

# AGTR1 拮抗剂奥美沙坦对 HTF 凋亡的促进作用及其机制

王丽君 李宏松 张文怡 邵美琳 任梅梅 王建明

西安交通大学第二附属医院眼科, 西安 710004

通信作者: 王建明, Email: xajdwjm@163.com

**【摘要】** 目的 探讨血管紧张素 1 型受体 (AGTR1) 拮抗剂奥美沙坦 (OMS) 对人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTF) 凋亡的作用及其机制。方法 收集于西安交通大学第二附属医院行斜视手术的患者 Tenon 囊组织, 采用组织块法培养原代 HTF, vimentin 免疫荧光染色及流式细胞术鉴定原代细胞。采用 10 ng/ml 转化生长因子  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) 诱导 HTF 建立细胞纤维化模型。将体外培养的细胞分为正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组和 OMS 组, 各组细胞分别予以普通培养液、含 TGF- $\beta$ 2 的培养液、含 TGF- $\beta$ 2 和 OMS 的培养液、含 OMS 的培养液培养细胞 48 h。Annexin V/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡情况, 分析细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率。Western blot 法检测线粒体凋亡途径中 procaspase-9、cleaved caspase-9、bax 和 bcl-2 蛋白表达水平。比色法检测细胞乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。结果 成功分离培养原代 HTF, 所培养细胞呈长梭形, vimentin 免疫荧光染色呈阳性, 流式细胞术检测所培养原代细胞中 vimentin 表达阳性率 >99%。正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组和 OMS 组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F=24.92, 3.96, 41.82$ , 均  $P<0.05$ ), 其中 TGF- $\beta$ 2+OMS 组早期凋亡率和总凋亡率较正常对照组和 TGF- $\beta$ 2 组明显升高, TGF- $\beta$ 2+OMS 组晚期凋亡率较正常对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组和 OMS 组 cleaved caspase-9/procaspase-9、bax、bax/bcl-2 总体比较差异均有统计学意义 ( $F=4.40, 7.98, 4.61$ , 均  $P<0.05$ ), 其中 TGF- $\beta$ 2+OMS 组 bax/bcl-2 较正常对照组明显升高, TGF- $\beta$ 2+OMS 组 cleaved caspase-9/procaspase-9、bax、bax/bcl-2 较 TGF- $\beta$ 2 组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组、OMS 组细胞 LDH 活性值分别为 (783.99 $\pm$ 79.97)、(913.16 $\pm$ 196.86)、(2 529.06 $\pm$ 240.21)、(2 134.29 $\pm$ 138.96)  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=24.95, P<0.05$ ), 其中与正常对照组和 TGF- $\beta$ 2 组比较, TGF- $\beta$ 2+OMS 组和 OMS 组 LDH 活性值明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组、OMS 组细胞 SOD 活性值分别为 (50.35 $\pm$ 0.97)、(41.61 $\pm$ 4.56)、(28.88 $\pm$ 3.26)、(37.61 $\pm$ 4.83)  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=5.71, P<0.05$ ), 其中 TGF- $\beta$ 2+OMS 组 SOD 活性值低于正常对照组和 TGF- $\beta$ 2 组, OMS 组 SOD 活性值低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。结论 AGTR1 拮抗剂 OMS 可以有效促进 HTF 凋亡, bax/bcl-2/caspase-9 介导的线粒体凋亡途径及氧化应激途径可能是 OMS 调控 HTF 凋亡过程的潜在机制。

**【关键词】** 青光眼; 滤过手术; 奥美沙坦; AGTR1 拮抗剂; Tenon 囊成纤维细胞; 凋亡

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2022SF-154、2023-YBSF-495)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220601-00262

## Promoting effect of AGTR1 blocker olmesartan on the apoptosis of HTF and its mechanism

Wang Lijun, Li Hongsong, Zhang Wenyi, Shao Meilin, Ren Meimei, Wang Jianming

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Wang Jianming, Email: xajdwjm@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect and mechanism of angiotensin type 1 receptor (AGTR1) blocker olmesartan (OMS) on the apoptosis of human Tenon capsule fibroblasts (HTF). **Methods** Tenon capsule tissues were obtained from patients during strabismus surgery in the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University. Primary HTF were cultured by explant culture. Primary cells were identified by vimentin immunofluorescence staining and flow cytometry. The fibrosis model of HTF was established using 10 ng/ml transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2). The cells were divided into normal control group cultured in culture medium, TGF- $\beta$ 2 group in culture medium containing TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 2+OMS group in culture medium containing TGF- $\beta$ 2 and OMS, and OMS group in culture medium containing OMS, and were cultured for 48 hours. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with annexin V/PI staining. The early apoptosis, late apoptosis, and total apoptosis rates were analyzed. The protein expression of procaspase-9, cleaved caspase-9, bax and bcl-2 in the mitochondrial apoptosis pathway was detected by Western blot. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) was detected by

colorimetry. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (No. 2019-014). **Results** Primary HTF were successfully isolated and cultured. The cultured cells were long spindle-shaped and positive for vimentin. The expression rate of vimentin in the primary cells was greater than 99%. A statistically significant difference was found in the early apoptosis rate, late apoptosis rate, and total apoptosis rate among the four groups ( $F = 24.92, 3.96, 41.82$ ; all at  $P < 0.05$ ). The early and total apoptosis rates were significantly higher in TGF- $\beta$ 2+OMS group than normal control group and TGF- $\beta$ 2 group, and the late apoptosis rate in TGF- $\beta$ 2+OMS group was significantly higher than that of normal control group (all at  $P < 0.05$ ). There were statistically significant differences in cleaved caspase-9/procaspase-9, bax, and bax/bcl-2 among the four groups ( $F = 4.40, 7.98, 4.61$ ; all at  $P < 0.05$ ). The bax/bcl-2 expression was significantly increased in TGF- $\beta$ 2+OMS group in comparison with normal control group, and the expressions of cleaved caspase-9/procaspase-9, bax, and bax/bcl-2 were significantly elevated in TGF- $\beta$ 2+OMS group compared with TGF- $\beta$ 2 group (all at  $P < 0.05$ ). LDH activity in the normal control group, TGF- $\beta$ 2 group, TGF- $\beta$ 2+OMS group and OMS group was ( $783.99 \pm 79.97$ ), ( $913.16 \pm 196.86$ ), ( $2529.06 \pm 240.21$ ), and ( $2134.29 \pm 138.96$ )  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ , respectively, showing a statistically significant difference ( $F = 24.95, P < 0.05$ ). Compared with normal control group and TGF- $\beta$ 2 group, LDH activity in TGF- $\beta$ 2+OMS group was increased, and the differences were statistically significant (both at  $P < 0.05$ ). SOD activity in the normal control group, TGF- $\beta$ 2 group, TGF- $\beta$ 2+OMS group and OMS group was ( $50.35 \pm 0.97$ ), ( $41.61 \pm 4.56$ ), ( $28.88 \pm 3.26$ ), and ( $37.61 \pm 4.83$ )  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ , respectively, showing a statistically significant difference ( $F = 5.71, P < 0.05$ ). SOD activity was reduced in TGF- $\beta$ 2+OMS group compared with normal control group and TGF- $\beta$ 2 group, reduced in OMS group compared with normal control group, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** AGTR1 blocker OMS can promote the apoptosis of HTF effectively. Mitochondrial apoptosis pathway mediated by bax/bcl-2/caspase-9 and oxidative stress pathway are the potential mechanisms that OMS regulates the apoptosis of HTF.

