

【实验研究】

梁秀玮 何梦梅 蔡雯婷 张瑞玲 金惠子 范佳淇 于靖

【中图分类号】 R774

【摘要】 目的 制作增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 的上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 细胞模型, 研究缓激肽 (bradykinin, BK) 对视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞发生 EMT 的影响, 并探讨 BK 对 PVR 的影响机制。**方法** 体外培养人 RPE 细胞株 ARPE-19 细胞, 采用不同浓度转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 分别作用于 ARPE-19 细胞 24 h、48 h, 于倒置显微镜下观察细胞形态变化; 采用 CCK-8 检测细胞增殖情况, 确定 TGF- $\beta 1$ 浓度及作用时间; 利用 Western blot 和细胞免疫荧光检测 EMT 标志蛋白 E-钙黏素、 α -平滑肌肌动蛋白波形蛋白 (Vimentin) 表达情况; 细胞划痕实验、Transwell 实验检测细胞迁移能力。同时采用 pSmad3 和 Smad7 的表达。**结果** TGF- $\beta 1$ 刺激 ARPE-19 细胞后可以成功诱导 EMT 体 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、作用时间为 48 h 时, 细胞增殖最明显。BK 在 TGF- $\beta 1$ 诱导的 EMT 中可以降低 α -素的表达并且降低细胞迁移能力。这些影响能被 BK-2 受体拮抗剂 HOE-140 逆转。TGF- $\beta 1$ 刺激后 pSmad3 表达量升高; TGF- $\beta 1$ 刺激前给予 BK 刺激, pSmad3 表达量减少; 加入 BK 前预敷 HOE-140 减弱, pSmad3 表达量升高。Smad7 表达趋势与 pSmad3 表达趋势相反。**结论** $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BK 通过 TGF- β /Smad 信号通路上调 Smad 7 的表达、下调 pSmad 3 的表达, 从而逆转是一种新的、有效的治疗 PVR 的方法。

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是增生型糖尿病视网膜病变、孔源性视网膜脱离、眼穿孔伤和眼内手术等的严重并发症,其基本病理生理过程是血-视网膜屏障破坏。PVR 的主要病理生理机制是通过上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 将视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞转化为间充质细胞^[1]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 在 PVR 的发病机制中起到至关重要的作用, TGF- β 诱导的 EMT 已经在大部分上皮类型细胞中得到验证^[2]。研究发现, 在 PVR 患者玻璃体中和 PVR 实验模型中, TGF- β 的表达和 PVR 的严重程度呈正相关^[3], 阻断 TGF- β 信号通路可以抑制体内外 RPE 细胞发生 EMT^[4-5]。Yu 等^[6] 研究发现, 补体和凝血级联是 PVR 病理过程中最重要的 KEGG 通路。而这个级联由激肽释放酶-激肽系统 (kallikrein-kinin system, KKS)、凝血系统和补体系统三部分组成, 其中 KKS 主要由激肽释放酶、激肽原、激肽、缓激肽 1 受体及缓激肽 2 受体 (bradykinin 1 receptor, B1R/bradykinin 2 receptor, B2R) 和激肽酶等组成。激肽主要有缓激肽 (bradykinin, BK)、胰激肽 (kallidin, KD) 等, KD 在酶的作用下可以转化为 BK。生理条件下 KKS 最终发挥效应的血管活性物质 BK 主要是激肽类物质, BK 在严重 PVR 大鼠视网膜中的表达明显增加^[7], 因此推测 KKS 通过效应分子 BK 作用, 调节 KKS、凝血系统和补体系统, 最终通过 KEGG 通路引发 PVR。本研究拟通过观察 BK 对 TGF- β 1 诱导的 RPE 细胞 EMT 的作用, 进一步揭示 PVR 的发病机制, 阐明 BK 对 PVR 的作用, 为临床治疗 PVR 提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 ARPE-19 细胞 (iCell Bioscience 公司), DMEM-H 培养液和胎牛血清 (Gibco 公司), 倒置显微镜 (OLYMPUS IX70), 酶标仪 (BioTek 公司), CCK-8 细胞增殖试剂盒 (上海锐赛生物), E-钙黏素抗体 (GeneTex 公司), BK、HOE-140、GAPDH 抗体 (Sigma 公司), α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体、Viminten 抗体、Smad7 抗体、p-Smad3 抗体 (Bioworld 公司), Transwell 小室 (Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取出冻存的 ARPE-19 细胞, 37 °C 水浴, 快速摇晃, 直至冻存液完全融化, 移入 15 mL 离心管, 1000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 吸出冻存液, 缓慢加入 5 mL 完全培养液, 用培养液混悬沉淀细胞, 调整细胞浓度, 置于含体积分数 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养。每 2 d 按 1:2 的比例进行传代, 隔天换液。于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.2 CCK-8 检测 ARPE-19 细胞的增殖 将对数

