

NADPH 氧化酶 4 抑制剂对贝伐单抗诱导人 RPE 细胞上皮-间质转化的抑制作用

谢超慧¹ 郝相慧² 杨玲玲² 徐海峰²

¹青岛大学医学部, 青岛 266071; ²山东省第一医科大学附属眼科研究所 山东第一医科大学附属青岛眼科医院 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 青岛 266071

通信作者: 徐海峰, Email: chxhf@126.com

【摘要】 目的 观察还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4 (NOX4) 抑制剂对贝伐单抗诱导人视网膜色素上皮 (RPE) 细胞发生上皮-间质转化 (EMT) 的影响。方法 将人 RPE 细胞系 ARPE-19 细胞分为空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组, 其中空白对照组不做任何处理, 贝伐单抗组、贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组培养基中分别加入 0.25 g/L 贝伐单抗、0.25 g/L 贝伐单抗+3 $\mu\text{mol/L}$ VAS2870、0.25 g/L 贝伐单抗+20 $\mu\text{mol/L}$ GKT137831 培养 72 h, VAS2870 和 GKT137831 均为 NOX4 抑制剂。采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法测定 NOX4 和 EMT 标志物纤维连接蛋白 (FN)、波形蛋白 (Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 及紧密连接相关蛋白闭锁小带蛋白-1 (ZO-1) mRNA 和蛋白表达水平; 采用细胞免疫荧光染色法验证 NOX4 和 EMT 标志物蛋白在各组细胞中的表达情况。结果 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示, 空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 和 NOX4 mRNA 和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (mRNA: $F = 97.07, 195.40, 722.40, 38.56, 70.81$, 均 $P < 0.001$; 蛋白: $F = 23.09, 64.58, 58.19, 26.97, 63.19$, 均 $P < 0.001$), 其中贝伐单抗组 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于空白对照组, ZO-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于贝伐单抗组, ZO-1 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于贝伐单抗组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 贝伐单抗组 FN、Vimentin、 α -SMA 荧光强度强于空白对照组, ZO-1 荧光强度弱于空白对照组; 贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组 FN、Vimentin、 α -SMA 荧光强度弱于贝伐单抗组, ZO-1 荧光强度强于贝伐单抗组。结论 NOX4 参与了贝伐单抗诱导 RPE 细胞 EMT 的发生, NOX4 抑制剂可减轻贝伐单抗诱导人 RPE 细胞的 EMT 程度。

【关键词】 贝伐单抗; 视网膜色素上皮细胞; 上皮-间质转化; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶-4; 抑制剂

基金项目: 国家科技重大专项基金项目 (2017ZX09304010); 国家自然科学基金项目 (81670828)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210407-00234

Inhibitory effects of NADPH oxidase 4 inhibitor on the epithelial-mesenchymal transition of human RPE cells induced by bevacizumab

Xie Chaohui¹, Hao Xianghui², Yang Lingling², Xu Haifeng²

¹Medical College, Qingdao University, Qingdao 266071, China; ²Eye Institute of Shandong First Medical University, Qingdao Eye Hospital of Shandong First Medical University, State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Xu Haifeng, Email: chxhf@126.com

[Abstract] **Objective** To observe the influence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) 4 inhibitors on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (RPE) cells induced by bevacizumab. **Methods** The cultured ARPE-19 cells were divided into blank control group, bevacizumab group, bevacizumab+VAS2870 group and bevacizumab+GKT137831 group. Cells were cultured with 0.25 g/L bevacizumab, 0.25 g/L bevacizumab plus 3 $\mu\text{mol/L}$ VAS2870 (a NOX4 inhibitor), 0.25 g/L bevacizumab plus 20 $\mu\text{mol/L}$ GKT137831 (a NOX4 inhibitor) for 72 hours according to grouping. No intervention was administered to the blank control group. The mRNA and protein expression levels of NOX4 and EMT markers including fibronectin (FN), vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA) and tight junction related protein zonula

