

敲低 *LOXLI* 基因对 HLECs 中弹性蛋白表达及细胞生物学行为的抑制作用

董月 玛依努 易湘龙

新疆医科大学第一附属医院眼科, 乌鲁木齐 830054

通信作者: 易湘龙, Email: yixianglong1010@163.com

【摘要】 目的 探讨敲低赖氨酰氧化酶样蛋白 1 (*LOXLI*) 基因对人晶状体上皮细胞 (HLECs) 中弹性蛋白的表达、聚集程度以及对 HLECs 增生活力及迁移能力的影响。方法 体外培养人晶状体上皮细胞系 HLE-B3, 将细胞分为 shLOXLI-1 组、shLOXLI-2 组、shLOXLI-3 组和正常对照组, 通过不同序列的慢病毒转染方法对 shLOXLI-1 组、shLOXLI-2 组和 shLOXLI-3 组细胞进行 *LOXLI* 基因敲低干预, 对正常对照组进行无意义序列慢病毒转染干预。采用实时荧光定量 PCR 法检测各转染组细胞的 *LOXLI* mRNA 相对表达量; 采用免疫荧光法检测 HLE-B3 中弹性蛋白的荧光强度; 采用 Western blot 法检测 HLE-B3 中弹性蛋白的表达; 采用电子显微镜扫描法检测 HLE-B3 中弹性蛋白的含量及聚集程度; 采用细胞划痕实验检测 HLE-B3 的迁移率; 采用细胞计数试剂盒 8 法检测 HLE-B3 的增生活力。结果 敲低 *LOXLI* 基因后, shLOXLI-1、shLOXLI-2、shLOXLI-3 组 *LOXLI* mRNA 相对表达量均低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 其中 shLOXLI-3 组敲低效果最佳, 故选取 shLOXLI-3 组与正常对照组进行后续实验并对比。免疫荧光染色后可见弹性蛋白稳定表达于 HLE-B3 细胞中, shLOXLI-3 组弹性蛋白的平均荧光强度为 56.96 ± 5.56 , 明显低于正常对照组的 80.52 ± 4.78 , 差异有统计学意义 ($t = 5.572, P < 0.001$)。shLOXLI-3 组弹性蛋白相对表达量为 0.807 ± 0.002 , 明显低于正常对照组的 1.185 ± 0.064 , 差异有统计学意义 ($t = 5.802, P < 0.01$)。电子显微镜下可见 shLOXLI-3 组弹性蛋白密度低于正常对照组, 但其形态、大小、聚集程度未见明显改变。培养 24 h 和 48 h 时 shLOXLI-3 组细胞相对迁移率为 0.292 ± 0.041 和 0.439 ± 0.032 , 均低于正常对照组的 0.463 ± 0.017 和 0.719 ± 0.007 , 差异均有统计学意义 ($t = 8.178, 2.611$, 均 $P < 0.05$)。培养 24、48、72、96 h, shLOXLI-3 组细胞活力值均低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 2.555, 2.704, 6.695, 7.266$, 均 $P < 0.05$)。结论 在 HLECs 中, 敲低 *LOXLI* 基因可引起弹性蛋白表达水平明显下降, 同时细胞迁移能力和细胞增生活力均下降。

【关键词】 赖氨酰氧化酶样蛋白 1; 剥脱综合征; 弹性蛋白; 迁移; 增生

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2023D01C102)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230911-00095

Inhibitory effect of knocking down *LOXLI* gene on elastin expression and cell biological behavior in HLECs

Dong Yue, Ma Yinu, Yi Xianglong

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Yi Xianglong, Email: yixianglong1010@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of knocking down the lysyl oxidase-like protein 1 (*LOXLI*) gene on the expression and aggregation of elastin in the human lens epithelial cells (HLECs), as well as its impact on the proliferation activity and migration ability of HLECs. **Methods** The human lens epithelial cell line HLE-B3 was cultured *in vitro* and divided into shLOXLI-1 group, shLOXLI-2 group, shLOXLI-3 group, and normal control group. The shLOXLI-1 group, shLOXLI-2 group, and shLOXLI-3 group cells were subjected to *LOXLI* gene knockdown intervention using different sequences of lentiviral transfection methods, while the normal control group was subjected to meaningless sequence lentiviral transfection intervention. The relative expression level of *LOXLI* mRNA in different groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The fluorescence intensity of elastin in HLE-B3 was determined by immunofluorescence. The expression of elastin in HLE-B3 was detected by Western blot. The content and aggregation degree of elastin in HLE-B3 was detected by electron microscopy scanning. The migration rate of HLE-B3 was detected by cell scratch assay. The proliferation activity of HLE-B3 was detected using the cell

