

文章编号 1006-8147(2018)05-0399-05

论著

吡非尼酮抑制肿瘤相关成纤维细胞促进结肠癌细胞系 HT29 上皮间质转化的作用及机制

马博昭,王小东,王金淼,戚峰

(天津医科大学总医院普通外科,天津 300052)

摘要 目的:探讨吡非尼酮在肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)诱导的 HT29 结肠癌细胞系侵袭、迁移、增殖、上皮-间质转化(EMT)中的作用及机制。方法:利用共培养小室将 CAFs 与 HT29 共培养后 CCK-8 测定 HT29 增殖效率;Real time-PCR 和 Western blot 检测 HT29 结肠癌细胞系 E-cadherin 和 Vimentin 转录及蛋白表达水平;Transwell 实验检测 HT29 结肠癌细胞的迁移和侵袭能力。ELISA 技术检测 CAFs 细胞上清液中细胞因子的表达。结果:吡非尼酮抑制 CAFs 对 HT29 增殖促进作用($P<0.05$);CAFs 条件培养基培养 HT29 后,Vimentin 表达水平显著升高($P<0.05$),E-cadherin 显著降低($P<0.05$);吡非尼酮处理 CAFs 的条件培养基对 HT29 细胞中两种蛋白无明显影响;Transwell 实验表明 CAFs 与 HT29 共培养后,其侵袭和迁移能力明显增强($P<0.05$);ELISA 结果提示 CAFs 分泌 TGF- β 1 功能受吡非尼酮抑制且存在剂量关系。结论:吡非尼酮通过抑制 CAFs 分泌 TGF- β 1 抑制 CAFs 诱导 HT29 结肠癌细胞系侵袭、迁移、增殖、上皮-间质转化。

关键词 肿瘤相关成纤维细胞;吡非尼酮;上皮间质转化;结肠癌

中图分类号 R735.3+5

文献标志码 A

Effect and mechanism of pirfenidone on epithelial-mesenchymal transition induced by cancer-associated fibroblasts in HT29 colon cancer cell lines

MA Bo-zhao, WANG Xiao-dong, WANG Jin-miao, QI Feng

(Department of Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect and mechanism of pirfenidone on the invasion, migration, proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by cancer-associated fibroblasts (CAFs) in HT29 colon cancer cell lines. **Methods:** CCK-8 was used to measure HT29 proliferation efficiency after coculture of CAFs with HT29 using co-culture chamber. The transcription and protein expression levels of E-cadherin and Vimentin in HT29 colon cancer cells were detected by Real time-PCR and Western blot, respectively. Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of HT29. ELISA technique was used to discover the expression of cytokines in CAFs supernatant. **Results:** Pirfenidone inhibited the proliferation of HT29 induced by CAFs ($P<0.05$). The expression of Vimentin was significantly increased in HT29 cells cultured in CAFs conditioned medium ($P<0.05$), while the expression of E-cadherin was significantly decreased ($P<0.05$). However, conditioned medium of pirfenidone treated CAFs had no significant effect on the expressions of the two proteins in HT29 cells ($P>0.05$). Trans-well assay showed that after co-cultured with CAFs, the invasion and migration ability of HT29 were significantly enhanced ($P<0.05$). The results of ELISA showed that the secretion of TGF- β 1 by CAFs was inhibited by pirfenidone, which was dose related. **Conclusion:** Pirfenidone could inhibit the invasion, migration, proliferation and epithelial-mesenchymal transition of HT29 colon cancer cell lines by inhibiting the secretion of TGF- β 1 by CAFs.

