

# 吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞增殖的影响

陈俊杰<sup>1</sup>, 吴共发<sup>2</sup>, 林俊汕<sup>2</sup>, 曾宇婷<sup>2</sup>, 黄绮亭<sup>2</sup>

作者单位: (511300) 中国广东省广州市, 增城市人民医院(中山大学附属博济医院)<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>病理科

作者简介: 陈俊杰, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼表损伤及修复机制。

通讯作者: 陈俊杰. chenjj163163@163.com

收稿日期: 2014-10-31 修回日期: 2015-01-08

## Effect of pirfenidone on the proliferation of rat corneal stromal cells

Jun-Jie Chen<sup>1</sup>, Gong-Fa Wu<sup>2</sup>, Jun-Shan Lin<sup>2</sup>, Yu-Ting Zeng<sup>2</sup>, Qi-Ting Huang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of ophthalmology; <sup>2</sup>Department of Pathology, Zengcheng People's Hospital, Boji Hospital Affiliated to Sun Yat - Sen University, Guangzhou 511300, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Jun-Jie Chen. Department of Ophthalmology, Zengcheng People's Hospital, Boji Hospital Affiliated to Sun Yat - Sen University, Guangzhou 511300, Guangdong Province, China. chenjj163163@163.com

Received: 2014-10-31 Accepted: 2015-01-08

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of pirfenidone (PFD) on the proliferation and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) expression *in vitro* culture rat corneal stromal cells.

• **METHODS:** Corneal stromal cells from 8 to 10wk SD rats were isolated, cultured and treated with different concentrations of PFD 0mg/mL (control group), 0.15mg/mL (experimental group I), 0.3mg/mL (experimental group II), 1mg/mL (experimental group III) for 48h. CCK-8 assay was performed to assess cell proliferation, while immunocytochemistry and Western Blot were used to detect the expression of ki-67 and TGF- $\beta_1$  expression, respectively.

• **RESULTS:** Compared with control group, PFD significantly inhibited the proliferation in a dose-dependent manner (all  $P < 0.05$ ), so was protein expression of ki-67. PFD significantly down-regulated the expression of TGF- $\beta_1$  in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Pirfenidone can significantly inhibit the proliferation of rat corneal stromal cell by down regulating TGF- $\beta_1$  expression, therefore, it has potential prospect in lightening the corneal wound healing reaction.

• **KEYWORDS:** pirfenidone; corneal stromal cells; TGF- $\beta_1$ ; proliferation

**Citation:** Chen JJ, Wu GF, Lin JS, et al. Effect of pirfenidone on the proliferation of rat corneal stromal cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(2):201-204

### 摘要

**目的:** 探讨吡非尼酮(Pirfenidone, PFD)对体外培养大鼠角膜基质细胞增殖的抑制效果及其对转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )表达的影响。

**方法:** 分离培养大鼠角膜基质细胞, 根据 PFD 用药的不同浓度分为对照组(0mg/mL)、实验组 I (0.15mg/mL)、实验组 II (0.3mg/mL)、实验组 III (1mg/mL), 加药 48h 后应用 CCK-8 法检测其对角膜基质细胞增殖能力的影响, 免疫细胞化学和 Western-blot 分别检测 ki-67 和 TGF- $\beta_1$  表达的变化。

**结果:** CCK-8 结果显示, 相比对照组, 各实验组对角膜基质细胞的增殖均有明显的抑制作用, 且随浓度的增大其抑制作用明显增强 (均  $P < 0.05$ ); 免疫细胞化学显示 PFD 能明显降低 ki-67 阳性指数 ( $P < 0.05$ ); Western-blot 结果显示, PFD 能降低 TGF- $\beta_1$  的表达, 且呈剂量依赖关系 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** PFD 对大鼠角膜基质细胞的增殖具有明显抑制作用, 抑制机制与下调 TGF- $\beta_1$  表达密切相关, 在减轻角膜创伤愈合方面具有潜在的运用前景。

**关键词:** 吡非尼酮; 角膜基质细胞; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 增殖

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.2.04

**引用:** 陈俊杰, 吴共发, 林俊汕, 等. 吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞增殖的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(2):201-204

