

· 实验研究 ·

Src 激酶抑制剂 CGP77675 对 TGF- β 1 诱导的视网膜色素上皮细胞上皮-间质转化的抑制作用

何建锋 吕立夏 罗俊杰 李宗义 沈俊慧 徐国彤 高芙蓉

200092 上海, 同济大学眼科研究所临床视觉科学实验室(何建锋、罗俊杰、李宗义); 200092 上海, 同济大学医学院再生医学系(吕立夏、徐国彤、高芙蓉); 200092 上海, 同济大学附属第十人民医院眼科(沈俊慧)

通信作者: 高芙蓉, Email: frgao@tongji.edu.cn

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2018.01.002

【摘要】 目的 探讨 Src 激酶抑制剂 CGP77675 (CGP) 对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导的人视网膜色素上皮 (RPE) 细胞上皮-间质转化 (EMT) 过程的作用及其机制。 **方法** 将培养的人 RPE 细胞株 (ARPE19) 分为对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组, 并根据分组用相应药物处理细胞。细胞体外培养后 3 d 于光学显微镜下观察各组细胞的形态变化; 分别采用实时荧光定量 PCR 法、Western blot 法和免疫荧光染色法检测各组细胞中 EMT 相关基因及其蛋白的表达变化, 包括细胞中纤溶酶原激活物抑制蛋白-1 (PAI1) 和纤连蛋白-1 (FN1) 的相对表达量及上皮细胞中闭锁小带蛋白 1 (ZO1) 和细胞骨架蛋白 F-肌动蛋白 (F-actin) 的分布; 采用 MTT 法检测各组细胞的增生率; 采用划痕试验检测各组细胞的迁移能力。 **结果** 对照组 ARPE19 细胞呈上皮样形态, F-actin 和 ZO1 沿细胞膜表达; TGF- β 1 处理组细胞为纤维样, F-actin 表达的排列紊乱, 细胞膜上 ZO1 表达不连续。TGF- β 1+CGP 处理组细胞维持上皮样形态, F-actin 和 ZO1 表达清晰且完整。对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 33.14, 82.92$, 均 $P < 0.01$), 对照组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量为 0.211 ± 0.080 和 0.116 ± 0.073 , TGF- β 1+CGP 处理组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量分别为 0.368 ± 0.097 和 0.362 ± 0.048 , 均明显低于 TGF- β 1 处理组的 1.000 ± 0.001 和 1.000 ± 0.001 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。3 个组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 181.90, 48.85$, 均 $P < 0.01$), 对照组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量分别为 0.166 ± 0.055 和 0.327 ± 0.066 , TGF- β 1+CGP 处理组 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量分别为 0.143 ± 0.030 和 0.260 ± 0.077 , 均明显低于 TGF- β 1 处理组的 1.000 ± 0.001 和 1.000 ± 0.001 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。细胞处理后 3 d, TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率为 $(79.30 \pm 3.44)\%$, 与对照组的 $(99.50 \pm 1.00)\%$ 和 TGF- β 1 处理组的 $(95.10 \pm 4.20)\%$ 比较均明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 处理后 7 d, TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率为 $(54.80 \pm 7.39)\%$, 明显低于 TGF- β 1 处理组的 $(92.10 \pm 4.50)\%$ 和对照组的 $(99.10 \pm 0.50)\%$, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.004$)。细胞划痕试验显示, TGF- β 1 处理组细胞迁移能力明显增强, TGF- β 1+CGP 处理组划痕宽度无明显变化。 **结论** Src 激酶抑制剂 CGP 能够抑制由 TGF- β 1 诱导的 ARPE19 细胞 EMT, 提示 Src 信号通路与 EMT 过程有关。

【关键词】 上皮-间质转化; 视网膜色素上皮细胞; Src 激酶抑制剂; 增生性玻璃体视网膜病变**基金项目:** 国家重点基础研究发展 973 计划项目 (2013CB967501、2015CB964601); 上海市卫生局青年科研项目 (20124y043)**Inhibiting effects of Src kinase inhibitor on TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition of human RPE cells** He Jianfeng, Lyu Lixia, Luo Junjie, Li Zongyi, Shen Junhui, Xu Guotong, Gao Furong

Laboratory of Clinical Vision Science, Tongji Eye Institute, Shanghai 200092, China (He JF, Luo JJ, Li ZY); Department of Regenerative Medicine, Tongji Eye Institute Shanghai 200092, China (Lyu LX, Xu GT, Gao FR); Department of Ophthalmology of Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Shen JH)

