

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.12.008

Pamrevlumab(FG-3019)通过 p38 MAPK 信号通路调控 人 Tenon's 囊成纤维细胞的增殖、移行和表型转化*

范雅稚 何 娜 王建明 冯海晓 邢 瑶

(西安交通大学第二附属医院眼科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:本研究旨在探究 Pamrevlumab(FG-3019)对人 Tenon's 囊成纤维细胞(HTFs)的增殖、移行和表型转化的影响。**方法:**应用组织块培养法进行 HTFs 的原代培养,通过波形蛋白(Vimentin)和细胞角蛋白(Cytokeratin)免疫荧光染色鉴定 HTFs。首先将 HTFs 分为 9 组:Control 组加入等量 DMEM 作为阴性对照组,其他组加入不同浓度的 FG-3019,使其终浓度分别为 10、20、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$,通过 MTT 法检测 FG-3019 对 HTFs 的毒性。然后将 HTFs 分为 4 组:Control 组(加入等量 DMEM 培养 48 h)、TGF- β 1 组(10 ng/mL 的 TGF- β 1 培养 48 h)、TGF- β 1+FG-3019 组(10 ng/mL 的 TGF- β 1 和 100 $\mu\text{g/mL}$ FG-3019 培养 48 h)、TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组(10 ng/mL 的 TGF- β 1、100 $\mu\text{g/mL}$ FG-3019 和 10 $\mu\text{g/mL}$ anisomycin 培养 48 h)。通过 MTT 法和 EdU 法检测 HTFs 增殖,通过伤口愈合实验评价 FG-3019 对 HTFs 移行的影响通过 qRT-PCR 或 Western blotting 检测 CTGF、p38 MAPK、p-p38 MAPK、 α -SMA、FN 和 collagen I 的表达变化。**结果:**免疫荧光染色显示,HTFs 中波形蛋白阳性表达(98.17%),细胞角蛋白阴性表达(1.83%)。与 Control 组相比,200、300、400 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 组的 HTFs 的细胞活力均显著降低($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组相比,TGF- β 1+FG-3019 组的 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 降低了 19.64%,增殖指数降低了 57.87%,伤口愈合率降低了 56.46%($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组相比,TGF- β 1+FG-3019 组的 α -SMA、FN 和 collagen I 蛋白相对表达量依次降低了 70.78%、70.99%和 70.04%,CTGF mRNA 和蛋白相对表达量分别降低了 75.83%和 60.73%($P<0.05$),p-p38 MAPK 蛋白相对表达量降低了 70.22%($P<0.05$)。与 TGF- β 1+FG-3019 组相比,TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组的增殖、移行、表型转化、CTGF mRNA 和蛋白相对表达量、p-p38 MAPK 蛋白相对表达量均显著增加($P<0.05$)。**结论:**FG-3019 部分通过抑制 p38 MAPK 信号通路来抑制 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖、移行和表型转化。

关键词:青光眼;Pamrevlumab(FG-3019);人 Tenon's 囊成纤维细胞;增殖;移行;表型转化;p38 MAPK 信号通路

中图分类号:R-33;R775 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)12-2237-08

Pamrevlumab (FG-3019) Regulates the Proliferation, Migration and Phenotypic Transformation of Human Tenon's Cystic Fibroblasts through p38 MAPK Signal Pathway*

FAN Ya-zhi, HE Na, WANG Jian-ming, FENG Hai-xiao, XING Yao

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

ABSTRACT Objective: To reveal the effects of Pamrevlumab (FG-3019) on the proliferation, migration and phenotypic transformation of human Tenon's cystic fibroblasts (HTFs). **Methods:** The primary culture of HTFs was carried out by tissue mass culture, and HTFs was identified by Vimentin and Cytokeratin immunofluorescence staining. Firstly, HTFs was divided into 9 groups: control group added the same amount of DMEM as negative control group, and other groups added different concentrations of FG-3019 with the final concentration of 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The toxicity of FG-3019 on HTFs was detected by MTT method. Then HTFs were divided into 4 groups: Control group (cultured with the same amount of DMEM for 48 h), TGF- β 1 group (cultured with 10 ng/mL TGF- β 1 for 48 h), TGF- β 1+FG-3019 group (cultured with 10 ng/mL TGF- β 1 and 100 $\mu\text{g/mL}$ FG-3019 for 48 h), TGF- β 1+FG-3019+anisomycin group (cultured with 10 ng/mL TGF- β 1, 100 $\mu\text{g/mL}$ FG-3019 and 10 $\mu\text{g/mL}$ anisomycin for 48 h). The proliferation of HTFs was detected by MTT method and EdU method. The effect of FG-3019 on HTFs migration was evaluated by wound healing experiment. The expression of CTGF, p38 MAPK, p-p38 MAPK, α -SMA, FN and collagen I was detected by qRT-PCR or western blotting. **Results:** Immunofluorescence staining showed that vimentin was positive (98.17%) and cytokeratin was negative (1.83%) in HTFs. Compared with Control group, the cell viability of HTFs in 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$ groups decreased significantly ($P<0.05$). Compared with TGF- β 1 group, the $\text{OD}_{490\text{nm}}$ of TGF- β 1+FG-3019 group decreased by 19.64%, the proliferation index decreased by 57.87%, and the wound healing rate decreased by 56.46% ($P<0.05$). Compared with TGF- β 1 group, the relative expression of α -SMA, FN and collagen I protein in TGF- β 1+FG-3019 group decreased by 70.78%, 70.99% and 70.04%, respectively, the relative expression of

* 基金项目:陕西省重点研发项目(S2019-YF-YBSF-0813)

作者简介:范雅稚(1982-),女,硕士,主治医师,研究方向:青光眼以及视神经的保护,电话:18691638227,E-mail: xajdFYZ@163.com

(收稿日期:2021-12-29 接受日期:2022-01-25)

p-p38 MAPK protein decreased by 75.83% and 60.73%, respectively, and the relative expression of p-p38 MAPK protein decreased by 70.22% ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1+FG-3019 group, the TGF- β 1+FG-3019+ anisomycin group had increased proliferation, migration, phenotypic transformation, relative expression of CTGF mRNA and protein, and relative expression of p-p38 MAPK protein ($P<0.05$). **Conclusion:** FG-3019 partially inhibits the proliferation, migration and phenotypic transformation of HTFs induced by TGF- β 1 by inhibiting p38 MAPK signal pathway.

