

引文格式:贺李娴,邵毅,邹雪香,周双双,周颖,刘二华,等.缓激肽对体外培养兔角膜内皮细胞增殖状况及对闭锁小带蛋白-1与相关性核酸结合蛋白表达的影响[J].眼科新进展,2018,38(2):116-120. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0025

【实验研究】

缓激肽对体外培养兔角膜内皮细胞增殖状况及对闭锁小带蛋白-1与相关性核酸结合蛋白表达的影响[△]

贺李娴 邵毅 邹雪香 周双双 周颖 刘二华 谭钢

作者简介:贺李娴,女,1991年9月出生,湖南人,硕士。研究方向:角膜及眼表疾病。联系电话:18773488167; E-mail: hlxian0706@126.com; ORCID: 0000-0002-1086-1694

About HE Li-Xian: Female, born in September, 1991. Master degree. Tel: 18773488167; E-mail: hlxian0706@126.com; ORCID: 0000-0002-1086-1694

收稿日期:2017-08-27

修回日期:2017-11-08

本文编辑:申蓝

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81100648、81400372);湖南省教育厅优秀青年基金资助(编号:15B210)

作者单位:421001 湖南省衡阳市,南华大学附属第一医院眼科(贺李娴,邹雪香,周双双,周颖,刘二华,谭钢);330006 江西省南昌市,南昌大学第一附属医院眼科(邵毅)

通讯作者:谭钢, E-mail: tangang99@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-4205-2015

Received date: Aug 27, 2017

Accepted date: Nov 8, 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81100648, 81400372); Outstanding Youth Foundation from the Education Commission of Hunan Province (No: 15B210)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of University of South China (HE Li-Xian, ZOU Xue-Xiang, ZHOU Shuang-Shuang, ZHOU Ying, LIU Er-Hua, TAN Gang), Hengyang 421001, Hunan Province, China; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University (SHAO Yi), Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Responsible author: TAN Gang, E-mail: tangang99@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-4205-2015

Effects of bradykinin on the proliferation of rabbit corneal endothelial cells and the expression of tight junction-related proteins ZO-1 and ZONAB

HE Li-Xian, SHAO Yi, ZOU Xue-Xiang, ZHOU Shuang-Shuang, ZHOU Ying, LIU Er-Hua, TAN Gang

【Abstract】 Objective To investigate the effects of bradykinin (BK) on the proliferation of rabbit corneal endothelial cells (RCECs) and the expression of tight junction-related proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and zonula occludens-1-associated nucleic-acid-binding protein (ZONAB), and to explore the underlying mechanisms of BK on cell proliferation in corneal endothelium. **Methods** RCECs at logarithmic growth phase were treated with different concentrations of BK (0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) BK group, with the controls left untreated. Morphological changes of cells in each group were examined under phase-contrast microscope, and MTT assays were used to detect cell proliferation at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h after BK treatment. And, at 72 h, the expression levels of ZO-1 and ZONAB protein were determined by Western blot. **Results** After 72 h of treatment, the cells in each group were fused into pieces and closely linked into a monolayer; but after 96 h, the growth of the cells was restricted, with the intercellular space become larger and the cells exfoliated. Compared with the control group, BK induced a significant increase of absorbance value and cell viability, and the differences were statistically significant (all $P < 0.001$), and the promoting effects showed a concentration-dependent manner, and 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK demonstrated the strongest regulative effect ($P < 0.001$). Western blot results showed that BK upregulated the expression of ZO-1 and ZONAB protein in a concentration-dependent manner. **Conclusion** BK can stimulate the proliferation of RCECs in a time- and concentration-dependent manner, and the mechanisms are probably associated with ZO-1/ZONAB-mediated signaling pathway.

