

· 实验研究 ·

CLC-2 氯离子通道靶向阻滞对人结膜成纤维细胞纤维化的抑制作用及其机制

吴沙仁高娃 崔仁哲 卢迪 丁浩轩 孙丽霞

延边大学附属医院眼科, 延吉 133000

通信作者: 孙丽霞, Email: sunlx_2008@163.com

【摘要】目的 探讨 CLC-2 氯离子通道靶向阻滞对人结膜成纤维细胞(HConF)纤维化过程的抑制作用。**方法** 将 HConF 分为空白对照组、脂质体 2000(Lipo2000)组、无义小干扰 RNA(siRNA)组和 CLC-2 siRNA 转染组,其中空白对照组不做任何处理,其他各组分别采用含有相应转染试剂的培养基培养。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 CLC-2 mRNA 的表达水平;采用 CCK-8 试剂盒检测各组 HConF 的增殖能力,即吸光度(A)值;采用流式细胞仪检测各组 HConF 凋亡比例;采用细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验检测各组 HConF 迁移能力;采用胶原收缩实验检测各组胶原面积收缩率;采用 Western blot 法检测各组细胞胶原蛋白(Collagen) I、Collagen III、PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt 的蛋白表达水平。**结果** 空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组 CLC-2 mRNA 相对表达量和细胞 A 值总体比较差异均有统计学意义($F=90.110, 198.680$, 均 $P<0.001$),其中 CLC-2 siRNA 转染组 CLC-2 mRNA 相对表达量和细胞 A 值明显低于无义 siRNA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组细胞凋亡率分别为 $(4.78\pm 1.10)\%$ 、 $(4.54\pm 1.51)\%$ 、 $(4.82\pm 0.88)\%$ 和 $(28.90\pm 0.91)\%$,总体比较差异有统计学意义($F=363.260, P<0.001$),其中 CLC-2 siRNA 转染组细胞凋亡率明显高于无义 siRNA 组,差异有统计学意义($P<0.001$)。各组细胞迁移率和细胞迁移数量总体比较差异均有统计学意义($F=74.493, 1625.431$, 均 $P<0.001$),其中 CLC-2 siRNA 转染组细胞迁移率明显低于无义 siRNA 组,细胞迁移数量明显少于无义 siRNA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各组细胞胶原面积收缩率总体比较差异有统计学意义($F=104.692, P<0.001$),其中 CLC-2 siRNA 转染组细胞胶原面积收缩率明显低于无义 siRNA 组,差异有统计学意义($P<0.001$)。各组 Collagen I 和 Collagen III 蛋白相对表达量及 p-PI3K/PI3K 比值和 p-Akt/Akt 比值总体比较差异均有统计学意义($F=112.073, 456.931, 340.889, 43.021$, 均 $P<0.001$),其中 CLC-2 siRNA 转染组 Collagen I 和 Collagen III 蛋白相对表达量及 p-PI3K/PI3K 比值和 p-Akt/Akt 比值明显低于无义 siRNA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 靶向抑制 CLC-2 氯离子通道基因表达可通过 PI3K/Akt 信号通路促进 HConF 凋亡,抑制细胞迁移、胶原合成及胶原收缩,抑制纤维化过程。

【关键词】 青光眼; 滤过性手术; 氯离子通道; 滤过泡; 瘢痕化; 细胞凋亡; 细胞迁移; 胶原收缩

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760171); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20191117KJ)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00410

Inhibitory effect of CLC-2 chloride channel targeted blocking on fibrosis of human conjunctival fibroblasts

Wu Sharen, Gao W, Cui Renzhe, Lu Di, Ding Haoxuan, Sun Lixia

Department of Ophthalmology, Yanbian University Affiliated Hospital, Yanji 133000, China

Corresponding author: Sun Lixia, Email: sunlx_2008@163.com

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effect of CLC-2 chloride channel targeted blocking on fibrosis of human conjunctival fibroblasts (HConF). **Methods** HConF were divided into blank control group, lipofectamine 2000 (Lipo2000) group, nonsense small interfering RNA (siRNA) group, and CLC-2 siRNA transfected group. The HConF were cultured in medium containing the corresponding transfection reagents according to grouping. No intervention was given to blank control group. The expression level of CLC-2 mRNA of HConF was detected by real-time fluorescence quantitative PCR; absorbance (A) value indicating the proliferative ability of HConF was determined by CCK-8 kit; the apoptosis ratio of HConF was tested by flow cytometry; the migration ability of HConF was identified by cell scratch test and Transwell migration assay; the contraction rate of HConF was assayed by collagen contraction test; the expression levels of collagen I, collagen III, PI3K, Akt, p-PI3K and p-Akt proteins were measured by Western blot. **Results** Significant differences were found in relative expression levels of CLC-2 mRNA and A value among four groups ($F=90.110, 198.680$; both at $P<0.001$). The relative expression level of CLC-2 mRNA and A value were significantly lower in CLC-2 siRNA transfected group than nonsense siRNA group,

showing statistically significant differences (both at $P < 0.001$). The proportion of apoptotic HConF in blank control group, Lipo2000 group, nonsense siRNA group, and CLC-2 siRNA transfected group was $(4.78 \pm 1.10)\%$, $(4.54 \pm 1.51)\%$, $(4.82 \pm 0.88)\%$ and $(28.90 \pm 0.91)\%$, respectively, and a statistically significant difference was found ($F = 363.260, P < 0.001$). The proportion of apoptotic HConF was significantly higher in CLC-2 siRNA transfected group than nonsense siRNA group, with a statistically significant difference ($P < 0.001$). Statistically significant differences were found in cell migration rate and the number of migrating cells among four groups ($F = 74.493, 1625.431$; both at $P < 0.01$). The cell migration rate of HConF in CLC-2 siRNA transfected group was significantly lower and the number of migrating cells was significantly smaller than those of nonsense siRNA group, with statistically significant differences (both at $P < 0.001$). A statistically significant difference in contraction rate was found among four groups ($F = 104.692, P < 0.001$). The contraction rate of HConF was significantly lower in CLC-2 siRNA transfected group than nonsense siRNA group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Statistically significant differences were found in relative expression levels of collagen I and collagen III proteins, p-PI3K/PI3K ratio, and p-Akt/Akt ratio among four groups ($F = 112.073, 456.931, 340.889, 43.021$; all at $P < 0.001$). The relative expression levels of collagen I and collagen III proteins, p-PI3K/PI3K ratio and p-Akt/Akt ratio in CLC-2 siRNA transfected group were significantly lower than those of nonsense siRNA group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Targeted blocking of CLC-2 chloride channel gene expression can inhibit fibrosis of HConF by promoting apoptosis of HConF through PI3K/Akt signaling pathway and inhibit fibrotic processes such as cell migration, collagen synthesis and collagen contraction.