Key words: Glaucoma; Pamrevlumab (FG-3019); Human Tenon's cystic fibroblasts; Proliferation; Migration; Phenotypic transformation; p38 MAPK signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R775 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)12-2237-08

前言

青光眼是一种以病理性高眼压、进行性视神经变性和视野缺损为特征的严重眼病,也是全世界第一位的不可逆性致盲眼病^[1]。青光眼滤过术(glaucoma filtration surgery, GFS)被广泛认为是药物和激光治疗无效的青光眼患者最有效的选择^[2],然而,术后瘢痕形成限制了 GFS 手术的成功率,主要原因是结膜下组织对 GFS 诱导的损伤的生物学反应促进了肌成纤维细胞的分化、成纤维细胞的增殖和滤过部位细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积,导致瘢痕的形成^[3]。目前,抗滤过手术区纤维化药物如丝裂霉素 C 和 5- 氟尿嘧啶等副作用明显,这些药物为抗代谢药物,可引起抑制伤口愈合的非特异性效应的并发症,如低眼压、滤过泡渗漏和眼内炎^[4,5],因此急需开发新的治疗药物。

人 Tenon's 囊成纤维细胞(human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs)在 GFS 后瘢痕形成中起主导作用,因为它们诱导手术伤口愈合的靶细胞^[6]。GFS 后诱导的转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)通过招募成纤维细胞、促进成纤维细胞增殖、激活成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化来促进伤口愈合和瘢痕形成^[7]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的高表达和细胞外基质蛋白,如纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和胶原(collagen)的沉积是肌成纤维细胞的关键特征^[8,9]。因此,TGF- β 诱导的肝纤维化模型作为一种细胞纤维化模型被广泛应用于纤维化的研究。

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)与多种纤维化疾病相关,CTGF 可诱导成纤维细胞转化成肌成纤维细胞,促进细胞外基质合成^[10-12]。有文献报道,将 CTGF 注射至青光眼术后滤过泡中,可使滤过泡面积缩小,持续时间缩短^[13]。本课题组前期实验中发现,兔青光眼滤过术后结膜下注射 CTGF 抗体能够维持较大的滤过泡面积和较低的眼压,提示 CTGF 抗体可以抑制滤过手术区纤维化^[14]。

多项研究表明丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)途径是 CTGF 促纤维化重要的胞内信号转导通路^[15],在真核细胞中,MAPK 信号转导通路有 4 条:即 ERK、JNK、p38 和 ERK5 通路。p38 MAPK 参与了肝纤维化、糖尿病视网膜病变等多种纤维增殖性疾病的发生发展^[16]。有学者发现,抑制 p38 MAPK 的激活可抑制 TGF- β 介导的肌成纤维细胞分化^[17],并且抑制结膜创伤模型小鼠结膜愈合过程的纤维化反应^[18]。Gen 等^[19]培养人软骨肉瘤来源的软骨细胞,发现 CTGF 通过 p38MAPK 信号通路刺激软骨细胞合成蛋白多糖。

然而,在青光眼滤过术后,p38 MAPK 信号通路是否介导了 HTFs 的 CTGF 表达尚不清楚,p38 MAPK 信号通路是否参与了 CTGF 促滤过手术区纤维化效应,CTGF 抗体是否通过抑制 p38 MAPK 信号通路起到抑制 HTFs 增殖的作用,国内外亦未见文献报道。

作为首个用于抑制 CTGF 的治疗性抗体,Pamrevlumab (FG-3019)抑制纤维化作用已经在多项研究中被证实,例如治疗特发性肺纤维化^[20]、胰腺癌^[21]、间皮瘤^[22]等纤维化相关疾病,实验结果证实 Pamrevlumab (FG-3019)抗纤维化疗效肯定,对于人体毒副作用小,安全性高。但 FG-3019 在眼科领域的应用仍为空白。因此本研究旨在考察 Pamrevlumab (FG-3019)对 HTFs 的增殖和移行的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

FG-3019 购自美国 FibroGen。TGF- β 1 重组蛋白购自美国 Peprotech。p38 MAPK 信号通路激活剂 anisomycin 购自美国 MCE。胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)均购自美国 Gibco。波形蛋白、细胞角蛋白、CTGF、p38 MAPK、p-p38 MAPK、 α -SMA、FN、collagen I、GAPDH、FITC 标记的 IgG 二抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自英国 Abcam。TRIzol 试剂、PrimeScriptTMII RT Master Mix、TB GreenTM Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)均购自日本 Takara。MTT 试剂、RIPA 缓冲液、BCA 蛋白分析试剂盒、BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒)均购自碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 HTFs 的体外培养 HTFs 来自 3 例青光眼患者,包括男性 1 例,女性 2 例,年龄范围为 41-54 岁。取青光眼患者滤过术中剪下的 Tenon's 囊组织,液氮中快速冷冻,然后储存在 -80℃。应用组织块培养法进行 HTFs 的原代培养,培养基为添加 10% (v/v)胎牛血清(FBS)和 1%青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM),培养条件为 37℃、5%CO₂ 的潮湿环境。当细胞繁殖到约 80%融合,及时进行传代培养,取 3-6 代的细胞进行实验。

1.2.2 HTFs 的免疫荧光鉴定 通过波形蛋白(Vimentin)(间质细胞标志物)和细胞角蛋白(Cytokeratin)(上皮细胞标志物)免疫荧光染色鉴定 HTFs。将处于对数生长期的第 4-5 代的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,然后用含 10%FBS 的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,接种于 6