occludens-1 (ZO-1) were measured by real-time PCR and Western blot assay, and the expression levels in different intervention groups were compared. The expressions of NOX4 and EMT markers were verified by immunofluorescence staining. **Results** There were statistically significant differences in the relative mRNA and protein expression levels of FN, vimentin, α -SMA, ZO-1 and NOX4 among blank control group, bevacizumab group, bevacizumab+VAS2870 group and bevacizumab+GKT137831 group (mRNA: $F = 97.07, 195.40, 722.40, 38.56, 70.81$; all at $P < 0.001$. Protein: $F = 23.09, 64.58, 58.19, 26.97, 63.19$; all at $P < 0.001$). The relative mRNA and protein expression levels of FN, vimentin, α -SMA and NOX4 were significantly higher and the relative mRNA and protein expression level of ZO-1 was significantly lower in bevacizumab group than those in blank control group (all at $P < 0.05$). The relative mRNA and protein expression levels of FN, vimentin, α -SMA and NOX4 were significantly lower and the relative mRNA and protein expression levels of ZO-1 were significantly higher in bevacizumab+VAS2870 and bevacizumab+GKT137831 groups than those in bevacizumab group (all at $P < 0.05$). The immunofluorescence intensity of FN, vimentin and α -SMA was stronger and the immunofluorescence intensity of ZO-1 was weaker in bevacizumab group than blank control group. The immunofluorescence intensity of FN, vimentin and α -SMA were weaker and the immunofluorescence intensity of ZO-1 was stronger in bevacizumab+VAS2870 group and bevacizumab+GKT137831 group than those in bevacizumab group. **Conclusions** NOX4 is involved in the bevacizumab-induced EMT of human RPE cells, the degree of which can be reduced by NOX4 inhibitors.

[Key words] Bevacizumab; Retinal pigment epithelial cells; Epithelial-mesenchymal transition; NADPH oxidase 4; Inhibitor

Fund program: National Science and Technology Major Project (2017ZX09304010); National Natural Science Foundation of China (81670828)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210407-00234

目前,眼底新生血管性疾病的一线治疗方法是玻璃体腔内注射抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物^[1]。然而,随着抗 VEGF 制剂临床应用的日益广泛及随访时间的延长,发现抗 VEGF 治疗后无论是脉络膜还是视网膜新生血管均可发生严重纤维化,尤其是视网膜新生血管纤维化,短期内即可造成牵拉性视网膜脱离^[2],脉络膜新生血管纤维化也严重影响视功能的恢复^[3]。因此,在抗 VEGF 治疗的同时如何减轻新生血管纤维化引起了广泛关注^[4]。本课题组前期研究证实,贝伐单抗对纤维化发生过程有调控作用,抗 VEGF 处理后纤维化及炎性因子的表达水平发生变化^[5-6]。有研究表明,抗 VEGF 处理后,RPE 细胞中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平也明显升高,抗氧化功能降低,ROS 水平升高与细胞纤维化发生直接相关^[7-8]。ROS 在视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中起到促进作用^[9]。机体细胞中产生 ROS 的一个主要来源是还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶介导的氧化应激反应^[10-11]。NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)表达于血管内皮和血管平滑肌等多种细胞内,是血管系统 ROS 的主要来源。本课题组前期研究发现 NOX4 的过度表达使 ROS 水平升高,而抑制 NOX4 活性仅降低了 ROS 产生的基础水平,这表明 NOX4 并非刺激内皮细胞产生 ROS 的主要