Key words cancer associated fibroblasts; pirfenidone; epithelial-mesenchymal transition; colon carcinoma

近年来肿瘤微环境在肿瘤发生发展中的关键作用被越来越多的人认识,肿瘤微环境由多种细胞成分构成,包括肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、免疫细胞、内皮细胞及间充质细胞。在这种异质性环境中,CAFs 是最主要的细胞,在肿瘤进展、侵袭及迁移过程中起着重要的作用^[1]。

有些研究认为 CAFs 在大多数的肿瘤中通过分泌多种细胞因子如 TGF- β 、IL-6 等从而起到促进肿瘤发生发展的作用^[2-3]。吡非尼酮(PFD)是一个有效的抗纤维化药物,很多研究已经证实,吡非尼酮可以改变成纤维细胞分泌的多种细胞因子及生长因子^[4-7]。本研究旨在探讨吡非尼酮在结肠癌 CAFs 诱导的 HT29 结肠癌细胞系侵袭、增殖、上皮-间质转化(EMT)中的作用及机制,为结肠癌的治疗提供新的思路。

基金项目 天津医科大学总医院科研基金资助项目(ZYYFY2016021)

作者简介 马博昭(1990-),男,硕士在读,研究方向:普通外科;通信作者:戚峰, E-mail: qf@medmail.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 人结肠癌源性肿瘤相关成纤维细胞系(江苏齐氏生物公司),人结肠癌细胞系 HT29(本实验室保存)。

1.1.2 主要试剂 CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),吡非尼酮(adamas-beta公司),2×RT MasterMix 及总 RNA 提取试剂盒(天根生物科技(北京)有限公司);高容量 cDNA 反转录试剂盒和 SYBR Select Master Mix (Invitrogen 公司,美国);E-cadherin、Vimentin、 β -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(Cell Signaling Technology,美国);Western blot 发光液(Millipore 公司,美国),TGF- β 1、IL-6 细胞因子 ELISA 试剂盒(北京达科为生物技术有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 筛选药物浓度 结肠癌细胞系 HT29 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,吡非尼酮以 0、0.25、0.5 mg/mL 不同浓度分别培养 HT29 细胞,每组 10 个复孔,培养 72 h,加入 10 μ L CCK8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,450 nm 处检测吸光度。

1.2.2 细胞培养 在以下几种条件下培养结肠癌细胞系 HT29:含 10%FBS 的 DMEM 标准培养基培养(control);含 0.5 mg/mL 吡非尼酮(PFD)培养基培养(PFD-CM);CAFs 上清条件培养(CAF-CM);加入吡非尼酮(PFD)处理 CAFs 细胞后的条件培养(PFD-CAF-CM)。

1.2.3 CCK8 实验 结肠癌细胞 HT29 以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板,Transwell 上室以 1×10^4 个/室接种 CAF 细胞。分为 3 个对照组:标准培养基培养(control),CAFs 与 HT29 Transwell 共培养(CAF-CM);含 0.5 mg/mL PFD 的培养基 CAFs 与 HT29 Transwell 共培养(PFD-CAF-CM)。每组 4 个复孔,培养 60 h,弃培养液,每孔加入 10% CCK8 溶液 500 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min,每个复孔吸出 100 μ L 置于 96 孔板,450 nm 处检测吸光度。

1.2.4 Transwell 实验

1.2.4.1 Transwell 侵袭实验:Matrigel 胶 1:6 稀释后以 50 μ L 包被 Transwell 上室底部膜,在 Transwell 下室内加入含 10%FBS 细胞培养基 600 μ L,上室内加入各组细胞的无胎牛血清培养基悬浮液 200 μ L,上室内加入各组处理后的 HT29 细胞,细胞数为 1×10^5 ,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,用棉签拭去 Matrigel 胶,将 Transwell 上室置于 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色 10 min,倒置显微镜下计数移至微孔膜下层每

视野的细胞数,随机计数 5 个高倍视野,求平均值。

1.2.4.2 Transwell 迁移实验:在 Transwell 下室中加入含 10%FBS 的培养基 600 μ L,在上室中加入各组处理后的 HT29 细胞,细胞数目为 1×10^5 个/室,细胞悬液体积 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,用棉签拭去小室上面细胞,将 Transwell 上室置于 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色 10 min,倒置显微镜下计数移至微孔膜下层每视野的细胞数,随机计数 5 个高倍视野,求平均值。

