

吡非尼酮对内皮细胞间质转化的抑制作用及机制

廖丁莹¹, 付丽丽², 郑玉萍¹, 王丽君¹, 李宏松¹, 张文怡¹, 王建明¹, 赵琳¹

引用:廖丁莹,付丽丽,郑玉萍,等. 吡非尼酮对内皮细胞间质转化的抑制作用及机制. 国际眼科杂志 2021;21(2):204-210

基金项目:陕西省重点研发计划项目(No.2018ZDXM-SF-045, 2017SF-266);西安市科技计划项目[No.2017116SF/YX010(10)]

作者单位:(710004)中国陕西省西安市,西安交通大学第二附属医院¹眼科;²妇产科

作者简介:廖丁莹,西安交通大学在读博士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:王建明,毕业于西安交通大学,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:眼底病、青光眼. xajdwjm@163.com;赵琳,毕业于西安交通大学,硕士,副主任医师,研究方向:眼底病、白内障. zhaolin_xa@126.com

收稿日期:2020-08-14 修回日期:2020-12-31

摘要

目的:建立缺氧诱导内皮细胞的内皮-间质转化(EndoMT)模型,探讨吡非尼酮(PFD)在视网膜下纤维瘢痕形成过程中的抗纤维化作用及机制。

方法:原代培养人脐静脉内皮细胞,鉴定后取4~7代用于实验。CoCl₂诱导细胞缺氧建立纤维化模型。CCK-8法检测细胞增殖率,筛选药物浓度。将细胞分为对照组(无血清培养基培养)、CoCl₂(200μmol/L)模型组、CoCl₂+低浓度(0.3mg/mL)PFD组、CoCl₂+高浓度(0.6mg/mL)PFD组。Western blot法检测细胞CD31、VE-cadherin、α-SMA、FSP1、p-p38和p38的蛋白表达水平。CD31/α-SMA免疫荧光双染法观察蛋白表达的变化。划痕实验观察细胞迁移能力的改变。q-PCR法检测TGF-β1、SNAI1 mRNA转录水平。

结果:与CoCl₂模型组相比,PFD能明显提高缺氧细胞的增殖率,抑制细胞的迁移能力(均P<0.05);PFD组细胞标志蛋白CD31、VE-cadherin表达增加,α-SMA、FSP1表达降低(均P<0.05)。免疫荧光检测显示PFD可明显抑制α-SMA和增加CD31的蛋白表达(P<0.05)。内皮细胞EndoMT过程中,p38总蛋白表达不变(P>0.05),但p-p38磷酸化蛋白表达增加,TGF-β1和SNAI1 mRNA转录水平增高的现象可明显被PFD抑制(均P<0.05)。高低浓度PFD组上述各现象无明显差异。

结论:PFD可以抑制内皮细胞纤维化的发生,TGF-β/p38 MAPK通路可能是PFD调控EndoMT过程的机制之一,为视网膜下纤维化的治疗提供了新思路。

关键词:吡非尼酮;内皮细胞;内皮间质转化;视网膜下纤维化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.2.03

Study on the effect and mechanism of Pirfenidone on endothelial - mesenchymal transition in endothelial cells

Ding-Ying Liao¹, Li-Li Fu², Yu-Ping Zheng¹, Li-Jun Wang¹, Hong-Song Li¹, Wen-Yi Zhang¹, Jian-Ming Wang¹, Lin Zhao¹

Foundation items: Shaanxi Provincial Science and Technology Department (No.2018ZDXM-SF-045, 2017SF-266); Science and Technology Program of Xi'an [No.2017116SF/YX010(10)]

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jian - Ming Wang. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. xajdwjm@163.com; Lin Zhao. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. zhaolin_xa@126.com

Received:2020-08-14 Accepted:2020-12-31

Abstract

• **AIM:** To establish the hypoxia induced endothelial - mesenchymal transition (EndoMT) model of endothelial cells, and to investigate the effect and mechanism of Pirfenidone (PFD) on inhibiting the subretinal fibrosis progression.

• **METHODS:** Primary cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), 4-7 passages were used for experiments after cell identification. CoCl₂ induced hypoxia to establish the transformation model of endothelial cells into fibroblasts. CCK-8 was performed to detect cell proliferation rate and chose the optimal drug concentration. All cells were divided into 4 groups: control group (FBS-free), CoCl₂(200μmol/L) group, CoCl₂+0.3mg/mL PFD group, CoCl₂+0.6mg/mL PFD group. The protein expression of CD31, VE-cadherin, α-SMA, FSP1, p-p38 and p38 were detected by Western blot. Double immunofluorescence labeling method was used to observe the CD31/α-SMA expression. Wound healing assay detected the cell migration. The q-PCR was applied to detect the mRNA levels of TGF-β1 and SNAI1.

• **RESULTS:** Compared with CoCl₂ group, PFD increased cell proliferation rate and inhibited cell migration significantly under hypoxia (P<0.05). PFD decreased the protein expression of the mesenchymal markers α-SMA and FSP1, and increased the protein level of the

endothelial markers CD31 and VE-cadherin ($P < 0.05$). Double immunofluorescence results showed that PFD could reduce the expression of α -SMA and increase the level of CD31 ($P < 0.05$). In the process of EndoMT, the p38 protein expression level was stable ($P > 0.05$). PFD down-regulated significantly the high protein expression of p-p38, and high mRNA expression of TGF- β 1 and SNAI1 compared with control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the 0.3 and 0.6mg/mL PFD groups in all results above.

• **CONCLUSION:** PFD can inhibit the formation of fibrosis in endothelial cells. TGF- β /p38MAPK signaling pathway might be one of the mechanisms that PFD regulates EndoMT progression. PFD will be expected to become a potential new sight on the treatment of subretinal fibrosis.