孔板中,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养至 80%融合,PBS 漂洗 3 次,4%多聚甲醛室温固定 30 min。0.1%的 PBST 通透 15 min,10%山羊血清封闭细胞 1 h,加入波形蛋白(1:100 稀释)和细胞角蛋白(1:100 稀释)单克隆抗体于 37℃ 孵育 2 h,加入 FITC 标记的 IgG 二抗(1:100 稀释)37℃ 避光孵育 1 h,加入 DAPI 室温孵育 5 min。甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 MTT 法检测 FG-3019 对 HTFs 的毒性 将 80%融合生长的细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,然后用含 10%FBS 的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,以 100 μ L/孔接种至 96 孔板,在 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h。HTFs 共分为 9 组:Control 组加入等量 DMEM 作为阴性对照组,其他组加入不同浓度的 FG-3019,使其终浓度分别为 10、20、50、100、200、300、400、500 μ g/mL,每组设 5 个复孔;另设一空白对照组(仅加培养液,不加细胞),比色时用于调零。培养 48 h 后,用倒置相差显微镜照像系统观察细胞形态并照相记录。每孔加入 10 μ L MTT(5000 μ g/mL),继续培养 4 h,吸弃培养液,每孔加入 100 μ L 的二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO),振荡 10 min,使结晶物充分溶解。应用酶标仪测定各孔 490 nm 吸光度值(OD_{490nm})。

1.2.4 MTT 法和 EdU 法检测 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖的影响 HTFs 共分为 4 组:即 Control 组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+FG-3019 组、TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组。Control 组加入等量 DMEM 作为阴性对照组,TGF- β 1 组加入 10 ng/mL 的 TGF- β 1 培养 48 h,TGF- β 1+FG-3019 组加入 10 ng/mL 的 TGF- β 1 和 100 μ g/mL FG-3019 共培养 48 h,TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组加入 10 ng/mL 的 TGF- β 1、100 μ g/mL FG-3019 和 10 μ g/mL anisomycin 共培养 48 h。培养条件及 MTT 检测方法同上。

将 HTFs 以 1×10^4 个/孔的密度接种到 24 孔板中,药物处理后,用 4%多聚甲醛室温固定 30 min,用 0.1%Triton X-100 在 0.1%柠檬酸钠中渗透 2 min。PBS 洗涤后,加入 200 μ L 的 10 μ M EdU 在 37℃ 孵育 1 h,荧光显微镜观察染色的细胞。增殖指数(%)=EdU 阳性数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 伤口愈合实验评价 FG-3019 对 HTFs 移行的影响 将 HTFs 接种至铺有盖玻片的 6 孔培养板,培养至 80%-90%融合后,用 10 μ L 微量加样器吸头造成条形细胞缺损区,PBS 漂洗 3 次以去除悬浮细胞,加入不同药物处理,每组设 5 个复孔,并设一空白对照。继续培养 48 h 后,于倒置相差显微镜下观察细胞移行情况,随机选取每孔 5 个低倍视野(100 倍)照相,用 Image J 软件测量伤口大小并计算伤口愈合率。

1.2.6 qRT-PCR 检测基因表达水平 细胞中的总 RNA 用 TRIzol 试剂提取。RNA 用 PrimeScriptTMII RT Master Mix 进行逆转录,终体积为 20 μ L。随后,使用 TB GreenTM Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)和美国伯乐 BIO-RAD CFX96 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR。将 mRNA 表达归一化为管家基因(GAPDH)。数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析。引物序列如下:CTGF:5'-GCCA GGTACC ATGACCGCCGCCAGTA TGGGC-3',5'-CTGC GAATTC TCATGCCATGTCTCCGTACAT-3'。GAPDH:5'-GGGAAGGTGAAGGTCGGAG-3',5'-GGGGTCAT TGATGGCAACA-3'。

1.2.7 Western blotting 法检测蛋白表达水平 使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白。用 BCA 蛋白分析试剂盒测量每个蛋白质浓度。蛋白质(20 μ g/泳道)在 10% SDS-PAGE 凝胶中分离,然后将各蛋白条带转移到 PVDF 膜上,5%的脱脂牛奶封闭 1 h。然后将膜与抗 CTGF(1:2000 稀释)、p38 MAPK(1:3000 稀释)、p-p38 MAPK(1:3000 稀释)、 α -SMA(1:2000 稀释)、FN(1:5000 稀释)、collagen I(1:1000 稀释)和 GAPDH(1:3000 稀释)的一抗 4℃ 过夜孵育。然后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(1:3000 稀释)室温孵育 1 h。用 BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒)显影,并用 Image Plus Pro 软件定量各蛋白条带的相对表达量。

1.3 统计数据分析

所有实验均重复 6 次,使用 IBM SPSS 22.0 版对数据进行分析。结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。组间差异分析采用单因素方差分析,然后进行 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTFs 的形态学观察和免疫荧光鉴定

HTFs 显微镜下呈梭形或星形多突起。细胞核较大,主要为圆形或椭圆形,细胞质疏松。免疫荧光染色显示,HTFs 中波形蛋白阳性表达(98.17%),细胞角蛋白阴性表达(1.83%)。见图 1。