【Key words】 bradykinin; rabbit corneal endothelial cells; proliferation; ZO-1; ZONAB

【摘要】 目的 观察缓激肽(bradykinin, BK)对体外培养兔角膜内皮细胞增殖及对紧密连接相关蛋白闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、闭锁小带蛋白-1相关性核酸结合蛋白(zonula occludens-1-associated nucleic-acid-binding protein, ZONAB)表达的影响,初步探讨BK促进角膜内皮细胞增殖的作用机制。**方法** 选择对数生长期的兔角膜内皮细胞,向培养基中分别加入0.01、0.10、1.00、10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK(BK组),对照组不做加药处理,倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化和增殖状况,MTT法检测各组细胞在24 h、48 h、72 h、96 h的吸光度(A)值,Western blot检测72 h各组细胞中紧密连接处ZO-1与核内ZONAB蛋白的表达。**结果** 加药72 h,各组细胞融合成片并紧密连成单层,加药96 h后各组细胞生长受限,细胞间隙变大,脱落细胞增多。与对照组相比,除0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK组24 h外,其余浓度BK处理后A值升高、增殖活力增强,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.001$),并呈现出一定的浓度依赖性,其中1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK作用最强($P < 0.001$)。Western blot结果显示BK可促进紧密连接处ZO-1与核内ZONAB蛋白的表达,且呈一定的浓度依赖性。**结论** BK体外刺激可促进兔角膜内皮细胞的增殖,具有浓度和时间的依赖性,其作用机制可能与ZO-1与ZONAB介导的信号通路有关。

【关键词】 缓激肽;兔角膜内皮细胞;增殖;ZO-1;ZONAB

【中图分类号】 R772.2

人角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CECs) 再生能力十分有限,成年后 CECs 有丝分裂停滞于 G1 期,眼科疾病、炎症、外伤、手术及年龄增长均可导致 CECs 密度降低,重者可引起角膜内皮盲,最终导致失明^[1-2]。因而探讨 CECs 的增殖能力与增殖机制具有深远的意义,眼科临床也亟需寻找并发现一些促进 CECs 增殖的新药物与新方法。缓激肽 (bradykinin, BK) 是一种局部肽类激素,参与炎症、疼痛、血管生成、细胞增殖、肿瘤发生、血-脑屏障通透性调节等诸多病理生理过程^[3-7]。在角膜组织,研究证实 BK 可促进角膜上皮细胞、成纤维母细胞、角膜基质细胞及 CECs 等多种角膜相关细胞的增殖,然而具体机制不明^[4-7]。闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 与闭锁小带蛋白-1 相关性核酸结合蛋白 (zonula occludens-1-associated nucleic-acid binding protein, ZONAB) 均属于紧密连接相关蛋白,两者相互作用并由此介导 ZO-1/ZONAB 信号通路,被证实与多种细胞的增殖分化有关,在 CECs 及视网膜色素上皮细胞亦有所报道^[8-9]。为探讨 BK 促进 CECs 增殖的作用是否与 ZO-1/ZONAB 信号通路有关,本研究在前期建立的体外培养兔角膜内皮细胞 (rabbit corneal endothelial cells, RCECs) 模型的基础上,观察 BK 对 RCECs 增殖状况及对 ZO-1 和 ZONAB 蛋白表达的影响,初步探讨 BK 促进 RCECs 增殖的作用机制,以期角膜再生提供新思路和新方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和主要试剂 50 d 龄大耳白兔, 体重 1~2 kg, 雌雄不限, 无眼部疾患及遗传性眼病, 由南华大学实验动物部提供。所有动物饲养和实验过程均符合视觉与眼科研究协会 (Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) 有关实验动物的相关规定。BK (美国 Abcam 公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清和胶原酶 I (美国 Gibco 公司); 青霉素链霉素双抗溶液和 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化液 (Trypsin, 美国 HyClone 公司); MTT 细胞增殖检测试剂盒 (长沙维世尔生物科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒、全蛋白提取试剂盒以及核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物科技有限公司); 鼠抗 ZONAB 抗体 (美国 Invitrogen 公司); 鼠抗 ZO-1 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); anti- β -actin (美国 Proteintech 公司); 全自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 RCECs 原代培养与传代培养 采用揭膜法结合胶原酶消化法获取 RCECs 原代细胞。耳缘静脉快速注射 10 mL 空气处死家兔。无菌条件下摘取完整眼球, 沿角膜巩膜内侧缘 1 mm 处环形剪下全层角膜, 小心去除晶状体和虹膜后, 用无菌温 PBS 液冲