[Key words] Glaucoma; Filtering surgery; Chloride channels; Filtering bleb; Cicatrix; Apoptosis, cells; Cell migration; Collagen contraction

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81760171); Jilin Province Education Department "13th Five-Year" Science and Technology Project (JJKH20191117KJ)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00410

青光眼是由于病理性高眼压而引起视神经损害 and 视野缺损的眼病,是全球主要的不可逆性致盲眼病^[1]。滤过性手术是目前治疗青光眼的主要手术方式,影响滤过手术成功率的主要原因是滤过区域的过度瘢痕化。尽管抗代谢药物丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 的应用提高了手术成功率,但是这些药物存在一定的毒性作用和不良反应^[2]。近年来,随着细胞分子生物学及基因组学等技术的不断进步,针对青光眼滤过术后抗瘢痕治疗的新技术、新方法不断涌现^[3-6]。但参与瘢痕形成的细胞因子种类繁多,目前对于这些因子及其调控机制的认识尚不足,因此进一步探索滤过泡瘢痕化的机制并寻找高效低毒性的抗瘢痕方法具有重要的临床意义。氯离子通道蛋白是广泛分布于哺乳动物各组织器官的一种通道蛋白,在机体内可以维持细胞容积、膜电位和 pH 值的稳定^[7]。近年来,关于氯离子通道参与瘢痕化过程的研究逐步深入。本课题组通过体外实验证实氯离子通道阻滞剂 5-硝基-2-(3-苯丙氨基)苯甲酸 [5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, NPPB] 可以抑制人结膜成纤维细胞 (human conjunctival fibroblasts, HConF) 的增生、迁移和细胞外基质合成过程^[8]。Fuchigami 等^[9]研究发现,非洲爪蟾胚胎受伤表皮前缘局部氯离子通道蛋白 CLC-3 表达的增强与伤口闭合有关,提示 CLC-3 参与了伤口愈合过程。Pan 等^[10]用高糖抑制大鼠角质细胞 CLC-2 氯

离子通道之后细胞增生和迁移能力受到抑制。但是 CLC-2 氯离子通道在青光眼术后滤过泡瘢痕化过程的作用尚不清楚。本研究拟通过 RNA 干扰的方法抑制 CLC-2 氯离子通道的表达,观察 CLC-2 氯离子通道在 HConF 凋亡、迁移、胶原合成和胶原收缩过程中的作用以及相关的信号传导通路,寻找抑制青光眼滤过泡瘢痕形成的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HConF 购自美国 ScienCell 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 FM 成纤维细胞专用培养基 (美国 ScienCell 公司); MMC (浙江海正药业股份有限公司); 胎牛血清 (bovine serum albumin, BSA) (美国 Sigma 公司); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 试剂盒、鼠源 β -actin 单克隆抗体 (AF0003) (上海碧云天生物技术有限公司); 鼠源胶原蛋白 (Collagen) I 单克隆抗体 (ab88147)、鼠源 Collagen III 单克隆抗体 (ab6310)、鼠源 PI3K p85 单克隆抗体 (sc-1637)、鼠源 p-PI3K p85 α 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); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG (A0208)、HRP 标记羊抗小鼠 IgG (A0216)、CCK-8 细胞增殖活性检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海贝博公

司);RNAiso Plus(总 RNA 提取试剂)、RNA PCR 试剂盒(AMV) Ver. 3.0、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)(北京 TaKaRa 公司);Stealth 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、脂质体 2000 (lipofectamine 2000, Lipo2000)、OPTI-MEM (美国 Invitrogen Life 公司)。CO₂ 培养箱、低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);超净工作台(日本 Airtech 公司);LightCycler[®] 480 System(瑞士 Roche 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HConF 培养及实验分组

HConF 用成纤维细胞专用培养基 FM 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,FM 成纤维细胞专用培养基内含成纤维细胞生长因子、体积分数 2% BSA、100 U/ml(商品单位)青霉素和 100 μg/ml 链霉素。为排除转染液及 siRNA 载体对细胞功能的影响,将 HConF 分为空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组,其中空白对照组不做任何处理,Lipo2000 组仅用 Lipo2000 处理,无义 siRNA 组用无义 siRNA 和 Lipo2000 处理,CLC-2 siRNA 转染组在无义 siRNA 组的基础上加用 siRNA 处理。siRNA 转染 HConF 实验重复 9 次,其余实验重复进行 3 次。

1.2.2 siRNA 转染 HConF

针对人 CLC-2 基因的 CLC-2 siRNA 由美国 Invitrogen Life 公司合成,stealth CLC-2 siRNA 寡核苷酸序列为 5'-UCCUCAUGAG GAAACGCCUGCUCUU-3',其互补链为 5'-AAGA GCAGGCGUUUCCUCAUGAGGA-3'。待 HConF 生长至 90% 融合时,用 FM 培养基将细胞制成密度为 2.5×10⁵ 个/ml 的细胞悬液,每孔 0.5 ml 接种于 24 孔板铺板,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,用 OPTI-MEM 培养液分别稀释 CLC-2 siRNA(1:20)、无义 siRNA(1:20)和 Lipo2000(1:50),室温放置 5 min;将稀释好的 CLC-2 siRNA 和无义 siRNA 与 Lipo2000 混匀,室温下放置 20 min;将混合物加入相应的细胞培养基中,使 CLC-2 siRNA 和无义 siRNA 最终浓度为 80 nmol/L,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4~6 h,去掉转染液,换为 FM 培养基,继续培养 24 h,荧光显微镜下观察并拍照,计算转染率。培养 24~48 h,进行后续实验及相应指标检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法验证 CLC-2 siRNA 转染 HConF 效果

各组细胞转染后继续培养 48 h,采用 Trizol 试剂抽提各组细胞总 RNA,取 500 ng RNA 在 10 μl 逆转录反应体系中合成 cDNA,以 2 μl cDNA 为

