

双氯芬酸钠滴眼液与翼状胬肉中增殖细胞核抗原表达水平的关系

李红玉¹ 孙兆义^{2*} 周乐均³ 李杰¹ 蔡秋萍¹

1. 南部战区海军第一医院眼科 广东湛江 524000

2. 牡丹江医学院附属红旗医院眼三科 黑龙江牡丹江 157000

3. 南部战区海军第一医院特诊科 广东湛江 524000

摘要：目的：观察增殖细胞核抗原(PCNA)在初发性翼状胬肉及复发性翼状胬肉组织中表达情况及用药后的变化。方法：100例翼状胬肉(包括55例初发性翼状胬肉,45例复发性翼状胬肉)和10例正常结膜组织对照组,随机分为五组:I组对照组10例,II组初发性胬肉28例,III组复发性胬肉24例,IV组初发性翼状胬肉27例术前局部应用双氯芬酸钠滴眼液,V组复发性翼状胬肉21例术前局部应用双氯芬酸钠滴眼液。5组标本均采用免疫组化法(ICH)进行PCNA检测。结果:I组PCNA阳性率为20%,II组为64.29%,III组为87.50%,IV组为29.63%,V组为61.90%。结论:翼状胬肉组织中有PCNA的表达,且PCNA在复发性胬肉中的表达高于初发性胬肉,术前应用双氯芬酸钠滴眼液可抑制PCNA表达,以初发性翼状胬肉组织中PCNA阳性表达率下降较为明显。

关键词：翼状胬肉;增殖细胞核抗原;双氯芬酸钠

翼状胬肉是一种眼表结膜炎症性疾病,其具有增殖性和侵袭性,且鼻侧发病多见。当病变累及视轴时可严重影响视力及美观,在赤道附近地域发病率最高。早期的它无明显症状,若翼状胬肉生长较大,侵入角膜,则会出现患眼发红、发干、异物感、散光及不同程度的视力低下,可以对患者眼部健康造成影响^[1]。PCNA是一种在真核生物中,是细胞增殖的关键核抗原,也是DNA聚合酶delta的辅因子^{[2]-[3]}。它对于DNA的复制、DNA的损伤修复、染色质结构的维持以及细胞周期进展位点都是必不可少的。我们应用免疫组织化学方法观察翼状胬肉中PCNA的表达及用药后改变。报告如下。

1 资料和方法

1.1 对象

被纳入研究的对象选自牡丹江医学院附属红旗医院眼科2017年-2019年100例(100只眼)住院接受单侧翼状胬肉切除的患者,均为静止期,这项研究排除标准是任何眼科或全身疾病或使用局部或全身药物。对于参与本研究的所有合格参与者均获有知情同意。手术切除翼状胬肉组织,而在

10例患有结膜松弛症的囊外白内障摘除手术中,在12点钟位置从角膜缘周围结膜获得正常结膜组织。选择这个区域是因为上盖保护它不受紫外线照射。55名接受初发翼状胬肉切除术的患者(31名男性和24名女性,年龄 71.4 ± 6.2 岁(平均标准差))及45名接受复发翼状胬肉切除术的患者(24名男性和21名女性,年龄 78.4 ± 5.4 岁(平均标准差))和10名接受囊外白内障手术但患有结膜松弛症的健康个体(7名男性和3名女性,年龄 74.5 ± 8.2 岁(平均标准差))被纳入研究。

1.2 方法

用药组分别在术前2周于翼状胬肉眼应用0.1%双氯芬酸钠50微升,日4次,一次1滴。(II组)(III组)。

1.3 标本处理

取得标本为翼状胬肉和正常结膜,福尔马林固定,石蜡包埋系列切片使用PCNA多克隆抗体进行免疫染色、HE染色。柠檬酸盐抗原修复液微波抗原修复(温度在 95°C - 98°C ,时间10min),冷却室温后,在避光、室温环境下加入1滴过氧化物酶阻断溶液,孵育10min,滴山羊血清

工作液作封闭用，在 37℃ 恒温箱中 1 h (上海博迅 GZX-9070MBE)，组织切片滴加稀释为 1:100 的 50 微升 PCNA 多克隆抗体 (一抗, SAB 公司提供)，4℃ 冰箱冷藏过夜 (约 12 h)。然后在加入生物素化的山羊抗兔二抗体之前，在 PBS 缓冲液 (pH 7.3) 中广泛洗涤它们，DAB 显色后于光镜下观察 5 S，用自来水冲洗，苏木素复染 2 分钟 (兔 SP 试剂盒、DAB 由北京中杉金桥公司提供)。免疫染色后，使用光学显微镜仔细检查组织切片。该技术的阴性对照在没有第一抗体的情况下完成随后对提取的数据进行了分析。