counting kit 8. **Results** After knocking down the *LOXLI* gene, the relative expression levels of *LOXLI* mRNA were lower in the shLOXLI-1, shLOXLI-2, and shLOXLI-3 groups than those in the normal control group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.001$). The shLOXLI-3 group had the best knockdown effect, so the shLOXLI-3 group was selected for subsequent experiments and compared with the normal control group. After immunofluorescence staining, stable expression of elastin was observed in HLE-B3 cells. The average fluorescence intensity of elastin in the shLOXLI-3 group was 56.96 ± 5.56 , significantly lower than 80.52 ± 4.78 in the normal control group ($t = 5.572, P < 0.001$). The relative expression level of elastin in the shLOXLI-3 group was 0.807 ± 0.002 , significantly lower than 1.185 ± 0.064 in the normal control group ($t = 5.802, P < 0.01$). Under the electron microscope, the elastin density in the shLOXLI-3 group was lower than that in the normal control group, but its morphology, size, and aggregation degree did not show significant changes. At 24 and 48 hours after transfection, the relative migration rates of shLOXLI-3 group cells were 0.292 ± 0.041 and 0.439 ± 0.032 , which were lower than 0.463 ± 0.017 and 0.719 ± 0.007 of normal control group, respectively, and the differences were statistically significant ($t = 8.178, 2.611$; both at $P < 0.05$). After 24, 48, 72, and 96 hours of cultivation, the cell viability values of shLOXLI-3 group were lower than those of normal control group, and the differences were statistically significant ($t = 2.555, 2.704, 6.695, 7.266$; all at $P < 0.05$). **Conclusions** Knocking down the *LOXLI* gene in HLECs can cause a significant decrease in the expression level of elastin in the cells, as well as decreases in cell migration ability and proliferation activity.

[Key words] Lysyl oxidase-like protein 1; Exfoliation syndrome; Elastin; Migration; Proliferation

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023D01C102)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230911-00095

剥脱综合征 (exfoliation syndrome, XFS) 是一种与年龄相关, 以细胞外基质中的弹性蛋白成分过度增生、降解不足以及异常交联为主要病理改变的全身性疾病^[1-2]。该病累及全身多个器官, 其中眼部是其主要受累器官^[3]。XFS 眼部临床特征为不同眼组织细胞如睫状体上皮细胞、晶状体上皮细胞、虹膜色素上皮细胞等均参与产生大量的剥脱物质^[4-5], 积聚在眼前节并阻塞小梁网, 引起眼压升高和视神经受损^[6-9], XFS 与白内障的发生也有很强的相关性^[10-11]。剥脱物质是由于微纤维成分过度产生和无序组装成的原纤维聚集体^[12], 主要含有弹性纤维成分, 如弹性蛋白等^[13-15]。XFS 的发病机制复杂, 包括多基因表达的相互作用、表观遗传因素与环境因素 (如地理纬度、紫外线照射、氧化应激、低叶酸摄入等)^[16], 大量研究表明遗传因素是 XFS 的主要影响因素, 目前已发现多个基因与 XFS 相关^[17]。全基因组关联性分析将赖氨酰氧化酶样蛋白 1 (lysyl oxidase-like protein 1, *LOXLI*) 基因确定为 XFS 的主要易感位点^[18]。*LOXLI* 是一种交联基质酶, 催化结缔组织中弹性蛋白的产生及其共价交联, 并作为核心成分参与弹性纤维的合成^[19-22]。目前的研究表明, *LOXLI* 基因在剥脱物质原纤维的形成和积累中发挥了重要作用, XFS 患者的几乎所有眼组织中, *LOXLI* 基因和弹性成分在疾病早期均瞬时上调^[23]。而下调 *LOXLI* 基因是否能抑制弹性成分的产生, 减少 XFS 中剥脱物质的生成尚不清楚。此外, 由于 XFS 与白内障

关系密切, 抑制 *LOXLI* 基因的表达是否可以通过改变人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs) 的部分功能而延缓白内障的发展也有待探讨。本研究拟探讨 *LOXLI* 基因低表达对人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 中弹性蛋白的作用以及对 HLE-B3 部分功能的影响, 以期抑制 XFS 中剥脱物质的产生及延缓 XFS 中白内障的发展提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HLE-B3 细胞株购自上海通派生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 MEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 人 *LOXLI* 慢病毒、嘌呤霉素、Polybrene 助转剂 (江苏汉恒生物科技有限公司); CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司); 组织细胞 RNA 提取试剂盒 (北京金式金生物公司); 反转录试剂盒、TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 兔抗 *LOXLI* 多克隆抗体 (26608-1-AP)、兔抗 Elastin 多克隆抗体 (15257-1-AP)、兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (10494-1-AP)、羊抗兔 HRP 标记亲和纯化山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (SA00001-2)、CoraLite594 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 荧光二抗 (SA00013-4)、ECL 化学发光检测试剂盒 (武汉三鹰生物技术有限公司); SDS-PAGE 凝胶制备