生长期的细胞消化计数, 细胞悬液以每孔 5000 个 (100 μ L) 的密度铺入 96 孔板中。待细胞融合至约 50% 更换无血清 DMEM/H 培养液饥饿 12 h 后给予不同浓度的 TGF- β 1 (0 μ g \cdot L⁻¹、0.1 μ g \cdot L⁻¹、0.5 μ g \cdot L⁻¹、2.5 μ g \cdot L⁻¹、10.0 μ g \cdot L⁻¹、12.5 μ g \cdot L⁻¹) 刺激细胞, 分别作用 24 h、48 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续将培养板在培养箱内孵育 4 h。酶标仪测定 450 nm 下的吸光度值 (A 值), 实验重复 3 次取均值。

1.2.3 细胞形态学观察 将 ARPE-19 细胞以每孔 500 \times 10³ 个接种于 6 孔培养板, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞融合至 50% ~ 70% 加无血清 DMEM/H 培养液饥饿 12 h。将实验对象分为 6 组, 分别为 DMEM/H 培养液 (对照组)、BK 组 (100 nmol \cdot L⁻¹ BK)、TGF- β 1 组 (10 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 1)、TGF- β 1 + BK 组 (10 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 1 + 100 nmol \cdot L⁻¹ BK)、TGF- β 1 + HOE140 组 (10 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 1 + 10 μ mol \cdot L⁻¹ HOE140) 和 TGF- β 1 + BK + HOE140 组 (10 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 1 + 100 nmol \cdot L⁻¹ BK + 10 μ mol \cdot L⁻¹ HOE140)。加药顺序为 HOE-140 加入 1 h 后加入 BK, BK 加入 0.5 h 后给予 TGF- β 1 处理。按组别分别给予不同药物刺激细胞, 48 h 后于倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot 分析 取不同组别的 ARPE-19 细胞加入蛋白裂解液, 30 min 后离心 (12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min), 酶标仪定量后电泳分离, 再转入硝酸纤维素膜, 室温封闭 1 h。分别加入一抗 (兔抗 E-钙黏素抗体、小鼠抗 α -SMA 抗体和 Viminten 抗体, 1:1000) 湿盒内 4 °C 过夜, 加入二抗, 37 °C 下孵育 1 h, PBST 室温摇床上洗 3 次, 每次 10 min, 上机扫描, 观察结果。所有实验重复 3 次。

1.2.5 细胞免疫荧光分析 取不同组别的 ARPE-19 细胞, 40 g \cdot L⁻¹ 多聚甲醛 4 °C 固定, PBS 漂洗, 50 g \cdot L⁻¹ BSA 室温封闭 30 min, 分别加入一抗 (兔抗 E-钙黏素抗体、小鼠抗 α -SMA 抗体和 Viminten 抗体), 37 °C 孵育 1 h, 4 °C 冰箱中过夜。PBS 洗 3 遍, 孵育二抗 2 h, PBS 洗 3 遍, 染核 (DAPI, 1:200), 体积分数 10% 甘油封片后共聚焦显微镜下观察, 实验重复 3 次。