• **KEYWORDS:** Pirfenidone; endothelial cell; endothelial-mesenchymal transition; subretinal fibrosis

Citation: Liao DY, Fu LL, Zheng YP, et al. Study on the effect and mechanism of Pirfenidone on endothelial-mesenchymal transition in endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21(2):204-210

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是一种常见的视网膜变性疾病, 主要发生于 50 岁以上的中老年人群。近 20a 来, ARMD 的患病率已经达到 8.7%^[1]。湿性 ARMD 是以黄斑区脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 为主要特点, 异常的新生血管会引起出血和渗出, 使黄斑部感光细胞功能减退, 甚至造成纤维瘢痕化和视网膜脱离, 视力永久性丧失^[2]。目前一线治疗方法为玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子 (VEGF) 类药物, 抑制或减少新生血管的形成及出血渗出。但是随着该类药物的广泛应用和随访时间的延长, 视网膜下纤维化逐渐加重的情况日益突显。有文献指出在 CNV 疾病中, 血管内皮细胞是新生血管和纤维化过程中多因素作用的关键细胞, 脉络膜微血管内皮细胞符合内皮细胞的特有表型^[3]。内皮细胞在各种刺激因子的作用下, 其内皮特性逐渐消失而转化为间质细胞 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT), 最终导致纤维化, 形成视网膜下瘢痕^[4]。目前普遍认为缺氧会使转化生长因子- β (TGF- β) 水平升高, TGF- β 又是刺激 EndoMT 发生的最常见的因子, 同时也会引起下游纤维化因子增多^[5], 进一步加重视网膜下纤维化的程度。

吡非尼酮 (Pirfenidone, PFD) 是一种新型的广谱抗纤维化小分子化合物, 其主要作用靶点是 TGF- β , 可有效抑制纤维细胞增殖和细胞外基质沉积^[6], 已成为治疗肝、肾及心肌纤维化的一线药物。但 PFD 是否能够延缓 CNV 患者视网膜下纤维化的进展尚未见报道。本研究初步观察 PFD 对缺氧诱导内皮细胞 EndoMT 过程的抑制作用及机制, 探讨 PFD 延缓视网膜下纤维化的可行性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 M199 培养基 (Gibco), 胎牛血清 (BI), 内皮细胞生长因子 (ScienCell), 吡非尼酮 (Sigma),

CoCl₂ (Sigma), CCK-8 (索莱宝), Trizol (Invitrogen), 反转录和 PCR 试剂盒 (TaKaRa), PCR 引物 (生工), BCA 蛋白定量试剂盒 (赫特)。电泳仪、电转仪和发光仪 (Bio-Rad), 实时荧光定量 PCR 仪 (Step One Plus); 荧光成像显微镜 (Zeiss)。

1.2 方法

1.2.1 原代人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 分离及培养

标本取自于西安交通大学第二附属医院妇产科正常剖宫产的新生儿无菌脐带, 约 25~30cm, 置于无菌保存液中转运。本研究标本取材获得西安交通大学第二附属医院伦理委员会审批 [No. (2019) 伦审-研第 (021) 号]。在超净台内用灭菌 PBS 缓冲液反复冲洗脐静脉内部以除去凝血块及残留物, 预热至 37℃ 的 0.1% I 型胶原酶 10mL 灌入脐静脉内, 夹闭脐带两端, 37℃ 消化 10min, 期间不时地晃动脐带使胶原酶 I 充分接触静脉内壁。消化结束后回收消化液至离心管内, 室温下 800×g 离心 5min 得到脐静脉内皮细胞, 加入含 20% 胎牛血清的 M199 培养基, 吹打混匀种于培养皿内, 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养, 24h 后换液。待内皮细胞生长融合至 80%~90% 时, 用 0.05% 胰蛋白酶消化传代, 经 vWF 因子抗原实验鉴定确认原代细胞分离成功, 选第 4~7 代细胞用于后续实验。

1.2.2 原代 HUVECs 鉴定 免疫荧光法检测 vWF 因子抗原。将细胞均匀接种于置有灭菌爬片的 24 孔板内, 生长至约 50% 时, PBS 缓冲液清洗后加入 4% 多聚甲醛冰上固定 30min, PBS 缓冲液洗涤后加入 0.1% Triton-X100 溶液, 室温破膜 20min, 小牛血清室温封闭 1h, 加入兔抗人 vWF 因子抗体 (Abcam, ab154193, 1:300), 4℃ 过夜, 再加入 488nm 荧光素标记的羊抗兔二抗 (CST, #4412, 1:800) 室温孵育 1h, DAPI 室温作用 20min 后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活力 将细胞每孔 100 μ L 均匀接种于 96 孔板中, 根据参考文献 [7] 的浓度梯度, 待细胞贴壁后加入不同浓度 PFD (0、0.01、0.1、0.3、0.6、0.9mg/mL) 或 CoCl₂ (0、25、50、100、200、400、800 μ mol/L), 分别孵育不同时间 (12、24、48h) 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液, 培养箱内孵育 4h, 取出后测定各孔在 450nm 处的吸光度 (OD) 值, 计算细胞增殖率, 细胞增殖率 = (OD_{实验组} - OD_{空白}) / (OD_{对照组} - OD_{空白}) × 100%, 筛选出合适的药物浓度和作用时间。

1.2.4 实验分组 将细胞随机分为 4 组: (1) 正常对照组: 不含 CoCl₂ 和 PFD 的无血清培养基培养细胞 24h; (2) CoCl₂ 模型组: 含 200 μ mol/L CoCl₂ 的无血清培养基培养细胞 24h; (3) CoCl₂ + 低浓度 PFD 组: 含 0.3mg/mL PFD 的无血清培养基预处理 1h, 再用含 200 μ mol/L CoCl₂ 和 0.3mg/mL PFD 的无血清培养基共同培养细胞 24h; (4) CoCl₂ + 高浓度 PFD 组: 含 0.6mg/mL PFD 的无血清培养基预处理 1h, 再用含 200 μ mol/L CoCl₂ 和 0.6mg/mL PFD 的无血清培养基共同培养细胞 24h。收集细胞用于后续实验。

1.2.5 Western blot 实验检测蛋白质相对表达量 收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定各组蛋白浓度, 与上样缓冲液混合后高温煮 10min。在聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳, 使用湿转的方法将蛋白质转移至激