酶^[12]。已有研究发现,缺氧可引起细胞中 NOX 高表达,也可诱导肾小管上皮细胞纤维化^[13]。抑制 NOX 表达可抑制血管内皮细胞增生^[14-15]。这些发现提示 NOX4 的表达在细胞纤维化中发挥重要作用。EMT 的特征之一在于诱导上皮基因的丢失以及多种细胞外基质蛋白的表达^[16-17]。闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)是细胞紧密连接重要组成蛋白之一,其穿梭于质膜和细胞核或细胞质之间,参与信号传导途径。EMT 发生期间,ZO-1 分子受到破坏,其参与细胞骨架构成和维持细胞极性的特性减弱,细胞发生形态学变化。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)作为一种高分子量糖蛋白,主要以 3 种形式存在,其中 1 种是由成纤维细胞和早期间充质细胞分泌合成,并在 EMT 过程中生成量增加^[18]。波形蛋白(Vimentin)是中间丝的其中 1 种蛋白质,其与微管及肌动蛋白微细丝组成细胞骨架,可锚定和支撑间充质细胞胞质内的细胞器,可作为 EMT 的标志物。与此机制相似的因子还有 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。NOX 在促进视网膜血管纤维化中有潜在作用^[18],已有研究证实 NOX 可调节 VEGF 的表达^[19],然而至今尚无 NOX 调控 RPE 细胞发生 EMT 的直接证据。本研究拟探讨 NOX4 抑制剂对抗 VEGF 治疗导致的人 RPE 细胞发生 EMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ARPE-19 细胞系购于上海赛百慷生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F-12 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司);贝伐单抗(瑞士 Genentech 公司);NOX4 抑制剂 VAS2870 和 GKT137831(美国 MCE 公司);驴血清蛋白、高效 RIPA 细胞快速裂解液、苯甲基磺酰氟(北京索莱宝科技有限公司);PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);Trizol、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、兔抗人 ZO-1 一抗(40-2300)(美国 Invitrogen 公司);兔抗人 Vimentin 一抗(10366-1-AP)、488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(SA00013-2)(美国 Proteintech 公司);兔抗人 α -SMA 一抗(ab32575)、兔抗人 FN 一抗(ab2413)、兔抗人 NOX4 一抗(ab133303)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(ab8245)、生物素标记羊抗兔二抗(ab150077)(英国 Abcam 公司);化学发光液(美国 Millipore 公司)。T75 细胞培养瓶及 6 孔板(美国 Corning 公司);激光扫描共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司);荧光定量 PCR 仪、Western blot 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 采用含有体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和链霉素混合液的 DMEM 培养基、在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 ARPE-19 细胞,3~4 d 传代。将传代后的 RPE 细胞按 1×10⁶ 个/ml 接种于 6 孔板中,达到 60%~70% 融合时更换为含有 2% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基,并将细胞分为空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组,其中空白对照组不做任何处理,贝伐单抗组、贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组培养基中分别加入 0.25 g/L 贝伐单抗、0.25 g/L 贝伐单抗+3 μ mol/L VAS2870、0.25 g/L 贝伐单抗+20 μ mol/L GKT137831 继续培养 72 h。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 及 NOX4 mRNA 的表达 收集各组细胞,用 Trizol 提取细胞中的总 RNA,按照试剂盒说明逆转录为 cDNA。引物由青岛德罗海达生物技术有限公司设计并合成。FN 正向引物序列:5'-GGGACCGTCAGGGAGAAAA-3',反向引物序列:5'-CGAGATATTCCTTCTGCCACTGTT-3';Vimentin 正向引物序列:5'-GCAGGAGGCAGAAGAATGGTA-3',反向引物序列:5'-GGGACTCATGGTTCCTTTAAGG-3'; α -SMA

正向引物序列:5'-GGTGACGAAGCACAGAGCAA-3',反向引物序列:5'-CAGGGTGGGATGCTCTTCAG-3';ZO-1 正向引物序列:5'-AGGATCCATATCCCGAGGAAA-3',反向引物序列:5'-CGAGGTCTCTGCTGGCTTGT-3';NOX4 正向引物序列:5'-CAACTGTTCTGCGCCTGACA-3',反向引物序列:5'-GCAACGTCAGCAGCATGTAGA-3';GAPDH 正向引物序列:5'-CATGTTTCGTCATGGTGTTGAA-3',反向引物序列:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。采用 ABI7500 Real-Time PCR 系统,按照 Real Master Mix(SYBR green)试剂盒说明书加入试剂进行 PCR 反应。反应条件:95 °C 预变性 30 s,1 个循环;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,扩增 40 个循环。实验独立重复 3 次,以 GAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.3 Western blot 法检测各组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 及 NOX4 蛋白的表达 将各组细胞用裂解缓冲液在冰上裂解 30 min 后收集超声 10 s,离心半径 10 cm,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清,采用 BCA 蛋白测定试剂盒定量蛋白浓度。将提取的总蛋白 30 μ g 在上样缓冲液中煮沸 10 min,质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜,50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜(FN 和 NOX 稀释比例均为 1:1 000, Vimentin、 α -SMA 和 ZO-1 稀释比例均为 1:2 000);洗膜,滴加相应二抗(1:2 000)在室温下孵育 1 h,再次洗膜并使用 Gel-DeI 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)使蛋白信号可视化。以 GAPDH 作为内参蛋白,采用 ImageJ 软件分析条带灰度。

1.2.4 细胞免疫荧光染色检测 FN、Vimentin、 α -SMA 和 ZO-1 蛋白表达的分布 将 ARPE-19 细胞接种到 6 孔板中,按照实验分组处理细胞后,弃去培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 3 次,室温下用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min。PBS 洗涤 3 次,检测 α -SMA 和 Vimentin 时用体积分数 0.2% Triton X-100 透化细胞 1 min,检测 NOX4 时用 0.5% Triton X-100 透化细胞 30 min,检测 ZO-1 和 FN 时不透化,再次 PBS 洗涤 3 次后,将细胞用体积分数 10% 驴血清蛋白在 37 °C 封闭 30 min,1:200 稀释一抗,并在 4 °C 条件下孵育过夜,PBS 洗涤后在室温下将细胞用 FITC 标记的驴抗兔 IgG(1:200)避光孵育 1 h,PBS 洗涤细胞并用 DAPI 复染细胞核,使用激光扫描共聚焦显微镜捕获图像。

