

· 实验研究 ·

SIS3 对糖皮质激素诱导高眼压模型小鼠小梁网纤维化的抑制作用及其机制

任静 段世超 崔慧玲 王迪 赵茹梦 刘茜 李海军

河南省人民医院 河南省立眼科医院 郑州大学人民医院 河南大学人民医院, 郑州 450003

通信作者: 李海军, Email: lihaijun@zzu.edu.cn

【摘要】 目的 探索特异性 Smad3 抑制剂(SIS3)对糖皮质激素诱导小鼠高眼压模型的作用及其可能的机制。**方法** 取 51 只 8 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠,采用随机数字表法随机分为对照组、地塞米松组和 SIS3 组,每组 17 只。对照组每周于小鼠结膜穹窿部注射 20 μ l 赋形剂 2% 聚乙烯醇,地塞米松组和 SIS3 组每周注射 20 μ l 10 mg/ml 醋酸地塞米松,同时 SIS3 组采用 100 μ g/ml SIS3 纳米胶束滴眼液每日点眼 3 次,连续 4 周。采用 Icare 眼压计每周监测小鼠眼压,4 周后处死小鼠并取出眼球,苏木精-伊红染色观察小梁网组织形态,Masson 染色检测小梁网组织中胶原的沉积面积,免疫荧光染色检测小梁网组织细胞外基质中纤维连接蛋白(FN)、胶原蛋白 I (Col-1)的表达。获取因眼球破裂伤捐献眼球的小梁网组织,培养获得原代人小梁网细胞(HTMCs),采用免疫荧光染色和 Western blot 法检测地塞米松诱导后细胞中 myocilin 的表达水平进行 HTMCs 鉴定。将原代 HTMCs 分为对照组、地塞米松组和 SIS3 组,分别用正常培养基、含 400 nmol/L 地塞米松的培养基、含 400 nmol/L 地塞米松+10 μ mol/L SIS3 的培养基培养 48 h。采用 Western blot 法检测 HTMCs 中 FN、Col-1 和 p-Smad3/Smad3 表达水平。**结果** 各组小鼠给药前后不同时间点眼压总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}}=72.94, P<0.001; F_{\text{时间}}=33.19, P<0.001$)。与基线眼压比较,地塞米松组在给药后各时间点眼压均升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$);给药 1、2、3、4 周时对照组和 SIS3 组眼压均明显低于地塞米松组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。苏木精-伊红染色结果显示,各组小鼠虹膜角膜角均开放,小梁网结构无明显差异。对照组、地塞米松组和 SIS3 组小梁网组织胶原阳性表达面积分别为 $(9.57\pm2.91)\%$ 、 $(27.75\pm5.88)\%$ 和 $(11.67\pm3.78)\%$,总体比较差异有统计学意义($F=25.91, P<0.001$),其中对照组和 SIS3 组小梁网组织胶原阳性表达面积明显低于地塞米松组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。对照组、地塞米松组和 SIS3 组小梁网组织 FN 荧光强度分别为 8.00 ± 1.92 、 14.01 ± 2.74 和 7.85 ± 0.64 ,Col-1 荧光强度分别为 6.90 ± 1.16 、 14.36 ± 3.19 和 4.90 ± 0.88 ,总体比较差异均有统计学意义($F=15.93/30.29$, 均 $P<0.001$),其中对照组和 SIS3 组 FN 和 Col-1 荧光强度明显低于地塞米松组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。免疫荧光染色和 Western blot 显示原代培养的细胞表达 myocilin,且经地塞米松诱导后细胞中 myocilin 表达水平显著增加,鉴定其为 HTMCs。各组细胞中 FN、Col-1 及 p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=8.22/23.08/8.78$, 均 $P<0.05$),其中对照组和 SIS3 组 FN、Col-1 和 p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达量明显低于地塞米松组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** SIS3 通过抑制 p-Smad3 减少小梁网细胞外基质沉积,减轻小梁网组织的纤维化,从而达到降眼压效果。

【关键词】 细胞外基质; 小梁网; 纤维化; 糖皮质激素; Smad3 蛋白; 特异性 Smad3 抑制剂

基金项目: 国家自然科学基金 (U1904166)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240401-00093

Inhibitory effect of SIS3 on trabecular meshwork fibrosis in mice with glucocorticoid-induced ocular hypertension and its mechanism

Ren Jing, Duan Shichao, Cui Huiling, Wang Di, Zhao Rumeng, Liu Qian, Li Haijun

Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Li Haijun, Email: lihaijun@zzu.edu.cn



