

结缔组织生长因子对人 Tenon 囊成纤维细胞中 E-cadherin 蛋白表达的促进作用

李静 谢安明

【摘要】 背景 青光眼滤过手术后滤过通道的瘢痕化是手术失败的主要原因,其主要病理机制是成纤维细胞的异常增生、间质-上皮转分化及细胞外基质的重塑。结缔组织生长因子(CTGF)是促进瘢痕形成的关键因子,而 CTGF 是否能促进人 Tenon 囊成纤维细胞(HTFs)的间质-上皮转分化尚不清楚。目的 观察 CTGF 对 HTFs 间质-上皮转分化的影响。方法 用体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖型培养液进行 HTFs 体外常规培养和传代,取 3~6 代细胞用于实验。将培养的 HTFs 分为空白对照组和 CTGF 处理组,空白对照组用 DMEM 完全培养液培养细胞,CTGF 处理组在培养液中加入 CTGF,使终质量浓度为 50 ng/ml。细胞培养后 48 h,采用细胞免疫荧光染色技术鉴定 HTFs 中上皮钙黏素(E-cadherin)蛋白的表达,采用 Western blot 法对 HTFs 中 E-cadherin 蛋白的表达量进行检测。结果 空白对照组及 CTGF 处理组 HTFs 均生长良好,呈长梭形,漩涡状排列。细胞免疫荧光染色显示,CTGF 处理组 HTFs 细胞质呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光;空白对照组 HTFs 仅见 DAPI 蓝染的细胞核,无 E-cadherin 表达的红色荧光。Western blot 法检测结果显示,空白对照组 HTFs 中 E-cadherin 蛋白无表达,而 CTGF 处理组 HTFs 中 E-cadherin 蛋白的相对表达量为 0.63 ± 0.08 。结论 间叶组织来源的成纤维细胞本身不表达 E-cadherin,在 CTGF 的刺激下成纤维细胞能够表达 E-cadherin,CTGF 促进 HTFs 的间质-上皮转分化。

【关键词】 人;成纤维细胞;Tenon 囊;结缔组织生长因子;转分化;青光眼/手术;滤过泡;瘢痕化

Promoting effect of connective tissue growth factor on expression of E-cadherin in human Tenon capsule fibroblasts Li Jing, Xie Anming. Department of Ophthalmology, Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China
Corresponding author: Li Jing, Email: lix-ww@163.com

[Abstract] **Background** Scarring of filtration channel following glaucoma filtering surgery is a main cause of the failure of the surgery. The proliferation, epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix remodeling of fibroblasts are thought to be the primary pathological mechanism of scarring. Connective tissue growth factor (CTGF) plays a promoting role in the formation of scar. Whether CTGF participates in mesenchymal-epithelial transition of human Tenon capsule fibroblasts (HTFs) is not clear yet. **Objective** This study attempted to investigate the effect of CTGF on the mesenchymal-epithelial transition of HTFs *in vitro*. **Methods** HTFs were cultured and passaged in high glucose DMEM medium with 10% fetal bovine serum, and the cells of generation 3-6 were used in this experiment. The cells were divided into the blank control group and CTGF-treated group and were routinely cultured in the blank control group. CTGF was added in the medium in the CTGF-treated group, with the final concentration 50 ng/ml CTGF. Immunofluorescence staining was used to identify and locate the expression of E-cadherin protein in the cells, and Western blot assay was employed to quantitatively analyze the expression level of E-cadherin protein in 48 hours after culture. **Results** The HTFs grew well with the spindle-like shape and vortex-like arrangement. The red fluorescence (E-cadherin protein) in the cytoplasm and blue fluorescence in the cellular nucleus were seen in the CTGF-treated group, but only nucleus with blue fluorescence were obtained in the blank control group. Western blot assay showed that the E-cadherin protein expression was absent in the blank control group, however, the relative expression level of E-cadherin protein in the cells was 0.63 ± 0.08 . **Conclusions** E-cadherin protein is not

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.005

作者单位: 710068 西安, 陕西省人民医院眼科(李静); 710061 西安交通大学第一附属医院眼科(谢安明)

通信作者: 李静, Email: lix-ww@163.com

expressed in fibroblast derived from mesenchymal tissue. However, CTGF can induce the expression of E-cadherin in HTFs. This study suggests that CTGF promotes the mesenchymal-epithelial transition of HTFs *in vitro*.

