引文格式:刘琳琳,王辉,吴晶,刘锦荣,吴维霖,蒋贻平,等. 橙皮苷对人翼状胬肉成纤维细胞增生的抑制作用[J]. 眼科新进展,2020,40(1):26-30. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0006

【实验研究】

橙皮苷对人翼状胬肉成纤维细胞增生的抑制作用△

刘琳琳 王辉 吴晶 刘锦荣 吴维霖 蒋贻平 胡成全

作者简介:刘琳琳,女,1978年10月出生,江西于都人,硕士,副主任医师、副教授。主要研究方向:青光眼、眼表疾病及小儿眼病等。联系电话:13879729813;E-mail:liullgz2012@163.com;ORCID:0000-0001-8282-5863

收稿日期:2019-02-01
修回日期:2019-05-03
本文编辑:盛丽娜
△**基金项目**:江西省卫生健康委员会中医药计划项目(编号:2016B096)

作者单位:341000 江西省赣州市,赣南医学院第一附属医院眼科(刘琳琳,王辉,蒋贻平,胡成全);341000 江西省赣州市,赣南医学院(吴晶,刘锦荣,吴维霖;均为在读硕士研究生)

【摘要】 **目的** 评价橙皮苷对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts,HPF)增生的抑制作用,对照观察丝裂霉素C(mitomycin C,MMC)对HPF的影响,寻找治疗及预防翼状胬肉复发的中医中药方法。**方法** 将人翼状胬肉新鲜组织剪碎后进行体外贴壁细胞常规培养及传代,并采用波形蛋白(Vimentin)免疫细胞化学染色及DAPI染色对HPF进行鉴定。用24 μmol·L^{-1}、48 μmol·L^{-1}、64 μmol·L^{-1}、72 μmol·L^{-1}、96 μmol·L^{-1}、120 μmol·L^{-1}橙皮苷及1.5 μmol·L^{-1}、7.5 μmol·L^{-1}、30.0 μmol·L^{-1} MMC作用于第3代HPF,24 h、48 h、72 h后采用MTT法检测细胞的增生抑制率,并筛选合适的浓度梯度及时间进行细胞凋亡检测,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** 根据MTT法检测细胞增生抑制率的结果,选用72 μmol·L^{-1}及48 μmol·L^{-1}的橙皮苷作为实验组,将7.5 μmol·L^{-1} MMC作为MMC标准对照组,无处理细胞作为空白对照组,培养48 h后流式细胞仪检测HPF的凋亡率。结果显示,72 μmol·L^{-1}橙皮苷组、48 μmol·L^{-1}橙皮苷组、7.5 μmol·L^{-1} MMC标准对照组及空白对照组的细胞凋亡率分别为(41.10±1.04)%、(24.97±3.70)%、(48.60±6.94)%及(9.20±4.67)%,各组间HPF凋亡率整体存在差异($F=43.581$,$P<0.001$),两两比较结果显示,除72 μmol·L^{-1}橙皮苷组与MMC标准对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余组间两两相比差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。**结论** 72 μmol·L^{-1}橙皮苷在抑制HPF生长方面有着与MMC等同的效果,主要是通过促进HPF凋亡进而抑制HPF的增生。

【关键词】 橙皮苷;人翼状胬肉成纤维细胞;丝裂霉素C;细胞增生
【中图分类号】 R777.3

翼状胬肉是结膜纤维组织异常增生并侵及角膜的一种眼表疾病,多见于户外工作的人群[1-2]。角膜缘干细胞屏障对异常增生的结膜纤维组织具有抑制作用,若角膜缘干细胞发生损害,人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts,HPF)增生与凋亡平衡机制将会被打破而导致翼状胬肉侵及角膜[3-4]。丝裂霉素C(mitomycin C,MMC)可通过抑制DNA的合成抑制HPF的增生[5]。但MMC容易引起角膜溶解、巩膜溶解及干眼等并发症[6]。有研究表明,橙皮苷可通过抑制细胞周期从而阻断癌细胞的增生[7],本研究就橙皮苷对HPF的增生周期是否具有抑制作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本获取 原发性翼状胬肉患者30例,男、女各15例,年龄30~60岁,于手术室无菌条件下取翼状胬肉组织进行原代及传代培养。术前所有患者均签署手术知情同意书。纳入标准:(1)按翼状胬肉诊断标准确诊的原发性翼状胬肉;(2)翼状胬肉头端侵入角膜2.5~3.5 mm。排除标准:(1)复发及假性翼状胬肉;(2)翼状胬肉伴有其他结膜疾病;(3)既往有眼部手术史;(4)有活动性眼部炎症性病变。