1.4 染色结果判断

光镜下观察到，PCNA 阳性细胞的细胞核染色呈浅黄或深棕色；假染色情况为细胞浆或细胞膜呈浅黄或深棕色，PCNA 阴性细胞为无棕黄色染色。在高倍显微镜下 (200 倍) 每张切片随机选取 5 个视野，计算每个视野阳性细胞率，取平均值作为该标本的阳性细胞率。表达结果分为：阴性 (-)：未见阳性细胞；弱阳性 (+)：阳性细胞率 < 50%；强阳性 (++)：阳性细胞率 > 50%。

1.5 统计学处理

应用 SPSS21.0 统计软件，计数资料采用 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 形态学观察

正常对照组：即正常结膜，分为上皮层和基质层。上皮层的表层是扁平细胞，中层是多边形细胞，基底层为立方或柱形细胞，一般上皮层由 3-5 层细胞构成。基质层由散在的毛细血管，少量成纤维细胞、淋巴细胞和中性粒细胞构成，为疏松结缔组织 (图 1)。

翼状胬肉组：在翼状胬肉组织的上皮层及纤维组织中，均能见到不同程度的增生，较厚的上皮层可达十余层，厚薄不均。上皮层组织可见增生活跃的成纤维细胞、且含有丰富的毛细血管，并见上皮囊肿，符合翼状胬肉病理改变 (图 2、3)。

2.2 PCNA 在翼状胬肉及正常结膜中的表达

与正常结膜相比，PCNA 在翼状胬肉组织中的表达增加。更具体地说，相比于正常结膜，免疫组化研究提供了 64.29% 初发及 87.50% 复发胬肉组织标本中 PCNA 蛋白表达增加的证据，高于正常结膜组，三组间比较，差异有统计学

意义 ($P = 0.001$) (表 1)。在所有研究的样品中，观察到正常结膜的上皮基部散在分布 PCNA 阳性细胞 (图 4)，在初发胬肉中增多，且向表层发展 (图 5)，而在复发胬肉的上皮全层显著增多，且染色深 (图 6)。目前的发现并不归因于翼状胬肉患者和正常结膜患者的年龄差异，因为两组患者的平均年龄没有统计学上的显著差异。

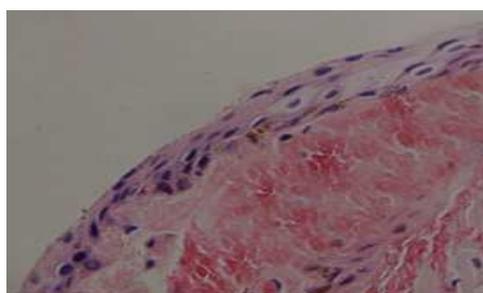


图 1 正常结膜 HE 染色 (x400)

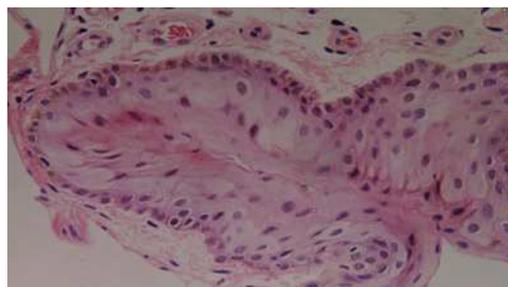


图 2 初发性翼状胬肉组织 HE 染色 (x400)

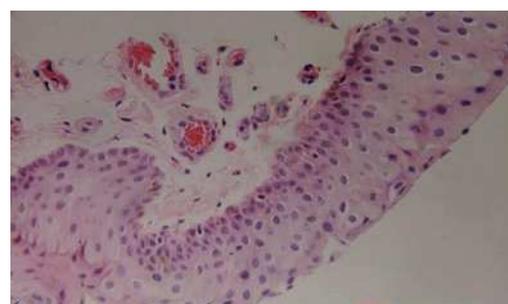


图 3 复发性翼状胬肉组织 HE 染色 (x400)

表 1 PCNA 在翼状胬肉及正常结膜的表达情况

	例数	-	+	++	阳性率 (%)	χ^2	P
I 组	10	8	2	0	20.00		
II 组	28	10	11	7	64.29	14.436	0.001***
III 组	24	3	8	13	87.50		