[Key words] Humans; Fibroblasts; Tenon capsule; Connective tissue growth factor; Transdifferentiation; Glaucoma/surgery; Bleb; Scarring

青光眼滤过手术仍是青光眼治疗的主要手术方式,可通过建立房水外引流通道来降低眼压,从而挽救或维持视功能^[1]。房水引流通道的持续通畅是青光眼滤过手术成功的关键,而滤过区的瘢痕形成是手术失败的关键因素,术后成纤维细胞的异常增生、收缩以及细胞外基质的合成增多是滤过组织瘢痕化的主要病理机制^[2]。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的下游反应介质,是刺激成纤维细胞增生、重塑细胞外基质、启动成纤维细胞转分化等病理性纤维瘢痕化过程中的关键因子^[3-4]。上皮钙黏素(E-cadherin)是上皮细胞的标志物,主要功能是介导同类细胞间的特异性黏附。来自间叶组织的正常成纤维细胞不表达 E-cadherin,但在组织瘢痕化的病理过程中是否存在间质-上皮转分化机制尚不清楚。本研究中观察 CTGF 对人 Tenon 囊成纤维细胞(human Tenon capsule fibroblasts, HTFs) E-cadherin 蛋白表达的影响,探索青光眼术后滤过区组织瘢痕化的机制,为抗青光眼滤过术后瘢痕化的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人 Tenon 囊成纤维细胞株(陕西省人民医院分子中心)。高糖型 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(杭州四季青公司);分析纯二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司);CTGF(美国 Peprotech 公司);抗 β -tubulin 兔多克隆抗体(bs-4511R, 北京博奥森公司);兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体(Ab53033)、Cy3 偶联山羊抗兔 IgG(H+L)(CW0159)(英国 Abcam 公司)。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HTFs 的培养 用含体积分数 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养液于 CO₂ 恒温培养箱中培养 HTFs, 细胞融合至 80% 时进行传代培养。传代后每 24 小时更换培养液, 3~4 d 细胞传代 1 次, 取 3~6 代细胞用于实验。

1.2.2 CTGF 溶液的制备 用质量分数 0.1% BSA 将 CTGF 溶液稀释至质量浓度为 100 ng/ml, 分装到高压蒸汽灭菌的 EP 管里, -20 °C 保存, 使用时以 DMEM 培

养液稀释至所需质量浓度。

1.2.3 细胞免疫荧光染色法检测和定位 HTFs 中 E-cadherin 蛋白的表达 收集生长良好的细胞, 经质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化后制备成细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^3 个/ μ l, 接种于 96 孔板中, 待细胞充分贴壁; 空白对照组用 DMEM 完全培养液培养 HTFs, CTGF 处理组在培养液中加入 50 ng/ml CTGF, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 48 h 后弃去培养液, 用 PBS 冲洗细胞 3 次, 每孔加入 100 μ l 预冷甲醇, 置于 -20 °C 冰箱中固定 30 min。向每个培养孔中加入体积分数 0.1% Triton X-100 溶液, 室温下放置 30 min 进行破膜处理, 再用 PBS 冲洗细胞 3 次, 每孔加入 1% BSA 溶液 100 μ l, 孵育 1 h; 加入相应一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗细胞 3 次, 加入相应二抗室温下避光孵育 40 min, PBS 冲洗细胞 3 次, 每孔加入 10 μ g/ml DAPI 溶液 100 μ l, 室温下避光孵育 5 min。吸去 DAPI 溶液, PBS 冲洗细胞 3 次, 倒置荧光显微镜下观察, 利用 NIS-Elements D 3.2 显微照相系统进行拍照。

1.2.4 Western blot 法检测细胞中 E-cadherin 蛋白的表达水平 以含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 HTFs, 贴壁生长后 48 h, PBS 清洗, 空白对照组和 CTGF 处理组的培养方法同 1.2.3。收集细胞后, RIPA 裂解液法常规提取细胞总蛋白, BCA 法测定细胞总蛋白的质量浓度, 配制 SDS-PAGE 凝胶, Marker 上样量为 5 μ l, 蛋白样品上样量为每孔 25 μ l, 其余各孔均用 1 倍 loading buffer 补足至 25 μ l。设置初始电压为 90 V, 待溴酚蓝指示剂移至浓缩胶与分离胶交界处时, 调整电压为 120 V, 待溴酚蓝指示剂到达分离胶下缘时, 终止电泳。转膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封闭, 加入兔抗人 E-cadherin 抗体(1:500)或 β -tubulin 抗体(1:100), 4 °C 孵育过夜; 洗膜, 加入相应的羊抗兔二抗(1:12 000)室温下孵育 1 h; 利用 Quantity One 凝胶图像分析软件分析特异条带灰度值进行分析。实验重复 3 次, 以 β -tubulin 为内参, 蛋白表达强度以各组条带灰度值与 β -tubulin 条带灰度值的比值表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0(序列号:10034432; Chicago 公司, USA) 统计学软件进行统计分析, 本研究中测量指标的