洗。将角膜凹面朝上置于无菌培养皿中, 在解剖显微镜下小心将后弹力层及内皮细胞层剥离, PBS 液反复清洗后, 置于细胞培养瓶中, 加入 DMEM 培养液 (含 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胶原酶 I), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中消化 16 h 后, 倒置显微镜下观察到内皮细胞变圆、间隙变清晰时, 再加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 加入 PBS, 再离心清洗 2 遍。加入 3 mL 培养液制成角膜内皮细胞悬液, 按 10×10^3 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$ 的密度接种于细胞培养皿, 于体积分数 5% CO_2 饱和湿度, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下培养。每 2~3 d 换液一次, 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 拍照记录。当细胞融合时, 加入 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶进行消化, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 2 min。待细胞变圆、间隙变大且快要脱离培养皿底时, 加入 10 mL 含胎牛血清的 DMEM 培养液中中止消化, 收集细胞悬液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 弃上清, 加入 10 mL 培养液洗涤细胞 1 次, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 弃上清, 最后加入 3 mL 培养液制成细胞悬液, 按 0.5×10^9 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 接种于 2 个细胞培养瓶内, 一分为二进行传代培养。

1.2.2 不同浓度 BK 处理细胞 传至 2~3 代时, 消化后收集细胞悬液, 按 0.5×10^9 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 接种于 24 孔板。根据加药处理的不同, 将 RCECs 随机分为 5 组: 对照组 (RCECs 不做加药处理)、4 种不同浓度 BK 组 (分别采用终浓度为 0.01、0.10、1.00、10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 溶液处理细胞)。倒置相差显微镜下动态观察不同浓度 BK 组及对照组在不同时间点 (0 h、24 h、48 h、72 h、96 h) 细胞生长的生物学形态变化, 并采集图像。

1.2.3 MTT 检测 将 RCECs 按每孔 10×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 待细胞生长至 70%~80% 融合时采用无血清培养基静置 24 h, 换含 4 种不同浓度的 BK 培养基培养, 每个实验组设 5 个复孔, 同时设置 5 个复孔为空白对照。各组铺 4 块 96 孔板, 分别在处理 24 h、48 h、72 h、96 h 每孔加入 20 μL 终浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液, 行 MTT 染色。采用 Bio-Rad 酶标仪分析并记录 490 nm 处的吸光度 (A) 值。

1.2.4 Western blot 检测 ZO-1 和 ZONAB 蛋白的表达 收集 72 h 时各组细胞, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化后放入离心管, 做好标记, 采用冰预冷 PBS 洗涤细胞一次, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 弃上清液, 加入 2 mL 细胞培养液, 轻轻吹打制成细胞悬液。ZO-1 全蛋白的提取与 ZONAB 核蛋白的提取分别参照南京凯基全蛋白与核蛋白提取试剂盒的步骤进行操作, 并按照考马斯亮蓝法 (BCA 蛋白定量试剂盒) 进行蛋白定量检测。对蛋白质提取物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜, 体积分数 5% 脱脂牛奶封闭过夜。将膜分别放于含有 1:500 的抗 ZO-1 抗体、1:1000 的抗 ZONAB 抗体及 1:1000 的内参

