

EW-7197 对 TGF- β 1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增殖和迁移的影响及机制

温佳敏¹, 郑磊², 艾伟鹏¹

引用:温佳敏,郑磊,艾伟鹏. EW-7197 对 TGF- β 1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增殖和迁移的影响及机制. 国际眼科杂志 2023; 23(10):1617-1620

基金项目: 深圳市科创委基础研究项目(面上项目)(No. JCYJ20190808170609490)

作者单位:¹(518071) 中国广东省深圳市, 深圳大学总医院药学部;²(518040) 中国广东省深圳市, 暨南大学附属深圳眼科医院
作者简介:温佳敏, 毕业于贵州医科大学, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向:药理学和青光眼靶向治疗药物。

通讯作者:温佳敏. xzwjm1122@163.com

收稿日期: 2023-03-21 修回日期: 2023-09-01

摘要

目的:探讨 ALK5 抑制剂 EW-7197 对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 增殖和迁移的影响及其机制。

方法:采用 MTS 法检测细胞增殖率, 并摸索 EW-7197 最佳的作用浓度和作用时间。之后将细胞分为 3 个组, 分别为正常对照组、TGF- β 1 诱导组和 TGF- β 1+EW-7197 处理组, 采用 Transwell 小室观察各组细胞迁移情况, 采用 Western blot 检测各组细胞 Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3 的蛋白表达水平。

结果:MTS 结果显示, 不同处理条件的 EW-7197 以 6.0 μ mol/L 作用 24h 的细胞增殖率最低 (均 $P < 0.01$)。Transwell 小室实验结果显示, TGF- β 1 诱导组的细胞迁移数量为 228.0 \pm 17.0 个/视野, 明显高于正常对照组 (149.0 \pm 15.0 个/视野) 和 TGF- β 1+EW-7197 处理组 (46.0 \pm 8.0 个/视野) (均 $P < 0.01$)。Western blot 检测结果显示, TGF- β 1 诱导组细胞中 Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3 相对表达量高于正常对照组和 TGF- β 1+EW-7197 处理组 (均 $P < 0.001$)。

结论:EW-7197 能够通过 TGF- β /Smad 信号通路抑制 TGF- β 1 诱导的 HTFs 增殖和迁移。

关键词:青光眼; EW-7197; Tenon 囊成纤维细胞; 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1); 瘢痕化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.10.03

Effects of EW-7197 on the proliferation and migration of TGF- β 1 induced human Tenon fibroblasts and its mechanism

Jia-Min Wen¹, Lei Zheng², Wei-Peng Ai¹

Foundation item: Basic Research (General Project) Supported by Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (No.

JCYJ20190808170609490)

¹Department of Pharmacy, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518071, Guangdong Province, China; ²Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jia - Min Wen. Department of Pharmacy, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518071, Guangdong Province, China. xzwjm1122@163.com

Received:2023-03-21 Accepted:2023-09-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of ALK5 inhibitor EW-7197 on the proliferation and migration of human Tenon fibroblasts (HTFs) induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its mechanism.

• **METHODS:** The cell proliferation rate was detected by MTS assay, and the optimal concentration and time of EW-7197 were explored. Then HTFs were divided into three groups: normal control group, TGF- β 1 induced group and TGF- β 1+EW-7197 group. Cell migration was observed by Transwell assay. The protein expression levels of Fibronectin, α -SMA, as well as the phosphorylated Smad2, Smad3 (p-Smad2, p-Smad3) were measured by Western blot.

• **RESULTS:** MTS assay showed that the proliferation rate of cells treated with 6.0 μ mol/L EW-7197 for 24h was the lowest (all $P < 0.01$). Transwell assay showed that the migrated number of HTFs in TGF- β 1 induced group was 228.0 \pm 17.0/field, which was significantly more than that in normal control group (149.0 \pm 15.0/field) and TGF- β 1+EW-7197 group (46.0 \pm 8.0/field; all $P < 0.01$). Western blot showed that the protein relative expression levels of Fibronectin, α -SMA and p-Smad2, p-Smad3 of HTFs in TGF- β 1 induced group were significantly higher than that in normal control group and TGF- β 1+EW-7197 group (all $P < 0.001$).