试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Nanodrop 分光光度计(美国 Thermo 公司);SDS-PAGE 蛋白电泳仪(上海天能科技有限公司);凝胶成像仪(上海天能生命科学有限公司);SEM 电子显微镜(日本电子公司)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒转染构建稳定转染细胞株

将 HLE-B3 培养于 90% MEM、10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素链霉素配制成的完全培养基中,置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养。将处于对数生长期的 HLE-B3 细胞接种至 6 孔板(2×10⁵ 个/孔),由于转染慢病毒的 shRNA 序列不同,敲低效率也不同,将 3 个不同 shLOXL1 转染序列慢病毒转染后的细胞分为 shLOXL1-1 组、shLOXL1-2 组、shLOXL1-3 组 3 个转染 shLOXL1 组,将转染无意义序列慢病毒的细胞作为正常对照组,次日细胞贴壁后弃上清,PBS 清洗后每孔加入 497.5 μl MEM 和 2.5 μl Polybrene,根据预实验检测出 HLE-B3 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 10,通过慢病毒滴度根据每孔加入慢病毒量(μl)=MOI×细胞数/病毒滴度(TU/ml)×1 000 公式计算出慢病毒体积(HBLV-h-LOXL1 shRNA1-ZsGreen-PURO 20 μl; HBLV-h-LOXL1 shRNA2-ZsGreen-PURO 13.3 μl; HBLV-h-LOXL1 shRNA3-ZsGreen-PURO 20 μl; HBLV-ZsGreen-PURO 正常对照 10 μl),并分别均匀加入对应组的 MEM 中进行转染,将 6 孔板置于细胞培养箱中培养 48 h 后于荧光显微镜下观察荧光,细胞生长至 70%~80% 移入培养瓶继续培养。培养基中加入嘌呤霉素(2 μg/ml)筛选 1 周,待未被转染细胞完全死亡,4 个组稳定转染细胞株建立。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 LOXL1 的敲低效率

采用 RNA 提取试剂盒对 4 个组转染 2 周后的 HLE-B3 细胞进行 RNA 提取,Nanodrop 仪器测定提取的 RNA 浓度,根据 RNA 浓度计算去除基因组 DNA 时加入 RNA 体积,每个反应管中加入 5×gDNA Eraser Buffer 2 μl、gDNA Eraser 1 μl、计算好体积的 RNA,并用 ddH₂O 补至 10 μl,于室温放置 30 min 去除 DNA。每个反应管中继续加入 Prime Script RT Enzyme Mix I 1 μl、RT Primer Mix 1 μl、5×Prime Script Buffer 2 (for Real Time) 4 μl、ddH₂O 4 μl,于热循环仪中 37 °C 15 min、85 °C 5 s 后冷却置于 4 °C 环境中,将 RNA 逆转录成 cDNA。于八联排管每组每个基因设置 3 个复孔,每孔内加入 TB Green Premix Ex Taq II 5 μl、ROX Reference Dye II 0.2 μl、ddH₂O 3 μl、相应 cDNA 1 μl、LOXL1 基因或 GAPDH 基因正向引物及反向引物各

0.4 μl、在 QuantStudio 1 Plus PCR 仪上设置两步法 PCR 扩增标准程序(95 °C 预变性 30 s,循环 1 次;95 °C 变性 5 s、60 °C 退火及延伸 34 s,循环 40 次)进行 PCR 反应。引物序列见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 LOXL1 mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

基因	引物序列
LOXL1	正向:5'-CCTGTGACTTCGGCAACCTCAAG-3'
	反向:5'-TGTCGCATTGTAGGTGCATAGC-3'
GAPDH	正向:5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTAC-3'
	反向:5'-ATTGCTGATCTTGAGGCTGTTG-3'

注:LOXL1:赖氨酰氧化酶样蛋白 1;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶
Note: LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.3 免疫荧光法对弹性蛋白定位检测

将转染 4 周后的 HLE-B3 接种至 6 孔板(2×10⁵ 个/孔),贴壁后每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 20 min,清洗,每孔加入 0.5% Triton-100 500 μl 透膜 20 min,清洗,2% BSA 封闭 30 min 后加入 Elastin 一抗(稀释比例 1:1 000),4 °C 孵育过夜。次日清洗后加入免疫荧光二抗室温下避光孵育 1 h(稀释比例 1:500),清洗后每孔加入含抗荧光淬灭剂的 DAPI 500 μl 进行核染色 5 min,再次清洗后于荧光显微镜下进行观察,弹性蛋白呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测弹性蛋白的表达

