

# 慢病毒载体介导雷帕霉素靶蛋白沉默对体外人晶状体上皮细胞增生的抑制作用

王逸涵 柳林

**【摘要】** 背景 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在细胞的生长中发挥重要作用,其在人晶状体上皮细胞(HLECs)中的过度表达与白内障术后的并发症,如后发性白内障有关,将 mTOR 短发夹状 RNA(shRNA)质粒成功转染至 HLECs 可为寻找预防和治疗后发性白内障的靶点提供实验支持。目的 探讨 HLECs 中 mTOR 基因沉默后对细胞形态和功能的影响。方法 分别将 mTOR shRNA 质粒、空白质粒和 PBS 加入细胞培养液感染 293T 细胞以进行慢病毒包装。常规培养 HLECs,然后分别用各组包装成功的慢病毒感染 HLECs 72 h,分为 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组,空白质粒组和 PBS 组。利用 Western blot 法检测并比较不同组间 HLECs 中 mTOR 蛋白的表达以确定 mTOR 被沉默,从 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组中筛选出沉默效率最高组进行后续实验。采用流式细胞仪检测 G<sub>1</sub> 期 HLECs 细胞比例;采用 Western blot 法检测细胞中上皮和间质标志物  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和 E-Cadherin 蛋白的表达;采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测各组细胞的增殖能力。结果 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组 293T 细胞上清液中含有大量包装成功的慢病毒,对绿色荧光蛋白(GFP)呈阳性反应,而空白质粒组和 PBS 组未见 GFP 反应的绿色荧光。mTOR shRNA 转染 1、2、3 组及空白质粒组转染的质粒具有嘌呤抗性,转染后的 HLECs 均生长良好,mTOR shRNA 转染 1、2、3 组 80% 以上的细胞对 GFP 呈阳性反应,PBS 组细胞无嘌呤抗性,可见较多细胞死亡。Western blot 法检测显示 mTOR shRNA 转染 3 组 mTOR mRNA 表达最弱,用于后续实验。mTOR shRNA 转染 3 组  $\alpha$ -SMA 表达条带明显弱于空白质粒组和 PBS 组,而 E-Cadherin 表达明显强于空白质粒组和 PBS 组。CCK8 法检测证实,实验后 1 h、2 h 3 个组间细胞增殖值(A 值)的总体差异比较均有统计学意义,其中 mTOR shRNA 转染 3 组的细胞增殖值均明显低于空白质粒组和 PBS 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。流式细胞仪检测表明,mTOR shRNA 转染 3 组细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期的细胞比例约为 (60.00±1.78)%,明显高于空白质粒组的 (53.48±1.86)% 和 PBS 组的 (53.02±1.49)%,总体比较差异有统计学意义 ( $F = 18.910, P = 0.002$ )。结论 mTOR shRNA 转染 HLECs 后可使 mTOR 基因沉默,从而逆转 HLECs 中上皮-间质转化(EMT)的进程,抑制细胞增生,延长细胞周期。

**【关键词】** 慢病毒载体;短发夹状 RNA;后囊膜混浊;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;上皮-间质转化;晶状体;上皮细胞;基因沉默

## Suppression of lentiviral vector-mediated mTOR gene silencing on growth of human lens epithelial cell *in vitro*

Wang Yihan, Liu Lin. Department of Ophthalmology, First Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Liu Lin, Email: linliu@sh163.net

**[Abstract]** **Background** Mammalian target of rapamycin (mTOR) acts as a critical molecular link between growth signals and the processes underlying cell growth. The overexpression of mTOR in human lens epithelial cells (HLECs) is associated with posterior capsular opacification (PCO). Applying the mTOR shRNA transfection technique to silence mTOR in HLECs is significant for the targeting treatment of PCO. **Objective** This study was to investigate the function and morphology of HLECs infected by mTOR shRNA lentiviral vector. **Methods** 293T cells were transfected by recombinant plasmid containing mTOR shRNA, blank plasmid and PBS to prepare different lentiviral vectors. HLECs were routinely cultured and were divided into the mTOR shRNA transfected 1, 2, 3 groups, blank plasmid group and PBS group, and different lentiviral vectors were added in the medium to infect the cells. The expression of mTOR protein in HLECs was detected using Western blot to determine mTOR gene silence, and the group with the highest efficiency of silence was screened as the sequent experiment group. The proportion of HLECs in the G<sub>1</sub> phase was analyzed by flow cytometry. The expressions of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and E-Cadherin proteins in the cells were assayed by Western blot. The viability of HLECs was assessed by cell counting kit-8

