

# MeCP2 对 LECs 生物学行为和上皮-间质转化的调控作用及其机制

牛超<sup>1</sup> 吴众<sup>1</sup> 黄亚琳<sup>1</sup> 张颖<sup>1</sup> 王应飞<sup>1</sup> 李晓华<sup>1</sup> 陆文龙<sup>2</sup>

<sup>1</sup>河南省人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省眼科与视觉科学重点实验室 郑州大学人民医院 河南大学人民医院, 郑州 450003; <sup>2</sup>河南科技大学医学技术与工程学院, 洛阳 471000

通信作者: 李晓华, Email: yksbls2390@126.com

**【摘要】** 目的 探讨甲基化 CpG 集合蛋白 2 (MeCP2) 对晶状体上皮细胞 (LECs) 生物学行为和上皮-间质转化 (EMT) 发生的作用及其可能机制。方法 根据细胞中转染物序列不同将人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 分为 MeCP2 类似物组、MeCP2-空质粒组和小干扰 RNA-MeCP2 (si-MeCP2) 组, 分别将相应序列的质粒转染 SRA01/04 细胞。转染后 24 h 采用逆转录 PCR 法检测各组细胞中 MeCP2 mRNA 相对表达量; 于转染后 48 h 采用划痕试验检测细胞迁移率; 采用免疫荧光染色测定细胞内 Wnt3a 蛋白表达; 采用 Western blot 法检测细胞内  $\beta$ -catenin、钙黏附蛋白-E (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、基质金属蛋白酶 (MMP)-9、MMP-7 和分泌型卷曲相关蛋白 5 (SFRP5) 蛋白表达。结果 转染后 24 h, MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞中 MeCP2 mRNA 相对表达量总体比较, 差异有统计学意义 ( $F=4\ 773.00, P<0.001$ )。划痕试验结果显示, MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞迁移率分别为  $(57.45\pm 5.20)\%$ 、 $(32.71\pm 10.02)\%$  和  $(17.77\pm 9.22)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=124.00, P<0.001$ ), 其中 si-MeCP2 组细胞迁移率明显低于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.001$ )。MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞中 Wnt3a 蛋白荧光强度 (A 值) 分别为  $75.92\pm 6.10$ 、 $52.03\pm 5.22$  和  $28.75\pm 3.39$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=221.30, P<0.001$ ), 其中 MeCP2-mimics 组显著高于 MeCP2-CN 组, si-MeCP2 组细胞中 Wnt3a 蛋白荧光强度明显低于 MeCP2-空质粒组和 MeCP2-拟似物组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.001$ )。si-MeCP2 组细胞内 E-cadherin 蛋白相对表达量明显高于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组, 细胞中  $\beta$ -catenin、Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 蛋白相对表达量明显低于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组, 差异有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞内 SFRP5 蛋白相对表达量分别为  $27.19\pm 0.03$ 、 $47.54\pm 0.05$  和  $74.93\pm 0.05$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=183.49, P<0.001$ ), 其中 si-MeCP2 组细胞内 SFRP5 蛋白相对表达量明显高于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.001$ )。结论 MeCP2 能刺激人 LECs 发生 EMT, 其作用机制可能与其靶向抑制 SFRP5 表达, 继而激活 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**【关键词】** 甲基化 CpG 集合蛋白 2; 人晶状体上皮细胞; 上皮-间质转化; 信号转导通路

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81770952); 河南省自然科学基金面上项目 (162300410296)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.007

## Regulation and its mechanism of MeCP2 on biological behavior and epithelial-mesenchymal transition of LECs

Niu Chao<sup>1</sup>, Wu Zhong<sup>1</sup>, Huang Yalin<sup>1</sup>, Zhang Ying<sup>1</sup>, Wang Yingfei<sup>1</sup>, Li Xiaohua<sup>1</sup>; Lu Wenlong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Sciences, People's Hospital of Zhengzhou University, People's Hospital of Henan University, Zhengzhou 450003, China; <sup>2</sup>School of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

Corresponding author: Li Xiaohua, Email: yksbls2390@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in the regulation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lens epithelial cells (LECs) and its possible mechanism.