转染 4 周后,采用 100:1 比例配制的蛋白裂解液 RIPA Buffer 与蛋白抑制剂 PMSF 抽提各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白样品浓度,加入蛋白上样缓冲液及 ddH₂O 制备相同浓度的蛋白上样样品。SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒制胶,每孔蛋白上样量 20 μl,进行电泳后电转印至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶孵育 2 h 封闭后置于 Elastin 一抗(稀释比例 1:2 000)及 GAPDH 一抗(稀释比例 1:10 000),4 °C 孵育过夜,次日洗膜后常温下避光孵育羊抗兔二抗(稀释比例 1:5 000)1 h,ECL 化学发光试剂进行化学发光反应,凝胶成像仪拍照。以 GAPDH 为内参,采用 ImageJ 分析软件分析各条带灰度值。目的蛋白相对表达量=目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。实验重复 3 次。

1.2.5 SEM 电子显微镜观察 HLE-B3 表面弹性蛋白的超微结构及其聚集程度

将转染 4 周的 HLE-B3 胰蛋白酶消化后沉淀至 8 mm×8 mm 硅片上,待培养

6 h 细胞贴壁后清洗,4%多聚甲醛固定 30 min,30%、50%、70%、80%、90%浓度乙醇梯度脱水各 15 min,100%浓度乙醇脱水 2 次,每次 15 min。置于 60 °C 烤箱干燥 4 h 后取出,于电子显微镜下观察细胞外基质中弹性蛋白形态及聚集程度。实验重复 3 次。

1.2.6 细胞划痕实验检测 HLE-B3 的迁移率 将转染 4 周的 HLE-B3 接种至 6 孔板(2×10^5 个/孔),次日用 100 μ l 无菌枪头垂直于 6 孔板在细胞层进行划痕,使用 PBS 清洗掉不贴壁的细胞,更换为 2% 胎牛血清培养基置于 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱中进行培养。分别于划痕后 0、24、48 h 在显微镜下观察划痕宽度并拍照记录。根据公式细胞迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 培养后划痕宽度) / 0 h 划痕宽度计算细胞迁移率。实验重复 3 次。

1.2.7 CCK-8 实验检测 HLE-B3 的增殖值 将转染 4 周处于对数生长期的 HLE-B3 用胰蛋白酶消化后稀释成 3×10^4 /ml 密度混悬液,接种于 5 个 96 孔板中,每孔 100 μ l,每组细胞 5 个复孔,置于 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱中,贴壁后于 0、24、48、72、96 h 分别取出 1 个 96 孔板,每孔内加入 10 μ l CCK-8 溶液,继续在培养箱中培养 4 h,酶标仪测定 450 nm 波长每孔的 A 值,作为细胞活力值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组间各指标比较采用独立样本 t 检验;多组间 LOXLI mRNA 相对表达量总体差异比较采用单因素方差分析,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 各组 HLE-B3 中 LOXLI mRNA 相对表达量比较

正常对照组、shLOXL1-1 组、shLOXL1-2 组、shLOXL1-3 组 LOXLI mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.35 、 0.16 ± 0.05 、 0.33 ± 0.14 、 0.04 ± 0.02 ,总体比较差异有统计学意义($F = 49.340$, $P < 0.001$),

其中与正常对照组比较,shLOXL1-1 组、shLOXL1-2 组、shLOXL1-3 组 LOXLI mRNA 相对表达量均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。shLOXL1-3 组敲低效果最佳。后续实验中,选择 shLOXL1-3 组细胞作为 LOXLI 敲低实验组,与正常对照组细胞进行对比。

2.2 各组 HLE-B3 中弹性蛋白免疫荧光表达比较

免疫荧光结果显示弹性蛋白稳定存在于 HLE-B3 中,2 个组细胞核密集程度相当,但与正常对照组相比,shLOXL1-3 组弹性蛋白荧光强度减弱。shLOXL1-3 组弹性蛋白平均荧光强度为 56.96 ± 5.56 ,明显低于正常对照组的 80.52 ± 4.78 ,差异有统计学意义($t = 5.572$, $P < 0.001$) (图 1)。

