

ILK SiRNA 对 TGF- β_2 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞增殖和凋亡的影响

王 群, 崔丽珺, 刘思伟, 康前雁

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81300765)

作者单位: (710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介: 王群, 在读博士研究生, 研究方向: 青光眼、白内障。

通讯作者: 康前雁, 毕业于西安交通大学医学院, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、眼底病的基础和临床研究。kangqy@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-24 修回日期: 2018-03-13

Effect of ILK SiRNA on the proliferation and apoptosis of human Tenon fibroblasts induced by transforming growth factor- β_2

Qun Wang, Li - Jun Cui, Si - Wei Liu, Qian - Yan Kang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81300765)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qian - Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2017-11-24 Accepted: 2018-03-13

Abstract

• AIM: To investigate the role of small interference RNA interference targeted Integrin-linked kinase (ILK SiRNA) on the proliferation and apoptosis of human Tenon fibroblasts (HTFs) induced by transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2).

• METHODS: The HTFs were identified by immunofluorescence analysis with Vimentin and keratin. HTFs with no other addiction was as normal control; H+T group: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 ; H+T+NC SiRNA group: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L negative SiRNA; H+T+ILK SiRNA group: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L ILK SiRNA. The ILK SiRNA were transfected into HTFs by lipofectamine 2000, then the cells were stimulated with 5 μ g/L TGF- β_2 . The protein expression of ILK were analyzed by Western Blot. The proliferation levels of HTFs were analyzed by CCK-8, the apoptosis of HTFs were analyzed by Hoechst 33342/PI double staining.

• RESULTS: The protein ILK were expressed in both TGF- β_2 treated and control groups, and TGF- β_2 up-regulated the expression of ILK, ILK SiRNA inhibited the

protein expression of ILK ($P < 0.05$). CCK-8 analysis showed that compared with the normal control group, the cell proliferation rate of HTFs in TGF- β_2 treated group increased, and in ILK SiRNA group the cell proliferation rate was suppressed after exposed to ILK SiRNA for 48h ($P < 0.05$). Hoechst 33342/PI double staining showed that there was no change on the apoptosis of TGF- β_2 stimulated group ($P > 0.05$), compared with the normal control group, however in the ILK SiRNA group, we found lots of apoptosis cells and a few of necrotic cells ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: The ILK SiRNA attenuates the abnormal proliferation of HTFs induced by TGF- β_2 , thereby enhancing the apoptosis of HTFs.

• KEYWORDS: Integrin-linked kinase; fibroblasts; transforming growth factor- β_2 ; proliferation; apoptosis

Citation: Wang Q, Cui LJ, Liu SW, et al. Effect of ILK SiRNA on the proliferation and apoptosis of human Tenon fibroblasts induced by transforming growth factor- β_2 . *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(4):621-625

摘要

目的: 探讨小干扰 RNA (the small interference RNA, SiRNA) 沉默整合素链接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 基因对转化生长因子- β_2 (transforming growth factor beta 2, TGF- β_2) 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon fibroblasts, HTFs) 增殖和凋亡的影响。

方法: 体外培养 HTFs 细胞, 波形蛋白 (Vimentin) 和角蛋白 (keratin) 免疫荧光染色进行鉴定。实验分组包括 NC 组: 正常对照 HTFs; H+T 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 ; H+T+NC SiRNA 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L 阴性对照 SiRNA; H+T+ILK SiRNA 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L ILK SiRNA。50nmol/L ILK SiRNA 转染 HTFs 细胞, 5 μ g/L TGF- β_2 刺激后, 分别利用 Western-blot 检测细胞内 ILK 的蛋白表达, CCK-8 检测细胞增殖能力, Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡。

结果: Western-blot 结果显示, TGF- β_2 可以明显上调 HTFs 细胞内 ILK 的表达, ILK SiRNA 可以明显抑制 TGF- β_2 诱导的 ILK 蛋白表达 ($P < 0.05$)。CCK-8 检测结果显示, 5 μ g/L TGF- β_2 可以促进 HTFs 细胞增殖, ILK SiRNA 转染后 48h, 细胞的增殖明显受到抑制, 且低于正常对照组 ($P < 0.05$)。Hoechst 33342/PI 双染结果显示, TGF- β_2 并不诱导 HTFs 细胞发生凋亡 ($P > 0.05$), 但 ILK SiRNA 可以诱导 HTFs 细胞发生明显凋亡, 并出现少量坏死细胞 ($P < 0.05$)。