1.2.5 ELISA 取生长状态良好的对数生长期细胞,按每孔 3×10^4 个细胞种于 24 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C,待细胞贴壁后以 0、0.25、0.5、1.0、1.5 mg/mL 吡非尼酮浓度加药,每组 3 个复孔。提取细胞上清,采用 ELISA 法检测 IL-6、TGF- β 1 的分泌量。

1.2.6 RT-PCR 及 Western blot 检测 HT29 细胞 Vimentin、E-cadherin 表达水平 Trizol 法分别提取结肠癌细胞各组中总 RNA,需测定基因引物序列,E-cadherin,上游:5'-CCTGGGACTCCACCTACAGA-',下游:5'-TGGATTCCAGAAACGGAGGC-3'(扩增片段长度 196 bp);Vimentin 上游:5'-CCGGGAGAAA TTGCAGGAGGAG-3',下游:5'-CGGGCTTTGTCTG TrGGTTAG-3'(扩增片段长度 178 bp);GAPDH (内参基因),上游:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游:5'-AGGTCAAGACGTGCCAGAGAC-3',^{2- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 mRNA 的相对表达量,采用蛋白印迹法(Western blot)检测 Vimentin 和 E-cadherin 基因蛋白表达水平。

1.3 统计学方法 运用统计软件 SPSS17.0 进行数据处理,多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法,所有统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义标准。每个实验均进行了 3 次独立实验。

2 结果

2.1 药物浓度筛选结果 结肠癌细胞 HT29 接种于 96 孔板,吡非尼酮以 0、0.25、0.5 mg/mL 不同浓度分别培养 HT29 细胞,培养 72 h,CCK8 试剂检测吸光度。统计结果显示 0.25、0.5 mg/mL 均对 HT29 细胞增殖无抑制作用($P > 0.05$),选取 0.5 mg/mL 作为 PFD-CAF-CM 组药物浓度(表 1)。

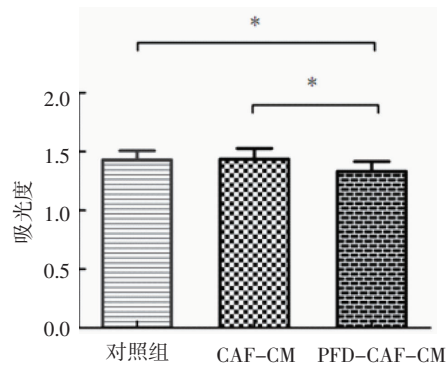
表 1 各组细胞吸光度

Tab 1 The absorbency in each group

分组	<i>n</i>	吸光度	<i>F</i>	<i>P</i>
空白	10	2.72±0.11		
0.25 mg/mL	10	2.77±0.16	0.389	0.682
0.50 mg/mL	10	2.73±0.12		

空白组、0.25 组、0.5 组两两比较无显著差异($P > 0.05$)

2.2 CCK8 实验检测增殖作用 PFD-CAF-CM 组分别与对照组、CAF-CM 组比较增殖效率受抑制,差异有统计学意义($P<0.01$),表明 PFD 可以抑制 CAFs 与 HT29 协同增殖作用;对照组与 CAF-CM 组比较无明显差异($P>0.05$)(图 1,表 2)。



PFD-CAF-CM 组分别与对照组、CAF-CM 组比较,差异有统计学意义($*P<0.01$),对照组与 CAF-CM 组比较无明显差异($P>0.05$)

图 1 CCK8 检测增殖作用

Fig 1 CCK8 detection of proliferation

表 2 CCK8 检测增殖作用

Tab 2 CCK8 detection of proliferation

分组	<i>n</i>	吸光度	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	16	1.42±0.08		
CAF-CM 组	16	1.44±0.09	7.44	0.002
PFD-CAF-CM 组	16	1.33±0.08		

