

· 实验研究 ·

肝细胞生长因子对转化生长因子- β_1 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞增生及转分化的抑制作用

陈静 王泳 李东豪

510150 广州医科大学附属第三医院眼科

通信作者:李东豪,Email:ldh71@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.006

【摘要】 目的 研究肝细胞生长因子(HGF)对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞增生和转分化的影响。方法 人 Tenon 囊成纤维细胞进行常规培养后分为空白对照组、TGF- β_1 处理组及不同质量浓度 HGF+TGF- β_1 组。TGF- β_1 处理组在细胞培养液中添加 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 , 不同质量浓度 HGF+TGF- β_1 组在细胞培养液中分别添加 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 , 然后分别添加不同质量浓度的 HGF(25、50、100、200 $\mu\text{g/L}$), 采用甲基偶氮四唑(MTT)法检测波长 560 nm 处各组细胞的吸光度(A_{560}); 然后选用 100 $\mu\text{g/L}$ 的 HGF 进行干预, 采用细胞免疫荧光染色技术检测人 Tenon 囊成纤维细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达分布; 采用 Western blot 法检测细胞中 α -SMA 蛋白的相对表达量。结果 体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞呈长梭形, 边界清楚, 细胞中波形蛋白表达阳性并定位于细胞质。MTT 检测显示空白对照组、TGF- β_1 处理组及 HGF_{25 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组、HGF_{50 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组、HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组、HGF_{200 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞的增殖值分别为 0.203 \pm 0.025、0.497 \pm 0.101、0.426 \pm 0.062、0.354 \pm 0.040、0.272 \pm 0.084 和 0.241 \pm 0.011, 组间比较差异有统计学意义($F=9.210, P=0.003$), TGF- β_1 处理组细胞增殖值明显高于空白对照组, 不同质量浓度 HGF+TGF- β_1 组细胞增殖值均明显低于 TGF- β_1 处理组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示空白对照组细胞中未见 α -SMA 的表达, TGF- β_1 处理组及 HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞的胞质中均可见 α -SMA 的表达, 呈红色荧光, HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞中 α -SMA 表达荧光减弱, α -SMA 表达细胞明显减少。TGF- β_1 处理组和 HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞中 α -SMA 染色阳性细胞百分比分别为 (60.0 \pm 4.7)% 和 (14.3 \pm 3.1)%, 差异有统计学意义($t=19.856, P<0.001$)。Western blot 检测显示空白对照组、TGF- β_1 处理组和 HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量分别为 0.642 \pm 0.032、1.330 \pm 0.069 和 0.884 \pm 0.040, 总体比较差异有统计学意义($F=13.370, P<0.001$), 其中 TGF- β_1 处理组细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量明显高于空白对照组, HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 组细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量明显低于 TGF- β_1 处理组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 HGF 抑制 TGF- β_1 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞的过度增生, 下调细胞中 α -SMA 蛋白的表达, 阻止成纤维细胞的表型转化。

【关键词】 Tenon 囊/细胞学; 成纤维细胞/代谢; 肝细胞生长因子/应用及剂量; 转化生长因子 β_1 ; 纤维化/预防和控制; α -平滑肌肌动蛋白; 人; 培养细胞

Inhibition of hepatocyte growth factor on proliferation and transdifferentiation of human Tenon capsule fibroblasts triggered by transforming growth factor- β_1 *in vitro* Chen Jing, Wang Yong, Li Donghao

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510010, China

Corresponding author: Li Donghao, Email: ldh71@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hepatocyte growth factor (HGF) on proliferation and transdifferentiation of human Tenon capsule fibroblasts induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) *in vitro*.