2.2 FG-3019 对 HTFs 的毒性

MTT 实验结果显示,不同浓度的 FG-3019 对 HTFs 的活力

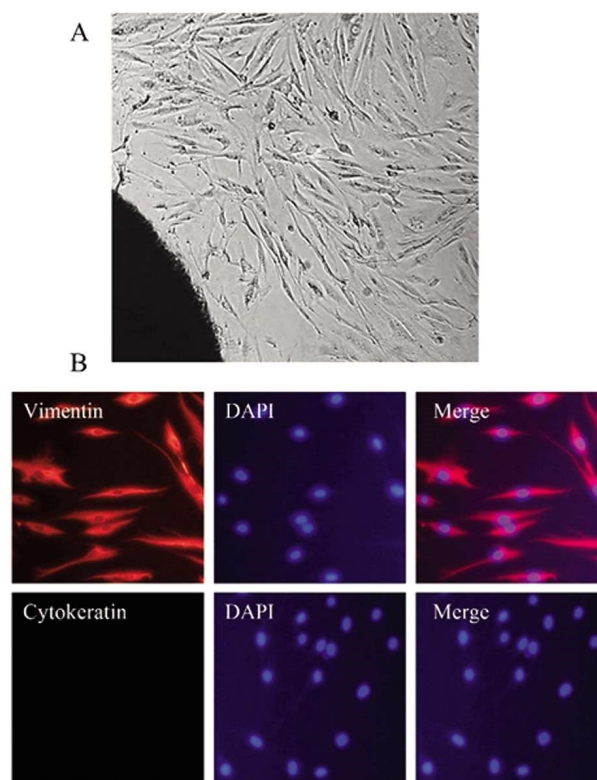


图 1 HTFs 的形态学观察和免疫荧光鉴定

Fig. 1 Morphological observation and immunofluorescence identification of HTFs

Note: A: Morphological observation of HTFs, magnification: $\times 200$;

B: immunofluorescence staining of vimentin and cytokeratin, red is vimentin or cytokeratin, blue is DAPI, magnification: $\times 200$

有显著影响 ($F=105.700, P<0.001$)。与 Control 组相比, 200、300、400 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 组的 HTFs 的细胞活力均显著降低 ($P<0.05$)。说明当 FG-3019 浓度大于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时对 HTFs 有毒性。因此, 后续实验中将 FG-3019 浓度设置为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。见图 2。

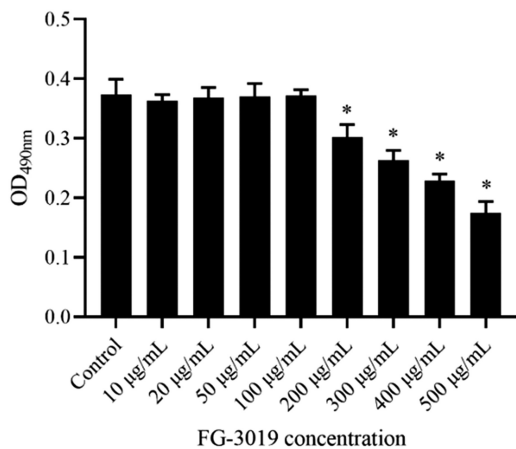


图 2 不同浓度的 FG-3019 对 HTFs 的毒性

Fig. 2 Toxicity of different concentrations of FG-3019 to HTFs

Note: compared with Control group, * $P<0.05$.

2.3 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖的影响

MTT 检测结果显示不同处理组的 OD_{490nm} 差异有统计学意义 ($F=57.700, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF- β 1 组的 OD_{490nm} 升高了 44.54% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组相比, TGF- β 1+FG-3019 组的 OD_{490nm} 降低了 19.64% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1+FG-3019 组相比, TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组的 OD_{490nm} 升高了 7.52% ($P<0.05$)。见图 3A。

EdU 染色结果显示不同处理组的增殖指数差异有统计学意义 ($F=232.363, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF- β 1 组的增殖指数升高了 418.15% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组相比, TGF- β 1+FG-3019 组的增殖指数降低了 57.87% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1+FG-3019 组相比, TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组的增殖指数升高了 38.93% ($P<0.05$)。见图 3B-C。

2.4 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 移行的影响

伤口愈合实验结果显示不同处理组的伤口愈合率差异有统计学意义 ($F=110.621, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF- β 1 组的伤口愈合率升高了 143.34% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组相比, TGF- β 1+FG-3019 组的伤口愈合率降低了 56.46% ($P<0.05$)。与 TGF- β 1+FG-3019 组相比, TGF- β 1+FG-3019+anisomycin 组的伤口愈合率升高了 47.53% ($P<0.05$)。见图 4。

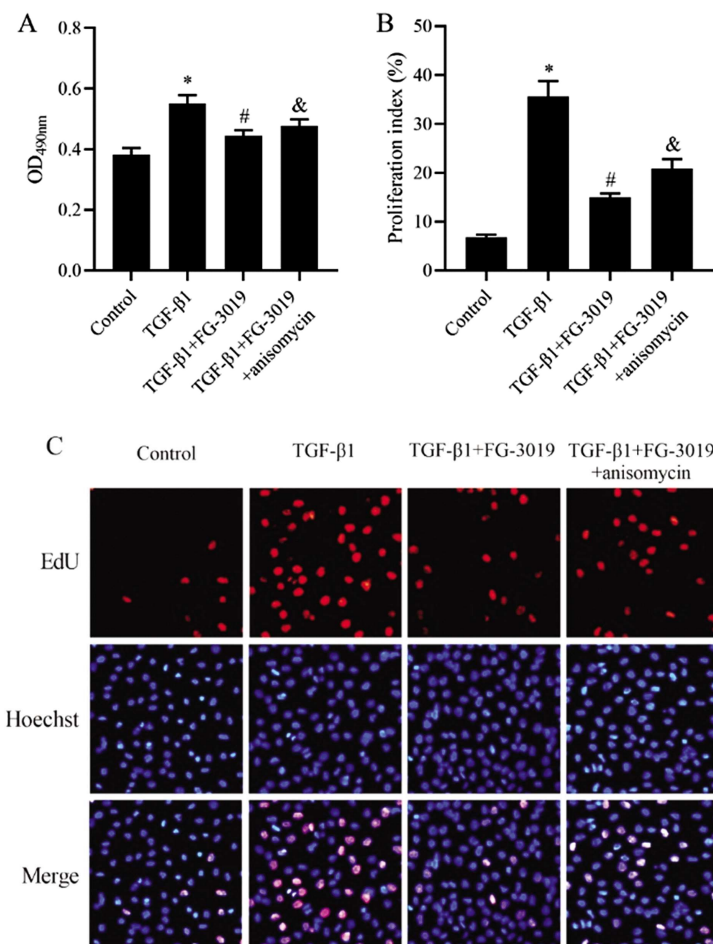


图 3 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖的影响

Fig. 3 The effect of FG-3019 on the proliferation of HTFs induced by TGF- β 1

Note: A: cell viability detected by MTT experiment; B and C: cell proliferation detected by EdU staining, magnification: $\times 200$; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with TGF- β 1 group, # $P<0.05$; compared with TGF- β 1+FG-3019 group, & $P<0.05$.