2.3 Transwell 实验

2.3.1 Transwell 侵袭实验 CAF-CM 组与 PFD-CM、PFD-CAF-CM 组、对照组相比,侵袭细胞数目明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$),表明 CAF 使 HT29 细胞侵袭性增强;PFD-CM 组与对照组比

较差异无统计学意义($P>0.05$),表明 PFD 不影响 HT29 细胞侵袭能力;PFD-CAF-CM 组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),表明 PFD 可以抑制 CAF 对 HT29 细胞侵袭能力的影响(图 2,表 3)。

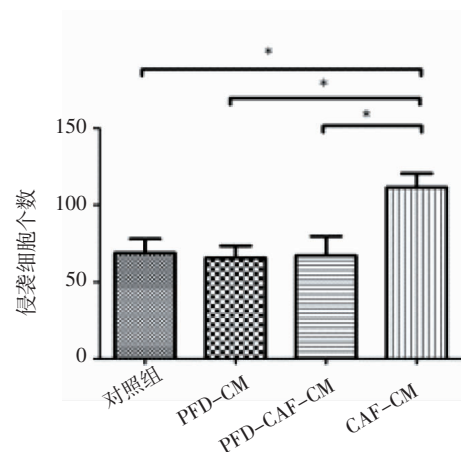
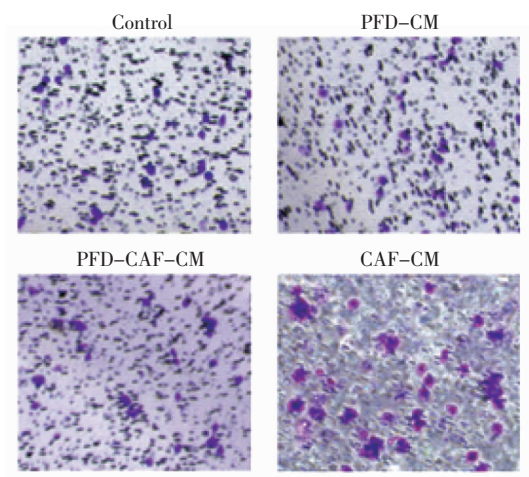
表 3 各组细胞侵袭/迁移结果

Tab 3 The invasion/migration results of each cell lines in each group

分组	<i>n</i>	侵袭细胞计数/ (个/HP)	迁移细胞计数/ (个/HP)
对照组	5	68.8±9.3	40.4±5.3
PFD-CM 组	5	65.6±7.8	40.4±4.4
PFD-CAF-CM 组	5	67.0±12.6	40.6±5.9
CAF-CM 组	5	111.4±9.6	57.0±5.1
<i>F</i>		25.16	12.67
<i>P</i>		0.000	0.000

2.3.2 Transwell 迁移实验 CAF-CM 组与 PFD-CAF-CM 组、对照组相比,迁移细胞数目明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$),表明 CAF 使 HT29 细胞迁移能力增强;PFD-CM 组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明 PFD 不影响 HT29 细胞迁移能力;PFD-CAF-CM 组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),表明 PFD 可以抑制 CAF 对 HT29 细胞迁移能力的影响(图 3,表 3)。

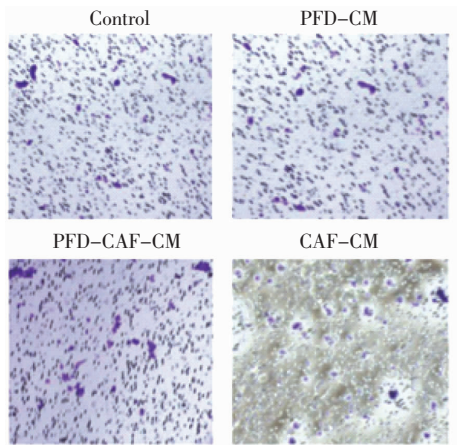
2.4 ELISA 实验检测 PFD 对 CAFs 分泌 TGF- β 1、IL-6 因子的作用 经 0.25、0.5、1.0、1.5 mg/mL 吡非尼酮药物干预后,CAF_s 分泌 TGF- β 1 显著减少,且随 PFD 剂量增加 TGF- β 1 浓度递减,各组与对照组比较差异显著($P<0.01$),说明 PFD 抑制 CAF_s 分泌 TGF- β 1 且存在剂量依赖关系(表 4,图 4)。不同药物浓度组 IL-6 含量无明显差异。