结论: ILK SiRNA 可以抑制 TGF- β_2 诱导的 HTFs 增殖, 并

诱导 HTFs 细胞发生凋亡。

关键词:整合素连接激酶;成纤维细胞;转化生长因子- β_2 ;增殖;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.06

引用:王群,崔丽珺,刘思伟,等. ILK siRNA 对 TGF- β_2 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞增殖和凋亡的影响. 国际眼科杂志 2018; 18(4):621-625

0 引言

青光眼 (glaucoma) 是全球第一位不可逆转致盲性眼病^[1-2], 滤过性手术是目前国内外治疗青光眼的普遍手术方式, 但是远期效果不佳^[3-4], 术区结膜下成纤维细胞增殖与迁移是滤过泡瘢痕化手术失败的重要原因, 寻找安全、有效、毒副作用小的抑制瘢痕形成的辅助药物是提高手术成功率的重要方法。转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 是在机体创伤修复过程中起关键调控作用的细胞因子, 在青光眼滤过泡瘢痕的形成过程中, 同样发挥着重要的作用^[5-6]。此外研究显示细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中玻璃黏连蛋白和纤维连接蛋白可以通过整合素信号通路来发挥促细胞增殖黏附作用^[7]。整合素链接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 作为介导整合素与细胞外基质连接的关键因子, 在 TGF- β 信号中同样发挥作用, 可能是两条通路的交汇点。

因此我们推测, ILK 在青光眼滤过术后瘢痕形成过程中起到重要作用。我们的前期研究已经显示 TGF- β_2 可以刺激体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon fibroblasts, HTFs) 内 ILK 的表达^[8]。本研究应用 RNA 干扰技术沉默 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞中 ILK 的表达, 利用 Western-blot 检测细胞内 ILK 的表达, CCK-8 检测细胞增殖能力, Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡, 探讨 ILK 对 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 HTFs 由课题组前期实验人员购买自 ATCC 公司, 保存于液氮罐中, 取第 15 代以内对数生长期细胞进行实验。重组人 TGF- β_2 (Peprotech, 美国), DMEM 高糖培养基和 2.5g/L 胰酶消化液 (Hyclone, 美国), 胎牛血清 (Gibco, 美国), 兔抗波形蛋白 (Vimentin) 单克隆抗体, 兔抗角蛋白 (keratin) 单克隆抗体, 兔抗 ILK 单克隆抗体和鼠抗 β -Actin 单克隆抗体 (Abcam, 英国), HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗和抗兔 IgG 二抗 (SAB, USA), Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国), Cell counting kit-8 (CCK-8, 七海生物, 上海), Hoechst 33342/PI 双染试剂盒 (Solarbio, 中国), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 IgG (康为世纪, 北京)。siRNA 引物由上海吉玛制药技术有限公司化学合成, ILK siRNA 正义链序列: 5'-GAC GCU CAG CAG ACA UGU GGA dTT -3', 反义链序列: 5'-UCC ACA UGU CUG CUG AGC GUC dTT -3'; 阴性对照 siRNA 正义链序列: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT -3', 反义链序列: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT -3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和鉴定 HTFs 细胞用含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37℃、50mL/L CO₂ 孵箱中培养, 使用 2.5g/L 胰酶消化法进行传代。取对数生长期的 HTFs, 胰酶消化, 以 1×10^4 个/孔密度将其接种于放有

8mm×8mm 载玻片的 24 孔板中, 培养箱内培养 48h 后, 观察细胞贴壁生长良好, 吸去培养基, PBS 液清洗后加入 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛固定 30min, 0.3% Triton X-100 室温孵育 20min, 5% 的山羊血清室温下封闭 30min, PBS 液清洗后加入波形蛋白和角蛋白单克隆抗体 (稀释比例 1:500, 阴性对照以等量 PBS 液代替), 4℃ 过夜, PBS 液清洗后加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (稀释比例 1:300), 室温孵育 2h, DAPI 染核 5min, 50% 缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期细胞, 胰酶消化后分别以 1×10^5 个/孔的密度接种到六孔板, 在细胞培养箱内孵育 24h 至细胞融合 70% ~ 80% 后, 换用基础 DMEM 培养液饥饿 24h。Lipofectamine 2000 介导 ILK siRNA 及阴性对照 siRNA 转染 HTFs, 具体操作严格按照 Lipofectamine TM 2000 说明书执行。实验分组包括 NC 组: 正常对照 HTFs; H+T 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 ; H+T+NC siRNA 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L 阴性对照 siRNA; H+T+ILK siRNA 组: HTFs+5 μ g/L TGF- β_2 +50nmol/L ILK siRNA。

