

论著·基础研究

血管内皮生长因子对体外培养的人 Tenon's 囊成纤维细胞的纤维化及其富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白表达的作用

项潇琼, 罗丽颖, 傅 扬, 顾 青, 唐 敏

上海交通大学附属第一人民医院眼科, 上海市眼底病重点实验室, 上海 200080

[摘要] **目的**·探讨血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 对体外培养的人 Tenon's 囊成纤维细胞 (human Tenon's fibroblast, HTF) 的纤维化及其富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) 表达的作用。**方法**·取斜视手术患者的 Tenon's 囊组织进行培养, 并采用免疫荧光技术对获得的 HTF 进行鉴定。采用不同浓度的 VEGF 刺激培养 HTF, 并依据刺激条件将 HTF 分为 4 组, 即 0 ng/mL 组、25 ng/mL 组、50 ng/mL 组和 100 ng/mL 组。采用蛋白质印迹和实时定量 PCR 分析 SPARC、I 型胶原蛋白 (collagen-I) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotein 9, MMP-9) 的表达以及胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路磷酸化活性的改变。采用细胞活力测定实验 (MTS 法) 和划痕实验检测 HTF 的增殖和迁移能力。**结果**·通过免疫荧光技术及倒置相差显微观察可以鉴定, 所培养的原代细胞为 HTF。在 VEGF 刺激作用下, 与 0 ng/mL 组相比, 其他 3 组 HTF 中的 SPARC、collagen-I 和 MMP-9 蛋白及其 mRNA 表达均有所增加, HTF 中 ERK 通路的磷酸化活性均有所上调, HTF 细胞的增殖及迁移能力亦均有所增加, 且在 50 ng/mL 组中影响最大。**结论**·VEGF 在促进 HTF 纤维化的过程中伴随着细胞基质蛋白 SPARC 的上调, 提示 SPARC 可能是这一过程的潜在调控位点。

[关键词] 人 Tenon's 囊成纤维细胞; 富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白; 血管内皮生长因子; 纤维化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.010 **[中图分类号]** R775.9 **[文献标志码]** A

Effects of vascular endothelial growth factor on the fibrosis and the expression of secreted protein acidic and rich in cysteine in cultured human Tenon's fibroblast

XIANG Xiao-qiong, LUO Li-ying, FU Yang, GU Qing, TANG Min

Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases; Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the expression of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and the fibrosis in cultured human Tenon's fibroblast (HTF) *in vitro*. **Methods**·HTF cells were obtained from Tenon's capsule tissues of patients undergoing strabismus surgery. Immunofluorescence was used to identify the HTF cells. HTF cells were cultured with different concentrations of VEGF, and which were divided into four groups, *i.e.*, 0 ng/mL group, 25 ng/mL group, 50 ng/mL group and 100 ng/mL group. The expression of SPARC, collagen-I, and matrix metalloprotein 9 (MMP-9) and the activity of extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway were analyzed by Western blotting and real-time quantitative PCR (qPCR). The abilities of proliferation and migration of HTF cells were detected by MTS assay and scratch test, respectively. **Results**·HTF cells were observed and identified by inverted phase contrast microscope and immunofluorescence. Under the stimulation of VEGF, the expression of protein and mRNA of SPARC, collagen-I and MMP-9 of HTF cells in other three groups were increased compared with 0 ng/mL group; the phosphorylation activities of ERK pathway were up-regulated, and the proliferation and migration abilities of HTF cells were up-regulated. And the effect was the most obvious in the 50 ng/mL group. **Conclusion**·VEGF is involved in promoting the fibrosis of HTF cells accompanied by the up-regulation of the SPARC, which suggests SPARC may become a potential regulatory site.

[Key words] human Tenon's fibroblast (HTF); secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC); vascular endothelial growth factor (VEGF); fibrosis

传统的青光眼滤过术 (glaucoma filtration surgery, GFS) 试图通过前房至结膜下的房水引流通道来降低眼压, 目前该手术是治疗青光眼的重要手段^[1]。然而, 结膜下手术区域的纤维化是导致该手术失败的主要原因。其中, 人 Tenon's 囊成纤维细胞 (human Tenon's fibroblast, HTF) 是

参与纤维化过程的主要反应细胞^[2]。临床上, 一些抗纤维化的药物如丝裂霉素等常用于 GFS 术后以提高手术的成功率, 但这些非细胞特异性抑制剂在减少 GFS 术后滤过泡的纤维化同时也增加了术后低眼压、感染等一系列并发症的发生风险^[3]。因此, 寻找具有细胞特异性且更安全有效的

[作者简介] 项潇琼 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: 1505817876@qq.com。