抗体 β -actin 一抗中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗 4 次,每次 5 min。将膜置于 10 mL 含 HRP 标记的二抗 (Proteintech) (1 : 6000) 中,室温下摇床振荡孵育 1 h,TBST 摇洗 3 次,每次 15 min。用 ECL 试剂盒暗室内曝光,观察并记录结果。以 β -actin 为内参,采用 Quantity One 专业灰度分析软件将图片上每个特异性条带灰度值数字化并计算相对灰度值。以目的蛋白 A 值/内参照 A 值的比值表示所测目标蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 应用统计学软件 SPSS 17.0 进行数据处理。数据以均数 \pm 标准差表示,各组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BK 对 RCECs 细胞形态的影响 加药 72 h,各组细胞已完全贴壁,融合成片,倒置显微镜下可见细胞呈多边形,细胞间紧密连接形成良好的单层。加药 96 h,各组细胞形态发生改变,大小不一,形态不规则,呈梭形、长条形改变,细胞间隙变大,随时间延长生长明显受限,凋亡明显增多。不同浓度 BK 组与对照组相比,细胞形态无明显差别,细胞贴壁融合成片,紧密连接成单层,生长活跃;当 BK 浓度升高至 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞生长开始受限,细胞间隙变大,脱落细胞增多,细胞透光性变差 (图 1-图 2)。

图 1 RCECs 体外培养 96 h 的细胞形态 ($\times 100$)。A:对照组;B: $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;C: $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;D: $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;E: $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组。图 2 RCECs 体外培养 96 h 的细胞形态 ($\times 100$)。A:对照组;B: $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;C: $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;D: $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组;E: $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组

2.2 BK 对 RCECs 细胞 A 值及增殖活力的影响

MTT 检测结果显示,与对照组比较, $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 处理 24 h 细胞的 A 值差异无统计学意义 ($P = 0.382$);余各 BK 组与对照组相比,同一时间点 (24 h、48 h、72 h、96 h) A 值差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.001$);其中,24 h 与 48 h 各 BK 组的 A 值随 BK 浓度增加呈不断上升趋势,72 h 与 96 h A 值在 $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组达最高值, $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处 BK 组 A 值反而降低。当 BK 浓度超过 $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞的 A 值在 72 h 达最高值,至 96 h A 值反而呈下降趋势。以上表明,BK 体外刺激后细胞 A 值升高,且增殖活力增强,具有浓度和时间依赖性 (表 1)。

2.3 BK 上调 RCECs 紧密连接处 ZO-1 蛋白的表达 细胞培养 72 h 时各组 RCECs 细胞紧密连接处均存在 ZO-1 蛋白的表达。与对照组相比,除 $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 组外,其他各组 ZO-1 蛋白表达量明显上调,差异均具有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); $0.10 \sim 10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 处理后,ZO-1 蛋白表达量随 BK 浓度升高而增加,呈现出一定的浓度依赖性 (图 3)。

图 3 不同浓度 BK 处理 72 h,ZO-1 蛋白表达变化。与对照组比较,* $P < 0.05$

2.4 BK 上调 RCECs 核内 ZONAB 蛋白的表达

细胞培养 72 h 各组 RCECs 细胞均存在 ZONAB 蛋白的表达。与对照组相比,各 BK 组 ZONAB 蛋白的表达均明显上调,差异均具有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); $0.10 \sim 1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 处理后,ZONAB 蛋白的表达随 BK 浓度升高而增强,以 $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 作用最为显著,亦呈现出一定的浓度依赖性;而 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BK 处理后,BK 促进 ZONAB 蛋白表达的作用反而减弱 (图 4)。