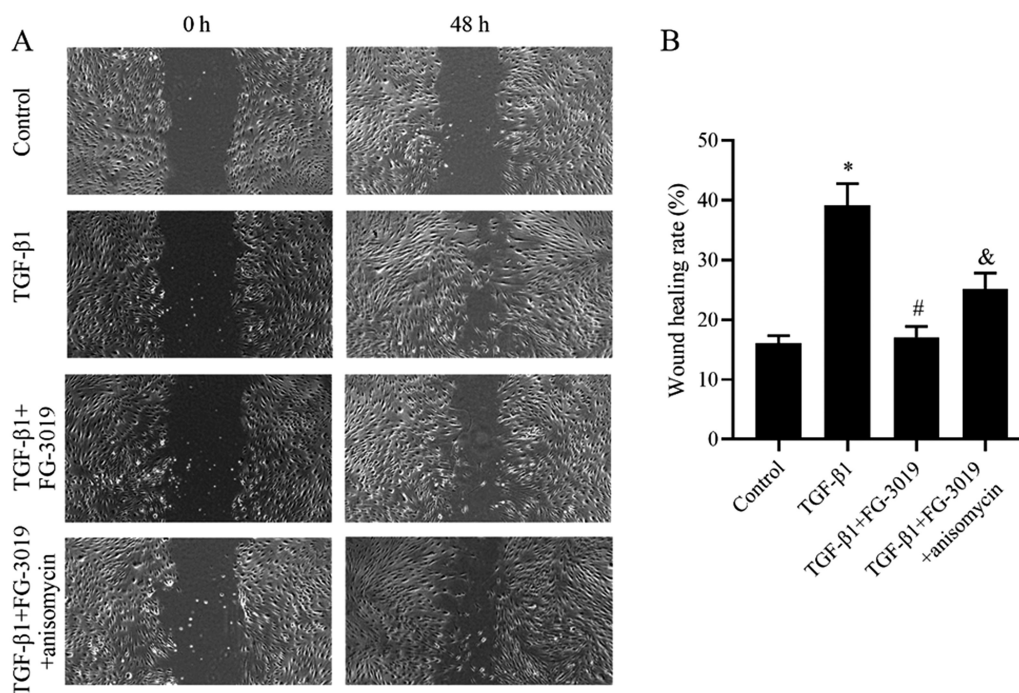


图4 FG-3019 对 TGF-β1 诱导的 HTFs 移行的影响

Fig. 4 The effect of FG-3019 on the migration of HTFs induced by TGF-β1

Note: A: cell migration detected by wound healing experiment, magnification: $\times 200$; B: wound healing rate; compared with Control group, $*P<0.05$; compared with TGF-β1 group, $#P<0.05$; compared with TGF-β1+FG-3019 group, $&P<0.05$.

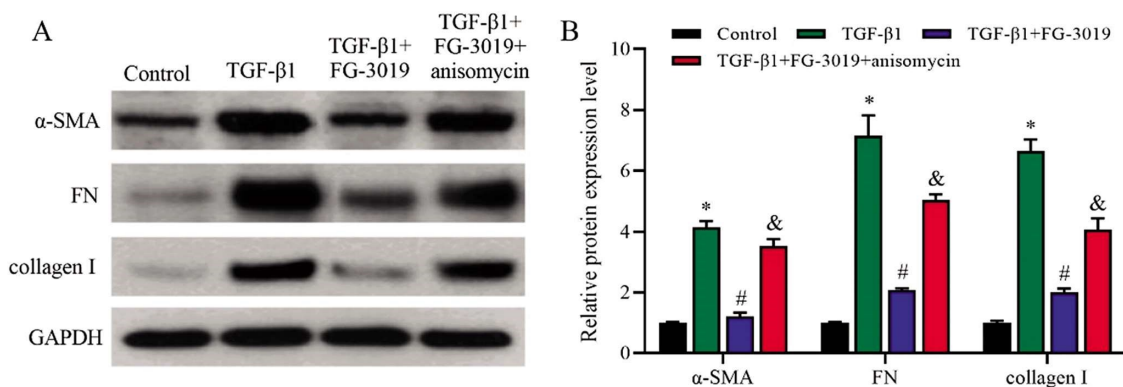


图5 FG-3019 对 TGF-β1 诱导的 HTFs 中 α-SMA、FN 和 collagen I 蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of FG-3019 on the expression of α-SMA, FN and collagen I in HTFs induced by TGF-β1

Note: A: Western blotting detected α-SMA, FN and collagen I protein levels; B: α-SMA, FN and collagen I protein relative expression; compared with Control group, $*P<0.05$; compared with TGF-β1 group, $#P<0.05$; compared with TGF-β1+FG-3019 group, $&P<0.05$.