* $P<0.01$

图 2 各组细胞侵袭结果

Fig 2 The invasion results of each cell line in each group



* $P<0.01$

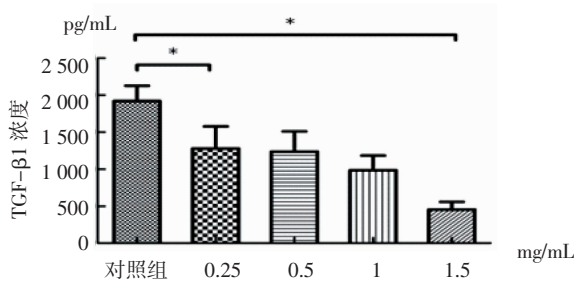
图 3 各组细胞迁移结果

Fig 3 The migration results of each cell line in each group

表 4 ELISA 检测 TGF- β 1

Tab 4 ELISA detection of TGF- β 1

分组	<i>n</i>	浓度/(pg/mL)	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	6	1 919.03±206.01		
0.25 mg/mL	6	1 278.42±298.15		
0.5 mg/mL	6	1 236.08±273.13	33.08	0.000
1 mg/mL	6	985.09±196.33		
1.5 mg/mL	6	452.28±104.35		

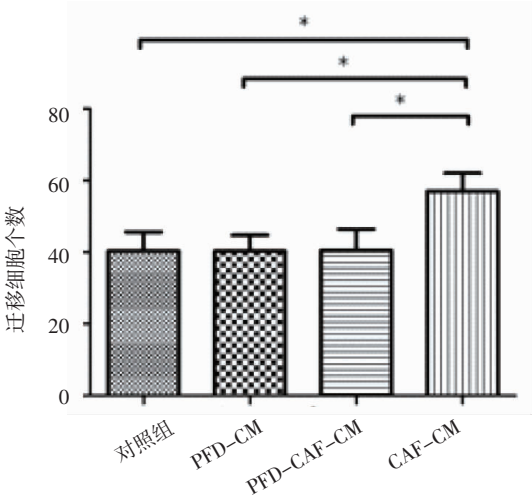


对照组分别与 0.25、0.5、1.0、1.5 mg/mL 各组比较, 差异显著 (* $P<0.01$); 0.25、0.5 mg/mL 两组比较, 无显著性差异 ($P>0.05$), 其余各组两两比较有显著性差异 ($P<0.01$)

图 4 ELISA 检测 TGF- β 1

Fig 4 ELISA detection of TGF- β 1

2.5 RT-PCR 及 Western blot 检测 HT29 细胞 Vimentin、E-cadherin 表达水平 与对照组、PFD-CM 组和 PFD-CAF-CM 组比较, CAF-CM 组 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); PFD-CM 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 表明 PFD 不影响 HT29 细胞 Vimentin、E-cadherin 表达; 对照组和 PFD-CAF-CM 组比较 Vimentin 的 mRNA 和蛋白及 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平无



显著性差异 ($P>0.05$), 说明 PFD 可以抑制 CAF 诱导 HT29 上皮间质转化 (表 5, 图 5、6)。

表 5 各组细胞中 Vimentin、E-cadherin 的 mRNA 表达水平

Tab 5 The expression levels of mRNA of Vimentin and E-cadherin in each group

分组	<i>n</i>	E-cadherin	Vimentin
对照组	3	1	1
PFD-CM 组	3	0.999 3±0.055 3	1.002 5±0.255 8
PFD-CAF-CM 组	3	1.012 5±0.048 9	1.020 5±0.283 3
CAF-CM 组	3	0.328 6±0.034 8	3.737 1±0.102 3
<i>F</i>		98.00	107.95
<i>P</i>		0.000	0.000