表 1 不同时间点、不同浓度 BK 组 RCECs 细胞的 A 值

($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 加药处理后的 A 值 | | | |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 对照组 | 0.130 2 ± 0.014 8 | 0.168 4 ± 0.017 1 | 0.295 8 ± 0.019 1 | 0.340 1 ± 0.025 5 |
| 0.01 μmol · L ⁻¹ BK 组 | 0.164 0 ± 0.022 2 | 0.250 4 ± 0.017 9 * | 0.396 0 ± 0.022 5 * | 0.429 3 ± 0.021 8 * |
| 0.10 μmol · L ⁻¹ BK 组 | 0.275 6 ± 0.031 8 * | 0.349 9 ± 0.025 4 * | 0.511 8 ± 0.029 1 * | 0.496 7 ± 0.022 9 * |
| 1.00 μmol · L ⁻¹ BK 组 | 0.363 5 ± 0.026 4 * | 0.504 1 ± 0.026 3 * | 0.675 4 ± 0.024 8 * | 0.634 5 ± 0.018 4 * |
| 10.00 μmol · L ⁻¹ BK 组 | 0.445 9 ± 0.021 9 * | 0.508 4 ± 0.022 7 * | 0.625 4 ± 0.025 9 * | 0.568 9 ± 0.015 5 * |

注:与对照组比较,* P < 0.001

图 4 不同浓度 BK 处理 72 h,核内 ZONAB 蛋白表达变化。与对照组比较,* P < 0.05

3 讨论

BK 是激肽释放酶-激肽系统的一员,由相对分子质量较高的激肽原在血浆激肽释放酶作用下形成,主要分布于局部组织(血液中含量较少),并以旁分泌和自分泌的方式发挥作用^[10]。BK 依赖于 B1 和 B2 两种受体,在高血压、慢性疼痛、炎症与血-脑屏障通透性调控等病理生理过程中起重要作用^[3]。在兔与人的角膜组织,有学者证实了 B1 受体与 B2 受体的存在^[11-12]。眼内的 BK 主要由泪液中所含激肽释放酶作用于激肽原而产生,各种外界刺激(如过敏原、风媒传播病原体、紫外线等)也可诱发结膜组织中肥大细胞释放组胺、血小板活化因子与 BK 等,介导眼球局部的过敏反应与角膜的慢性炎症^[13]。

体外研究证实,BK 还能促进多种角膜细胞的增殖。前期研究发现,BK(0.10 nmol · L⁻¹ ~ 10.00 μmol · L⁻¹)浓度依赖性地促进角膜上皮细胞增殖及 DNA 合成、钙离子内流、基质金属蛋白酶-1 和前列腺素 E2 的释放^[4];0.01 ~ 10.00 μmol · L⁻¹范围的 BK 还能促进犬角膜成纤维细胞及基质细胞的增殖,其效应亦与浓度呈正相关,并可能与表皮生长因子受体有关^[5-6];另有学者发现,0.01 μmol · L⁻¹ BK 还可刺激牛 CECs 的增殖,促进细胞有丝分裂过程^[7]。本研究利用 0.01 ~ 10.00 μmol · L⁻¹ BK 对 RCECs 进行体外刺激,发现 BK 可促进细胞的增殖,并具有一定的浓度与时间依赖性:中低浓度(0.01 ~ 1.00 μmol · L⁻¹)BK 处理后细胞贴壁融合,紧密连成单层,增殖活力增强,而随着 BK 浓度升高(10.00 μmol · L⁻¹)及培养时间的延长(96 h 以上),细胞间隙变大,脱落细胞增多,增殖活力反而受限。