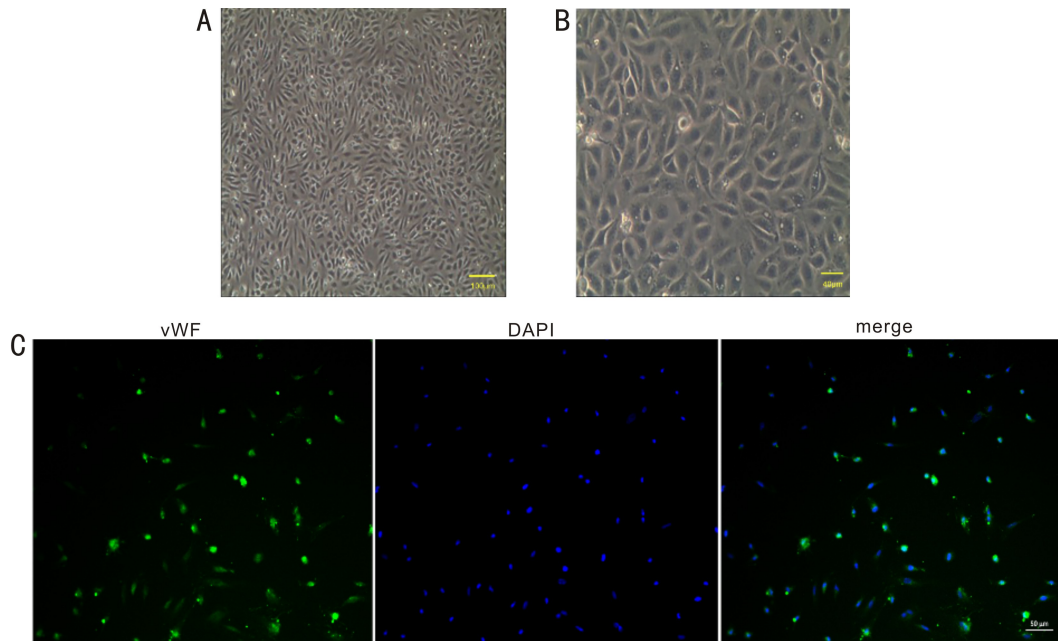


图1 原代 HUVEC 细胞的形态及鉴定 A:光镜($\times 40$);B:光镜($\times 100$);C:vWF 因子荧光染色($\times 200$)。

活的 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1h。按照目标蛋白的分子量裁膜,分别加入上皮标志物 CD31 (Santa Cruz, sc-376764, 1:500)、VE-cadherin (Abcam, ab33168, 1 μ g/mL)、纤维细胞标志物 α -SMA (Abcam, ab5694, 1 μ g/mL)、FSP1 (Abcam, ab197896, 1:1000)、通路因子 p-p38 (ABclonal, AP0057, 1:1000)、p38 (ABclonal, A4771, 1:1000) 和内参 GAPDH (Proteintech, 60004-1-1g, 1:25000) 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后分别加入羊抗兔 (Elabscience, E-AB-1003, 1:3000)、羊抗鼠 (Elabscience, E-AB-1001, 1:3000) 二抗,室温孵育 1h,洗膜后加入 ECL 显色液后曝光拍照。

1.2.6 细胞免疫荧光双染法检测蛋白表达情况 细胞随机均匀种于铺有灭菌爬片的 24 孔板中,贴壁后各组分别加入相应药物进行干预,24h 后 4% 多聚甲醛冰上固定 30min, PBS 缓冲液洗涤后加入 0.1% Triton-X100 溶液,室温破膜 20min,小牛血清室温封闭 1h,滴加鼠抗人 CD31 (Abcam, ab24590, 1:150) 和兔抗人 α -SMA (Abcam, ab5694, 1:100) 混合抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤后分别滴加种属对应的 594nm (Proteintech, SA00013-3, 1:250) 和 488nm (CST, #4412, 1:800) 荧光二抗,避光室温孵育 1h,洗涤后 DAPI 避光染色 20min,洗涤后封片。镜下拍照观察。

1.2.7 细胞划痕实验观察细胞迁移能力 预先在六孔板背面画出定位线,细胞随机均匀种于各孔,贴壁后用 200 μ L 枪头垂直于定位线画出划痕,按照分组分别加入相应药物进行干预,每孔于划痕后 0、24h 在显微镜下观察并拍照。细胞迁移率=(0h 划痕距离-24h 划痕距离)/0h 划痕距离 $\times 100\%$ 。

1.2.8 实时定量 q-PCR 检测 mRNA 含量 按各个分组进行培养干预后收集细胞,使用 Trizol 法提取细胞总 RNA,分光光度计测定纯度和浓度后,逆转录为 cDNA,采用 20 μ L 体系进行扩增,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,1 个循环,94 $^{\circ}$ C 变性 20s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20s,循环 40 次。TGF- $\beta 1$ 引物序列:5'-CAGCAACAATT CCTGGCGATA-3',5'-GCTAAGCGAAAGCCCTCAAT-3';

SNAI1 引物序列:5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3',5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3'; β -actin 引物序列:5'-TTTGAATGATGAGCCTTCGTCCTCC-3',5'-GGTCTCAAG TCAGTGTACAGGTAAGC-3'。反应结束后根据扩增曲线结果,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目标基因的相对表达量。

统计学分析:本实验的统计学分析采用 SPSS 25.0 软件进行。所有实验均重复 3 次。计量数据用均数 \pm 标准差表示,各组之间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 HUVECs 细胞鉴定 接种 24h 后,镜下可见内皮细胞贴壁,呈梭形或椭圆形,边界清晰。第 4~6d,内皮细胞单层生长融合成片,排列紧密的部分呈典型的铺路鹅卵石样(图 1A、1B)。荧光显微镜下可见内皮细胞胞浆内均有亮度较强的绿色荧光,说明人 vWF 因子存在于细胞内,证明上述方法分离 HUVECs 细胞成功,且纯度可达 95% 以上,可用于后续实验(图 1C)。

2.2 不同浓度 CoCl₂ 和 PFD 对 HUVECs 的增殖活力影响 筛选 CoCl₂ 诱导缺氧建立纤维化模型的最佳作用时间和浓度。结果如图 2A 所示,随着 CoCl₂ 作用时间和浓度的增加,细胞的增殖率逐渐下降,24h 时各组细胞的增殖活力均在 50% 左右,对照组、25、50、100、200、400、800 μ mol/L CoCl₂ 组的增殖率分别为 (100 \pm 0)%、(83.48 \pm 9.11)%、(79.52 \pm 10.00)%、(69.72 \pm 11.78)%、(59.05 \pm 7.40)%、(44.75 \pm 10.69)%、(38.17 \pm 4.97)%、各组之间差异有统计学意义 ($F = 39.52, P < 0.01$)。与对照组相比,100、200、400、800 μ mol/L 组差异有统计学意义 ($t = 6.298, 13.56, 12.66, 30.54$, 均 $P < 0.001$),表明 CoCl₂ 会导致内皮细胞缺氧,降低增殖率,具有一定的浓度依赖性。200 μ mol/L CoCl₂ 干预细胞 24h 后增殖率略大于 50%,故本实验使用 200 μ mol/L CoCl₂ 刺激细胞 24h 建立细胞模型。