• **CONCLUSION:** EW-7197 can suppress the proliferation and migration of TGF- β 1-induced HTFs through TGF- β /Smad signaling pathways.

• **KEYWORDS:** glaucoma; EW-7197; Tenon fibroblasts; transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1); scarring

Citation: Wen JM, Zheng L, Ai WP. Effects of EW-7197 on the proliferation and migration of TGF- β 1 induced human Tenon fibroblasts and its mechanism. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(10):1617-1620

0 引言

青光眼是一组由于病理性眼压升高而导致视神经损伤和不可逆视功能损害的眼病,预计2040年全球青光眼患病人数将达到1.2亿^[1-2]。小梁切除术是降低青光眼患者眼压的经典手术方式,但滤过通道瘢痕化严重影响了手术成功率^[3]。尽管联合使用5-氟尿嘧啶或丝裂霉素C有助于抑制术后纤维细胞增生降低瘢痕化,但由于缺乏靶向性,这些药物具有诱发严重并发症的潜在风险^[4]。因此探索滤过通道瘢痕化的发病机制以及研发更安全有效的药物具有重要的科学意义。国内外大量研究证实,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad通路的异常活化参与诱导了人Tenon囊成纤维细胞(human Tenon fibroblasts, HTFs)向肌成纤维细胞转分化,增加细胞外基质合成,是青光眼滤过手术后的组织纤维化和瘢痕收缩的重要机制之一^[5]。EW-7197是一种TGF- β I型受体(TGF- β R I,又称为ALK5)小分子抑制剂,可以靶向拮抗TGF- β 介导的信号传导,发挥抑癌效应^[6]。近年研究发现,EW-7197还可以在肝脏、肾脏和肺等多器官纤维化动物模型中发挥拮抗纤维化的作用^[7],但目前尚缺乏EW-7197拮抗结膜组织瘢痕化的研究。本研究拟探讨EW-7197对TGF- β 1诱导的HTFs增殖和迁移的影响及相关机制,为抑制青光眼滤过术后瘢痕化提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人Tenon囊成纤维细胞系(HTFs)购自上海联组生物科技有限公司(#C529);DMEM/F12培养基、青-链霉素、2.5g/L胰蛋白酶(美国Gibco公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(中美合资兰州民海生物);TGF- β 1(美国Peprotech公司);MTS、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(美国Sigma公司);EW-7197(美国MedChemexpress公司);Transwell小室(美国Corning公司);兔抗人Fibronectin(ab2413)、鼠抗人 α -SMA(ab5694)(美国Abcam公司);p-Smad2(#18338)、p-Smad3(#9520)单克隆抗体(美国CST公司);羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG荧光二抗(美国Licor公司);Odyssey双色红外成像系统(美国Licor公司)。

1.2 方法

1.2.1 HTFs培养及分组

常规培养于DMEM/F12培养基(含有10% FBS和1%青-链霉素)内,每3d传代1次,取对数期生长的细胞进行实验,培养箱内温度为37℃,CO₂体积分数为5%。将细胞分为正常对照组、TGF- β 1诱导组和TGF- β 1+不同浓度EW-7197处理组。正常对照组为细胞培养液中添加终浓度0.5% DMSO,TGF- β 1诱导组为培养基中添加终浓度0.5% DMSO和1 μ L TGF- β 1(终末浓度为10 μ g/mL)。为了筛选出EW-7197的最佳作用浓度和时间,各EW-7197处理组用混合有10 μ g/mL TGF- β 1以及不同浓度的EW-7197(1.5、3.0、6.0、8.0 μ mol/L)的培养基分别作用不同时间点(6、12、24h),检测细胞增殖情况。