Corresponding author: Gao Furong, Email: frgao@tongji.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the inhibiting effect of CGP77675 (CGP), a Src inhibitor, on

epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (RPE) cells induced by transformation growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). **Methods** Human RPE cell line (ARPE19 cells) was cultured *in vitro* and divided into control group, TGF- $\beta 1$ group and TGF- $\beta 1$ +CGP group. Corresponding agent was added into culture medium based on grouping. The morphology of the cells were examined under the optical microscope 3 days after culture. The expressions of EMT-related genes and proteins in the cells were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively, including fibronectin 1 (FN1), and plasminogen activation inhibitor 1 (PAI1), and the expressions of zonula occludens protein 1 (ZO1) and cytoskeleton protein filamentous actin (F-actin) were detected by immunofluorescence staining. MTT assay was employed to evaluate the cell proliferation rate. The migration distance of the cells was measured by scratch test. **Results** The ARPE19 cells in the control group showed an epithelial-like morphology and F-actin and ZO-1 were expressed along cell membrane. In the TGF- $\beta 1$ group, the cells appeared to be fibrous-like, and the fluorescence staining of F-actin was disordered and ZO-1 was discontinuous on the cell membrane. The cells in the TGF- $\beta 1$ +CGP group remained to be an epithelial-like in shape with clear and complete expressions of F-actin and ZO-1. The relative expressions of FN1 mRNA and PAI1 mRNA in the cells were 0.211 ± 0.080 and 0.116 ± 0.073 , 1.000 ± 0.001 and 1.000 ± 0.001 , 0.368 ± 0.097 and 0.362 ± 0.048 in the control group, TGF- $\beta 1$ group and TGF- $\beta 1$ +CGP groups, showing significant differences among the groups ($F = 33.14, 82.92$; both at $P < 0.01$), with the highest expressions of FN1 mRNA and PAI1 mRNA in the TGF- $\beta 1$ group (all at $P < 0.05$). The relative expressions of FN1 and PAI1 proteins were 0.166 ± 0.055 and 0.327 ± 0.066 , 1.000 ± 0.001 and 1.000 ± 0.001 , 0.143 ± 0.030 and 0.260 ± 0.077 in the control group, TGF- $\beta 1$ group and TGF- $\beta 1$ +CGP group, with significant differences among three groups ($F = 181.90, 48.85$; both at $P < 0.01$), and the expressions FN1 and PAI1 proteins were significantly higher in the TGF- $\beta 1$ than those in the control group and TGF- $\beta 1$ +CGP group (all at $P < 0.05$). The cell proliferative rate in the TGF- $\beta 1$ +CGP group was $(79.30 \pm 3.44) \%$ and $(54.80 \pm 7.39) \%$ at the third day and seventh day after culture, which were significantly reduced in comparison with $(99.50 \pm 1.00) \%$ and $(99.10 \pm 0.50) \%$ in the control group as well as $(95.10 \pm 4.20) \%$ and $(92.10 \pm 4.50) \%$ in the TGF- $\beta 1$ group (all at $P < 0.05$). The migration distance was disappeared in the TGF- $\beta 1$ group, and the scratch width was not obviously changed in the TGF- $\beta 1$ +CGP group. **Conclusions** Src inhibitor can inhibit EMT process of ARPE19 cells induced by TGF- $\beta 1$, indicating that Src signaling pathway may play a critical role in EMT of RPE cells.

[Key words] Epithelial-mesenchymal transition; Retinal pigment epithelial cells; Src kinase inhibitor; Vitreoretinopathy, proliferative

Fund program: National Key Basic Research Program of China (2013CB967501, 2015CB964601); Shanghai Health Bureau Scientific Research Grant (20124y043)

视网膜色素上皮 (retina pigment epithelium, RPE) 细胞是位于神经视网膜和脉络膜之间的单层细胞, 对于神经视网膜, 特别是光感受器细胞的存活及其功能的维持具有重要作用^[1]。生理条件下 RPE 细胞不发生分裂增生, 但当神经视网膜受到损伤时, RPE 细胞重新进入细胞分裂周期并发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 这也是增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreous retinopathy, PVR) 的病理特征之一^[2-3]。研究证实 EMT 过程中有极性的上皮细胞与其周围细胞分离并从基底膜脱落, 失去其上皮特性而呈现间质细胞形态, 同时获得增生、迁移和产生大量细胞外基质成分的能力^[4], PVR 病程中 RPE 细胞也发生类似改变而迁移到视网膜前膜和后膜, 引起视网膜脱离^[5-7], 因此抑制 RPE 细胞的增生和 EMT 的发生是治疗 PVR 的重要环节。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 在多种纤维化疾病中发挥重要作用, 在 PVR 的发生中, TGF- $\beta 1$

是一个关键的诱导信号分子, 可诱导 RPE 细胞转分化为纤维样细胞^[8-10], 可能与非经典的氧化还原依赖的 Src 蛋白的激活有关^[11]。Src 是细胞质中的一种非受体酪氨酸蛋白激酶, 在许多肿瘤中被异常激活, 在肿瘤转移和 EMT 过程中发挥重要作用^[12-13], PVR 以及 RPE 细胞的 EMT 过程与肿瘤细胞相似, 但 Src 在 PVR 以及 RPE 细胞的 EMT 过程中是否发挥相应作用尚不清楚。本研究探讨 Src 信号通路是否参与 TGF- $\beta 1$ 诱导的 RPE 细胞 EMT 过程及其可能的机制, 为 PVR 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人 RPE 细胞系 (ARPE19) 购自美国 ATCC 细胞库; 胎牛血清、DMEM/F12、青链霉素、胰蛋白酶消化液 (美国 Gibco 公司); TGF- $\beta 1$ (美国 Humanzyme 公司); MTT、丝裂霉素 C、CGP77675 (CGP) (美国 Sigma 公

