

# 氯离子通道阻滞剂 NPPB 在 TGF- $\beta$ 1 诱导 HConF 细胞纤维化中的作用及其机制

孙丽霞<sup>1</sup> 李英俊<sup>1</sup> 崔仁哲<sup>1</sup> 卢迪<sup>1</sup> 郑雅娟<sup>2</sup>

<sup>1</sup>延边大学附属医院眼科, 吉林省延吉市 133000; <sup>2</sup>吉林大学第二医院眼科, 长春 130041

通信作者: 郑雅娟, Email: zhengyajuan124@126.com

**【摘要】** 目的 观察氯离子通道阻滞剂 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸(NPPB)在转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 诱导的体外培养人结膜成纤维细胞(HConF)纤维化中的作用,并进一步探索其作用机制。方法 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法筛选出 TGF- $\beta$ 1 最适作用时间和 NPPB 最适作用浓度,将细胞分为对照组、TGF- $\beta$ 1 处理组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组,CCK-8 法检测各组 HConF 细胞增殖值(A),采用流式细胞仪检测各组 HConF 细胞周期,通过细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验检测各组细胞迁移情况。采用 Western blot 和荧光定量 PCR 法检测 HConF 细胞向肌成纤维细胞转化的标志性蛋白  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I型胶原蛋白(COL-I)和纤维连接蛋白(FN)的表达,同时用 Western blot 法检测 PI3K/Akt 信号通路蛋白磷酸化水平。结果 TGF- $\beta$ 1 可促进细胞增殖,并呈时间依赖性;其中 TGF- $\beta$ 1 作用后 48 h 和 72 h 细胞 A 值比较,差异无统计学意义( $P=0.064$ ),选择 48 h 作为 TGF- $\beta$ 1 作用的最适时间。NPPB 抑制 HConF 细胞增殖作用呈浓度依赖性;与对照组比较,50  $\mu$ mol/L 和 100  $\mu$ mol/L NPPB 组细胞增殖值明显降低,差异均有统计学意义( $P=0.020, 0.000$ ),选择 100  $\mu$ mol/L 作为 NPPB 的最适作用浓度。TGF- $\beta$ 1+NPPB 组细胞 A 值、相对迁移面积和迁移细胞数较 TGF- $\beta$ 1 处理组下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );TGF- $\beta$ 1 处理组 G1 期细胞比例较对照组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组明显减少,S 期和 G2/M 期细胞比例增多,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。TGF- $\beta$ 1 处理组  $\alpha$ -SMA、细胞外基质 COL-I 和 FN 的蛋白及 mRNA 相对表达量均明显高于对照组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ );TGF- $\beta$ 1 处理组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值明显高于对照组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。结论 NPPB 可能通过抑制 PI3K 和 Akt 磷酸化来抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HConF 增殖、迁移、分化及细胞外基质合成等纤维化过程。

**【关键词】** 氯离子通道; 滤过泡瘢痕化; 氯离子通道阻滞剂

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760171)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.003

## The effect and mechanisms of chloride channel blocker NPPB on TGF- $\beta$ 1 induced HConF fibrosis

Sun Lixia<sup>1</sup>, Li Yingjun<sup>1</sup>, Cui Renzhe<sup>1</sup>, Lu Di<sup>1</sup>, Zheng Yajuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Yanbian University Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The Second Hospital of Jilin University, Jilin University, Changchun 130041, China

Corresponding author: Zheng Yajuan, Email: zhengyajuan124@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect and mechanisms of chloride channel blocker 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) on transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) induced human conjunctival fibroblasts (HConF) fibrosis. **Methods** Cell counting kit (CCK-8) was used to screen out the optimal TGF- $\beta$ 1 treatment time and the optimal NPPB concentration. The cells were divided into control group, TGF- $\beta$ 1 treatment group and TGF- $\beta$ 1+NPPB group. Cell proliferation and cell cycle were detected by CCK-8 and flow cytometer, respectively. Cell migration ability were observed by scratch and transwell migration assays. Western blot and Real time-PCR were used to detect the expression of collagen I (COL-I), fibronectin (FN) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). The phosphorylation level of PI3K and Akt were measured by Western blot. **Results** TGF- $\beta$ 1 promotes cell proliferation in a time-dependent manner. There was no statistically significant difference in A values between 48 hours and 72 hours after TGF- $\beta$ 1 treatment ( $P=0.064$ ). Forty-eight hours was selected as the most appropriate time for TGF- $\beta$ 1 treatment. NPPB inhibited HConF cell proliferation in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, the proliferation A values of cells in the 50 mol/L and 100 mol/L NPPB groups were significantly reduced ( $P=0.020, 0.000$ ), and 100 mol/L was selected as the optimal concentration of NPPB. The cell proliferation A value, migration area and migration cell number of TGF- $\beta$ 1+NPPB group were significantly lower than those of TGF-

$\beta 1$  treatment group (all at  $P < 0.05$ ). Compared with the control group and TGF- $\beta 1$ +NPPB group, the proportion of G1 phase cells in the TGF- $\beta 1$  treatment group was reduced, and the proportion of cells in the S phase and G2/M phase were increased, with statistically significant differences between them (all at  $P < 0.05$ ). The protein and mRNA expression of  $\alpha$ -SMA, COL- I and FN in the TGF- $\beta 1$  treatment group were higher than those in the control group and TGF- $\beta 1$ +NPPB group, with statistically significant differences between them (all at  $P < 0.05$ ); the ratios of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in the TGF- $\beta 1$  treatment group were significantly higher than those in the control group and TGF- $\beta 1$ +NPPB group, with statistically significant differences between them (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** NPPB may inhibit TGF- $\beta 1$  induced HConF fibrosis process by inhibiting phosphorylation of PI3K and Akt.