**[Key words]** Glaucoma; Filtering surgery; Olmesartan; AGTR1 blocker; Tenon capsule fibroblasts; Apoptosis

**Fund program:** Key Program of Research and Development of Shaanxi (2022SF-154, 2023-YBSF-495)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220601-00262

青光眼是全球主要的不可逆性致盲眼病<sup>[1]</sup>,青光眼滤过术 (glaucoma filtration surgery, GFS) 是药物无法控制青光眼的主要治疗手段,滤过道纤维化瘢痕是导致 GFS 手术失败的主要原因<sup>[2-3]</sup>。目前临床上使用的抑制 GFS 术后纤维化的药物 5-氟尿嘧啶和丝裂霉素 C 可能发生角膜失代偿、滤过泡渗漏、低眼压、低眼压性黄斑病变等严重并发症<sup>[4]</sup>。因此,亟需进一步研究防治 GFS 术后纤维化的可行性靶点及药物。GFS 术后转化生长因子  $\beta$ 2 (transforming growth factor- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 2) 在局部术区组织表达增加, TGF- $\beta$ 2 是引发 GFS 术后结膜纤维化的有力刺激, TGF- $\beta$ 2 诱导也是建立人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon capsule fibroblasts, HTF) 纤维化的经典方法<sup>[5-6]</sup>。在 TGF- $\beta$ 2 刺激下, HTF 转分化为肌成纤维细胞参与组织愈合, 而肌成纤维细胞的增生激活、凋亡受抑制是导致 GFS 术后组织纤维化瘢痕形成的关键因素<sup>[6-8]</sup>。因此, HTF 细胞凋亡的调控机制是 GFS 术后纤维化瘢痕的研究重点。其次, 研究已证实血管紧张素 1 型受体 (angiotensin type 1 receptor, AGTR1) 拮抗剂可以有效抑制心脏、肝脏、血管、皮肤等组织纤维化的发展<sup>[9-10]</sup>。奥美沙坦 (olmesartan, OMS) 是 AGTR1 拮抗剂家族成员之一, 可以调节组织细胞的凋亡<sup>[11-12]</sup>。研究证实, OMS 可以增加颈动脉内膜凋亡细胞的数量, 即可促进内膜细胞凋

亡<sup>[11]</sup>。OMS 可通过增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 增加凋亡蛋白 bax、caspase-3 的表达, 干预 HeLa 和 MCF-7 细胞的活性<sup>[12]</sup>, 说明 OMS 可以调控组织细胞的凋亡。然而, OMS 能否促进 HTF 凋亡及其作用的分子调控机制目前尚未见报道。本研究采用 TGF- $\beta$ 2 诱导 HTF 纤维化, 在细胞水平模拟 GFS 术后 HTF 的生物学变化, 观察 OMS 对 HTF 凋亡的作用, 并探讨其作用途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织来源** 收集于西安交通大学第二附属医院眼科行斜视手术的患者 Tenon 囊组织, 患者年龄 < 18 岁, 无全身及其他眼部疾病史, 既往无眼部手术史。研究方案经西安交通大学第二附属医院伦理委员会审批 [批文号: (2019) 伦审一研第 (014) 号]。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司); TGF- $\beta$ 2 (美国 PeproTech 公司); OMS、MTT (美国 Sigma 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 比色分析试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 分析试剂盒 (武汉

Elabscience 公司);兔源 bax 单克隆抗体(50599-2-Ig)、鼠源 caspase-9/p35/p10 单克隆抗体(66169-1-Ig)、鼠源 GAPDH 单克隆抗体(60004-1-Ig)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(SA00001-1)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(SA00001-2)(美国 Proteintech 公司);鼠源 bcl-2 单克隆抗体(BF9103)(美国 Affinity 公司);鼠源 vimentin 单克隆抗体(sc-6260)(美国 Santa Cruz 公司);DyLigh649 标记的山羊抗鼠二抗(A23620)(美国 Abbkine 公司)。荧光显微镜(日本 Nikon 公司);酶联免疫检测仪(德国 BMG LABTECH 公司);流式细胞仪(美国 ACEA Biosciences 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 原代 HTF 的离体培养** 超净台内无菌 DMEM 液冲洗组织块,将组织剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 组织块,用含体积分数 20% FBS 的 DMEM 培养液重悬组织块,使组织块自然、均匀地平铺于培养皿,置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞爬出至细胞融合率达 70%~80%时传代。采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液进行 HTF 常规培养,取第 3~7 代 HTF 进行后续实验。

**1.2.2 免疫荧光染色法鉴定原代 HTF** HTF 为间质来源细胞,vimentin 为间质来源细胞标志物<sup>[13]</sup>,因此采用 vimentin 免疫荧光染色鉴定原代 HTF。制作 HTF 细胞爬片,48 h 后采用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min,预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)润洗爬片后采用体积分数 0.1% Triton-X100 通透细胞膜 15 min,质量分数 3% 牛血清白蛋白封闭 1 h,滴加 vimentin 一抗(1:50)4 ℃ 过夜。次日,PBS 润洗细胞爬片后避光加入 DyLigh649 标记的山羊抗鼠二抗(1:200),室温放置 1 h,DAPI 染细胞核,抗荧光淬灭封片剂封片后荧光显微镜下观察并拍照。