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

究中计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗 + VAS2870 组、贝伐单抗 + GKT137831 组间总体比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 及 NOX4 mRNA 相对表达量比较

空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗 + VAS2870 组和贝伐单抗 + GKT137831 组细胞中 FN、Vimentin、

α -SMA、ZO-1 和 NOX4 mRNA 相对表达量组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 97.07, 195.40, 722.40, 38.56, 70.81$, 均 $P < 0.001$), 其中贝伐单抗组 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 mRNA 相对表达量明显高于空白对照组, ZO-1 mRNA 相对表达量明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。贝伐单抗 + VAS2870 组和贝伐单抗 + GKT137831 组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 mRNA 相对表达量明显低于贝伐单抗组, ZO-1 mRNA 相对表达量明显高于贝伐单抗组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 及 NOX4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of mRNA expression of FN, vimentin, α -SMA, ZO-1 and NOX4 in cells among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同基因 mRNA 相对表达量				
		FN	Vimentin	α -SMA	ZO-1	NOX4
空白对照组	3	0.670 \pm 0.046	0.768 \pm 0.011	0.751 \pm 0.029	1.277 \pm 0.014	0.446 \pm 0.011
贝伐单抗组	3	1.002 \pm 0.086 ^a	1.000 \pm 0.030 ^a	1.000 \pm 0.022 ^a	1.003 \pm 0.091 ^a	1.007 \pm 0.089 ^a
贝伐单抗+VAS2870 组	3	0.605 \pm 0.025 ^b	0.630 \pm 0.021 ^b	0.345 \pm 0.018 ^b	1.662 \pm 0.007 ^b	0.297 \pm 0.057 ^b
贝伐单抗+GKT137831 组	3	0.272 \pm 0.008 ^b	0.559 \pm 0.019 ^b	0.241 \pm 0.010 ^b	1.674 \pm 0.129 ^b	0.259 \pm 0.008 ^b
<i>F</i> 值		97.07	195.40	722.40	38.56	70.81
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与贝伐单抗组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验) FN:纤维连接蛋白;Vimentin:波形蛋白; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;ZO-1:闭锁小带蛋白-1;NOX:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶

Note:Compared with blank control group,^a $P < 0.05$;compared with bevacizumab group,^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA,SNK-*q* test) FN:fibronectin; α -SMA: α -smooth muscle actin;ZO-1:zonula occludens-1;NOX:nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

2.2 不同分组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 和 NOX4 蛋白相对表达量比较

Western blot 检测结果显示,空白对照组 FN、Vimentin、 α -SMA 及 NOX4 条带灰度弱于贝伐单抗组, ZO-1 条带灰度强于贝伐单抗组;贝伐单抗 + VAS2870 组和贝伐单抗 + GKT137831 组的 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 条带灰度弱于贝伐单抗组, ZO-1 条带灰度强于贝伐单抗组 (图 1)。空白对照组、贝伐单抗组、贝伐单抗 + VAS2870 组和贝伐单抗 + GKT137831 组中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 和 NOX4 的蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 23.09, 64.58, 58.19, 26.97, 63.19$, 均 $P < 0.001$), 其中贝伐单抗组 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 蛋白相对表达量明显高于空白对照组, ZO-1 蛋白相对表达量明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。贝伐单抗 + VAS2870 组和贝伐单抗 + GKT137831 组 FN、Vimentin、 α -SMA 和 NOX4 蛋白相对表达量明显低于贝伐单抗组, ZO-1 蛋白相对表达量明显高于贝伐单抗组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