然而,BK 促进角膜细胞增殖的具体作用机制仍然不明。近年来研究发现,位于细胞间紧密连接的 ZO-1/ZONAB 信号通路可能是介导细胞增殖的重要途径。ZO-1 是紧密连接的主要跨膜蛋白,而 ZONAB 作为一种 Y-box 转录抑制因子,主要穿梭于细胞间紧密连接与细胞核之间,ZONAB 通过与 ZO-1 中 Src 同源区 3 结构域结合,使 ZONAB 局限于细胞质,抑制 ZONAB 及下游效应基因的核内转录进而抑制细胞的增殖,而当 ZONAB 处于游离状态时,位于核内的 ZONAB 则促进相关基因表达和细胞增殖^[14]。ZO-1 与 ZONAB 相互作用,并受到众多因子的调控,构成 ZO-1/ZONAB 信号通路^[15-16],参与肾小管、视网膜、角膜等多种组织细胞的增殖与分化过程^[8-9,17-18]。通过转基因小鼠过表达 ZONAB 可增加 MDCK 细胞的生长密度,而 ZONAB 被抑制则降低细胞生长密度^[17];ZONAB 过表达与 ZO-1 低表达还能增加视网膜色素上皮细胞 5-溴脱氧尿嘧啶核苷阳性细胞的数量和比例,表明其细胞增殖促进作用^[8];在人 CECs,慢病毒转染 ZO-1 诱导 ZO-1 的低表达,60 岁人群 CECs 密度 1 周后增加 50%,提示 ZO-1 低表达可促进体外人 CECs 的增殖^[9];在 II 型肺泡上皮细胞,ZONAB 高表达显著促进细胞的增殖并抑制其转分化,而 ZONAB 低表达时细胞增殖减少,转分化增多^[18]。本研究通过 RCECs 体外模型发现 BK 不但促进核内 ZONAB 蛋白的表达,同时上调紧密连接处 ZO-1 蛋白的表达。BK 作用后,ZONAB 与 ZO-1 蛋白的表达均增强,激活下游促增殖基因的转录进而促进细胞的增殖。

综上所述,BK 体外刺激可促进 RCECs 细胞的增殖,同时上调紧密连接处 ZO-1 与核内 ZONAB 蛋白的表达,表明 ZO-1/ZONAB 信号通路可能在 BK 介导的 RCECs 增殖过程中起重要作用,为角膜再生提供了新的研究思路和药物治疗靶点。

参考文献

- [1] BOURNE WM, NELSON LR, HODGE DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(3): 779-782.
- [2] SAXENA R, BOEKHOORN SS, MULDER PG, NOORDZIJ B, VAN RIJ G, LUYTEN GP. Long-term follow-up of endothelial cell change after Artisan phakic intraocular lens implantation [J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(4): 608-613.
- [3] HALL JM. Bradykinin receptors: Pharmacological properties and biological roles[J]. *Pharmacol Ther*, 1992, 56(2): 131-

190.

[4] WIERNAS TK, DAVIS TL, GRIFFIN BW, SHARIF NA. Effects of bradykinin on signal transduction, cell proliferation, and cytokine, prostaglandin E2 and collagenase-1 release from human corneal epithelial cells[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 123(6):1127-1137.

[5] CHENG CY, HUANG SC, HSIAO LD, SUN CC, JOU MJ, YANG CM, et al. Bradykinin-stimulated p42/p44 MAPK activation associated with cell proliferation in corneal keratocytes[J]. *Cell Signal*, 2004, 16(5):535-549.

[6] CHENG CY, TSENG HC, YANG CM. Bradykinin-mediated cell proliferation depends on transactivation of EGF receptor in corneal fibroblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4):1367-1381.

[7] YANG SW, LEE WK, LEE EJ, KIM KY, LIM Y, LEE KH, et al. Effect of bradykinin on cultured bovine corneal endothelial cells[J]. *Ophthalmologica*, 2001, 215(4):303-308.

[8] GEORGIADIS A, TSCHMUTTER M, BAINBRIDGE JW, BALAGGAN KS, MOWAT F, WEST EL, et al. The tight junction associated signaling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e15730.

[9] KAMPIK D, BASCHE M, GEORGIADIS A. Lentivirus mediated interference with the zo-1/zonab pathway induces cell cycle progression in human corneal endothelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(14):6004.

[10] VAUGHAN DE. Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis[J]. *Am J Cardiol*, 2001, 87(8A):18C-24C.

[11] MA JX, SONG Q, HATCHER HC, CROUCH RK, CHAO L, CHAO J. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues[J]. *Exp Eye Res*, 1996, 63(1):19-26.