模板加入 CLC-2 基因引物,CLC-2 基因正向引物序列为 5'-CCCTGGTCATCTTC ATTCTCA-3',反向引物序列为 5'-TAGGTGCTGCTGT CCGTATG-3',引物由上海生工生物科技有限公司合成。在 20 μl 体系中进行 PCR 扩增,条件如下:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。溶解曲线分析:95 °C 0 s,20 °C 1 s;65 °C 15 s,20 °C 1 s;95 °C 0 s,0.1 °C 1 s。以 GAPDH 为内参照,GAPDH 基因正向引物序列为 5'-ACCACAGTCCATGCCA TCAC-3',反向引物序列为 5'-TCCACCACCCTG TTGCTGTA-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组 HConF 中 CLC-2 mRNA 相对表达量。

1.2.4 CCK-8 法检测各组 HConF 增生能力

收集生长状态良好的各组 HConF,将密度调至 5×10⁴ 个/ml,按每孔 100 μl 接种于 96 孔板中,培养 24 h,按体积比为 1:10 的比例在待测 96 孔板内加入 CCK-8 溶液,37 °C 培养 4 h,用酶标仪测定各孔在波长 450 nm 处的吸光度(absorbance,A)值。

1.2.5 流式细胞仪检测各组 HConF 凋亡比例

将 HConF 以 2.5×10⁵ 个/ml 密度接种于 6 孔板,每组设 4 个复孔,培养 24 h,收集培养基中的悬浮细胞,使用不含 EDTA 的质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗 2 次,4 °C 下 300×g 离心 5 min,收集细胞,用 1 倍 Annexin V 结合液 400 μl 悬浮细胞,密度调至 1×10⁶ 个/ml;在细胞悬浮液中加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液,混匀,于 4 °C 避光孵育 15 min;加入 PI 染色液后轻轻混匀,4 °C 避光孵育 5 min;350 目尼龙膜过滤。采用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测 Annexin V-FITC 的绿色荧光及 PI 红色荧光。采用流式细胞技术分析软件计算细胞凋亡率。

1.2.6 细胞划痕实验及 Transwell 迁移实验检测各组 HConF 迁移量

(1)细胞划痕实验 将各组 HConF 均匀地接种于 6 孔板,培养过夜后弃去培养基,替换为含 4 μg/ml MMC 的培养基,继续培养 2 h,用 200 μl 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 h 和 24 h 将细胞置于倒置显微镜下观察并拍照,采用 ImageJ 软件测量各个视野划痕面积,细胞迁移率=(初始划痕面积-24 h 后划痕面积)/初始划痕面积×100%。(2)Transwell 迁移实验 将孔径为 8 μm 的 Transwell 小室置于 24 孔培养板中,将 HConF 依据分组方法经过不同的处理,密度调整至 5×10⁵ 个/ml,每组取 200 μl 分别接种于上室,下室加入含 20% BSA

的 DMEM 500 μl , 将 Transwell 小室置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 24 h, 弃去培养基, 并用棉签轻轻擦掉上室未迁移的细胞, 将迁移到下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定并用结晶紫染色, 光学显微镜 200 倍视野下观察并拍照, 每个样品任意选择 6 个视野, 计数每个视野的迁移细胞数, 取平均值, 评估细胞迁移能力。

1.2.7 胶原收缩实验检测各组胶原面积收缩率 采用含 EDTA 的胰蛋白酶收集 HConF, 无血清 MEM 洗 2 次后用 MEM 重悬细胞, 将 5 mg/ml 的 Collagen I 原液、0.1 mol/L NaOH、10 倍 PBS 和 HConF 悬液以 200:12:23:765 的体积比在冰上混合, 混合后 Collagen I 的终质量浓度为 1 mg/ml, 细胞密度为 2×10^5 个/ml。将上述细胞与胶原的混合液以每孔 0.5 ml 均匀接种于 24 孔板, 每组设 4 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 20 min, 胶原凝固, 用 10 μl 无菌枪头将胶块与孔壁分离, 每孔加入 0.5 ml 无血清的 MEM, 继续培养 24 h, 分别于胶块与孔壁分离后 0 h 和 48 h 拍照, 采用 ImageJ 软件测量胶块面积, 胶原面积收缩率 = (0 h 胶块面积 - 48 h 胶块面积) / 0 h 胶块面积 $\times 100\%$ 。

1.2.8 Western blot 法检测各组细胞中 Collagen I、Collagen III、PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平 对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 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分离, 将蛋白从凝胶中转印至 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 α -SMA 多克隆抗体 (1:1 000)、鼠源 Collagen I 单克隆抗体 (1:2 500)、鼠源 Collagen III 单克隆抗体 (1:1 500)、鼠源 PI3K p85 单克隆抗体 (1:500)、鼠源 p-PI3K p85 α 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 β -actin 单克隆抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 HRP 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, 于暗室内用胶片显影, 采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行灰度值半定量分析。以 β -actin 为内参, 计算各组 Collagen I、Collagen III、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 / β -actin 蛋白条带灰度值, 并计算 p-PI3K/PI3K 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。计量

资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CLC-2 mRNA 相对表达量比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组 CLC-2 mRNA 相对表达量分别为 1.00、 0.99 ± 0.03 、 0.98 ± 0.052 和 0.43 ± 0.048 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 90.110$, $P < 0.001$), 其中 Lipo2000 组和无义 siRNA 组 CLC-2 mRNA 相对表达量与空白对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.820$ 、 0.640); 与无义 siRNA 组比较, CLC-2 siRNA 转染组 CLC-2 mRNA 相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 1)。

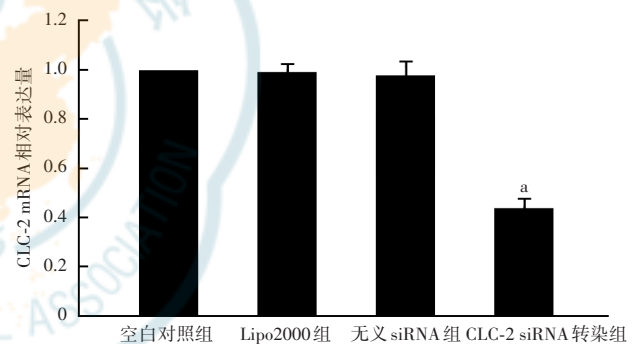


图 1 各组 HConF 中 CLC-2 mRNA 相对表达量比较 $F = 90.110$, $P < 0.001$. 与无义 siRNA 组相比, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA

Figure 1 Comparison of expression levels of CLC-2 mRNA in HConF among four groups $F = 90.110$, $P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

2.2 各组细胞增生能力比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组细胞 A 值分别为 1.71 ± 0.10 、 1.73 ± 0.07 、 1.80 ± 0.08 和 0.65 ± 0.09 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 198.680$, $P < 0.001$), 其中 Lipo2000 组和无义 siRNA 组细胞 A 值与空白对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.723$ 、 0.129), CLC-2 siRNA 转染组细胞 A 值较无义 siRNA 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 2)。