中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究

[Abstract] Objective To explore the effect of specific inhibitor of Smad3 (SIS3) on glucocorticoid-induced ocular hypertension in mice and its possible mechanism. **Methods** Fifty-one eight-week-old female C57BL/6J mice were randomly divided into control group, dexamethasone group and SIS3 group by the random number table method, with 17 mice in each group. Mice in the control group were injected with 20 μ l 2 % polyvinyl alcohol into the conjunctival fornix every week for 4 weeks. Mice in the dexamethasone group and SIS3 group were injected with 20 μ l 10 mg/ml dexamethasone acetate every week and SIS3 group was treated with additional 100 μ g/ml SIS3 nanomicelle eye drops 3 times daily for up to 4 weeks. Intraocular pressure (IOP) was measured weekly using Icare rebound tonometer. Mice were sacrificed 4 weeks after treatment, and the eyeballs were removed. Morphology of trabecular meshwork (TM) tissues were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. The collagen deposition area in TM tissues were examined by Masson staining. Fibronectin (FN) and collagen type I (Col-1) in the extracellular matrix of TM tissue were detected by immunofluorescence staining. TM tissues were obtained from donated patients, and primary human trabecular meshwork cells (HTMCs) were obtained by culture. The expression level of myocilin in dexamethasone-induced HTMCs was detected by immunofluorescence and Western blot for cell identification. Primary HTMCs were divided into normal control group, dexamethasone group and SIS3 group cultured with normal culture medium, medium containing 400 nmol/L dexamethasone, medium containing 400 nmol/L dexamethasone+10 μ mol/L SIS3 for 48 hours, respectively. The expression levels of FN, Col-1 and p-Smad3/Smad3 proteins were measured by Western blot. The use and care of animals complied with the ARVO statement. This study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Zhengzhou University (No. ZZU-LA20220729). The collection of TM tissue specimens complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Medical Ethics Committee of Henan Provincial Eye Hospital (No. HNEECKY-2022[18]). The patients knew the purpose of the experiment and signed the informed consent forms. **Results** There was a significant overall difference in IOP among the three groups at different time points after administration ($F_{\text{group}} = 72.94, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 33.19, P < 0.001$). Compared with baseline, IOP was increased in the dexamethasone group at each time point after administration, and the differences were statistically significant (all $P < 0.001$). The IOP of the control and SIS3 groups at weeks 1, 2, 3, 4 were significantly lower than that of the dexamethasone group (all $P < 0.001$). HE staining showed that the iridocorneal angles of all groups were open with similar morphology of the TM structure. Masson staining showed that the positive expression area of collagen in the control group, dexamethasone group and SIS3 group was $(9.57 \pm 2.91)\%$, $(27.75 \pm 5.88)\%$ and $(11.67 \pm 3.78)\%$, respectively, with a statistically significant difference among the three groups ($F = 25.91, P < 0.001$), and the positive expression area of collagen was significantly lower in the control group and SIS3 group than in the dexamethasone group (all $P < 0.001$). The fluorescence expression level of FN in the control group, dexamethasone group and SIS3 group was 8.00 ± 1.92 , 14.01 ± 2.74 and 7.85 ± 0.64 , respectively, and the fluorescence expression level of Col-1 was 6.90 ± 1.16 , 14.36 ± 3.19 and 4.90 ± 0.88 , respectively, with statistically significant differences among the three groups ($F = 15.93, 30.29$; both $P < 0.001$), and the fluorescence expression levels of FN and Col-1 were significantly lower in the control group and SIS3 group than in the dexamethasone group (all $P < 0.01$). Immunofluorescence staining and Western blot showed that the cultured primary cells expressed myocilin and the expression level of myocilin was significantly increased after dexamethasone induction, which was identified as HTMCs. There were statistically significant differences in the relative expression levels of FN, Col-1, and p-Smad3/Smad3 proteins among different groups of cells ($F = 8.22, 23.08, 8.78$; all $P < 0.05$), and the relative expression levels of FN, Col-1, and p-Smad3/Smad3 proteins were significantly lower in the control group and SIS3 group than in the dexamethasone group (all $P < 0.05$). **Conclusions** SIS3 reduces IOP by inhibiting p-Smad3, reducing extracellular matrix deposition in TM, and reducing fibrosis in the TM tissue.

[Key words] Extracellular matrix; Trabecular meshwork; Fibrosis; Glucocorticoids; Smad3 protein; Specific inhibitor of Smad3

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U1904166)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240401-00093



青光眼常因眼压升高导致视神经不可逆性损伤,严重者可致盲。全球青光眼患病率约为 3.54%,预计 2040 年患者数量将增加到 1.118 亿^[1]。原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)是常见的青光眼类型,约占所有原发性青光眼的 70%^[1-2]。眼压升高多因小梁网组织中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常沉积导致小梁网纤维化造成房水流出阻力增加所致^[3]。抑制小梁网纤维化是防治青光眼的主要策略之一^[4-5]。

研究证实,转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad 通路是诱导组织纤维化的主要途径,其在诱导小梁网组织纤维化的途径中扮演重要角色^[6-7]。POAG 患者房水中活性 TGF- β 2 和总 TGF- β 2 水平显著升高,在离体培养的人眼小梁网细胞中 TGF- β 2 水平也有不同程度升高, TGF- β 促进 ECM 成分,如胶原蛋白(collagen, Col)和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的表达并抑制 ECM 的降解^[8]。Smad3 是 TGF- β 信号通路的直接下游分子,是病理纤维化过程中 ECM 合成的重要介质^[9]。抑制 Smad3 蛋白的胞内磷酸化可以减少 TGF- β 诱导的纤维化^[10]。特异性 Smad3 抑制剂(specific inhibitor of Smad3, SIS3)通过抑制 Smad3 的磷酸化来抑制 TGF- β /Smad3 信号通路,具有改善多种组织纤维化的效果^[11-13];然而其在小梁网组织纤维化方面的作用尚不清楚。研究证实,糖皮质激素可诱导小梁网 ECM 纤维化,使房水流出阻力增加,导致眼压升高^[14]。建立糖皮质激素诱导的高眼压或青光眼动物模型,有助于探讨 POAG 的发病机制以及新的治疗方法。因此,本研究探讨 SIS3 对糖皮质激素诱导的小梁网组织纤维化的疗效,为青光眼提供潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及组织标本来源 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 51 只,体质量 16~19 g,购自郑州华兴实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002]。自由获取食物和水,环境温度控制在 22~26℃,湿度控制在 45%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗循环。所有实验动物的饲养和使用均符合美国视觉和眼科研究协会的声明,本研究方案经郑州大学动物伦理委员会批准(批文号:ZZU-LA20220729)。原代人小梁网细胞(human trabecular meshwork cells, HTMCs)来源于河南省立眼科医院既往因眼球破裂伤行 1 期眼球摘除的无其他眼病患者的小梁网组织。小梁网组织