筛选 PFD 最佳治疗时间和浓度。结果如图 2B 所示,不同时间不同浓度 PFD 组分别与对照组、DMSO 组相比,细胞增殖率基本不受影响 ($F_{12h} = 0.418, F_{24h} = 0.289, F_{48h} =$

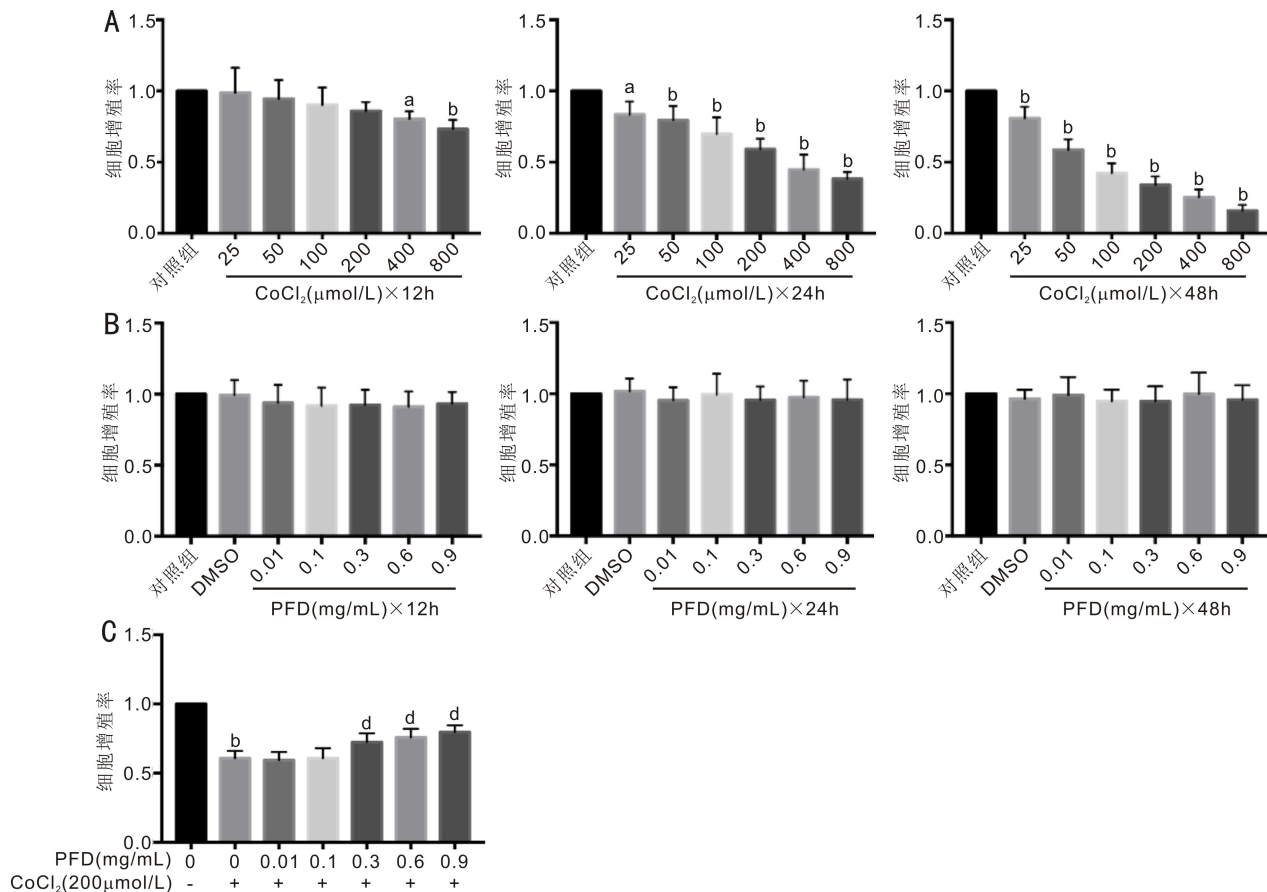


图2 CoCl₂和PFD对内皮细胞增殖率的影响 A:CoCl₂对细胞增殖率的影响(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组);B:PFD对细胞增殖率的影响;C:PFD对缺氧条件下细胞增殖率的影响(^b $P < 0.01$ vs 对照组;^d $P < 0.01$ vs 单纯缺氧组)。

0.240, 均 $P > 0.05$), 表明使用 DMSO 溶解 PFD 不会产生细胞毒性, 且单纯使用 PFD 不会对内皮细胞增殖产生影响。

不同浓度 PFD 预处理内皮细胞 1h 后, 再加入 200 μmol/L CoCl₂, 使其共同干预刺激细胞 24h, 结果如图 2C 所示, 对照组、单纯缺氧组、0.01、0.1、0.3、0.6、0.9 mg/mL PFD 组细胞增殖率分别为 (100 ± 0)%、(60.81 ± 5.23)%、(59.4 ± 5.90)%、(60.81 ± 7.23)%、(72.45 ± 6.30)%、(75.85 ± 6.21)%、(79.7 ± 4.94)%, 差异有统计学意义 ($F = 13.1, P < 0.001$)。与对照组相比, 单纯缺氧组细胞增殖率降低 ($t = 13.8, P < 0.001$); 与单纯缺氧组相比, 经 0.3、0.6、0.9 mg/mL PFD 溶液预处理后细胞增殖率明显增加, 差异有统计学意义 ($t = 3.478, 4.534, 6.427$, 均 $P < 0.01$)。故后续实验使用 200 μmol/L CoCl₂ 和 0.3、0.6 mg/mL PFD 共同干预细胞。

2.3 PFD 对缺氧诱导的 EndoMT 过程中细胞迁移能力的影响 各组细胞迁移率分别为 (100 ± 5.34)%、(332.63 ± 10.37)%、(183.97 ± 13.27)%、(204.75 ± 9.40)%, 差异有统计学意义 ($F = 129.4, P < 0.001$)。正常对照组细胞形态规则, 24h 后划痕边缘整齐光滑, 仍清晰可见; CoCl₂ 模型组细胞划痕边缘在 24h 时基本消失, 细胞向划痕区域迁移, 状态不佳, 变形及死亡的细胞数量增多; CoCl₂ 模型组与正常对照组相比, 缺氧后内皮细胞迁移能力增加 ($t = 38.87, P = 0.0007$)。经低浓度或高浓度 PFD 溶液预处理后, 两组细胞的形态较 CoCl₂ 模型组改善, 两组间细胞迁移率差异无统计学意义 ($t = 3.369, P = 0.078$), 但与模型组对比