1.1.2 主要试剂和仪器 1640基础培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司),抗青-链霉素(北京索莱宝科技有限公司),免疫荧光试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),共聚焦显微镜(美国蔡司880),MTT、DMSO、酶标仪、橙皮苷(成都德瑞克公司),细胞周期检测试剂盒(美国BD Pharmingen公司),MMC针剂(北京百奥莱博科技有限公司),流式细胞仪(美国BD FACSCalibur公司),倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS IX71)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞的培养 无菌条件下取原发性翼状胬肉组织置于冰上,PBS冲洗2~3次,将组织中血细胞尽量冲洗干净。再将胬肉组织剪成约0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm大小,接种于斜口培养瓶中,组织块之间间隔0.5 cm,加入含体积分数12%胎牛血清的1640培养基至刚好没过组织块,2~3 d后可见长梭形细胞从组织块边缘爬出,大约1周后可长满培养瓶,胰蛋白酶消化后传代。以后细胞每2 d换1次液,每4~6 d可传1代,取第3代细胞进行实验。

1.2.2 细胞的鉴别 将直径为1.5 cm无菌圆形玻片置于6孔板底部,取对数生长期细胞接种于6孔板中,每孔2 mL,接种密度为10×10^6个·L^{-1}。待细胞长满圆形玻片后用PBS液轻柔冲洗玻片,将细

胞爬片放入-20 ℃冰甲醇中固定5 min，用含体积分数0.1% Tween20的PBS清洗两次，加入500 μL blocking buffer（含体积分数2%牛血清白蛋白和体积分数0.1% Tween20的PBS）室温摇匀后静置30 min，再用鼠来源波形蛋白抗体试剂盒及免疫荧光试剂盒-抗小鼠FITC对细胞进行染色，在共聚焦显微镜下以492 nm波长进行激发，用DAPI对细胞核进行染色，以358 nm波长进行激发，观察细胞形态。

1.2.3　MTT检测细胞增生　取对数生长期细胞按30×10^6个·L^{-1}接种于96孔板中，每孔加入细胞悬液100 μL，每板均设有空白对照组、无处理细胞对照组、3个不同浓度MMC对照组（1.5 μmol·L^{-1}、7.5 μmol·L^{-1}、30.0 μmol·L^{-1}）及6个橙皮苷浓度组（24 μmol·L^{-1}、48 μmol·L^{-1}、64 μmol·L^{-1}、72 μmol·L^{-1}、96 μmol·L^{-1}、120 μmol·L^{-1}）。每组设5个复孔，待细胞贴壁后更换含体积分数12%胎牛血清的1640培养基培养12 h，按组别不同分别处理细胞，培养24 h、48 h、72 h后，每孔加入20 μL MTT继续培养4 h，吸除混合液，每孔再加入150 μL DMSO，避光低速震荡10 min后酶标仪570 nm波长检测吸光度（A）值，根据公式：细胞增生抑制率=[1-（加药组A值-空白对照组A值）/（细胞对照组A值-空白对照组A值）]×100%。

1.2.4　流式细胞仪检测细胞凋亡　取对数生长期细胞按50×10^6个·L^{-1}接种于6孔板中，每孔加入细胞悬液2 mL，待细胞贴壁后更换含体积分数12%胎牛血清的1640培养基培养12 h，随机分为空白对照组、MMC标准对照组、橙皮苷组，空白对照组不作处理，MMC标准对照组和橙皮苷组分别加入7.5 μmol·L^{-1} MMC和72 μmol·L^{-1}、48 μmol·L^{-1}橙皮苷，各组均培养48 h后吸除培养液，PBS液清洗2次，将细胞消化后1000 r·min^{-1}离心5 min，PBS重复清洗细胞2遍，取50×10^3个细胞离心，加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞，加入5 μL Annexin V-FITC充分摇匀室温避光15 min后加入10 μL碘化丙啶（PI）染色液，流式细胞仪检测，每组设3个复孔。