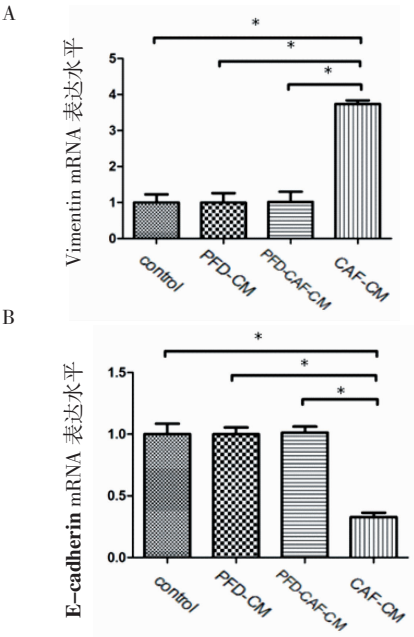
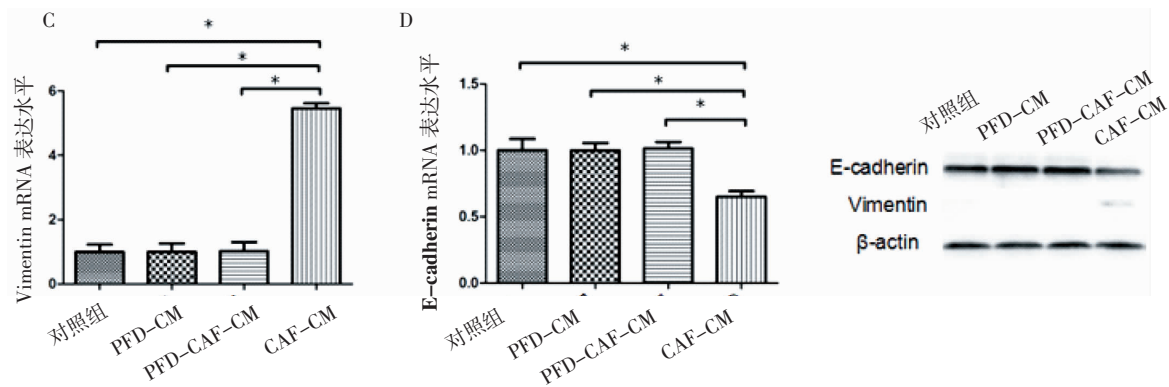


图 A、B 示各组细胞 Vimentin、E-cadherin mRNA 表达量; * $P<0.01$

图 5 各组细胞中 Vimentin、E-cadherin 的 mRNA 表达水平

Fig 5 The expression levels of mRNA of Vimentin and E-cadherin in each group



C、D 示各组细胞 Vimentin、E-cadherin 蛋白表达量, * $P < 0.01$

图6 各组细胞中 Vimentin、E-cadherin 的蛋白表达水平

Fig 6 The expression levels of Vimentin and E-cadherin protein in each group

3 讨论

近年来肿瘤微环境在肿瘤发生发展中的关键作用被越来越多的人认识,其众多的细胞成分如内皮细胞、淋巴细胞、成纤维细胞等也被逐渐认知^[1]。尽管目前针对肿瘤微环境的免疫治疗已经取得了相当的成效,但是炎症细胞如淋巴细胞,单核-巨噬细胞及中性粒细胞的可塑性和异质性严重阻碍了免疫治疗的效果。在这种情况下,肿瘤微环境中另一种重要的细胞 CAFs,可能成为改变肿瘤微环境并治疗肿瘤的新靶点。有些研究认为 CAFs 通过提供结构支架和通过分泌大量的生长因子从而起到促进肿瘤发生发展的作用,有助于肿瘤组织内稳态和组织重塑^[2-4]。