[通信作者] 唐 敏, 电子信箱: tmsmile@sina.com。



抑制纤维化的方法是该领域重要的研究方向之一。

GFS 可引起组织微血管损伤并导致其发生渗漏,而血小板的活化及各种生长因子的释放是促进滤过泡纤维化的第一步。在该步骤中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)参与血管生成,且与成纤维细胞的活化增殖、伤口修复及纤维化密切相关,在术后滤过泡愈合过程中发挥一定的作用^[4-5]。纤维化是多因素参与的复杂病理过程,而富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)可能在过程中扮演了重要角色,其过度表达与病理性组织重构相关。部分研究^[6-8]发现,干扰 SPARC 的表达可减弱纤维化反应的发生。Seet 等^[9]对敲除 SPARC 基因的小鼠施行 GFS 后发现,其纤维化反应明显减弱,但具体的调控机制尚不清楚。

本研究采用不同浓度的 VEGF 作用于体外培养的 HTF 以构建体外纤维化模型,观察 HTF 的增殖和迁移能力、细胞促纤维化相关因子表达的变化,并研究其对细胞基质蛋白 SPARC 表达的影响,以探讨 SPARC 成为调控 GFS 后纤维化的作用靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 Tenon's 囊组织的获取 收集 2017 年 10 月—2018 年 3 月于上海交通大学附属第一人民医院眼科行斜视矫正手术患者的结膜下 Tenon's 囊组织。所有患者及其家属均签署了知情同意书。

1.1.2 试剂及仪器 DMEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),兔抗人波形蛋白单克隆抗体(ab92547)、兔抗人角蛋白单克隆抗体(EPR17882)、兔抗人 SPARC 单克隆抗体(ab207743)、兔抗人 I 型胶原蛋白(collagen-I)单克隆抗体(ab138942)、兔抗人基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein 9, MMP-9)单克隆抗体(ab76003)、兔抗人胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)_{1/2}单克隆抗体(ab17942)、兔抗人磷酸化 ERK_{1/2}(p-ERK_{1/2})单克隆抗体(ab65142)[艾博抗(上海)贸易有限公司],倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 原代细胞培养及分组 用生理盐水冲洗 Tenon's 囊组织后,采用组织块贴壁法进行原代细胞培养:组织经显

微剪处理至 1 mm × 1 mm 大小,均匀接种于 40 mm 培养皿中,加入含 20% FBS 的 DMEM 培养液于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。传代后,换用含 10% FBS 的 DMEM 培养液进行细胞培养,以获得 HTF。选取第 3 ~ 9 代 HTF 进行后续实验。在后续实验中,采用不同浓度(0、25、50、100 ng/mL)的 VEGF 刺激培养 HTF 24 h,并依据刺激条件将 HTF 分为 4 组,即 0 ng/mL 组(对照组)、25 ng/mL 组、50 ng/mL 组和 100 ng/mL 组。

1.2.2 HTF 鉴定 将细胞接种至预先处理过的玻片上,并置于 24 孔板中进行培养。待细胞生长覆盖至玻片的 90% 时,用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 3 次,经 4% 多聚甲醛固定后, PBS 洗涤 3 次。采用 5% 山羊血清和 0.3% Triton-X 100 封闭 30 min,加入兔抗人波形蛋白单克隆抗体(工作浓度为 1:250)和兔抗人角蛋白单克隆抗体(工作浓度为 1:50)于 4 ℃ 孵育过夜。次日,加入 Alexa Fluor 488 标记的抗兔 IgG(工作浓度为 1:1 000,美国 Cell Signaling Technology 公司)于室温孵育 40 min。用 DAPI 染细胞核, PBS 洗涤 2 次。于免疫荧光显微镜下观察并拍照,同时在倒置相差显微镜下观察细胞生长的特点及形态。

1.2.3 蛋白表达水平检测 分别采用免疫荧光技术及蛋白质印迹(Western blotting)对 SPARC、MMP-9、collagen-I 的表达进行检测。①免疫荧光分析。将细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中的玻片上,经不同浓度的 VEGF 刺激作用 24 h 后,用细胞固定液(甲醛与丙酮的体积比为 1:1)进行固定。向 4 组细胞中加入兔抗人 SPARC 单克隆抗体(工作浓度为 1:400)、兔抗人 MMP-9 单克隆抗体(工作浓度为 1:200)、兔抗人 collagen-I 单克隆抗体(工作浓度为 1:400)于 4 ℃ 孵育过夜,次日用 PBS 洗涤后加入免疫荧光标记二抗(工作浓度为 1:1 000,美国 Jackson 公司)于室温暗盒内孵育 1 h。经 DAPI 染核后置于免疫荧光显微镜下观察细胞的染色情况并拍照,利用 Image J 软件分析荧光强度并计算各组蛋白的表达水平。② Western blotting 检测。采用 RIPA 裂解液将 4 组细胞置于冰上进行裂解,提取细胞总蛋白后用 BCA 法进行蛋白定量。取等量的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。结束后将蛋白转至聚偏氟乙烯膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭后, TBST 漂洗,加入兔抗人 SPARC 单克隆抗体、兔抗人 MMP-9 单克隆抗体、兔抗人 collagen-I 单克隆抗体、兔抗人 p-ERK_{1/2} 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(美国 Proteintech 公司)(工作浓度均为 1:1 000)于 4 ℃ 孵育过夜,次日 TBST 洗涤后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及抗鼠二抗(工作浓度均