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.008

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院眼科

通信作者:柳林,Email:linliu@sh163.net

(CCK8) test. **Results** Successfully packaged lentivirus were found in the supernatant after infection of mTOR shRNA in the mTOR shRNA transfected 1, 2, 3 groups with the green fluorescence in >80% cells, while green fluorescence protein (GFP) response was absent in the blank plasmid group and the PBS group. The HLECs of mTOR shRNA transfected groups and blank plasmid group grew well due to the resistance for puromycin of plasmid, however, more dead cells were found in the PBS group. Western blot revealed the weakest expression of mTOR mRNA in the cells in the mTOR shRNA transfected 3 group. The expressing bland of  $\alpha$ -SMA in the HLECs was weaker in the mTOR shRNA transfected 3 group than that in the blank plasmid group or PBS group, and the expression of E-Cadherin was stronger in the mTOR shRNA transfected 3 group than that in the blank plasmid group or PBS group. The absorbance of the mTOR shRNA transfected 3 group was significantly declined in comparison with the blank plasmid group and the PBS group, with significant difference among the three groups in both 1 hour and 2 hours after experiment (all at  $P < 0.05$ ). The proportion of cells in  $G_1$  phase was  $(60.00 \pm 1.78)\%$  in the mTOR shRNA transfected 3 group, which was significantly increased in comparison with  $(53.48 \pm 1.86)\%$  in the blank plasmid group and  $(53.02 \pm 1.49)\%$  in the PBS group ( $F = 18.910, P = 0.002$ ). **Conclusions** mTOR gene is silenced after mTOR shRNA plasmid transfected into HLECs. This procedure can invert the epithelial-mesenchymal transition (EMT), inhibit cell growth and put off cellular cycle in HLECs *in vitro*.

[**Key words**] Lentiviral vector; Short hairpin RNA; Posterior capsule opacification; Mammalian target of rapamycin; Epithelial-mesenchymal transition; Lens, crystal; Epithelial cells; Gene silence

后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 是超声乳化白内障摘出联合人工晶状体植入术后常见的并发症<sup>[1]</sup>。组织病理学证实,白内障术后保留的前囊膜及赤道部残存的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs) 不断增生、向后囊视轴区移行并发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是 PCO 发生的主要原因<sup>[2-3]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种进化高度保守的蛋白质,是调节细胞周期及细胞生长和增生的信号枢纽。mTOR 通路通过整合来自营养、能量、氧分压、氨基酸及生长因子的信号而作用于下游分子,改变下游分子活性并调节磷酸化,影响细胞内 mRNA 的翻译、核糖体生物合成、细胞凋亡等多种生物学功能,从而控制细胞的生长、增生和分化<sup>[4-7]</sup>。RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 是新型基因阻断技术,其中的短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 是采取质粒或者病毒载体表达的 siRNA<sup>[8]</sup>,较 siRNA 表达更持久且稳定,本实验探讨利用 shRNA 技术沉默 mTOR 基因对 HLECs 增生及凋亡的影响,在基因水平寻找针对 PCO 的预防和治疗方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

多位点抑制 mTOR shRNA (上海吉凯基因公司); 包膜质粒、包装质粒 (本实验室自行制备); DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 质粒抽提盒 [生物工程 (上海) 股份有限公司]; RIPA 蛋白裂解液、5 倍上样缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司);

醋酸纤维素膜 (聚偏氟乙烯) (polyvinylidene fluoride, PVDF) (美国 Bio-Rad 公司); 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)、嘌呤霉素 (美国 Sigma 公司); 抗 mTOR 抗体 (20657-1-AP)、 $\alpha$ -Tubulin 抗体 (11224-1-AP)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (14395-1-AP)、E-Cadherin 抗体 (20874-1-AP) (美国 Proteintech 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (111-035-003)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗 (111-035-012) (美国 Jackson 公司); ECL 发光液 (美国 Thermo 公司); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) (日本同仁公司); PI 染液 (美国 BD 公司)。曝光胶片 (美国柯达公司)。冻存 HLECs (美国模式培养物集存库)。