**Methods** Human LEC lines (SRA01/04) were divided into MeCP2-mimic group, MeCP2-NC group and small interfering RNA-MeCP2 (si-MeCP2) group, and MeCP2 analog plasmid, blank plasmid and MeCP2 si-RNA

plasmid was used respectively to transfect the cells. The expression of MeCP2 mRNA in the cells was detected by using real-time PCR 24 hours after transfection. At 48 hours after transfection, the migration rate of the cells was evaluated by scratching test, and the expression of Wnt3a protein in the cells was detected by immunofluorescence staining. The relative expressions of  $\beta$ -catenin, E-cadherin, Vimentin, matrix metallo proteinase (MMP)-9, MMP-7 and secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) proteins in the cells were detected by Western blot. **Results** After 24 hours of transfection, the relative expression of MeCP2 mRNA in the cells was significantly different among the MeCP2-mimic group, MeCP2-NC group and si-MeCP2 group ( $F = 4 773.00, P < 0.001$ ). The migrating rate of the cells in the MeCP2-mimic group, MeCP2-NC group and si-MeCP2 group was  $(57.45 \pm 5.20)\%$ ,  $(32.71 \pm 10.02)\%$  and  $(17.77 \pm 9.22)\%$ , respectively, showing a significant difference among the three groups ( $F = 124.00, P < 0.001$ ), and the migrating rate of the cells in the si-MeCP2 group was significantly lower than that of the MeCP2-mimic group or MeCP2-NC group (both at  $P < 0.001$ ). The relative expressing intensity (absorbance) of Wnt3a in the cells of the MeCP2-mimic group, MeCP2-NC group and si-MeCP2 group was  $75.92 \pm 6.10$ ,  $52.03 \pm 5.22$  and  $28.75 \pm 3.39$ , respectively, with a significant difference among three the groups ( $F = 221.30, P < 0.001$ ), and the relative expressing intensity (absorbance) of Wnt3a in the cells was significantly lower in the si-MeCP2-mimic group than that of the MeCP2-NC group and MeCP2-mimic group (both at  $P < 0.001$ ). The relative expressing level of E-cadherin protein was significantly elevated and the expressions of  $\beta$ -catenin, Vimentin, MMP-9 and MMP-7 were significantly reduced in the si-MeCP2 group compared with the MeCP2-mimic group and MeCP2-NC group (all at  $P < 0.01$ ). The relative expressing level of SFRP5 protein in the MeCP2-mimic group, MeCP2-NC group and si-MeCP2 group was  $27.19 \pm 0.03$ ,  $47.54 \pm 0.05$  and  $74.93 \pm 0.05$ , respectively, showing a statistical difference among the three groups ( $F = 183.49, P < 0.001$ ), and the relative expressing level of SFRP5 in the si-MeCP2 group was significantly higher than that in the MeCP2-mimic group and MeCP2-NC group (both at  $P < 0.001$ ). **Conclusions** MeCP2C can promote EMT of human LECs by down-regulating the expression of SFRP5 and therefore activating the Wnt3a/ $\beta$ -catenin signal pathway.

**[Key words]** Methyl-CpG-binding protein 2; Lens epithelial cells, human; Epithelial-mesenchymal transition; Signal pathway

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81770952); Natural Science Foundation of Henan Province (162300410296)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.007

目前临床上白内障常用的治疗方法是超声乳化白内障摘出联合人工晶状体植入术<sup>[1]</sup>,但后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障术后的常见并发症,其主要原因是残余晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在生长因子的作用下迅速生长,同时细胞间黏附性下降,发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[2-3]</sup>,目前认为术后 LECs 的 EMT 过程在 PCO 形成中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。EMT 指上皮细胞失去极性而向具有间质表型的细胞转化的过程,上皮细胞黏附性降低,极性消失且移行能力增强<sup>[5]</sup>。Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路参与 EMT,当该通路激活时细胞质内  $\beta$ -catenin 浓度增加并进入细胞核,与淋巴增强因子/T 细胞转录因子结合为复合物,促进下游一系列细胞因子的转录,调控细胞 EMT 的发生<sup>[6-7]</sup>。甲基化 CpG 集合蛋白 2 (methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2) 属于 DNA 结合蛋白家族成员,在神经细胞发育、分化和肿瘤发展过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。近年来研究证实 MeCP2 参与多种眼科疾病的

发生和发展<sup>[9]</sup>,但关于 MeCP2 对人 LECs 生物学行为是否有调控作用尚未完全阐明。本研究拟探讨 MeCP2 对人 LECs 生物学行为的调控作用及其可能机制,为临床上 PCO 的治疗提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人 LECs SRA01/04 细胞株 (购自中科院上海细胞库); DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (杭州四季青生物工程材料有限公司); RIPA 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司); 鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体 (MA5-15739-D800)、羊抗人  $\beta$ -catenin (PA5-82544)、钙黏附蛋白 E (E-cadherin) (13-1900)、波形蛋白 (Vimentin) (MA5-16409)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo proteinase-9, MMP-9)-9 (MA5-14228)、MMP-7 (PA5-87486)、分泌型卷曲相关蛋白 5 (secreted frizzled-related protein 5, SFRP5) (PA5-30169) 抗体、DAPI (D3571)、lipofectamine 2000 转染试剂盒 (美国