为 1:5 000, 美国 Jackson 公司) 室温孵育 1 h。经 ECL 发光液显色后于凝胶成像系统拍照, Image J 软件测量蛋白条带灰度值, 以 β -肌动蛋白 (β -actin) 和 ERK_{1/2} 为内参, 分析各样品目的蛋白的相对含量。

1.2.4 mRNA 表达水平检测 采用实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 对 *SPARC*、*MMP-9*、*collagen-I* 的 mRNA 表达进行检测。利用 TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 并用 Nanodrop 2000 检测各组 mRNA 的浓度和纯度。按照 TaKaRa (RR036A) 操作手册将各组 RNA 反转录成 cDNA, 再根据 TaKaRa (RR407) 操作手册加入试剂和引物后, 采用两步法 PCR 进行扩增。PCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物系列
Tab 1 Primer sequences of qPCR

基因	引物序列 (5'→3')
β -actin	上游引物 GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	下游引物 AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>SPARC</i>	上游引物 AGGAAACCGAAGAGGAGG
	下游引物 GCAAAGAAGTGGCAGGAA
<i>MMP-9</i>	上游引物 GACCTCAAGTGGCACCACCA
	下游引物 GTGGTACTGCACCAAGGGCAA
<i>collagen-I</i>	上游引物 CCCAGCCACAAAGAGTCTACA
	下游引物 GTTTCACACGTCTCGGTCA

1.2.5 HTF 增殖能力检测 采用细胞活力测定实验 (MTS 法) 检测 HTF 的增殖能力。将细胞稀释至 1×10^5 个/mL 并接种于 96 孔板中, 待细胞生长覆盖至 96 孔板底部的 90% 时, 采用不同浓度的 VEGF 刺激作用 24 h。而后, 向每孔加入 MTS 20 μ L 继续培养 2 h, 于酶标仪下检测各孔细胞在 490 nm 处的吸光度 [$D(490\text{ nm})$] 值。

1.2.6 HTF 迁移能力检测 采用划痕实验检测 HTF 的迁移能力。将 HTF 细胞均匀接种于 12 孔板中, 待细胞生长覆盖至 12 孔板底部的 90% 时, 用移液枪沿每组孔板中线横、竖各划 2 条直线。用 PBS 清洗细胞碎片后, 加入不同浓度的 VEGF 作用细胞。于特定时间 (0、24、48、72 h) 在相差显微镜下观察, 并在每孔细胞的同一位置拍照, 观察划痕面积改变, 并计算各组细胞的划痕愈合率。划痕愈合率 = (初始划痕面积 - 终划痕面积) / 初始划痕面积 $\times 100\%$ 。

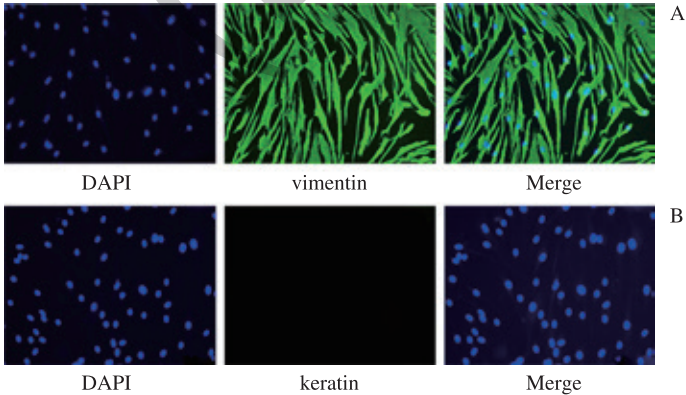
1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对研究数据进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HTF 鉴定

将患者 Tenon's 囊组织剪碎后平铺于培养皿中进行培养, 于倒置相差显微镜下观察发现, 细胞呈梭形、可贴壁生长, 其胞核位于细胞中部, 4 ~ 6 d 细胞可融合长满瓶底; 待细胞长满后进行传代, 经 12 h 后细胞可再次贴壁生长; 且经多次传代后, HTF 的细胞形态和生长活性保持不变。采用免疫荧光技术对 HTF 进行鉴定, 结果 (图 1) 显示: 兔抗人波形蛋白单克隆抗体染色为阳性, 即细胞质呈绿色 (二抗标记为绿色荧光); 兔抗人角蛋白单克隆抗体染色为阴性, 即细胞质未着色。由于多数组织的上皮细胞均含有细胞角蛋白, 该阴性结果显示染色细胞非上皮细胞; 且成纤维细胞属于间质细胞, 经抗波形蛋白单抗反应的染色结果显示为阳性。因此, 综合上述结果并结合取材部位可知, 该细胞为 HTF。