迁移率均明显减小 ($t = 88.41, 16.29$, 均 $P < 0.01$)。证明 PFD 可抑制缺氧对内皮细胞迁移运动的增强作用 (图 3)。
2.4 PFD 对缺氧诱导的 EndoMT 过程中各标志物蛋白及 mRNA 表达的影响 PFD 可抑制 EndoMT 过程中间质细胞标志物的表达和增加内皮细胞标志物的表达。与正常对照组相比, CoCl₂ 模型组细胞的 α-SMA、FSP1 的蛋白表达水平显著升高 ($t = 5.328, 4.706$, 均 $P < 0.05$), CD31、VE-cadherin 的蛋白表达水平降低 ($t = 6.379, 5.78$, 均 $P < 0.05$); 与 CoCl₂ 模型组比较, 低浓度 PFD 组和高浓度 PFD 组均能显著抑制 α-SMA、FSP1 的蛋白表达, 使 CD31、VE-cadherin 的蛋白表达仍维持在一个较高的水平 (均 $P < 0.05$), 但组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见图 4, 表 1。

PFD 可抑制 EndoMT 过程中转录因子及通路因子的表达。与正常对照组相比, CoCl₂ 模型组中 p-p38 磷酸化蛋白被激活 ($t = 7.382, P < 0.05$), 经高低浓度 PFD 干预后, p-p38 蛋白的磷酸化过程被抑制 ($t = 4.667, 9.392$, 均 $P < 0.05$), p38 总蛋白含量不变 ($P > 0.05$), 图 5A、5B, 表 1。

q-PCR 实验结果显示, CoCl₂ 模型组细胞中 TGF-β1、转录因子 SNAIL mRNA 含量较正常对照组明显升高 ($t = 14.46, 9.89$, 均 $P < 0.05$); 与 CoCl₂ 模型组相比, 低浓度和高浓度 PFD 组能明显抑制 TGF-β1、转录因子 SNAIL mRNA 转录 (均 $P < 0.05$), 且两组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 2, 图 5C。

细胞免疫荧光双染检测结果显示, 各组细胞 CD31 和 α-SMA 的表达差异具有统计学意义 ($F = 105.6, 33.42$, 均

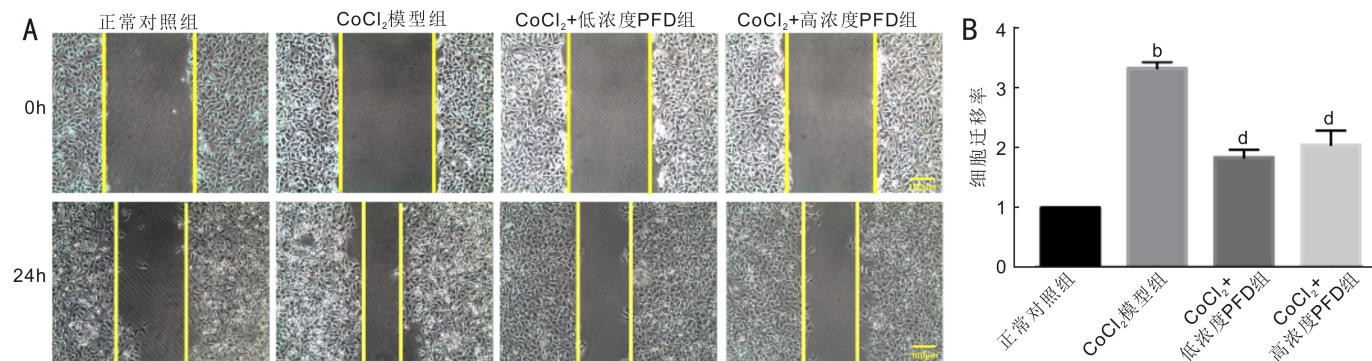


图3 PFD对缺氧条件下内皮细胞迁移能力的影响 A: 光镜下各组迁移距离的测量($\times 40$); B: 各组迁移率的定量分析。^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs CoCl₂模型组。

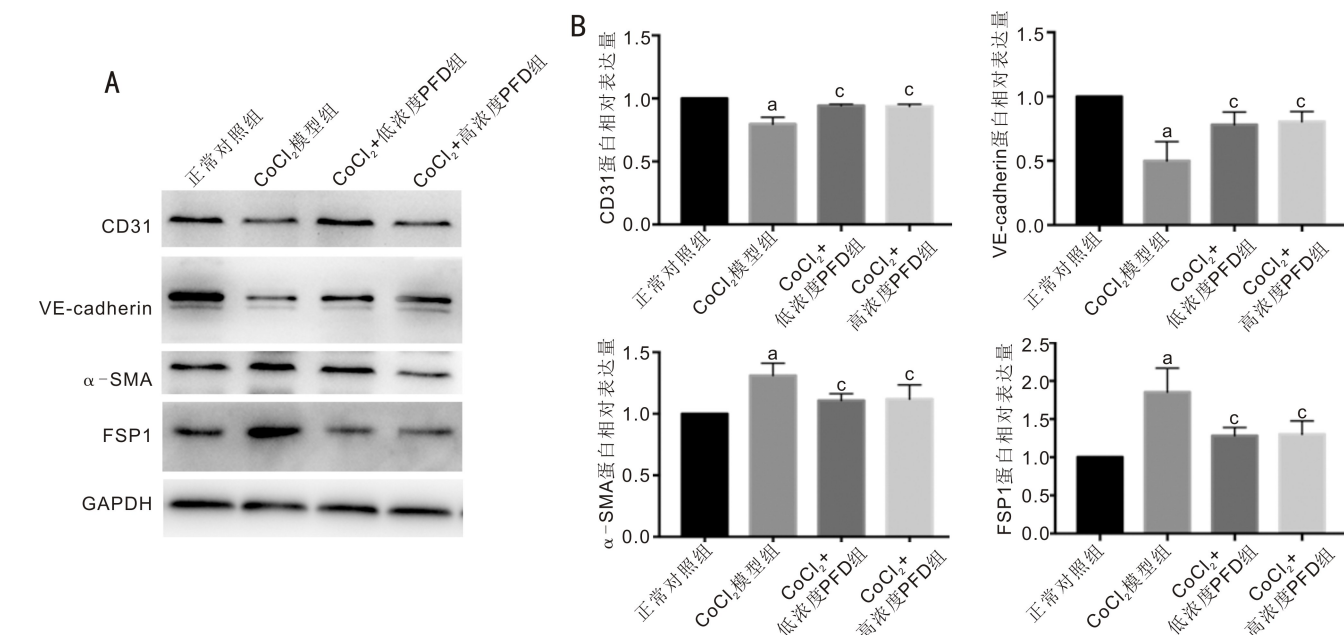


图4 PFD对缺氧条件下内皮细胞 EndoMT 过程中相关标志蛋白表达量的影响 A: 内皮细胞标志因子(CD31、VE-cadherin)和间质细胞标志因子(α -SMA、FSP1)的蛋白表达检测条带; B: 各标志因子蛋白表达的定量分析。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs CoCl₂模型组。