Invitrogen 公司); Wnt3a 荧光一抗(ab219412)、荧光二抗(上海 Abcam 公司); MeCP2 过表达序列(MeCP2-拟似物)、MeCP2 空白质粒、小干扰 RNA-MeCP2 (small interfering RNA-MeCP2, si-MeCP2) 序列由上海玛吉基因公司合成。VANOX-S 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养与转染

将冻存的 SRA01/04 细胞株解冻,重悬于含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行培养,待细胞融合至 90% 以上时用胰蛋白酶消化重悬,按 1:2 的比例进行传代培养。转染前 24 h 将细胞接种于 6 孔板,细胞密度为  $2 \times 10^5$ /孔,转染时细胞丰度为 50%~60%,转染前更换培养液,各孔留 1.5 ml 液体,将 A 液(5  $\mu$ l MeCP2-拟似物/MeCP2-空白质粒/si-MeCP2+250  $\mu$ l DMEM)和 B 液(5  $\mu$ l lipofectamine 2000+250  $\mu$ l DMEM)分别充分混匀,常温放置 5 min,于 B 液内加适量 A 液,充分混匀后常温下静置 20 min。将上述混合液加入 6 孔板内,于培养箱中孵育 4~6 h,更换培养基,继续培养。根据转染的序列不同,分别转染 MeCP2-拟似物质粒(MeCP2-拟似物组)、MeCP2-空白质粒(MeCP2-空白质粒组)和 si-MeCP2 质粒(si-MeCP2 组),转染后 6 h 弃去原培养液,更换为含 FBS 和双抗的培养液,继续培养 24 h。

### 1.2.2 逆转录 PCR 法检测各组细胞中 MeCP2 mRNA 的表达

细胞转染后 24 h,Trizol 提取各组细胞 RNA,用氯仿/异丙醇处理后收集 RNA 沉淀,用体积分数 75% 乙醇洗涤,300 $\times$ g 离心后弃上清液,用 DEPC 水溶解 RNA。根据逆转录试剂盒说明,以  $\beta$ -actin 为内参进行 PCR 扩增。MeCP2 上游引物序列:5'-TAGCGCTTAGCGCCCATGTGC-3',下游引物序列 5'-TAGGCTAGCCCCTAGCTACA-3'; $\beta$ -actin 上游引物序列:5'-TAGCTAGGGCTTCGAAGTAGC-3',下游引物序列:5'-TAGCTAGCGGCTAGCCTACGA-3'。反应条件:95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 总延伸 6 min。取 5  $\mu$ l PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析,目的基因相对表达量=目标基因条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值。每组实验重复 3 次,取平均值。

### 1.2.3 划痕试验检测细胞迁移能力

细胞转染后 24 h 接种于 6 孔板,细胞密度为  $3 \times 10^5$ /孔,加入 2 ml 完全培养液,置于培养箱中孵育,待细胞融合至 80%~90% 时弃去原培养液,PBS 洗涤 3 遍,以不含血清的培养基饥饿培养 12 h,用灭菌移液枪头垂直于 6 孔板底部划

痕,PBS 洗去脱落细胞,显微镜下测量划痕宽度并拍照。加完全培养液继续培养 24 h,于光学显微镜下测量划痕宽度,每个样品取 5 个视野测量距离,计算细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h 划痕距离-24 h 划痕距离)/0 h 划痕距离 $\times$ 100%,每组设 5 个复孔,每组重复 3 次。

### 1.2.4 免疫荧光染色法检测细胞内 Wnt3a 蛋白表达

细胞转染后 48 h,室温下用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min,PSB 洗涤,于体积分数 0.1% Triton X-100 中渗透 5 min,用含质量分数 5% 牛血清蛋白的 PBS 在室温下封闭 1 h,滴加一抗(1:200)室温孵育 1 h,滴加荧光二抗,室温下孵育 1 h,DAPI 复染。荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image Pro Plus 6.0 软件对细胞吸光度(A)进行定量分析。每组细胞设置 5 个复孔,每个细胞培养孔制备一个样品,每张样品任意选取 5 个区域拍照并评估荧光强度,取平均值。