**[Key words]** Chloride channel; Filtering bleb scarring; Chloride channel blocker

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81760171)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.003

青光眼是以视神经损害和进行性视野缺损为特征的一类进展性视神经病变<sup>[1]</sup>。滤过性手术是治疗青光眼的主要手术方法,但其成功率受滤过泡瘢痕化等因素的影响<sup>[2]</sup>。目前,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)和丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)等抗代谢药物常被用于抑制滤过性手术后滤过泡瘢痕的形成,以提高手术成功率<sup>[3]</sup>;但是药物的细胞毒性作用常引起各种严重的并发症<sup>[4]</sup>。因此,寻找抗滤过泡纤维化的新靶点具有重大意义。研究表明,CLC 氯离子通道在多种细胞增生、分化、凋亡、迁移方面起调节作用<sup>[5-7]</sup>。我们前期的研究也发现,CLC-2 氯离子通道参与调控结膜成纤维细胞向肌成纤维细胞转化、细胞周期、增生、迁移及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成这一系列纤维化过程<sup>[8]</sup>。5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸[5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, NPPB]是一种非特异性氯离子通道阻滞剂,通过改变氯离子通道蛋白的构象而阻断 CLC-2、CLC-3 等氯离子通道,从而抑制其功能<sup>[6]</sup>。NPPB 是否对人结膜成纤维细胞(human conjunctival fibroblasts, HConF)纤维化有抑制作用,目前尚不明确。本研究通过转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )诱导人 HConF 纤维化,观察 NPPB 对 HConF 细胞分化、增生、迁移及 ECM 形成过程的抑制作用及其信号传导通路,以期为抗青光眼滤过泡瘢痕化提供一种新的思路和药物靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系、主要试剂及仪器** HConF 细胞、FM (Fibroblast Medium) 成纤维细胞专用培养基(美国 Scien Cell 公司); NPPB、胎牛血清(bovine serum albumin, BSA)(美国 Sigma 公司); TGF- $\beta 1$ (美国 R&D Systems 公司); 丝裂霉素 C(台州海正药业有限公司); BCA 试剂盒、鼠源  $\beta$ -actin 单克隆抗体(AF0003)(中国

碧云天公司); 兔源  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)多克隆抗体(ab124964)、鼠源 I 型胶原蛋白(collagen I, COL- I)单克隆抗体(ab88147)、兔源纤维连接蛋白(fibronectin, FN)多克隆抗体(ab2375)、鼠源 PI3K p85 单克隆抗体(sc-1637)、鼠源 p-PI3K p85 $\alpha$  多克隆抗体(sc12929)、鼠源 Akt1 单克隆抗体(sc-5298)、鼠源 p-Akt1 单克隆抗体(sc-293125)(美国 Abcam 公司)。酶标仪(日本 OLYMPUS 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HConF 细胞培养** 取 HConF 用 FM 成纤维细胞专用培养基进行培养,倒置显微镜下观察 HConF 细胞融合后,按 1:4 传代。取第 5~7 代细胞用于实验,待细胞 80% 融合后进行实验。

**1.2.2 主要试剂的配制** 用灭菌的含体积分数 0.5% BSA 的 4 mmol/L HCL 溶液将 TGF- $\beta 1$  配制成 20  $\mu$ g/ml 的储存液, -20  $^{\circ}$ C 储存备用,使用前用 DMEM 稀释成 2 ng/ml。将 NPPB 用 DMSO 溶解配成 0.4 mol/L 储存液, -20  $^{\circ}$ C 避光保存,实验当天用 DMEM 稀释成相应浓度的工作液,为了排除 DMSO 的影响,确保最高浓度的 NPPB 工作液中 DMSO 的含量不超过 0.1%。

**1.2.3 细胞计数法筛选最适 TGF- $\beta 1$  作用时间和最适 NPPB 作用浓度** 将细胞密度调至  $5 \times 10^4$ /ml,按每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板中,分为对照组和 TGF- $\beta 1$  处理组,每组设 6 个复孔,分别于 2 ng/ml 的 TGF- $\beta 1$  处理细胞后 0、24、48 和 72 h 加入细胞试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8), 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h,用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处吸光度(A)值,并筛选出最适 TGF- $\beta 1$  作用时间。同时将细胞分为对照组, 10、50、100 和 200  $\mu$ mol/L NPPB 组,分别用 0、10、50、100 和 200  $\mu$ mol/L NPPB 作用 HConF 细胞 48 h,采用 CCK-8 法检测细胞增生情况,并筛选出 NPPB 最适作用浓度。

**1.2.4 实验分组** 将 HConF 细胞分为对照组、TGF- $\beta 1$  处理组和 TGF- $\beta 1$ +NPPB 组。TGF- $\beta 1$  处理组细胞

采用 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 诱导 48 h; TGF- $\beta$ 1+NPPB 组细胞在 TGF- $\beta$ 1 诱导 48 h 后,再用 100  $\mu$ mol/L NPPB 处理 48 h;对照组细胞常规培养。

**1.2.5 细胞计数法检测各组细胞增生情况** 取各组培养的细胞计数以  $5 \times 10^4$ /ml 密度接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔,分组处理后,参照 CCK-8 试剂盒步骤处理细胞,检测 450 nm 波长处 A 值。

**1.2.6 流式细胞仪检测各组 HConF 细胞周期** 取 HConF 细胞以  $2.5 \times 10^5$ /ml 密度接种于 6 孔板,每组设 4 个复孔,分组处理后收集细胞培养液备用,使用不含 EDTA 的质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,用预冷 PBS 洗 1 次,预冷的 70% 乙醇 4  $^{\circ}$ C 固定,离心收集细胞,预冷 PBS 洗 1 次,用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液避光染色 30 min,350 目尼龙膜过滤。用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况。用流式细胞技术分析软件分析 DNA 含量和光散射情况。