计量资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 个组间 HTFs 中 E-cadherin 相对表达量的差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 HTFs 的形态学表现

空白对照组 HTFs 呈长梭形,细胞核较大,位于细胞的中部,细胞质丰富,细胞呈漩涡状排列,增生能力强。CTGF 处理组 HTFs 的形态及排列方式与空白对照组相比无明显改变(图 1)。

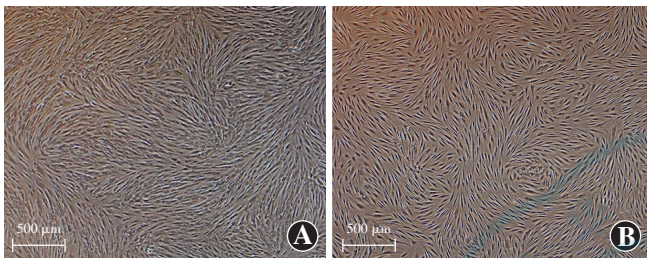


图 1 培养 HTFs 的形态 可见细胞呈长梭形,漩涡状排列(标尺 = 500 μm , $\times 400$) A:空白对照组 B:CTGF 处理组

2.2 2 个组 HTFs 中 E-cadherin 蛋白的表达定位

细胞免疫荧光染色结果显示,空白对照组可见 DAPI 蓝染的细胞核(图 2A),未见 E-cadherin 蛋白荧光表达,而 CTGF 处理组可见 HTFs 有 E-cadherin 蛋白的荧光表达,在细胞质中均匀表达(图 2B)。

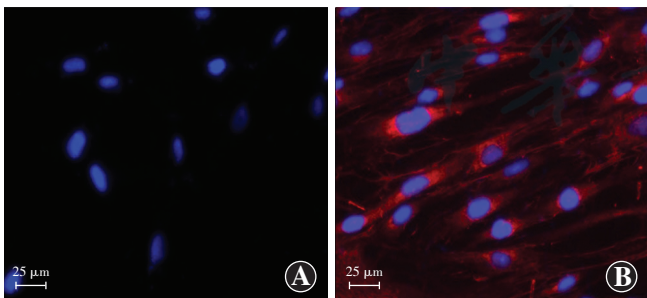


图 2 2 个组细胞 E-cadherin 蛋白免疫荧光染色(标尺 = 25 μm , $\times 400$) A:空白对照组可见蓝染细胞核,但未见 E-cadherin 蛋白表达的红色荧光(Cy3 红色荧光) B:CTGF 处理组可见 E-cadherin 蛋白的红色荧光及蓝染的细胞核

2.3 Western blot 法检测 CTGF 对 HTFs 中 E-cadherin 蛋白表达的影响

Western blot 法检测结果显示,培养后 48 h 空白对照组和 CTGF 处理组细胞中 E-cadherin 蛋白的相对表达量分别为 0.00 ± 0.00 和 0.63 ± 0.08 ,即正常 HTFs 无 E-cadherin 蛋白的表达,经 50 ng/ml CTGF 刺激后 HTFs 可表达 E-cadherin 蛋白(图 3)。

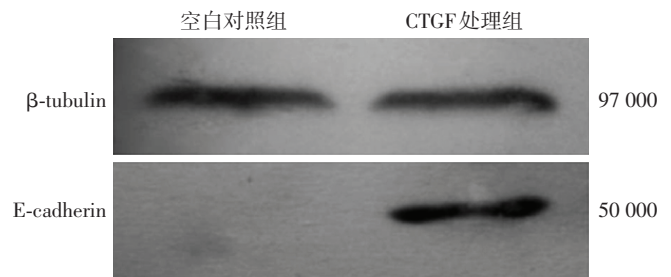


图 3 Western blot 法检测 2 个组 HTFs 中 E-cadherin 蛋白表达的变化 CTGF:结缔组织生长因子;E-cadherin:上皮钙黏素