注：** 显著性为 0.05 *** 显著性为 0.001

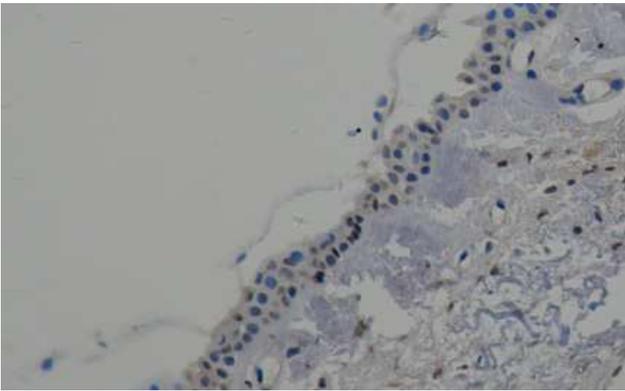


图4 IHC 观察正常结膜组织中 PCNA 的表达 (x200)

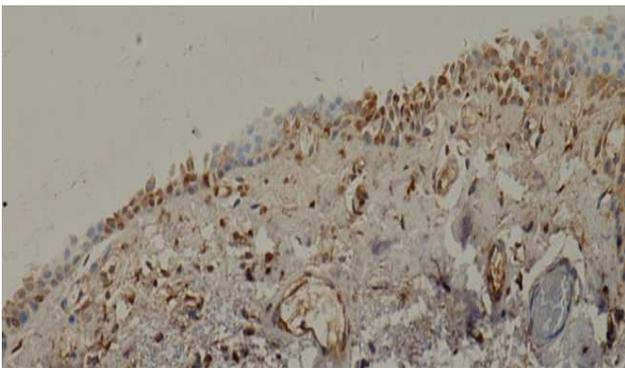


图5 IHC 观察原发性翼状胬肉中 PCNA 的表达 (x200)

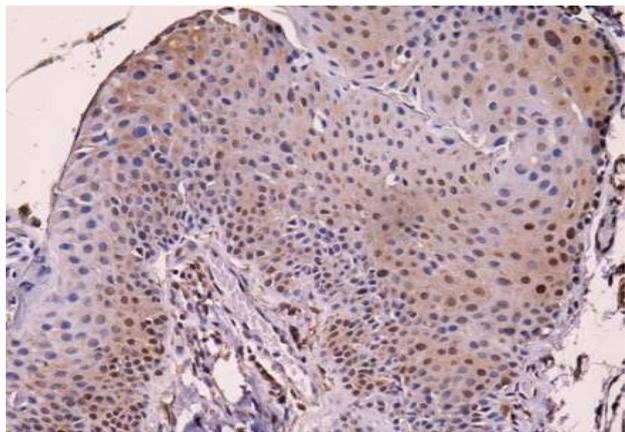


图6 IHC 观察复发性翼状胬肉中 PCNA 的表达 (x200)

2.3 用药后改变

见表2、3、4及图7、8。经统计学分析，原发性翼状胬肉组（II组）与用药后原发性翼状胬肉组（IV组）比较，差异有显著性（ $\chi^2 = 6.623$ ， $P = 0.010$ ）；复发性翼状胬肉组 PCNA（III组）与用药后复发性翼状胬肉组（V组）比较，差异有显著性（ $\chi^2 = 3.973$ ， $P = 0.046$ ）；用药后原发性翼状胬肉组（IV组）与用药后复发性翼状胬肉组（V组）比较，