**1.2.3 流式细胞术鉴定原代 HTF** 将细胞分为对照组和 vimentin 标记组。正常生长的 HTF 通过 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton X-100 渗透 15 min,体积分数 10% 山羊血清封闭 30 min,vimentin 标记组加入 vimentin 一抗(1 μg/1×10<sup>6</sup> cells),对照组细胞用 PBS 代替 vimentin 一抗,室温孵育 2 h,避光加入 DyLigh649 标记的山羊抗鼠二抗(1:100),室温孵育 30 min。流式细胞仪上机检测,根据对照组细胞设立 M1 区间,检测 vimentin 标记组细胞的 M1 峰,M1 峰代表 vimentin 阳性细胞,统计 vimentin 阳性细胞所占比例,评估所培养原代 HTF 的纯度。

**1.2.4 MTT 法检测细胞增生率** MTT 检测 0、10、20、40、80 μmol/L OMS 干预 48 h 后 HTF 的增生活性。将 HTF 以 3×10<sup>3</sup> 个/200 μl 接种至 96 孔板中,每组设

5 个平行复孔,干预结束后,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,培养箱内孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 150 μl DMSO。酶标仪测定波长 490 nm 处吸光度(absorbance, A)值。细胞相对增生率=处理组 A 值/对照组 A 值×100%。

**1.2.5 细胞分组及给药** 将细胞分为正常对照组、TGF-β2 组、TGF-β2+OMS 组和 OMS 组,其中正常对照组采用含 2% FBS 的 DMEM 培养液培养 HTF 48 h;TGF-β2 组参照前期研究结果<sup>[14]</sup>,采用含 10 ng/ml TGF-β2 的 2% FBS DMEM 培养液培养 48 h;TGF-β2+OMS 组采用含 10 ng/ml TGF-β2 和 40 μmol/L OMS 的 2% FBS DMEM 培养液共处理 HTF 48 h;OMS 组采用含 40 μmol/L OMS 的 2% FBS DMEM 培养液培养 HTF 48 h。

**1.2.6 流式细胞术 Annexin V/PI 染色检测细胞凋亡情况** 待细胞干预结束后,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化 HTF,收集细胞及细胞培养液于 EP 管中,1 000×g 离心 5 min,PBS 重悬洗涤 HTF;1 000×g 离心 5 min,每份样品加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液、5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 染色液,室温避光孵育 20 min,4 ℃ 避光保存。流式细胞仪检测 HTF 细胞凋亡率,Annexin V-FITC 阳性为绿色荧光,PI 阳性为红色荧光,通过流式细胞仪检测分析 HTF 早期及晚期细胞凋亡(坏死)率。Annexin V-FITC 单阳性提示细胞发生早期凋亡,Annexin V-FITC 和 PI 双阳性提示细胞发生晚期凋亡(坏死)。

**1.2.7 Western blot 法检测目的蛋白相对表达量** 细胞干预结束后 PBS 轻柔冲洗 3 次,RIPA 裂解液(含质量分数 1% PMSF 和磷酸酶抑制剂)冰上裂解细胞 20 min 后提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。以蛋白裂解液样品与 5 倍 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液体积比为 4:1 混匀后 100 ℃ 水浴加热 5 min。各组取 20 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,80 V 电泳约 30 min,110 V 电泳约 120 min。采用 200 mA 恒流湿转法将蛋白转至 PVDF 膜,根据目的蛋白相对分子质量确定转膜时间。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,孵育一抗[GAPDH(1:50 000)、procaspase-9(1:1 000)、cleaved caspase-9(1:1 000)、bax(1:2 000)、bcl-2(1:1 000)],4 ℃ 过夜;室温孵育二抗(1:5 000)1 h。ECL 发光液观察目的蛋白条带,BioRad 凝胶成像系统成像。采用 ImageJ 软件分析目的蛋白灰度值。以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

**1.2.8 比色法检测 LDH 活性** 干预结束后收集细胞于 EP 管中,持续冰浴下超声波破碎细胞(设置条件

为:200 W, 2 s/次, 间隔 3 s, 总时间为 5 min), 4 °C 条件下 10 000×g 离心 10 min, 取上清, BCA 法检测蛋白浓度。96 孔板中按照分组分别设置空白孔、标准孔、测定孔和对照孔, 根据 LDH 活性检测说明, 空白孔加入 25 μl ddH<sub>2</sub>O, 标准孔加入 5 μl ddH<sub>2</sub>O 和 20 μl 0.2 μmol/mL 丙酮酸标准品, 测定孔加入 20 μl 待测样本, 对照孔加入 5 μl ddH<sub>2</sub>O 和 20 μl 待测样本; 各孔加入 25 μl 基质液; 测定孔加入 5 μl 辅酶 I 应用液; 37 °C 孵育 15 min; 各孔加入 25 μl 显色剂, 37 °C 孵育 15 min; 各孔加入 250 μl 碱溶液应用液, 静置 5 min。酶标仪检测各孔在 450 nm 处的 A 值, 并计算 LDH 活性值。LDH 活性值 [μmol/(min · L)] = (测定孔 A 值 - 对照孔 A 值) / (标准孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 标准品浓度 × 样本稀释倍数 / 样本蛋白浓度 × 1 000。

**1.2.9 比色法检测 SOD 活性** 样品准备同 1.2.7, 根据 SOD 活性检测说明, 96 孔板中按照分组分别设置对照孔、对照空白孔、测定孔和测定空白孔, 对照孔加入 20 μl ddH<sub>2</sub>O 和 20 μl 酶工作液, 对照空白孔加入 20 μl ddH<sub>2</sub>O 和 20 μl 酶稀释液, 测定孔加入 20 μl 待测样本和 20 μl 酶工作液, 测定空白孔加入 20 μl 待测样本和 20 μl 酶稀释液; 各孔加入 200 μl 底物应用液, 混匀; 37 °C 培养箱孵育 20 min。酶标仪检测各孔在 450 nm 处的 A 值, 计算 SOD 活性值。SOD 活性值 [μmol/(min · L)] = [(对照孔 A 值 - 对照空白孔 A 值) - (测定孔 A 值 - 测定空白孔 A 值)] / (对照孔 A 值 - 对照空白孔 A 值) × 100% / 50% × (反应液总体积 / 样本体积) × 样本稀释倍数 / 样本蛋白浓度。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 Levene 检验证实方差齐。各组各检测指标总体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 原代 HTF 的培养及鉴定