1.2.2 MTS法测定细胞增殖率

取生长状态良好的HTFs,制成细胞悬液,计数,以1 \times 10⁵个/毫升接种于96孔板。为了筛选最佳药物浓度及作用时间,按照1.2.1分组方案加入200毫升/孔进行培养;加入MTS 20 μ L,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中继续培养4h;以加入MTS溶液20微升/孔作为空白孔。采用酶标仪于490nm波长处检测各孔的吸光度值(absorbance, A值)。计算细胞增殖

率=(各组A值-空白孔A值)/(正常对照组A值-空白孔A值) \times 100%。所有实验均独立重复3次。

1.2.3 Transwell小室检测细胞迁移

取对数期生长的HTFs,制成细胞悬液,计数,以1 \times 10⁵个/孔铺于6孔板中;待细胞贴壁后,根据摸索出的EW-7197最佳作用浓度和时间分为3组:正常对照组为细胞培养液中添加终浓度0.5% DMSO培养24h,TGF- β 1诱导组为细胞培养液中添加终浓度0.5% DMSO及10 μ g/mL TGF- β 1处理24h,TGF- β 1+EW-7197处理组为细胞培养液中添加10 μ g/mL TGF- β 1以及6.0 μ mol/L EW-7197的混合液处理24h;去除原培养基,PBS清洗1次,取少量胰酶消化并收集细胞;PBS清洗细胞3次,计数,重悬于无血清DMEM/F12培养基中;在Transwell小室上室中加入100 μ L密度为1 \times 10⁵个/毫升的细胞悬液,下室加入500 μ L含FBS的完全培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱继续培养48h;弃去培养基,取出小室,用棉签轻轻擦去上室未迁移的细胞,迁移至下室的细胞用4%多聚甲醛固定5min,0.2%结晶紫染色8min,清水洗去多余结晶紫,晾干后,置于倒置显微镜下随机选取3个视野拍照,并计数发生迁移的细胞数目。所有实验均独立重复3次。

1.2.4 Western blot分析相关蛋白表达

收集1.2.3分组方案中的各组细胞,用PBS洗涤,加入RIPA裂解缓冲液溶解细胞,离心半径8cm,13 000r/min离心10min,收集上清液蛋白,采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白质转印至PVDF膜。将PVDF膜置于含质量分数5%脱脂奶粉中室温封闭1h,加入质量分数5% BSA稀释的Fibronectin(1:1000)、 α -SMA(1:1000)、p-Smad2(1:1000)、p-Smad3(1:1000)、Actin(1:1000)抗体,摇床上室温孵育30min,4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次5min;加入相应IRDye 680CW或IRDye 800CW荧光二抗(均1:1000),室温避光孵育1h,使用LICOR-Odyssey系统显影分析。以Actin为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。所有实验均独立重复3次。

统计学分析:采用统计学软件SPSS22.0进行统计分析。计量资料经W检验呈正态分布,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,均经Levene检验方差齐。不同组间的细胞增殖率、迁移数目和细胞中Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3蛋白相对表达水平的差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EW-7197对TGF- β 1诱导HTFs细胞增殖的影响

MTS实验结果表明,正常对照组、TGF- β 1诱导组和TGF- β 1+不同浓度EW-7197处理组在处理不同时间点细胞增殖率总体比较,差异均有统计学意义(P<0.01)。TGF- β 1诱导组的细胞增殖率较正常对照组均升高,差异均有统计学意义(P<0.01)。在EW-7197不同处理条件中,以6.0 μ mol/L EW-7197处理24h细胞增殖率最低,差异均有统计学意义(P<0.01),见表1。因此在后续实验中选择该药物浓度和作用时间。

2.2 EW-7197对TGF- β 1诱导HTFs细胞迁移的影响

Transwell迁移实验结果显示,正常对照组、TGF- β 1诱导组、TGF- β 1+EW-7197处理组细胞迁移数量分别为149.0 \pm 15.0、228.0 \pm 17.0、46.0 \pm 8.0个/视野,总体比较差异有统计学意义(F=68.091,P=0.001),其中TGF- β 1诱导