Methods Human Tenon capsule fibroblasts were cultured and divided into blank control group, TGF- β_1 treated group and different concentrations HGF+TGF- β_1 groups. The TGF- β_1 at 10 $\mu\text{g/L}$ was added into culture medium of the TGF- β_1 treated group, and different concentrations of HGF (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$) and 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 were added into culture medium of the HGF_{25 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 , HGF_{50 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 , HGF_{100 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 , HGF_{200 $\mu\text{g/L}$} +TGF- β_1 group respectively. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was employed to measure the cell proliferation (absorbance at 560 nm). Immunofluorescence staining was used to evaluate and locate the expression of α -smooth muscle action (α -SMA) in the cells. The expression of α -SMA protein in the cells was detected by Western blot assay. **Results**

Cultured cells showed fusiform in shape with the positive response for vimentin. The proliferation value of the cells was

0.203±0.025, 0.497±0.101, 0.426±0.062, 0.354±0.040, 0.272±0.084, 0.241±0.011 in the blank control group, TGF- β_1 treated group, HGF_{25 μ g/L}+TGF- β_1 group, HGF_{50 μ g/L}+TGF- β_1 group, HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 group and HGF_{200 μ g/L}+TGF- β_1 group, respectively, showing a significant difference among the groups ($F=9.210, P=0.003$). Compared with the TGF- β_1 treated group, the proliferation values of the cells were significantly reduced in the blank control group and HGF+TGF- β_1 group (all at $P<0.05$). Immunofluorescence staining showed that α -SMA protein mainly located in cytoplasm with the strong red fluorescence in the cells of the TGF- β_1 treated group and weak red fluorescence in HGF+TGF- β_1 group, and the expression of α -SMA was absent in the blank control group. The percentage of α -SMA-positive cells was (60.0±4.7)% in the TGF- β_1 treated group and (14.3±3.1)% in the HGF+TGF- β_1 group, with significant difference between the two groups ($t=19.856, P<0.001$). The relative expression levels of the α -SMA protein in the cells were 0.642±0.032, 1.330±0.069 and 0.884±0.040 in the blank control group, TGF- β_1 group and HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 group, respectively, showing a significant difference among the groups ($F=13.370, P<0.001$), and relative expression levels of the α -SMA protein in the cells were significantly lower in the blank control group and HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 group than that in the TGF- β_1 treated group (all at $P<0.05$). **Conclusions** HGF can inhibit the proliferation of human Tenon capsule fibroblasts, down-regulate the expression of α -SMA protein induced by TGF- β_1 and arrest the phenotype transformation of fibroblasts *in vitro*.

[Key words] Tenon capsule/cytology; Fibroblasts/metabolism; Hepatocyte growth factor/administration & dosage; Transforming growth factor beta type 1; Fibrosis/prevention & control; α -Smooth muscular actin; Humans; Cells, cultured

目前青光眼滤过术仍是临床上治疗青光眼的主要手术方式,术后滤过区纤维瘢痕的形成是手术失败的主要原因,术后成纤维细胞的异常增生、肌成纤维细胞的收缩以及细胞外基质的合成增多等是引起滤过区纤维瘢痕的主要病理机制^[1]。研究表明,转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)在伤口愈合的过程中发挥重要作用,可诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增生,并介导细胞转分化为 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达阳性的肌成纤维细胞,因此其在促进伤口愈合的同时也与滤过泡纤维瘢痕化密切相关^[2]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是能阻止肝肾等组织器官纤维化的细胞生长因子之一^[3],但其对人眼 Tenon 囊成纤维细胞的影响鲜见报道。根据以往学者的研究经验,人 Tenon 囊成纤维细胞体外培养是进行青光眼术后滤过区抗纤维化研究良好的靶细胞^[4]。本研究采用体外培养人 Tenon 囊成纤维细胞,探讨 HGF 对抗青光眼滤过手术后滤过泡纤维瘢痕化过程中成纤维细胞增生及转分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 Tenon 囊成纤维细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、牛血清白蛋白(美国 Hyclon 公司);胰蛋白酶、二甲亚砜(美国 Sigma 公司);甲基偶氮四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒(南京凯基生物有限公司);