3 讨论

青光眼滤过手术后滤过通道的瘢痕化是机体自身创伤愈合机制在局部的表现^[5],其病理生理过程复杂,涉及细胞因子的合成和释放,成纤维细胞和炎症细胞的活化、增生、迁移和细胞表型的转化以及细胞外基质的合成和降解等^[6]。CTGF 是创伤愈合纤维化过程中的关键因子^[7-9],能够促进成纤维细胞的增生、迁移及转分化,调节胶原等细胞外基质的合成等^[3,10]。CTGF 还能刺激纤维连接蛋白的趋化和表达,促进内皮细胞的增生、迁移和黏附,促进新生血管形成^[11],故 CTGF 与眼内多种纤维化疾病等的发生密切相关^[12-14]。Seher 等^[15]研究显示,人成纤维细胞具有较强的 CTGF 表达潜能,组织受到创伤后,成纤维细胞 CTGF 的表达明显上调。Esson 等^[16]向滤过泡内注射 CTGF 后发现其具有促进滤过通道瘢痕形成的作用。同时,Wang 等^[17]发现滤过术后结膜下注射 CTGF 抗体能较好地维持眼压和滤过泡的大小。Jing 等^[18]将 CTGF RNA 干扰转染 HTFs 后,可以明显抑制 HTFs 的增生。上述研究均提示,CTGF 在组织纤维化瘢痕形成过程中起重要作用。

E-cadherin 是上皮细胞的标志物,其主要功能是介导相同类型细胞间的特异性黏附,主要分布于同种类型上皮细胞侧面的黏附小带,具有维持上皮的完整性、极性、细胞形态分化等重要作用^[19]。青光眼术后滤过泡瘢痕化的主要病理机制是成纤维细胞的黏附、增生、转分化以及细胞外基质的重塑,正常情况下来源于间叶组织的成纤维细胞不表达 E-cadherin,但在损伤、炎症等病理情况下是否有影响尚不清楚。

研究证实,CTGF 能够刺激并上调 HTFs 中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达, α -SMA 表达的峰值出现在 50 ng/ml CTGF 作用后 48 h^[20],提示 CTGF 可以促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化,进而分泌大量细胞外基质,进一步启动纤维化过程。本研究结果显示,常规培养的 HTFs 并不

表达 E-cadherin, 而 CTGF 处理组 HTFs 则有 E-cadherin 的表达。有研究报道, TGF- β 下调 E-cadherin 蛋白的表达水平^[21]。CTGF 作为 TGF- β 的下游介质, 可以上调 HTFs 中 E-cadherin 蛋白的表达, 该现象可能与以下因素有关: (1) TGF- β 主要通过 Smad 通路诱导 CTGF 的表达, 促进组织纤维化和瘢痕形成, 但体内存在不依赖 Smad 的信号通路介导 CTGF 发挥生物学作用^[22]。(2) 近来研究发现, CTGF 可通过 Wnt 信号通路上调肾小管上皮细胞中 E-cadherin 蛋白的表达, 促进间质转化^[23], 提示 CTGF 在促进组织纤维化和瘢痕化的病理过程中可能存在新的信号通路和分子机制。(3) 青光眼滤过手术后滤过通道的瘢痕形成是一个复杂的病理生理过程, 涉及多种细胞因子的合成和释放, 成纤维细胞和炎症细胞的活化、增生、迁移和细胞表型的转化以及细胞外基质的合成和降解, 构成了一个包含多个信号转导途径和反馈回路的网络状功能体系。本研究推测 TGF- β 通过促进 HTFs 向手术区的迁移, 加速炎症因子的释放, 诱导血管生长因子表达和新生血管的生成, 其主要在瘢痕化形成的早期炎症阶段和中期增生阶段发挥作用; 在瘢痕形成的晚期 CTGF 行使主导作用, 造成组织创伤修复、肉芽组织形成及细胞外基质重新降解和沉积。本研究中检测出 CTGF 可刺激 HTFs 表达 E-cadherin 蛋白, 提示 CTGF 可促进成纤维细胞发生间质-上皮转分化, 呈现上皮细胞的某些特性, 从而促进已迁移到手术区的 HTFs 的局部黏附和增生, 同时 CTGF 通过其自身的细胞因子网络加速细胞外基质的降解和沉积, 导致滤过通道的瘢痕化。

目前, 国内外关于 CTGF 促进 HTFs 间质-上皮转分化的研究仍鲜有报道。本研究结果显示, CTGF 虽为 TGF- β 的下游效应介质, 但仍有可能通过新的信号转导通路和细胞分子机制发挥与 TGF- β 不同的生物学功能。

本研究中未对 CTGF 处理后 HTFs 中 E-cadherin mRNA 的表达量进行检测, 尚无法得知 CTGF 对 E-cadherin 蛋白表达量的上调作用与剂量及时间有无线性关系, 同时 CTGF 抑制剂对 E-cadherin 蛋白表达的影响及其具体信号通路也未涉及, 这些均有待进一步研究。