### 1.2 方法

**1.2.1 慢病毒包装** 293T 细胞 6 孔板铺板, 4.5 ml 含体积分数 10% FBS 的高糖 DMEM 培养, 待细胞 70% ~ 80% 融合备用。分别将 3 组特异性抑制 mTOR 的 shRNA 以及包装质粒、包膜质粒和 PEI 按比例加入 500  $\mu$ l 不含 FBS 的 DMEM 高糖培养液中, 设置为 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组; 在培养液中加入不含 mTOR 抑制靶点的空白质粒、包装质粒、包膜质粒和 PEI, 设置为空白质粒组; 将等容积 PBS 加入培养液中作为 PBS 组。5 组加样结束室温静置 15 min 后分别加入制备好的 293T 细胞中, 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养细胞。分别于培养 48、72 和 96 h 换液并收集各含慢病毒的上清液, 用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后分装, 4  $^{\circ}$ C 保存。长期需分装 -80  $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

**1.2.2 HLECs 培养及慢病毒感染** 将冻存 HLECs 置于 37  $^{\circ}$ C 水浴箱快速摇动, 于 1 min 内快速解冻。吸净

冻存管中液体,溶于盛装 3 ml 培养液的离心管中,离心半径 15 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液,再加入 3 ml 培养液,将细胞沉淀吹打混匀,培养在含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液中,37 ℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育。培养后 1 h 光学显微镜下即可见细胞贴壁生长。每隔 1~2 天换液 1 次,待细胞达 90% 融合时,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化 1:2 传代。6 孔板均匀铺板 HLECs,加入 2 ml 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,待细胞 50% 融合时分别加入 5 组前期制备含慢病毒的上清液 1 ml,标记为 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组, PBS 组和空白质粒组。继续培养 12 h,换液并再次加入对应慢病毒上清液进行二次感染,24 h 后再次换液并重复感染。第 3 次感染后 24 h 换液加入 2 μl 嘌呤霉素,筛选 3~4 d,观察各组细胞形态,必要时再次筛选,以获得最终存活的稳定细胞株。

**1.2.3 Western blot 法检测细胞中 mTOR、E-Cadherin、α-SMA 蛋白的表达** 按照筛选结果选择 mTOR shRNA 转染 3 组作为后续研究。在 100 μl 预冷改良 RIPA 裂解液中加入 5 μl PMSF 和 1 μl 蛋白酶抑制剂,配制混合蛋白裂解液。吸尽各组细胞培养基, PBS 清洗 1 遍,加入培养皿中,预冷刮刀将细胞从皿底刮下并置于 0.5 ml EP 管中,将细胞置于冰上裂解 30 min。4 ℃ 条件下、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,加入 5 倍上样缓冲液,100 ℃ 煮 7 min,冷却至室温后 -20 ℃ 保存。取适量蛋白样品进行聚丙烯酰胺蛋白分离,使用转移电泳装置将蛋白转印到 PVDF 膜,质量分数 10% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入 mTOR 一抗(1:500),4 ℃ 孵育过夜。PBST 液洗膜 3 次后加入 1:3 000 稀释的二抗,37 ℃ 孵育 30 min,再次用 PBST 洗 3 次。ECL 显色曝光,根据曝光结果选取抑制效率最高组蛋白样品相同方法进行 α-Tubulin、E-Cadherin、α-SMA 蛋白量检测,实验重复 3 次,观察 α-Tubulin 一致条件下 mTOR shRNA 转染 3 组、PBS 组和空白质粒组 HLECs 中 E-Cadherin 和 α-SMA 蛋白的表达。

**1.2.4 CCK8 法检测细胞的增生情况** 将筛选出的 mTOR shRNA 转染 3 组细胞分别加入 96 孔板,各组细胞设 3 个复孔,每孔约 150 μl 细胞悬液,保证细胞密度为 5×10<sup>3</sup>/ml。在 37 ℃ 条件下预孵育培养板 2~3 d,更换等容积培养液,向各孔中加入 10 μl CCK8 溶液。37 ℃ 条件下孵育 1~2 h,测定波长 450 nm 处的吸光度(A)值,观察 mTOR shRNA 转染 3 组、PBS 组和空白质粒组 HLECs 的增生情况。实验独立重复 3 次。