**1.2.7 细胞划痕试验和 Transwell 迁移试验检测 HConF 细胞迁移情况** (1)细胞划痕试验 将 HConF 细胞均匀地接种于 6 孔板,过夜后按照分组给予不同条件处理,吸出培养基,替换为含 4  $\mu$ g/ml 丝裂霉素 C 的培养基,继续培养 2 h,用 200  $\mu$ l 无菌枪头垂直在融合的细胞层上划痕,用 PBS 洗掉划下的细胞,加入不含 BSA 的 DMEM 继续培养,分别于划痕后 0、12 和 24 h 将细胞置于倒置显微镜下观察并拍照,用 Image J 软件测量各个视野划痕面积,计算相对划痕面积,即不同时间点划痕面积相对初始划痕面积的百分比,分析细胞迁移能力。(2)Transwell 迁移实验 将孔径为 8  $\mu$ m Transwell 小室置于 24 孔培养板中,将 200  $\mu$ l 密度为  $5 \times 10^5$ /ml 的各组 HConF 细胞接种于上室,将 500  $\mu$ l 含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 加入下室,将 Transwell 小室置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 24 h,去掉培养基,用棉签轻轻擦掉上室未迁移的细胞,用质量分数 4% 多聚甲醛固定下室迁移的细胞,结晶紫染色,每个样品任意选择 6 个视野,在  $\times 200$  的放大倍数下拍照并计数每个视野的迁移细胞数,取平均值来评估细胞迁移能力。

**1.2.8 荧光定量 PCR 法检测各组细胞  $\alpha$ -SMA、COL-I 和 FN mRNA 的表达** 用 Trizol 试剂抽提各组细胞总 RNA,取 500 ng RNA 在 10  $\mu$ l 逆转录反应体系中合成 cDNA,以 2  $\mu$ l DNA 为模板加入靶基因上下游引物(表 1),引物由上海生工生物科技有限公司合成,在 20  $\mu$ l 体系中进行 PCR 扩增,扩增条件如下:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,60  $^{\circ}$ C 退火 20 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40

个循环。以 GAPDH 为内参照,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组 HConF 细胞中  $\alpha$ -SMA、COL-I 及 FN 的 mRNA 表达。

表 1 基因引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
$\alpha$ -SMA	F: ATGGTGGGAATGGGACAAAA R: CGTGAGCAGGGTGGGATG	189
COL-I	F: CCTCTTTAGCACCTTTTCG R: GGACCAGCAACACCATCTG	128
FN	F: CAGCAGAGGCATAAGGTTC R: ACTCATCTCCAACGGCATA	132
GAPDH	F: AGGAGGCATTGCTGATGAT R: AGGAGGCATTGCTGATGAT	189

注: SMA:平滑肌肌动蛋白; COL-I: I 型胶原蛋白; FN: 纤维连接蛋白; F: 正义链; R: 反义链

**1.2.9 Western blot 法检测各组细胞  $\alpha$ -SMA、COL-I、FN、PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt 的蛋白表达** 各组细胞进行相应处理后,采用常规胰蛋白酶消化法消化并收集细胞,用细胞蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度。各组培养细胞中取 20  $\mu$ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白从凝胶中转移到 PVDF 膜,用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原;分别以兔源  $\alpha$ -SMA 多克隆抗体(1:1 000)、鼠源 COL-I 单克隆抗体(1:2 500)、兔源 FN 多克隆抗体(1:1 500)、鼠源 PI3K p85 单克隆抗体(1:500)、鼠源 p-PI3K p85 $\alpha$  多克隆抗体(1:500)、鼠源 Akt1 单克隆抗体(1:500)、鼠源 p-Akt1 单克隆抗体(1:500)及鼠源  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:1 000)4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜;TBST 缓冲液(含体积分数 0.1% Tween 20)洗膜 3 次,每次 10 min;分别添加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和山羊抗兔二抗(1:5 000),室温下孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;用 ECL 发光液结合 PVDF 膜上二抗,于暗房内用胶片显影,使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值半定量分析。以  $\beta$ -actin 为内参,计算各组  $\alpha$ -SMA、COL-I、FN、PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的相对表达量,目标蛋白相对表达量=目标蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值,并计算 p-PI3K/PI3K 以及 p-Akt/Akt 的比值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中各计量资料数据经 W 检验呈正态分布,以 mean $\pm$ SD 表示。对照组与 TGF- $\beta$ 1 处理组细胞不同时间点 A 值比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。不同摩尔浓度 NPPB 组 A 值比较,对照组、TGF- $\beta$ 1 处理组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组 A 值、细胞周期细胞分布

值、细胞相对迁移面积、细胞迁移数量、各蛋白及 mRNA 相对表达量比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TGF- $\beta$ 1 不同作用时间及 NPPB 不同作用浓度下 HConF 细胞增殖情况

各组细胞接种后 0、24、48 和 72 h 细胞 A 值总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 1506.56, P = 0.00$ ), TGF- $\beta$ 1 处理组细胞增殖呈时间依赖性;其中 TGF- $\beta$ 1 作用后 48 h 与 72 h HConF 细胞 A 值比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.064$ )。对照组与 TGF- $\beta$ 1 处理组细胞 A 值总体比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 47.05, P = 0.00$ );与作用 24、48 和 72 h 对照组相比,相应时间点 TGF- $\beta$ 1 处理组 HConF 细胞 A 值均明显升高 ( $t = -2.80, P = 0.031; t = -4.37, P = 0.005; t = -4.44, P = 0.004$ ) (表 2)。因此选择 48 h 作为 TGF- $\beta$ 1 的最适作用时间。

表 2 对照组和 TGF- $\beta$ 1 处理组不同作用时间点细胞 A 值比较 (mean $\pm$ SD)

组别	样本量	不同时间点细胞 A 值			
		0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	6	2.16 $\pm$ 0.10	2.43 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.62 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	2.67 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
TGF- $\beta$ 1 处理组	6	2.18 $\pm$ 0.08	2.50 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	2.70 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	2.69 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 47.05, P = 0.00, F_{\text{时间}} = 1506.56, P = 0.00$ 。与组内 0 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与同时点正常对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF: 转化生长因子