1.2.3 Western-blot 检测细胞内 ILK 的表达 使用 siRNA 转染细胞 24h 后加入 5 μ g/L TGF- β_2 , 48h 后用蛋白裂解液 RIPA 提取细胞总蛋白, 蛋白定量后煮样变性。上样后 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转膜至 PVDF 膜上, ILK (稀释比例 1:10000) 和 β -actin (稀释比例 1:20000) 一抗孵育, 4℃ 摇床过夜, 分别加入相应的兔二抗和鼠二抗 (稀释比例均为 1:20000) 孵育 1h, ECL 显色, 置于 Bio-Rad 凝胶成像系统获取图像, 分析条带光密度值, 以实验组条带光密度值与内参 β -actin 光密度值变化倍数作图。实验重复 3 次。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖能力 取对数生长期细胞, 胰酶消化后以 2×10^3 个/孔密度将其接种于 96 孔板中, Lipofectamine 2000 介导 siRNA 转染 HTFs, 24h 后加入 5 μ g/L TGF- β_2 , 于转染后 48h 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 空白对照组加等量培养基, 继续于孵箱中培养 1h, 96 孔板于微板测试仪上检测, 检测波长为 450nm, 记录并分析结果。实验重复 3 次。

1.2.5 Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡 取对数生长期细胞, 胰酶消化后以 1×10^4 个/孔密度将其接种于放有 8mm×8mm 载玻片的 24 孔板, Lipofectamine 2000 介导 siRNA 转染 HTFs, 24h 后加入 5 μ g/L TGF- β_2 , 于转染后 48h, PBS 液清洗后加入 Hoechst 染色液 (100mg/L, 100 μ L) 和 PI 染色液 (100mg/L, 100 μ L) 4℃ 染色 20min, 染色后 PBS 洗涤 1 次, 在荧光显微镜下观察。正常细胞为 Hoechst 33342⁻/PI⁻ 呈弱蓝色荧光, 凋亡细胞为 Hoechst 33342⁺/PI⁻ 呈强蓝色荧光, 坏死细胞为 Hoechst 33342⁻/PI⁺ 呈强红色荧光。实验重复 3 次, 每组随机选取 5 张不同视野图片。

统计学分析: 实验数据用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异比较用单因素方差分析 (One way ANOVA), 两组之间的多重比较采用 LSD-*t* 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTFs 细胞形态和鉴定 HTFs 细胞贴壁生长, 细胞呈长梭形或分枝状单层排列, 胞核位于细胞中部, 生长时呈放射状或漩涡状生长, 细胞汇合后呈束状平行排列