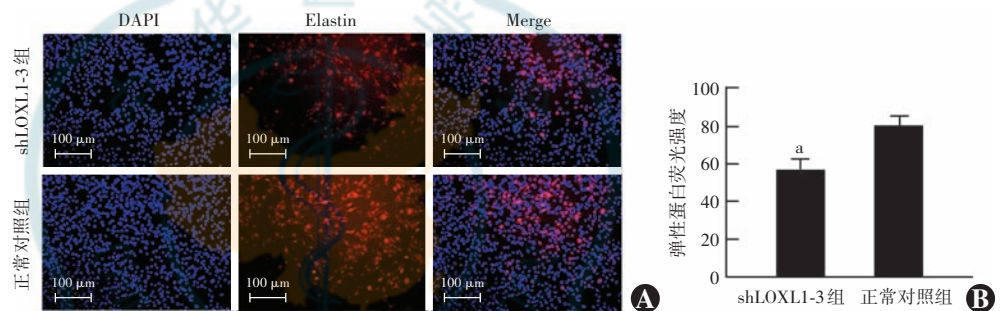


图 1 各组 HLE-B3 中弹性蛋白免疫荧光染色 A: 细胞免疫荧光染色图($\times 200$, 标尺 = 100 μ m) DAPI 染色为 HLE-B3 细胞核,红色荧光为弹性蛋白,弹性蛋白广泛存在于 HLE-B3 细胞中。与正常对照组相比,shLOXL1-3 组弹性蛋白荧光强度减弱 B: 各组弹性蛋白荧光强度量化比较 与正常对照组相比,^a $P < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) sh: 短发夹 RNA; LOXL1: 赖氨酰氧化酶蛋白 1

Figure 1 Immunofluorescence staining of elastin in HLE-B3 in different groups A: Cellular immunofluorescence staining ($\times 200$, scale bar = 100 μ m) DAPI staining showed the nuclei of HLE-B3 cells, while red fluorescence indicated elastin, which expressed widely in HLE-B3 cells. Compared with normal control group, the fluorescence intensity of elastin in shLOXL1-3 group decreased B: Quantitative comparison of elastin fluorescence intensity between two groups Compared with normal control group, ^a $P < 0.001$ (Independent samples t -test, $n = 3$) sh: short hairpin RNA; LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1

2.3 各组 HLE-B3 中弹性蛋白相对表达量比较

shLOXL1-3 组弹性蛋白条带灰度明显弱于正常对照组;shLOXL1-3 组弹性蛋白相对表达量为 0.807 ± 0.002 ,明显低于正常对照组的 1.185 ± 0.064 ,差异有统计学意义($t = 5.802$, $P < 0.01$) (图 2)。

2.4 各组 HLE-B3 中弹性蛋白聚集程度比较

2 个组细胞外基质中可见弹性蛋白,呈圆颗粒状,shLOXL1-3 组弹性蛋白密度相比于正常对照组明显降低,但其形态、大小均无明显变化,且 2 个组弹性蛋白的聚集程度未发生明显改变(图 3)。

2.5 各组 HLE-B3 细胞迁移率比较

shLOXL1-3 组和正常对照组在 0 h 进行划痕后,两侧细胞距离相等;24 h 可见 shLOXL1-3 组细胞划痕宽度小于正常对照组;48 h 正常对照组划痕已基本消

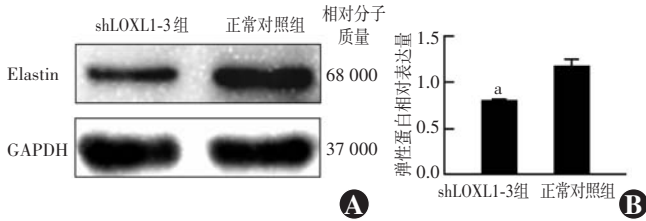


图 2 Western blot 检测各组弹性蛋白表达水平 A:弹性蛋白表达电泳图 shLOXL1-3 组 Elastin 蛋白表达条带明显弱于正常对照组 B:各组 Elastin 蛋白相对表达量比较 与正常对照组相比, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) sh:短发夹 RNA; LOXL1:赖氨酰氧化酶样蛋白 1; GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

Figure 2 Expression of elastin in different groups detected by Western blot A: Electrophoretogram of elastin protein expression Protein band of elastin was significantly weakened in shLOXL1-3 group compared with normal control group B: Comparison of relative expression level of elastin between two groups Compared with normal control group, $^a P < 0.01$ (Independent samples t -test, $n = 3$) sh: short hairpin RNA; LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

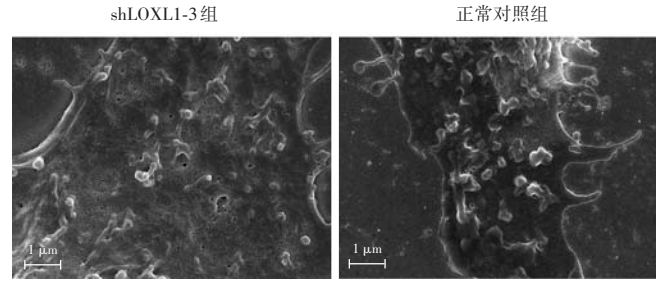


图 3 扫描电子显微镜观察 HLE-B3 细胞外基质中弹性蛋白 ($\times 10\,000$, 标尺 = $1\ \mu\text{m}$) 与正常对照组对比, shLOXL1-3 组细胞外基质中弹性蛋白形态、大小没有明显改变, 密度偏低, 没有出现明显的聚集现象 sh:短发夹 RNA; LOXL1:赖氨酰氧化酶样蛋白 1