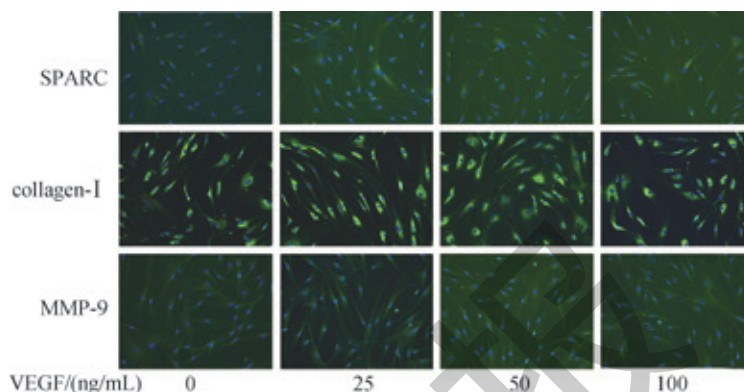
注: A. DAPI 染色和抗波形蛋白单抗杂交反应; B. DAPI 染色和抗角蛋白单抗杂交反应。Vimentin 为波形蛋白, keratin 为角蛋白; 蓝色荧光示细胞核, 绿色荧光示细胞质, Merge 为上述两者的叠加图

图 1 免疫荧光技术鉴定 HTF ($\times 200$)
Fig 1 Identification of HTF by immunofluorescence ($\times 200$)

2.2 免疫荧光技术检测 SPARC、collagen-I 和 MMP-9 的表达

经不同浓度的 VEGF 刺激作用细胞 24 h 后, 采用免疫荧光技术对 HTF 中的 SPARC、MMP-9 和 collagen-I

的表达进行检测。结果 (图 2) 显示, 在 VEGF 刺激作用下, SPARC 的表达水平较对照组有轻度的增加, 且促纤维化相关因子 MMP-9 和 collagen-I 的表达水平也相应增加。



注: 蓝色荧光示细胞核, 绿色荧光示细胞质

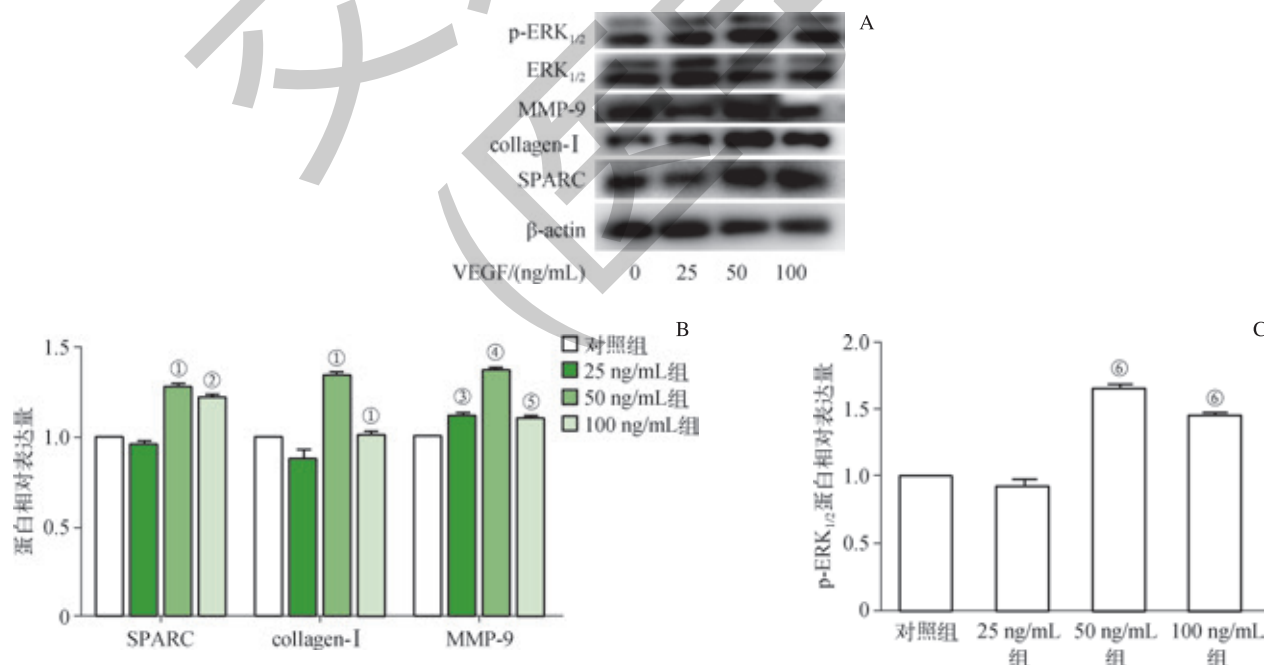
图 2 免疫荧光技术检测各组 HTF 中目的蛋白的表达 ($\times 100$)