2.3 各组 HConF 凋亡率比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组细胞凋亡率分别为 $(4.78 \pm 1.10)\%$ 、 $(4.54 \pm 1.51)\%$ 、 $(4.82 \pm 0.88)\%$ 和 $(28.90 \pm 0.91)\%$, 总

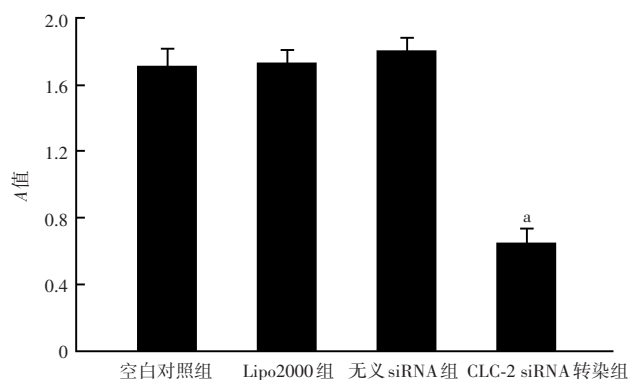


图 2 各组 HConF 增生 A 值比较 $F = 198.680, P < 0.001$. 与无义 siRNA 组相比, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) A: 吸光度; Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA
Figure 2 Comparison of proliferation A value of HConF among four groups $F = 198.680, P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) A: absorbance; Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

体比较差异有统计学意义 ($F = 363.260, P < 0.001$), 其中 Lipo2000 组和 无义 siRNA 组的细胞凋亡率与空白对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.783, 0.976$), 与无义 siRNA 组比较, CLC-2 siRNA 转染组细胞凋亡率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 3)。

2.4 各组 HConF 迁移量比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组细胞迁移率分别为 $(35.0 \pm 1.4)\%$ 、 $(32.4 \pm 2.5)\%$ 、 $(35.1 \pm 2.3)\%$ 和 $(5.7 \pm 1.4)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 74.493, P < 0.001$), 其中 Lipo2000 组和 无义 siRNA 组与空白对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.377, 0.745$); 与无义 siRNA 组比较, CLC-2 siRNA 转染组细胞迁移率明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 4)。Transwell 迁移实验

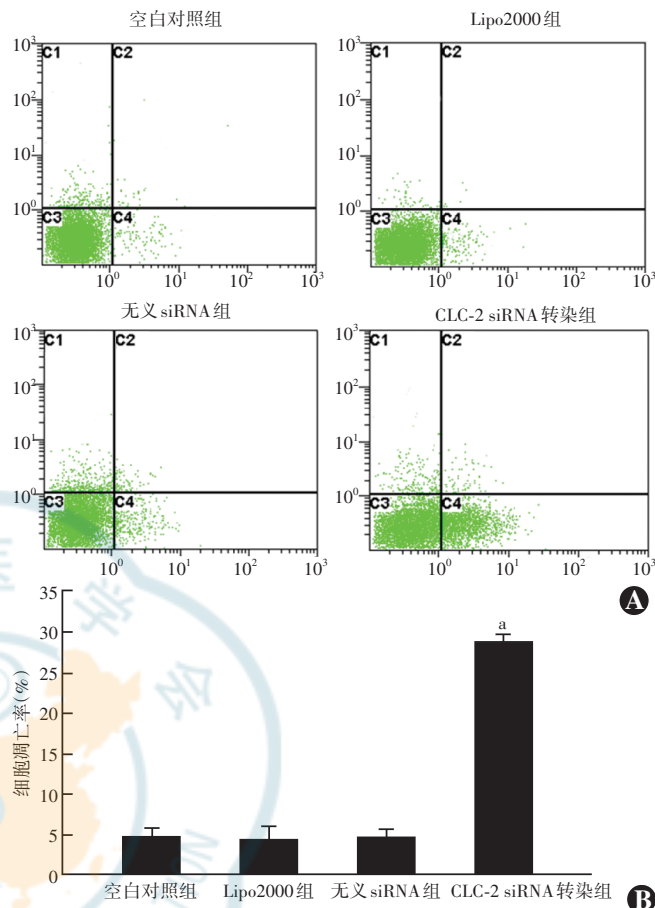


图 3 各组 HConF 凋亡情况比较 A: 细胞凋亡流式细胞图 C1: 死亡细胞; C2: 晚期凋亡细胞; C3: 正常细胞; C4: 早期凋亡细胞 B: 各组细胞凋亡率的量化比较 $F = 363.260, P < 0.001$. 与无义 siRNA 组相比, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) siRNA: 小干扰 RNA; Lipo2000: 脂质体 2000
Figure 3 Comparison of HConF apoptosis among four groups A: Flow cytometry scatter plots of HConF apoptosis C1: dead cells; C2: late apoptotic cells; C3: normal cells; C4: early apoptotic cells B: Comparison of apoptosis rate among four groups $F = 363.260, P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) siRNA: small interfering RNA; Lipo2000: lipofectamine 2000

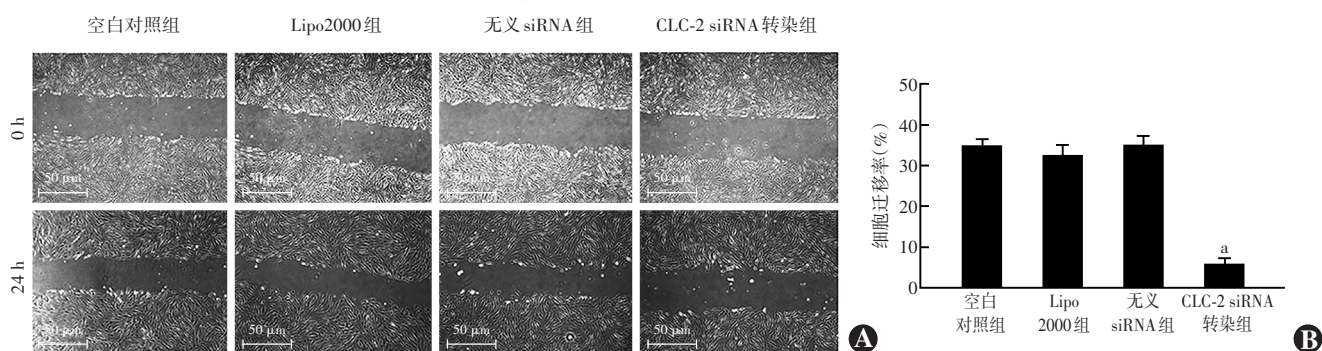


图 4 细胞划痕实验检测各组 HConF 迁移情况 A: 细胞划痕图 ($\times 100$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: 各组细胞迁移率比较 $F = 74.493, P < 0.001$. 与无义 siRNA 组相比, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA
Figure 4 Wound scratch assay for the migratory ability of HConF in four groups A: Images of HConF captured after scratch ($\times 100$, bar = $50 \mu\text{m}$) B: Comparison of HConF migration rate among four groups $F = 74.493, P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