Figure 3 Observation of elastin in the extracellular matrix of HLE-B3 cells by scanning electron microscopy ($\times 10\,000$, scale bar = $1\ \mu\text{m}$) Compared with normal control group, the morphology and size of elastin in the extracellular matrix of the shLOXL1-3 group showed no significant change, but the density was low, and there was no obvious aggregation sh: short hairpin RNA; LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1

失, shLOXL1-3 组两侧细胞仍有一定距离。24 h 和 48 h 时 shLOXL1-3 组细胞相对迁移率分别为 0.292 ± 0.041 和 0.439 ± 0.032 , 均低于正常对照组的 0.463 ± 0.017 和 0.719 ± 0.007 , 差异均有统计学意义 ($t = 8.178, 2.611$, 均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.6 各组不同时间点 HLE-B3 细胞增殖值比较

CCK-8 实验结果显示, 培养 24、48、72、96 h, shLOXL1-3 组细胞活力值均低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 2.555, 2.704, 6.695, 7.266$, 均 $P < 0.05$) (表 2)。

3 讨论

XFS 于 1917 年由芬兰林德伯格首次提出^[24], 多出现于年龄较大者中, 患者常合并开角型青光眼、白内障及听力下降^[10], 且相比于其他类型青光眼, 视神经损伤更严重^[25]。XFS 的主要特征是原纤维成分的过度产生并异常交联形成剥脱物质并积累于眼前节^[12], 而弹性蛋白是原纤维成分中

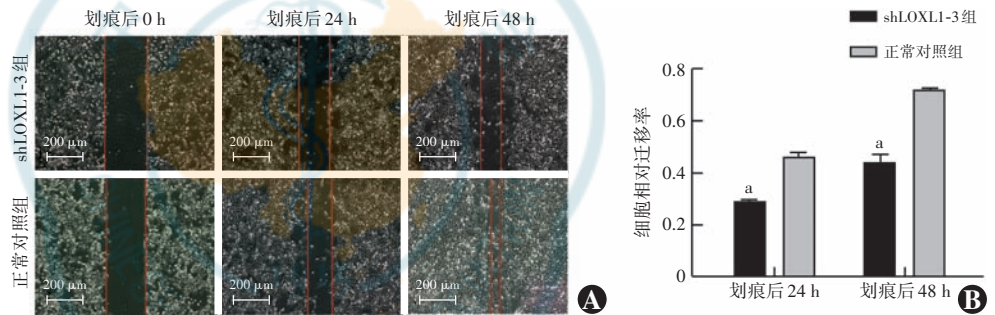


图 4 各组 HLE-B3 迁移能力比较 A:光学显微镜下细胞划痕迁移图 ($\times 100$, 标尺 = $200\ \mu\text{m}$) B:各组细胞相对迁移率比较 与正常对照组相比, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) sh:短发夹 RNA; LOXL1:赖氨酰氧化酶样蛋白 1

Figure 4 Comparison of migration ability of HLE-B3 in different groups A: Cell migration image under an optical microscope ($\times 100$, scale bar = $200\ \mu\text{m}$) B: Comparison of relative migration rates of cells between two groups Compared with normal control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t -test, $n = 3$) sh: short hairpin RNA; LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1

表 2 各组转染后不同时间点细胞活力值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of cell viability at different time points after transfection between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	转染后不同时间点细胞活力值			
		24 h	48 h	72 h	96 h
正常对照组	5	1.681 ± 0.099	2.680 ± 0.144	3.933 ± 0.250	5.335 ± 0.559
shLOXL1-3 组	5	1.550 ± 0.058	2.463 ± 1.107	3.002 ± 0.184	3.400 ± 0.207
t 值		2.555	2.704	6.695	7.266
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.001	< 0.001

注: (独立样本 t 检验) sh:短发夹 RNA; LOXL1:赖氨酰氧化酶样蛋白 1

Note: (Independent samples t -test) sh: short hairpin RNA; LOXL1: lysyl oxidase-like protein 1

的重要组成部分^[26]。目前的研究已证实在 XFS 的多个易感基因中, LOXL1 基因发挥了较强的遗传效应^[27-28]。在 XFS 患者眼组织中, LOXL1 基因和弹性成分表达均上调, 且在剥脱物质中, LOXL1 蛋白与弹性