人 Tenon 囊组织块贴壁后 4~7 d, 可见长梭形细胞从组织块的周围爬出, 呈放射状排列

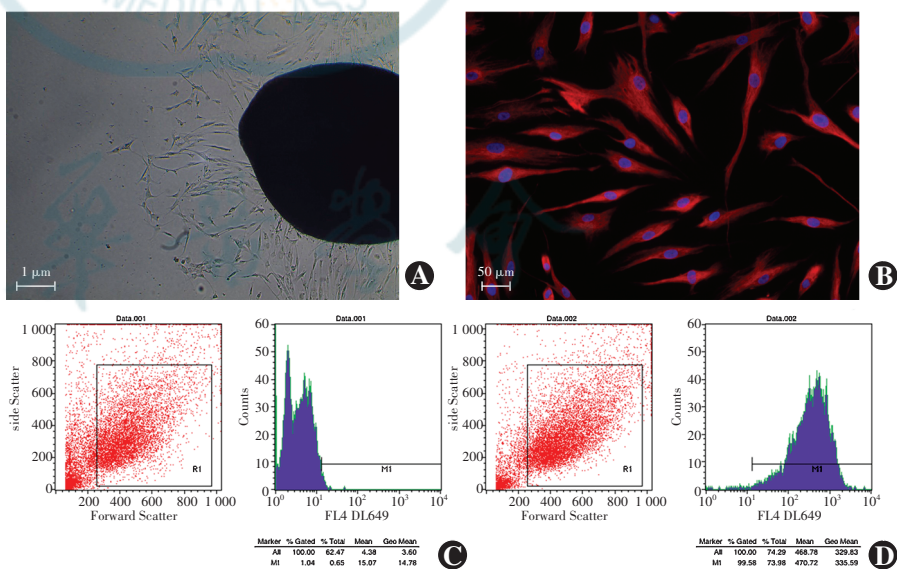
(图 1A)。Vimentin 免疫荧光染色阳性细胞的细胞质内可见与细胞长轴方向一致的红色 (DyLigh649 标记) 束状或网状结构 (图 1B), 此结果符合 HTF 特性。流式细胞术检测结果显示, 原代细胞中 vimentin 表达阳性率大于 99% (图 1C, D), 提示所培养的原代 HTF 纯度较高。

### 2.2 不同浓度 OMS 作用于 HTF 细胞相对增生率比较

MTT 实验结果显示, 相对于 0 μmol/L, 10、20、40、80 μmol/L OMS 干预 HTF 后 48 h, HTF 细胞相对增生率分别为 (91.40 ± 2.44)%、(92.31 ± 2.94)%、(76.19 ± 5.21)% 和 (78.33 ± 3.71)%, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 11.22, P < 0.05$ ), 其中与 0 μmol/L 相比, 10 μmol/L 和 20 μmol/L OMS 作用于 HTF 细胞相对增生率差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ); 40 μmol/L 和 80 μmol/L OMS 作用于 HTF 细胞相对增生率明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ); 40 μmol/L 和 80 μmol/L OMS 作用于 HTF 细胞相对增生率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 故后续实验采用 40 μmol/L OMS 干预细胞 (图 2)。

### 2.3 各组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率比较

正常对照组、TGF-β2 组、TGF-β2+OMS 组和 OMS



**图 1 原代 HTF 的培养及鉴定** A: HTF 从组织块周围爬出 (×40, 标尺 = 1 μm) B: 原代细胞的 vimentin 免疫荧光鉴定 (×200, 标尺 = 50 μm) Vimentin 阳性呈红色 (DyLigh649 标记), 主要分布在细胞质; 细胞核由 DAPI 染色, 呈蓝色 C、D: 流式细胞术检测原代细胞中 vimentin 表达的阳性率 (C: 对照组; D: Vimentin 标记组)

**Figure 1 Culture and identification of primary HTF** A: HTF crawling out from the tissue (×40, bar = 1 μm) B: Vimentin immunofluorescence assay of primary cells (×200, bar = 50 μm) Vimentin-positive cell showed red (DyLigh649 conjugated), and were mainly in cytoplasm. Nuclei were stained by DAPI and showed blue C, D: The positive rate of vimentin expression in primary cells was detected by flow cytometry (C: Control group; D: Vimentin labeled group)

组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 24.92, 3.96, 41.82$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中 TGF- $\beta$ 2+OMS 组早期凋亡率和总凋亡率较正常对照组和 TGF- $\beta$ 2 组明显升高, TGF- $\beta$ 2+OMS 组晚期凋亡率较正常对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 3, 表 1)。

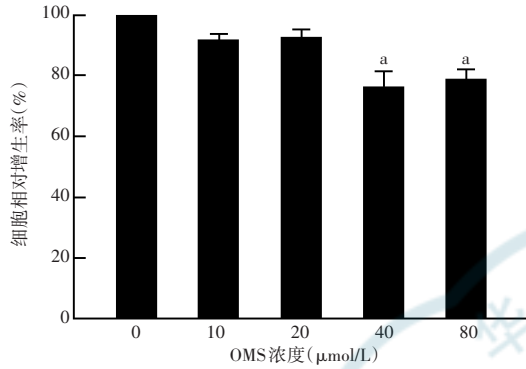


图 2 不同浓度 AGTR1 拮抗剂 OMS 作用于 HTF 细胞相对增生率比较  $F = 11.22, P < 0.05$ . 与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 6$ ) OMS: 奥美沙坦

Figure 2 Comparison of HTF proliferation after different concentrations of AGTR1 blocker OMS  $F = 11.22, P < 0.05$ . Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $^a P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 6$ ) OMS: olmesartan