**1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期** 消化收集细胞于流式管中,每组细胞设 3 个复孔,约每管 1×10<sup>6</sup>/ml,

2 000 r/min 常温离心后弃培养液, PBS 洗 3 次,体积分数 70% 乙醇 4 ℃ 固定过夜,离心后弃去固定液, PBS 洗 3 次,离心弃上清。每管加入 200 μl PI 染液染色,常温避光反应 30 min 后检测细胞周期,对 mTOR shRNA 转染 3 组、PBS 组和空白质粒组不同细胞周期 HLECs 的比例进行比较。实验独立重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组单因素干预三水平实验设计, mTOR shRNA 转染组、空白质粒组和 PBS 组间各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验。采用双尾检验法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒包装及感染

mTOR shRNA 转染 1、2、3 组 293T 细胞上清液中含有大量包装成功的慢病毒,293T 细胞中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 反应阳性(图 1),而 PBS 组和空白质粒组未见绿色荧光。慢病毒感染后, HLECs 均呈典型上皮细胞样形态,融合均匀, mTOR shRNA 转染 1、2、3 组可见 80% 以上的细胞呈 GFP 反应阳性,而 PBS 组和空白质粒组 GFP 反应阴性。

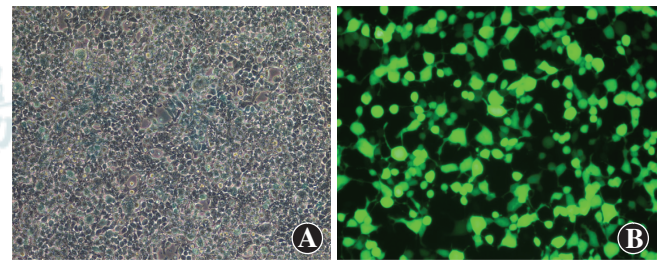


图 1 慢病毒包装转染结果(×100) A: 光学显微镜下可见 293T 细胞排列紧密 B: 荧光显微镜下可见 mTOR shRNA 转染 3 组 293T 细胞对 GFP 反应阳性,呈绿色荧光

### 2.2 HLECs 的转染效果

mTOR shRNA 转染 1、2、3 组及空白质粒组转染的质粒具有嘌呤抗性,故经 2 μg/ml 嘌呤霉素筛选后,极少数细胞死亡漂浮, HLECs 形态无明显变化,多次传代细胞稳定性较好。荧光显微镜下 mTOR shRNA 转染 1、2、3 组 GFP 阳性反应细胞均在 80% 以上(图 2)。空白质粒组细胞生长良好,未见 GFP 绿色荧光,而 PBS 组细胞则大量死亡。mTOR shRNA 转染 1、2、3 组及空白质粒组细胞生长良好,说明慢病毒感染 HLECs 成功,且感染效率较高,可以进行后续实验。

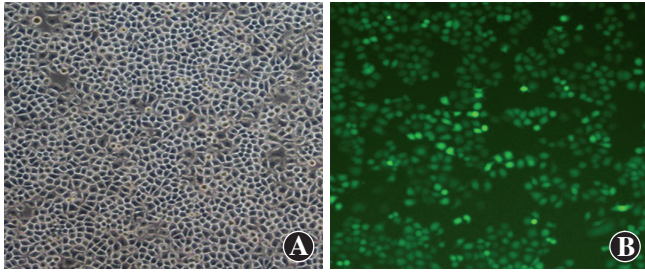


图 2 HLECs 慢病毒感染效率 ( $\times 100$ ) A: 光学显微镜下可见 mTOR shRNA 转染 3 组 HLECs 生长良好, 呈多角形, 形态均一, 互相融合 B: 同视野同组细胞对 GFP 反应阳性, 呈绿色荧光

### 2.3 各组 HLECs 中 mTOR 蛋白的表达

5 个组细胞中内参基因  $\alpha$ -Tubulin 的表达条带强度接近, mTOR shRNA 转染 1 组 mTOR 蛋白表达条带明显弱于空白质粒组和 PBS 组, mTOR shRNA 转染 2 组和 mTOR shRNA 转染 3 组未见 mTOR 蛋白的表达条带 (图 3), 选择 mTOR shRNA 转染 3 组细胞进入后续实验。