纤维共定位,这提示 *LOXLI* 基因的激活可能导致了弹性纤维成分异常聚集并形成剥脱物质^[23]。有研究推测,抑制 *LOXLI* 基因表达可能会成为干预 XFS 的潜在靶点^[29],然而目前还没有相关研究来验证这一观点。研究和探讨抑制 *LOXLI* 基因的表达对弹性蛋白产生和聚集的影响、对细胞功能的影响以及对预防 XFS 的发生和延缓 XFS 白内障的发展具有重要意义。

本研究通过 shRNA 抑制 *LOXLI* 基因的表达,观察弹性蛋白表达或聚集上的相应改变以及对细胞功能的影响,以探讨调节 *LOXLI* 基因对 XFS 的作用。由于 HLECs 参与了剥脱物质的产生及白内障的形成^[5,30],本研究选用 HLE-B3 进行细胞学相关实验,通过建立稳定敲低 *LOXLI* 基因的 HLE-B3 细胞株,对弹性蛋白进行定位、定量检测,电子显微镜下观察其对弹性蛋白的影响,此外还对 HLE-B3 进行了增殖及迁移实验观察 *LOXLI* 基因对 HLECs 功能的影响。本研究中,选择慢病毒敲低 *LOXLI* 效率最高的细胞株作为实验组,通过对实验组和对照组的弹性蛋白进行免疫荧光染色,发现 2 个组中的弹性蛋白均稳定存在于 HLE-B3 细胞中,而通过 Western blot 检测发现在敲低 *LOXLI* 基因后,HLE-B3 中弹性蛋白的相对表达量显著降低,说明抑制 *LOXLI* 基因的表达可以在一定程度上抑制弹性蛋白的产生。电子显微镜扫描下观察 2 个组间弹性蛋白的大小、形态并没有出现明显改变,shLOXLI-3 组 HLE-B3 中弹性蛋白的密度相对降低,而 2 个组细胞弹性蛋白在聚集程度上并无明显差异,这也说明 *LOXLI* 基因与弹性蛋白间并不是简单一对一的调节关系。由于弹性蛋白是原纤维成分中的重要组成部分,敲低 *LOXLI* 基因可以减少弹性蛋白的产生,这可能会在一定程度上导致原纤维成分产生的减少,从而减少 XFS 中剥脱物质的产生。此外,本研究发现抑制 *LOXLI* 基因的表达后,HLE-B3 的增生活力及迁移能力均出现显著下降。但目前还无法验证 *LOXLI* 基因通过什么机制改变 HLE-B3 的增生活力及迁移能力。以往的研究结果提示弹性蛋白会影响细胞的趋化性、黏附性、增殖能力、迁移能力等功能^[31-36],因此我们认为敲低 *LOXLI* 基因后导致的弹性蛋白异常表达可能参与了 HLECs 增生活力及迁移能力的改变,但也不排除其他因素同时参与导致的细胞功能改变。HLECs 是人晶状体的主要组成细胞,在不同阶段可以表现出不同的生理特征和功能^[37],目前的研究认为,HLECs 的异常增殖和迁移参与了后囊下白内障的发生^[29]。在本研究中,LOXLI 的低表达状态抑制了 HLECs 的增殖和迁移,这可能对后囊下白内障的发生和发展起到

一定的延缓作用,但还需要更多的研究去探索和证明。

然而,有研究发现,虽然在 XFS 早期弹性纤维与 *LOXLI* 基因共同上调,但在疾病晚期,*LOXLI* 基因表达下调,弹性蛋白仍持续高表达^[1,38]。疾病晚期 *LOXLI* 基因的下调、弹性蛋白的高表达与本研究结论相反,这也说明 *LOXLI* 基因并不是调控弹性蛋白的唯一因素,未来需探索更多的遗传因素和环境因素对弹性蛋白的调控以及对疾病的表现^[39]。

本研究发现,敲低 *LOXLI* 基因可引起 HLECs 中弹性蛋白表达水平明显下降,同时该细胞的增生活力及迁移能力下降。推测抑制 *LOXLI* 基因的表达可能通过减少弹性蛋白的生成从而减少 XFS 中剥脱物质的生成以及延缓后囊下白内障的发生和发展。但本研究仅探讨了 *LOXLI* 基因对 HLECs 以及对剥脱物质中一种组成成分的影响,后续的研究中,我们将完善 *LOXLI* 基因对参与 XFS 的各眼组织中不同弹性纤维物质产生的影响,进而对 XFS 的发生和发展提供新的治疗思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 董月:实施研究、整理/分析数据、起草文章;玛依努:设计实验、修改文章;易湘龙:参与选题、审阅及修改文章、定稿