差异有显著性（ $\chi^2 = 5.000$ ， $P = 0.025$ ）。

表2.PCNA 在初发胬肉及用药后的初发胬肉的表达情况

	例数	-	+	++	阳性率 (%)	χ^2	P
II组	28	10	11	7	64.29	6.623	0.010**
III组	27	19	6	2	29.63		

注：** 显著性为 0.05 *** 显著性为 0.001

表3 PCNA 在复发胬肉及用药后的复发胬肉的表达情况

	例数	-	+	++	阳性率 (%)	χ^2	P
III组	24	3	8	13	87.50	3.973	0.046**
V组	21	8	7	6	61.90		

注：** 显著性为 0.05 *** 显著性为 0.001

表4 PCNA 在用药后的初发胬肉和用药后复发胬肉的表达情况

	例数	-	+	++	阳性率 (%)	χ^2	P
IV组	27	19	6	2	29.63	5.000	0.025**
V组	21	8	7	6	61.90		

注：** 显著性为 0.05 *** 显著性为 0.001

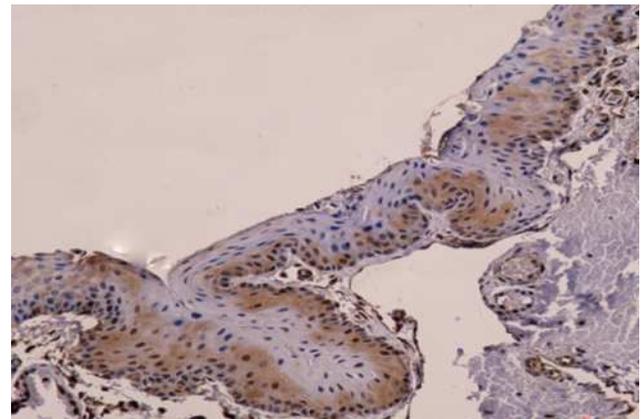


图7 IHC 观察原发性翼状胬肉用药后 PCNA 的表达 (x200)

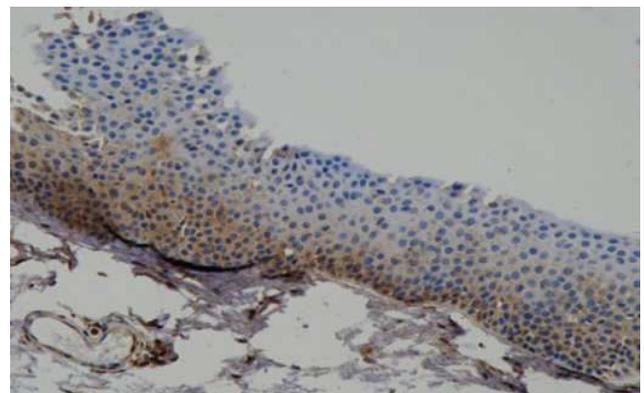


图8 IHC 观察复发性翼状胬肉用药后 PCNA 的表达 (x200)

3 讨论

翼状胬肉是角膜球结膜在外界刺激下产生的一种慢性

疾病，它通过光毒效应及其导致的氧化应激损伤、细胞凋亡及增殖失衡、炎症反应及免疫机制、角膜缘干细胞缺陷等有关^[4-6]。目前为止，其具体发病机制尚不是很清楚，没有公认的理论。一些研究者认为翼状胬肉的发生与上皮细胞的增殖有关，其发生和发展的关键因素可能是增殖因素，如凯西^[7]等人研究认为翼状胬肉的发生和发展是上皮细胞的增殖所致。聂聪^[8]等人研究结果认为翼状胬肉上皮的增殖潜能高于正常结膜上皮。因此寻找安全、有效的抗增殖药是许多学者所面临的研究课题。PCNA是一种环绕着脱氧核糖核酸的环状蛋白质，它在脱氧核糖核酸复制、细胞分裂和增殖中起着重要作用，PCNA的表达可作为细胞增殖状态的指标。众多研究表明，许多肿瘤细胞的异常增殖跟PCNA的表达有明显的相关性，PCNA的紊乱可能是部分肿瘤发生的内在机制。Smith等^[9]通过研究证明，可通过靶向PCNA抑制胰腺癌的进展。Cardano等^[10]认为靶向PCNA对于抑制肿瘤细胞增殖是一个灵敏而有效的治疗策略。这些研究结果提示，PCNA可促进肿瘤的增殖和发展。非甾体消炎镇痛药物中的双氯芬酸钠滴眼液属苯乙酸类，可抑制引起眼内炎症介质前列腺素释放，降低血-房水屏障生化及机械刺激，可改善眼内炎症已被证实^[11]。分析认为双氯芬酸钠滴眼液可通过抑制嗜酸性粒细胞的趋化作用及前列腺素合成，稳定细胞膜，减轻机体变态炎症反应，促进结膜炎消退及血管扩张，利于泪膜修复^[12]。但也有多项研究显示，环氧酶抑制剂具有显著的抗肿瘤细胞增殖作用，认为非甾体抗炎药可能通过环氧酶依赖性和环氧酶非依赖性途径发挥抗癌作用，可以抑制细胞的增殖，阻断细胞周期，从而诱导细胞的凋亡^[13]。