ECL 显色试剂盒(美国 Thermo 公司);人重组 HGF、人重组 TGF- β_1 (美国 Peprotech 公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 Invitrogen 公司);小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(TA801250)、鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体(ZM-0003)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(ZF-0312,北京中杉金桥生物技术有限公司);羊抗鼠 Cy3 荧光抗体(A0521)、 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(AF0003)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(A0216,中国碧云天生物技术研究);BCA 蛋白定量试剂(北京康为世纪生物科技有限公司)。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);全波长多功能酶标仪(美国 Eppendorf 公司);细胞培养箱(美国 Thermo 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 Tenon 囊成纤维细胞的培养及鉴定 将细胞接种于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中置于含体积分数 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养并及时换液,当细胞生长融合至 80% 时用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化并传代,取 3~6 代细胞用于实验。将处于对数生长期的细胞消化并计数后接种于 96 孔板,置于 37 °C 恒温培养箱中,待细胞长至 80% 融合后取出培养板,质量分数 4% 多聚甲醛溶液 37 °C 条件下固定 30 min;用牛血清白蛋白封闭细胞 1 h,加入小鼠抗波形蛋白单克隆抗体(1:100),37 °C 孵育 2 h,漂洗后加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:100),避光 37 °C 孵育 1 h,加入 DAPI 染料,室温下孵育 5 min;封片后倒置荧光显微镜下观察细胞中波形蛋白的表达情况并拍照。

1.2.2 MTT 法检测细胞增生情况 将处于对数生长期的人 Tenon 囊成纤维细胞消化并计数后接种于 96 孔板, 将细胞分为空白对照组、TGF- β_1 处理组及 HGF_{25 μ g/L}+TGF- β_1 组、HGF_{50 μ g/L}+TGF- β_1 组、HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 组和 HGF_{200 μ g/L}+TGF- β_1 组, 同时设置调零孔, 每组设 5 个复孔, 置于体积分数 5% CO₂ 37 °C 培养箱中培养 24 h, 换用含体积分数 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿培养 12 h。空白对照组继续加入 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, TGF- β_1 处理组加入 10 μ g/L TGF- β_1 , HGF+TGF- β_1 组加入 10 μ g/L 的 TGF- β_1 和质量浓度 25、50、100、200 μ g/L 的 HGF, 继续培养 48 h, 每孔加入质量分数 5% 的 MTT 溶液 20 μ l, 继续培养 4 h, 吸弃培养液, 每孔加入 150 μ l 二甲亚砜, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 采用酶标仪测定各孔于 560 nm 波长下吸光度 (A_{560}) 值。

1.2.3 细胞免疫荧光染色法检测细胞中 α -SMA 蛋白的表达 空白对照组、TGF- β_1 处理组细胞处理同 1.2.2 的步骤, HGF+TGF- β_1 组细胞用 100 μ g/L 的 HGF 进行干预, 各组细胞加药处理后 48 h 用预冷的 PBS 冲洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, PBS 冲洗后以质量分数 0.2% Triton 破膜处理 15 min, 以 1% 胎牛血清封闭 1 h, PBS 冲洗 3 次, 添加鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体 (1:100), 4 °C 冰箱中孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 滴加羊抗鼠 Cy3 荧光抗体 (1:200), 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 冲洗后再加入 DAPI 染料进行细胞核染色, 室温下避光孵育 5 min, 置于倒置荧光显微镜下观察细胞中 α -SMA 的表达并拍照。任意取 200 个细胞, 计算 α -SMA 染色阳性细胞数。阳性细胞百分比 = 阳性细胞数/200 \times 100%。