临床上部分结肠癌患者就诊时已处于中晚期,已经失去手术治疗机会。而且有些患者手术后很快发生复发与转移。恶性肿瘤最主要的特征之一是转移,肿瘤的转移是一个复杂的多级的生物学过程,而肿瘤细胞获得侵袭转移能力的关键一步便是 EMT^[8]。EMT 的主要特征是上皮细胞表型标记物的表达下调或缺失(如 E-cadherin),而间质细胞表型标记物(如 Vimentin、N-cadherin 等)表达上调^[9-10]。TGF- β 能介导 EMT 发生的现象首先在细胞培养中发现^[11]。TGF- β 分子主要通过 β -整合素信号传导途径促进 Smad(主要是 Smad3)分子依赖的细胞转录过程的发生,也可通过非 Smad 分子依赖信号传导途径和调控转录因子发挥作用引起 EMT^[12]。吡非尼酮是一个有效的抗纤维化药物,但作用机制尚不清楚。目前研究显示吡非尼酮可以减弱成纤维细胞受到细胞生长因子如 TGF- β 刺激后的细胞增殖、纤维化相关蛋白和细胞因子产生^[5-6]。目前,吡非尼酮对结肠癌相关 CAFs 的作用还需要进一步研究。

吡非尼酮作为一种细胞因子抑制剂可以改变

成纤维细胞分泌的多种细胞因子及生长因子^[7]。本实验中,利用 CAFs 诱导结肠癌细胞 HT29 后发现,HT29 增殖能力增加,间质表型标志物 Vimentin 表达水平显著升高,上皮表型标志物 E-cadherin 表达水平显著降低,差异具有统计学意义。这表明 CAFs 可能通过分泌细胞因子促进 HT29 细胞 EMT 的发生。条件培养基培养 HT29 细胞后发现,与对照组相比,吡非尼酮处理后 CAFs 条件培养基促进 HT29 细胞增殖能力明显减弱。ELISA 检测细胞培养上清,结果显示,使用吡非尼酮干预 CAFs 后 TGF- β 1 分泌量显著降低,但是 IL-6 的分泌量在各组之间并未发生明显的变化。同时,Western blot 及 PCR 结果显示,吡非尼酮处理后 CAFs 条件培养基与 HT29 细胞共培养以后,相对于对照组,间质表型 Vimentin 表达水平明显受抑制。Transwell 实验表明,吡非尼酮干预 CAFs 后,与未干预组相比肿瘤细胞的侵袭性和迁移性明显减弱。吡非尼酮通过抑制结肠癌相关 CAFs 分泌 TGF- β 1,抑制 HT29 细胞发生 EMT 可能是吡非尼酮的作用机制之一。

综上所述,随着对肿瘤微环境研究的深入,吡非尼酮抑制肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)诱导的结肠癌细胞上皮-间质转化(EMT)可能作为结肠癌治疗及预后新思路。

参考文献:

- [1] Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts(CAFs) in tumor microenvironment[J]. Front Biosci, 2010, 15:166
- [2] Yeung T L, Leung C S, Wong K K, et al. TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment[J]. Cancer Res, 2013, 73(16):5016
- [3] Wang L M, Cao L M, Wang H M, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(44):76116

和 SHR-T 组血浆和脑组织中的促炎因子 IL-17 浓度均显著高于正常饮食组 SHR-C, 血浆和脑组织中的抑炎因子 IL-10 水平均低于 SHR-C; 16 周时, 经叶酸联合维生素治疗后 SHR-T 组血浆和脑组织中的促炎因子 IL-17 降低, 抑炎因子 IL-10 水平升高, 并且免疫组化也得到类似结果。因此, 我们推测 Hey 通过调节炎症反应进而影响高血压患者的脑组织病变。即 Hey 可促进炎症反应从而导致脑组织病变的发生, 下调免疫反应后可起到保护作用。