1.2.6 细胞划痕实验 用 marker 笔在 6 孔板背后用直尺比着均匀划横线, 每隔 0.5 ~ 1.0 cm 划一道, 横穿过孔。每孔划 5 条线。用枪头比着直尺, 垂至于六孔板背后的横线划痕。用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 于倒置显微镜下观察并拍照, 做好记录。将细胞放入 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 培养箱培养, 24 h 后再次于倒置显微镜下观察拍照。利用 Image J 软件测量每孔多个点划痕间距, 24 h 时测量的划痕间距减去处理前的划痕间距即为 24 h 细胞迁移距离。实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 细胞迁移实验 将小室放入培养

板中,上室加入 300 μL 预温的无血清培养基,室温下静置 15 ~ 30 min,使基质胶再水化。再吸去剩余培养液。调整细胞密度为 10^9 个 $\cdot \text{L}^{-1}$,取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 上室,取 500 μL 含体积分数 5% FBS 的培养基加入 Transwell 下室,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 18 h 后进行结果统计。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据采用均数 \pm 标准差表示,组间均数比较采用单因素方差分析。所有数据均为 3 次实验后取得的平均值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMT 体外细胞模型建立 不同浓度 TGF- β 1 分别作用于 ARPE-19 细胞 24 h、48 h 后,A 值较对照组(0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1)有所提高,当 TGF- β 1 为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,作用 24 h、48 h 差异均有统计学意义。48 h 时,细胞增殖较 24 h 时更明显,且当 TGF- β 1 浓度为 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖最明显。用 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1 处理 ARPE-19 细胞 48 h 后,ARPE-19 细胞形态发生了明显改变,细胞形态逐渐从典型的鹅卵石样转变为长梭形的间充质样细胞。此外还发现不同浓度 TGF- β 1 刺激 48 h 后,E-钙黏素表达量较对照组明显减少($P < 0.05$),且随着 TGF- β 1 浓度的增加,E-钙黏素表达量逐渐减少(图 1)。所以,用 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1 处理 ARPE-19 细胞 48 h 可以成功诱导 EMT 体外细胞模型。

2.2 BK 对 TGF- β 1 诱导 ARPE-19 细胞发生 EMT 的影响 BK + TGF- β 1 组可阻止 TGF- β 1 诱导的 EMT,长梭形的间充质细胞数量明显减少。而 BK + TGF- β 1 + HOE-140 组则减弱了 BK 的作用,细胞的间充质样转化明显增强。Western blot 分析显示,与

TGF- β 1 组相比,BK + TGF- β 1 组 E-钙黏素蛋白表达升高, α -SMA 和 Viminten 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与 BK + TGF- β 1 组相比,加入 BK 前预敷 HOE-140,然后给予 TGF- β 1 刺激,BK 作用减弱, α -SMA 和 Viminten 表达量增加($P < 0.05$;见图 2)。免疫荧光结果显示(图 3),BK 可以阻止 TGF- β 1 的作用,使 E-钙黏素表达增加, α -SMA 和 Viminten 表达下降;而加入 BK 前预敷 HOE-140,然后给予 TGF- β 1 刺激,BK 作用减弱,E-钙黏素表达下降, α -SMA 和 Viminten 表达增加。此外,在 BK + TGF- β 1 组中 BK 可抑制 TGF- β 1 增强的 ARPE-19 细胞迁移,而 BK + TGF- β 1 + HOE-140 组的细胞迁移能力较 BK + TGF- β 1 组增强(图 4)。结果提示,BK 可以逆转 TGF- β 1 的作用,阻止 TGF- β 1 诱导的 ARPE-19 细胞发生 EMT。