组细胞迁移数量较正常对照组明显增多,差异有统计学意义($P<0.01$);TGF- β 1+EW-7197 处理组细胞迁移数量较 TGF- β 1 诱导组明显减少,差异有统计学意义($P<0.001$, 图 1)。

2.3 EW-7197 对 HTFs 中 TGF- β /Smad 通路相关蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示,正常对照组、TGF- β 1 诱导组、TGF- β 1+EW-7197 处理组细胞中 Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。与正常对照组相比,TGF- β 1 诱导组中 Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3 蛋白的相对表达量明显增加,差异均有统计学意义($P<0.001$)。与 TGF- β 1 诱导组相比,EW-7197 处理组细胞中 Fibronectin、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3 蛋白的相对表达量明显减少,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 2。

3 讨论

青光眼是一组通常由于房水引流障碍导致眼内压增高引起特征性视神经萎缩和视野缺损的疾病。无论是何种类型的青光眼,积极降低眼压达到靶眼压、改善视网膜视神经血液循环、减轻视网膜神经节细胞的损害是青光眼治疗的目标^[8]。小梁切除术是通过人为地开创一条滤过通道,将房水引流至巩膜瓣和结膜瓣下,以期降低眼压。但滤过泡的瘢痕化导致小梁切除术后 1a 的手术失败率在 9.35%~17.3%,这也一直困扰着手术医生和患者^[3]。迄今为止,广谱抗代谢药物 5 氟尿嘧啶或丝裂霉素 C 仍然在临床上被用作拮抗术后滤过通道瘢痕化,但这类药物存在一定的毒性或副作用,可能会引起角膜损害、低眼压综合征、眼内炎等^[9]。因此,探寻毒性更低、具有靶向性抑制术后滤过通道瘢痕化的药物一直是青光眼领域研究的热点,而其中涉及揭示术后结膜组织瘢痕化的潜在机制至关重要。

表 1 不同浓度 EW-7197 对 TGF- β 1 诱导 HTFs 细胞后不同时间点细胞增殖率比较

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

组别	6h	12h	24h
正常对照组	61.44 \pm 4.94	83.50 \pm 3.97	90.87 \pm 4.78
TGF- β 1 诱导组	70.56 \pm 2.63	90.48 \pm 3.30	95.56 \pm 3.54
TGF- β 1+1.5 μ mol/L EW-7197 组	68.12 \pm 1.70	57.45 \pm 1.09	54.41 \pm 0.28
TGF- β 1+3.0 μ mol/L EW-7197 组	55.77 \pm 0.33	45.05 \pm 2.12	41.57 \pm 3.18
TGF- β 1+6.0 μ mol/L EW-7197 组	43.18 \pm 1.24	30.97 \pm 2.51	26.12 \pm 5.84
TGF- β 1+8.0 μ mol/L EW-7197 组	43.02 \pm 0.91	30.34 \pm 2.71	26.43 \pm 0.73
<i>F</i>	39.24	15.56	7.98
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