本研究发现，翼状胬肉组织中PCNA阳性率显著高于正常对照组的结膜组织，且在复发性胬肉中的表达高于初发性胬肉，表明细胞增殖及其活跃的物质合成在翼状胬肉内明显存在；术前术眼滴双氯芬酸钠滴眼液，PCNA在翼状胬肉组织中的表达受抑制，且PCNA阳性表达率在复发性胬组织中下降较为显著，提示双氯芬酸钠具有抑制PCNA表达的作用。但到目前为止，对于双氯芬酸钠抑制翼状胬肉中PCNA表达的机制尚不清楚，因此进一步研究双氯芬酸钠如何对PCNA介导的信号通路进行干扰，在已有的初步成果的基础上继续进行深入系统的探讨，为探究其病因和发病机制提供理论依据，也对翼状胬肉的预防、治疗及防治术后复发有重要的研究、参考价值。

参考文献：

- [1] 黄雄飞,张跃红,张柳,高宗银,杨为中.术前双氯芬酸钠滴眼液联合术后妥布霉素地塞米松滴眼液对家兔白内障术后炎症反应的影响[J].中国药师,2021,24(1):64-69.
- [2] Amaia, Gonz á lez-Magaña, Francisco J, Blanco. Human PCNA Structure, Function and Interactions.[J]. Biomolecules,2020,10(4):.DOI:10.3390/biom10040570.
- [3] Katherine N,Choe,George-Lucian,Moldovan.Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork.[J].Molecular cell,2017,65(3):380-392. DOI:10.1016/j.molcel.2016.12.020.
- [4] Thiago Gonç alves Dos Santos,Martins,Thomaz Gonç alves Dos Santos,Martins.Mechanisms and biomarker candidates in pterygium development.[J].Arquivos brasileiros de oftalmologia,2020,83(3):262.DOI:10.5935/0004-2749.20200068.
- [5] Sangeetha Vijayam,S Pai,Alisha,Kishore,Seema,Sen,Namrata,Sharma,Radhika,Tandon.Conjunctival Autofluorescence and Cytological Changes in Pterygium.[J].Cornea,2022,41(5):583-586. DOI:10.1097/ICO.0000000000002820.
- [6] Sameh Mohamed Elgouhary,Hesham Fouad Elmazar,Mariana Ibrahim Naguib,Noha Rabie Bayomy.Role of oxidative stress and vascular endothelial growth factor expression in pterygium pathogenesis and prevention of pterygium recurrence after surgical excision[J].International ophthalmology.,2020,40(10):2593-2606.
- [7] Kase S,Takahashi S,Sato I,Nakanishi K,Yoshida K,Ohno S.Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium.[J].British journal of ophthalmology,2007,91(7):958-961.
- [8] Cong,Nie,Xin-Chun,Zhang,Si-Ying,Xu,Ya-Dan,Quan,Zhi-Xin,Tang,Rong,Lu.Pterygial body epithelium domination of pterygial proliferation with TCF4 as a potential key factor.[J].International journal of ophthalmology,2018,11(9):1467-1474.DOI:10.18240/ijo.2018.09.07.
- [9] Shanna J,Smith,Caroline M,Li,Robert G,Lingeman,Robert J,Hickey,Yilun,Liu,Linda H,Malkas,Mustafa,Raof.Molecular Targeting of Cancer-Associated PCNA Interactions in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using a Cell-Penetrating Peptide.[J].

Molecular therapy oncolytics,2020,17:250–256.DOI:10.1016/j.omto.2020.03.025.

[10]Cardano, Miriana,Tribioli, Carla,Prosperi, Ennio. Targeting Strategy to Proliferating Cell NuclearAntigen (PCNA) as an Effective Strategy to Inhibit Tumor Cell Proliferation[J].Current cancer drug targets,2020,20(4):240–252.

[11]冯智军,王旭红,丁莉坤,李雪晴,宋薇,文爱东. 双氯芬酸钠缓释胶囊人体生物等效性研究 [J]. 中国药师,2019,22(7):1340–1343.DOI:10.3969/j.issn.1008–049X.2019.07.042.

[12]姜洋,李莹,崔歌. 0.1% 双氯芬酸钠滴眼液在 SMILE 术后疗效的观察 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2020,

34(2): 57–60.

[13]Fei SJ,Xiao SD,Peng YS,Chen XY,Shi Y.Chemopreventive effects of rofecoxib and folic acid on gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N’ -nitro-N-nitrosoguanidine in rats.[J].Chinese journal of digestive diseases,2006,7(3):134–140.

作者简介:

李红玉, (1993–), 女, 广东省湛江市人, 主治医师, 硕士学位, 南部战区海军第一医院眼科, 主治医师, 眼表方向。

通讯作者*: 孙兆义, (1967–), 男, 黑龙江省牡丹江市, 教授, 主任医师, 博士学位, 眼表疾病方向。