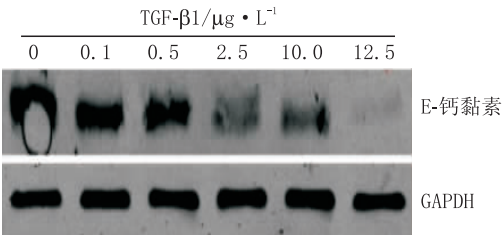


图1 TGF- β 1 诱导 ARPE-19 细胞发生 EMT 时 E-钙黏素蛋白表达结果

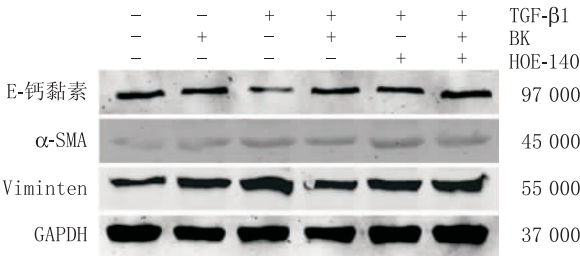


图2 BK 及其受体拮抗剂 HOE-140 对 EMT 标志蛋白表达的影响

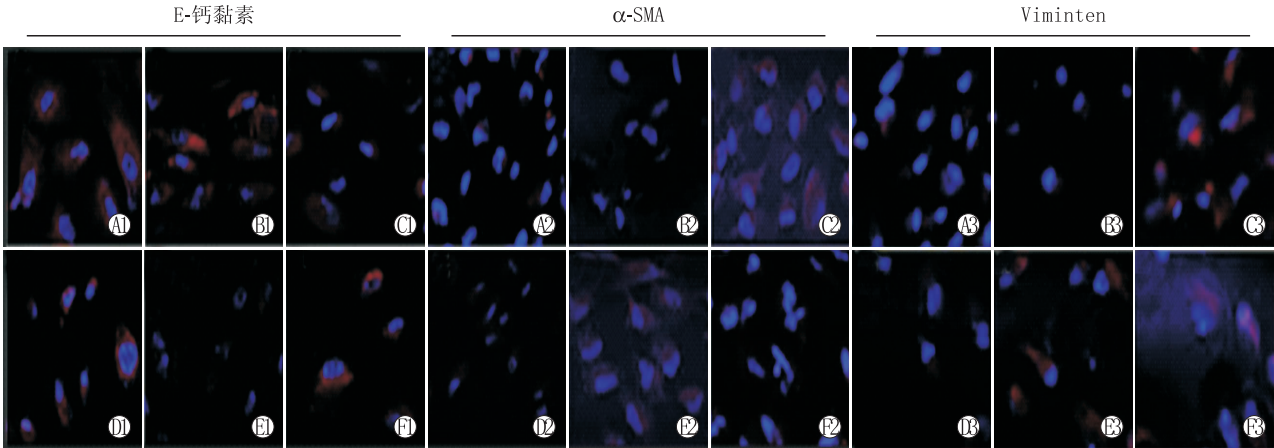


图3 细胞免疫荧光检测 BK 分别对 E-钙黏素蛋白、 α -SMA 蛋白和 Viminten 蛋白表达的影响(200 \times)。图中 A、B、C、D、E、F 分别对应对照组、BK 组、TGF- β 1 组、TGF- β 1 + BK 组、TGF- β 1 + HOE140 组和 TGF- β 1 + BK + HOE140 组

2.3 BK 对 EMT 信号通路下游因子的影响 Western blot 结果分析显示(图 5),与 TGF-β1 组相比, BK + TGF-β1 组 pSmad3 表达减少($P < 0.001$), Smad7 表达升高。与 BK + TGF-β 组相比, BK + TGF-

β1 + HOE-140 组则逆转 pSmad 3 和 Smad 7 的表达水平。结果表明, BK 通过 TGF-β/Smad 通路下调 pSmad3 表达、上调 Smad7 表达,从而逆转 TGF-β1 诱导产生的 EMT。