结果显示,空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组每个视野细胞迁移数量分别为 (236.0±4.2)、(238.2±4.7)、(243.6±6.1) 和 (67.6±6.9) 个/视野,总体比较差异有统计学意义 ($F = 1\ 625.431, P < 0.001$),其中 Lipo2000 组和无义 siRNA 组细胞迁移数量与空白对照组比较,差异均无统计学意义 ($P = 0.511, 0.153$);CLC-2 siRNA 转染组细胞迁移数量较无义 siRNA 组明显减少,差异有统计学意义 ($P = 0.001$) (图 5)。

2.5 各组 HConF 胶原面积收缩率比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组细胞胶原面积收缩率分别为 (48.0±2.1)%、(47.6±2.9)%、(50.2±3.1)% 和 (15.0±2.2)% ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 104.692, P < 0.001$),其中 Lipo2000 组和无义 siRNA 组细胞胶原面积收缩率与空白对照组相比,差异均无统计学意义 ($P = 0.870, 0.100$),CLC-2 siRNA 转染组细胞胶原面积收缩率明显低于无义 siRNA 组,差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 6)。

2.6 各组 HConF 中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组 Collagen I 蛋白相对表达量分别为 0.83±0.05、0.79±0.04、0.81±0.02 和 0.42±0.03, Collagen III 蛋白相对表达量分别为 0.85±0.04、0.83±0.06、0.88±0.04 和 0.19±0.03,各组之间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 112.073, 456.931$, 均 $P < 0.001$),其中与空白对照组相比,Lipo2000 组和无义 siRNA 组 Collagen I 和 Collagen III 蛋白相对表达量差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$),CLC-2 siRNA 转染组 Collagen I 和 Collagen III 蛋白相对表达量较无义 siRNA 组明显降低,差异

均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 7)。

2.7 各组 HConF 中 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平比较

空白对照组、Lipo2000 组、无义 siRNA 组和 CLC-2 siRNA 转染组 p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量比值分别为 0.80±0.01、0.82±0.03、0.79±0.04、0.25±0.04, p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比值分别为 0.62±0.04、0.66±0.03、0.60±0.02、0.45±0.05,各组之间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 340.889, 43.021$, 均 $P < 0.001$),其中与空白对照组相比,Lipo2000 组和无义 siRNA 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比值差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$),与无义 siRNA 组相比,CLC-2 siRNA 转染组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比值明显降低,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 8)。

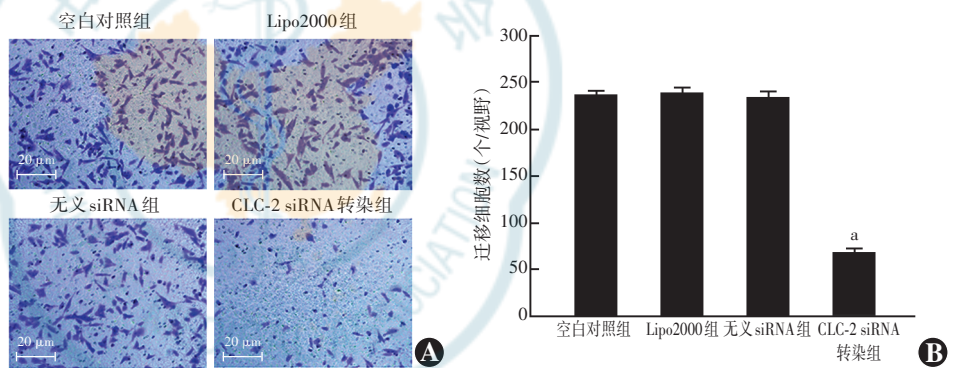


图 5 Transwell 小室迁移实验检测各组 HConF 迁移情况 A: 各组细胞 Transwell 小室迁移情况 (结晶紫 ×200, 标尺 = 20 μm) B: 各组迁移细胞数比较 $F = 1\ 625.431, P < 0.001$. 与无义 siRNA 组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA

Figure 5 Transwell migration assay of HConF in four groups A: Migration of HConF (Crystal violet × 200, bar = 20 μm) B: Comparison of the number of migrating HConF among four groups $F = 1\ 625.431, P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

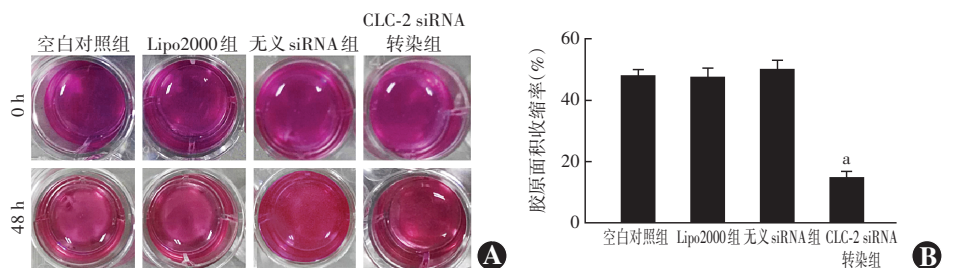


图 6 各组胶原收缩情况 A: 各组胶原收缩图 B: 各组胶原收缩面积量化比较 $F = 104.692, P < 0.001$. 与无义 siRNA 组相比, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA

Figure 6 Collagen gel contraction assay of HConF A: Contraction of HConF in four groups at different time points B: Comparison of contraction ratio among four groups $F = 104.692, P < 0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

