposus cells proliferation. *Biochem Biophysical Res Commun* 2018;506(1):94-101
- 11 Neusser MA, Lindenmeyer MT, Moll AG, *et al.* Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy. *Am J Pathol* 2010;176(2):594-607
- 12 Kim KW, Park SH, Lee SH, *et al.* Upregulated stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) expression and its interaction with CXCR4 contribute to the pathogenesis of severe pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(12):7198-7206
- 13 Zhou W, Guo S, Liu M, *et al.* Targeting CXCL12/CXCR4 Axis in Tumor Immunotherapy. *Curr Medici Chemist* 2019;26(17):3026-3041
- 14 Ding J, Hori J, Zhang R, *et al.* Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the formation of postburn hypertrophic scar (HTS). *Wound Rep Regenera* 2007;19(5):568-578