组别	CD31	VE-cadherin	α -SMA	FSP1	p-p38	p38
正常对照组	0.34 \pm 0.01	0.82 \pm 0.09	0.45 \pm 0.04	0.69 \pm 0.03	0.21 \pm 0.06	0.72 \pm 0.04
CoCl ₂ 模型组	0.27 \pm 0.03 ^a	0.41 \pm 0.15 ^a	0.59 \pm 0.11 ^a	1.28 \pm 0.05 ^a	0.28 \pm 0.01 ^a	0.82 \pm 0.11
CoCl ₂ +低浓度 PFD 组	0.32 \pm 0.05 ^c	0.64 \pm 0.04 ^c	0.49 \pm 0.08 ^c	0.88 \pm 0.06 ^c	0.23 \pm 0.03 ^c	0.75 \pm 0.08
CoCl ₂ +低浓度 PFD 组	0.33 \pm 0.02 ^c	0.65 \pm 0.07 ^c	0.50 \pm 0.05 ^c	0.89 \pm 0.07 ^c	0.25 \pm 0.05 ^c	0.76 \pm 0.03
<i>F</i>	29	13.35	7.598	10.87	18.48	0.808
<i>P</i>	<0.001	<0.01	<0.05	<0.01	<0.001	>0.05

注: ^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs CoCl₂模型组。

组别	TGF- β 1	SNAI1
正常对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
CoCl ₂ 模型组	1.48 \pm 0.06 ^b	1.57 \pm 0.10 ^a
CoCl ₂ +低浓度 PFD 组	1.19 \pm 0.10 ^d	1.27 \pm 0.05 ^c
CoCl ₂ +高浓度 PFD 组	1.13 \pm 0.13 ^c	1.28 \pm 0.06 ^c
<i>F</i>	16.63	41.44
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs CoCl₂模型组。

$P < 0.001$)。与正常对照组相比,CoCl₂模型组细胞 CD31 红色荧光强度显著变弱($t = 18.02, P < 0.01$), α -SMA 绿色荧光强度增加($t = 24.26, P < 0.01$);与 CoCl₂模型组比较,低浓度和高浓度 PFD 组细胞 α -SMA 绿色荧光强度均被抑制($t = 7.403, 4.935$, 均 $P < 0.05$),CD31 红色荧光强度增加($t = 10.09, 4.394$, 均 $P < 0.05$);低浓度和高浓度 PFD 组相比, α -SMA 和 CD31 荧光强度无明显差异($t = 1.021, 1.152$, 均 $P > 0.05$),见图 6。