### 0 引言

角膜损伤后会引发复杂的创伤愈合反应, 这种反应有助于维持角膜的完整性, 并随后恢复角膜结构和透明度。然而, 当创伤愈合反应过度时会引起过度纤维化而导致瘢痕形成, 降低角膜透明度, 最终影响视功能。角膜透明度是受到多种复杂因素的影响, 包括角膜上皮细胞、基质细胞、多种生长因子如转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta_1$ ) 等, 都参与了纤维化的过程<sup>[1,2]</sup>。研究表明, 角膜过度创伤愈合反应引起的纤维化与各器官纤维化疾病具有相同的组织病理学基础<sup>[2-4]</sup>, 吡非尼酮作为新型广谱抗炎抗纤维化药物, 在动物实验和临床试验中被证明具有广泛的抗纤维化作用<sup>[5-8]</sup>。本研究运用类比的方法, 通过观察吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞增殖活性的抑制作用, 探讨其作用及对 TGF- $\beta_1$  表达的影响, 以图寻找到抑制角膜过度创伤愈合的有效潜在药物。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康 SPF 级 SD 大鼠购自中山大学中山医学院实验动物中心,8~10 周龄,体质量 198~255g,雌雄不限;胎牛血清及 DMEM/F<sub>12</sub> 培养基购自美国 Hyclone 公司;即用型鼠抗人广谱 CK(细胞角蛋白)、Vimentin(波形蛋白)、ki-67 抗体、快捷型免疫组化试剂盒、DAB 显色剂、PBS 及柠檬酸盐抗原修复液均购自福州迈新公司;兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记 IgG 购自中杉金桥;兔抗人 TGF-β<sub>1</sub> 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒、蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术;吡非尼酮购自美国 Sigma(编号 P2116,固体,纯度 ≥99.8%)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取新鲜大鼠角膜,显微镜下撕掉上皮层及内皮层,剪成 6~8 块置于 50mL 培养瓶中,进行角膜基质细胞原代培养并传代,将处于对数生长期的细胞分为对照组和实验组。实验组分为实验组 I、实验组 II、实验组 III,分别加入 0.15,0.3,1mg/mL 的吡非尼酮处理 48h,对照组以 PBS 处理相同时间。

**1.2.2 细胞增殖活性实验检测吡非尼酮对角膜基质细胞增殖能力的影响** 将大鼠角膜基质细胞接种至 96 孔板,分组设置同上述,每组设 6 个复孔,处理后培养 48h 后,每孔加 10μL 的 CCK-8,置于 37℃,50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 2h,后置于酶联免疫检测仪 450nm 处测定吸光度(A),计算抑制率(%) = (A<sub>对照组</sub> - A<sub>实验组</sub>) / A<sub>对照组</sub> × 100%。

**1.2.3 免疫细胞化学鉴定大鼠角膜基质细胞和检测其 ki-67 表达的变化** 盖玻片置于六孔板,接种细胞后待其贴壁后,取出盖玻片用 95% 酒精固定 15min,免疫细胞化学检测按照说明书检测 CK 及 Vimentin 表达,对细胞进行鉴定;另外按分组对细胞进行相应处理 48h 后,免疫细胞化学检测 ki-67 的表达,随机计算 10 个高倍视野阳性细胞数,计算 ki-67 阳性指数(%) = 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。

**1.2.4 Western-blot 检测大鼠角膜基质细胞中 TGF-β<sub>1</sub> 表达的变化** 收集四组细胞,按照蛋白提取试剂盒说明提取蛋白,并测定蛋白浓度。每泳道等质量加入 40μg 蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,GAPDH 及 TGF-β<sub>1</sub> 的稀释度分别为 1:1000 和 1:500,一抗 4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记 IgG 按 1:5000 稀释孵育 1h,ECL 化学发光法检测蛋白表达,GAPDH 为内对照,Image J 软件进行灰度值分析比较,灰度值比率 = TGF-β<sub>1</sub> 灰度值 / GAPDH 灰度值。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件,四组抑制率、ki-67 阳性指数和 TGF-β<sub>1</sub> 灰度值的数据均进行方差齐性检验和单因素方差分析,双变量相关分析采用 Spearman 检验,P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞鉴定结果** 倒置显微镜下见细胞呈梭形、纺锤形或星型,有突触。免疫细胞化学显示细胞 Vimentin 表达阳性,CK 表达阴性,说明获得的细胞为大鼠角膜基质细胞。

表 1 各组大鼠角膜基质细胞生长的抑制情况

分组	孔数	A 值( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率(%)
对照组	6	0.907 ± 0.048	
实验组 I	6	0.639 ± 0.065	29.19 <sup>a</sup>
实验组 II	6	0.329 ± 0.045	63.94 <sup>a,b</sup>
实验组 III	6	0.081 ± 0.0009	90.51 <sup>a,b,c</sup>

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组;<sup>b</sup>P<0.05 vs 实验组 I;<sup>c</sup>P<0.05 vs 实验组 II。