1.2.4 Western blot 法检测细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量 空白对照组、TGF- β_1 处理组同 1.2.2 描述的方法, HGF+TGF- β_1 组选用 100 μ g/L 的 HGF 进行干预, 各组细胞分组加药处理后 48 h 收集细胞, 置冰上裂解并提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量。制备质量分数 10% SDS 分离胶, 取等量的上样蛋白加入 SDS 凝胶中, 电泳跑胶, 电转印至 PVDF 膜上, 待脱脂奶粉液封闭漂洗后, 分别加入鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体或 β -actin 鼠抗人单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, 次日漂洗后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 37 °C 孵育 1 h, 洗膜, ECL 显色, 凝胶成像系统拍照, Imag J 软件测量蛋白条带灰度值, 以 β -actin 作为内参照。 α -SMA 蛋白相对表达量 = 阳性细胞 α -SMA 表达灰度值/ β -actin 灰度值 \times 100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 空白对照组、TGF- β_1 处理组、HGF_{25 μ g/L}+TGF- β_1 组、HGF_{50 μ g/L}+TGF- β_1 组、HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 组、HGF_{200 μ g/L}+TGF- β_1 组间细胞增值 (A_{560}) 及空白对照组、TGF- β_1 处理组和 HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 组间细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。TGF- β_1 处理组与 HGF_{100 μ g/L}+TGF- β_1 组间 α -SMA 阳性细胞百分比的差异比较采用独立样本 t 检验。采用双尾检测法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 Tenon 囊成纤维细胞的形态和鉴定

体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞贴壁生长, 细胞呈长梭形, 边界清楚。免疫荧光染色显示细胞中波形蛋白反应阳性并定位于细胞质 (图 1A), 呈绿色荧光, 细胞核呈圆形或椭圆形, 核膜、核仁清晰可见, 细胞核呈蓝色荧光 (图 1B)。

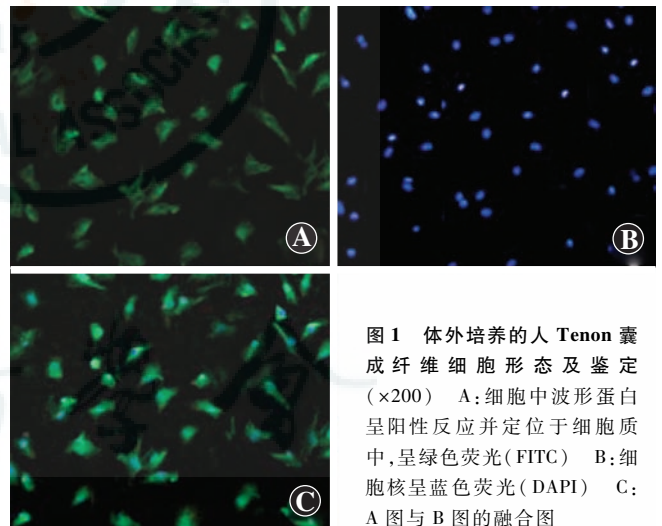


图 1 体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞形态及鉴定 ($\times 200$) A: 细胞中波形蛋白呈阳性反应并定位于细胞质中, 呈绿色荧光 (FITC) B: 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) C: A 图与 B 图的融合图

2.2 各组人 Tenon 囊成纤维细胞增生情况比较

MTT 检测结果显示, 空白对照组、TGF- β_1 处理组及不同质量浓度 HGF 处理组细胞增值明显不同, 其中以 TGF- β_1 处理组细胞增值最高, 细胞增值随着 HGF 质量浓度的增加逐渐下降, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F=9.210, P=0.003$)。与空白对照组比较, TGF- β_1 处理组细胞增值明显增加, 各质量浓度 HGF 处理组细胞增值明显低于 TGF- β_1 处理组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 1)。

表 1 各组人 Tenon 囊成纤维细胞增殖值的比较 ($\bar{x} \pm s, A_{560}$)

分组	样本量	细胞增殖值
空白对照组	6	0.203 ± 0.025
TGF-β ₁ 处理组	6	0.497 ± 0.101 ^a
HGF _{25 μg/L} + TGF-β ₁ 组	6	0.426 ± 0.062 ^b
HGF _{50 μg/L} + TGF-β ₁ 组	6	0.354 ± 0.040 ^b
HGF _{100 μg/L} + TGF-β ₁ 组	6	0.272 ± 0.084 ^b
HGF _{200 μg/L} + TGF-β ₁ 组	6	0.241 ± 0.011 ^b
F 值		9.210
P 值		0.003