标本的采集符合《赫尔辛基宣言》原则,并经河南省立眼科医院医学伦理委员会批准[批文号:HNEECKY-2022(18)],患者知晓实验目的并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 组织解离试剂盒(130-101-540,德国 Miltenyi Biotec 公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、DMEM/F12 培养基(C3280)、醋酸地塞米松(SD9520)、苏木精-伊红染色试剂盒(G1120)、Masson 三色染色试剂盒(G1346)(北京索莱宝生物科技有限公司);胎牛血清(澳大利亚 Gibco 公司);地塞米松(D4902)、DAPI 染色液(28718-90-3)(美国 Sigma-Aldrich 公司);SIS3(S3552,美国休斯顿 Selleck 化学公司);放射免疫沉淀法裂解缓冲液(P0013B)、BCA 蛋白定量试剂盒(P0010S)、蛋白酶抑制剂混合物(P1049)(上海碧云天生物技术有限公司);PAGE 凝胶快速制备试剂盒(PG110)、无蛋白封闭液(PS108)、ECL 化学发光检测试剂盒(SQ202)(上海雅酶生物医药科技有限公司);小鼠抗 myocilin 单克隆抗体(sc-137233,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);兔抗 GAPDH 多克隆抗体(10494-1-AP)、兔抗 Col-1 多克隆抗体(14695-1-AP)、小鼠抗 Smad3 单克隆抗体(66516-1-Ig)(武汉三鹰生物技术有限公司);兔抗 FN 单克隆抗体(ab268020,英国 Abcam 公司);兔抗 p-Smad3 单克隆抗体(9520,美国 Cell Signaling Technology 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(EF0002)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗(EF0001)(山东思科捷生物技术有限公司);Alexa Fluor[®] 488 标记驴抗兔荧光二抗(711-545152)、Cy[™]3 AffiniPure[®] 标记驴抗鼠荧光二抗(715-165-150)(美国 Jackson ImmunoResearch 公司);0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液(南京瑞年百思特制药有限公司);FAS 眼球固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司)。醋酸地塞米松混悬液(10 mg/ml)和 SIS3 纳米胶束滴眼液(100 μ g/ml)由河南省立眼科医院李景果教授配制^[15]。小动物气体麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);手持回弹眼压计(芬兰 Icare 公司);ChemiDoc MP 系统(美国 Bio-Rad 公司);激光扫描共聚焦显微镜(德国莱卡公司);3D 数字切片扫描仪(匈牙利 3D HISTECH 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 采用随机数字表法将小鼠分为对照组、地塞米松组和 SIS3 组,每组 17 只。参照文献^[14]的方法,地塞米松组小鼠采用结膜穹隆部注射醋酸地塞米松混悬液进行高眼压造模,即采用 0.8 L/min 氧和 2.5% 异氟烷混合麻醉小鼠,右眼

0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼 1~2 滴,翻开下眼睑,采用 29G 胰岛素注射器针头于右眼结膜穹隆部注射 10 mg/ml 醋酸地塞米松混悬液 20 μ l。每周注射 1 次,连续 4 周;SIS3 组小鼠采用与地塞米松组同样处理方式的同时,局部用 100 μ g/ml 无菌 SIS3 纳米胶束滴眼液点眼,每日 3 次,持续 4 周;对照组小鼠右眼结膜穹隆部注射 20 μ l 赋形剂 2% 聚乙烯醇。醋酸地塞米松混悬液制备方法如下:(1)赋形剂的制备 将 2% 聚乙烯醇 200 mg 放入烧杯中,加入去离子水 10 ml,磁力搅拌(300 r/min)过夜。(2)10 mg/ml 醋酸地塞米松混悬液的制备 将 1 ml 丙酮加入 100 mg 醋酸地塞米松中,混合至溶液变清亮,用 1 ml 注射器收集溶液,将针头插入赋形剂中缓慢释放溶液,磁力搅拌(1 500 r/min) 2 min,将混合液转移至茄形瓶中,旋转蒸发丙酮,直到溶液的剩余体积约为 10 ml,将溶液定容至 10 ml,得到 10 mg/ml 醋酸地塞米松混悬液,监测 pH 值为 7.1。该制剂使用前在超净台中用过滤头进行过滤除菌。

1.2.2 眼压测量 每周注射前,于 10:00~14:00 之间,采用 Icare 手持回弹眼压计测量小鼠右眼日间眼压。取 3 次测量的平均值作为最终的眼压值。

1.2.3 苏木精-伊红染色和 Masson 三色染色检测小鼠小梁网组织形态学变化和胶原沉积情况 各组随机选取 5 只小鼠,于注射第 4 周,颈椎脱臼法处死小鼠,剖取右眼眼球,立即用 FAS 眼球固定液固定,脱水,石蜡包埋;使用旋转切片沿眼球矢状面行 3.5 μ m 厚石蜡切片,参照苏木精-伊红染色试剂盒对眼球石蜡切片进行组织病理染色,显微镜下观察小梁网组织形态。参照 Masson 三色染色试剂盒对眼球石蜡切片进行染色,使用 3D 数字切片扫描仪 73 倍下获取图像。采用 ImageJ 软件分析小梁网胶原阳性表达面积,为了避免切片本身导致的染色差异,每组选取 5 只小鼠的切片,用 Photoshop 软件创建 960 $\times$ 110 像素模板,框选小梁网组织,各个切片的胶原阳性表达面积=胶原着色总面积/(960 $\times$ 110) $\times$ 100%。

1.2.4 免疫荧光染色观察小鼠小梁网组织 FN 和 Col-1 蛋白表达 取各组石蜡切片,烤片后,用二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇和 75%乙醇脱蜡和再水合;将切片浸入柠檬酸缓冲液,于高压锅中煮沸伴蒸气喷洒 2.5 min;取出切片冷却后,用 2 倍柠檬酸盐缓冲溶液处理 3 min,用含 4% 牛血清白蛋白和 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液室温封闭 1 h,滴加荧光标记的抗 FN、抗 Col-1(均 1:500 稀释)抗体,在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;用含 4% 牛血清白蛋白和 0.25% Triton X-100 的 PBS 溶液漂洗 3 次,滴加相应的二抗(1:300 稀释)室