**2.2 吡非尼酮对角膜基质细胞增殖活性的影响** CCK-8 检测结果显示,吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞的增殖有明显抑制作用(表 1),三个实验组的抑制率均明显高于对照组(均 P<0.05),并且吡非尼酮对细胞抑制率的效应随着药物浓度的升高逐渐增加,即实验组 II 抑制率高于实验组 I (P<0.05)、实验组 III 高于实验组 II (P<0.05)。

**2.3 吡非尼酮对角膜基质细胞 ki-67 表达的影响** ki-67 阳性表达细胞的核呈棕褐色(图 1A),统计分析显示,实验组细胞 ki-67 阳性指数均较对照组减低(均 P<0.05),在三个实验组中随着药物浓度升高 ki-67 阳性指数明显减低(组间比较均 P<0.05,图 1B)。

**2.4 吡非尼酮对角膜基质细胞 TGF-β<sub>1</sub> 表达水平的影响** Western-blot 结果显示,全部实验组的 TGF-β<sub>1</sub> 表达均比对照组减低,且实验组中随着吡非尼酮浓度升高,TGF-β<sub>1</sub> 表达逐渐减低(图 2A)。Image J 软件分析条带灰度值,实验组 I 与对照组比较、实验组 II 与实验组 I 比较、实验组 III 与实验组 II 比较,差异均有统计学意义(P<0.05,图 2B)。双变量相关分析 Spearman 检验结果显示,吡非尼酮浓度与 TGF-β<sub>1</sub> 表达量存在显著正相关关系,且相关关系密切( $r_s = -0.612, P = 0.000$ ),说明随吡非尼酮浓度升高,TGF-β<sub>1</sub> 表达量下降且呈剂量依赖关系。

## 3 讨论

由机械损伤、手术及感染等原因造成的角膜损伤是一种常见的眼表疾病,当损伤深及角膜基质层,为填充过大的缺损,角膜基质细胞会增生活跃,产生大量胶原纤维,这种反应一方面能促进伤口愈合,保持角膜完整性;但另一方面其过度的基质成纤维细胞增殖会引起角膜纤维化、瘢痕形成而严重损害视力。目前对角膜损伤或角膜屈光手术后常规使用糖皮质激素以防止角膜纤维化,但糖皮质激素长时间及高浓度的应用对眼副作用大,严重时可能造成永久性的视觉损失<sup>[9]</sup>。因此,寻求安全有效的抗角膜基质细胞增殖药物以保持角膜透明度具有重大临床价值。

吡非尼酮已被众多动物实验和临床试验证实是一种新型的具有广谱抗纤维化作用的药物,其抗纤维化作用机制尚未研究清楚,初步认为其通过调节与纤维化有关的生长因子和细胞因子的表达,包括 TGF-β, TNF 和 PDGF 等,从而抑制成纤维细胞的增殖和胶原基质的合成<sup>[10]</sup>。TGF-β 包括 TGF-β<sub>1</sub>, TGF-β<sub>2</sub> 和 TGF-β<sub>3</sub> 等,已被证实是多种器官纤维化过程的中枢因子,可以促进成纤维细胞的增殖和生长,增加胶原合成,阻止细胞外基质的降解<sup>[11]</sup>,其高表达与眼部疾病瘢痕形成具有密切关系<sup>[12]</sup>。大量研究表明,吡非尼酮能减少肺和肾等器官的成纤维细胞 TGF-β 包括 TGF-β<sub>1</sub> 的表达,从而发挥抗纤维化作用<sup>[13,14]</sup>。