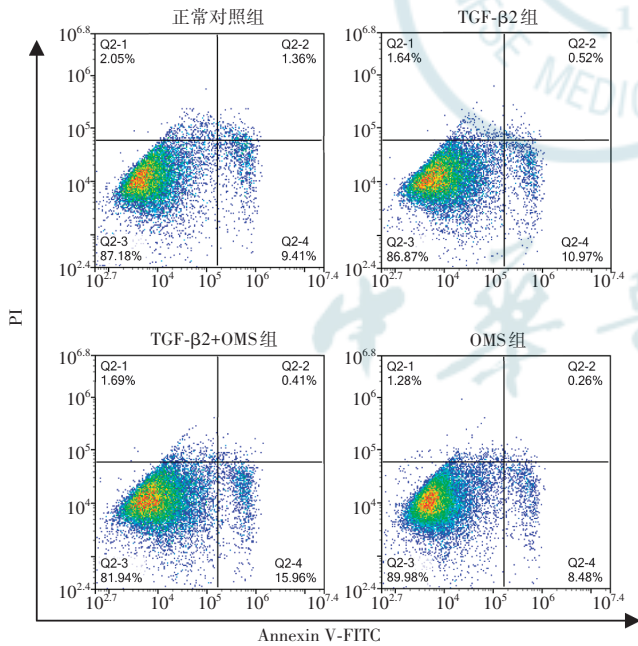


图 3 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况 Annexin V-FITC 单阳性为早期凋亡细胞, Annexin V-FITC 和 PI 双阳性为晚期凋亡 (坏死) 细胞 Q2-1: 死亡细胞; Q2-2: 晚期凋亡细胞; Q2-3: 正常细胞; Q2-4: 早期凋亡细胞 TGF: 转化生长因子; OMS: 奥美沙坦

Figure 3 Cell apoptosis detected by flow cytometry Annexin V-FITC-positive cells were early apoptotic cells. Cells positive for both Annexin V-FITC and PI were late apoptotic cells (necrotic cells) Q2-1: dead cells; Q2-2: late apoptotic cells; Q2-3: normal cells; Q2-4: early apoptotic cells TGF: transforming growth factor; OMS: olmesartan

表 1 各组细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 1 Comparison of apoptosis rate among four groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
正常对照组	18	4.65 $\pm$ 0.79	1.59 $\pm$ 0.24	6.24 $\pm$ 0.77
TGF- $\beta$ 2 组	18	5.96 $\pm$ 0.43	3.91 $\pm$ 0.51	9.87 $\pm$ 0.45
TGF- $\beta$ 2+OMS 组	18	11.54 $\pm$ 0.98 <sup>ab</sup>	4.28 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	15.82 $\pm$ 1.09 <sup>ab</sup>
OMS 组	18	4.43 $\pm$ 0.40	2.34 $\pm$ 0.33	6.77 $\pm$ 0.28
F 值		24.92	3.96	41.82
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 TGF- $\beta$ 2 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; OMS: 奥美沙坦

Note: Compared with respective normal control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with respective TGF- $\beta$ 2 group,  $^b P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) TGF: transforming growth factor; OMS: olmesartan

#### 2.4 各组细胞凋亡指标 caspase-9、bax 和 bcl-2 蛋白相对表达量比较

正常对照组、TGF- $\beta$ 2 组、TGF- $\beta$ 2+OMS 组和 OMS 组 cleaved caspase-9/procaspase-9、bax、bax/bcl-2 总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 4.40, 7.98, 4.61$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中 TGF- $\beta$ 2+OMS 组 bax/bcl-2 较正常对照组明显升高, TGF- $\beta$ 2 + OMS 组 cleaved caspase-9/procaspase-9、bax、bax/bcl-2 较 TGF- $\beta$ 2 组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 4, 表 2)。

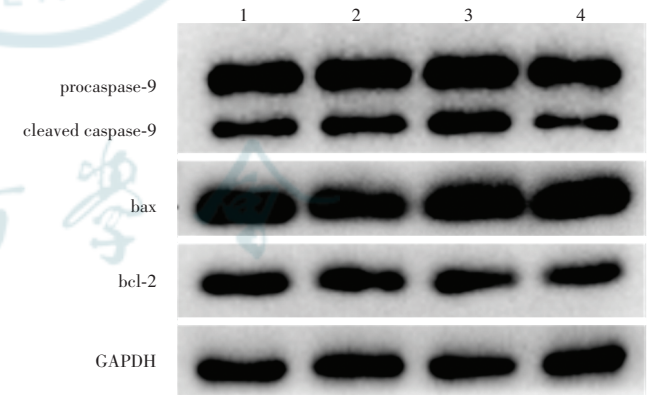


图 4 各组细胞凋亡指标 caspase-9、bax 和 bcl-2 蛋白表达电泳图

与 TGF- $\beta$ 2 组比较, TGF- $\beta$ 2+OMS 组 bax、cleaved caspase-9 蛋白表达条带增强; 各组 procaspase-9、bcl-2 蛋白表达条带无明显差异 1: 正常对照组; 2: TGF- $\beta$ 2 组; 3: TGF- $\beta$ 2 + OMS 组; 4: OMS 组 GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 Expressions of caspase-9, bax and bcl-2 proteins in HTF detected by Western blot Compared with TGF- $\beta$ 2 group, the intensity of bax and cleaved caspase-9 bands were increased in TGF- $\beta$ 2 + OMS group. There was no significant difference in bands intensity of procaspase-9 and bcl-2 among four groups 1: normal control group; 2: TGF- $\beta$ 2 group; 3: TGF- $\beta$ 2 + OMS group; 4: OMS group GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组细胞凋亡指标 caspase-9、bax 和 bcl-2 蛋白相对表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of expression levels of caspase-9, bax and bcl-2 proteins in HTF among four groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	不同蛋白相对表达量					
		procaspase-9	cleaved caspase-9	bax	bcl-2	cleaved caspase-9/ procaspase-9	bax/bcl-2
正常对照组	3	1.26±0.03	0.97±0.10	1.14±0.02	1.13±0.07	1.00±0.00	1.00±0.00
TGF-β2 组	3	1.11±0.08	0.75±0.18	0.93±0.04	0.93±0.07	0.84±0.10	1.04±0.07
TGF-β2+OMS 组	3	1.04±0.08	0.99±0.12	1.29±0.09 <sup>b</sup>	0.83±0.15	1.25±0.04 <sup>b</sup>	1.83±0.34 <sup>ab</sup>
OMS 组	3	1.09±0.14	0.84±0.11	1.08±0.02	0.93±0.07	1.03±0.11	1.36±0.11
F 值		1.09	0.76	7.98	1.65	4.40	4.61
P 值		0.41	0.55	<0.05	0.25	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 TGF-β2 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) TGF:转化生长因子;OMS:奥美沙坦

Note: Compared with respective normal control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with respective TGF-β2 group, <sup>b</sup> $P<0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) TGF: transforming growth factor; OMS: olmesartan