温孵育 1 h;漂洗清除残余二抗,滴加 DAPI 染色液室温避光孵育 10 min,用抗荧光淬灭封片剂进行封片,于激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.5 原代 HTMCs 的分离培养和鉴定 参照本课题组前期工作^[16-17]进行原代 HTMCs 的分离培养和鉴定。取捐献眼球,手术剪沿角巩膜缘 3 mm 处环形将眼球剪开,获取角巩膜环,在显微镜下用显微镊环形撕取小梁网组织。参照组织解离试剂盒说明书,取小梁网组织,于 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h,1 000 $\times$ g 离心 5 min,弃去上清液,加入 1 ml 含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 新鲜培养基,采用微量移液器轻轻吹打重悬小梁网细胞,将细胞悬液转移至培养皿中进行培养;每 2 天换液 1 次,当细胞密度达到 80% 以上进行传代,取传至 5~8 代的 HTMCs 进行实验。采用免疫荧光和 Western blot 法检测小梁网细胞的标志物 myocilin 对其进行鉴定。

1.2.6 HTMCs 分组及处理 将 HTMCs 接种到细胞培养瓶中,分为对照组、地塞米松组和 SIS3 组,分别在含 15% 胎牛血清的新鲜 DMEM/F12 培养基、含 400 nmol/L 地塞米松的培养基、含 400 nmol/L 地塞米松+10 μ mol/L SIS3 的培养基中孵育 48 h。地塞米松作用浓度的选择参照本课题组前期工作^[16]。

1.2.7 Western blot 法检测各组 HTMCs 中蛋白相对表达量 取各组处理后的细胞,用含有蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法缓冲液裂解,4 $^{\circ}$ C 下 14 000 $\times$ g 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 10 μ g 蛋白,采用 10% 十二烷基硫酸钠凝胶电泳分离,并转印到硝酸纤维素膜上。将硝酸纤维素膜置于 1 倍无蛋白封闭液中封闭 1 h,置于抗 GAPDH、抗 myocilin、抗 FN、抗 Col-1、抗 Smad3、抗 p-Smad3 抗体(均 1:1 000 稀释)中 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;用 1 倍 TBST 洗涤膜 3 次,置于相应的二抗(1:5 000 稀释)稀释液中室温振荡孵育 1 h;1 倍 TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 化学发光液显影,使用 ChemiDoc MP 系统捕获图像。采用 ImageJ 软件计算各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组小鼠不同时间点右眼眼压总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。各组小鼠小梁网组织胶原阳性面积、FN 和 Col-1 荧光强度及各组 HTMCs 中各蛋白总体差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间点眼压比较

各组小鼠不同时间点右眼眼压总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 72.94, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 33.19, P < 0.001$)。与给药前眼压比较,地塞米松组给药后各时间点眼压值均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);对照组和 SIS3 组内各时间点间眼压比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。对照组和 SIS3 组给药 1、2、3、4 周时眼压均明显低于相应时间点地塞米松组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)(表 1)。

2.2 各组小鼠小梁网组织形态学变化和胶原阳性表达面积比较

苏木精-伊红染色结果显示,各组小鼠给药 4 周时虹膜角膜角组织形态相似,虹膜角膜角开放(图 1A)。Masson 染色结果显示,对照组、地塞米松组、SIS3 组胶原阳性表达面积分别为 $(9.57 \pm 2.91)\%$ 、 $(27.75 \pm 5.88)\%$ 和 $(11.67 \pm 3.78)\%$,总体比较差异有统计学意义($F = 25.91, P < 0.001$)。与地塞米松组比较,对照组和 SIS3 组胶原阳性表达面积明显减少,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$),对照组与 SIS3 组胶原阳性表达面积比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1B)。

2.3 各组小鼠小梁网组织中 FN 和 Col-1 荧光强度比较

对照组、地塞米松组、SIS3 组 FN 荧光强度分别为 8.00 ± 1.92 、 14.01 ± 2.74 、 7.85 ± 0.64 ,Col-1 荧光强度分别为 6.90 ± 1.16 、 14.36 ± 3.19 、 4.90 ± 0.88 ,各组间 FN 和 Col-1 荧光强度总体比较差异均有统计学意义($F = 15.93$ 、 30.29 ,均 $P < 0.001$)。对照组和 SIS3 组 FN 和 Col-1 荧光强度较地塞米松组均明显减弱,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 2)。

2.4 HTMCs 的体外培养和鉴定

培养第 3 周时,有少量细胞生长,呈不规则扁平多角形,胞质

表 1 各组小鼠不同时间点眼压比较 ($\bar{x}\pm s$, mmHg)						
Table 1 Comparison of mouse intraocular pressure among different groups at different time points ($\bar{x}\pm s$, mmHg)						
组别	样本量	不同时间点小鼠眼压				
		给药前	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
对照组	17	11.56±0.30	11.78±0.25	11.90±0.30	11.85±0.23	11.75±0.47
地塞米松组	17	11.73±0.39	13.04±0.78 ^{ab}	13.94±0.83 ^{ab}	15.16±1.63 ^{ab}	15.92±2.58 ^{ab}
SIS3 组	17	11.53±0.41	11.58±0.58 ^c	11.68±0.38 ^c	11.78±0.64 ^c	11.89±0.86 ^c

注: $F_{\text{组别}} = 72.94, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 33.19, P < 0.001$. 与各自给药前眼压比较, ^a $P < 0.001$; 与同一时间点对照组眼压比较, ^b $P < 0.001$; 与同一时间点地塞米松组眼压比较, ^c $P < 0.001$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) SIS3: 特异性 Smad3 抑制剂 1 mmHg=0.133 kPa

Note: $F_{\text{group}} = 72.94, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 33.19, P < 0.001$. Compared with respective before administration, ^a $P < 0.001$; compared with control group at the same time point, ^b $P < 0.001$; compared with dexamethasone group at the same time point, ^c $P < 0.001$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) SIS3: specific inhibitor of Smad3 1 mmHg=0.133 kPa