Fig 2 Expression of target proteins in HTF cells stimulated by different concentrations of VEGF by immunofluorescence ($\times 100$)

2.3 Western blotting 检测 SPARC、collagen-I、MMP-9 和 p-ERK_{1/2} 的表达

经不同浓度的 VEGF 刺激作用细胞 24 h 后, 通过 Western blotting 观察 HTF 中 SPARC、collagen-I、MMP-9 和 p-ERK_{1/2} 表达的变化。结果 (图 3) 显示, 在 VEGF 刺激作用下, SPARC 的表达水平较对照组有轻度的增加,

且促纤维化相关因子 MMP-9 和 collagen-I 的表达水平也有所增加; 当 VEGF 的浓度为 50 ng/mL 时, SPARC、MMP-9 和 collagen-I 的表达量最高; 同时, 随着 VEGF 浓度的增加, p-ERK_{1/2} 的表达量亦增加, 继而推测 ERK 通路的磷酸化活性有所上调。



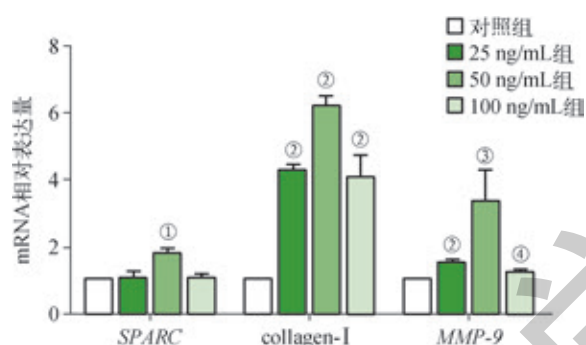
注: A. SPARC、collagen-I、MMP-9 和 p-ERK_{1/2} 的蛋白条带; B. SPARC、collagen-I 和 MMP-9 的相对表达量 (以 β -actin 作为内参); C. p-ERK_{1/2} 的相对表达量 (以 ERK_{1/2} 作为内参)。^① $P=0.001$, ^② $P=0.008$, ^③ $P=0.009$, ^④ $P=0.002$, ^⑤ $P=0.024$, ^⑥ $P=0.001$, 与对照组比较

图 3 Western blotting 检测各组目的蛋白的表达

Fig 3 Expression of target proteins in HTF cells stimulated by different concentrations of VEGF by Western blotting

2.4 qPCR 检测 *SPARC*、*collagen-I* 和 *MMP-9* 的 mRNA 的表达

经不同浓度的 VEGF 刺激作用细胞 24 h 后, 采用 qPCR 对各组 HTF 中 *SPARC*、*collagen-I* 和 *MMP-9* 的 mRNA 进行检测, 结果 (图 4) 显示, *SPARC* 的 mRNA 表达水平与对照组相比有所增加, 且促纤维化相关因子 *collagen-I* 和 *MMP-9* 的 mRNA 表达水平亦增加; 当 VEGF 的浓度为 50 ng/mL 时, HTF 中 *SPARC*、*collagen-I* 和 *MMP-9* 的 mRNA 表达变化最为明显。



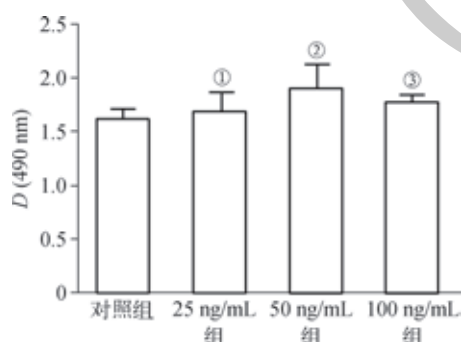
注: 以 β -actin 作为内参。① $P=0.003$, ② $P=0.001$, ③ $P=0.019$, ④ $P=0.008$, 与对照组比较

图 4 qPCR 检测各组 HTF 中目的基因的 mRNA 表达

Fig 4 Expression of mRNA of target genes in HTF cells stimulated by different concentrations of VEGF by qPCR

2.5 MTS 法检测 HTF 的增殖活性

经不同浓度的 VEGF 刺激作用细胞 24 h 后, 采用 MTS 法对 HTF 的增殖活性进行检测, 结果 (图 5) 显示: 随着 VEGF 浓度的增加, HTF 在 490 nm 的吸光度有轻度的增加, 表明细胞数量逐渐增多且增殖活性亦逐渐增强; 当 VEGF 浓度为 50 ng/mL 时, HTF 在 490 nm 的吸光度最强。