参考文献:

- [1] Ganguly P, Alam S F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease[J]. *Nutr J*, 2015, 14: 6
- [2] He L M, Gao C Y, Wang Y, et al. Red cell distribution width and homocysteine act as independent risk factors for cardiovascular events in newly diagnostic essential hypertension[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):102590
- [3] Li S, Zhu J, Wu L, et al. The association between Plasma homocysteine and ambulatory blood Pressure variability in Patients with untreated hypertension[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 477: 32
- [4] Kirabo A. A new paradigm of sodium regulation in inflammation and hypertension[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017, 313(6): R706
- [5] Bartoloni E, Alunno A, Gerli R. Hypertension as a cardiovascular risk factor in autoimmune rheumatic diseases[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(1): 33
- [6] 张宇, 王林. 同型半胱氨酸与 H 型高血压研究进展[J]. *中华老年病研究电子杂志*, 2016, 3(1): 30
- [7] Li Q, Wang Y, Yu F, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(6): 1015
- [8] Lehmann M, Regland B, Blennow K, et al. Vitamin B12-B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2003, 16(3): 145
- [9] Werder S F. Cobalamin deficiency, hyperhomocysteinemia, and dementia[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2010, 6: 159
- [10] Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, et al. Increased Total Homocysteine Levels Predict the Risk of Incident Dementia Independent of Cerebral Small-Vessel Diseases and Vascular Risk Factors[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 49(2): 503
- [11] Kayacelebi A A, Willers J, Pham V V, et al. Plasma homoarginine, arginine, asymmetric dimethylarginine and total homocysteine interrelationships in rheumatoid arthritis, coronary artery disease and Peripheral artery occlusion disease[J]. *Amino Acids*, 2015, 47(9): 1885
- [12] Liu J, Liu H, Zhao H, et al. Relationship between cardio-ankle vascular index and homocysteine in hypertension subjects with hyperhomocysteinemia[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(7): 652
- [13] 徐志红, 陆国平, 吴春芳. 高同型半胱氨酸血症对内皮细胞炎症反应的促发作用及其干预性研究[J]. *上海医学*, 2007, 15(5): 353
- [14] 孔炜, 王宪. 免疫炎症反应与动脉粥样硬化—高同型半胱氨酸血症促进动脉粥样硬化早期发病的免疫炎症机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(7): 525
- [15] Xie L, Choudhury G R, Winters A, et al. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 180
- [16] Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis[J]. *Int J Immunopharmacol*, 2003, 3(10/11): 1363
- [17] Beringer A, Noack M, Miossec P, et al. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(3): 230
- [18] Wojkowska D W, Szpakowski P, Glabinski A, et al. Glabinski, interleukin 17A promotes lymphocytes adhesion and induces CCL2 and CXCL1 release from brain endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): Pii: E1000
- [19] Chastain E M, Duncan D S, Rodgers J M, et al. The role of antigen Presenting cells in multiple sclerosis[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1812(2): 265

(2018-01-29 收稿)

(上接第 403 页)

- [4] Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, et al. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2345
- [5] Yang Y F, Ye Y M, Lin X C, et al. Inhibition of pirfenidone on TGF- β 2 induced proliferation, migration and Epithelial-Mesenchymal transition of human lens epithelial cells line SRA01/04[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56837
- [6] Hisatomi K, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells[J]. *BMC pulmonary medicine*, 2012, 12: 24
- [7] Cottin V. The role of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): S5
- [8] Chen T, You Y A, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3261
- [9] Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2001, 77(3): 201
- [10] Liu C Y, Lin H H, Tang M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15966
- [11] Valcourt U, Kowanzetz M, Niimi H, et al. TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4): 1987
- [12] Zhang J, Tian X J, Zhang H, et al. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(345): ra91

(2018-02-14 收稿)