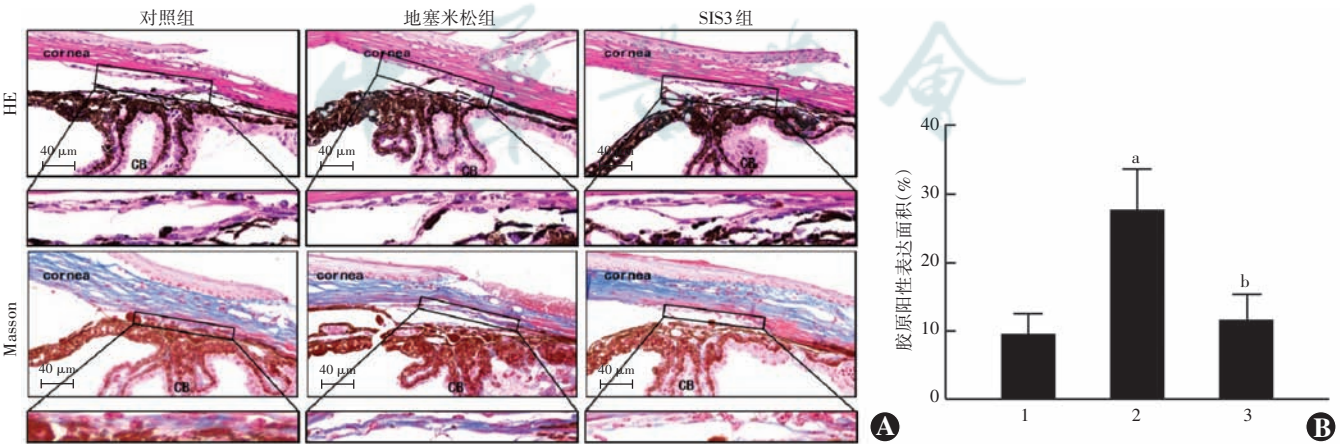


图 1 各组小鼠小梁网组织形态学变化和胶原沉积情况比较 A:各组小鼠小梁网组织形态学及胶原染色图像($\times 73$,标尺=40 μm) HE 染色显示各组虹膜角膜角开放,小梁网组织形态相似,Masson 染色显示地塞米松组更多的胶原沉积(蓝色),SIS3 组胶原表达明显减少 B:各组小梁网组织胶原阳性面积比较 $F = 25.91, P < 0.001$ 。与对照组比较,^a $P < 0.001$;与地塞米松组比较,^b $P < 0.001$ (单因素方差分析,LSD- t 检验; $n = 5$) 1:对照组;2:地塞米松组;3:SIS3 组 方框中区域代表小梁网;HE:苏木精-伊红染色;CB:睫状体;cornea:角膜;SIS3:特异性 Smad3 抑制剂

Figure 1 Comparison of morphological changes and collagen deposition in mouse trabecular meshwork tissues among different groups A: Morphological and collagen staining images of mouse trabecular meshwork tissue ($\times 73$, scale bar=40 μm) HE staining showed that all groups had open iridocorneal angles and similar trabecular meshwork. Masson staining showed accumulation of collagen (blue) in the dexamethasone group, which was significantly reduced in the SIS3 group B: Comparison of the collagen positive area among different groups $F = 25.91, P < 0.001$. Compared with control group,^a $P < 0.001$; compared with dexamethasone group,^b $P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 5$) 1: control group; 2: dexamethasone group; 3: SIS3 group Within the boxes were the trabecular meshwork; HE: hematoxylin-eosin staining; CB: ciliary body; SIS3: specific inhibitor of Smad3

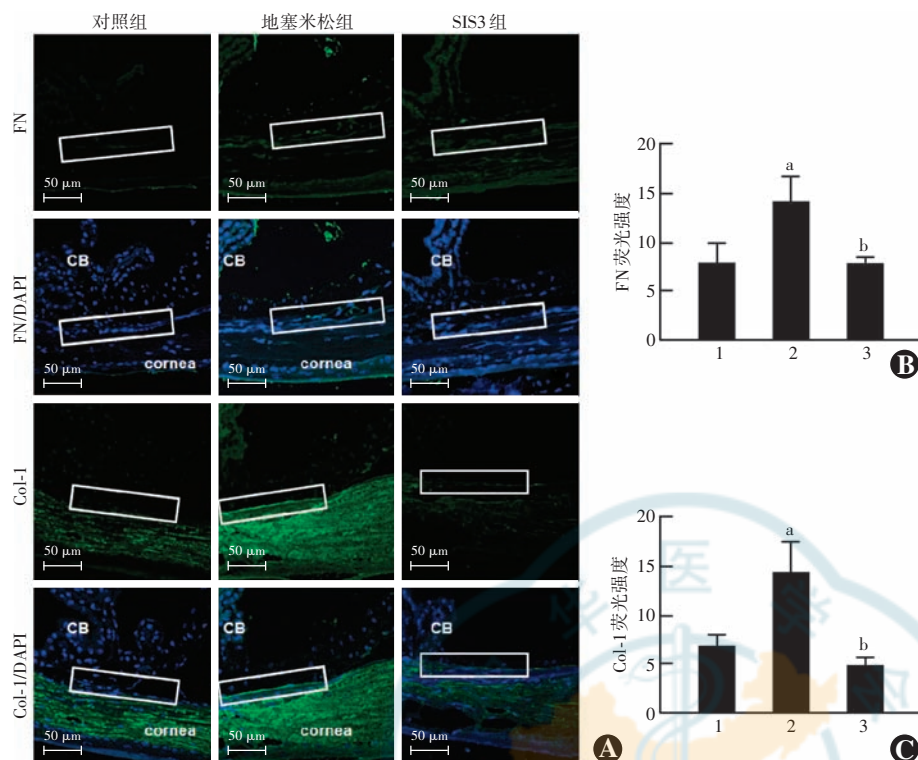


图 2 各组小鼠小梁网组织 FN 和 Col-1 蛋白荧光染色比较 A: 各组小梁网组织中 FN、Col-1 表达免疫荧光图 ($\times 63$, 标尺 = 50 μm) 方框中区域代表小梁网 B: 各组小梁网组织中 FN 荧光强度比较 $F = 15.93, P < 0.001$. 与对照组相比, $^a P < 0.01$; 与地塞米松组相比, $^b P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 5$) C: 各组小梁网组织中 Col-1 荧光强度比较 $F = 30.29, P < 0.001$. 与对照组相比, $^a P < 0.01$; 与地塞米松组相比, $^b P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 5$) 1: 对照组; 2: 地塞米松组; 3: SIS3 组 FN: 纤维连接蛋白; Col-1: 胶原蛋白 1; CB: 睫状体; cornea: 角膜