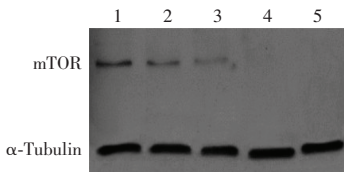


图 3 各组 HLECs 中 mTOR 的抑制效率比较 mTOR shRNA 转染 1 组 HLECs 中 mTOR 蛋白表达弱于 PBS 组和空白质粒组, mTOR shRNA 转染 2 组和 mTOR shRNA 转染 3 组未见 mTOR 蛋白表达条带 1: 空白质粒组 2: PBS 组 3: mTOR shRNA 转染 1 组 4: mTOR shRNA 转染 2 组 5: mTOR shRNA 转染 3 组 mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

### 2.4 各组 HLECs 中 $\alpha$ -SMA、E-Cadherin 蛋白表达

空白质粒组、PBS 组和 mTOR shRNA 转染 3 组 HLECs 中内参  $\alpha$ -Tubulin 蛋白反应条带强度相近, 空白质粒组及 PBS 组细胞中  $\alpha$ -SMA、E-Cadherin 蛋白表达强度均无明显差别, mTOR shRNA 转染 3 组细胞中的  $\alpha$ -SMA 蛋白表达明显弱于空白质粒组和 PBS 组, E-Cadherin 表达则明显强于空白质粒组及 PBS 组 (图 4)。

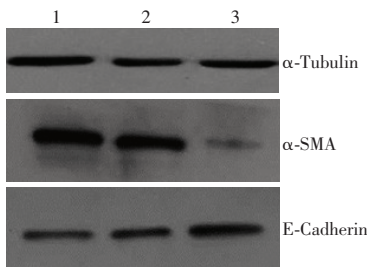


图 4 各组 HLECs 中上皮和间质标志物的表达 空白质粒组、PBS 组和 mTOR shRNA 转染 3 组细胞中内参  $\alpha$ -Tubulin 表达条带的强弱一致, mTOR shRNA 转染 3 组细胞中  $\alpha$ -SMA 蛋白表达条带明显弱于空白质粒组和 PBS 组, 而 E-Cadherin 蛋白条带强于空白质粒组和 PBS 组 1: 空白质粒组 2: PBS 组 3: mTOR shRNA 转染 3 组 SMA: 平滑肌肌动蛋白

### 2.5 各组细胞增生活性的比较

培养液中添加 CCK8 后 1 h、2 h、3 次独立实验结果显示 mTOR shRNA 转染 3 组、空白质粒组和 PBS 组间 HLECs 增值值 ( $A$  值) 的总体差异均有统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 其中 mTOR shRNA 转染 3 组的细胞增

生值均明显低于空白质粒组和 PBS 组 (均  $P < 0.05$ ) (表 1, 2)。

表 1 不同组实验后 1 h 3 次独立实验检测的 HLECs 的增值值 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)

组别	样本量	3 次独立实验细胞增值值		
		第 1 次	第 2 次	第 3 次
mTOR shRNA 转染 3 组	3	1.272 $\pm$ 0.712	1.280 $\pm$ 0.810	1.150 $\pm$ 0.522
空白质粒组	3	1.711 $\pm$ 0.246 <sup>a</sup>	1.709 $\pm$ 0.293 <sup>a</sup>	1.759 $\pm$ 0.367 <sup>a</sup>
PBS 组	3	1.776 $\pm$ 0.881 <sup>a</sup>	1.794 $\pm$ 0.306 <sup>a</sup>	1.840 $\pm$ 0.375 <sup>a</sup>
P		0.043	0.021	0.010

注: 与各次实验的 mTOR shRNA 转染 3 组值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) HLECs: 人晶状体上皮细胞; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; shRNA: 短发夹状 RNA

表 2 不同组实验后 2 h 3 次独立实验检测的 HLECs 的增值值 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)

组别	样本量	3 次独立实验细胞增值值		
		第 1 次	第 2 次	第 3 次
mTOR shRNA 转染 3 组	3	1.698 $\pm$ 0.465	1.732 $\pm$ 0.387	1.734 $\pm$ 0.655
空白质粒组	3	3.146 $\pm$ 1.429 <sup>a</sup>	3.181 $\pm$ 0.709 <sup>a</sup>	3.181 $\pm$ 1.182 <sup>a</sup>
PBS 组	3	3.258 $\pm$ 1.511 <sup>a</sup>	3.279 $\pm$ 1.026 <sup>a</sup>	3.245 $\pm$ 1.313 <sup>a</sup>
P		0.015	0.001	0.009