对照组细胞 A 值为 2.10 $\pm$ 0.10, 10、50、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组细胞 A 值分别是 2.02 $\pm$ 0.11、1.57 $\pm$ 0.12、1.10 $\pm$ 0.10 和 0.19 $\pm$ 0.09, 各组之间细胞 A 值总体比较差异有统计学意义 ( $F = 68.900, P = 0.000$ ), NPPB 抑制 HConF 细胞增殖作用呈浓度依赖性;与对照组比较, 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组细胞 A 值均明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.020、0.000$ ), 200  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组光学显微镜下可见细胞大量死亡 (图 1)。最终选择 100  $\mu\text{mol/L}$  作为 NPPB 的最适作用浓度。

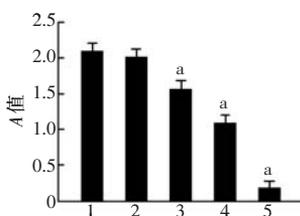


图 1 不同作用浓度 NPPB 处理细胞增殖值比较  $F = 68.900, P = 0.000$ ; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) 1: 对照组; 2: 10  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组; 3: 50  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组; 4: 100  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组; 5: 200  $\mu\text{mol/L}$  NPPB 组 NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸

### 2.2 各组细胞增殖值比较

对照组、TGF- $\beta$ 1 处理组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组 A 值分别为 2.24 $\pm$ 0.13、3.13 $\pm$ 0.08 和 2.12 $\pm$ 0.10, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 14.720, P = 0.001$ ), 与 TGF- $\beta$ 1 处理组相比, TGF- $\beta$ 1+NPPB 组 HConF 细胞 A 值明显降低, 差异有统计学意义 ( $P = 0.018$ ) (图 2)。

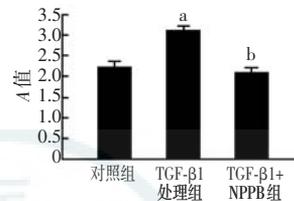


图 2 各组细胞增殖值比较  $F = 14.720, P = 0.001$ 。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 TGF- $\beta$ 1 处理组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸

### 2.3 各组 HConF 细胞周期比较

各组细胞周期细胞比例总体比较差异有统计学意义 (G0/G1 期:  $F = 237.08, P = 0.00$ ; S 期:  $F = 11.07, P = 0.00$ ; G2/M 期:  $F = 228.09, P = 0.00$ ); 与对照组和 TGF- $\beta$ 1+NPPB 组比较, TGF- $\beta$ 1 处理组细胞 G1 期的细胞比例明显减小, S 期和 G2/M 期细胞比例增加, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3, 图 3)。

表 3 各组细胞周期分布 (mean $\pm$ SD, %)

组别	样本量	不同细胞周期细胞分布		
		G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	4	64.43 $\pm$ 3.71	8.37 $\pm$ 3.02	27.20 $\pm$ 1.92
TGF- $\beta$ 1 处理组	4	54.60 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	10.40 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	35.00 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>
TGF- $\beta$ 1+NPPB 组	4	81.44 $\pm$ 3.14 <sup>b</sup>	6.56 $\pm$ 3.02 <sup>b</sup>	12.00 $\pm$ 3.23 <sup>b</sup>

F 值: 237.08, 11.07, 228.09  
P 值: 0.00, 0.00, 0.00

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 TGF- $\beta$ 1 处理组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸

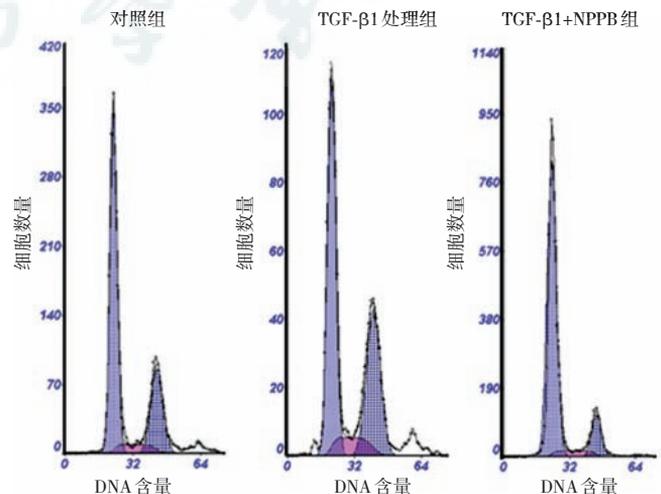


图 3 流式细胞仪检测各组 HConF 细胞周期分布 TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺)苯甲酸

### 2.4 各组 HConF 细胞迁移情况比较

对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组相对划痕面积分别为(24.54±2.42)%、(79.86±2.04)%和(20.03±1.56)%，总体比较差异有统计学意义( $F=1\ 655.450, P=0.000$ )；其中 TGF-β1 处理组细胞相对划痕面积小于对照组和 TGF-β1+NPPB 组，差异均有统计学意义( $P=0.000, 0.002$ )。对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组细胞迁移数量分别是 79.88±3.81、173.63±2.56 和 50.18±2.23，总体比较差异有统计学意义( $F=1\ 138.000, P=0.000$ )；其中 TGF-β1 处理组中迁移细胞数量较对照组和 TGF-β1+NPPB 组增多，差异均有统计学意义( $P=0.000, 0.001$ ) (图 4)。

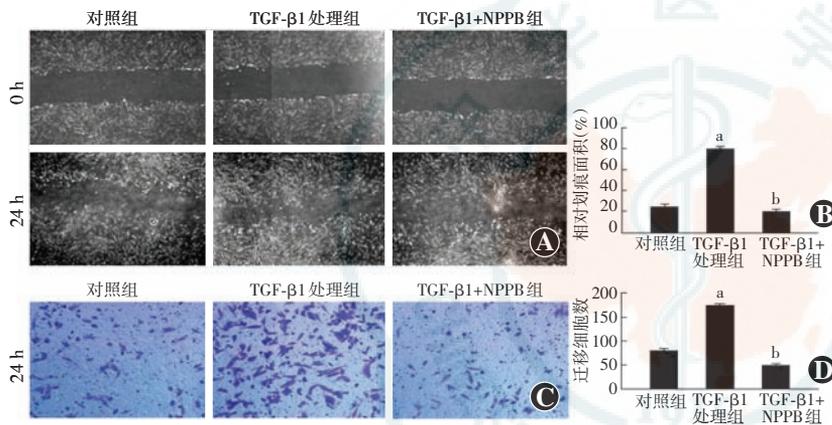


图 4 各组 HConF 细胞迁移能力比较 A: 光学显微镜观察细胞划痕实验结果(×100) B: 细胞划痕后 24 h 各组相对划痕面积百分比比较  $F=1\ 655.450, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) C: Transwell 小室迁移实验观察结果(×200) D: 各组迁移细胞数比较  $F=1\ 138.000, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺) 苯甲酸