### 1.2.5 Western blot 法检测细胞内 $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-7 和 SFRP5 蛋白表达

细胞转染后 48 h 收集各组细胞,RIPA 裂解液提取总蛋白,将蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔进行电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,用质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 温和洗膜 3 min,滴加相应一抗,4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤 10 min,洗涤 3 次;滴加二抗,室温下孵育 1 h,TBST 洗涤 10 min,洗涤 3 次,加入配制好的 ECL 发光液,避光孵育 5 min,化学发光凝胶成像仪中采集图片信息,以  $\beta$ -actin 作为内参。采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度分析。每个实验重复 3 次,取平均值,每组细胞设置 6 个复孔,共 5 个样品。目标蛋白相对表达量=目标蛋白表达灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白表达灰度值。

## 1.2 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究定量指标数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 mean $\pm$ SD 表示,各组方差经 Levene 检验方差齐,采用均衡分组单因素干预三水平研究设计,MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组各检测指标差异总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

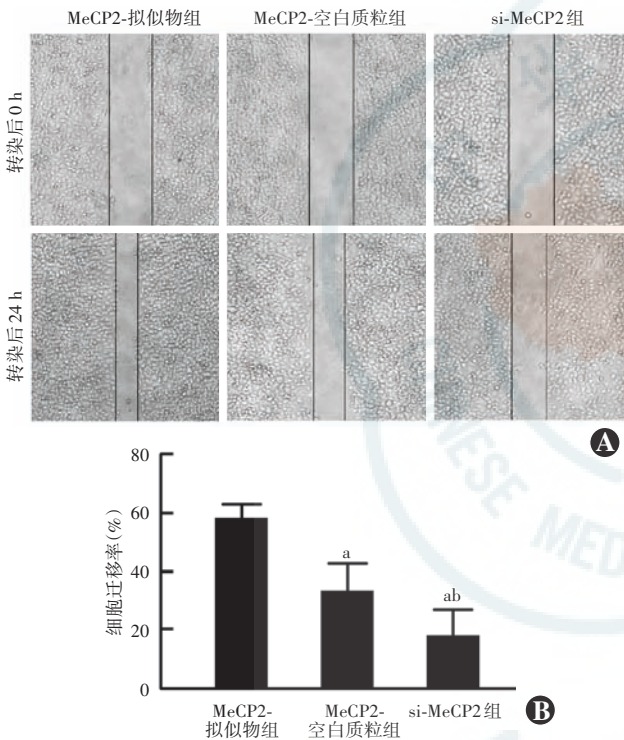
### 2.1 各转染组细胞中 MeCP2 mRNA 相对表达量比较

转染后 24 h,MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞中 MeCP2 mRNA 相对表达量分别为  $10.686 \pm 0.329$ 、 $1.495 \pm 0.274$  和  $0.238 \pm 0.016$ ,总体比较差异有统计学意义( $F = 4.773.00$ , $P < 0.001$ ),其中

si-MeCP2 组较 MeCP2-空质粒组细胞中 MeCP2 mRNA 相对表达量下降了 90%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各转染组细胞迁移率比较

细胞转染后 48 h, MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞迁移率分别为  $(57.45 \pm 5.20)\%$ 、 $(32.71 \pm 10.02)\%$  和  $(17.77 \pm 9.22)\%$ , 3 个组细胞间迁移率总体比较差异有统计学意义 ( $F = 124.00, P < 0.001$ ), 其中 MeCP2-拟似物组细胞迁移率高于 MeCP2-空质粒组, si-MeCP2 组细胞迁移率低于 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 1)。



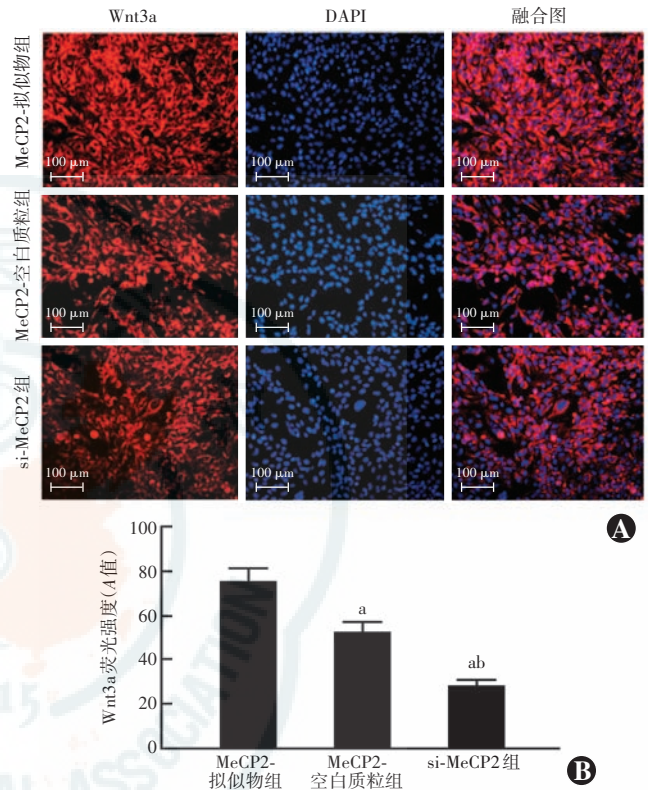
**图 1 各组细胞迁移率比较** A: 各组细胞划痕图 ( $\times 40$ ) B: 各组细胞迁移率量化比较 与 MeCP2-拟似物组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 MeCP2-空白质粒组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 5$ ) MeCP: 甲基化 CpG 集合蛋白; si-MeCP2: 小干扰 RNA-MeCP2