1.3　统计学分析　采用SPSS 22.0统计软件处理数据。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间均值的比较使用单因素方差分析，多组间相应指标的两两比较采用LSD法，不同时间测量的计量资料采用重复测量方差分析。检验水准：$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　细胞的鉴别　原代细胞进行培养，传代（图1）。波形蛋白为细胞的骨架蛋白，鼠来源波形蛋白抗体对HPF波形蛋白染色呈阳性，在共聚焦显微镜下显色为荧光绿，细胞呈纺锤形、长梭形或星形扁平状结构；DAPI可穿透细胞膜与细胞核中DNA双链结合，在共聚焦显微镜下呈蓝色卵圆形，符合HPF形态结构（图2）。

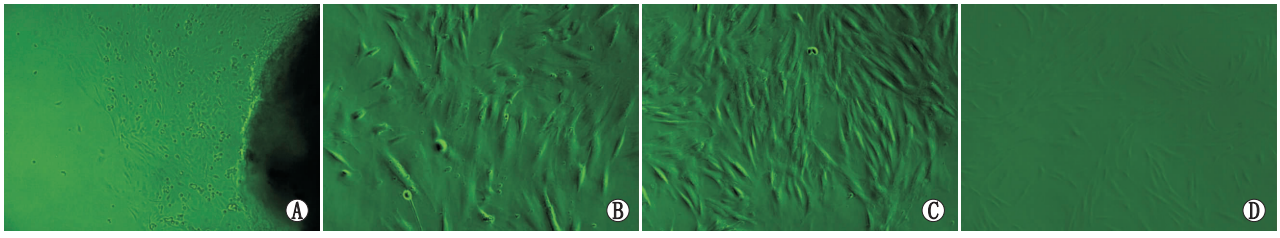


图1　倒置相差显微镜下原代及传代细胞。A：原代细胞（×40）；B：第1代细胞（×200）；C：第2代细胞（×100）；D：第3代细胞（×100）

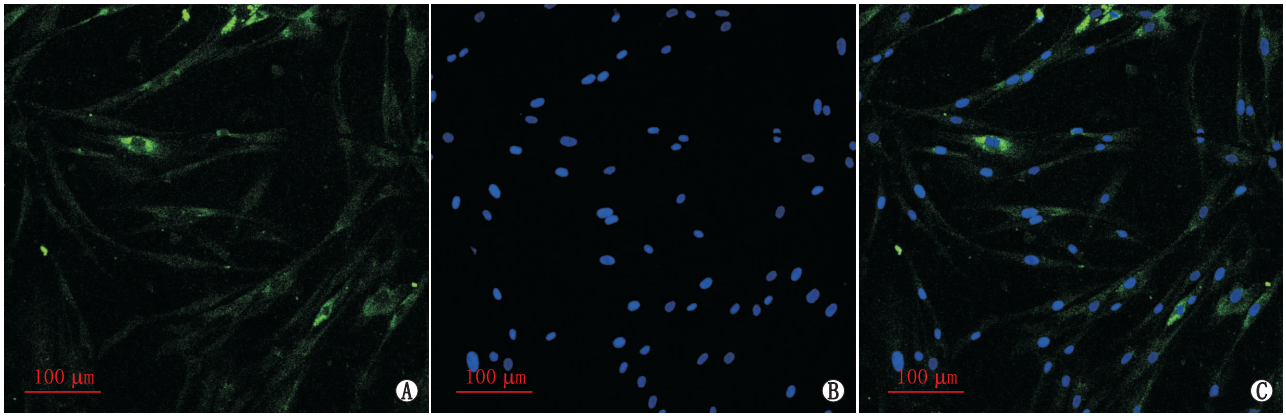


图2　免疫荧光染色鉴定HPF（共聚焦显微镜）。A：HPF呈Vimentin阳性表达；B：细胞核DAPI染色呈阳性表达；C：细胞骨架和细胞核染共同显色

2.2　橙皮苷对 HPF 增生的抑制　橙皮苷对 HPF 的增生抑制率随橙皮苷浓度增加而增加($P<0.01$)，橙皮苷对 HPF 的增生抑制率随时间先增加后降低($P<0.01$)，时间与浓度间无交互效应($P>0.05$)。见表1。