### 2.5 各组细胞 LDH 和 SOD 活性比较

LDH 活性分析结果显示,正常对照组、TGF-β2 组、TGF-β2+OMS 组、OMS 组细胞 LDH 活性值分别为 (783.99 ± 79.97)、(913.16 ± 196.86)、(2 529.06 ± 240.21)、(2 134.29 ± 138.96) μmol/(min · L), 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 24.95, P < 0.05$ ), 其中与正常对照组和 TGF-β2 组比较, TGF-β2+OMS 组和 OMS 组 LDH 活性值明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。SOD 活性分析结果显示, 正常对照组、TGF-β2 组、TGF-β2+OMS 组、OMS 组细胞 SOD 活性值分别为 (50.35 ± 0.97)、(41.61 ± 4.56)、(28.88 ± 3.26)、(37.61 ± 4.83) μmol/(min · L), 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 5.71, P < 0.05$ ), 其中 TGF-β2+OMS 组 SOD 活性值明显低于正常对照组和 TGF-β2 组, OMS 组 SOD 活性值明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 5)。

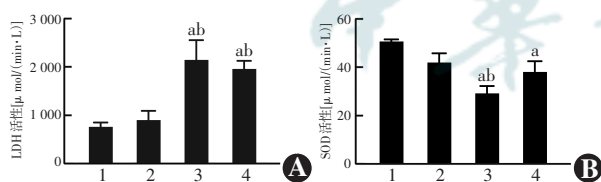


图 5 各组细胞 LDH 和 SOD 活性值比较 A: 各组 LDH 活性值比较  $F = 24.95, P < 0.05$ 。与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 TGF-β2 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 4$ ) B: 各组 SOD 活性值比较  $F = 5.71, P < 0.05$ 。与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 TGF-β2 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: TGF-β2 组; 3: TGF-β2+OMS 组; 4: OMS 组 LDH: 乳酸脱氢酶; SOD: 超氧化物歧化酶

Figure 5 Comparison of LDH and SOD activity in HTF among four groups A: Comparison of LDH activity  $F = 24.95, P < 0.05$ . Compared with normal control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with TGF-β2 group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 4$ ) B: Comparison of SOD activity  $F = 5.71, P < 0.05$ . Compared with normal control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with TGF-β2 group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: TGF-β2 group; 3: TGF-β2+OMS group; 4: OMS group LDH: lactate dehydrogenase; SOD: superoxide dismutase

### 3 讨论

GFS 失败的机制较为复杂, 滤过道纤维化是导致 GFS 失败的主要原因<sup>[2,15]</sup>。在 TGF-β2 刺激下, HTF 转分化为肌成纤维细胞参与组织愈合, 而肌成纤维细胞的增生激活及凋亡受抑制是导致 GFS 术后纤维化的关键因素<sup>[6-8]</sup>。促进 HTF 细胞凋亡是减轻 GFS 术后纤维化瘢痕的研究要点之一<sup>[16-17]</sup>。TGF-β2 诱导是建立 HTF 细胞纤维化的经典方法, 本研究采用 TGF-β2 诱导 HTF 建立细胞纤维化模型, 观察 AGTR1 拮抗剂 OMS 对 HTF 凋亡的作用及其途径。研究证明, OMS 通过调控 bax/bcl-2/caspase-9 及氧化应激途径促进 HTF 凋亡, 为以 AGTR1 为靶点抑制 GFS 术后纤维化瘢痕提供了理论基础。

既往研究中 OMS 作用于细胞的药物浓度范围在 0.5~5 000 μmol/L<sup>[18-20]</sup>, 考虑可能是不同组织、不同细胞中 AGTR1 表达差异较大导致药物作用的有效浓度差异较大。本研究中为了筛选合适的 OMS 浓度, 首先采用不同浓度 OMS 作用于 HTF 后进行 MTT 实验, 检测其对 HTF 细胞增生活性的影响, 最终采用最小有效浓度为 40 μmol/L 的 OMS 干预 HTF。

斜视手术患者的 Tenon 囊组织是研究中广泛选择的 HTF 原代细胞培养的组织来源<sup>[21-22]</sup>, 主要原因是斜视手术患者年龄普遍偏小, 相对于白内障、青光眼等患者的 Tenon 囊组织进行原代 HTF 细胞培养的成功率较高; 其次, 青光眼患者由于在术前常使用降眼压类药物, 且不同患者术前的治疗方案存在差异, 使此类患者 Tenon 囊组织的结构、细胞特性均存在较大差异。本研究中选择的是既往无眼部手术史、无全身及其他眼部疾病史的斜视患者, 所选患者的基线情况一致, 患者 Tenon 囊组织的结构、细胞特性一致性较高, 从而保

证研究的可重复性。

肌成纤维细胞凋亡受抑制是导致 GFS 术后组织纤维化瘢痕形成的关键因素<sup>[8]</sup>。手术伤口愈合过程中,局部组织释放的 TGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子、结缔组织生长因子等细胞因子诱导 HTF 转分化为肌成纤维细胞参与组织愈合,多种细胞因子共同作用促进组织细胞的增生及细胞外基质的过度合成、分泌,肌成纤维细胞持续存在会导致组织收缩及纤维化瘢痕<sup>[8]</sup>,肌成纤维细胞的增生激活及凋亡减少是 GFS 术后组织纤维化瘢痕形成的关键因素<sup>[6-7]</sup>。细胞发生凋亡时,细胞质和染色质浓缩、核碎裂,并产生凋亡小体。细胞凋亡早期,磷脂酰丝氨酸会从细胞膜内侧翻转到细胞膜外侧,Annexin V 染色阳性提示磷脂酰丝氨酸外翻这一重要的细胞早期凋亡特征,而凋亡晚期细胞(坏死细胞)会丧失细胞膜的完整性,PI 进入细胞呈阳性染色,利用该特点可采用 Annexin V/PI 荧光染色检测细胞早期及晚期凋亡率。本研究中 OMS 通过诱导 HTF 早期凋亡来促进 HTF 凋亡。其次,OMS 干预使 HTF 纤维化模型细胞的早期凋亡率及总凋亡率升高,而 OMS 干预对正常 HTF 细胞的凋亡率无明显影响,提示 OMS 可以促进模型细胞凋亡,而对正常细胞凋亡的作用不显著,即 OMS 可能仅作用于已纤维化的 HTF,但其局部应用的组织安全性有待进一步行动物实验验证。