2.5 FG-3019 对 TGF-β1 诱导的 HTFs 表型转化的影响

不同处理组的 α-SMA、FN 和 collagen I 蛋白相对表达量差异有统计学意义 ($F=542.223, P<0.001$; $F=382.829, P<0.001$; $F=488.089, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF-β1 组的 α-SMA、FN 和 collagen I 的蛋白相对表达量依次升高了 314.17%、614.67% 和 564.23% ($P<0.05$)。与 TGF-β1 组相比, TGF-β1+FG-3019 组的 α-SMA、FN 和 collagen I 的蛋白相对表达量依次降低了 70.78%、70.99% 和 70.04% ($P<0.05$)。与 TGF-β1+FG-3019 组相比, TGF-β1+FG-3019+anisomycin 组的 α-SMA、FN 和 collagen I 的蛋白相对表达量依次升高了 190.50%、142.85% 和 103.60% ($P<0.05$)。见图 5。

2.6 FG-3019 对 TGF-β1 诱导的 HTFs 中 CTGF 表达和 p38 MAPK 信号通路活化的影响

不同处理组的 CTGF 的 mRNA 和蛋白相对表达量差异有统计学意义 ($F=715.694, P<0.001$; $F=167.089, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF-β1 组的 CTGF mRNA 和蛋白相对表达量分别升高了 722.74% 和 408.50% ($P<0.05$)。与 TGF-β1 组相比, TGF-β1+FG-3019 组的 CTGF mRNA 和蛋白相对表达量分别降低了 75.83% 和 60.73% ($P<0.05$)。与 TGF-β1+FG-3019 组相比, TGF-β1+FG-3019+anisomycin 组的 CTGF mRNA 和蛋白相对表达量分别升高了 217.24% 和 130.30% ($P<0.05$)。见图 6。

不同处理组的 p-p38 MAPK 的蛋白表达差异有统计学意义 ($F=383.153, P<0.001$)。与 Control 组相比, TGF-β1 组的 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量升高了 423.41% ($P<0.05$)。与 TGF-β1 组相比, TGF-β1+FG-3019 组的 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量降低了 70.22% ($P<0.05$)。与 TGF-β1+FG-3019 组相比,

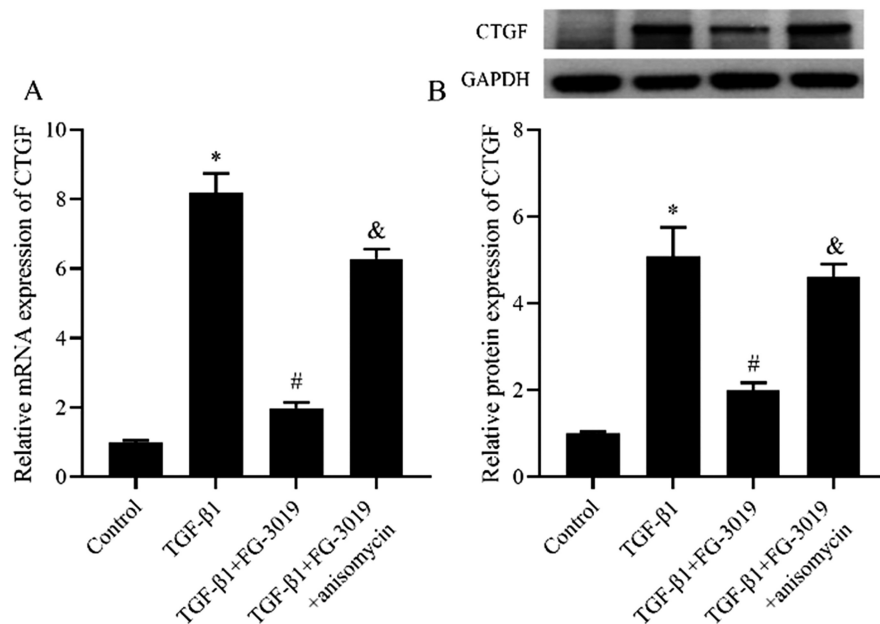


图6 FG-3019对TGF-β1诱导的HTFs中CTGF表达的影响

Fig. 6 The effect of FG-3019 on the expression of CTGF in HTFs induced by TGF-β1

Note: A: CTGF mRNA level detected by qRT-PCR; B: CTGF protein level detected by Western blotting; C: Relative expression of CTGF protein; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with TGF-β1 group, # $P<0.05$; compared with TGF-β1+FG-3019 group, & $P<0.05$.

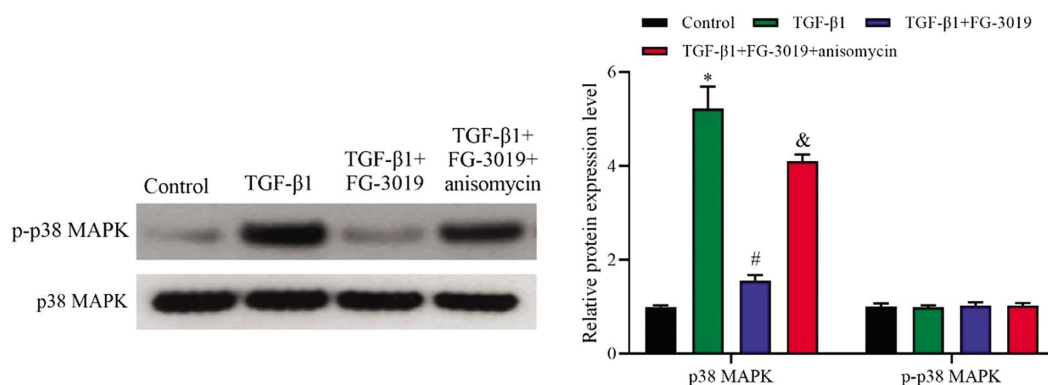


图7 FG-3019对TGF-β1诱导的HTFs中p38 MAPK信号通路活化的影响

Fig. 7 The effect of FG-3019 on the activation of p38 MAPK signaling pathway in HTFs induced by TGF-β1

Note: A: Western blotting detected p38 MAPK and p-p38 MAPK protein levels; B: p38 MAPK and p-p38 MAPK protein relative expression levels; compared with Control group, * $P<0.05$; compared with TGF-β1 group, # $P<0.05$; compared with TGF-β1+FG-3019 group, & $P<0.05$.