**Figure 1 Comparison of cell migration rate among various groups** A: Photograph of scratch in different groups ( $\times 40$ ) B: Comparison of the cell migration rate among various groups Compared with MeCP2-mimics group,  $^a P < 0.05$ ; compared with MeCP2-CN group,  $^b P < 0.05$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 5$ ) MeCP: methyl-CpG-binding protein; si-MeCP2: small interfering RNA-MeCP2

### 2.3 各转染组细胞内 Wnt3a 蛋白表达比较

细胞转染后 48 h, 单位面积内 MeCP2-拟似物组细胞质内可见大面积强荧光, MeCP2-空白质粒组细胞荧光强度明显弱于 MeCP2-拟似物组, 而 si-MeCP2 组细胞质内荧光强度弱于 MeCP2-空白质粒组。MeCP2-拟似物组、MeCP2-空白质粒组和 si-MeCP2 组细胞荧光强度分别为  $75.92 \pm 6.10$ 、 $52.03 \pm 5.22$  和  $28.75 \pm 3.39$ ,

组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 221.30, P < 0.001$ ), 其中 MeCP2 拟似物组细胞内 Wnt3a 蛋白荧光表达明显强于 MeCP2 空质粒组, si-MeCP2 组细胞中 Wnt3a 荧光强度弱于 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 2)。



**图 2 各组细胞中 Wnt3a 表达强度比较** A: 各组细胞免疫荧光染色图 可见 si-MeCP2 组细胞中 Wnt3a 表达强度明显弱于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组 ( $\times 200$ , 标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) B: 各组细胞中 Wnt3a 荧光强度比较 与 MeCP2-拟似物组比较,  $^a P < 0.05$  与 MeCP2-空质粒组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 6$ ) MeCP: 甲基化 CpG 集合蛋白; si-MeCP2: 小干扰 RNA-MeCP2; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

**Figure 2 Comparison of the expression of Wnt3a among various groups** A: Photograph of immunofluorescence in each group The expressing intensity of Wnt3a in the si-MeCP group was weakened in the MeCP2-mimics group in comparison with the MeCP2-CN group and MeCP2-mimics group ( $\times 200$ , bar =  $100 \mu\text{m}$ ) B: Comparison of fluorescence intensity of Wnt3a among various groups Compared with the MeCP2-mimics group,  $^a P < 0.05$ ; compared with the MeCP2-CN group,  $^b P < 0.05$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 6$ ) MeCP: methyl-CpG-binding protein; si-MeCP2: small interfering RNA-MeCP2; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

### 2.4 各转染组细胞内 $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-7 和 SFRP5 蛋白相对表达量比较

MeCP2-拟似物组、MeCP2-空质粒组和 si-MeCP2 组细胞中  $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 103.32, 124.97, 164.97, 212.87, 236.97$ , 均  $P <$

0.01), 其中 si-MeCP2 组和 MeCP2-空质粒组细胞内 E-cadherin 蛋白的相对表达量明显高于 MeCP2-拟似物组, si-MeCP2 组细胞内 E-cadherin 蛋白的相对表达量明显高于 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); si-MeCP2 组和 MeCP2-空质粒组细胞内  $\beta$ -catenin、Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 蛋白相对表达量明显低于 MeCP2-拟似物组, si-MeCP2 组细胞内  $\beta$ -catenin、Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 蛋白相对表达量明显低于 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 3, 表 1)。各组细胞内 Wnt3a 阻断因子 SFRP5 蛋白相对表达量总体比较, 差异有统计学意义( $F = 183.49, P < 0.001$ ), 其中 si-MeCP2 组和 MeCP2-空质粒组细胞内 SFRP5 蛋白相对表达量明显高于 MeCP2-拟似物组, si-MeCP2 组细胞内 SFRP5 蛋白相对表达量明显高于 MeCP2-空质粒组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 4, 表 1)。