在 MMC 对照组中，MMC 对 HPF 的增生抑制率随 MMC 浓度增加而增加($P<0.001$)，MMC 对 HPF 的增生抑制率随时间延长逐渐增加($P<0.001$)，MMC 浓度与时间之间存在交互作用($P<0.01$)(见表2)。通过细胞增生抑制率的初筛，后续实验药物作用时间选择 48 h，橙皮苷浓度选择 48 μmol·L^{-1}及 72 μmol·L^{-1}，MMC 浓度选择 7.5 μmol·L^{-1}。

表1　橙皮苷对 HPF 的增生抑制率　($\bar{x}\pm s$)

橙皮苷浓度	增生抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
24 μmol·L^{-1}	9.91±1.31	31.78±4.34	14.51±3.43
48 μmol·L^{-1}	17.80±1.87	45.58±2.49	20.81±3.09
64 μmol·L^{-1}	33.62±13.31	51.82±0.71	27.24±1.35
72 μmol·L^{-1}	35.03±4.73	69.44±2.74	51.70±1.09
96 μmol·L^{-1}	39.98±1.55	78.31±0.67	64.00±4.99
120 μmol·L^{-1}	44.87±1.14	81.83±0.57	67.09±0.62

注：浓度效应：$F=220.192$，$P=0.002$；时间效应：$F=94.648$，$P=0.005$；浓度与时间交互效应：$F=9.835$，$P=0.062$

表2　MMC 对 HPF 的增生抑制率　($\bar{x}\pm s$)

MMC 浓度	增生抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
1.5 μmol·L^{-1}	12.85±1.71	39.55±1.33	54.71±3.59
7.5 μmol·L^{-1}	26.35±2.72	72.57±3.23	84.45±1.35
30.0 μmol·L^{-1}	48.70±1.83	84.82±0.86	90.04±0.90

注：浓度效应：$F=317.660$，$P<0.001$；时间效应：$F=1173.218$，$P<0.001$；浓度与时间交互效应：$F=192.491$，$P=0.001$

2.3　橙皮苷对细胞凋亡的诱导作用　依据以上实验结果，选用 72 μmol·L^{-1}、48 μmol·L^{-1}橙皮苷为实验组，7.5 μmol·L^{-1} MMC 作为 MMC 标准对照组，无处理细胞作为空白对照组，均作用于细胞 48 h，流式细胞仪检测结果显示，72 μmol·L^{-1}橙皮苷组、48 μmol·L^{-1}橙皮苷组、7.5 μmol·L^{-1} MMC 标准对照组及空白对照组的细胞凋亡率分别为(41.10±1.04)%、(24.97±3.70)%、(48.60±6.94)%及(9.20±4.67)%，各组间 HPF 凋亡率整体存在差异($F=43.581$，$P<0.001$)，两两比较结果显示，除 72 μmol·L^{-1} 橙皮苷组与 MMC 标准对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)外，其余组间两两相比差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)(图3)。