TGF-β1+FG-3019+anisomycin组的p-p38 MAPK蛋白相对表达量升高了164.06% ($P<0.05$)。然而,不同处理组的p38 MAPK蛋白表达差异无统计学意义 ($F=0.438, P=0.728$)。见图7。

3 讨论

青光眼治疗的主要目标是将眼内压降低到安全水平以维持视神经的视觉功能。目前,GFS手术是用于治疗无法耐受药物治疗和激光手术的青光眼患者的经典且有效的手术方法之一。然而,大约15-25%的GFS因术后滤泡中的瘢痕形成而失败^[23]。HTFs的过度激活导致细胞增殖和迁移以及细胞外基质(ECM)合成是瘢痕形成的主要原因^[24]。因此,抑制HTFs的过度激活是治疗青光眼的主要目的之一,然而,目前临床中相关的药物比较缺乏。作为首个用于抑制CTGF的治疗性抗体,Pam-revlumab(FG-3019)抑制纤维化作用及良好的安全性已经在多

项研究中被证实^[20-22]。然而,尚无文献报道FG-3019在青光眼相关方面的应用,因此,本研究首次探讨了FG-3019治疗GFS手术后滤过区纤维化的可能作用。

波形蛋白常见于间充质来源细胞,属于一种中间丝蛋白。细胞角蛋白常见于上皮细胞,属于一种上皮细胞中间纤维蛋白。本研究中HTFs中波形蛋白阳性表达,细胞角蛋白阴性表达。说明培养的HTFs来源于间充质细胞而非上皮细胞,结合形态学特征可证明培养的细胞为HTFs。本研究首次考察了FG-3019对HTFs的毒性,MTT实验结果表明当FG-3019浓度大于200 μg/mL时对HTFs有毒性。

先前的研究表明,成纤维细胞活化是由趋化因子和细胞因子的刺激作用引起的,它们通常在伤口愈合反应过程中在结膜下产生^[25]。细胞因子TGF-β通过驱动成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,在介导伤口愈合中发挥关键作用^[26]。伤口部位的常

驻细胞会产生 TGF- β ,这可能有助于瘢痕形成。在瘢痕滤过泡的基质结缔组织中,TGF- β 1 和 TGF- β 2 的表达存在差异,但 TGF- β 1 是主要表达形式^[27]。特别是,TGF- β 1 及其下游通路被认为是术后瘢痕形成过程中的主要调节因子^[28]。TGF- β 1 介导的促纤维化通路已被广泛认为可诱导成纤维细胞转化为肌成纤维细胞^[29]。有针对性地破坏 TGF- β 1 信号通路可以防止正常皮肤成纤维细胞和肾小管上皮细胞发生纤维化^[30]。此外,先前的研究报道 TGF- β 1 在原代人眼成纤维细胞亚群中表达^[31]。其他文献已经证实 TGF- β 1 信号介导 HTFs 中的肌成纤维细胞分化和胶原蛋白生成^[32]。因此,更好地了解 TGF- β 1 介导的 HTFs 激活和胶原蛋白表达的调节及其潜在机制对于 GFS 治疗策略的发展至关重要。TGF- β 诱导的肝纤维化模型作为一种细胞纤维化模型被广泛应用于纤维化的研究。因此,本研究使用 TGF- β 处理 HTFs 来诱导 HTFs 的增殖、移行和表型转化,并将 FG-3019 浓度设置为 100 $\mu\text{g/mL}$ (对正常处理的 HTFs 无毒性)。本次研究结果显示,TGF- β 1 明显诱导了 HTFs 的增殖、移行和表型转化,然而,FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖、移行和表型转化具有明显的抑制作用,这些结果提示 FG-3019 可能在治疗 GFS 手术后滤过区纤维化方面具有较大的潜力。

CTGF 与多种纤维化疾病相关,本课题组前期实验中发现,兔青光眼滤过术后结膜下注射 CTGF 抗体能够维持较大的滤过泡面积和较低的眼压^[14]。FG-3019 通过抑制 CTGF 来抑制纤维化的作用已经在多项研究中被证实。本研究结果也显示,FG-3019 显著抑制了 TGF- β 1 诱导的 HTFs 中 CTGF 的 mRNA 和蛋白表达。为了进一步考察 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 生物学行为的影响,本研究进一步考察了 p38 MAPK 信号通路。已知 MAPKs 信号通路是 CTGF 促纤维化重要的胞内信号转导通路^[15],p38 MAPK 作为主要的 MAPK 信号通路成员,抑制 p38 MAPK 的激活可抑制 TGF- β 介导的肌成纤维细胞分化^[17]。此外,p38MAPK 抑制剂可减轻兔滤过手术后的纤维化^[33]。现有研究证实,CTGF 通过 p38 MAPK 信号通路诱导视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 细胞 ECM 的产生^[34]。本研究结果表明,FG-3019 抑制了 TGF- β 1 诱导的 HTFs 中 p38 MAPK 信号通路的活化。为了进一步验证 p38 MAPK 信号通路是否介导 FG-3019 对 HTFs 的影响,本研究使用 p38 MAPK 信号通路激活剂 anisomycin 处理 TGF- β 1 诱导的 HTFs,发现 anisomycin 逆转了 FG-3019 对 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖、移行和表型转化的抑制作用。上述结果说明 FG-3019 部分通过抑制 p38 MAPK 信号通路来抑制 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖、移行和表型转化。

综上所述,本次研究首次揭示了 FG-3019 通过抑制 p38 MAPK 信号通路来抑制 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖、移行和表型转化。因此,FG-3019 有望成为治疗 GFS 手术后滤过区纤维化的潜在药物。在后续实验中,本课题组将进一步探索 FG-3019 对青光眼动物模型的治疗作用,从而深入论证 FG-3019 的临床应用潜力。

参考文献(References)