**表 1 各组 SRA01/04 细胞内  $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-7 和 SFRP5 蛋白相对表达量比较 (mean $\pm$ SD)**

**Table 1 Comparison of expression of  $\beta$ -catenin, E-cadherin, Vimentin, MMP-9, MMP-7 and SFRP5 proteins in the cells among different groups (mean $\pm$ SD)**

组别	样本量	$\beta$ -catenin	E-cadherin	Vimentin	MMP-9	MMP-7	SFRP5
MeCP2-拟似物组	6	0.68 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.09	27.19 $\pm$ 0.03
MeCP2-空质粒组	6	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	47.54 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
si-MeCP2 组	6	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.87 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	74.93 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>
F 值		103.32	124.97	164.97	212.87	236.97	183.49
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

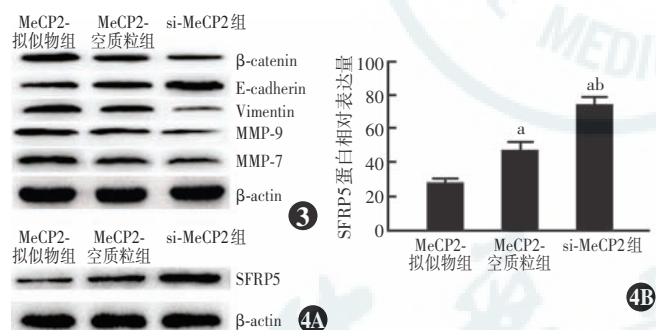
注: 与 MeCP2-拟似物组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 MeCP2-空质粒组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) E-cadherin: 钙黏附蛋白 E; Vimentin: 波形蛋白; MMP: 基质金属蛋白酶; SFRP: 分泌型 Frz 受体相关蛋白; MeCP: 甲基化 CpG 集合蛋白; si-MeCP2: 小干扰 RNA-MeCP2

Note: Compared with MeCP2-mimics group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with MeCP2-CN group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (ANOVA, LSD-*t* test) SFRP: secreted frizzled-related protein; MMP: matrix metalloproteinase; MeCP: methyl-CpG-binding protein; si-MeCP2: small interfering RNA-MeCP2

3 讨论

研究表明, EMT 是导致前囊膜下白内和 PCO 的主要病理机制。在 EMT 中, 残余 LECs 发生骨架应力纤维重排, 同时上皮表型消失, 细胞向后囊膜位置移动, 最终导致 PCO<sup>[4-5]</sup>。Wnt 通路在 EMT 过程中发挥重要作用, 当其被异常激活时该复合体破坏, 上皮细胞的标志性因子 E-cadherin 表达下降, 间质细胞的标志性因子 Vimentin 表达上调, 各种蛋白相互作用, 使细胞失去极性, 细胞内骨架蛋白重组, 细胞间连接变得疏松, 从而导致细胞黏附力下降, 移动能力增强, 进而发生迁移或侵袭<sup>[6-7]</sup>。同时, MMP-9 和 MMP-7 为 Wnt 信号通路的另外一组效应因子, 能降解细胞外基质和基底膜的关键酶, 其蛋白水解活性能促进细胞外基质蛋白组分的降解, 同时可诱导 EMT 过程<sup>[10]</sup>。Wnt 信号通路在视网膜发育、晶状体形成和眼部血管形成中均发挥重要作用<sup>[11-12]</sup>。Wnt 在晶状体发育过程中及成年人晶状体中均有表达, Wnt3a 过表达能促进 LECs 增生<sup>[11, 13]</sup>。

MeCP2 蛋白是甲基化结合蛋白家族成员之一, 通过与甲基化 DNA 的特异性结合而抑制转录基因<sup>[8]</sup>。研究证实, MeCP2 参与眼科疾病的发生和发展, 在增生性玻璃体视网膜病变的视网膜中大量表达<sup>[9]</sup>。Wnt 信号通路有多种调节因子, 其中包括 SFRP。SFRP 含有一个富含半胱氨酸结构域的蛋白质, 有 SFRP1~5 共 5 种亚型, 可与卷曲蛋白竞争性地结合 Wnt 配体, 从而阻断 Wnt 信号转导<sup>[14-15]</sup>。研究证实, MeCP2 能靶向 SFRP4, 在大鼠类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞中调节经典 Wnt 通路激活<sup>[16]</sup>。在肝癌细胞中 MeCP2 能诱导 SFRP1 甲基化, 导致 SFRP1 表达沉默,