细胞凋亡主要由线粒体通路、内质网通路和死亡受体通路介导,其中脊椎动物细胞凋亡过程主要由线粒体通路介导。细胞受到凋亡诱导因子(如细胞超氧化物损伤等)刺激后激活 bax,使其发生寡聚化并插入线粒体膜,引起线粒体膜通透性改变,释放细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C),Cyt C 与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 形成多聚复合物,该复合物可以募集胞质中的 procaspase-9,使其剪切活化为 cleaved caspase-9,然后激活下游的 caspase-3、caspase-7,引起细胞凋亡。Caspase-9 是 caspase 顺序激活级联反应中最早的一步,因此 cleaved caspase-9 是细胞凋亡线粒体途径的起分子。Bcl-2 表达于线粒体外膜、内质网和核膜,通过阻止 Cyt C 从线粒体释放,或通过 Apaf-1 结合来抑制 caspase 活性,对细胞凋亡起到抑制作用。Bax/bcl-2 的比值及 cleaved caspase-9/procaspase-9 的比值增加起到正向促进细胞凋亡的作用<sup>[23]</sup>。HTF 细胞凋亡受抑制是 GFS 术后组织瘢痕化的重要机制,有研究者通过分析 HTF 细胞中 caspase-3/caspase-9/Apaf-1 信号通路、ROS 介导的氧化应激及线粒体膜电位的变化研究氧化锌纳米颗粒对 HTF 细胞凋亡的影响<sup>[16]</sup>。一项关于人 GFS 术

后滤过泡细胞学和免疫学的研究表明,GFS 术后局部组织细胞凋亡与组织基质的分解和促凋亡信号的释放有关,这些信号可以通过诱导代谢活性细胞的凋亡来抑制胶原合成<sup>[17]</sup>。本研究中,OMS 增加了 HTF 纤维化模型细胞 cleaved caspase-9/procaspase-9、bax/bcl-2 的比值,提示 OMS 可能通过干预 bax/bcl-2/caspase-9 介导的线粒体途径促进细胞凋亡。

氧化-抗氧化系统作为细胞凋亡线粒体途径激活的上游,在细胞凋亡过程中发挥着重要作用。多种组织细胞的研究结果表明,氧化-抗氧化系统参与细胞的氧化应激反应,介导组织细胞损伤、修复及凋亡的发生和发展,氧化-抗氧化系统是研究已明确的细胞凋亡线粒体途径激活的上游机制<sup>[24-27]</sup>。ROS、LDH、SOD、谷胱甘肽参与的氧化应激介导了硅壳纳米颗粒诱导的 H9c2 细胞凋亡和细胞毒性<sup>[25]</sup>。ROS 及 SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶在内的抗氧化酶活性与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的骨髓间充质干细胞中 caspase-3 活化、LDH 释放和细胞凋亡有关<sup>[26]</sup>。LDH 是一种氧化还原酶,在组织细胞损伤后活性增加。SOD 可以保护细胞免受过量超氧化物的损害<sup>[23]</sup>。因此,LDH 和 SOD 是评价细胞氧化应激损伤的重要指标。本研究中,OMS 增加了 HTF 纤维化模型细胞的 LDH 活性,抑制了 SOD 活性,提示 OMS 可能通过干预细胞氧化应激系统促进细胞凋亡。

OMS 目前作为一线降压药物广泛应用于临床,具有较高的人体组织安全性。其次,临床及基础研究已证实 OMS 可以有效抑制心脏、肝脏、血管、皮肤等组织的纤维化发展<sup>[9-10]</sup>。并且,OMS 可以调控组织细胞凋亡。OMS 也可以增加颈动脉内膜 TUNEL 阳性细胞的数量,即可促进内膜细胞凋亡<sup>[11]</sup>。OMS 通过增加 ROS 和凋亡蛋白 bax、caspase-3 的表达干预 HeLa 和 MCF-7 细胞的活性<sup>[12]</sup>。本研究中,OMS 可以呈浓度依赖性地抑制 HTF 的增生活性,通过诱导 HTF 早期凋亡来促进 HTF 纤维化模型细胞的凋亡,但 OMS 在局部组织应用的有效性仍有待进一步进行在体实验验证。

本研究聚焦于细胞水平开展实验,缺乏在体动物实验的验证,下一步将在动物水平探讨 OMS 局部应用的组织安全性及在 GFS 术后局部组织应用促进组织细胞凋亡的有效性。另外,本研究仅探索了 OMS 促进 HTF 细胞凋亡的潜在机制,下一步将深入探讨 OMS 促进 HTF 细胞凋亡过程中 bax、bcl-2、caspase-9 的具体分子调控机制及其促进 HTF 细胞凋亡的其他机制。局部炎症反应、炎症因子的表达变化也是 GFS 术后瘢痕形成的重要因素之一,并且局部炎症反应与氧化应激和细胞凋亡存在明确的信号交互作用,未来我们将进

一步开展这方面的研究。

综上所述,本研究结果显示 AGTR1 拮抗剂 OMS 可以有效促进 HTF 纤维化模型细胞的凋亡,线粒体凋亡途径及氧化应激途径可能是 OMS 调控细胞凋亡过程的潜在机制。本研究创新性地探索了 OMS 促进 HTF 细胞凋亡的作用途径,阐释了 bax/bcl-2/caspase-9 途径在 OMS 调节 HTF 凋亡中的作用,为干预 HTF 凋亡介导的 GFS 术后纤维化瘢痕形成提供了新思路,同时为 OMS 作为潜在防治 GFS 术后瘢痕化的新方式提供了分子理论依据。本研究结果为以 AGTR1 为靶点抑制 GFS 术后纤维化提供了细胞学基础,但该作用在 GFS 术后的实际效果仍需要进一步的动物实验论证。

**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** 王建国:参与选题、实验设计、指导研究过程、文章主要内容修改和定稿;王丽君:参与设计实验、实施研究、采集数据、分析解释数据、统计分析、论文撰写及修改和定稿;李宏松、张文怡、邵美琳、任梅梅:参与实施研究、采集数据、统计分析和起草文章