司);蛋白酶抑制剂(美国 Selleck 公司);Real-time PCR Super Real PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒(北京天根生物科技有限公司);兔抗人闭锁小带蛋白 1(zonula occludens protein 1, ZO1)一抗(21773-1-AP, 1:1 000)、兔抗人纤溶酶原激活物抑制物 1(plasminogen activation inhibitor 1, PAI1)一抗(13801-1-AP, 1:1 000)、兔抗人纤连蛋白 1(fibronectin 1, FN1)一抗(15613-1-AP, 1:1 000)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的 β -actin 抗体(HRP-60008, 1:5 000)、山羊抗兔二抗(SA00001-2, 1:5 000)(美国 Proteintech 公司);FITC 标记的鬼笔环肽(phalloidin, Pha)(ab176753, 1:5 000)(美国 Abcam 公司);驴抗兔 Alexa fluor 488 二抗(A-21206, 1:5 000)、驴抗鼠 Alexa fluor 555 二抗(A-21202, 1:5 000)(美国 Life Technology 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 ARPE19 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清和质量分数 1% 青链霉素的 DMEM/F12 基础培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板,第 2 天更换为含 1% 胎牛血清的培养液。继续培养 24 h 后将培养细胞分为对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组,对照组细胞培养液中添加 1 μ l 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),TGF- β 1 处理组添加 1 μ l DMSO 和 1 μ l TGF- β 1(终质量浓度 10 μ g/ml),TGF- β 1+CGP 处理组先加入 1 μ l CGP 和 1 μ l DMSO(终质量浓度 5 μ g/ml)处理 1 h,然后添加 1 μ l TGF- β 1。各组于培养后 48 h 后更换培养液并按照分组重新添加相应试剂继续培养 48 h,光学显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 采用免疫荧光技术检测各组细胞中 ZO1 和 F-actin 的表达和定位 培养的各组细胞爬片经质量分数 4% 多聚甲醛固定,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,加入质量分数 0.1% Triton-x 100 通透细胞 5 min,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min。用质量分数 5% 牛血清蛋白(bull serum albumin, BSA)室温封闭 1 h,加入 ZO1 一抗,4 °C 孵育过夜,然后用 PBS 漂洗细胞爬片 3 次,每次 5 min,加入相应荧光二抗,室温下孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入 DAPI,室温下孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。用 FITC 偶联的鬼笔环肽对 F-actin 进行免疫荧光染色,BSA 室温封闭 1 h,加入鬼笔环肽,室温孵育 1 h。PBS 漂洗细胞爬片 3 次,每次 5 min。加入 DAPI 孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。封片后均在激光扫描共焦显微镜下观察。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中

PAI1 mRNA 和 FN1 mRNA 的表达 Trizol 法提取总 RNA,取 1 μ g RNA 于 20 μ l 体系中逆转录成 cDNA,将 cDNA 1:10 稀释,将 10 mmol/L 的引物 1:12 稀释,反应总体系为 20 μ l。根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书依次加入 10 μ l SuperReal PreMix,4 μ l cDNA 模板和 6 μ l 引物进行扩增。PCR 反应条件:95 °C 预变性 15 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环,反应数据通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行定量分析。实验重复 3 次,每组设 2 个复孔,人 GAPDH 作为内参照。本研究使用的引物均由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
<i>GAPDH</i>	F:ACATCGCTCAGACACCATG R:TGTACTTGAGGTCAATGAAGGG	200
<i>PAI1</i>	F:GCCCTTGAGTGTCTTGTAGA R:TGGCTGGACTTCCTGAGATA	200
<i>FN1</i>	F:GAGCTGCACATGTCTTGGGAAC R:GGAGCAAATGGCACCCAGATA	200

注:GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;PAI:纤溶酶原激活物抑制物;FN:纤连蛋白

1.2.4 Western blot 定量检测各组细胞中 PAI1 和 FN1 蛋白的表达 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,用 BCA 法进行蛋白质量浓度的测定。加入 5 倍上样缓冲液,100 °C 煮沸 10 min;取 20 μ g 蛋白,用质量分数 5% SDS-PAGE 浓缩胶和质量分数 10% 的分离胶电泳分离,转印至尼龙膜上,用质量分数 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入相应一抗,4 °C 孵育过夜;用含质量分数 0.1% Tween-20 的 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的相应二抗,室温孵育 1.5 h,0.1% TBST 漂洗 3 次,每次 10 min;加入 ECL 发光液检测蛋白条带。实验重复 3 次。采用 Image J 软件中的灰度测量模块采集 PAI1 和 FN1 蛋白条带的灰度值。目的蛋白相对表量=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 灰度值 \times 100%。