3 讨论

眼底新生血管性疾病对视力产生影响的原因主要有

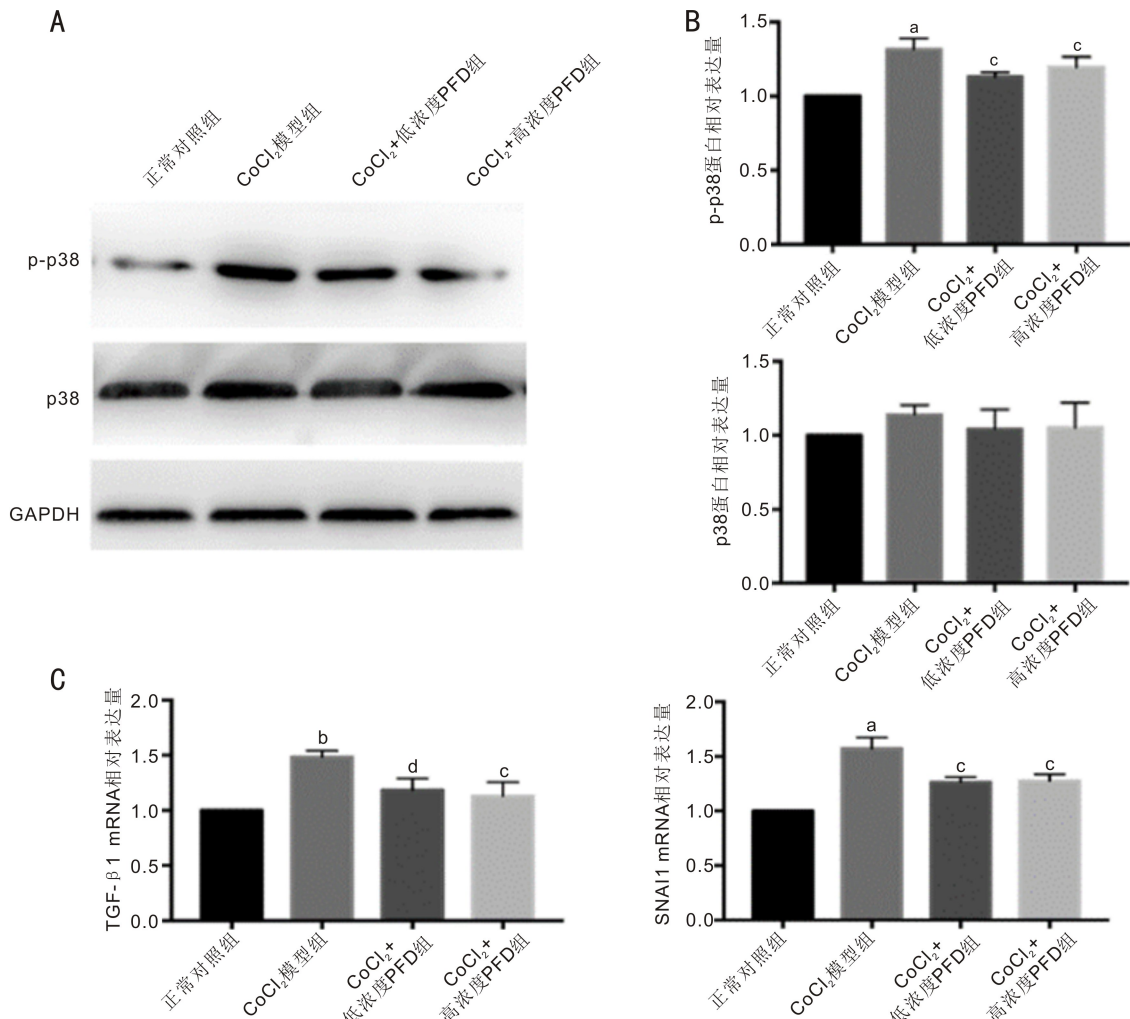


图5 PFD对缺氧条件下内皮细胞 EndoMT 过程中转录因子及通路因子表达的影响 A: 通路标志因子 (p38、p-p38) 的蛋白表达检测条带; B: p38、p-p38 蛋白表达的定量分析; C: 通路标志因子 TGF-β1 和转录因子 SNAI1 mRNA 表达的定量分析。^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs CoCl₂ 模型组。

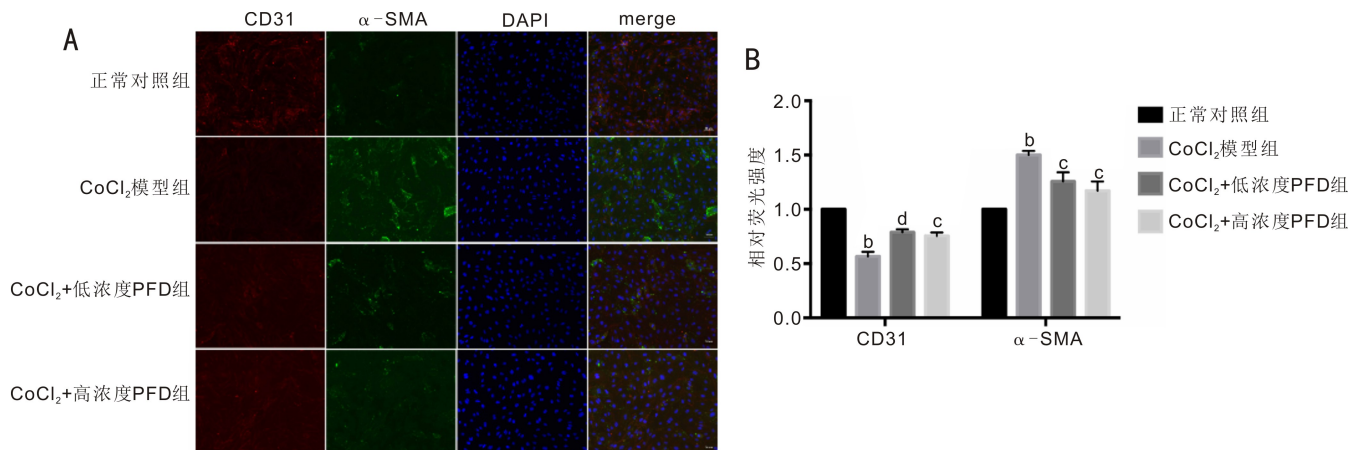


图6 PFD对缺氧条件下内皮细胞中 CD31 和 α-SMA 表达的影响 A: 各组细胞 CD31 和 α-SMA 的免疫荧光双染结果 (×200, CD31 为红色荧光, α-SMA 为绿色荧光); B: CD31 和 α-SMA 的免疫荧光强度定量分析。^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs CoCl₂ 模型组。

活动性新生血管的出血渗出和新生血管萎缩后形成的纤维化组织。目前抗 VEGF 治疗主要针对的是减少新生血管的生成及出血渗出,而对血管萎缩后的纤维化改变关注较少。Pedrosa 等^[8]对接受抗 VEGF 连续治疗的 ARMD 患者展开 60mo 的随访观察,发现有 55.69% 的随访者出现了较严重的黄斑部视网膜下纤维化。虽然纤维化是新生血管的必然结局,但是多次抗 VEGF 治疗会破坏血管新生

和纤维化之间的平衡,和自然病程共同引起过度的纤维增殖^[9]。多项研究证实,在各种因素刺激下,内皮细胞可通过 TGF-β、Notch、Wnt 等信号通路在心脏、肺和肾组织中发生 EndoMT^[10]。目前视网膜下纤维化的研究多集中于视网膜色素上皮细胞的上皮间质转化 (EMT),而脉络膜微血管内皮细胞的内皮间质转化 (EndoMT) 则关注较少。

缺氧是导致 ARMD 疾病发展的一个重要因素,缺氧

会促进新生血管的发生,而血管的生长则使缺血进一步加重,使脉络膜微血管内皮细胞进入 EndoMT 过程,引起视网膜下纤维瘢痕形成,所以寻找抑制视网膜下纤维化的方法显得尤为重要。由于人脉络膜微血管内皮细胞很难获得,HUVECs 是从人脐带静脉血管中分离培养的原代细胞,是研究新生血管及其后期进展的重要体外细胞模型,在视网膜及脉络膜新生血管的研究中也广泛应用^[11],故本研究使用 HUVECs 作为细胞模型。首先,本研究利用 CoCl₂ 诱导内皮细胞缺氧,建立纤维化模型。实验中观察到内皮细胞在缺氧环境中迁移能力增强,形态由铺路鹅卵石样逐渐变为狭长梭形,细胞之间的紧密连接变松散,间隙增大,内皮细胞标志物 CD31 和 VE-cadherin 表达减少,间质细胞标志物 α -SMA 和 FSP1 表达增多,说明该缺氧模型可以成功诱导 EndoMT 的发生。