- [1] Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, et al. The diagnosis and treatment of glaucoma[J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(13): 225-234
- [2] Zada M, Pattamatta U, White A. Modulation of fibroblasts in conjunctival wound healing [J]. Ophthalmology, 2018, 125 (2): 179-192
- [3] Fu S, Sun L, Zhang X, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces human Tenon's capsule fibroblasts differentiation and fibrosis by up-regulating TGF- β type I receptor[J]. Exp Eye Res, 2017, 165: 47-58
- [4] Masoumpour MB, Nowroozadeh MH, Rameghinejad MR. Current and future techniques in wound healing modulation after glaucoma filtering surgeries[J]. Open Ophthalmol J, 2016, 10: 68-85
- [5] Panarelli JF, Nayak NV, Sidoti PA. Postoperative management of trabeculectomy and glaucoma drainage implant surgery[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2016, 27(2): 170-176
- [6] Fan Gaskin JC, Nguyen DQ, Soon Ang G, et al. Wound healing modulation in glaucoma filtration surgery-conventional practices and new perspectives: the role of antifibrotic agents (part I)[J]. J Curr Glaucoma Pract, 2014, 8(2): 37-45
- [7] Cai X, Yang Y, Chen P, et al. Tetramethylpyrazine Attenuates Transdifferentiation of TGF- β 2-treated human tenon's fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(11): 4740-4748
- [8] Zhang F, Liu K, Cao M, et al. Rosiglitazone treatment prevents postoperative fibrosis in a rabbit model of glaucoma filtration surgery [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(7): 2743-2752
- [9] Zhu H, Dai L, Li X, et al. Role of the long noncoding RNA H19 in TGF- β 1-induced Tenon's capsule fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition[J]. Exp Cell Res, 2020, 387(2): 111802
- [10] Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, et al. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis [J]. Acta Physiol (Oxf), 2009, 195 (3): 321-338
- [11] Richeldi L, Fernández Pérez ER, Costabel U, et al. Pamrevlumab, an anti-connective tissue growth factor therapy, for idiopathic pulmonary fibrosis (PRAISE): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(1): 25-33
- [12] Yin Q, Liu H. Connective tissue growth factor and renal fibrosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 365-380
- [13] 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
- [14] 王建国, 惠娜, 范雅稚, 等. 结膜下注射 CTGF 抗体对兔青光眼滤过手术后眼压和滤过泡面积的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2008, 8 (10): 2005-2007
- [15] Hong L, Lai HL, Fang Y, et al. Silencing CTGF/CCN2 inactivates the MAPK signaling pathway to alleviate myocardial fibrosis and left ventricular hypertrophy in rats with dilated cardiomyopathy[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(11): 9519-9531
- [16] Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, et al. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrotic reaction of retinal pigment epithelial cells [J]. Lab Invest, 2005, 85(7): 838-850
- [17] Meyer-Ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, et al. p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(4): 1500-1509
- [18] Yamanaka O, Saika S, Ohnishi Y, et al. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice[J]. Mol Vis, 2007, 13: 1730-1739

- [19] Yosimichi G, Kubota S, Nishida T, et al. Roles of PKC, PI3K and JNK in multiple transduction of CCN2/CTGF signals in chondrocytes [J]. Bone, 2006, 38(6): 853-863
- [20] Raghu G, Scholand MB, de Andrade J, et al. FG-3019 anti-connective tissue growth factor monoclonal antibody: results of an open-label clinical trial in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir J, 2016, 47(5): 1481-1491
- [21] Picozzi VJ, Pipas JM, Koong A, et al. FG-3019, a human monoclonal antibody to CTGF, with gemcitabine/erlotinib in patients with locally advanced or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Journal of Clinical Oncology, 2013, 31(4): 213-213
- [22] Ohara Y, Chew SH, Misawa N, et al. Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody inhibits growth of malignant mesothelioma in an orthotopic mouse model[J]. Oncotarget, 2018, 9(26): 18494-18509
- [23] Matlach J, Hipp M, Wagner M, et al. A comparative study of a modified filtering trabeculectomy and conventional trabeculectomy [J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9: 483-492
- [24] Liu Y, Kimura K, Orita T, et al. Inhibition by all-trans-retinoic acid of transforming growth factor- β -induced collagen gel contraction mediated by human tenon fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(7): 4199-4205
- [25] Denk PO, Roth-Eichhorn S, Gressner AM, et al. Cytokine regulation of hyaluronate production by human Tenon's capsule fibroblasts[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(2): 77-80
- [26] Sethi A, Mao W, Wordinger RJ, et al. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5240-5250
- [27] Saika S, Yamanaka O, Baba Y, et al. Accumulation of latent transforming growth factor-beta binding protein-1 and TGF beta 1 in extracellular matrix of filtering bleb and of cultured human subconjunctival fibroblasts [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(3): 234-241
- [28] Stewart AG, Thomas B, Koff J. TGF- β : Master regulator of inflammation and fibrosis [J]. Respirology, 2018, 23(12): 1096-1097
- [29] Lin HL, Qin YJ, Zhang YL, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits myofibroblast transformation of human Tenon's fibroblasts [J]. Exp Eye Res, 2020, 197: 108119
- [30] Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, et al. Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(4): 1305-1318
- [31] Stahnke T, L?bler M, Kastner C, et al. Different fibroblast subpopulations of the eye: a therapeutic target to prevent postoperative fibrosis in glaucoma therapy[J]. Exp Eye Res, 2012, 100: 88-97
- [32] Meyer-Ter-Vehn T, Katzenberger B, Han H, et al. Lovastatin inhibits TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(9): 3955-3960
- [33] 曾琨, 黄丽娜, 孙良南, 等. p38MAPK 抑制剂减轻兔滤过手术后纤维化的研究 [J]. 中国实用眼科杂志, 2012, 30(3): 350-354
- [34] Nagai N, Klimava A, Lee WH, et al. CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the ERK (p42/p44mapk) MAPK and the p38 MAPK signaling pathways [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4): 1903-1910