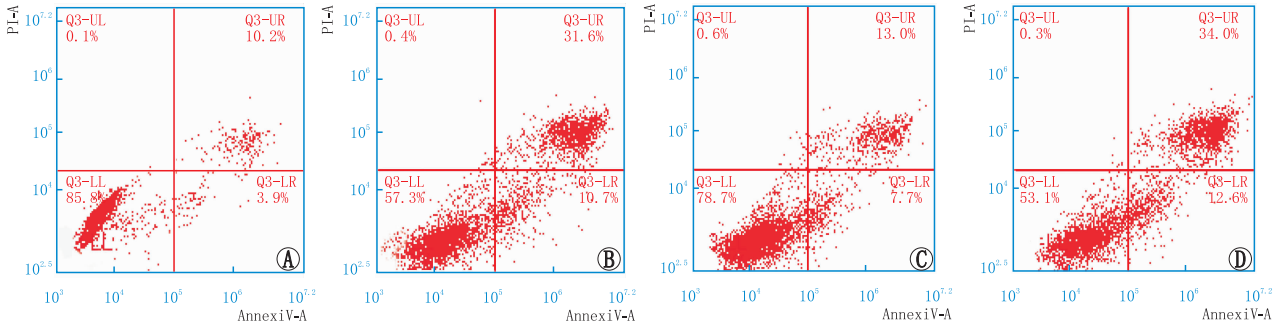


图3　流式细胞仪检测的细胞凋亡率。A：空白对照组；B：72 μmol·L^{-1}橙皮苷组；C：48 μmol·L^{-1}橙皮苷组；D：MMC 标准对照组

3　讨论

翼状胬肉的发病机制类似于肿瘤，其表皮细胞的活性十分高，增生速度快[8]。陈祎祎等[9]在观察翼状胬肉复发与病理组织变化的关系中发现，复发翼状胬肉的组织病理学变化多表现为细胞增生。翼状胬肉传统手术切除的复发率相当高，国外报道的复发率为 24%～89%[10]，国内报道的为 20%～70%[11]。为抑制翼状胬肉复发，很多学者进行了研究，有学者提出了羊膜移植以及带角膜缘干细胞的自体结膜移植等改良手术方法[12-13]，或联合激素或抗代谢药物进行辅助治疗等，虽然均有效降低了翼状胬肉的术后复发率，但改良手术对正常的眼表组织有一定的损伤，激素或抗代谢药物对眼表的毒性作用较强。临床上较常用的 MMC 是一种抗代谢的药物，其可有效抑制细胞 DNA 的复制，同时还具有细胞杀伤作用[14]。

现今，寻找一种既能抑制翼状胬肉复发，又对眼表组织无毒副作用的药物至关重要。橙皮苷是橙皮素与芸香糖形成的糖苷，为二氢黄酮衍生物。橙皮苷是柑橘果肉和果皮的重要成分，其含量可达柑桔幼果鲜重的 1.4%[15]，赣南脐橙产量富足，因此也可作为获取橙皮苷的主要原料。因橙皮苷在植物药中分布较为广泛，其药理活性的研究一直受到人们的广泛关注，且在中药新药的创制和研发中，橙皮苷常被选为指标成分而用于定性和定量研究。橙皮苷提取物天然无毒，有着广泛的药学性质和医学应用。橙皮苷具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抑制前列腺素合成、调节药物代谢酶活性等多种生物学作用[16-17]。目前，橙皮苷抗肿瘤作用已受到广泛关注，橙皮苷能抑制多种癌细胞的增生分化。罗晓婷等[18]研究赣南脐橙果皮提取物橙皮苷对人低分化鼻咽癌上皮细

胞株细胞增生与细胞周期的影响中发现，橙皮苷能抑制细胞的分裂增生，诱导细胞周期特异性的细胞凋亡。已有研究表明，橙皮苷通过阻滞 TGF-β/Smad 信号通路抑制细胞的增生，而对正常组织无明显损伤作用[19]。

本研究通过观察橙皮苷对体外培养的 HPF 增生及细胞周期变化的影响，寻找辅助治疗及预防翼状胬肉复发的中医中药方法。本研究的 MTT 结果表明，随着时间和浓度的增加，橙皮苷对翼状胬肉 HPF 增生的抑制率逐渐增加，说明橙皮苷对 HPF 的增生具有抑制作用，但随着作用时间的迁延及药物浓度的不断增加，其对细胞增生的抑制作用增强越来越缓慢。流式细胞仪检测结果显示，橙皮苷可通过促进 HPF 凋亡来抑制 HPF 的增生，且随着橙皮苷浓度的增加，促凋亡作用越来越明显。在与 MMC 的作用对比中，72 μmol·L^{-1}橙皮苷与 7.5 μmol·L^{-1} MMC 对翼状胬肉 HPF 的促凋亡作用无明显差异，由此可以说明，橙皮苷与 MMC 促凋亡作用机制具有相似性。由于 MMC 的副作用明显，橙皮苷运用于临床抑制翼状胬肉的生长及复发更具有优势。此外，细胞的增生与凋亡与基因表达密切相关，对于橙皮苷抑制 HPF 增生的机制，是否与抑制相关细胞周期基因的激活及周期蛋白的活化有关值得进一步研究，这对于从基因水平阐明橙皮苷对 HPF 增生抑制机制具有重要意义。

综上所述，本研究证实了橙皮苷对 HPF 的增生具有较强的抑制作用，提示橙皮苷有可能会成为新型的抗增生药物，但尚需从基础及临床进一步深入研究。鉴于药物体外研究与临床应用具有差异，我们将进一步在活体上观察橙皮苷的疗效并进行毒理学方面的研究，为寻找新方法预防翼状胬肉复发提供可靠依据。

参考文献

[1] THRELFALL T J, ENGLISH D R. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve[J]. *Am J Ophthalmol*, 1999, 128(3): 280-287.