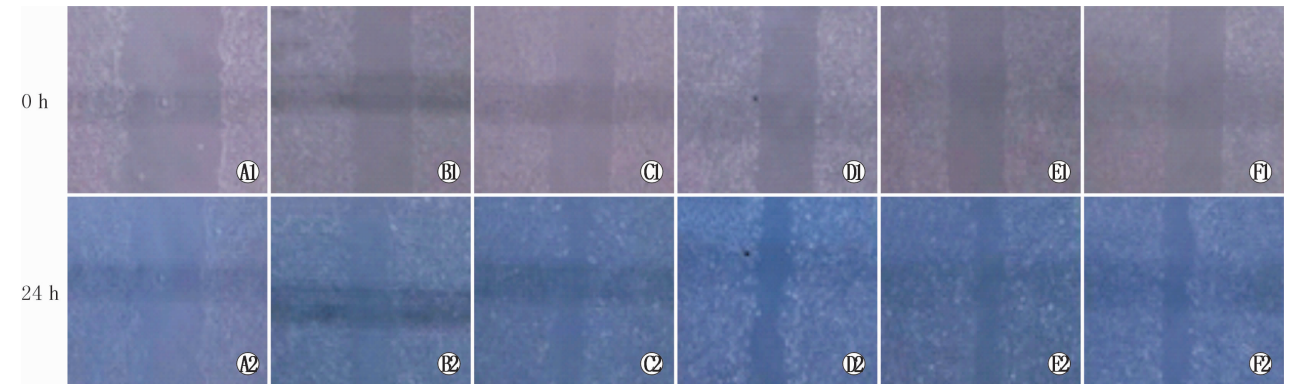


图 4 ARPE-19 细胞在 0 h 和 24 h 后划痕边缘细胞的迁移(×50)。图中 A、B、C、D、E、F 分别对应对照组、BK 组、TGF-β1 组、TGF-β1 + BK 组、TGF-β1 + HOE140 组和 TGF-β1 + BK + HOE140 组

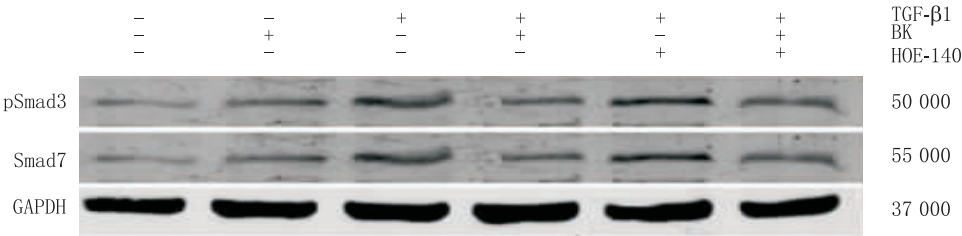


图 5 Western blot 检测 BK 对 ARPE-19 细胞 EMT 通路中 pSmad3 和 Smad7 表达的影响

3 讨论

PVR 通常被认为是由 RPE 细胞中的 EMT 驱动的纤维化过程,引起视网膜的牵引并导致手术失败^[8]。EMT 广泛发生于肾间质纤维化中^[9]和肝纤维症^[10]患者。在哺乳动物中,TGF 可分为 3 种亚型:TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,TGF-β1 是介导肿瘤细胞转化的主要细胞因子。TGF-β1 诱导的 RPE 细胞的 EMT 模型是公认的研究 EMT 潜在机制的经典模型^[11-12],然而 TGF-β1 处理的最佳浓度和时间可能有所不同^[13-14]。本研究用不同浓度的 TGF-β1 处理 ARPE-19 细胞 24 h 和 48 h,观察到 10.0 μg · L⁻¹ TGF-β1 可导致 ARPE-19 细胞的 EMT。TGF-β1 处理 48 h 后,细胞形态发生明显变化,与 24 h 相比差异更大。这一结果与 Yang 等^[14]的结果一致。细胞接触完整性是 TGF-β1 诱导的上皮-肌成纤维细胞转化的重要调节因子^[15]。而 E-钙黏素是细胞间黏附连接的主要成分,提示 E-钙黏素可能参与 TGF-β1 诱导的 EMT。E-钙黏素在正常的 ARPE-19 细胞中有高表达^[16],当 E-钙黏素的转录受到抑制时,它可能影响上皮细胞之间的黏附并最终导致 EMT。因此,E-钙黏素的减少是上皮细胞 EMT 的一个标志。本研

究采用 Western blot 检测发现,随着 TGF-β1 浓度的增加,E-钙黏素蛋白的表达水平逐渐降低。结果表明,TGF-β1 诱导的 EMT 细胞模型在体外可以成功建立。