## 参考文献

- Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2081-2090. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.
- 孔亚男, 陆宏, 陈颖, 等. 青光眼滤过术后瘢痕形成机制及抗瘢痕化研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(10): 1688-1691. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.10.12.
- Kong YN, Lu H, Chen Y, et al. Mechanisms of scar formation and research progress in anti-fibrosis therapy after glaucoma filtration surgery[J]. *Int Eye Sci*, 2019, 19(10): 1688-1691. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.10.12.
- 邢瑶, 王建国, 范雅雅, 等. ILK-siRNA-AAV 对大鼠青光眼滤过术后滤过通道瘢痕形成的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40(4): 316-325. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210617-00362.
- Xing Y, Wang JM, Fan YZ, et al. Inhibitory effect of ILK-siRNA-AAV on scar formation after glaucoma filtering surgery in rats[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2022, 40(4): 316-325. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210617-00362.
- Wolters J, van Mechelen R, Al Majidi R, et al. History, presence, and future of mitomycin C in glaucoma filtration surgery[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2021, 32(2): 148-159. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000729.
- Pasquale LR, Dorman-Pease ME, Luttly GA, et al. Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(1): 23-30.
- Cai X, Yang Y, Chen P, et al. Tetramethylpyrazine attenuates transdifferentiation of TGF-beta 2-treated human Tenon's fibroblasts[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(11): 4740-4748. DOI: 10.1167/iov.16-19529.
- Xing Y, Cui L, Kang Q. Silencing of ILK attenuates the abnormal proliferation and migration of human Tenon's capsule fibroblasts induced by TGF-beta 2[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 407-416. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2644.
- 李柯, 聂圣琼, 郑雅娟. 肌纤维细胞在青光眼滤过术后伤口愈合中的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(10): 1806-1809. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.11.
- Li K, Nie SQ, Zheng YJ. Research progress on pathobiology of myofibroblast in wound healing after glaucoma filtering surgery[J]. *Int Eye Sci*, 2018, 18(10): 1806-1809. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.11.
- Cunningham JW, Claggett BL, O'Meara E, et al. Effect of sacubitril/valsartan on biomarkers of extracellular matrix regulation in patients with HFpEF[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(5): 503-514. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.05.072.
- Akershoek JJ, Brouwer KM, Vlig M, et al. Differential effects of Losartan and Atorvastatin in partial and full thickness burn wounds[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179350 [2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28614412/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0179350.
- Chen M, Ichiki T, Ohtsubo H, et al. Inhibition of balloon injury-induced neointimal formation by olmesartan and pravastatin in rats with insulin resistance[J]. *Hypertens Res*, 2007, 30(10): 971-978. DOI: 10.1291/hypres.30.971.
- Bakhtiari E, Hosseini A, Mousavi SH. The role of ROS and NF-kB pathway in olmesartan induced-toxicity in HeLa and mcf-7 cell lines[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 429-434. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.074.
- 王丽君, 李宏松, 张文怡, 等. 原代人眼 Tenon's 囊成纤维细胞的生物学特性及体外培养方案优化[J]. *临床眼科杂志*, 2020, 28(6): 551-555. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2020.06.018.
- Wang LJ, Li HS, Zhang WY, et al. Biological characteristics of primary human Tenon's capsule fibroblasts and optimization of the culture protocol *in vitro*[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2020, 28(6): 551-555. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2020.06.018.
- Wang L, Li H, Zhang W, et al. AGTR1 blocker attenuates activation of Tenon's capsule fibroblasts after glaucoma filtration surgery via the NF-kB signaling pathway[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2021, 407(1): 112786 [2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34411608/>. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112786.
- 朱晓燕, 谢琳, 谭薇. 整合素 alpha3beta3 在大鼠青光眼滤过术后结膜瘢痕形成中的作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(12): 1046-1052. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190917-00398.
- Zhu XY, Xie L, Tan W. Effect of integrin alpha3beta3 on conjunctival scar formation after glaucoma filtration surgery in rats[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(12): 1046-1052. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190917-00398.
- Wang L, Guo D, Wang Z, et al. Zinc oxide nanoparticles induce human Tenon fibroblast apoptosis through reactive oxygen species and caspase signaling pathway[J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 683: 108324 [2022-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32112740/>. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108324.
- Molteno AC, Bevin TH, Dempster AG, et al. Otago glaucoma surgery outcome study: cytology and immunohistochemistry of trabeculectomy blebs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(7): 4991-4999. DOI: 10.1167/iov.12-11553.
- Bakhtiari E, Hosseini A, Boroushaki MT, et al. Synergistic, cytotoxic and apoptotic activities of olmesartan with NF-kB inhibitor against HeLa human cell line[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(8): 614-621. DOI: 10.3109/15376516.2015.1053647.
- Nakamura F, Tsukamoto I, Inoue S, et al. Cyclic compressive loading activates angiotensin II type 1 receptor in articular chondrocytes and stimulates hypertrophic differentiation through a G-protein-dependent pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(6): 962-973. DOI: 10.1002/2211-5463.12438.
- Gong X, Shao L, Fu YM, et al. Effects of olmesartan on endothelial progenitor cell mobilization and function in carotid atherosclerosis[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1189-1193. DOI: 10.12659/MSM.892996.
- Liu Y, Kimura K, Orita T, et al. Inhibition by all-trans-retinoic acid of transforming growth factor-beta-induced collagen gel contraction mediated by human Tenon fibroblasts[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(7): 4199-4205. DOI: 10.1167/iov.13-13572.
- Hwang YH, Jung SA, Lyu J, et al. Transforming growth factor-beta1-induced human subconjunctival fibrosis is mediated by microRNA 143/145 expression[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(6): 2064-2071. DOI: 10.1167/iov.19-26797.
- 洪萌, 洪道先, 石荣先, 等. 木犀草素调控 Nrf2/HO-1 通路保护视网膜色素上皮细胞氧化损伤[J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21(1): 21-26. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.04.
- Hong M, Hong DX, Shi RX, et al. Protective effect of Luteolin on oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by regulating the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int Eye Sci*, 2021, 21(1): 21-26. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.04.
- Chen B, Zhao J, Zhang R, et al. Neuroprotective effects of natural compounds on neurotoxin-induced oxidative stress and cell apoptosis[J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25(5): 1078-1099. DOI: 10.1080/1028415X.2020.1840035.
- Cui G, Zhang H, Guo Q, et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial pathway-dependent apoptosis is induced by silica nanoparticles in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30(9): 646-655. DOI: 10.1080/15376516.2020.1805664.
- Fang J, Zhao X, Li S, et al. Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90rsk-CREB pathway[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 312 [2022-05-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31655619/>. DOI: 10.1186/s13287-019-1419-2.
- 孙瑞竹, 张绍丹, 梁远波. 氧化应激对小梁网的损伤[J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(4): 375-379. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.019.
- Sun RZ, Zhang SD, Liang YB. Oxidative injury on trabecular meshwork[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(4): 375-379. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.019.

(收稿日期: 2022-06-01 修回日期: 2022-12-28)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