### 2.5 各组 HConF 细胞表型转化情况

对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组 α-

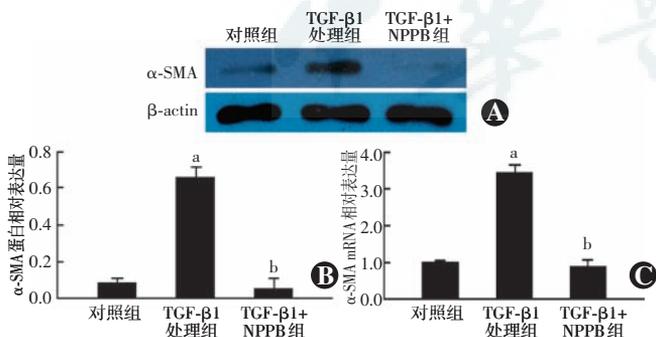


图 5 Western blot 法和荧光定量 PCR 法检测各组 HConF 细胞 α-SMA 蛋白和 mRNA 表达 A: 各组 α-SMA 蛋白表达电泳图 B: 各组 α-SMA 蛋白相对表达量量化比较  $F=2\ 046.000, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) C: 各组 α-SMA mRNA 相对表达量量化比较  $F=253.650, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺) 苯甲酸; SMA: 平滑肌肌动蛋白

SMA 蛋白相对表达量分别为 0.083±0.027、0.660±0.052 和 0.053±0.051, α-SMA mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.11、3.45±0.21 和 0.87±0.19, 3 个组 α-SMA 蛋白和 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义( $F=2\ 046.000, P=0.000; F=253.650, P=0.000$ )；其中 TGF-β1 处理组细胞 α-SMA mRNA 和蛋白相对表达水平明显高于对照组和 TGF-β1+NPPB 组, 差异均有统计学意义(均  $P=0.000$ ) (图 5)。

### 2.6 各组 HConF 细胞 COL-I 和 FN 蛋白和 mRNA 相对表达量变化

对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组 COL-I 蛋白相对表达量分别是 0.59±0.04、0.90±0.04、0.64±0.03, COL-I mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.14、2.01±0.17 和 1.25±0.12, 各组 collagen-I 蛋白和 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F=43.310, P=0.000; F=230.100, P=0.000$ )；对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组 FN 蛋白相对表达量分别为 0.32±0.04、0.64±0.03 和 0.49±0.03, FN mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.16、2.33±0.14 和 1.45±0.13, 各组 FN 蛋白和 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义( $F=144.590, P=0.000; F=167.500, P=0.000$ )。TGF-β1 处理组细胞 COL-I 和 FN 蛋白及 mRNA 相对表达量均较对照组和 TGF-β1+NPPB 组高, 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ ) (图 6、7)。

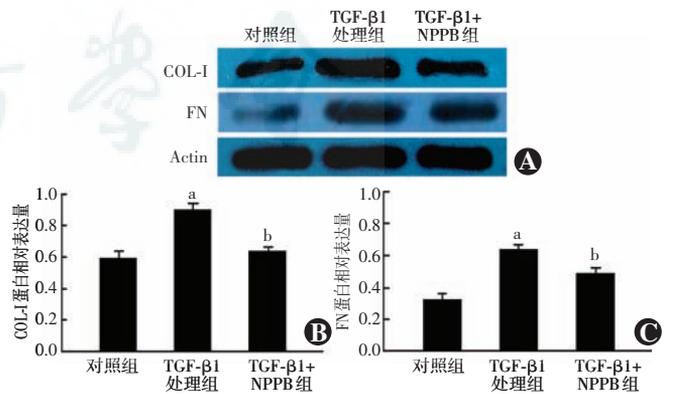
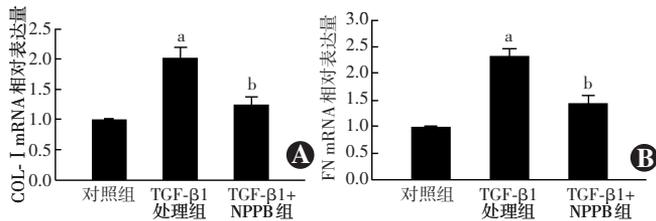


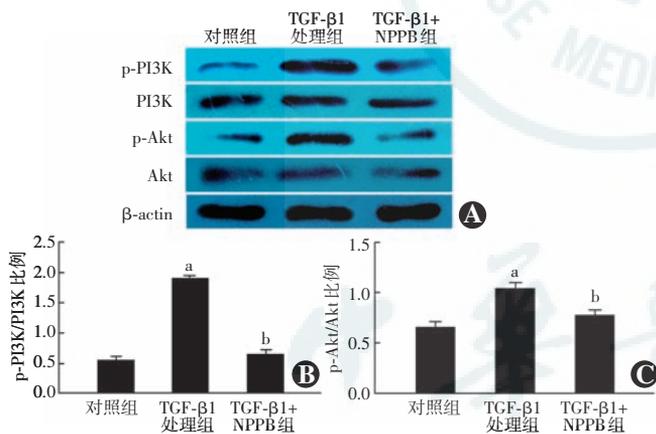
图 6 Western blot 法检测各组 HConF 细胞 COL-I 和 FN 蛋白表达 A: 各组 COL-I 和 FN 蛋白表达电泳图 B: 各组 COL-I 蛋白相对表达量量化比较  $F=43.310, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) C: 各组 FN 蛋白相对表达量量化比较  $F=144.590, P=0.000$ 。与对照组比较,  $^aP<0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=4$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺) 苯甲酸; COL-I: I 型胶原蛋白; FN: 纤维连接蛋白