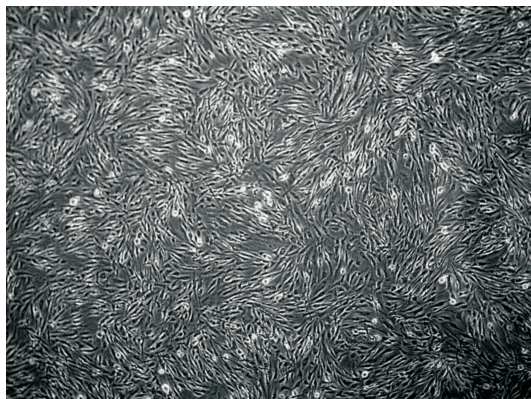


图1 HTFs 细胞的形态观察($\times 400$)。

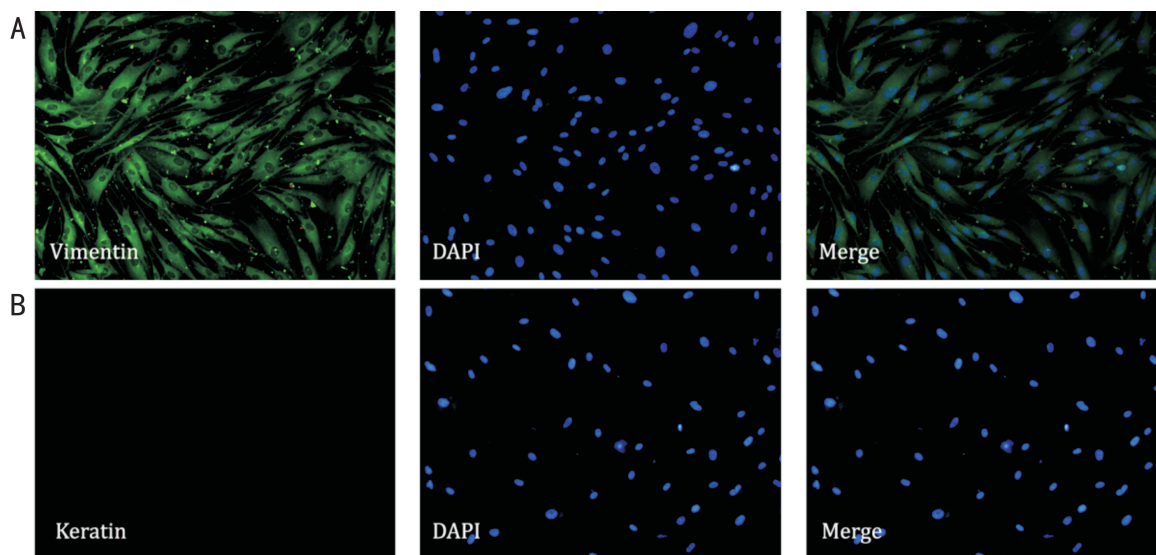


图2 免疫荧光染色鉴定 HTFs 细胞($\times 200$) A: HTFs 细胞波形蛋白免疫荧光染色;绿色荧光为波形蛋白,蓝色荧光为细胞核;B: HTFs 细胞角蛋白免疫荧光染色;角蛋白未表达,蓝色荧光为细胞核。Vimentin:波形蛋白;Keratin:角蛋白。

(图1)。细胞约4~6d可以融合长满瓶底,传代后12h细胞即可贴壁生长。多次传代 HTFs 细胞性状表现稳定,细胞形态和生长特点保持不变。HTFs 细胞免疫荧光染色显示:波形蛋白在 HTFs 细胞胞浆内表达,呈围绕胞核的束状、纤维状排列的绿色高荧光,其方向与细胞长轴一致(图2A)。角蛋白在 HTFs 细胞胞核与胞浆内均不表达(图2B)。证实为成纤维细胞。

2.2 ILK SiRNA 对 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞内 ILK 的表达 Western-blot 结果显示,与 NC 组相比,H+T 组和 H+T+NC SiRNA 组细胞内 ILK 表达明显上调,差异有统计学意义($P=0.023, 0.007$);与 H+T 组相比,H+T+ILK SiRNA 组细胞内 ILK 的表达明显下调,差异有统计学意义($P=0.001$),H+T+NC SiRNA 组细胞内 ILK 的表达无明显变化,差异无统计学意义($P=0.441$,图3)。

2.3 ILK SiRNA 对 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示,与 NC 组相比,H+T 组和 H+T+NC SiRNA 组细胞增殖明显比较快,H+T+ILK SiRNA 组细胞增殖明显降低,差异有统计学意义($P=0.006, 0.003, <0.001$);与 H+T 组相比,H+T+NC SiRNA 组细胞增殖无明显变化,差异无统计学意义($P=0.711$),H+T+ILK SiRNA 组细胞增殖明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$,图4)。

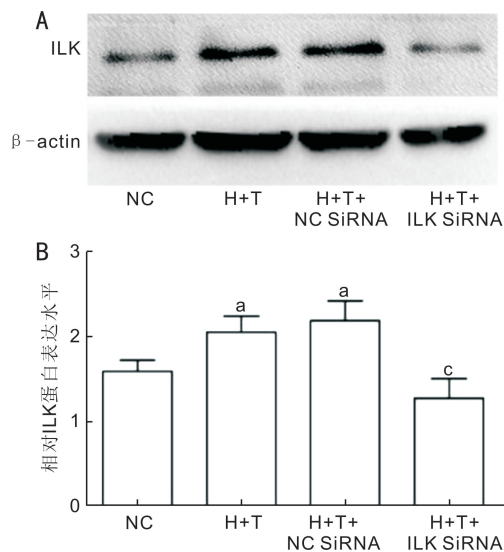


图3 ILK SiRNA 对 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞内 ILK 的表达式的影响 A: Western-blot 检测细胞内 ILK 的表达;B: Western-blot 结果统计图;^a $P<0.05$ vs NC 组;^c $P<0.05$ vs H+T 组。