既往研究证实 PFD 在肾、肺和肝脏等器官中可以减少促纤维和促炎症因子的分泌和表达,如 TGF- β 、TNF- α ,从而抑制细胞的间质转化和胶原蛋白产生^[12]。眼部的新生血管形成和纤维化均与 TGF- β 有关^[13]。Martin 等^[14]学者发现患者接受抗 VEGF 药物治疗后,玻璃体腔中 TGF- β 含量增加,与后期纤维化显著相关。本研究通过 CCK-8 法检测了不同浓度 PFD 对内皮细胞增殖的影响,结果显示 PFD 可明显抑制缺氧细胞的增殖,其浓度为 0.3、0.6 和 0.9mg/mL 时均有效果,且组间无明显差异,考虑到 0.9mg/mL 浓度较高,可能会引起药物副作用,故后续实验药物浓度选择 0.3、0.6mg/mL。实验中各浓度 PFD 对正常内皮细胞的增殖无明显影响,主要是因为正常视网膜脉络膜组织中,TGF- β 处于无活性的“潜活状态”,当视网膜脉络膜组织受到缺血、缺氧、炎症等损伤时,可以激活 TGF- β ^[15],使其可以发挥促进纤维细胞增殖、减少细胞外基质降解等纤维化改变,此时 PFD 可以有效抑制这些生物学效应。

本研究对缺氧诱导的内皮细胞给予 PFD 治疗后,光镜下观察治疗组的细胞形态比单纯缺氧组的形态更圆润,细胞间隙较小,细胞边缘突起减少,比较接近正常内皮细胞的形态。通过划痕实验可以观察到 PFD 组的细胞迁移能力较单纯缺氧组弱。与单纯缺氧组相比,PFD 组的内皮细胞标志物 CD31 和 VE-cadherin 的蛋白质表达增多,间质细胞标志物 α -SMA 和 FSP1 的蛋白质表达减少。上述改变在高低浓度 PFD 组间没有显著差异。由此证实了 PFD 可抑制内皮细胞向纤维细胞转化的 EndoMT 过程,且该抑制作用对 PFD 浓度的差异不敏感,可以说明 0.3~0.6mg/mL 均为细胞治疗窗,PFD 的有效浓度范围较大,该有效浓度与 Guo 等^[7]报道的用于抑制 Tenon 囊成纤维细胞增殖迁移时的浓度相同。

近年来,TGF- β /Smad 通路被认为是促进纤维化的经典信号通路。除此之外,多种 Smad 非依赖性信号通路可以被 TGF- β 激活^[16]。Choi 等^[17]验证了 PFD 通过 TGF- β /Smad 通路抑制纤维化的发生。有研究已经证明 TGF- β 能够通过 p38 MAPK 信号通路促进眼部各组织多种细胞的新生血管生长和瘢痕化^[18]。本研究发现缺氧的内皮细胞中 TGF- β 1 和转录因子 SNAIL mRNA 转录水平显著增高,p-p38 磷酸化蛋白被激活,而加入 PFD 干预后可以抑制这些因子的转录增加以及 p-p38 磷酸化蛋白的激活,初步提示 PFD 抑制 EndoMT 过程是通过 TGF- β /p38 MAPK 通路进行的,这对 PFD 可以延缓视网膜下纤维化的效果

及机制提供了更充分的理论依据。

综上所述,PFD 可以有效抑制内皮细胞纤维化的进展,TGF- β /p38 MAPK 通路可能是 PFD 调控内皮细胞向纤维细胞转化 EndoMT 过程的机制之一,这可以成为 PFD 抗视网膜下纤维化的理论基础,但该作用在眼内的实际效果,则需要更进一步的动物实验论证。

参考文献

- 1 Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. *Asia Pac J Ophthalmol* 2017; 6 (6): 493-497
- 2 Channa R, Sophie R, Bagheri S, et al. Regression of choroidal neovascularization results in macular atrophy in anti-vascular endothelial growth factor-treated eyes. *Am J Ophthalmol* 2015; 159(1): 9-19
- 3 Sun JX, Chang TF, Li MH, et al. SNAIL, an endothelial-mesenchymal transition transcription factor, promotes the early phase of ocular neovascularization. *Angiogenesis* 2018; 21(3): 635-652
- 4 Karasek MA. Does transformation of microvascular endothelial cells into myofibroblasts play a key role in the etiology and pathology of fibrotic disease? *Med Hypotheses* 2007; 68(3): 650-655
- 5 Maring JA, van Meeteren LA, Goumans MJ, et al. Interrogating TGF- β Function and Regulation in Endothelial Cells. *Methods Mol Biol* 2016; 1344: 193-203
- 6 Kim ES, Keating GM. Pirfenidone; a review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 2015; 75(2): 219-230
- 7 Guo X, Yang Y, Liu L, et al. Pirfenidone Induces G1 Arrest in Human Tenon's Fibroblasts *In Vitro* Involving AKT and MAPK Signaling Pathways. *J Ocul Pharmacol Ther* 2017; 33(5): 366-374
- 8 Pedrosa AC, Sousa T, Pinheiro-Costa J, et al. Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration with Anti-VEGF Agents: Predictive Factors of Long-Term Visual Outcomes. *J Ophthalmol* 2017; 2017: 4263017
- 9 Hwang JC, Del Priore LV, Freund KB, et al. Development of subretinal fibrosis after anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2011; 42(1): 6-11
- 10 谢路远, 盛小伍, 邓飞艳. 内皮间质转化参与纤维化疾病的研究进展. *华中科技大学学报(医学版)* 2018; 47(4): 499-501, 512
- 11 Moleiro AF, Conceicao G, Leite-Moreira, et al. A Critical Analysis of the Available *In Vitro* and *Ex Vivo* Methods to Study Retinal Angiogenesis. *J Ophthalmol* 2017; 2017: 3034953
- 12 陈钰清, 闫永吉, 仇美华, 等. 吡非尼酮抗纤维化作用的研究进展. *临床药物治疗杂志* 2016; 14(5): 1-7
- 13 邓宝娣, 李嘉, 王庭槐. 脉络膜新生血管相关信号通路研究进展. *国际眼科杂志* 2019; 19(5): 762-765
- 14 Martin DF, Maguire MG, Fine SL, et al. Ranibizumab and Bevacizumab for Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration: Two-Year Results. *Ophthalmology* 2020; 127(4S): S135-S145
- 15 赵世红, 何守志. 氮激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究. *中华眼科杂志* 2003; 39(5): 298-302
- 16 Lee IC, Ko JW, Park SH, et al. Copper nanoparticles induce early fibrotic changes in the liver via TGF- β /Smad signaling and cause immunosuppressive effects in rats. *Nanotoxicology* 2018; 12(6): 637-651
- 17 Choi K, Lee K, Ryu SW, et al. Pirfenidone inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Mol Vis* 2012; 18: 1010-1020
- 18 Terai K, Call MK, Liu H, et al. Crosstalk between TGF- β and MAPK signaling during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(11): 8208-8215