**图 7 荧光定量 PCR 法检测各组 HConF 细胞 COL-1 和 FN mRNA 表达** A: 各组 COL-1 mRNA 相对表达量量化比较  $F = 230.100$ ,  $P = 0.000$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) B: 各组 FN mRNA 相对表达量量化比较  $F = 167.500$ ,  $P = 0.000$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺) 苯甲酸; COL-1: I 型胶原蛋白; FN: 纤维连接蛋白

### 2.7 各组 HConF 细胞 PI3K 及 Akt 蛋白表达变化

各组 HConF 细胞总 PI3K 和 Akt 蛋白表达电泳条带强度无明显变化 (图 8A)。对照组、TGF-β1 处理组和 TGF-β1+NPPB 组 p-PI3K/PI3K 比值分别是  $0.56 \pm 0.05$ 、 $1.90 \pm 0.04$ 、 $0.66 \pm 0.06$ , p-Akt/Akt 比值分别是  $0.66 \pm 0.06$ 、 $1.05 \pm 0.05$ 、 $0.78 \pm 0.05$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 1789.450$ ,  $P = 0.000$ ;  $F = 54.600$ ,  $P = 0.000$ ); 与对照组比较, TGF-β1 处理组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比例较对照组和 TGF-β1+NPPB 组升高, 差异均有统计学意义 (均  $P = 0.00$ ) (图 8B、C)。



**图 8 Western blot 法检测各组 HConF 细胞 PI3K 及 Akt 蛋白表达** A: 各组蛋白表达电泳图 B: 各组 p-PI3K/PI3K 比例比较  $F = 1789.450$ ,  $P = 0.000$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组 p-Akt/Akt 比例比较  $F = 54.600$ ,  $P = 0.000$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 TGF-β1 处理组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) TGF: 转化生长因子; NPPB: 5-硝基-2-(3-苯丙胺) 苯甲酸

### 3 讨论

滤过性手术是目前治疗青光眼的主要手术方法, 使滤过道创口不完全愈合从而维持有功能的滤过泡是滤过手术追求的理想结果。TGF-β 是创口愈合和瘢痕

形成过程中主要的生长因子<sup>[9]</sup>。TGF-β 通过多条信号通路促进处于静止状态的结膜成纤维细胞重新进入细胞周期, 并不断增生, 向创口迁移, 促进细胞 ECM 合成, 还刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞并表达 α-SMA, 从而引起胶原纤维收缩, 最终形成结膜下致密的胶原性瘢痕<sup>[10]</sup>。

抑制青光眼术后滤过泡瘢痕化的方法很多, MMC 和 5-Fu 是目前临床上广泛应用的抗代谢药物。然而, MMC 和 5-Fu 抑制细胞增生作用的选择性低, 对增生细胞起抑制作用的同时也使其他非增生细胞凋亡和坏死, 由此产生了一系列毒性作用和不良反应, 如滤过泡漏、术后低眼压、浅前房、角膜上皮损伤、眼内炎等<sup>[11-12]</sup>。因此探索抗滤过泡瘢痕化的新方法十分重要。

氯离子通道是位于哺乳动物细胞膜上负责转运氯离子或其他阴离子的蛋白质孔道, 其主要功能是维持细胞容积平衡, 调节细胞增生、分化、细胞迁移及细胞凋亡等生物学过程<sup>[7,13]</sup>。我们前期研究中发现, TGF-β1 可上调 HConF 细胞 CLC-2 氯离子通道的表达, 而通过 RNA 干扰技术抑制 CLC-2 氯离子通道后可抑制 TGF-β1 诱导的结膜成纤维细胞向肌成纤维细胞转化、细胞周期、增生、迁移及 ECM 合成这一系列纤维化过程<sup>[8]</sup>。NPPB 是一种非特异性氯离子通道阻滞剂, 通过改变氯离子通道蛋白的构象可非特异性地阻断芳香族酸类容积敏感性氯离子通道<sup>[6]</sup>。NPPB 常被用来在不同的细胞中研究氯离子电流的药理特性<sup>[14-15]</sup>。本研究中采用血清饥饿法将成纤维细胞周期同步化后发现, NPPB 可以抑制静止于 G1 期的细胞重新进入细胞周期, 说明氯离子通道参与 G1/S 限制点的调控<sup>[14]</sup>; 同样, 将人视网膜色素上皮细胞周期同步化后, 用核仁染色的方法观察发现 NPPB 通过促进核仁萎缩、抑制核仁形成来抑制细胞周期进展和细胞增生<sup>[16]</sup>; 研究发现, 只有处于细胞周期 M 期的细胞才特异性地表达 CLC-2 蛋白, M 期之后细胞几乎没有 CLC-2 表达<sup>[17]</sup>。以上研究均提示我们 NPPB 可能是一种有效抑制结膜成纤维细胞纤维化的药物。

Qian 等<sup>[18]</sup>用胰岛素样生长因子-1 促进猪动脉平滑肌细胞中的 CLC-2 蛋白表达后, 细胞增生能力提高, 用 RNA 干扰的方法抑制 CLC-2 的表达后, 细胞增生能力下降。Xu 等<sup>[19]</sup>用 CLC-3 反义寡核苷酸转染鼻咽癌细胞后细胞停滞于 S 期, 细胞增生被抑制, 认为氯离子通道是细胞由 G1 期限限制点进入 S 期的重要调控因素, 细胞周期和细胞增生与氯离子通道密切相关。本研究中也发现 TGF-β1 会促进 HConF 细胞转化、增生、迁移及 ECM 合成等纤维化过程, NPPB 干预后可

以抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HConF 细胞增生,抑制 HConF 细胞周期进展,将细胞停滞于 G1 期,提示 NPPB 在 HConF 细胞周期 G1/S 限制点处起关键作用。