2.4 ILK SiRNA 对 TGF- β_2 诱导的 HTFs 细胞凋亡的影响

Hoechst 33342/PI 双染免疫荧光检测显示,NC 组、H+T 组和 H+T+NC SiRNA 组细胞大部分呈 Hoechst 33342/PI 的弱蓝色荧光为正常细胞,偶尔出现 1~5 个 Hoechst

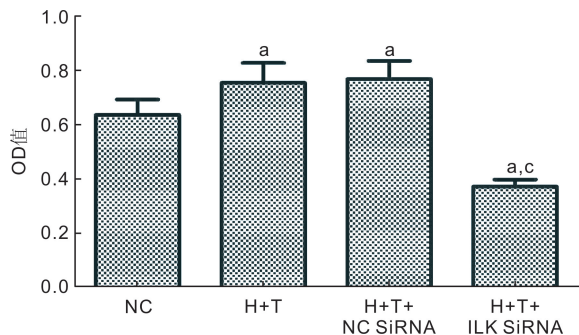


图4 ILK SiRNA对TGF- β_2 诱导的HTFs细胞增殖的影响
^a $P < 0.05$ vs NC组; ^c $P < 0.05$ vs H+T组。

33342⁺/PI⁺的强蓝色荧光凋亡细胞,而H+T+ILK SiRNA组凋亡细胞的强蓝色荧光明显增多,且出现少量Hoechst 33342⁻/PI⁺的强红色荧光坏死细胞(图5)。统计结果显示,相比NC组,H+T组和H+T+NC SiRNA组的凋亡细胞比例无明显改变,差异无统计学意义($P = 0.930, 0.960$),而H+T+ILK SiRNA组的凋亡细胞比例明显升高($P < 0.001$)。与H+T组相比,H+T+NC SiRNA组的凋亡细胞比例无明显改变,差异无统计学意义($P = 0.970$),而H+T+ILK SiRNA组的凋亡细胞比例明显升高($P < 0.001$),并出现坏死细胞($P < 0.001$,图6)。

3 讨论

在青光眼滤过泡瘢痕的形成过程中,TGF- β 发挥着重要的作用。在青光眼术后动物模型中,给予TGF- β 抑制剂SB-505124,可以抑制滤过泡瘢痕化,延长滤过泡生存时间,外源性给予3种TGF- β 单体均可以引起和增加滤过术后瘢痕化,尤其TGF- β_2 ,可以增加III型胶原纤维的合成,在应用丝裂霉素治疗后,仍可显著地刺激瘢痕形成^[9-10]。TGF- β_2 对于结膜纤维化及滤过泡瘢痕的形成具有重要作用,单独作用即可刺激Tenon囊成纤维细胞增殖、移行,并可以增强胶原纤维的收缩,应用TGF- β_2 抗体组与对照组和5-氟尿嘧啶组相比,TGF- β_2 抗体组可显著减少结膜下胶原沉积,同时显著抑制 α -SMA的表达,抑制了肌成纤维细胞的表型转化,从而有效抑制术后瘢痕化^[11]。

除了TGF- β ,细胞外基质对创伤的修复过程同样重要,其可以通过整合素信号通路来发挥作用,对细胞的增生、分化、迁移、凋亡,以及胶原网架收缩等具有重要调控作用。整合素是细胞表面的主要黏附因子,介导创面细胞与ECM及细胞间的黏附和信号传递,也是ECM的主要受体,介导了细胞与ECM、细胞之间的连接,ILK为整合素的下游信号分子,直接介导整合素与ECM连接,是多条介导细胞黏附活动的信号转导通路的关键因子。此提示整合素信号通路在青光眼滤过术后瘢痕化的调控作用和TGF- β 信号通路一样,有着重要的意义。Li等^[12]和Kim等^[13]在肾脏纤维化的研究中发现,TGF- β 可以通过PINCH-1-ILK- α -parvin复合体介导细胞的异常增殖以及上皮间质转化的发生,Vi等^[14]在对皮肤成纤维细胞的研究中发现,在ILK缺乏的纤维母细胞中使用TGF- β 处理后,出现smad-2/3磷酸化作用的衰减,此外MAPK信号通路同时表达下调,细胞骨架蛋白异常重组,不能形成成熟的粘着斑和有收缩性的肌动蛋白纤维,进一步证实ILK在TGF- β 诱导的创伤修复中同样发挥重要作用。