**图 3 各组 SRA01/04 细胞内  $\beta$ -catenin、E-cadherin、Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 蛋白表达的比较** MeCP: 甲基化 CpG 集合蛋白; si-MeCP2: 微小 RNA-MeCP2; MMP: 基质金属蛋白酶; E-cadherin: 钙黏附蛋白 E; Vimentin: 波形蛋白;  $\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白 **图 4 各组细胞内 SFRP5 蛋白表达的比较** A: 各组细胞中 SFRP5 蛋白表达电泳图 si-MeCP2 组 SFRP5 蛋白表达明显强于 MeCP2-拟似物组和 MeCP2-空质粒组 B: 各组细胞中 SFRP5 蛋白相对表达量量化比较

**Figure 3 Comparison of expression of  $\beta$ -catenin, E-cadherin, Vimentin, MMP-9 and MMP-7 protein in SRA01/04 cells among various groups** MeCP: methyl-CpG-binding protein; si-MeCP2: small interfering RNA-MeCP2; MMP: matrix metalloproteinase **Figure 4 Comparison of SFRP5 protein expression among various groups** Compared with the MeCP2-mimics group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with MeCP2-CN group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 6$ ) SFRP: secreted frizzled-related protein; MeCP: methyl-CpG-binding protein; si-MeCP2: small interfering RNA-MeCP2

从而诱导 Wnt 信号通路活化<sup>[17]</sup>。

本研究中探讨 MeCP2 对人 LECs 的 EMT 过程的影响,结果显示过表达 MeCP2 的 SRA01/04 细胞迁移能力强于 MeCP2 正常表达和 MeCP2 沉默的细胞,说明 MeCP2 能刺激 SRA01/04 细胞的移行能力。为了验证这种作用是否是通过激活 EMT 过程而产生的,本研究中检测了 MeCP2 对 SRA01/04 细胞 Wnt 信号通路相关蛋白表达的影响,发现 MeCP2 表达增强的细胞内 Wnt3a 及  $\beta$ -catenin 的表达随之增强,转染 si-MeCP2 的细胞内 Wnt3a、 $\beta$ -catenin 的表达明显减弱,提示 MeCP2 对 Wnt 信号通路的活化有刺激作用。随着 MeCP2 过表达细胞内 Wnt 信号通路的激活,E-cadherin 表达随之减弱,Vimentin 表达随之增强,同时,MMP-9 和 MMP-7 的表达也强于转染空白质粒和 si-MeCP2 RNA 的细胞,而 si-MeCP2 组细胞内 E-cadherin 表达最强,Vimentin、MMP-9 和 MMP-7 的表达最弱,说明 MeCP2 能激活 Wnt 信号通路,进而刺激 SRA01/04 细胞发生 EMT。

为了进一步探讨 MeCP2 对 Wnt 信号通路的调控机制,本研究中进一步检测了 MeCP2 可能的靶基因,研究证实 SFRP5 是 Wnt3a 的阻断因子<sup>[18-19]</sup>,因此本研究检测了 MeCP2 表达程度不同的 SRA01/04 细胞中 SFRP5 的相对表达量,结果显示 MeCP2 过表达细胞内 SFRP5 的相对表达量最低,而 MeCP2 沉默的细胞中 SFRP5 相对表达量最高,提示 MeCP2 可能是通过抑制 SFRP5 的活性而激活 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路的。

综上所述,MeCP2 能刺激人 LECs 的 EMT 过程,这种作用可能是通过靶向抑制 SFRP5 基因表达、继而激活 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路实现的。但 MeCP2 对人 LECs 的 EMT 是否通过其他的靶向通路而起作用,及 MeCP2 对人 LECs 的其他生物学活性是否有调控作用仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [1] Lu C, Yu S, Song H, et al. Posterior capsular opacification comparison between morphology and objective visual function [J]. BMC Ophthalmol, 2019, 19(1): 40-49. DOI: 10.1186/s12886-019-1051-z.
- [2] 杨宝霞,王晔,赵晓雯,等.后囊膜混浊的体外上皮-间质转化模型的建立[J].中华实验眼科杂志,2016,34(3):210-217. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.004.
- [3] Yang BX, Wang Y, Zhao XW, et al. *In vitro* epithelial-mesenchymal transition model for LECs of human posterior capsule opacification[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(3): 210-217. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.004.
- [4] 侯定善,李睿姝,范妍,等.高糖条件下人视网膜色素上皮细胞的上皮-间质转化[J].中华实验眼科杂志,2015,33(1):21-26. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.005.
- [5] Hou DS, Li RS, Fan Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells under the high glucose condition