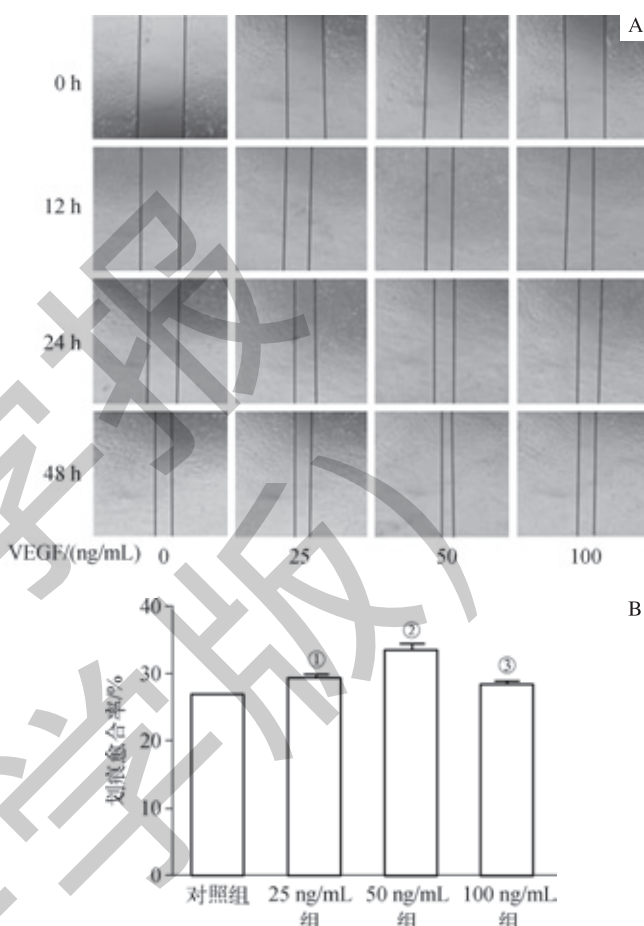
注: ① $P=0.024$, ② $P=0.027$, ③ $P=0.013$, 与对照组比较

图 5 MTS 法检测不同浓度 VEGF 刺激下 HTF 的增殖活性

Fig 5 Proliferation activity of HTF cells stimulated by different concentrations of VEGF detected by MTS assay

2.6 划痕实验检测 HTF 的迁移能力

经不同浓度的 VEGF 刺激作用细胞后, 通过划痕实验检测 HTF 的迁移能力, 观察 4 组细胞发现: 随着 VEGF 浓度的增加 HTF 的迁移速度也得到了同步提升; 当 VEGF 浓度为 50 ng/mL 时, 划痕面积愈合速度最快 (图 6)。



注: A. 显微镜观察每个时间点下不同 VEGF 浓度对划痕细胞的影响; B. 划痕愈合率的统计数值。① $P=0.026$, ② $P=0.009$, ③ $P=0.028$, 与对照组比较

图 6 划痕实验检测不同浓度 VEGF 刺激下的 HTF 迁移能力

Fig 6 Migration ability of HTF cells stimulated by different concentrations of VEGF detected by scratch test

3 讨论

大量研究已证实, VEGF 在 GFS 术后滤过泡瘢痕的形成过程中发挥重要作用。Kim 等^[10]和 Lopilly Park 等^[11]发现, GFS 术后失败的患者房水中 VEGF 水平较手术成功的患者有明显升高。Li 等^[12]通过对滤过手术的动物模型的房水进行研究也发现了 VEGF 表达水平有所上调, 推测 GFS 手术的成功在一定程度上与房水中的 VEGF 浓度相关。同时, Lopilly Park 等^[11]的实验也证实 Tenon's 囊成纤维细胞可以表达不同类型的 VEGF, 而 VEGF 则可促进

Tenon's 囊成纤维细胞的增殖。这与本研究的结果相一致, 即随着 VEGF 浓度的增加, HTF 的增殖活性有所增强。Wilgus 等^[13]发现在伤口愈合过程中, VEGF 可通过增加新生血管和胶原沉积纤维化形成皮肤瘢痕, 而抑制 VEGF 则可明显减少新生血管及胶原纤维的生成。本研究也发现, 随着 VEGF 刺激强度的增加, HTF 中 collagen-I 的表达量亦增加, 同时 ERK 通路的磷酸化活性也有所增加。有研究^[14]发现, VEGF 通过与受体结合可介导丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) / ERK 的级联激活, 促进细胞增殖, 这是内皮细胞和成纤维细胞中 VEGF 诱导细胞增殖的主要调节机制。