1.2.5 MTT 法检测各组细胞活性 将 ARPE19 细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板中孵育 24 h,更换为含 1% 胎牛血清的培养基继续培养细胞 24 h,按照 1.2.1 的分组方法处理各组细胞,每组设 4 个平行孔。分别于细胞培养后 1、3 和 7 d 弃去培养液,各孔加入 100 μ l 含质量分数 10% MTT(5 mg/ml)的培养液,置 37 °C 培养箱中孵育 4 h,再加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪测定波长为 490 nm 处各孔吸光度(A)值。细胞增生率=各组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.6 划痕试验法检测各组细胞的迁移能力 将培养细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板孵育 24 h, 更换为含 1% 胎牛血清的培养液继续培养 24 h, 按照 1.2.1 的分组方法处理各组细胞, 在培养液中加入丝裂霉素 C ($10 \mu\text{g/ml}$) 处理 3 h。用枪头在培养皿中央划十字, PBS 洗 3 次以去除漂浮细胞, 加入含 1% 胎牛血清的培养液进行培养。分别于划痕后 0、24 和 48 h 在光学显微镜下观察并记录各组细胞迁移距离。

1.3 统计学方法

采用 SigmaPlot 10.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对照组、TGF- $\beta 1$ 处理组和 TGF- $\beta 1$ +CGP 处理组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 及其蛋白相对表达量的差异比较采用单因素方差分析; 不同时间点 3 个组间细胞增生率的差异比较采用两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组培养细胞的形态及 ZO1 和 F-actin 分布

光学显微镜下对照组 ARPE19 细胞呈椭圆形, 接近上皮样细胞形态, 排列致密, 大小均匀; TGF- $\beta 1$ 处理组细胞呈梭形, 为纤维样细胞形态; TGF- $\beta 1$ +CGP 组细胞接近上皮样形态 (图 1)。荧光显微镜下对照组 ARPE19 细胞中 F-actin 和 ZO1 沿细胞膜分布, 分别呈绿色和红色荧光; TGF- $\beta 1$ 处理组细胞中 F-actin 染色显示分布紊乱, 细胞膜上的 ZO1 荧光染色不连续; TGF- $\beta 1$ +CGP 组细胞中

F-actin 和 ZO1 分布清晰且规则, 可见少数细胞发生融合, 为双核, 细胞数明显少于对照组 (图 2)。

2.2 各组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量的比较

对照组、TGF- $\beta 1$ 处理组和 TGF- $\beta 1$ +CGP 处理组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 33.14, 82.92$, 均 $P <$

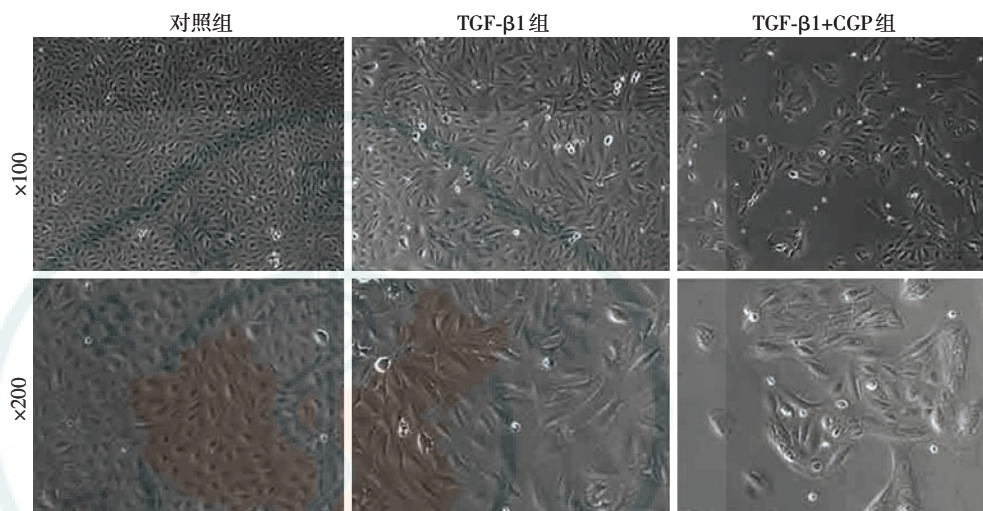


图 1 细胞培养后 3 d 光学显微镜下 ARPE19 形态 对照组培养的细胞呈椭圆形, 细胞排列致密; TGF- $\beta 1$ 处理组细胞呈长梭形, 排列规则; TGF- $\beta 1$ +CGP 处理组细胞呈长梭形, 细胞数量明显减少 TGF: 转化生长因子; CGP: Src 激酶抑制剂 CGP77675