注: 与各次实验的 mTOR shRNA 转染 3 组值比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) HLECs: 人晶状体上皮细胞; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; shRNA: 短发夹状 RNA

### 2.6 各组 G<sub>1</sub> 期细胞比例的比较

3 次独立实验均显示, mTOR shRNA 转染 3 组、空白质粒组和 PBS 组在 G<sub>1</sub> 期的细胞比例的总体差异均有统计学意义 ( $P = 0.003, 0.001, 0.002$ ), 其中 mTOR shRNA 转染 3 组 G<sub>1</sub> 期细胞比例明显高于空白质粒组和 PBS 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 不同组 3 次独立实验检测的 G<sub>1</sub> 期 HLECs 细胞比例 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	3 次独立实验细胞比例		
		第 1 次	第 2 次	第 3 次
mTOR shRNA 转染 3 组	3	60.00 $\pm$ 1.78	60.05 $\pm$ 1.03	59.58 $\pm$ 1.49
空白质粒组	3	53.48 $\pm$ 1.86 <sup>a</sup>	53.54 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	53.67 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>
PBS 组	3	53.02 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	52.47 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	52.93 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
F		18.910	26.070	21.310
P		0.002	0.001	0.002

注: 与各次实验的 mTOR shRNA 转染 3 组值比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) HLECs: 人晶状体上皮细胞; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; shRNA: 短发夹状 RNA

## 3 讨论

白内障囊外摘出术后残留的 LECs 在局部环境改变, 尤其是转化生长因子- $\beta$  等炎性因子的刺激下, 不

断增生移行,导致 PCO<sup>[9]</sup>,发生 EMT,而后囊膜的皱缩及扭曲则加重了视物障碍。

慢病毒载体可以广泛而稳定地作用于多种难以感染的细胞,并且对分裂期和非分裂期细胞均有感染作用,免疫原性较低,操作和生产相对容易<sup>[10]</sup>,目前已在重组蛋白表达、持久性基因沉默、免疫学、多能干细胞的诱导等领域得到广泛应用<sup>[11]</sup>。本实验通过慢病毒包装、感染获得低 mTOR 表达 HLECs 细胞株,细胞多次传代形态均一旦性状稳定,shRNA 抑制效率极高,且 mTOR shRNA 转染 2 组、mTOR shRNA 转染 3 组抑制表达尤明显。并且 mTOR 低表达后细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub>期,细胞的分裂速度明显减慢,且生长增生减缓。同时一些上皮标志物,如 E-Cadherin 表达增强,间质标志物,如  $\alpha$ -SMA 表达减弱,均显示 mTOR 是上皮细胞 EMT 过程中重要的作用蛋白,通过抑制其表达可以减弱 EMT 的进程,并在一定程度上逆转该过程。

PI3K/Akt/mTOR 通路是调控细胞生长和增生的主要途径,Akt 可直接磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点,激活 mTOR 及其下游途径,加快 cyclin D1、CDK4、CDC25A 和 Rb 的磷酸化,促进 G<sub>1</sub>期的发展,促进细胞增生。Rozen-Zvi 等<sup>[12]</sup>研究表明,Akt/mTORC1 通路的激活还可引起细胞间胶原沉积,破坏上皮细胞间的紧密连接,同时通过对缺氧反应元件的激活与抑制间接调控缺氧诱导因子的表达,加强细胞侵袭力,改变细胞性状。Gulhati 等<sup>[13]</sup>研究发现,mTORC1 和 mTORC2 通过 RhoA、Rac 1 介导细胞的增生、移行和 EMT 过程。转录因子 Snail、Twist 被证明可能也参与了 EMT 过程,特异性降低 Rictor 和 Raptor 的表达,Snail 和 Twist 均下调,E-Cadherin 的表达上升<sup>[14]</sup>。虽然已经发现 mTOR 联系上下游多条通路介导 EMT,但详细的调控机制至今仍不清楚。PI3K/Akt 可通过其间复杂多样的通路直接或间接激活 mTOR,引发下游生物效应。可进一步研究联合阻断引起的生物学改变,以达到最大限度抑制的同时不改变其他正常生物功能的目的,未来或可作为疾病治疗的研究目标之一。