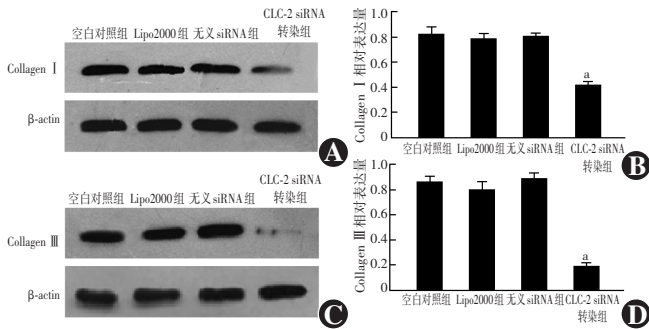


图 7 各组 HConF 中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平
 A: 各组 Collagen I 蛋白表达电泳图 B: 各组 Collagen I 蛋白表达水平量化比较 $F=112.073, P<0.001$ 。与无义 siRNA 组相比, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) C: 各组 Collagen III 蛋白表达电泳图 D: 各组 Collagen III 蛋白表达水平量化比较 $F=456.931, P<0.001$ 。与无义 siRNA 组相比, $^a P<0.001$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA; Collagen: 胶原蛋白; β -actin: β 肌动蛋白

Figure 7 Expression of collagen I and collagen III protein in HConF of four groups by Western blot A: Electrophoretogram of collagen I protein B: Comparison of collagen I protein expression level among four groups $F=112.073, P<0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) C: Electrophoretogram of collagen III protein D: Comparison of collagen III protein expression among four groups $F=456.931, P<0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

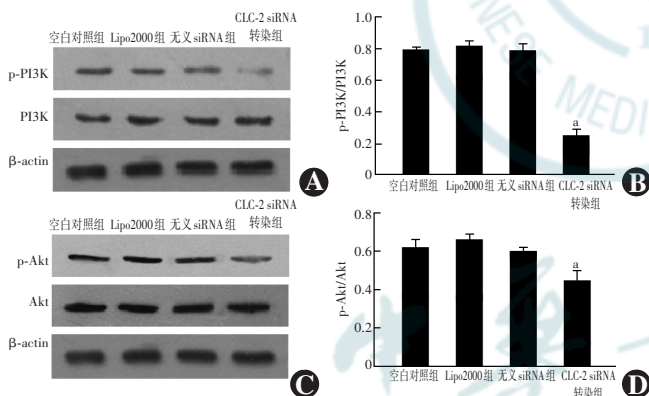


图 8 各组 HConF 中 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平
 A: 各组 p-PI3K、PI3K 蛋白表达电泳图 B: 各组 p-PI3K/PI3K 蛋白表达量量化比较 $F=340.889, P<0.001$ 。与无义 siRNA 组相比, $^a P<0.001$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) C: 各组 p-Akt、Akt 蛋白表达电泳图 D: 各组 p-Akt/Akt 蛋白表达量量化比较 $F=43.021, P<0.001$ 。与无义 siRNA 组相比, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=3$) Lipo2000: 脂质体 2000; siRNA: 小干扰 RNA; β -actin: β 肌动蛋白

Figure 8 Expression of p-PI3K and p-Akt protein in four groups by Western blot A: Electrophoretogram of p-PI3K and PI3K proteins B: Comparison of p-PI3K/PI3K protein expression level among four groups $F=340.889, P<0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) C: Electrophoretogram of p-Akt and Akt proteins D: Comparison of p-Akt/Akt protein expression level among four groups $F=43.021, P<0.001$. Compared with nonsense siRNA group, $^a P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) Lipo2000: lipofectamine 2000; siRNA: small interfering RNA

3 讨论

随着医学的发展,近年来多种微创手术在治疗青光眼上取得了一定疗效,但滤过手术因其显著的降眼压效果仍为目前治疗青光眼的主流术式。在手术创伤的刺激下, HConF 通过增生、向创面迁移、促进胶原合成以及胶原收缩,从而引起滤过泡瘢痕形成,是影响青光眼滤过手术成功率的主要原因^[11]。很多研究者致力于研究抑制滤过泡瘢痕形成的方法,以期提高青光眼滤过术的成功率^[12-17],如 Li 等^[14]研究发现,二甲双胍通过激活 AMPK/Nrf2 信号通路抑制纤维化及炎症因子表达,从而抑制大鼠滤过泡瘢痕形成; Liang 等^[15]研究发现,全反式维甲酸 (all-trans-retinoic acid, ATRA) 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 HConF 的纤维化过程,抑制滤过泡瘢痕形成;也有研究探讨调控青光眼滤过术后瘢痕形成过程的基因发现,非编码长链 RNA H19 和 RNA 28 在人 Tenon 囊成纤维细胞的纤维化过程中均起重要调控作用,可通过靶向抑制相关基因的表达来调控 Tenon 囊成纤维细胞纤维化,从而抑制滤过泡瘢痕化^[16-17]。

大多数抗瘢痕化的研究均着眼于通过抑制成纤维细胞的增生、促进其凋亡来达到抑制瘢痕形成的作用,然而,有研究发现,使用抗增生的方法抑制成纤维细胞增生后,成纤维细胞仍然可以向创面迁移,进而导致创面瘢痕形成^[18]。而且,抗代谢药物的毒性作用和不良反应往往较大,目前临床上用于青光眼滤过手术的抗代谢药物 MMC 和 5-Fu 可以提高滤过手术的成功率,但是,降低药物浓度致其抗瘢痕作用不足,增加药物浓度可以达到抗瘢痕化的效果但可出现明显的毒性作用和不良反应,如滤过泡渗漏、角膜上皮缺损、滤过泡炎和眼内炎等^[2]。因此,寻找对 HConF 增生、迁移、胶原合成及胶原收缩等一系列纤维化过程均起到抑制作用且毒性作用和不良反应较小的方法,可以达到更好的抗瘢痕化效果。

电压门控氯离子通道是广泛表达在哺乳动物细胞中的一种跨膜蛋白,在维持细胞容积的动态平衡、调节细胞的电生理活动等方面发挥着重要作用,目前发现的电压门控氯离子通道有 CLC-1、CLC-2、CLC-3、CLC-4、CLC-5、CLC-6、CLC-7、CLC-Ka 和 CLC-Kb 这 9 个亚型^[19-20]。在人眼小梁网细胞中检测到了除 CLC-1 外其他所有亚型的表达,其中 CLC-2 和 CLC-3 表达量高于其他亚型,CLC-2 和 CLC-3 表达量会不同程度受眼压波动等因素的影响^[21]。CLC-2 和 CLC-3 氯离子通道是目前研究较清楚的 2 种亚型。Wang