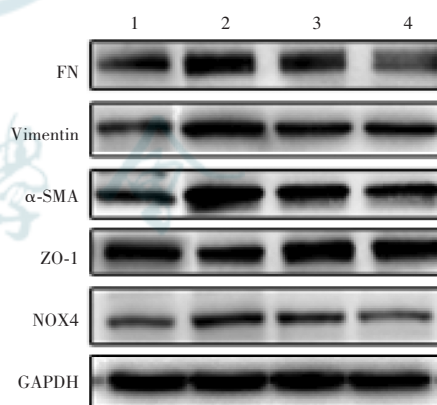


图 1 各组细胞 EMT 标志物蛋白及 NOX4 蛋白表达电泳图 1:空白对照组;2:贝伐单抗组;3:贝伐单抗 + VAS2870 组;4:贝伐单抗 + GKT137831 组 FN:纤维连接蛋白;Vimentin:波形蛋白; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;ZO-1:闭锁小带蛋白-1;NOX:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 Electrophoretogram of EMT markers and NOX4 expression among various groups 1:blank control group;2:bevacizumab group;3:bevacizumab + VAS2870 group;4:bevacizumab + GKT137831 group FN:fibronectin; α -SMA: α -smooth muscle actin;ZO-1:zonula occludens-1;NOX:nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase;GAPDH:glyceralde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组细胞中 FN、Vimentin、 α -SMA、ZO-1 及 NOX4 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of FN, vimentin, α -SMA, ZO-1 and NOX4 expression in cells among various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	不同蛋白相对表达量				
		FN	Vimentin	α -SMA	ZO-1	NOX4
空白对照组	3	0.622±0.065	0.466±0.085	0.570±0.032	1.695±0.209	0.519±0.042
贝伐单抗组	3	1.002±0.016 ^a	1.003±0.021 ^a	1.000±0.022 ^a	1.002±0.041 ^a	1.007±0.089 ^a
贝伐单抗+VAS2870 组	3	0.423±0.157 ^b	0.566±0.041 ^b	0.529±0.058 ^b	1.932±0.112 ^b	0.448±0.099 ^b
贝伐单抗+GKT137831 组	3	0.305±0.155 ^b	0.655±0.039 ^b	0.452±0.077 ^b	2.032±0.074 ^b	0.275±0.076 ^b
F 值		23.09	64.58	58.19	26.97	63.19
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与贝伐单抗组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,SNK- q 检验) FN:纤维连接蛋白;Vimentin:波形蛋白; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;ZO-1:闭锁小带蛋白-1;NOX:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶

Note:Compared with blank control group,^a $P<0.05$;compared with bevacizumab group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA,SNK- q test) FN:fibronectin; α -SMA: α -smooth muscle actin;ZO-1:zonula occludens-1;NOX:nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

2.3 各组细胞 EMT 标志物蛋白表达情况比较

免疫荧光染色结果显示, FN 主要表达于细胞外基质, 呈绿色荧光。贝伐单抗组 FN 荧光强度明显强于空白对照组, 贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组 FN 荧光强度均明显减弱。Vimentin 和 α -SMA 主要表达于细胞质, 均呈绿色荧光。贝伐单抗组 Vimentin 和 α -SMA 荧光强度明显强于空白对照组, 贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组较贝伐单抗组荧光强度明显减弱。ZO-1 主要表达于细胞膜, 呈绿色荧光。贝伐单抗组 ZO-1 荧光强度明显弱于空白对照组, 贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组荧光强度明显强于贝伐单抗组(图 2)。

2.4 空白对照组和贝伐单抗组细胞 NOX4 免疫荧光染色情况比较

免疫荧光染色结果显示, NOX4 主要表达于细胞质, 呈绿色荧光。与空白对照组相比, 贝伐单抗组中 NOX4 荧光强度明显较强(图 3)。

3 讨论

抗 VEGF 治疗使众多眼部新生血管性疾病患者视力得以提高^[20], 但新生血管的纤维化影响了患者的视力获益^[3,21], RPE 细胞对于维持正常视觉功能至关重要, 其 EMT 与视网膜纤维化发病机制有关^[22]。RPE 细胞经 EMT 过程形成成纤维细胞样细胞, 并产生细胞外基质成分, 参与视网膜纤维化组织的形成^[23]。因此在抗 VEGF 治疗同时抑制纤维化的发生具有重要意义。

许多疾病的发生与氧化应激有关。ROS 是氧正常代谢的天然副产物, 其包括超氧化物和 H₂O₂, 在细胞信号转导和维持体内平衡中具有重要作用, 但在氧化应激状态下, ROS 产生增多则会导致细胞损伤并危害机体健康^[24-25]。本课题组前期研究发现, 贝伐单抗