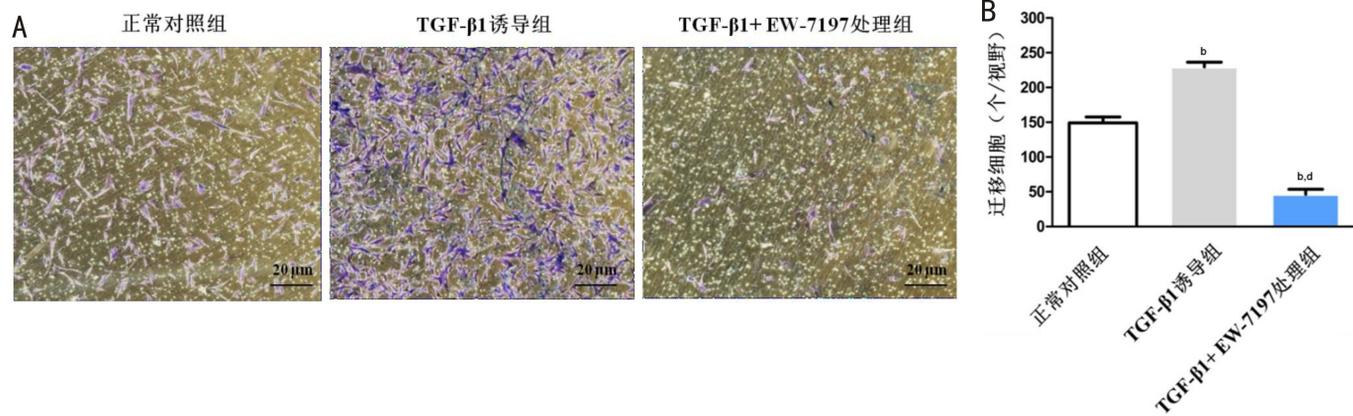


图 1 Transwell 小室迁移实验检测各组 HTFs 细胞迁移情况比较。^b $P<0.01$ vs 正常对照组;^d $P<0.01$ vs TGF- β 1 诱导组。

A: 各组细胞 Transwell 小室迁移情况(结晶紫); B: 各组迁移细胞数比较。

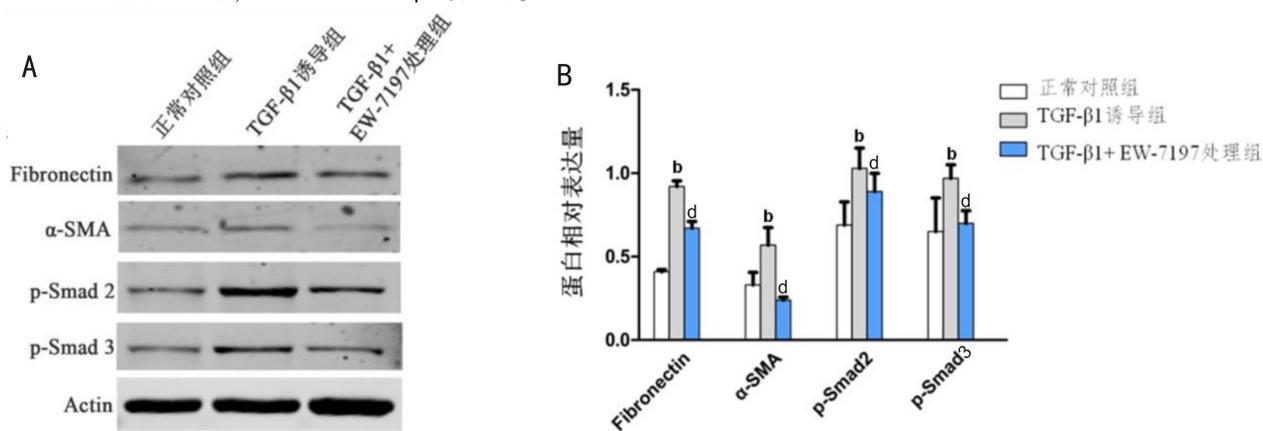


图 2 Western blot 检测各组细胞中 Fibronectin、 α -SMA 及 p-Smad2、p-Smad3 表达比较。^b $P<0.01$ vs 正常对照组;^d $P<0.01$ vs TGF- β 1 诱导组。