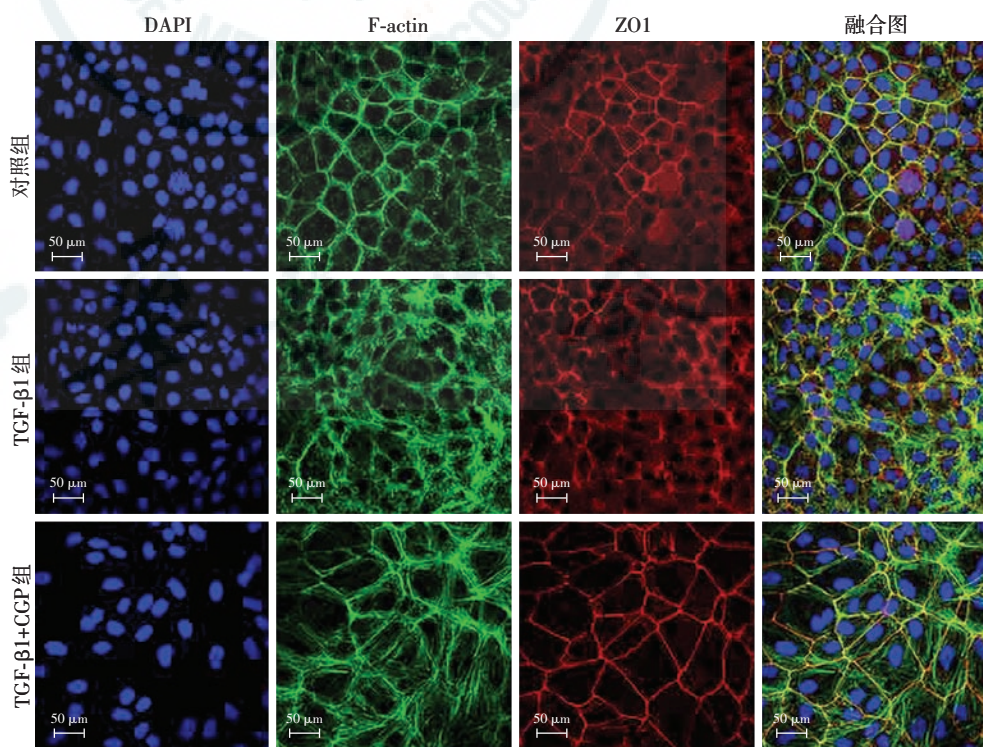


图 2 各组 ARPE19 细胞中 ZO1 和 F-actin 的定位和表达 (标尺 = $50 \mu\text{m}$) 培养 3 d 的细胞中可见 F-actin 沿细胞膜表达, 呈绿色荧光 (FITC-phalloidin), ZO1 表达呈红色荧光 (Alaxa fluor 555), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI); 对照组 F-actin 和 ZO1 染色显示排列规则, TGF- $\beta 1$ 处理组 F-actin 和 ZO1 染色排列紊乱; TGF- $\beta 1$ +CGP 处理组 F-actin 和 ZO1 染色排列较 TGF- $\beta 1$ 处理组规则 F-actin: F-肌动蛋白; ZO: 闭锁小带蛋白; TGF: 转化生长因子; CGP: Src 激酶抑制剂 CGP77675

0.01), 对照组细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量分别为 0.211 ± 0.080 和 0.116 ± 0.073 , TGF- β 1 + CGP 处理组分别为 0.368 ± 0.097 和 0.362 ± 0.048 , 均明显低于 TGF- β 1 处理组的 1.000 ± 0.001 和 1.000 ± 0.001 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。TGF- β 1 处理组 ARPE19 细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 蛋白表达条带明显强于对照组和 TGF- β 1+CGP 处理组, 对照组与 TGF- β 1+CGP 处理组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白表达强度接近 (图 4A)。对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 181.90, 48.85$, 均 $P < 0.01$), 对照组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量分别为 0.166 ± 0.055 和 0.327 ± 0.066 , TGF- β 1+CGP 处理组 FN1 和 PAI1 蛋白相对表达量分别为 0.143 ± 0.030 和 0.260 ± 0.077 , 均明显低于 TGF- β 1 处理组的 1.000 ± 0.001 和 1.000 ± 0.001 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4B)。

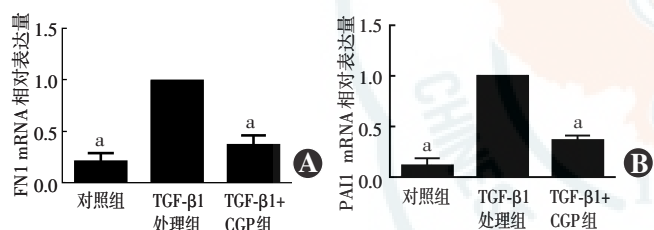


图 3 各组 ARPE19 细胞中 FN1 mRNA 和 PAI1 mRNA 相对表达量比较 A: 各组细胞中 FN1 mRNA 相对表达量比较 $F = 33.140, P = 0.001$. 与 TGF- β 1 处理组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) B: 各组细胞中 PAI1 mRNA 相对表达量比较 $F = 82.920, P = 0.000$. 与 TGF- β 1 处理组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) FN: 纤连蛋白; TGF: 转化生长因子; CGP: Src 激酶抑制剂 CGP77675; PAI: 纤溶酶原激活物抑制剂

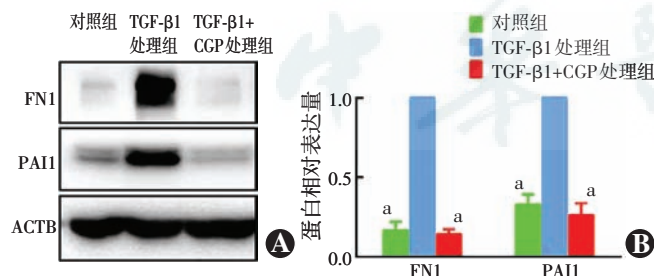


图 4 Western blot 法检测各组 ARPE19 细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白的表达 A: 各组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白表达电泳图 可见对照组和 TGF- β 1+CGP 处理组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白表达条带明显弱于 TGF- β 1 处理组 B: 各组细胞中 FN1 和 PAI1 蛋白表达的量化比较 FN1: $F = 181.90, P < 0.01$; PAI1: $F = 48.850, P < 0.01$. 与 TGF- β 1 处理组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) FN: 纤连蛋白; PAI: 纤溶酶原激活物抑制剂; TGF: 转化生长因子; CGP: Src 激酶抑制剂 CGP77675