COL- I、FN、蛋白多糖、层黏连蛋白等 ECM 组分的合成和沉积是创口愈合的组织学基础,正常情况下机体 ECM 产生和降解保持动态平衡,当创伤发生时,TGF- $\beta$  等多种因素可刺激 ECM 的合成并抑制其降解,从而诱导创口愈合<sup>[20]</sup>。本研究中选择 COL- I 和 FN 2 个指标进行检测。成纤维细胞向肌成纤维细胞转化也是创口愈合和组织修复的重要步骤,肌成纤维细胞通过表达其标志性的蛋白  $\alpha$ -SMA 从而促进组织收缩<sup>[21-23]</sup>。本研究中发现 NPPB 通过抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导  $\alpha$ -SMA 表达及 COL- I 和 FN 合成来抑制 HConF 细胞分化和 ECM 合成。

包括 5-FU 和 MMC 在内的大多抗滤过泡痕痕化的研究都致力于抑制结膜成纤维细胞增生,但是抑制结膜成纤维细胞增生后,细胞迁移能力并不受抑制,受 TGF- $\beta$  等细胞因子的趋化作用,结膜成纤维细胞仍然可以向创口部位迁移,从而促进创口愈合<sup>[24]</sup>。因此,抑制结膜成纤维细胞的迁移能力也是抗痕痕化的一个重要方面。本研究通过细胞划痕实验和 Transwell 小室方法检测发现,NPPB 可抑制 HConF 细胞迁移。Du 等<sup>[7]</sup>用 CLC-3 siRNA 抑制骨肉瘤细胞中 CLC-3 的基因表达后,细胞迁移能力受到抑制。Pan 等<sup>[5]</sup>研究发现,通过 RNA 干扰的方法来抑制大鼠角质细胞的 CLC-2 表达也会抑制细胞的迁移能力。综上所述,本研究中发现 NPPB 通过调控 HConF 细胞增生、周期、转化、迁移及 ECM 合成,抑制结膜成纤维细胞的纤维化过程,这为抑制滤过泡痕痕化提供了一个新方向。

多项研究已经证实,PI3K/Akt 信号通路参与调控细胞增生、转化、迁移和 ECM 合成<sup>[5,25-26]</sup>。Du 等<sup>[7]</sup>研究表明,CLC-3 氯离子通道通过 PI3K/Akt 信号通路调控骨肉瘤细胞增生和迁移过程。同样,也有研究发现,用氯离子通道阻滞剂或 CLC-2 RNAi 抑制氯离子通道会通过 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞的增生和迁移能力<sup>[5,25]</sup>。Qin 等<sup>[27]</sup>研究发现,PI3K 抑制剂 LY294002 可以抑制高糖诱导的 ECM 合成。本研究在 TGF- $\beta$ 1 诱导下进一步检测了 NPPB 对 HConF 细胞 PI3K 和 Akt 磷酸化水平的影响,结果发现 NPPB 可以抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 PI3K 和 Akt 磷酸化,由此推测 NPPB 可能通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 HConF 细胞增生、周期、转化、迁移及 ECM 合成,从而抑制滤过泡痕痕化过程。

综上所述,本研究结果表明 NPPB 对 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HConF 细胞纤维化过程具有抑制作用,推测 NPPB

通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HConF 细胞增生、周期进展、细胞转化、迁移及 ECM 合成。本研究结果提示氯离子通道是抵抗滤过泡痕痕化的一个新靶点,为进一步研究青光眼滤过术抗痕痕化提供了新的思路。

## 参考文献

- [1] Lui MH, Lam JC, Kwong YL, et al. A cross-sectional study on compliance with topical glaucoma medication and its associated socioeconomic burden for a Chinese population [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(2): 293-299. DOI:10.18240/ijo.2017.02.18.
- [2] Shi H, Wang H, Fu S, et al. Losartan Attenuates scar formation in filtering bleb after trabeculectomy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(3): 1478-1486. DOI:10.1167/iov.16-21163.
- [3] Panarelli JF, Vinod K, Huang G, et al. Transconjunctival revision with mitomycin-C following failed trabeculectomy [J]. *J Glaucoma*, 2016, 25(7): 618-622. DOI:10.1097/IJG.0000000000000408.
- [4] Sawchyn AK, Slabaugh MA. Innovations and adaptations in trabeculectomy [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2016, 27(2): 158-163. DOI:10.1097/ICU.0000000000000236.
- [5] Pan F, Guo R, Cheng W, et al. High glucose inhibits CLC-2 chloride channels and attenuates cell migration of rat keratinocytes [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 4779-4791. DOI:10.2147/DDDT.S84628.
- [6] Park M, Song C, Yoon H, et al. Double blockade of glioma cell proliferation and migration by temozolomide conjugated with NPPB, a chloride channel blocker [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7(3): 275-285. DOI:10.1021/acscchemneuro.5b00178.
- [7] Du S, Yang L. CLC-3 chloride channel modulates the proliferation and migration of osteosarcoma cells via AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1622-1630.
- [8] Sun L, Dong Y, Zhao J, et al. The CLC-2 chloride channel modulates ECM synthesis, differentiation, and migration of human conjunctival fibroblasts via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6). DOI:10.3390/ijms17060910.
- [9] 朱晓燕,李磊,鲜光军,等.转化生长因子- $\beta$ 2 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞转化及其在痕痕形成中的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(3): 215-219. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.03.002.
- Zhu XY, Li L, Xian GM, et al. Effects of transforming growth factor- $\beta$ 2 on human Tenon fibroblasts transformation and scarring after glaucoma filtration surgery [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(3): 215-219. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.03.002.
- [10] 明佩佩,王玲,王大博,等.大鼠青光眼滤过术后滤过泡形态与组织病理学动态观察 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(10): 886-890. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.005.
- Ming PP, Wang L, Wang DB, et al. Dynamic changes of morphology and histopathology of conjunctival filtering bleb after anti-glaucoma filtering surgery in rat [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(10): 886-890. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.005.
- [11] Mearza AA, Aslanides IM. Uses and complications of mitomycin C in ophthalmology [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2007, 6(1): 27-32. DOI:10.1517/14740338.6.1.27.
- [12] Wu Z, Li S, Wang N, et al. A comparative study of the safety and efficacy effect of 5-fluorouracil or mitomycin C mounted biological delivery membranes in a rabbit model of glaucoma filtration surgery [J]. *Clin Ophthalmol*, 2013, 7: 655-662. DOI:10.2147/OPHTH.S34200.
- [13] Tang YB, Liu YJ, Zhou JG, et al. Silence of CLC-3 chloride channel inhibits cell proliferation and the cell cycle via G/S phase arrest in rat basilar arterial smooth muscle cells [J]. *Cell Prolif*, 2008, 41(5): 775-785. DOI:10.1111/j.1365-2184.2008.00551.x.
- [14] Zheng YJ, Furukawa T, Tajimi K, et al. Cl- channel blockers inhibit