A: 蛋白电泳图; B: 蛋白相对表达量比较。

研究发现,青光眼滤过术后 HTFs 会发生向肌成纤维细胞转分化,表现为细胞增殖和迁移能力增强,滤泡区域内细胞外基质大量合成堆积导致瘢痕形成^[10]。在这一病理过程中,TGF- β 信号通路的异常活化被认为发挥着重要的作用^[11]。TGF- β 是生物体内重要的细胞因子,由其介导的信号通路广泛参与细胞增殖、分化、迁移等过程,而该信号通路的异常激活已经被证实与人体多器官的纤维化存在关联性,也参与了青光眼滤过术后瘢痕化的形成^[12]。在我们的研究中证实,使用外源性 TGF- β 1 刺激 HTFs 后会显著增加后者的增殖和迁移能力,佐证了这一观点。因此,理论上靶向阻断 TGF- β 通路传导被认为可以抑制滤过术后纤维化的发生。而既往研究中应用的一些 TGF- β 通路抑制剂已经被证实可以减少青光眼滤过手术动物模型中滤过通道瘢痕化的面积,有利于降低术后眼压^[13-17]。

EW-7197 是一种新型的 TGF- β 通路小分子抑制剂,作用靶点是 TGF- β R 1(又称为 ALK5),通过竞争性结合于 ALK5 胞内激酶结构域的 ATP 结合位点产生激酶抑制活性,从而能够阻断 TGF- β 1 诱导的 Smad2/Smad3 蛋白磷酸化及入核,减少 TGF- β 通路下游与组织纤维化及上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关靶基因的表达^[18]。EW-7197 起初被发现可以抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移以及 EMT 过程,近年来还被证实具有拮抗肝脏、肾脏、肺等器官动物模型纤维化的作用。诸如 Park 等^[7] 研究发现,EW-7197 可以通过阻断 TGF- β 1/Smad2/3 信号传导,降低不同器官纤维化小鼠模型中组织内胶原蛋白、 α -SMA、纤连蛋白等的表达,从而发挥抗纤维化作用,延长动物模型的生存周期。Binabaj 等^[19] 则证实,EW-7197 在溃疡性结肠炎小鼠模型中可以发挥拮抗结肠组织纤维化的作用,其机制与靶向抑制 TGF- β 1/Smad2/3 通路,下调促纤维化基因表达,减少胶原组织在结肠中的过度沉积有关。虽然在上述器官中,EW-7197 展现了较好的抗纤维化效应,但目前尚缺乏其在眼部拮抗组织纤维化的研究。在本研究中,我们将 EW-7197 添加至 TGF- β 1 诱导后的 HTFs 培养基中,发现可以呈浓度和时间梯度降低 HTFs 的细胞增殖能力。此外,使用 6.0 μ mol/L 作用浓度的 EW-7197 还可以显著减弱 HTFs 的细胞迁移能力,初步在细胞实验水平证实了 EW-7197 可能具有抑制青光眼滤过术后瘢痕化的作用。

为了更好地揭示 EW-7197 的作用机制,我们探索了该药物对 HTFs 中 TGF- β /Smad 信号通路的影响,发现 EW-7197 可以降低 p-Smad2、p-Smad3 的蛋白表达水平,这与既往 EW-7197 在其他器官抗纤维化的作用机制一致^[7,19],证实了 EW-7197 具有高度的特异性和靶向性。此外,我们还发现 EW-7197 可以明显降低 TGF- β /Smad 下游重要靶点 Fibronectin 和 α -SMA 的蛋白表达水平,后者均属于细胞外基质的重要组成成分^[20],它们的表达减弱可能导致了 HTFs 的迁移能力降低。此外,Fibronectin 和 α -SMA 也是 HTFs 向肌纤维细胞转分化的标志^[21],EW-7197 对它们的抑制表达作用可能有助于减少 HTFs 在 TGF- β 1 诱导后的转分化。

综上所述,本研究通过细胞实验初步证实了 EW-7197 具有抑制 TGF- β 1 诱导 HTFs 增殖和迁移的能力,可能与下调 p-Smad2、p-Smad3 的蛋白,阻断 TGF- β /Smad 信号传导有关。接下来我们将进一步通过动物模型