Figure 2 Comparison of fluorescence staining of FN and Col-1 proteins in mouse trabecular meshwork tissue among different groups A: Fluorescence staining of FN and Col-1 expression in different groups ($\times 63$, scale bar = 50 μm) Within the boxes were the trabecular meshwork B: Comparison of the fluorescence intensity of FN $F = 15.93, P < 0.001$. Compared with the control group, $^a P < 0.01$; compared with the dexamethasone group, $^b P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 5$) C: Comparison of the fluorescence intensity of Col-1 $F = 30.29, P < 0.001$. Compared with the control group, $^a P < 0.01$; compared with the dexamethasone group, $^b P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 5$) 1: control group; 2: dexamethasone group; 3: SIS3 group FN: fibronectin; Col-1: collagen type I; CB: ciliary body

形成短突起;培养第 5 周时,有一定数量细胞生长,呈梭形、不规则多角形,细胞核呈椭圆形或圆形,并形成单层细胞层。免疫荧光染色结果显示,培养的细胞中 myocilin 呈阳性表达,地塞米松诱导后细胞中 myocilin 荧光明显增强,蛋白表达条带明显增强,鉴定细胞为 HTMCs (图 3)。

2.5 各组 HTMCs 中 FN、Col-1、p-Smad3/Smad3 蛋白表达水平比较

对照组、地塞米松组、SIS3 组间 FN、Col-1、p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ($F = 8.22, 23.08, 8.78$, 均 $P < 0.05$), 其中 SIS3 组 FN、Col-1、p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达量分别为 1.05 ± 0.43 、 1.43 ± 0.25 、 0.90 ± 0.18 , 明显低于地塞米松组的 2.49 ± 0.77 、 2.45 ± 0.39 、 1.72 ± 0.41 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

3 讨论

探索减轻小梁网纤维化的有效方法对于治疗青光眼具有重要意义,本研究利用糖皮质激素诱导小梁网纤维化构建小鼠高血压模型模拟 POAG 的发病机制。本

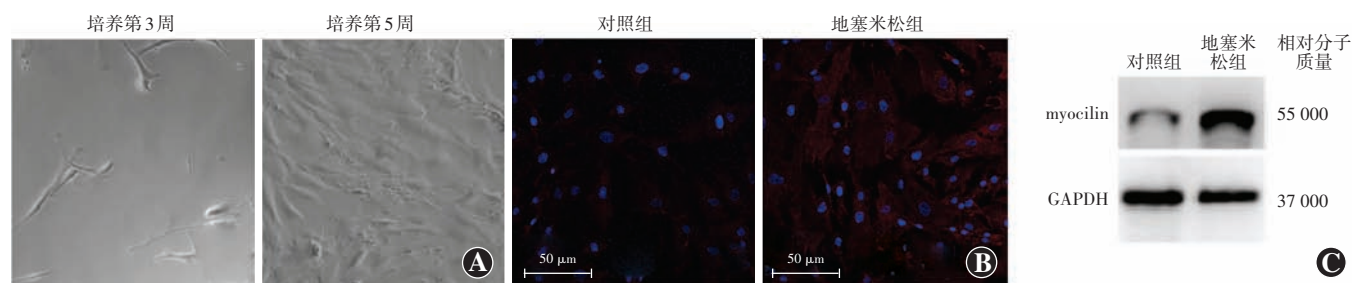


图 3 HTMCs 的体外培养及鉴定 A: HTMCs 培养 3 周和 5 周的形态 ($\times 200$) B: 免疫荧光染色观察 myocilin 表达 ($\times 63$, 标尺 = 50 μm) 对照组细胞 myocilin 呈弱荧光表达,地塞米松诱导后,myocilin 荧光表达增强 C: Western blot 检测 myocilin 表达 对照组细胞 myocilin 呈弱表达,地塞米松诱导后,myocilin 蛋白表达水平明显增加

Figure 3 Culture and identification of HTMCs in vitro A: Morphology of HTMCs cultured for 3 and 5 weeks ($\times 200$) B: Myocilin expression of control and dexamethasone groups using immunofluorescence staining ($\times 63$, scale bar = 50 μm) Cells in the control group showed weak fluorescent expression of myocilin, which was increased after dexamethasone induction C: Myocilin expression of control and dexamethasone groups detected by Western blot Cells in the control group showed weak expression of myocilin, which was increased after dexamethasone induction