2.3 不同时间点各组细胞增生能力和迁移能力的比较

MTT 法检测细胞增生的实验结果表明, 对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组在处理不同时间点细胞增生率总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 7.560, P = 0.004; F_{\text{时间}} = 21.460, P < 0.001$), 细胞处理后 3 d, 对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率分别为 $(99.50 \pm 1.00)\%$ 、 $(95.10 \pm 4.20)\%$ 和 $(79.30 \pm 3.44)\%$, TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率与 TGF- β 1 处理组比较下降约 20%, 差异有统计学意义 ($P = 0.004$); 细胞处理后 7 d, 对照组、TGF- β 1 处理组和 TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率分别为 $(99.10 \pm 0.50)\%$ 、 $(92.10 \pm 4.50)\%$ 和 $(54.80 \pm 7.39)\%$, TGF- β 1+CGP 处理组细胞增生率与 TGF- β 1 处理组比较下降约 40%, 差异有统计学意义 ($P = 0.004$)。细胞划痕试验结果显示, TGF- β 1 处理组细胞迁移能力明显增强, 划痕后 48 h 细胞即覆盖整个划痕区, 呈汇合生长; TGF- β 1+CGP 处理组划痕宽度无明显变化 (图 5), 显示细胞的迁移受到明显抑制。

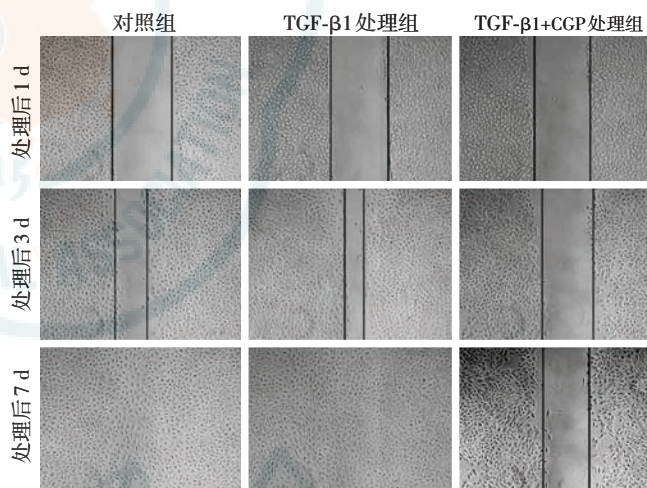


图 5 各组 ARPE19 细胞的迁移能力比较 对照组和 TGF- β 1 处理组细胞随着处理时间延长细胞逐渐向划痕区迁移, 至处理后 7 d 细胞全部覆盖划痕区, TGF- β 1+CGP 处理组细胞划痕区面积随着时间延长无明显改变 TGF: 转化生长因子; CGP: Src 激酶抑制剂 CGP77675

3 讨论

PVR 是视网膜脱离后纤维组织形成造成的病理改变^[6], 纤维增生膜的主要细胞成分有 RPE 细胞、胶质细胞、纤维细胞等。尽管有 Müller 胶质细胞等参与视网膜纤维增生膜的形成, 但目前认为 RPE 细胞在纤维增生膜的形成中仍发挥重要作用^[2]。在 PVR 形成过程中, RPE 细胞受多种炎性细胞因子和趋化因子 (如 TGF- β 1 等) 的刺激而获得增生和迁移能力, 发生 EMT, 进而参与视网膜纤维组织的形成^[7], 然而, 有关这一过程的具体机制尚不完全清楚。细胞在发生

EMT 时紧密连接被破坏,细胞形态由上皮样转变为纤维样^[4]。为研究 CGP 对 RPE 细胞 EMT 的作用,本研究首先检测了 CGP 处理对 TGF- β 1 诱导的 ARPE19 细胞形态变化的影响,进而检测其对上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO1 表达和细胞骨架蛋白 F-actin 排列的作用。Pha 与 F-actin 有很强的亲和作用,但与球状肌动蛋白单体不结合,故常用于 F-actin 表达的检测。EMT 过程的另一个重要特征是间质化后的细胞会分泌大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),进而促进细胞迁移和浸润^[14-15],其中 FN1 是 ECM 组成成分^[16-18],PAII 则是由成纤维细胞所分泌,两者在多种迁移性肿瘤组织中均高表达^[19-20],常作为细胞发生 EMT 的标志物。本研究用 TGF- β 1 诱导 ARPE19 细胞以建立 EMT 细胞模型,发现抑制 Src 信号通路能有效抑制 EMT 的标志物 PAII 和胞外基质 FN1 的表达,同时能维持 ZO1 在细胞膜上的定位和 F-actin 在细胞中的有序排列。由于发生 EMT 的细胞增生和迁移能力增强,本研究进一步检测了 CGP 对 TGF- β 1 诱导的 ARPE19 细胞增生和迁移的影响,发现抑制 Src 后细胞的增生和迁移能力减弱,说明抑制 Src 通路能阻止 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程,Src 信号通路是 TGF- β 1 诱导 RPE 细胞发生 EMT 的重要调控通路。有研究表明,RPE 细胞发生 EMT 时收缩能力增加^[21],而这种收缩力依赖于 FAK-Src 信号通路的激活^[22],认为 Src 通路参与 RPE 细胞 EMT,即 TGF- β 1 等因子是 RPE 细胞发生 EMT 乃至促进 PVR 发生和发展的重要因子,而 Src 是调控该过程的信号通路,可能是干预 PVR 进程药物的潜在靶点。