在既往研究中我们发现,TGF- β_2 可以诱导体外培养

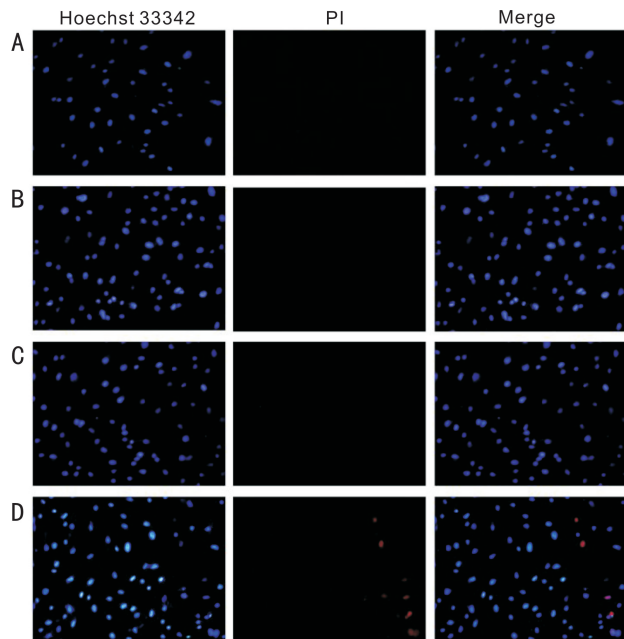


图5 ILK SiRNA对TGF- β_2 诱导的HTFs细胞凋亡的影响($\times 200$) A:NC组;B:H+T组;C:H+T+NC SiRNA组;D:H+T+ILK SiRNA组。

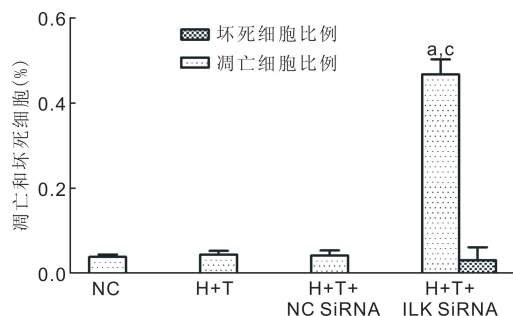


图6 ILK SiRNA对TGF- β_2 诱导的HTFs细胞凋亡影响的统计图
^a $P < 0.05$ vs NC组; ^c $P < 0.05$ vs H+T组。

HTFs增殖、转分化及黏附性增强,而ILK的表达也相应上调,提示ILK在TGF- β_2 诱导的HTFs增殖、转分化及黏附性增强中起到重要作用。在本研究中,我们使用5 μ g/L TGF- β_2 刺激HTFs可以发现ILK的表达明显上调,且可以促进细胞的增殖($P < 0.05$),但是对细胞的凋亡则无明显改变($P > 0.05$),使用Lipofectamine 2000介导靶向ILK特异性SiRNA转染HTFs,结果显示ILK SiRNA可以有效降低TGF- β_2 诱导ILK表达上调,抑制TGF- β_2 诱导的细胞增殖,并诱导细胞发生明显凋亡,提示ILK SiRNA可以抑制TGF- β_2 诱导的HTFs增殖,并诱导HTFs细胞发生凋亡。在对来自烧伤患者瘢痕的成纤维细胞研究中发现,ILK高表达组细胞的增殖明显快于其他组,而抑制ILK表达,同时细胞的增殖受到抑制,而 α -肌动蛋白(Actin alpha, smooth muscle aorta, α -SMA)的表达和ILK的表达呈现一致性,即ILK高表达组 α -SMA的表达上调,抑制ILK, α -SMA的表达也相应下调,提示ILK在创伤愈合中发挥重要作用^[15]。研究发现,在前列腺癌细胞中PTEN基因突变可以抑制ILK的表达,进而抑制AKT473位点丝氨酸的磷酸化,造成细胞G₁期阻滞,大多数细胞停留在G₁期^[16]。ILK缺失小鼠的大脑中少突胶质细胞谱系及髓鞘形成显著减少,抑制ILK表达后细胞生长增殖受到抑制,细胞周期蛋白D1/D3和细胞周期蛋白依赖性激酶2/4均