[12] KUANETSOVA TP, CHESNOKOVA NB, PASKHINA TS. Activity of tissue and plasma kallikrein and level of their precursors in eye tissue structures and media of healthy rabbits[J]. *Vopr Med Khim*, 1991, 37(4):79-82.

[13] PROUD D, SWEET J, STEIN P, SETTIPANE RA, KAGEY-SOBOTKA A, FRIEDLAENDER MH, et al. Inflammatory mediator release on conjunctival provocation of allergic subjects with allergen[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85(5):896-905.

[14] POZZI A, ZENT R. ZO-1 and ZONAB interact to regulate proximal tubular cell differentiation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3):388-390.

[15] TERRY S, NIE M, MATTER K, BALDA MS. Rho signaling and tight junction functions[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2010, 25(1):16-26.

[16] HE LX, TAN G. The ZO-1/ZONAB signaling pathways and cell proliferation and differentiation[J]. *Chin J Cell Biol*, 2017, 39(1):128-134.

贺李娜, 谭钢. ZO-1/ZONAB 信号通路 with 细胞的增殖分化[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(1):128-134.

[17] BALDA MS, GARRETT MD, MATTER K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density[J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(3):423-432.

[18] HOU AN. Study on the regulatory effect of ZONAB on proliferation and transdifferentiation of alveolar epithelial cells in bronchopulmonary[D]. Shenyang: China Medical University, 2014.

侯阿娜. 气管肺发育不良模型中 ZONAB 调节肺泡上皮细胞增殖及转分化的研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2014.

关于我刊文后参考文献引用和著录新标准的说明

为了正确执行国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献参考文献著录规则》，自 2016 年 1 月起，我刊文后参考文献的引用和著录执行以下新标准。

1 不同文献类型的引用和著录格式

1.1 阅读型参考文献 (reading reference) 著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源，或供读者进一步阅读的信息资源。著录时需要标注文章的起始页。

1.2 引文参考文献 (cited reference) 著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。页码只需著录引用信息所在页。

著录格式示例如下：

阅读型参考文献：邵毅，余静，余瑶，高桂平，杨继玲，裴重刚，等. 无缝线骨髓间充质干细胞羊膜移植预防角膜缘干细胞缺乏的实验研究[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(11):1011-1015.

SHAO Y, YU J, YU Y, GAO GP, YANG JL, PEI ZG, et al. Novel sutureless bone marrow mesenchymal stem cells with amniotic membrane transplantation for corneal limbus stem cells defect in rabbit model[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2013, 33(11):1011-1015.

引文参考文献：杨秀梅，王雨生. MEK/ERK 参与大鼠脉络膜新生血管基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达调控[J]. *眼科新进展*, 2015, 25(6):504.

YANG XM, WANG YS. Contribution of MEK/ERK pathway

in regulation of MMP-2 and MMP-9 expression in rat choroidal neovascularization[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 25(6):504.

2 著者的著录新规则

著者的著录时要求其姓全部著录，字母全大写，名可缩写为首字母，缩写名后省略缩写点。

著录格式示例如下：

[1] COOKE CA, LUM DJ, WHEELDON CE, TEOH H, MCGHEE CN. Surgical approach, histopathology, and pathogenesis in cataract associated with true lens exfoliation[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2007, 33(4):735-738.

3 标识符号

论文正文和文献表中的序号均要使用“[]”括起，正文中连续序号和文献表中连续页码间用短横线连接。

需要注意的是，国家新标准新增了 4 个文献类型及其标识：(1) 档案, A: 分类保存以备查考的文件和材料，如人事档案、科技档案、法律法规、政府文件等。(2) 舆图, CM: 世界、国家、区域的地图。(3) 数据集, DS: 一种由数据所组成的集合，又称为资料集、数据集合或资料集合。(4) 其他, Z: 凡是归不进前面 15 个类型的文献，均可放到“Z”中。

本刊编辑部