等^[22]研究发现,CLC-2 氯离子通道在人小梁网细胞增生、凋亡和吞噬中起重要作用,CLC-2 氯离子通道通过转化生长因子 β /Smad 信号转导通路维持小梁网细胞骨架的正常结构和生理功能。氯离子通道除了维持小梁网的正常功能外,在眼部其他组织中也起重要作用,Bi 等^[23]研究证实 CLC-2 蛋白在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC)-5 中有表达,CLC-2 氯离子通道通过抑制 RGC-5 细胞凋亡起到视神经保护作用。Niu 等^[24]研究发现,人眼晶状体上皮细胞中存在 CLC-3 的表达,CLC-3 可通过抑制过氧化氢和光照诱导的氧化应激、内质网应激,减少线粒体途径的细胞凋亡,从而对晶状体上皮细胞起保护作用。本课题组用氯离子通道阻滞剂 NPPB 非特异性阻断氯离子通道后,HConF 纤维化受到抑制^[8],本研究通过 RNA 干扰的方法抑制 CLC-2 氯离子通道的表达,观察其对 HConF 纤维化过程的影响,结果发现抑制 CLC-2 基因表达可促进 HConF 凋亡。Cheng 等^[25]通过氯离子通道阻滞剂 CLC-3 基因敲除的方法抑制人支气管上皮细胞氯离子通道,发现细胞凋亡数量增加,相反,CLC-3 基因过表达会抑制人支气管上皮细胞凋亡。Zhang 等^[26]研究证实,抑制 CLC-3 基因表达会促进 PC12 细胞凋亡,而 CLC-3 基因过表达则抑制 PC12 细胞凋亡。然而,Small 等^[27]和 Maeno 等^[28]研究显示,NPPB 阻滞氯离子通道可抑制细胞凋亡。也有研究在鼻咽癌 CNE-2Z 细胞中发现,氯离子通道阻滞剂可以抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡,并进一步通过 CLC-3 siRNA 抑制 CLC-3 基因表达,证实参与紫杉醇诱导细胞凋亡的氯离子通道可能是 CLC-3^[29]。分析以上结果,可能与不同细胞种类中氯离子通道对细胞凋亡的调控作用不同有关。

在创口愈合过程中,成纤维细胞在炎症因子的刺激下向创口趋化迁移,并合成胶原蛋白,进一步引起胶原蛋白收缩,从而促进创口愈合。本研究通过细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验发现,抑制 CLC-2 基因表达之后,HConF 的迁移能力下降。Pan 等^[10]研究发现,用 RNA 干扰的方法抑制 CLC-2 氯离子通道表达会抑制人角质细胞的迁移能力;Guan 等^[30]用 CLC-3 siRNA 抑制宫颈鳞状细胞癌细胞的 CLC-3 基因表达,造成细胞增生和迁移能力下降,与本研究结果一致。本研究采用 Western blot 法检测 CLC-2 基因敲减对胶原蛋白合成的影响,并进一步用 Collagen I 制作三维细胞培养模型,观察 CLC-2 基因对胶原收缩的影响,结果显示 CLC-2 基因敲减可抑制 Collagen I 和 Collagen III 合成,进而导致胶原收缩能力下降。多项研究已经发现氯离子通道在胶原收缩中起一定的调控作用

用^[31-33]。Qi 等^[31]研究发现,氯离子通道阻滞剂 4,4'-二异硫氰基芪-2,2'-二磺酸通过抑制人肺成纤维细胞胶原合成及胶原收缩抑制肺纤维化过程;CLC-1、CLC-4 和 CLC-5 氯离子通道通过参与 Collagen IV 胶原蛋白合成在心房纤颤的发病过程中发挥调控作用^[32]。Shukla 等^[33]也证实通过抑制 CLC-4 氯离子通道可以减少转化生长因子 β 1 诱导的小鼠真皮成纤维细胞的细胞外基质合成。

PI3K/Akt 通路已被证明在许多类型细胞的生理和病理中发挥关键作用。该通路的关键酶 PI3K 将磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸,与 Akt 和 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 结合,使 Akt 磷酸化。Akt 的激活可引起下游靶细胞的一系列反应,从而调节细胞功能^[34-35]。CLC-3 氯离子通道通过 PI3K/Akt 信号通路调控宫颈鳞状细胞癌细胞的增生和迁移^[30];CLC-2 氯离子通道也可通过 PI3K/Akt 信号通路调控多种细胞的增生和迁移^[10,36]。为进一步探索 CLC-2 氯离子通道参与 HConF 纤维化过程的信号通路,本研究中结果显示抑制 CLC-2 基因表达后 PI3K 和 Akt 的磷酸化比例均下降,表明 CLC-2 基因敲减可通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 HConF 的纤维化过程。

综上所述,本研究结果表明抑制 CLC-2 基因表达可以促进 HConF 凋亡,抑制 HConF 的迁移、胶原合成及胶原收缩,提示通过基因敲减或其他手段抑制 CLC-2 基因表达可抑制青光眼术后滤过泡瘢痕化,为寻找抗青光眼术后瘢痕化新方法提供了依据。下一步我们将观察过表达 CLC-2 氯离子通道对 HConF 纤维化作用,并通过动物实验验证细胞实验所得结论。本研究仅进行了 PI3K/Akt 信号通路的检测,对信号通路的研究不够完善,尚需进一步检测其下游蛋白的表达,系统阐明 CLC-2 信号通路调控 HConF 纤维化的机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 孙丽霞:参与选题和研究设计、研究过程指导、文章主要内容修改和定稿;吴沙仁高娃:参与研究设计和实施研究、分析数据、论文撰写及修改和定稿;崔仁哲、卢迪:实施研究;丁浩轩:资料分析

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] 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.
- [3] Zhang Y, Zhu S, Xu X, et al. *In vitro* study of combined application of