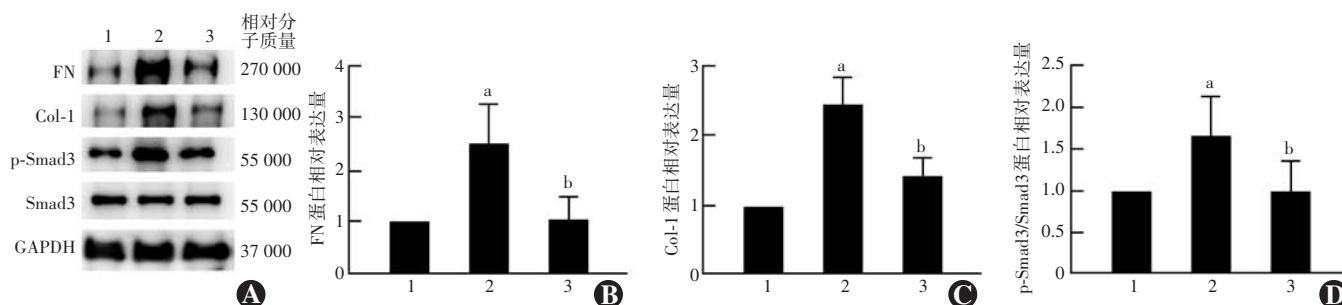


图 4 各组 HTMCs 中 FN、Col-1、p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达水平比较 A: 各组 HTMCs 中 FN、Col-1、p-Smad3/Smad3 蛋白表达电泳图 B: 各组 HTMCs 中 FN 蛋白相对表达量比较 $F=8.22, P<0.05$ C: 各组 HTMCs 中 Col-1 蛋白相对表达量比较 $F=23.08, P<0.01$ D: 各组 HTMCs 中 p-Smad3/Smad3 蛋白相对表达量比较 $F=8.78, P<0.05$ 。与对照组相比, ^a $P<0.05$; 与地塞米松组相比, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n=3$) 1: 对照组; 2: 地塞米松组; 3: SIS3 组 FN: 纤维连接蛋白; Col-1: 胶原蛋白 1; p-Smad3: 磷酸化的 Smad3; SIS3: 特异性 Smad3 抑制剂

Figure 4 Comparison of relative expression levels of FN, Col-1 and p-Smad3/Smad3 proteins in HTMCs among different groups A: Electrophoretogram of FN, Col-1 and p-Smad3/Smad3 proteins expression in HTMCs among various groups B: Comparison of relative expression of FN among different groups $F=8.22, P<0.05$ C: Comparison of relative expression of Col-1 among different groups $F=23.08, P<0.01$ D: Comparison of relative expression of p-Smad3/Smad3 among different groups $F=8.78, P<0.05$. Compared with the control group, ^a $P<0.05$; compared with the dexamethasone group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n=3$) 1: control group; 2: dexamethasone group; 3: SIS3 group FN: fibronectin; Col-1: collagen type I; p-Smad3: phosphorylated Smad3; SIS3: specific inhibitor of Smad3

研究改进了醋酸地塞米松混悬液的配制方法,构建了一个可重复的、简单的糖皮质激素诱导的小鼠高眼压模型。为了延长药物的眼表滞留时间以及增强药物的角膜穿透能力,将 SIS3 制作成纳米胶束滴眼液。动物实验证实,地塞米松可诱导小梁网组织中胶原的沉积和 FN、Col-1 的高表达,诱发高眼压。当模型小鼠预防性采用 SIS3 纳米胶束滴眼液点眼,小梁网组织中胶原的沉积和 FN、Col-1 的表达被抑制,且眼压无显著升高,提示 SIS3 可通过抑制小梁网纤维化降低眼压。本研究通过 HTMCs 实验观察到,地塞米松组 HTMCs 中 FN 和 Col-1 表达增加, TGF- β /Smad3 信号通路中的重要活性分子 p-Smad3 表达也显著增加; SIS3 可抑制 Smad3 的磷酸化,并可以抑制地塞米松诱导的 FN 和 Col-1 高表达。

ECM 在小梁网结构稳定中起着重要作用,其中 FN 提供压力传感能力, Col 有助于维持机械强度,是小梁网中重要的 ECM 成分,调控房水流出阻力^[5,18]。在糖皮质激素诱导的青光眼小梁网中检测到 FN 和胶原的沉积^[19-20]。因此,防止 ECM 在小梁网中的过度沉积可有效抑制小梁网纤维化并降低小梁网流出阻力。

Smad3 参与胶原基因启动子的转录激活,是瘢痕成纤维细胞中 Col 形成所必需的分子^[21-22]。因此, Smad3 直接影响胶原的表达,抑制 Smad3 可降低胶原的表达,从而预防纤维化。大量研究表明, SIS3 可减弱人真皮成纤维细胞中肌成纤维细胞的分化和胶原合成,减少肺纤维化小鼠模型中胶原沉积和炎症细胞浸润,降低急性肺损伤大鼠模型中胶原的表达,抑制单侧

输尿管梗阻小鼠肾间质纤维化^[11-13,23]。本研究证实, SIS3 可降低地塞米松诱导高眼压小鼠的眼压以及小梁网组织中 Col-1 和 FN 的表达,并进一步通过细胞实验验证了 SIS3 是通过抑制 Smad3 的磷酸化来达到抑制 ECM 沉积的作用,然而, SIS3 抑制 Col-1 和 FN 沉积的作用机制仍有待进一步探索。

综上,本研究探讨了 SIS3 靶向调控 p-Smad3 并抑制 ECM 沉积,改善小梁网组织的纤维化,降低了糖皮质激素诱导的小鼠高眼压,为青光眼治疗提供了新思路。但本研究也存在一定不足,如未在动物模型中进行机制验证,有待在后续的工作中进一步完善。未来,我们将深入探索 SIS3 抑制小梁网纤维化的分子机制,寻找更加精准的分子靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 任静:参与研究设计、实施研究、数据分析、论文撰写及修改;段世超、崔慧玲:参与实施研究、数据分析、论文修改;王迪、赵茹梦:参与实施研究、采集数据;刘茜:参与数据分析、论文修改;李海军:参与选题、设计实验、数据分析、论文智力性内容修改和定稿

志谢 特别感谢河南省人民医院 河南省立眼科医院李景果教授及栗占荣教授对本实验开展过程中研究方案设计、醋酸地塞米松混悬液及 SIS3 纳米胶束滴眼液配制提供的大力帮助

参考文献

- [1] 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.
- [2] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90 (3): 262-267. DOI: 10.1136/bjo.2005.081224.
- [3] Pattabiraman PP, Toris CB. The exit strategy: pharmacological modulation of extracellular matrix production and deposition for better