- [6] *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(1): 21-26. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.005.
- [4] 马君择,柏凌,刘子瑶,等.微小 RNA-30a 在后发性白内障中对上皮间质转化的调控机制[J].兰州大学学报:医学版,2018,44(4):16-22. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2018.04.003.
- [5] Ma JZ, Bai L, Liu ZY, et al. Mechanism of miR-30a regulates epithelial-mesenchymal transition in posterior capsule opacification[J]. J Lanzhou Univer: Med Sci, 2018, 44(4): 16-22. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2018.04.003.
- [5] Shao JZ, Qi Y, Du SS, et al. *In vitro* inhibition of proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells by fasudil [J]. Int J Ophthalmol, 2018, 11(8): 1253-1257. DOI: 10.18240/ijo.2018.08.02.
- [6] Li B, Wang S, Wang S. MiR-195 suppresses colon cancer proliferation and metastasis by targeting WNT3A [J]. Mol Genet Genomics, 2018, 293(5): 1245-1253. DOI: 10.1007/s00438-018-1457-y.
- [7] Zhang Z, Liu T, Yu M, et al. The plant alkaloid tetrandrine inhibits metastasis via autophagy-dependent Wnt/ $\beta$ -catenin and metastatic tumor antigen 1 signaling in human liver cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 7-11. DOI: 10.1186/s13046-018-0678-6.
- [8] Xu M, Bian S, Li J, et al. MeCP2 suppresses LIN28A expression via binding to its methylated-CpG islands in pancreatic cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 14476-14485. DOI: 10.18632/oncotarget.7507.
- [9] 郑珊珊,李晓华. MeCP2 在新生血管性眼病形成中的作用[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(18):17-18.
- [10] Zheng SS, Li XH. The role of MeCP2 in the formation of neovascular eye disease [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(18): 17-18.
- [10] 杨永光,鲁才杰,刘丽娟,等. Notch3 通过 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路介导基质金属蛋白酶-2/基质金属蛋白酶-9 调控肝癌侵袭转移[J].中华实验外科杂志,2018,35(4):655-658. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.04.018.
- [11] Yang YG, Lu CJ, Liu LJ, et al. Notch3 regulate invasion and metastasis of hepatic carcinoma by matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 mediated by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Chin J Exp Surg, 2018, 35(4): 655-658. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.04.018.
- [11] Liu TT, Zhang LM, Wang YY, et al. Dickkopf-1 inhibits Wnt3a-induced migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells [J]. Exp Eye Res, 2017, 161: 2564-2673. DOI: 10.1016/j.exer.2017.06.001.
- [12] Feng K, Guo HK. Eaf2 protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by Wnt signaling [J/OL]. Mol Med Rep, 2017. http://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC57834931. DOI: 10.3892/mmr.2017.8246.
- [13] Bao X, Song H, Chen Z, et al. Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells [J]. Mol Vis, 2012, 18: 1983-1990. DOI: 10.1186/1471-2199-13-24.
- [14] Heinosalo T, Gabriel M, Kallio L, et al. Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) expression promotes lesion proliferation via canonical WNT signaling and indicates lesion borders in extraovarian endometriosis [J]. Hum Reprod, 2018, 33(5): 817-823. DOI: 10.1093/humrep/dey026.
- [15] Xie J, Zhao T, Liu Y. Sonic hedgehog regulates the pathfinding of descending serotonergic axons in hindbrain in collaboration with Wnt5a and secreted frizzled-related protein 1 [J]. Int J Dev Neurosci, 2018, 66: 24-32. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2017.11.006.
- [16] Miao CG, Huang C, Huang Y, et al. MeCP2 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting SFRP4 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes in rats [J]. Cell Signal, 2013, 25(3): 598-608. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.11.023.
- [17] Quan H, Zhou F, Nie D, et al. Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncogene, 2014, 33(22): 2826-2835. DOI: 10.1038/onc.2013.225.
- [18] Lippert A, Janeczek AA, Fürstenberg A, et al. Single-molecule imaging of Wnt3A protein diffusion on living cell membranes [J]. Bio J, 2017, 113(12): 2762-2767. DOI: 10.1016/j.bj.2017.08.060.
- [19] Zhou J, Zhao L, Li B, et al. Nanorod diameter modulated osteogenic activity of hierarchical micropore/nanorod-patterned coatings via a Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Nanomedicine, 2018, 14(5): 1719-1731. DOI: 10.1016/j.nano.2018.04.006.

(收稿日期:2019-06-03 修回日期:2019-11-24)

(责任编辑:杜娟)