处理细胞后可使 ROS 和纤维化相关因子水平升高, 因此 ROS 在 RPE 细胞的 EMT 过程中起到促进作用。

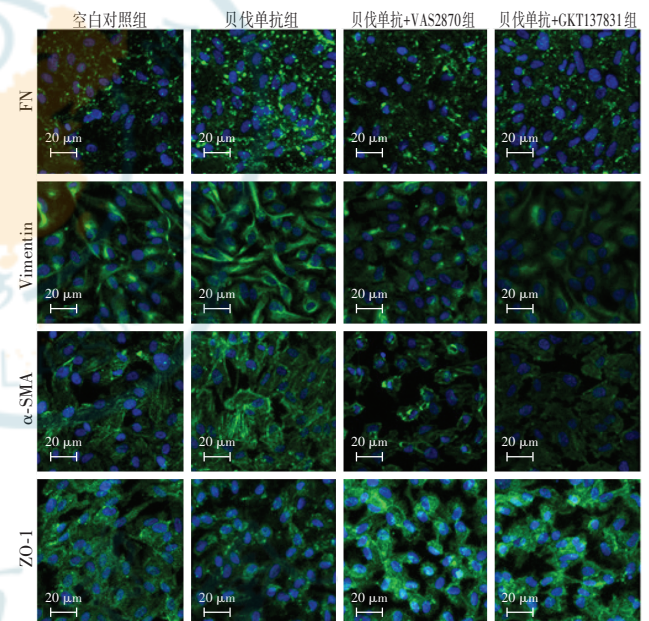


图 2 各组细胞中 EMT 标志物蛋白的免疫荧光染色表现 (DAPI $\times 200$, 标尺 = 20 μ m) FN 主要表达于细胞外基质, Vimentin、 α -SMA 主要表达于细胞质, ZO-1 主要表达于细胞膜, 均呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光。贝伐单抗组 FN、Vimentin、 α -SMA 荧光强度强于空白对照组; ZO-1 荧光强度弱于空白对照组; 贝伐单抗+VAS2870 组和贝伐单抗+GKT137831 组 FN、Vimentin、 α -SMA 荧光强度弱于贝伐单抗组, ZO-1 荧光强度强于贝伐单抗组 FN:纤维连接蛋白; Vimentin:波形蛋白; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; ZO-1:闭锁小带蛋白-1

Figure 2 Immunofluorescence staining of EMT markers among various groups (DAPI $\times 200$, bar = 20 μ m) FN mainly expressed in extracellular matrix, vimentin and α -SMA in cytoplasm, and ZO-1 in cell membrane, all of which showed green fluorescence, and the nuclei presented blue fluorescence (DAPI). The immunofluorescence intensity of FN, vimentin and α -SMA were stronger and the immunofluorescence intensity of ZO-1 was weaker in bevacizumab group than those in blank control group. The immunofluorescence intensity of FN, vimentin and α -SMA were weaker and the immunofluorescence intensity of ZO-1 was stronger in bevacizumab+VAS2870 and bevacizumab+GKT137831 groups than bevacizumab group FN: fibronectin; α -SMA: α -smooth muscle actin; ZO-1: zonula occludens-1

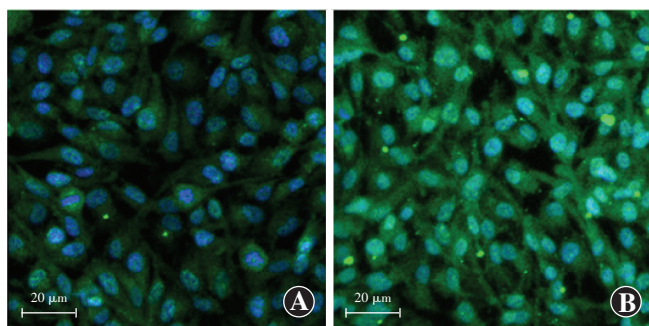


图3 贝伐单抗组和空白对照组细胞中 NOX4 的免疫荧光染色表现 (DAPI $\times 200$, 标尺 = 20 μm) NOX4 主要表达于细胞质,呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)。可见贝伐单抗组 NOX4 表达强于空白对照组 A:空白对照组 B:贝伐单抗组

Figure 3 Immunofluorescence staining of NOX4 in bevacizumab group and blank control group (DAPI $\times 200$, bar = 20 μm) NOX4 was mainly expressed in cytoplasm, showing green fluorescence. Nuclei presented blue fluorescence (DAPI). The immunofluorescence intensity of NOX4 was higher in bevacizumab group than blank control group A: blank control group B: bevacizumab group