- aqueous humor drainage [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 787 : 32 – 42. DOI: 10. 1016/j. ejphar. 2016. 04. 048.
- [4] Garg A, Gazzard G. Treatment choices for newly diagnosed primary open angle and ocular hypertension patients [J]. Eye (Lond), 2020, 34 (1) : 60 – 71. DOI: 10. 1038/s41433-019-0633-6.
- [5] Acott TS, Kelley MJ. Extracellular matrix in the trabecular meshwork [J]. Exp Eye Res, 2008, 86 (4) : 543 – 561. DOI: 10. 1016/j. exer. 2008. 01. 013.
- [6] Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis [J]. Growth Factors, 2011, 29 (5) : 196 – 202. DOI: 10. 3109/08977194. 2011. 595714.
- [7] Fuchshofer R, Tamm ER. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347 (1) : 279 – 290. DOI: 10. 1007/s00441-011-1274-7.
- [8] Agarwal P, Daher AM, Agarwal R. Aqueous humor TGF- β 2 levels in patients with open-angle glaucoma: a meta-analysis [J]. Mol Vis, 2015, 21 : 612 – 620.
- [9] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF- β / Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach [J/OL]. J Biol Chem, 2001, 276 (20) : 17058 – 17062 [2024 – 08 – 12]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/11279127](http://www. ncbi..nlm. nih. gov/pubmed/11279127). DOI: 10. 1074/jbc. M100754200.
- [10] Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis [J/OL]. Front Pharmacol, 2017, 8 : 461 [2024 – 08 – 12]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/28769795](http://www. ncbi..nlm. nih. gov/pubmed/28769795). DOI: 10. 3389/fphar. 2017. 00461.
- [11] Liang Q, Lin Q, Li Y, et al. Effect of SIS3 on extracellular matrix remodeling and repair in a lipopolysaccharide-induced ARDS rat model [J/OL]. J Immunol Res, 2020, 2020 : 6644687 [2024 – 08 – 12]. [http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33294466](http://www. ncbi..nlm. nih. gov/pubmed/33294466). DOI: 10. 1155/2020/6644687.
- [12] Shou J, Cao J, Zhang S, et al. SIS3, a specific inhibitor of smad3, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503 (2) : 757 – 762. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2018. 06. 072.
- [13] Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor- β 1-induced extracellular matrix expression [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69 (2) : 597 – 607. DOI: 10. 1124/mol. 105. 017483.
- [14] Patel GC, Phan TN, Maddineni P, et al. Dexamethasone-induced ocular hypertension in mice: effects of myocilin and route of administration [J]. Am J Pathol, 2017, 187 (4) : 713 – 723. DOI: 10. 1016/j. ajpath. 2016. 12. 003.
- [15] Li J, Li Z, Zhou T, et al. Positively charged micelles based on a triblock copolymer demonstrate enhanced corneal penetration [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10 : 6027 – 6037. DOI: 10. 2147/IJN. S90347.
- [16] Li H, Ren J, Cui H, et al. Dexamethasone induces senescence-associated changes in trabecular meshwork cells by increasing ROS levels via the TGF β /Smad3-NOX4 axis [J/OL]. Cell Transplant, 2023, 32 : 9636897231177356 [2024 – 08 – 12]. <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/37265069>. DOI: 10. 1177/09636897231177356.
- [17] Li H, Cui H, Ren J, et al. Elevated angiotensin- II levels contribute to the pathogenesis of open-angle glaucoma via inducing the expression of fibrosis-related genes in trabecular meshwork cells through a ROS/NOX4/SMAD3 axis [J]. Cell Transplant, 2023, 32 : 9636897231162526.
- [18] 向艳, 陈志祺, 王瑞琳, 等. 内皮素-1 对体外培养人小梁网细胞纤维连接蛋白及 I 型胶原表达的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2010, 28 (5) : 421 – 425. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 05. 012.
- Xiang Y, Chen ZQ, Wang RL, et al. Effects of endothelin on expression of fibronectin and collagen I in human trabecular meshwork [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2010, 28 (5) : 421 – 425. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 05. 012.
- [19] Tawara A, Tou N, Kubota T, et al. Immunohistochemical evaluation of the extracellular matrix in trabecular meshwork in steroid-induced glaucoma [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246 (7) : 1021 – 1028. DOI: 10. 1007/s00417-008-0800-0.
- [20] Tektas OY, Lütjen-Drecoll E. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma [J]. Exp Eye Res, 2009, 88 (4) : 769 – 775. DOI: 10. 1016/j. exer. 2008. 11. 025.
- [21] Chen SJ, Yuan W, Lo S, et al. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human α 2 (I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- β [J]. J Cell Physiol, 2000, 183 (3) : 381 – 392. DOI: 10. 1002/(SICI) 1097-4652 (200006) 183:3<381::AID-JCP11>3.0.CO;2-O.
- [22] Wang Z, Gao Z, Shi Y, et al. Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007, 60 (11) : 1193 – 1199. DOI: 10. 1016/j. bjps. 2006. 05. 007.
- [23] Ji X, Wang H, Wu Z, et al. Specific inhibitor of Smad3 (SIS3) attenuates fibrosis, apoptosis, and inflammation in unilateral ureteral obstruction kidneys by inhibition of transforming growth factor β (TGF- β)/Smad3 signaling [J]. Med Sci Monit, 2018, 24 : 1633 – 1641. DOI: 10. 12659/msm. 909236.

(收稿日期: 2024-09-19 修回日期: 2025-03-28)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者 · 作者 · 编者

本刊投稿方式

投稿请登录 <http://zhshykzz. yiigle. com>, 然后点击“期刊在线投/审稿”依据提示进行投稿; 或登录中华医学会杂志社学术期刊出版服务平台 (<http://medpress. yiigle. com>), 点击“立即注册”, 根据页面上的指示进行注册, 已经注册的作者请点击“新建投稿”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, 以备日后稿件修改补充所用。投稿后请点击“申请成为作者”, 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名, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位署录名称应与投稿时文章中署录的相一致。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、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。 (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或与审稿人的利益关系。 (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)

中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究