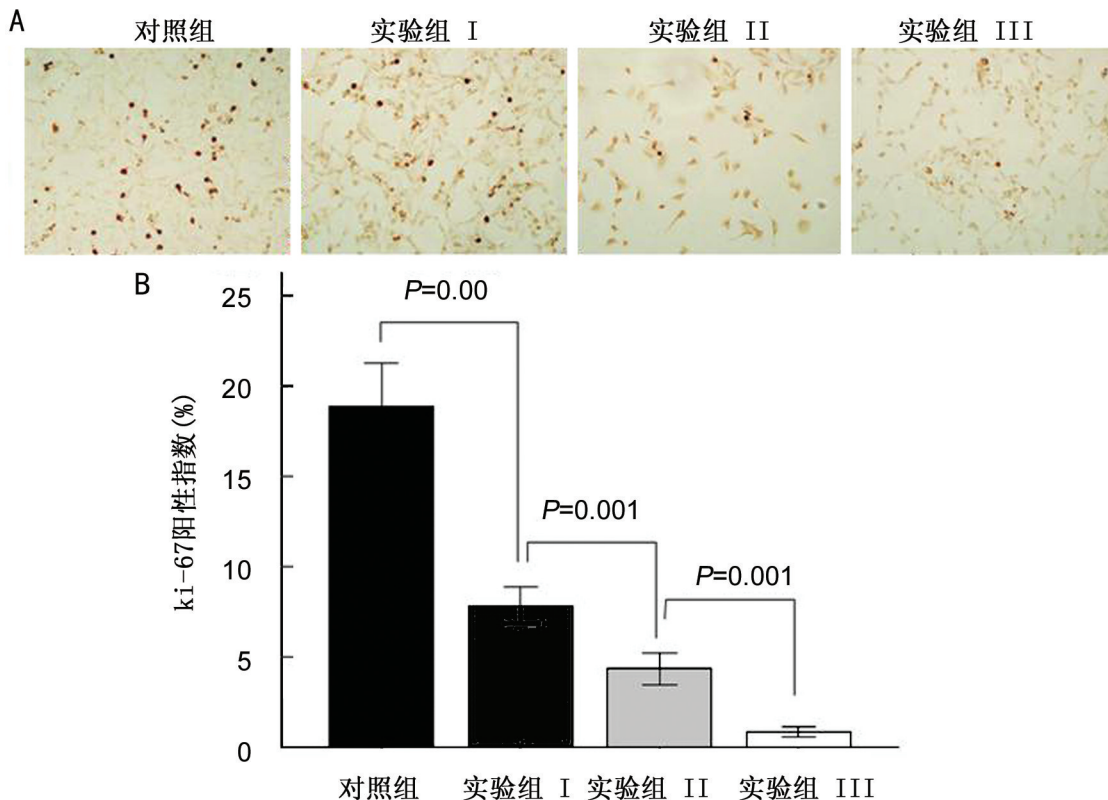


图1 吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞 ki-67 表达的影响 A:各组细胞 ki-67 免疫细胞化学染色(Envision 法×200); B:各组细胞 ki-67 阳性指数比较。

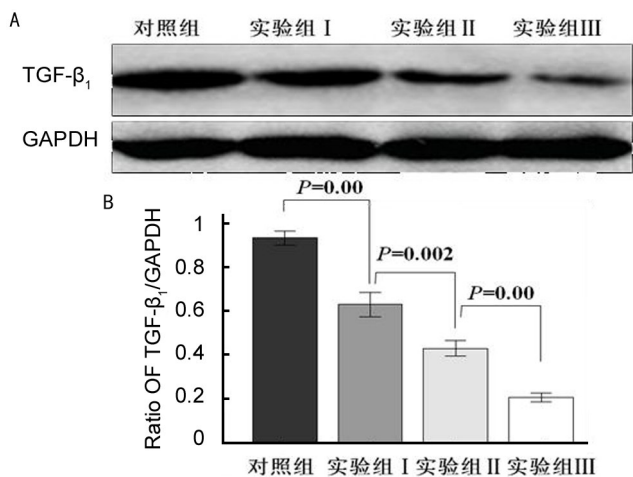


图2 吡非尼酮对大鼠角膜基质细胞 TGF-β<sub>1</sub> 表达的影响 A: Western-blot 检测各组细胞 TGF-β<sub>1</sub> 表达; B: 各组细胞 TGF-β<sub>1</sub> 灰度值比率比较。

眼部很多增殖性病变的病理基础也是纤维化,吡非尼酮对角膜过度创伤愈合反应的纤维化是否具有安全有效的抗纤维化作用未见报道。本研究根据各器官纤维化疾病具有相同的组织病理学基础<sup>[2-4]</sup>,推测吡非尼酮可以抑制角膜基质细胞增殖。实验结果显示,对体外培养的大鼠角膜基质细胞加入吡非尼酮处理后,CCK-8 法检测显示大鼠角膜基质细胞的增殖在三个实验组均受到明显抑制,并且吡非尼酮对细胞抑制率呈剂量依赖关系。Ki-67 是细胞增殖的标记物,可以判断细胞增殖程度与细胞分裂成正比;本研究免疫细胞化学检测各组细胞 ki-67 表达,进一步证实了吡非尼酮能抑制角膜基质细胞增殖。我们初

步探讨了吡非尼酮抑制角膜基质细胞增殖的可能机制,实验结果显示实验组细胞的 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达均减低,并且随吡非尼酮浓度升高,TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达量下降且呈明显剂量依赖相关关系。TGF-β<sub>1</sub> 是 TGF-β 家族成员之一,是公认的最重要的致纤维化因子,抑制其水平能减低成纤维细胞的增殖和胶原合成,起到抗纤维化的作用<sup>[15,16]</sup>。根据文献报道,吡非尼酮在肺和肾等器官发挥抗纤维化作用是通过减少成纤维细胞 TGF-β (包括 TGF-β<sub>1</sub>) 表达实现的<sup>[13,14]</sup>。结合本研究结果,可以得出吡非尼酮能抑制大鼠角膜基质细胞增殖活性与下调 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达有密切关系。