以往降低 mTOR 表达主要通过使用雷帕霉素等抑制剂,但是由于药物本身的毒性及半衰期的限制,长期的动物实验并未得出令人满意的结论,而使用慢病毒包装含有特异性抑制靶点的 shRNA 可以获得 mTOR 低表达的稳定细胞株,这在很多肿瘤疾病中已经得到了验证<sup>[15]</sup>。本实验中成功地进行特异性慢病毒包装,并且高效感染 HLECs,有效降低了 mTOR 的表达。获得稳定株之后进行相关检测,与雷帕霉素等抑制剂结果相同,即细胞增生明显减慢,细胞周期延

长,E-Cadherin 表达升高, $\alpha$ -SMA 的表达降低<sup>[16]</sup>,再次证明 mTOR 通路是介导细胞发生 EMT 的重要通路之一。shRNA 的应用有效控制了 EMT,在体外 HLECs 中稳定发挥作用,为安全、有效地预防和治疗 PCO 提供了新的思路和方法。

## 参考文献

- [1] Gotoh N, Perdue NR, Matsushima H, et al. An in vitro model of posterior capsular opacity: SPARC and TGF- $\beta$ <sub>2</sub> minimize epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(10): 4679-4687. doi: 10.1167/iovs.07-0091.
- [2] Yazici AT, Bozkurt E, Kara N, et al. Long-term results of phacoemulsification combined with primary posterior curvilinear capsulorhexis in adults [J]. Middle East Afr J Ophthalmol, 2012, 19(1): 115-119. doi: 10.4103/0974-9233.92126.
- [3] Varga A, Sacu S, Vécsei-Marlovits PV, et al. Effect of posterior capsule opacification on macular sensitivity [J]. J Cataract Refract Surg, 2008, 34(1): 52-56. doi: 10.1016/j.jcrs.2007.08.024.
- [4] Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway [J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(6): 596-603. doi: 10.1016/j.ceb.2005.09.009.
- [5] Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(3): 133-139. doi: 10.1038/nrm3522.
- [6] Saqceña M, Menon D, Patel D, et al. Amino acids and mTOR mediate distinct metabolic checkpoints in mammalian G<sub>1</sub> cell cycle [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(8): e74157 [2014-04-24]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074157. doi: 10.1371/journal.pone.0074157.
- [7] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance [J]. J Cell Sci, 2009, 122(20): 3589-3594. doi: 10.1242/jcs.051011.
- [8] 游燊,涂旺招,王耀东. mTOR shRNA 慢病毒载体的构建及包装 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(5): 534-537. doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2013.05.01.
- [9] 林婷婷,王思敏,刘加勇,等. 雷帕霉素对转化生长因子- $\beta$  诱导的人晶状体上皮细胞上皮-间叶样转化的抑制作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(4): 347-351. doi: 10.3760/cma.j.issn.209543160.2013.04.009.
- [10] 孙静,孙强明,李建芳,等. EB 病毒 BHRF1 基因慢病毒载体的构建及功能鉴定 [J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(6): 1197-1201. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2013.06.09.
- [11] Sakuma Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational [J]. Biochem J, 2012, 443(3): 603-618. doi: 10.1042/BJ20120146.
- [12] Rozen-Zvi B, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 activates mammalian target of rapamycin complex-1 and promotes collagen production by increasing HIF-1 $\alpha$  expression [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(4): F485-494. doi: 10.1152/ajprenal.00215.2013.
- [13] Gulhati P, Bowen KA, Liu J, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways [J]. Cancer Res, 2011, 71(9): 3246-3256. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4058.
- [14] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer [J]. Development, 2005, 132(14): 3151-3161. doi: 10.1242/dev.01907.
- [15] Hou G, Xue L, Lu Z, et al. An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR [J]. Cancer Lett, 2007, 253(2): 236-248. doi: 10.1016/j.canlet.2007.01.026.
- [16] Liu H, Feng G, Wu L, et al. The effects of rapamycin on lens epithelial cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study [J]. Mol Vis, 2010, 16: 1646-1653.

(收稿日期:2014-09-04)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)