目前尚无安全有效的临床药物作为 PVR 的常规治疗方法^[17],抗炎治疗可能是 PVR 的一个潜在研究方向。补体和凝血级联是 PVR 病理过程中最重要的 KEGG 通路,KKS 是连接补体通路和凝血通路的中间过程^[15],在炎症中起着重要作用。在 KKS 系统中,血浆激酶将高相对分子质量的激肽原转化为 BK 和赖氨酸缓激肽,而组织激酶则在酶的作用下将低相对分子质量的激肽原转化为赖氨酸缓激肽,转化为 BK。BK 氨基酸序列为 Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg,其通过自分泌-旁分泌机制释放,与组织器官中的激肽受体结合后发挥一系列复杂的生理效应^[18]。BK 受体分为 B1R 和 B2R,BK 介导的生物学反应主要是与 B2R 作用产生的。B2R 由多种细胞类型表达,包括心肌细胞、疼痛敏感的神经元、血管内皮细胞、平滑肌细胞等^[19]。为探讨 BK 对 PVR 是否有类似作用,本研究采用 BK 刺激体外细胞模型,观察 BK 对 PVR 模型的影响。结果表明, BK 对 TGF-β1 诱导的 EMT 蛋白表达水平有影响,并

可逆转 EMT。为了进一步确定 BK 是否影响 TGF-β1 诱导的 EMT 迁移,本研究采用细胞划痕愈合实验和 Transwell 细胞迁移实验,结果表明, BK 可抑制 ARPE-19 细胞的迁移。加入 HOE-140,细胞迁移能力增强。

在 RPE 细胞发生 EMT 的过程中, TGF-β/Smad 通路是主要的作用途径^[20]。 TGF-β 结合在跨膜的 TGF-β II 型受体 TGFR2 上, 然后与 TGF-β I 型受体 TGFR1 形成紧密连接的复合体, 导致 Smad2 和 Smad3 磷酸化激活, 并与 Smad4 形成三聚体, 转运到细胞核, 进一步调控 TGF-β 反应基因的转录^[21]。 尽管这一过程中 pSmad2 和 pSmad3 的功能都被肯定, 但近期研究发现, TGF-β 主要的靶基因都是 pSmad3 依赖的转录调控, 没有 Smad3 的激活, TGF-β 将不会诱导 RPE 细胞发生 EMT^[22]。 在 EMT 相关的晶状体损伤模型和 PVR 模型中, 敲除小鼠 Smad3 基因可以有效地抑制上皮细胞发生间充质转化^[23]。 抑制性的 Smad 蛋白 Smad7 可以负向调控 Smad2/3, 其过表达将抑制 RPE 细胞发生 EMT^[24]。 上调 BK-B2R 通路可调节 TGF-β/Smad 信号级联, 减少肾纤维化^[23]。 然而, BK 在 RPE 细胞中的作用尚不清楚。 在本研究中, BK 降低了 pSmad3 的表达水平, 提高了 Smad7 的表达水平, 防护性改变被 HOE-140 逆转。 然而, 目前的结果仅在体外得到验证, 是否在体内观察到同样的结论还需要进一步研究。

本研究结果提示, BK 通过 TGF-β/Smad 信号通路参与了 TGF-β1 介导的 ARPE-19 细胞的 EMT 进程。 这些发现可能会为未来预防或治疗 PVR 提供一种临床治疗策略。

参考文献

[1] TOSI G M, MARIGLIANI D, ROMEO N, TOTI P. Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge [J]. *Cell Physiol*, 2014, 229 (11): 1577-1583.

[2] MOUSTAKAS A, PARDALI K, GAAL A, HELDIN C H. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation [J]. *Immunol Lett*, 2002, 82 (1-2): 85-91.

[3] HOERSTER R, MUETHER P S, VIERKOTTEN S, HERMANN M M, KIRCHHOF B, FAUSER S. Upregulation of TGF-β1 in experimental proliferative vitreoretinopathy is accompanied by epithelial to mesenchymal transition [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252 (1): 11-16.

[4] LIANG C M, TAI M C, CHANG Y H, CHEN Y H, CHEN C L, LU D W, et al. Glucosamine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of retinal pigment epithelial cells in culture and morphologic changes in a mouse model of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89 (6): e505-514.