验证 EW-7197 拮抗青光眼滤过术后瘢痕化的作用,以期探寻青光眼术后滤过通道瘢痕化的机制和药物研究提供一点参考。

参考文献

- 1 Stein JD, Khawaja AP, Weizer JS. Glaucoma in adults - screening, diagnosis, and management: a review. *JAMA* 2021;325(2):164-174
- 2 Kastner A, King AJ. Advanced glaucoma at diagnosis: current perspectives. *Eye* 2020;34(1):116-128
- 3 Kalarn S, Le T, Rhee DJ. The role of trabeculectomy in the era of minimally invasive glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2021;33(2):112-118
- 4 Oliveira CM, Ferreira JLM. Overview of cicatricial modulators in glaucoma fistulizing surgery. *Int Ophthalmol* 2020;40(10):2789-2796
- 5 Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: the dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Prog Retin Eye Res* 2017;60:44-65
- 6 Son JY, Park SY, Kim SJ, et al. EW-7197, a novel ALK-5 kinase inhibitor, potently inhibits breast to lung metastasis. *Mol Cancer Ther* 2014;13(7):1704-1716
- 7 Park SA, Kim MJ, Park SY, et al. EW-7197 inhibits hepatic, renal, and pulmonary fibrosis by blocking TGF- β /Smad and ROS signaling. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(10):2023-2039
- 8 Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, et al. The diagnosis and treatment of glaucoma. *Dtsch Arztebl Int* 2020;117(13):225-234
- 9 Cabourne E, Clarke JC, Schlottmann PG, et al. Mitomycin C versus 5-Fluorouracil for wound healing in glaucoma surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;2015(11):CD006259
- 10 Shah MH, Chan EC, Van Bergen NJ, et al. Nox4 facilitates TGF β 1-induced fibrotic response in human Tenon's fibroblasts and promotes wound collagen accumulation in murine model of glaucoma filtration surgery. *Antioxidants* 2020;9(11):1126
- 11 Wang RQ, Chen BY, Wei HY, et al. Collecting and deactivating TGF- β 1 hydrogel for anti-scarring therapy in post-glaucoma filtration surgery. *Mater Today Bio* 2022;14:100260
- 12 Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact* 2018;292:76-83
- 13 Hachana S, Larrivé B. TGF- β superfamily signaling in the eye: implications for ocular pathologies. *Cells* 2022;11(15):2336
- 14 Cheng WS, Chen CL, Chen JT, et al. AR12286 alleviates TGF- β -related myofibroblast transdifferentiation and reduces fibrosis after glaucoma filtration surgery. *Molecules* 2020;25(19):4422
- 15 Kasar K, Demir T, Akin MM, et al. The effect of halofuginone and pirfenidone on wound healing in experimental glaucoma filtration surgery. *J Fran Ophthalmol* 2021;44(3):340-349
- 16 Liu Y, Liu PP, Liu L, et al. Triptolide inhibits TGF- β -induced matrix contraction and fibronectin production mediated by human Tenon fibroblasts. *Int J Ophthalmol* 2018;11(7):1108-1113
- 17 Fujimoto T, Inoue - Mochita M, Iraha S, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibits transforming growth factor-beta 2-induced increases in aqueous humor outflow resistance. *J Biol Chem* 2021;297(3):101070
- 18 Tsao J, Song HY, Choi EY, et al. EW-7197, an oral transforming growth factor β type I receptor kinase inhibitor, for preventing peritoneal adhesion formation in a rat model. *Surgery* 2018;164(5):1100-1108
- 19 Binabaj MM, Asgharzadeh F, Avan A, et al. EW-7197 prevents ulcerative colitis-associated fibrosis and inflammation. *J Cell Physiol* 2019;234(7):11654-11661
- 20 Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J* 2021;288(24):6850-6912
- 21 Wen JM, Lin XC, Gao WY, et al. MEK inhibition prevents TGF- β 1-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Mol Med Rep* 2019;19(1):468-476