- bevacizumab and 5-fluorouracil or bevacizumab and mitomycin C to inhibit scar formation in glaucoma filtration surgery [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2019, 2019 : 7419571 [2021-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31885893/>. DOI:10.1155/2019/7419571.
- [4] Sharma A, Anumanthan G, Reyes M, et al. Epigenetic modification prevents excessive wound healing and scar formation after glaucoma filtration surgery [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57 (7) : 3381-3389. DOI:10.1167/iovs.15-18750.
- [5] 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/iovs.16-21163.
- [6] Masoumpour MB, Nowroozzadeh MH, Razeghinejad MR. Current and future techniques in wound healing modulation after glaucoma filtering surgeries [J]. *Open Ophthalmol J*, 2016, 10 : 68-85. DOI:10.2174/1874364101610010068.
- [7] Stauber T, Weinert S, Jentsch TJ. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters [J]. *Compr Physiol*, 2012, 2 (3) : 1701-1744. DOI:10.1002/cphy.c110038.
- [8] Sun L, Dong Y, Zhao J, et al. NPPB modulates apoptosis, proliferation, migration and extracellular matrix synthesis of conjunctival fibroblasts by inhibiting PI3K/AKT signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (3) : 1331-1338. DOI:10.3892/ijmm.2017.3323.
- [9] Fuchigami T, Matsuzaki T, Ihara S. Possible roles of ENaC and Cl(-) channel in wound closure in *Xenopus laevis* embryos [J]. *Zoolog Sci*, 2011, 28 (10) : 703-711. DOI:10.2108/zsj.28.703.
- [10] 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.
- [11] Khaw PT, Chang L, Wong TT, et al. Modulation of wound healing after glaucoma surgery [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2001, 12 (2) : 143-148. DOI:10.1097/00055735-200104000-00011.
- [12] Wang W, Deng Ai, He S, et al. A key role of microRNA-26a in the scar formation after glaucoma filtration surgery [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46 (4) : 831-837. DOI:10.3892/etm.2018.5984.
- [13] Holló G. Wound healing and glaucoma surgery: modulating the scarring process with conventional antimetabolites and new molecules [J]. *Dev Ophthalmol*, 2017, 59 : 80-89. DOI:10.1159/000458488.
- [14] Li X, Leng Y, Jiang Q, et al. Eye drops of metformin prevents fibrosis after glaucoma filtration surgery in rats via activating AMPK/Nrf2 signaling pathway [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11 : 1038 [2021-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32903813/>. DOI:10.3389/fphar.2020.01038.
- [15] Liang L, Wang X, Zheng Y, et al. All-trans-retinoic acid modulates TGF- β -induced apoptosis, proliferation, migration and extracellular matrix synthesis of conjunctival fibroblasts by inhibiting PI3K/AKT signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (3) : 2929-2935. DOI:10.3892/mmr.2019.10507.
- [16] Zhu H, Dai L, Li X, et al. Role of the long noncoding RNA H19 in TGF- β 1-induced Tenon's capsule fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition [J/OL]. *Exp Cell Res*, 2020, 387 (2) : 111802 [2021-07-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31877306/>. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.111802.
- [17] Sui H, Fan S, Liu W, et al. LINC00028 regulates the development of TGF β 1-treated human tenon capsule fibroblasts by targeting miR-204-5p [J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020 [2021-07-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085895/>. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.01.096.
- [18] Ocleston NL, Daniels JT, Tarnuzzer RW, et al. Single exposures to antiproliferatives; long-term effects on ocular fibroblast wound-healing behavior [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38 (10) : 1998-2007. DOI:10.1097/00004397-199703740-00022.
- [19] Altamura C, Desaphy JF, Conte D, et al. Skeletal muscle CLC-1 chloride channels in health and diseases [J]. *Pflugers Arch*, 2020, 472 (7) : 961-975. DOI:10.1007/s00424-020-02376-3.
- [20] Saberbaghi T, Wong R, Rutka JT, et al. Role of Cl-channels in primary brain tumour [J]. *Cell Calcium*, 2019, 81 : 1-11. DOI:10.1016/j.ceca.2019.05.004.
- [21] Comes N, Gasull X, Gual A, et al. Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80 (6) : 801-813. DOI:10.1016/j.exer.2004.12.009.
- [22] Wang HW, Zheng YJ. Effect of CLC-2 on the cytoskeleton in human trabecular meshwork cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8 (4) : 1099-1105. DOI:10.3892/mmr.2013.1619.
- [23] Bi MM, Hong S, Ma LJ, et al. Chloride channel protein 2 prevents glutamate-induced apoptosis in retinal ganglion cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19 (7) : 705-711.
- [24] Niu L, Liu X, Zhao J, et al. 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid induces apoptosis of human lens epithelial cells via reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress through the mitochondrial apoptosis pathway [J/OL]. *Int J Mol Med*, 2021, 47 (4) : 59 [2021-07-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33604681/>. DOI:10.3892/ijmm.2021.4892.
- [25] Cheng G, Shao Z, Chaudhari B, et al. Involvement of chloride channels in TGF- β 1-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293 (5) : L1339-L1347. DOI:10.1152/ajplung.00121.2007.
- [26] Zhang HN, Zhou JG, Qiu QY, et al. CLC-3 chloride channel prevents apoptosis induced by thapsigargin in PC12 cells [J]. *Apoptosis*, 2006, 11 (3) : 327-336. DOI:10.1007/s10495-006-3980-2.
- [27] Small DL, Tauskela J, Xia Z. Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 334 (2) : 95-98. DOI:10.1016/s0304-3940(02)01107-2.
- [28] Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (17) : 9487-9492. DOI:10.1073/pnas.140216197.
- [29] Zhang H, Li H, Yang L, et al. The CLC-3 chloride channel associated with microtubules is a target of paclitaxel in its induced-apoptosis [J/OL]. *Sci Rep*, 2013, 3 : 2615 [2021-07-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24026363/>. DOI:10.1038/srep02615.
- [30] Guan Y, Luan Y, Xie Y, et al. Chloride channel-3 is required for efficient tumour cell migration and invasion in human cervical squamous cell carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 153 (3) : 661-669. DOI:10.1016/j.ygyno.2019.03.006.
- [31] Qi S, den Hartog GJ, Bast A. Superoxide radicals increase transforming growth factor-beta1 and collagen release from human lung fibroblasts via cellular influx through chloride channels [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 237 (1) : 111-118. DOI:10.1016/j.taap.2009.02.019.
- [32] Jiang YY, Hou HT, Yang Q, et al. Chloride channels are involved in the development of atrial fibrillation—a transcriptomic and proteomic study [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 10215 [2021-07-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860555/>. DOI:10.1038/s41598-017-10590-w.
- [33] Shukla A, Edwards R, Yang Y, et al. CLIC4 regulates TGF- β -dependent myofibroblast differentiation to produce a cancer stroma [J]. *Oncogene*, 2014, 33 (7) : 842-850. DOI:10.1038/onc.2013.18.
- [34] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803 (9) : 991-1002. DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.04.005.
- [35] Weichhart T, Säemann MD. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications [J/OL]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67 Suppl 3 : iii70-74 [2021-05-07]. https://ard.bmj.com/content/67/Suppl_3/iii70.long. DOI:10.1136/ard.2008.098459.
- [36] Heo KS, Ryoo SW, Kim L, et al. Cl-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.

(收稿日期:2021-08-10 修回日期:2022-02-16)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