[5] NASSAR K, GRISANTI S, TURA A, LÜKE J, LÜKE M, SOLIMAN M, et al. A TGF-beta receptor 1 inhibitor for prevention of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123 (1): 72-86.

[6] YU J, PENG R, CHEN H, CUI C, BA J. Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (13): 8146-8153.

[7] ZHAO H M, YU J, SHENG M J. Experimental study on the role of kininogen-kinin system in the formation of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29 (7): 591-595.

[8] SAIKA S, YAMANAKA O, OKADA Y, TANAKA S, MIYAMOTO T, SUMIOKA T, et al. TGF-β in fibroproliferative diseases in the eye [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, 1: 376-390.

[9] BAI Y, LU H, LIN C, XU Y, HU D, LIANG Y, et al. Sonic hedgehog-mediated epithelial-mesenchymal transition in renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37 (5): 1317-1327.

[10] ZHAO Y L, ZHU R T, SUN Y L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4 (3): 269-274.

[11] DVASHI Z, GOLDBERG M, ADIR O, SHAPIRA M, POLLACK A. TGF-beta1 induced transdifferentiation of RPE cells is mediated by TAK1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0122229.

[12] SAIKA S, KONO-SAIKA S, TANAKA T, YAMANAKA O, OHNISHI Y, SATO M, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice [J]. *Lab Invest*, 2004, 84 (10): 1245-1258.

[13] KOECK S, AMANN A, HUBER J M, GAMERITH G, HILBE W, ZWIERZINA H. The impact of metformin and salinomycin on transforming growth factor β-induced epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11 (4): 2946-2952.

[14] YANG S, YAO H, LI M, LI H, WANG F. Long non-coding RNA MALAT1 mediates transforming growth factor beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0152687.

[15] MASSZI A, FAN L, ROSIVALL L, MCCULLOCH C A, ROTSTEIN O D, MUCSI I, et al. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1 induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165 (6): 1955-1967.

[16] PALMA-NICOLÁS J P, LÁPEZ-COLOMÉ A M. Thrombin induces slug-mediated E-cadherin transcriptional repression and the parallel up-regulation of N-cadherin by a transcription-independent mechanism in RPE cells [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228 (3): 581-589.

[17] PRIGLINGER C S, PRIGLINGER S. Pharmacological approach to treatment of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Ophthalmology*, 2013, 110 (10): 948-959.

[18] YU J, PENG R, CHEN H. Kininogen 1 and insulin-like growth factor binding protein 6: candidate serum biomarkers of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Clin Exp Optom*, 2014, 97 (1): 72-79.

[19] HE S, KUMA S R, ZHOU P, KRASNOPEPOV V, RYAN S J, GILL P S, et al. Soluble EphA4 inhibition of PDGF-induced RPE migration *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (1): 543-552.

[20] SAITOH M, MIYAZAWA K. Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF-β-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem*, 2012, 151 (6): 563-571.

[21] CHOI K, LEE K, RYU S W, IM M, KOOK K H, CHOI C. Pirfenidone inhibits transforming growth factor - beta1-induced fibrogenesis by blocking nuclear translocation of Smads in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 1010-1020.

[22] SAIKA S, KONO-SAIKA S, TANAKA T, YAMANAKA O, OHNISHI Y, SATO M, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice [J]. *Lab Invest*, 2004, 84 (10): 1245-1258.

[23] CÁRDENAS A, CAMPOS J, EHRENFELD P, MEZZANO S, RUIZ-ORTEGA M, FIGUEROA C D, et al. Up-regulation of the kinin B2 receptor pathway modulates the TGF-β/Smad signaling cascade to reduce renal fibrosis induced by albumin [J]. *Peptides*, 2015, 73 (1): 7-19.

[24] SAIKA S, YAMANAKA O, NISHIKAWA-ISHIDA I, KITANO A, FLANDERS K C, OKADA Y, et al. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model [J]. *Arch Ophthalmol*, 2007, 125 (5): 647-654.