综上所述,本研究初步得出吡非尼酮对体外培养大鼠角膜基质细胞具有明显抑制作用,机制可能是通过下调 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达,减少细胞外基质沉积,抑制纤维化。我们下一步将建立角膜纤维化动物模型,深入研究吡非尼酮抑制角膜创伤愈合反应的作用机制及安全性,以寻找抑制角膜过度创伤愈合的有效潜在药物。

参考文献

- Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010;91(3): 326-335
- Tandon A, Tovey JC, Sharma A, et al. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Curr Mol Med* 2010;10(6): 565-578
- Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res* 2012;99(1):78-88
- 齐虹, 朱秀安. 准分子激光屈光性角膜切削术后角膜雾状混浊发生机制的研究. *解剖学报* 2002;33(1): 78-83
- 冯玲芳, 贾振宇, 朱丽瑾, 等. 吡非尼酮对大鼠矽肺纤维化的抑制作用. *中华劳动卫生职业病杂志* 2010;28(10):772-775



6 蓝蔚,刘德伍,彭燕,等.吡非尼酮对人增生性瘢痕成纤维细胞胶原蛋白分泌的影响.实用临床医学 2013;14(4):1-3  
7 Conte E,Gili E,Fagone E, et al. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- $\beta$ -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur J Pharm Sci* 2014;58(23):13-19  
8 Lee K, Young Lee S. Antifibrotic effect of pirfenidone on human pterygium fibroblasts. *Curr Eye Res* 2014;39(7):680-685  
9 李薇,周远大.重组人角质细胞生长因子异构体抑制兔角膜基质细胞增殖分化的研究.第三军医大学学报 2008;30(8):728-731  
10 Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, et al. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *Eur Respir Rev* 2011;20(120):85-97  
11 Tian XL, Yao W, Guo ZJ, et al. Low dose pirfenidone suppresses transforming growth factor beta - 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and protects rats from lung fibrosis induced by bleomycina. *Chin Med Sci J* 2006;21(3):145-151

12 Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, et al. TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):756-763  
13 Dosanjh A, Ikonen T, Wan B, et al. Pirfenidone: A novel anti-fibrotic agent and progressive chronic allograft rejection. *Pulm Pharmacol Ther* 2002;15(5):433-437  
14 Shimizu T, Kuroda T, Hata S, et al. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int* 1998;54(1):99-109  
15 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10(1):76-99  
16 Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006;69(2):213-217

## 2015 IJO 部分编委会议在西安召开， 樊代明院士出席并作重要讲话

本刊讯 2015年元月13日,《国际眼科杂志》英文刊 IJO 部分编委会议在第四军医大学樊代明院士办公室成功召开。本刊总顾问/中国工程院副院长、第四军医大学前任校长樊代明院士出席会议并作重要讲话。樊院士首先对本刊入选“中国国际影响力优秀学术期刊”表示热烈祝贺,并表示将大力支持 IJO 国际化发展,进一步提升国际影响力,努力争创世界一流期刊。惠延年主编主持会议,胡秀文总编作 2014 IJO 工作报告。报告指出:2014 年 IJO 影响因子由 0.119 提升到 0.5,他引率为 0.9(90%),并入选了“中国国际影响力优秀学术期刊”。全年收稿 822 篇共来自 40 个国家。全年 6 期共刊文 200 篇,接受率为 24.33%。国际论文 110 篇占 55%;基金项目论文 69 篇占 35%。2014 年审稿人共 55 个国家 551 人,包括许多世界著名眼科专家。IJO 近期目标是两年内 JCR 影响因子达到 1.0 以上,并尽早入选中国最具国际影响力学术期刊。本刊编委、第四军医大学唐都医院眼科主任严宏教授,航空航天医学系张作明教授以及国际眼科杂志编辑部主任彭娟编辑和总编助理/电子版主任胡新越编辑参加了会议。会议结束时樊代明院士怀着喜悦的心情分别为惠延年主编、胡秀文总编等签名赠书——《医学发展考》。胡秀文总编向樊代明院士赠送 IJO/IES 最新一期样刊请樊院士指导。会议在轻松愉快、团结向上的气氛中进行,本次会议对 IJO 的发展具有重要意义。

IJO/IES 编辑部