NOX 是调控 ROS 产生的重要上游信号^[23], NADPH 氧化还原酶的 NOX 家族在 ROS 参与转化生长因子 β 介导的 EMT 发生过程中具有重要作用。NOX 家族由 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、双重氧化酶 1 (Duox1) 和 Duox2 共 7 个亚型组成^[12]。其中,NOX4 是表达丰富、分布广泛的 NOX 亚型之一^[26]。与其他 NOX 成员不同,即使在没有胞质调节剂的情况下,NOX4 也具有结构活性,这使得 NOX4 在控制内皮细胞的氧化还原状态和细胞内信号转导方面具有重要作用^[27]。在此之前的研究中,我们发现 NOX4 通过 ROS 机制调节信号通路促进视网膜新生血管的生成,但 NOX 抑制剂对 EMT 的影响未见直接证据。了解 NOX 抑制剂能否抑制及逆转抗 VEGF 抑制剂诱导的 EMT 对于新生血管的防治具有重要意义。

本研究观察了贝伐单抗对 ARPE19 细胞中 NOX4 表达水平的影响,发现培养基中加入贝伐单抗后,在 EMT 标志物发生变化的同时,细胞中 NOX4 mRNA 和蛋白表达水平均增高,而加入 NOX4 抑制剂 GKT137831 或 VAS2870 后,NOX4 呈低表达状态,EMT 标志物中 FN、Vimentin 和 α -SMA 表达水平降低,ZO-1 表达水平升高,表明由贝伐单抗引起的 EMT 发生了逆转,NOX4 的表达与 EMT 密切相关,下调 NOX4 对贝伐单抗引起的 ARPE19 细胞的 EMT 有抑制作用,验证了 NOX4 可能参与 EMT 的调控。有研究发现 NOX4 在大鼠晶状体上皮细胞、人胸膜间皮细胞和人肾小管上皮细胞 EMT 过程中发挥一定作用,而 NOX4 抑制剂可以减轻纤维化程度,与本研究结果一致^[28-30]。本研究使用了 2 种不同的 NOX4 抑制剂,体外实验观察了 NOX4

的表达,均使贝伐单抗诱发的 EMT 发生逆转。由此可以推测多种 NOX4 抑制剂具有成为临床有效纤维化抑制剂的可能。

综上所述,NOX4 在视网膜纤维化形成中可能发挥重要的调节作用,NOX4 抑制剂可能减少抗 VEGF 治疗所诱发的新生血管过度纤维化的发生,这可能为年龄相关性黄斑变性等脉络膜新生血管疾病的治疗提供新的思路。但本实验仅观察了 2 种 NOX4 抑制剂处理 RPE 细胞的生物学行为,并未在动物模型中证实,因此需要在下一步的研究中进行相关动物实验,进一步检测参与调控发生纤维化过程的诱导因子 VEGF 及各类炎性因子变化,并探讨不同 NOX 抑制剂在不同浓度时在体内相关通路中不同程度的影响。

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 徐海峰:参与选题和研究设计、研究过程指导、数据和资料分析、文章主要内容修改和定稿;谢超慧:参与研究设计和实验实施、收集和分析数据、论文撰写及修改和定稿;郝相慧:参与研究实施、收集和分析数据;杨玲玲:实验指导,对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改

参考文献

- [1] Pozarowska D, Pozarowski P. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy [J]. Cent Eur J Immunol, 2016, 41 (3) : 311-316. DOI: 10. 5114/ceji. 2016. 63132.
- [2] Daniel E, Toth CA, Grunwald JE, et al. Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. Ophthalmology, 2014, 121 (3) : 656-666. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2013. 10. 019.
- [3] Ahn SJ, Park KH, Woo SJ. Subretinal fibrosis after anti-vascular endothelial growth factor therapy in eyes with myopic choroidal neovascularization [J]. Retina, 2016, 36 (11) : 2140-2149. DOI: 10. 1097/IAE. 0000000000001043.
- [4] 陈有信, 汤加. 抗血管内皮生长因子治疗眼部新生血管性疾病问题与挑战 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37 (1) : 1-4. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 01. 001. Chen YX, Tang J. Problems and challenges of anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascularization diseases [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37 (1) : 1-4. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 01. 001.
- [5] Zhang M, Chu S, Zeng F, et al. Bevacizumab modulates the process of fibrosis *in vitro* [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2015, 43 (2) : 173-179. DOI: 10. 1111/ceo. 12374.
- [6] Chu SJ, Zhang ZH, Wang M, et al. Effect of bevacizumab on the expression of fibrosis-related inflammatory mediators in ARPE-19 cells [J]. Int J Ophthalmol, 2017, 10 (3) : 366-371. DOI: 10. 18240/ijo. 2017. 03. 07.
- [7] Malik D, Tarek M, Caceres del Carpio J, et al. Safety profiles of anti-VEGF drugs: bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture [J]. Br J Ophthalmol, 2014, 98 Suppl 1 : i11-16. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2014-305302.
- [8] Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis [J]. Redox Biol, 2015, 6 : 565-577. DOI: 10. 1016/j. redox. 2015. 09. 009.
- [9] 郝相慧, 杨玲玲, 周丽, 等. 活性氧在贝伐单抗诱导视网膜色素上皮细胞上皮间质转化中的作用 [J]. 眼科新进展, 2021, 41 (1) : 6-11.