- transition of quiescent (G0) fibroblasts into the cell cycle[J]. J Cell Physiol, 2003, 194(3): 376-383. DOI:10.1002/jep.10218.
- [15] Cheng G, Shao Z, Chaudhari B, et al. Involvement of chloride channels in TGF-beta1-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(5): L1339-1347. DOI:10.1152/ajplung.00121.2007.
- [16] 郑雅娟, 辛华, 张文松, 等. 氯离子通道阻滞剂对人 RPE 细胞增殖抑制作用的实验研究[J]. 眼科研究, 2006, 24(4): 344-347. Zheng YJ, Xin H, Zhang WS, et al. Inhibitory effects of chloride channel blocker on proliferation of cultured human retinal pigment epithelium cells[J]. Eye Res, 2006, 24(4): 344-347.
- [17] Zheng YJ, Furukawa T, Ogura T, et al. M phase-specific expression and phosphorylation-dependent ubiquitination of the ClC-2 channel[J]. J Biol Chem, 2002, 277(35): 32268-32273. DOI: 10.1074/jbc.M202105200.
- [18] Qian JS, Pang RP, Zhu KS, et al. Static pressure promotes rat aortic smooth muscle cell proliferation via upregulation of volume-regulated chloride channel[J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 24(5-6): 461-470. DOI:10.1159/000257485.
- [19] Xu B, Mao J, Wang L, et al. ClC-3 chloride channels are essential for cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(6): 370-380.
- [20] Hyldig K, Riis S, Pennisi CP, et al. Implications of extracellular matrix production by adipose tissue-derived stem cells for development of wound healing therapies[J/OL]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1167 [2018-03-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485991/>. DOI:10.3390/ijms18061167.
- [21] Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7-12. DOI:10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x.
- [22] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(5): 349-363. DOI:10.1038/nrm809.
- [23] Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation[J]. Am J Pathol, 2001, 159(3): 1009-1020. DOI:10.1016/S0002-9440(10)61776-2.
- [24] Vidmar J, Chingwaru C, Chingwaru W. Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review[J]. J Surg Res, 2017, 210: 269-280. DOI:10.1016/j.jss.2016.10.016.
- [25] Heo KS, Ryoo SW, Kim L, et al. Cl<sup>-</sup> channel is essential for LDL-induced cell proliferation via the activation of Erk1/2 and PI3K/Akt and the upregulation of Egr-1 in human aortic smooth muscle cells[J]. Mol Cells, 2008, 26(5): 468-473.
- [26] Liu Y, Li W, Liu H, et al. Inhibition effect of small interfering RNA of connective tissue growth factor on the expression of extracellular matrix molecules in cultured human renal proximal tubular cells[J]. Ren Fail, 2014, 36(2): 278-284. DOI:10.3109/0886022X.2013.846866.
- [27] Qin D, Zhang GM, Xu X, et al. The PI3K/Akt signaling pathway mediates the high glucose-induced expression of extracellular matrix molecules in human retinal pigment epithelial cells[J/OL]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 920280 [2018-03-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324947>. DOI:10.1155/2015/920280.

(收稿日期:2018-11-20 修回日期:2019-04-25)

(本文编辑:张宇)

## 消息

## 《眼底照相技巧与彩图解读》出版发行

《眼底照相技巧与彩图解读》于 2019 年 4 月由人民卫生出版社出版发行。本书由广州爱尔眼科医院吴德正教授、马红婕博士、张静琳博士、李梦媛硕士主编,高汝龙教授主审,立足基层,深入浅出地从眼底照相拍摄的基本方法和拍摄技巧出发,并细致分析各类眼科常见病、多发病的眼底彩图表现。全书包括 1000 余幅普通眼底彩图和彩色眼底拼图照片,每幅图配有详尽的文字说明及各种箭头,“手把手”指导读者读图。眼底彩图结合临床病例展示,部分病例还配有 B 型超声、光学相干断层成像(OCT)、荧光素眼底血管造影(FFA)等检查图像,帮助读者理解疾病,指导临床诊断。

本书约 80 万字,大 16 开,精装,彩色印刷,定价 249.00 元。全国各大新华书店、医药书店、当当网、卓越亚马逊网均有销售,也可登陆人民卫生出版社网站(<http://www.pmph.com>)或人民卫生出版社天猫旗舰店进行购买,或联系人民卫生出版社销售部,联系电话:010-59787226/010-59787033。

(本刊编辑部)



## 天津医科大学眼科医院第十一届国际会议暨天津医科大学眼科医院 建院三十周年、眼视光学院成立十五周年学术活动通知

2019 年 9 月,天津医科大学眼科医院建院 30 周年,恰逢创始人袁佳琴教授百年诞辰。正是“三十而立再奋进,百年医者薪火传”。在这样具有特殊意义的日子,我们诚邀各位专家同道莅临“天津医科大学眼科医院第十一届国际会议暨天津医科大学眼科医院建院三十周年、眼视光学院成立十五周年学术活动”,与我们共同纪念这难忘的时刻!

时间:2019 年 9 月 27-29 日(周五-周日)

地点:天津医科大学眼科医院

联系方式:天津医科大学眼科医院科教科 022-86428817、86428836。Email:iiitc1989@163.com

(天津医科大学眼科医院)