作为一种细胞基质蛋白, SPARC 能增强纤维连接蛋白介导的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的积聚, 而抑制 SPARC 的表达则可减少多种胶原成分^[15]及 MMPs、组织金属蛋白酶抑制物 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP-3)^[16]的表达。在机体的多种组织和细胞中, SPARC 可引起金属蛋白酶系统活性的变化, 从而促进了 ECM 的积聚。Kato 等^[17]研究发现, 随着 VEGF 刺激剂量的增加, 人微血管内皮细胞 (HMEC-1) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 中的 SPARC 表达也逐渐增加。然而目前, 在 HTF 中关于 VEGF 可诱导 SPARC 表达的研究相对较少。本研究结果显示, VEGF 可以促进 HTF 中 SPARC 的表达; 同时, 在 VEGF 刺激作用下, HTF 中 MMP-9 和 collagen-I 表达均有所增加, 继而推测该 2 种蛋白表达的增加可能与 SPARC 表达上升有关。有研究^[18]证实, SPARC 可以调节 MMP 的活性并影响 MMP 的表达。部分研究认为, SPARC 可在胶原蛋白的翻译后加工中充当分子伴侣, 以确保胶原蛋白的稳定性。McDonald 等^[19]发现, 在心肌细胞纤维化过程中

SPARC 可促进前胶原-I 的合成、胶原纤维的形成和沉积。而本研究发现, VEGF 可在 mRNA 和蛋白水平上刺激 collagen-I 的表达, 继而推测 SPARC 可能在 collagen-I 的表达过程中发挥了一定的促进作用, 且 VEGF 信号通路对这个过程存在一定的影响。Van Bergen 等^[4]研究表明, HTF 的增殖主要由 VEGF₁₂₁ 和 VEGF₁₈₉ 诱导所致, 也与 ERK 通路的激活相关; 而抑制 ERK 通路的磷酸化则可抑制 VEGF 对 HTF 的增殖调控作用, 继而表明 VEGF 是通过 MAPK/ERK 途径刺激细胞增殖的。Kato 等^[17]针对内皮细胞中 VEGF 对 ERK 下游信号的调节作用进行研究发现, 外源性 SPARC 可对该调节作用产生一定的抑制效果。而在本研究中, HTF 经 VEGF 刺激作用后, 其 SPARC 的表达水平有所增加且 ERK 通路的磷酸化活性亦有所增加, 继而提示, 在不同的细胞中 SPARC 可就 VEGF 对 ERK 通路的调节作用产生不同的影响。

已有研究^[20-21]表明 SPARC 可以促进细胞的增殖和迁移, 而 SPARC 的敲除或下调则可抑制各种细胞的迁移活动, 继而表明 SPARC 在细胞迁移过程中发挥一定的作用。有研究^[22]认为, SPARC 是通过允许细胞从其正常附着物与其周围基质以及其他相邻细胞脱粘的方式来介导细胞迁移的, 且该蛋白可通过调节 ECM 的表达来影响细胞行为。本研究发现在 VEGF 刺激作用下, 伴随着 SPARC 表达的增加, HTF 的迁移能力也有所提高; 由此推测, SPARC 在此过程中也可能扮演着重要角色。

综上所述, 本研究发现 SPARC 在 VEGF 对 HTF 纤维化调控过程中可能发挥了重要作用。在后续的体内及体外研究中, 我们将对 SPARC 的表达进行调控以实现 VEGF 对 HTF 纤维化的调控作用的改变, 并进一步探讨 SPARC 成为 GFS 术后纤维化的蛋白治疗靶点的可能性。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Yu DY, Morgan WH, Sun X, et al. The critical role of the conjunctiva in glaucoma filtration surgery[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28(5): 303-328.
- [2] Masoumpour MB, Nowroozzadeh MH, Razeghinejad MR. Current and future techniques in wound healing modulation after glaucoma filtering surgeries[J]. *Open Ophthalmol J*, 2016, 10: 68-85.
- [3] Yamamoto T, Sawada A, Mayama C, et al. The 5-year incidence of bleb-related infection and its risk factors after filtering surgeries with adjunctive mitomycin C: collaborative bleb-related infection incidence and treatment study 2[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(5): 1001-1006.
- [4] Van Bergen T, Vandewalle E, Van de Veire S, et al. The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery[J]. *Exp Eye Res*, 2011, 93(5): 689-699.
- [5] Ong HT, Dilley RJ. Novel non-angiogenic role for mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor on keratinocytes during wound healing[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 69-79.
- [6] Atorrasagasti C, Peixoto E, Aquino JB, et al. Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54962.
- [7] Nakatani K, Seki S, Kawada N, et al. Expression of SPARC by activated hepatic stellate cells and its correlation with the stages of fibrogenesis in human chronic hepatitis[J]. *Virchows Arch*, 2002, 441(5): 466-474.
- [8] Ding W, Pu W, Jiang S, et al. Evaluation of the antifibrotic potency by knocking down SPARC, CCR2 and SMAD3[J]. *EBioMedicine*, 2018, 38: 238-247.
- [9] Seet LF, Su R, Barathi VA, et al. SPARC deficiency results in improved surgical survival in a novel mouse model of glaucoma filtration surgery[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9415.
- [10] Kim YG, Hong S, Lee CS, et al. Level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor and surgical results of ahmed glaucoma valve implantation in patients with neovascular glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2009, 18(6): 443-447.
- [11] Lopilly Park HY, Kim JH, Ahn MD, et al. Level of vascular endothelial growth factor in tenon tissue and results of glaucoma surgery[J]. *Arch Ophthalmol*, 2012, 130(6): 685-689.
- [12] Li Z, Van Bergen T, Van de Veire S, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery[J]. *Invest*



- Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(11): 5217-5225.
- [13] Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyzy TM, et al. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor[J]. Lab Invest, 2008, 88(6): 579-590.
- [14] Li Z, Hua W, Li X, et al. Suppression of human Tenon fibroblast cell proliferation by lentivirus-mediated VEGF small hairpin RNA[J]. J Ophthalmol, 2017, 2017: 7982051.
- [15] Rosset EM, Trombetta-eSilva J, Hepfer G, et al. SPARC and the N-propeptide of collagen I influence fibroblast proliferation and collagen assembly in the periodontal ligament[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0173209.
- [16] Oh DJ, Kang MH, Ooi YH, et al. Overexpression of SPARC in human trabecular meshwork increases intraocular pressure and alters extracellular matrix[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(5): 3309-3319.
- [17] Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, et al. Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(2): 422-426.
- [18] Li B, Li F, Chi L, et al. The expression of SPARC in human intracranial aneurysms and its relationship with MMP-2/-9[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58490.
- [19] McDonald LT, Zile MR, Zhang Y, et al. Increased macrophage-derived SPARC precedes collagen deposition in myocardial fibrosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(1): H92-H100.
- [20] Seno T, Harada H, Kohno S, et al. Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas[J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 707-715.
- [21] Chang CH, Yen MC, Liao SH, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) enhances cell proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition, and SPARC expression is associated with tumor grade in head and neck cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): e1556.
- [22] Tumbarello DA, Andrews MR, Brenton JD, et al. SPARC regulates transforming growth factor β induced (TGF β) extracellular matrix deposition and paclitaxel response in ovarian cancer cells[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162698.

[收稿日期] 2019-01-18

[本文编辑] 邢宇洋

学术快讯

上海交通大学医学院院长陈国强率团访问马来西亚和新加坡

2019年8月8日, 南亚东南亚医学教育与医疗卫生联盟理事长、上海交通大学医学院院长陈国强, 上海交通大学医学院附属仁济医院副院长夏强、附属上海儿童医学中心院长江忠仪等一行先后应邀赴马来西亚和新加坡访问, 拜访中国驻马来西亚大使、新加坡教育部部长和卫生部部长等, 全方位推动上海交通大学医学院与新加坡、马来西亚高校在医学教育、科技合作、学生交换等领域的交流合作。

陈国强一行先行到访马来西亚, 与马来西亚国际医药大学 (International Medical University, IMU)、马来亚大学医学院、马来亚大学医学中心 (University Malaya Medical Centre, UMMC) 举行会谈, 共同推进临床医学联合培养项目, 并进一步签订专项合作协议探索建立联合实验室, 开展科研合作, 举办辐射南亚、东南亚的国家级培训班等, 促进区域高等医学教育和医疗卫生服务质量的提升。先期到达马来西亚的附属仁济医院夏强教授率领肝移植团队联合 UMMC 专家, 成功完成马来西亚首次共 2 例儿童活体肝移植手术。期间, 上海交通大学医学院与马来亚大学医学院签署合作备忘录, 双方将在学生培养、科学研究等领域展开更为深入的精诚合作。此外, 陈国强院长还与 IMU 校长 Aziz Baba 探讨了在沿线国家开展临床医学本科专业联合培养项目的路径。

随后, 陈国强一行访问了新加坡国立大学杨潞龄医学院、新加坡中央医院 (Singapore General Hospital, SGH) 与竹脚妇幼医院 (KK Women's and Children's Hospital, KKH)。通过实地调研, 持续推进美国、中国和新加坡儿童医疗机构等的六方合作, 并进一步扩展联合研究, 推动中新双方共同关注的儿童问题、老龄化问题的国际合作。同时, 受 VIVA 儿童抗癌基金会资助, 附属上海儿童医学中心与 KKH 签署全面合作备忘录, 双方将在医疗服务、教育培训、科研合作等方面进行密切联系, 从肿瘤研究逐步拓展到病理学等更广泛的领域。此外, 上海交通大学医学院与新加坡国立大学医学院签署合作备忘录, 双方将进一步加强医学教育、临床研究、学生交换等方面的合作, 并率先开展肿瘤、脑科学、免疫学的合作研究, 助力学科发展。访问过程中, 陈国强院长还会见了新保集团副总裁 Fong Kok Yong 先生, 双方期待在儿童、老人等问题上加强互动合作。

访问期间, 陈国强院长先后拜访了中国驻马来西亚大使白天、新加坡教育部部长王乙康、卫生部部长颜金勇等, 从管理层面进一步夯实深度互动的国际合作网络, 提升医学院国际化水平和国际影响力。