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与 TGF-β₁ 处理组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF: 转化生长因子; HGF: 肝细胞生长因子

2.3 各组细胞中 α-SMA 蛋白的表达及定位情况

免疫荧光染色显示, 空白对照组仅可见蓝染的细胞核, 未见 α-SMA 荧光表达 (图 2A); TGF-β₁ 处理组可见 α-SMA 表达于细胞质中, 呈红色荧光 (图 2B); HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组细胞中 α-SMA 荧光强度减弱, 阳性细胞数减少 (图 2C)。TGF-β₁ 处理组 α-SMA 染色阳性细胞百分比分别为 (60.0 ± 4.7)%, 明显高于 HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组的 (14.3 ± 3.1)%, 差异有统计学意义 ($t = 19.856, P < 0.001$)。

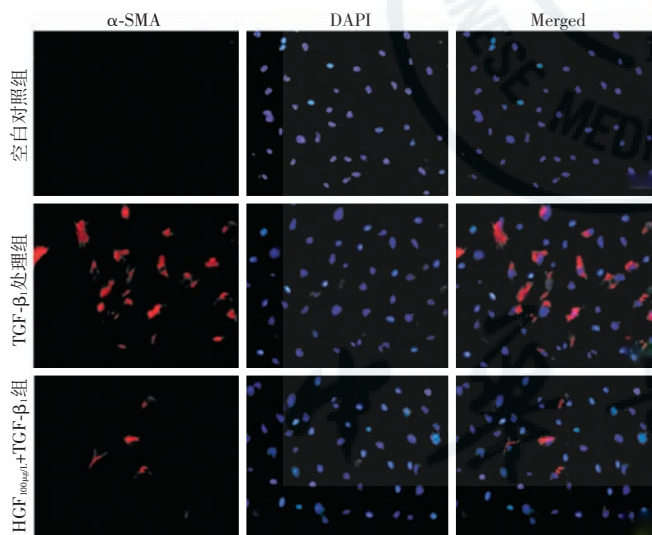


图 2 各组 α-SMA 蛋白的表达及定位 (×200) 空白对照组仅见蓝染的细胞核 (DAPI), 未见 α-SMA 阳性表达; TGF-β₁ 处理组可见 α-SMA 蛋白表达于细胞质中, 呈红色荧光 (Cy3); HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组 α-SMA 蛋白表达减弱, 阳性细胞数减少 TGF: 转化生长因子; HGF: 肝细胞生长因子; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白

2.4 各组细胞中 α-SMA 蛋白相对表达量的比较

Western blot 检测结果显示, TGF-β₁ 处理组细胞中 α-SMA 蛋白表达条带最强, 空白对照组表达条带最弱, 空白对照组细胞中 α-SMA 蛋白相对表达量为 0.642 ± 0.032, TGF-β₁ 处理组及 HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组细胞中

α-SMA 蛋白相对表达量分别为 1.330 ± 0.069 和 0.884 ± 0.040, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 13.370, P < 0.001$), 其中 TGF-β₁ 处理组和 HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组细胞中 α-SMA 蛋白相对表达量均明显高于空白对照组, HGF_{100 μg/L} + TGF-β₁ 组细胞中 α-SMA 蛋白相对表达量明显低于 TGF-β₁ 处理组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3)。

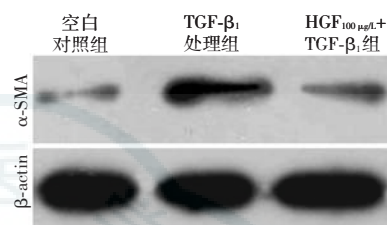


图 3 Western blot 法检测的各组成纤维细胞中 α-SMA 蛋白的表达 可见 TGF-β₁ 处理组细胞中 α-SMA 蛋白表达条带最强, 空白对照组表达条带最弱 TGF: 转化生长因子; HGF: 肝细胞生长因子; α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白