目前,关于 Src 的研究主要与肿瘤相关。Src 在多种肿瘤组织中,特别是转移癌组织中呈高表达,并具有很高的生物活性^[23-24],Src 促进肿瘤转移的作用可能是多方面的,如在胰腺癌细胞中,激活的 Src 可通过下调细胞黏附分子 E-cadherin 的表达,促进癌细胞从原位肿瘤组织中游离^[25],Src 也能通过其下游效应分子,如 p130 和富伪足的非典型性激酶 1 SGK269 等的作用促进细胞迁移^[26-27]。此外,Src 还可能通过激活 STAT3、增加血管内皮生长因子和白细胞介素-8 的表达而促进新生血管形成,间接促进肿瘤细胞的转移^[28],但关于 Src 是通过何种机制参与促进 RPE 细胞 EMT 的过程尚不完全清楚,曾有研究报道其通过 E-cadherin 发挥作用,但对其在 RPE 细胞中的表达变化还有争议,认为或许仅有部分 RPE 细胞表达 E-cadherin^[29],如研究发现猪 RPE 细胞中有 P-cadherin 和 N-cadherin 表达而没有 E-cadherin 表达^[30],无论哪

种钙黏附分子在 RPE 细胞中如何表达,我们的结果证实 CGP 确实有助于加强 ZO1 在细胞膜上的定位及细胞骨架的有序排列,提示 Src 的激活可下调细胞黏附分子表达,破坏上皮细胞之间的连接,从而导致 RPE 细胞的增生,发生 EMT^[30-31],而 PVR 患者脱离的视网膜组织中 Src 处于激活状态可导致 RPE 细胞的黏附分子减少及细胞紧密连接的破坏,导致 RPE 细胞发生 EMT,参与增生性纤维膜的形成。

在肿瘤发生过程中,TGF- β 和 Src 激酶都能调节细胞增生、EMT、细胞迁移和肿瘤转移,提示 TGF- β 与 Src 激酶之间存在相互作用。TGF- β 1 可通过非经典氧化还原依赖的机制激活 Src 蛋白^[11],研究表明在胰腺导管腺癌细胞中 Src 可被 TGF- β 所激活,并参与 TGF- β 调控的细胞迁移^[32]。然而,有关 Src 在 TGF- β 诱导的 EMT 过程中的作用尚有争议。Maeda 等^[33]研究发现,乳腺癌细胞中 Src 并不参与 TGF- β 诱导的 EMT,而 Galliher 等^[34]则报道 Src 通过整合素促进 TGF- β 介导的 EMT。有关 Src 与 TGF- β 的相互作用及其参与 RPE 细胞 EMT 过程的分子机制值得进一步研究。

综上所述,本研究表明抑制 Src 信号通路能抑制 TGF- β 1 诱导的 RPE 细胞的 EMT 过程,其主要机制为维持细胞间紧密连接、减少 ECM 成分的分泌以及抑制细胞增生和迁移能力,这些结果提示 Src 信号通路可作为临床 PVR 的治疗靶点。我们将进一步通过体内 PVR 模型验证 CGP 对病理条件下 PVR 的抑制作用。

参考文献

- [1] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 845-881. DOI: 10. 1152/physrev. 00021. 2004.
- [2] Kim IK, Arroyo JG. Mechanisms in proliferative vitreoretinopathy[J]. *Ophthalmol Clin North Am*, 2002, 15(1): 81-86.
- [3] Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21(1): 127-144.
- [4] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428. DOI: 10. 1172/JCI39104.
- [5] Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(2): 391-405.
- [6] Garweg JG, Tappeiner C, Halberstadt M. Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment[J]. *Surv Ophthalmol*, 2013, 58(4): 321-329. DOI: 10. 1016/j. survophthal. 2012. 12. 004.
- [7] Kwon OW, Song JH, Roh MI. Retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy[J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 55: 154-162. DOI: 10. 1159/000438972.
- [8] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(19): 1286-1292. DOI: 10. 1056/NEJM199411103311907.
- [9] Pena RA, Jerdan JA, Glaser BM. Effects of TGF-beta and TGF-beta neutralizing antibodies on fibroblast-induced collagen gel contraction:

- implications for proliferative vitreoretinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(6): 2804-2808.
- [10] Lee SC, Kwon OW, Seong GJ, et al. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells [J]. Ophthalmic Res, 2001, 33(2): 80-86. DOI: 10.1159/000055648.
- [11] Zhang H, Davies KJ, Forman HJ. TGF β 1 rapidly activates Src through a non-canonical redox signaling mechanism [J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 568: 1-7. DOI: 10.1016/j.abb.2015.01.001.
- [12] Guarino M. Src signaling in cancer invasion [J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1): 14-26. DOI: 10.1002/jcp.22011.
- [13] Thakur R, Trivedi R, Rastogi N, et al. Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer [J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 10194 [2016-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431480/>. DOI: 10.1038/srep.10194.
- [14] Hjortland GO, Bjørnland K, Pettersen S, et al. Modulation of glioma cell invasion and motility by adenoviral gene transfer of PAI-1 [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(4): 301-309.
- [15] Soikkeli J, Podlasz P, Yin M, et al. Metastatic outgrowth encompasses COL-I, FN1, and POSTN up-regulation and assembly to fibrillar networks regulating cell adhesion, migration, and growth [J]. Am J Pathol, 2010, 177(1): 387-403. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090748.
- [16] Jin M, He S, Wörpel V, et al. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF- α [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(13): 4324-4332.
- [17] Kent D, Sheridan C. Choroidal neovascularization: a wound healing perspective [J]. Mol Vis, 2003, 9: 747-755.
- [18] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437. DOI: 10.1172/JCI36183.
- [19] Andreasen PA, Kjølner L, Christensen L, et al. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review [J]. Int J Cancer, 1997, 72(1): 1-22.
- [20] Hewitt R, Danø K. Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer [J]. Enzyme Protein, 1996, 49(1-3): 163-173.
- [21] Ma J, Zhang Q, Moe MC, et al. Regulation of cell-mediated collagen gel contraction in human retinal pigment epithelium cells by vascular endothelial growth factor compared with transforming growth factor-beta2 [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2012, 40(1): 76-86. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2011.02618.x.
- [22] Morales SA, Mareninov S, Prasad P, et al. Collagen gel contraction by ARPE-19 cells is mediated by a FAK-Src dependent pathway [J]. Exp Eye Res, 2007, 85(6): 790-798. DOI: 10.1016/j.exer.2007.08.014.
- [23] Je DW, O YM, Ji YG, et al. The inhibition of SRC family kinase suppresses pancreatic cancer cell proliferation, migration, and invasion [J]. Pancreas, 2014, 43(5): 768-776. DOI: 10.1097/MPA.000000000000103.
- [24] Zhao S, Li H, Wang Q, et al. The role of c-Src in the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells induced by association of cell surface GRP78 with activated α 2M [J/OL]. BMC Cancer, 2015, 15: 389 [2017-02-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455704/>. DOI: 10.1186/s12885-015-1401-z.
- [25] Nagathihalli NS, Merchant NB. Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 2059-2069.
- [26] Kanner SB, Reynolds AB, Wang HC, et al. The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110 [J]. EMBO J, 1991, 10(7): 1689-1698.
- [27] Kelber JA, Reno T, Kaushal S, et al. KRas induces a Src/PEAK1/Erbb2 kinase amplification loop that drives metastatic growth and therapy resistance in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2554-2564. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3552.
- [28] Byers LA, Sen B, Saigal B, et al. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22): 6852-6861. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0767.
- [29] Burke JM, Cao F, Irving PE, et al. Expression of E-cadherin by human retinal pigment epithelium: delayed expression *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(12): 2963-2970.
- [30] Tamiya S, Liu L, Kaplan HJ. Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(5): 2755-2763. DOI: 10.1167/iovs.09-4725.
- [31] Chen HC, Zhu YT, Chen SY, et al. Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition [J]. Lab Invest, 2012, 92(5): 676-687. DOI: 10.1038/labinvest.2011.201.
- [32] Ungefroren H, Sebens S, Groth S, et al. Differential roles of Src in transforming growth factor- α regulation of growth arrest, epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2011, 38(3): 797-805. DOI: 10.3892/ijo.2011.897.
- [33] Maeda M, Shintani Y, Wheelock MJ, et al. Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)- β -mediated epithelial to mesenchymal transitions (EMT) in mammary epithelial cells. PP1 directly inhibits TGF- β receptors I and II [J]. J Biol Chem, 2006, 281(1): 59-68. DOI: 10.1074/jbc.M503304200.
- [34] Galliher AJ, Schiemann WP. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells [J/OL]. Breast Cancer Res, 2006, 8(4): 42 [2016-02-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779461/>. DOI: 10.1186/bcr1524.

(收稿日期: 2016-06-12 修回日期: 2017-11-26)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

广告目次

- 拓普康 OCT(全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……封二
- 同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页
- 普诺明(肝素非球面散光矫正型人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页
- 沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页
- 立宝舒(卡波姆眼用凝胶) 博士伦(上海)贸易有限公司……前插页
- 灵光(复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页
- 施图伦(七叶洋地黄双苷滴眼液) 深圳市康哲药业有限公司……前插页
- 氟美童(抗炎类固醇水性混悬滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三
- 千寿制药株式会社……封底