- Hao XH, Yang LL, Zhou L, et al. Reactive oxygen species participate in the mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells induced by bevacizumab[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2021, 41(1): 6-11.
- [10] Bhatt L, Groeger G, McDermott K, et al. Rod and cone photoreceptor cells produce ROS in response to stress in a live retinal explant system[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 283-293.
- [11] Usui S, Oveson BC, Lee SY, et al. NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa[J]. *J Neurochem*, 2009, 110(3): 1028-1037. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06195.x.
- [12] Serrander L, Cartier L, Bedard K, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation[J]. *Biochem J*, 2007, 406(1): 105-114. DOI: 10.1042/BJ20061903.
- [13] 唐琳, 郭青, 张翠翠, 等. 缺氧诱导因子 1 α 介导的信号通路在血管紧张素 II 诱导肾间质纤维化中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(3): 194-197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2011.03.014.
- Tang L, Guo Q, Zhang CC, et al. Role of hypoxia inducible factor 1 α -mediated signaling pathway in angiotensin II-induced renal interstitial fibrosis[J]. *Chin J Nephrol*, 2011, 27(3): 194-197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2011.03.014.
- [14] Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, et al. NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1473-1484. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1473.
- [15] Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, et al. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2319-2324. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.149450.
- [16] Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT: 2016 [J]. *Cell*, 2016, 166(1): 21-45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- [17] Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1417-1419. DOI: 10.1172/JCI39675.
- [18] Al-Shabraway M, Bartoli M, El-Remessy AB, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(2): 599-607. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63001-5.
- [19] 李静, 杨静, 康前雁. NADPH 氧化酶 4 抑制剂对缺氧诱导的人 RPE 细胞中 VEGF 表达的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(1): 4-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.002.
- Li J, Yang J, Kang QY. Inhibitory effects of NADPH oxidase 4 inhibitor on VEGF expression in hypoxia-induced human RPE cells[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(1): 4-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.002.
- [20] Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF, et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(1): 193-201. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.08.011.
- [21] Roberts PK, Zotter S, Montuoro A, et al. Identification and quantification of the angiogenic switch in neovascular AMD[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(1): 304-311. DOI: 10.1167/iovs.18-25189.
- [22] Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2008, 8(1): 69-76. DOI: 10.2174/187153008783928343.
- [23] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313. DOI: 10.1152/physrev.00044.2005.
- [24] Zhao M, Wang Y, Li L, et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1845-1863. DOI: 10.7150/thno.50905.
- [25] Otoupalova E, Smith S, Cheng G, et al. Oxidative stress in pulmonary fibrosis[J]. *Compr Physiol*, 2020, 10(2): 509-547. DOI: 10.1002/cphy.c190017.
- [26] Weyemi U, Dupuy C. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses[J]. *Mutat Res*, 2012, 751(2): 77-81. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.04.002.
- [27] Anilkumar N, Weber R, Zhang M, et al. Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(7): 1347-1354. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.164277.
- [28] Das SJ, Wishart T, Jandeleit-Dahm K, et al. Nox4-mediated ROS production is involved, but not essential for TGF β -induced lens EMT leading to cataract[J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 192: 107918 [2021-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926131/>. DOI: 10.1016/j.exer.2020.107918.
- [29] Kim Y, Park SY, Jung H, et al. Inhibition of NADPH oxidase 4 (NOX4) signaling attenuates tuberculous pleural fibrosis[J/OL]. *J Clin Med*, 2019, 8(1): 116 [2021-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669315/>. DOI: 10.3390/jcm8010116.
- [30] Hu F, Xue M, Li Y, et al. Early growth response 1 (Egr1) is a transcriptional activator of NOX4 in oxidative stress of diabetic kidney disease[J/OL]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 3405695 [2021-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29854821/>. DOI: 10.1155/2018/3405695.

(收稿日期:2021-10-20 修回日期:2022-05-07)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登陆中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中署名的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)