3 讨论

青光眼滤过术后的切口愈合过程与其他组织类似, 滤过通道的纤维瘢痕化过程主要涉及多种细胞因子参与的成纤维细胞增生、细胞表型的转化以及细胞外基质的合成和降解等。TGF-β 是在多个促进人 Tenon 囊成纤维细胞活性的细胞因子中起主导作用且与青光眼术后滤过通道纤维瘢痕化关系最为密切的一种细胞因子, 也是促进伤口处细胞增生、迁移转化、细胞外基质积聚和收缩的关键性调控因子, 以 TGF-β 为代表的多种细胞因子可刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 促进细胞增生, 是产生细胞外基质的主要来源^[5]。肌成纤维细胞表达 α-SMA 蛋白, 收缩力强, 对于手术伤口的正常闭合和病理性收缩发挥至关重要的作用, 其数量的多少与纤维瘢痕化的程度密切相关。肌成纤维细胞的过度增生是青光眼滤过术后滤过通道瘢痕形成的重要因素, 因此抑制 TGF-β 调节的肌成纤维细胞转化将成为抑制术后纤维瘢痕化的有效手段。

HGF 是一种具有多种生物活性的多肽细胞因子, 不仅与多种组织器官的再生修复有关, 而且可以抑制细胞外基质的合成, 加速细胞外基质的降解, 从而起到抗纤维化的作用。近年来, 多项研究证实 HGF 对心脏、肝脏、肺脏、肾脏、皮肤、腹膜、肌腱等组织器官具有很强的抗瘢痕和抗纤维化的生物活性^[6-12], 认为 HGF 主要是通过对抗 TGF-β₁ 而发挥抗纤维化作用。研究发现, HGF 可直接拮抗 TGF-β₁ 的促纤维化作用, 从而促进组织再生^[11, 13-17]。由此可见 TGF-β₁ 与 HGF 的失衡是组织器官纤维化发生、发展的重要机制, 但目前鲜见 HGF 对人 Tenon 囊成纤维细胞影响的研究。本研

究用 TGF- β_1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增生、转化为肌成纤维细胞,发现 HGF 可抑制 TGF- β_1 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞的过度增生及 α -SMA 蛋白的过度表达,与既往研究中 HGF 抑制心肌纤维化的机制一致^[13]。亦有研究发现 HGF 可以有效阻抑 TGF- β_1 诱导的肌腱成纤维细胞 α -SMA 过度表达,以达到抑制大鼠肌腱纤维化的目的^[18]。在慢性肾功能不全的大鼠模型中发现,HGF 可下调肾小球系膜细胞中 α -SMA 的表达,从而减轻肾功能的进一步恶化^[19]。近年来对组织损伤修复过程的研究表明,组织损伤后分泌多种炎症因子和趋化因子,间充质干细胞根据体内的信号向损伤部位迁移,以发挥其免疫调节、组织修复作用。体外研究发现,间充质干细胞能分泌 HGF^[20],Lan 等^[21] 研究发现间充质干细胞能够通过分泌 HGF 来抑制肺纤维化。Tang 等^[22] 研究发现间充质干细胞可以分泌 HGF、血管内皮生长因子等多种细胞因子,参与肝组织前体细胞的增生分化,从而发挥抗肝纤维化作用。故我们推测在青光眼滤过术后切口愈合过程可能与间充质干细胞通过分泌 HGF 来抑制 α -SMA 的过度表达,从而抑制 TGF- β_1 诱导的肌成纤维细胞的病理性收缩,起到对滤过通道纤维瘢痕化的作用。