[2] QING Y F, ZI X H, XI L S, HONG W. PanAberrant expression of genes and proteins in pterygium and their implications in the pathogenesis[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(6): 973-981.

[3] BUSIN M, BREDA C, BERTOLIN M, BOVONE C, PONZIN D, FERRARI S, *et al*. Corneal epithelial stem cells repopulate the donor area within 1 year from limbus removal for limbal autograft[J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(12): 2481-2488.

[4] CHEN P, ZHOU Q J, WANG J Y, ZHAO X W, DUAN H Y, WANG Y, *et al*. Characterization of the corneal surface in limbal stem cell deficiency and after transplantation of cultured allogeneic limbal epithelial cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254(9): 1765-1777.

[5] KAWASW K, MATSUSHITA H, YAMAMOTO T, KITAZAWA Y. Mitomycin concentration in rabbit and human ocular tissues after topical administration[J]. *Ophthalmology*, 1992, 99(2): 203-207.

[6] LINDQUIST T P, LEE W B. Mitomycin C-associated scleral stromalysis after pterygium surgery[J]. *Cornea*, 2015, 34(4): 398-401.

[7] 史伟云，王富华. 翼状胬肉手术中慎用丝裂霉素 C[J]. 中华眼科杂志，2013，49(10)：869-872.
SHI W Y, WANG F H. Mitomycin C related complications shouldn't be neglected in the pterygium surgery[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49(10): 869-872.

[8] PENG J, SHA X Y, LIU Y. Pterygium epithelium abnormal differentiation related to activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway *in vitro*[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(6): 1118-1125.

[9] 陈祎祎，杨桂芳. 翼状胬肉复发与病理组织变化的关系[J]. 中国医学创新，2013，9(11)：130-131.
CHEN W W, YANG G F. Relationship between pterygium recurrence and pathological changes[J]. *Med Innovat CHN*, 2013, 9(11): 130-131.

[10] ALEXANDRE K, FIDELINA P, ADRIANA J L. Oxidant/antioxidant state in tissue of prymary and recurrent pterygium[J]. *BMC Ophthalmol*, 2014, 14: 149.

[11] MUSTAFA O, EMRE A, JULIDE C U A. Repeated bevacizumab injections versus mitomycin C in rotational conjunctival flap for prevention of pterygium recurrence[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2014, 62(4): 407-411.

[12] 张岩，孔令普，王翠，马军艳，吕杰. 不同术式治疗原发性翼状胬肉的临床效果分析[J]. 国际眼科杂志，2015，15(2)：361-363.
ZHANG Y, KONG L P, WANG C, MA J Y, LV J. Clinical effect analysis of different surgical treatment of primary pterygium[J]. *Int Eye Sci*, 2015, 15(2): 361-363.

[13] 宋慧洋，朱秋建，李斌，李国星. 医用生物蛋白胶联合自体结膜移植及治疗性接触镜配戴治疗单纯翼状胬肉[J]. 新乡医学院学报，2015，32(12)：1125-1127.
SONG H Y, ZHU Q J, LI B, LI G X. Conjunctival autografting combined with fibrin glue and usage of soft contact lens for the treatment of pterygium[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2015, 32(12): 1125-1127.

[14] 张海江，霍鸣，董洁玉，宋庆磊. 核心蛋白多糖抑制翼状胬肉成纤维细胞增生的实验研究[J]. 眼科新进展，2014，34(8)：725-728.
ZHANG H J, HUO M, DONG J Y, SONG Q L. Inhibitive effects of decorin on proliferation of cultured human pterygium fibroblasts[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(8): 725-728.