参考文献

- [1] Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound modulation after filtration surgery [J]. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57(6): 530-550. doi: 10.1016/j.survophthal.2012.01.008.
- [2] 漆雪梅, 刘流. 肌成纤维细胞与创伤的关系 [J]. *中华医学美容杂志*, 2001, 7(2): 109-111. doi: 10.3760/cma.j.issn.1671-0290.2001.02.032.
- [3] Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation [J]. *FASEB J*, 2004, 18(3): 469-479.
- [4] Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation [J]. *FASEB J*, 2005, 19(7): 729-738.
- [5] Turgut B, Eren K, Akin MM, et al. Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 421-429. doi: 10.2147/DDDT.S63320.
- [6] Lockwood A, Brocchini S, Khaw PT. New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(1): 65-71. doi: 10.1016/j.coph.2012.10.008.
- [7] Gibson DJ, Pi L, Sriram S, et al. Conditional knockout of CTGF affects corneal wound healing [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(4): 2062-2070. doi: 10.1167/iops.13-12735.
- [8] Sriram S, Gibson DJ, Robinson P, et al. Assessment of anti-scarring therapies in ex vivo organ cultured rabbit corneas [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 173-182. doi: 10.1016/j.exer.2014.06.014.
- [9] Accornero F, van Berlo JH, Correll RN, et al. Genetic analysis of connective tissue growth factor as an effector of transforming growth factor β signaling and cardiac remodeling [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(12): 2154-2164. doi: 10.1128/MCB.00199-15.
- [10] Lee SY, Kim SI, Choi ME. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases [J]. *Transl Res*, 2015, 165(4): 512-530. doi: 10.1016/j.trsl.2014.07.010.
- [11] 孙冰, 柯根杰, 胡闻, 等. 不同类型和病程视网膜前膜中结缔组织生长因子和纤维连接蛋白的差异表达 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(8): 757-762. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.08.013.
- [12] van Setten G, Aspiotis M, Blalock TD, et al. Connective tissue growth factor in pterygium; simultaneous presence with vascular endothelial growth factor-possible contributing factor to conjunctival scarring [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2003, 241(2): 135-139.
- [13] Wunderlich K, Pech M, Eberle AN, et al. Expression of connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in plaques of human anterior subcapsular cataracts and membranes of posterior capsule opacification [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 21(2): 627-636.
- [14] Guo CM, Wang YS, Hu D, et al. Modulation of migration and Ca²⁺ signaling in retinal pigment epithelium cells by recombinant human CTGF [J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(10): 852-862. doi: 10.3109/02713680903128935.
- [15] Seher A, Nickel J, Mueller TD, et al. Gene expression profiling of connective tissue growth factor (CTGF) stimulated primary human tenon fibroblasts reveals an inflammatory and wound healing response in vitro [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 53-62.
- [16] Esson DW, Neelakantan A, Iyer SA, et al. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(2): 485-491.
- [17] Wang JM, Hui N, Fan YZ, et al. Filtering bleb area and intraocular pressure following subconjunctival injection of CTGF antibody after glaucoma filtration surgery in rabbits [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(5): 480-483. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.05.04.
- [18] Jing J, Li P, Li T, et al. RNA interference targeting connective tissue growth factor inhibits the transforming growth factor- β 2 induced proliferation in human Tenon capsule fibroblasts [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2013, 2013: 354798 [2015-05-01]. <http://www.oalib.com/paper/3077811>. doi: 10.1155/2013/354798.
- [19] Gumbiner B, McIrea P. Catenin as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins [J]. *J Cell Sci*, 1993, 17: 155-158.
- [20] Zhang J, Gao P, Ye W, et al. Functional characteristics of connective tissue growth factor on human Tenon's capsule fibroblast [J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(1): 53-61. doi: 10.3109/02713683.2013.833245.
- [21] Yang T, Chen M, Sun T. Simvastatin attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(6): 863-874. doi: 10.1159/000350104.
- [22] Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(16): 3573-3584. doi: 10.1159/000350104.
- [23] Yang Z, Sun L, Nie H, et al. Connective tissue growth factor induces tubular epithelial to mesenchymal transition through the activation of canonical Wnt signaling in vitro [J]. *Ren Fail*, 2015, 37(1): 129-135. doi: 10.3109/0886022X.2014.967699.

(收稿日期: 2015-03-07)

(本文编辑: 刘艳 张宇)