目前临床上采用的抗滤过泡纤维瘢痕化的方法主要是术中局部使用抗代谢药物及术后应用糖皮质激素类药物,但其远期效果欠佳且并发症较多,如药物的结膜和角膜上皮毒性、滤过泡薄壁或囊泡状滤过泡、滤过泡渗漏、滤过泡感染、持续性低眼压、浅前房等。针对青光眼滤过手术后滤过泡的纤维瘢痕化问题,临床工作者进行了多种尝试,抗滤过泡纤维瘢痕化的药物研究也取得了一定进展^[23-25],但各类新药应用后在安全性与有效性之间难以达到平衡的作用。人体组织损伤愈合过程中,体内细胞因子保持着很微妙的平衡,内源性 TGF- β_1 表达不足或过度表达会分别导致损伤组织延迟愈合或纤维瘢痕愈合。本研究结果的突破在于发现 HGF 可作为一种保护性细胞因子,可能通过抑制 TGF- β_1 来达到抑制抗青光眼滤过手术后滤过通道的纤维瘢痕化的目的。HGF 的应用对抗青光眼术后 TGF- β_1 诱导的滤过泡纤维瘢痕化的抑制可能起着十分重要的作用,补充外源性 HGF 为干预青光眼滤过术后滤过通道的纤维瘢痕化提供新的治疗方法。但由于本实验是基于体外培养环境实施的,实验条件易于控制,与体内的生物环境相比较有一定差异,因此 HGF 在体内的生物活性有待进一步研究加以证实。此外 HGF 的最佳作用浓度、最佳作用时间及其信号通路机制等仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Liu X, Li P, Chen XY, et al. c-Ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen: implications for wound healing and scar formation [J]. Clin Exp Dermatol, 2010, 35 (4) : 417-424. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2009.03606.
- [2] Zhang XH, Sun NX, Feng ZH, et al. Interference of Y-27632 on the signal transduction of transforming growth factor beta type 1 in ocular Tenon capsule fibroblasts [J]. Int J Ophthalmol, 2012, 5 (5) : 576-581. DOI:10.3980/j.issn.2222-3959.2012.05.06.
- [3] Chen X, Chen Z, Wang H, et al. Plasmidp UDK-HGF encoding human hepatocyte growth factor gene attenuates gentamicin-induced kidney injury in rats [J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65 (5) : 541-547. DOI: 10.1016/j.etp.2012.03.003.
- [4] 李中秋, 张孝生, 卢弘. 抗青光眼术后滤过泡瘢痕化组织人 Tenon 囊成纤维细胞的生长特性 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32 (4) : 308-312. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.005. Li ZQ, Zhang XS, Lu H. *In vitro* growth characteristics of human Tenon capsule fibroblasts from patients with bleb scarring after antiglaucoma filtration surgery [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32 (4) : 308-312. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.005.
- [5] Liu Y, Kimura K, Orita T, et al. All-trans-retinoic acid inhibition of transforming growth factor- β -induced collagen gel contraction mediated by human Tenon fibroblasts: role of matrix metalloproteinases [J]. Br J Ophthalmol, 2015, 99 (4) : 561-565. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-306175.
- [6] Li M, Yi X, Ma L, et al. Hepatocyte growth factor and basic fibroblast growth factor regulate atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation and rheumatic heart disease via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2013, 6 (5) : 1121-1126. DOI: 10.3892/etm.2013.1274.
- [7] Chakraborty S, Chopra P, Hak A, et al. Hepatocyte growth factor is an attractive target for the treatment of pulmonary fibrosis [J]. Exp Opin Investig Drugs, 2013, 22 (4) : 499-515. DOI: 10.1517/13543784.2013.778972.
- [8] Abd-Elgawad H, Abu-Elsaad N, El-Karef A, et al. Piceatannol increases the expression of hepatocyte growth factor and IL-10 thereby protecting hepatocytes in thioacetamide-induced liver fibrosis [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94 (7) : 779-787. DOI:10.1139/cjpp-2016-0001.
- [9] Du T, Zou X, Cheng J, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4 (3) : 59. DOI: 10.1186/s12576-013-0251-1.
- [10] Xiao Z, Xi C. Hepatocyte growth factor reduces hypertrophy of skin scar: *in vivo* study [J]. Adv Skin Wound Care, 2013, 26 (6) : 266-270. DOI:10.1097/01.ASW.0000429705.02588.f5.
- [11] Cui Q, Fu S, Li Z. Hepatocyte growth factor inhibits TGF- β_1 -induced myofibroblast differentiation in tendon fibroblasts: role of AMPK signaling pathway [J]. J Physiol Sci, 2013, 63 (3) : 163-170. DOI:10.1007/s12576-013-0251-1.
- [12] Matsuoka T, Maeda Y, Matsuo K, et al. Hepatocyte growth factor prevents peritoneal fibrosis in an animal model of encapsulating peritoneal sclerosis [J]. J Nephrol, 2008, 21 (1) : 64-73.
- [13] Yi X, Li X, Zhou Y, et al. Hepatocyte growth factor regulates the TGF- β_1 -induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts [J]. Int J Mol Med, 2014, 34 (2) : 381-390. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1782.
- [14] Yu JL, Li JH, Chengz RG, et al. Effect of matrine on transforming growth factor β_1 and hepatocyte growth factor in rat liver fibrosis model [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7 (5) : 390-393. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60062-6.
- [15] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF- β_1 suppression by apoptosis of

- myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2454-2461. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833e4149.
- [16] Wang HY, Yang LZ, Cui MJ, et al. Pathological changes, TGF- β_1 expression, and the effects of hepatocyte growth factor in 5/6 nephrectomized rats[J]. Ren Fail, 2014, 36(3): 393-399. DOI: 10.3109/0886022X.2013.867797.
- [17] Naim R, Naumann A, Barnes J, et al. Transforming growth factor-beta $_1$ -antisense modulates the expression of hepatocyte growth factor/scatter factor in keloid fibroblast cell culture[J]. Aesthetic Plast Surg, 2008, 32(2): 346-352. DOI: 10.1007/s00266-007-9078-6.
- [18] 崔清波, 郭晓辉, 杨书龙, 等. HGF 对 TGF- β_1 诱导的 α -SMA 阳性肌腱成纤维细胞的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(1): 9-12.
Cui QB, Guo XH, Yang SL, et al. Effects on TGF- β_1 -induced α -SMA positive myofibroblasts by HGF [J]. J Harbin Med univer, 2014, 48(1): 9-12.
- [19] Wang HY, Yang LZ, Cui MJ, et al. Hepatocyte growth factor-induced amelioration in chronic renal failure is associated with reduced expression of α -smooth muscle actin [J]. Ren Fail, 2012, 34(7): 862-870. DOI: 10.3109/0886022X.2012.687344.
- [20] Tari K, Atashi A, Kaviani S, et al. Erythropoietin induces production of hepatocyte growth factor from bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Biologicals, 2017, 45: 15-19. DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.10.010.
- [21] Lan YW, Theng SM, Huang TT, et al. Oncostatin M-preconditioned mesenchymal stem cells alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis through paracrine effects of the hepatocyte growth factor [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(3): 1006-1017. DOI: 10.5966/sctm.2016-0054.
- [22] Tang WP, Akahoshi T, Piao JS, et al. Basic fibroblast growth factor-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion to ameliorate liver cirrhosis via paracrine hepatocyte growth factor [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(6): 1065-1074. DOI: 10.1111/jgh.12893.
- [23] Lin X, Yu M, Wu K, et al. Pirfenidone inhibits proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's fibroblasts *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8): 3763-3770. DOI: 10.1167/iov.08-2815.
- [24] Yan ZC, Bai YJ, Tian Z, et al. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery film in rabbit glaucoma filtration surgery [J]. Mol Vis, 2011, 17(27): 2495-2506.
- [25] Seet LF, Su R, Toh LZ, et al. *In vitro* analyses of the anti-fibrotic effect of SPARC silencing in human Tenon's fibroblasts: comparisons with mitomycin C [J]. J Cellular Molec Med, 2012, 16(6): 1245-1259. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01400.x.

(收稿日期: 2017-12-20 修回日期: 2018-09-11)

(本文编辑: 杜娟)

读者 · 作者 · 编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)