[15] 罗晓婷，李舒梅. 橙皮甙生物学活性研究进展[J]. 赣南医学院学报，2008，28(2)：301.
LUO X T, LI S M. Progress in biologic activity effects of hesperidin[J]. *J Gannan Med Univ*, 2008, 28(2): 301.

[16] ASH C, OSMAN C, ALI O. Protective effect of hesperidin on oxidative and histological liver damage following carbon tetrachloride administration in Wistar rats[J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(3): 486-493.

[17] GESIVALDO S, LISANDRO D G. SUR1 receptor interaction with hesperidin and linarin predicts possible mechanisms of action of valeriana officinalis in parkinson[J]. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8: 97.

[18] 罗晓婷，熊亮，李思思. 橙皮苷提取物对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增生和细胞周期的影响[J]. 时珍国医国药，2011，22(9)：2202-2204.
LUO X T, XIONG L, LI S S. Effect of hesperidin extract on proliferation and cell cycle of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2011, 22(9): 2202-2204.

[19] 任周新，赵丹瑞，李丽，沈俊岭，梅晓峰. 橙皮苷对 TGF-β1 诱导的人胚肺 HPF 活化的影响[J]. 中国现代中药，2017，19(9)：1270-1272.
REN Z X, ZHAO D R, LI L, SHEN J L, MEI X F. Effect of hesperidin on production of a-SMA, col-I and FN in human embryonic lung fibroblast stimulated by TGF-β1[J]. *Mod Chin Med*, 2017, 19(9): 1270-1272.

Inhibitory effects of hesperidin on proliferation of human pterygium fibroblasts

LIU Linlin[1], WANG Hui[1], WU Jing[2], LIU Jinrong[2], WU Weilin[2], JIANG Yiping[1], HU Chengquan[1]

1. *Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou* 341000, *Jiangxi Province, China*
2. *Gannan Medical University, Ganzhou* 341000, *Jiangxi Province, China*

【Abstract】 **Objective** To evaluate the inhibitory effect of hesperidin on proliferation of human pterygium fibroblasts (HPF) cultured *in vitro*, and observe the effect of mitomycin C (MMC) on HPF, in order to find the traditional Chinese medicine methods for the treatment and prevention of pterygium recurrence. **Methods** The fresh tissues of human pterygium were cut up, and routine culture and passage of adherent cells were made *in vitro*. HPF was identified by vimentin immunocytochemical staining and DAPI staining. The third generation HPF cells were treated with hesperidin (24 μmol · L^{-1}, 48 μmol · L^{-1}, 64 μmol · L^{-1}, 72 μmol · L^{-1}, 96 μmol · L^{-1}, 120 μmol · L^{-1}) and MMC (1.5 μmol · L^{-1}, 7.5 μmol · L^{-1} and 30 μmol · L^{-1}) for 24 h, 48 h and 72 h. Cell proliferation inhibition rate was detected by MTT assay, and the appropriate concentration gradient and time were selected for detection of apoptosis. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. **Results** According to the inhibition rate of cell proliferation detected by MTT assay, hesperidin at 72 μmol · L^{-1} and 48 μmol · L^{-1} were used as the experimental group, 7.5 μmol · L^{-1} MMC as the standard control group, and untreated cells as the blank control group. The apoptosis of HPF was detected by flow cytometry, after cells being cultured for 48 h. The results showed that the apoptosis rates were (41.10 ± 1.04)%, (24.97 ± 3.70)%, (48.60 ± 6.94)% and (9.20 ± 4.67)% in 72 μmol · L^{-1} and 48 μmol · L^{-1} hesperidin groups, 7.5 μmol · L^{-1} MMC standard control group and blank control group, respectively. There was difference in apoptosis rate of HPF among groups ($F = 43.581$, $P < 0.001$), and comparison between any two groups showed that there was no statistically significant difference between the 72 μmol · L^{-1} glucoside group and the 7.5 μmol · L^{-1} MMC group ($P > 0.05$), but the differences between other pairs were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** 72 μmol · L^{-1} hesperidin has the same effect as MMC in inhibiting the growth of pterygium HPF, mainly by promoting the apoptosis of HPF and then inhibiting the proliferation of HPF.

【Key words】 hesperidin; human pterygium fibroblast; mitomycin C; cell proliferation