下调,而细胞周期抑制性蛋白 p27 Kip1 则上调^[17]。此外有研究显示,抑制 ILK 的表达后促凋亡因子 Bax 的表达上调,而抑制凋亡的细胞因子 Bcl-2 表达下调,流式细胞仪检测显示凋亡细胞比例增多^[18-19];抑制小鼠黑色素瘤细胞和膀胱癌细胞 ILK 的表达,细胞增殖受到抑制,诱导细胞发生凋亡,与 PI3K/ILK/AKT 通路的活化有关,并与 GSK3 β 和 β -catenin 相关^[20]。

综上所述,ILK SiRNA 可以抑制 TGF- β_2 诱导的 ILK 表达从而抑制 HTFs 增殖,并诱导 HTFs 细胞发生凋亡,提示 ILK 有可能是整合素信号通路和 TGF- β 信号通路的交汇环节,它可能是多种细胞外基质和 TGF- β 诱发创伤愈合的共同效应子,有望成为青光眼滤过术后瘢痕化研究的新靶点,其具体作用还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Tham YC, Li X, Wong TY, *et al.* Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040; a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014;121(11):2081-2090
- 2 Broman AT, Quigley HA, West SK, *et al.* Estimating the rate of progressive visual field damage in those with open-angle glaucoma, from cross-sectional data. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):66-76
- 3 Gedde SJ, Singh K, Schiffman JC, *et al.* Tube Versus Trabeculectomy Study Group The Tube Versus Trabeculectomy Study: interpretation of results and application to clinical practice. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23(2):118-126
- 4 Qing GP, Wang NL, Wang T, *et al.* Long-term Efficacy of Trabeculectomy on Chinese Patients with Pigmentary Glaucoma: A Prospective Case Series Observational Study. *Chin Med J (Engl)* 2016;129(11):1268-1272
- 5 Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016;12(6):325-338
- 6 Ran W, Zhu D, Feng Q. TGF- β_2 stimulates Tenon's capsule fibroblast proliferation in patients with glaucoma via suppression of miR-29b expression regulated by Nrf2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):4799-4806
- 7 Lawson C, Schlaepfer DD. Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin. *Cell Adh Migr* 2012;6(4):302-306
- 8 崔丽珺,孙娜,田蕴霖,等. TGF- β_2 刺激人 Tenon 囊成纤维细胞生物学行为改变及表达整合素连接激酶(ILK)的研究. *眼科新进展*

2017;37(7):605-609

- 9 Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Prog Retin Eye Res* 2017;60(9):44-65
- 10 Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, *et al.* Transforming growth factor- β_1 , - β_2 , and - β_3 *in vivo*: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):1975-1982
- 11 Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, *et al.* Evaluation of anti-TGF- β_2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3394-3401
- 12 Li Y, Dai C, Wu C, *et al.* PINCH-1 promotes tubular epithelial-to-mesenchymal transition by interacting with integrin-linked kinase. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(9):2534-2543
- 13 Kim SM, Kim N, Lee S, *et al.* TGF- β_1 -induced PINCH-1-ILK- α -parvin complex formation regulates mesangial cell proliferation and hypertrophy. *Exp Mol Med* 2007;39(4):514-523
- 14 Vi L, de Lasa C, DiGuglielmo GM, *et al.* Integrin-Linked Kinase Is Required for TGF- β_1 Induction of Dermal Myofibroblast Differentiation. *J Invest Dermatol* 2011;131(3):586-593
- 15 林伟华,李叶扬,米兰,等. 整合素连接激酶对瘢痕成纤维细胞增殖和分化的影响. *中华整形外科杂志* 2014;30(1):45-49
- 16 Persad S, Attwell S, Gray V, *et al.* Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(7):3207-3212
- 17 Hussain R, Macklin WB. Integrin-Linked Kinase (ILK) Deletion Disrupts Oligodendrocyte Development by Altering Cell Cycle. *J Neurosci* 2017;37(2):397-412
- 18 Liu Q, Xiao L, Yuan D, *et al.* Silencing of the integrin-linked kinase gene induces the apoptosis in ovarian carcinoma. *J Recept Signal Transduct Res* 2012;32(2):120-127
- 19 陈震,邢怡桥,徐冲. 抑制整合素连接激酶表达水平对视网膜母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响. *中华眼科杂志* 2012;48(2):159-163
- 20 Li L, Pan XY, Shu J, *et al.* Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanomacells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochimie* 2014;103(8):89-100