参考文献

- [1] Wiggs JL, Pasquale LR. Expression and regulation of LOXLI and elastin-related genes in eyes with exfoliation syndrome[J]. J Glaucoma, 2014,23(8 Suppl 1): S62-63. DOI: 10.1097/IJG.000000000000124.
- [2] Tranchina L, Centofanti M, Oddone F, et al. Levels of plasma homocysteine in pseudoexfoliation glaucoma[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011, 249(3): 443-448. DOI: 10.1007/s00417-010-1487-6.
- [3] Aboobakar IF, Johnson WM, Stamer WD, et al. Major review: exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology[J]. Exp Eye Res, 2017, 154: 88-103. DOI: 10.1016/j.exer.2016.11.011.
- [4] Naumann GO, Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M. Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations[J]. Ophthalmology, 1998, 105(6): 951-968. DOI: 10.1016/S0161-6420(98)96020-1.
- [5] Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome[J]. Surv Ophthalmol, 2001, 45(4): 265-315. DOI: 10.1016/s0039-6257(00)00196-x.
- [6] Gayathri R, Coral K, Sharmila F, et al. Correlation of aqueous humor lysyl oxidase activity with TGF- β levels and LOXLI genotype in pseudoexfoliation[J]. Curr Eye Res, 2016, 41(10): 1331-1338. DOI: 10.3109/02713683.2015.1125505.
- [7] Aung T, Ozaki M, Mizoguchi T, et al. A common variant mapping to CACNA1A is associated with susceptibility to exfoliation syndrome[J]. Nat Genet, 2015, 47(4): 387-392. DOI: 10.1038/ng.3226.
- [8] Micheal S, Khan MI, Akhtar F, et al. Role of lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in Pakistani patients with pseudoexfoliative glaucoma[J]. Mol Vis, 2012, 18: 1040-1044.
- [9] Sharma S, Martin S, Sykes MJ, et al. Biological effect of LOXLI coding variants associated with pseudoexfoliation syndrome[J]. Exp Eye Res,

- 2016, 146 : 212–223. DOI: 10. 1016/j. exer. 2016. 03. 013.
- [10] Cahill M, Early A, Stack S, et al. Pseudoexfoliation and sensorineural hearing loss [J]. *Eye (Lond)*, 2002, 16(3) : 261–266. DOI: 10. 1038/sj. eye. 6700011.
- [11] Aziz BF, Elawamry AI, Roshdy MM, et al. Exfoliation syndrome in Egypt: prevalence and association with cataract in a large cohort [J]. *Ophthalmol Ther*, 2021, 10(4) : 1045–1056. DOI: 10. 1007/s40123-021-00397-4.
- [12] Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GO. Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome [J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(5) : 921–937. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2006. 01. 047.
- [13] Bernstein AM, Ritch R, Wolosin JM. Exfoliation syndrome; a disease of autophagy and LOXL1 proteopathy [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 (Suppl 1) : S44–S53. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000919.
- [14] Wolosin JM, Ritch R, Bernstein AM. Is autophagy dysfunction a key to exfoliation glaucoma? [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27(3) : 197–201. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000606.
- [15] Schlötzer-Schrehardt U. Molecular biology of exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 : S32–S37. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000903.
- [16] Pasquale LR, Kang JH, Fan B, et al. LOXL1 polymorphisms: genetic biomarkers that presage environmental determinants of exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 (Suppl 1) : S20–S23. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000915.
- [17] 殷燕, 樊宁, 刘旭阳. 剥脱综合征的分子遗传学研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(8) : 760–763. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 019.
- Yin Y, Fan N, Liu XY. Advances in molecular genetics of exfoliation syndrome [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(8) : 760–763. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 019.
- [18] Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence variants in the *LOXL1* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma [J]. *Science*, 2007, 317(5843) : 1397–1400. DOI: 10. 1126/science. 1146554.
- [19] Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(4) : 660–672. DOI: 10. 1002/jcb. 10413.
- [20] Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001, 70 : 1–32. DOI: 10. 1016/s0079-6603(01)70012-8.
- [21] Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(19–20) : 2304–2316. DOI: 10. 1007/s00018-006-6149-9.
- [22] Papke CL, Yanagisawa H. Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: insights from mouse and human studies [J]. *Matrix Biol*, 2014, 37 : 142–149. DOI: 10. 1016/j. matrix. 2014. 02. 004.
- [23] Schlötzer-Schrehardt U, Pasutto F, Sommer P, et al. Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(6) : 1724–1735. DOI: 10. 2353/ajpath. 2008. 080535.
- [24] Lindberg JG. Clinical investigations on depigmentation of the pupillary border and translucency of the iris in cases of senile cataract and in normal eyes in elderly persons [J]. *Acta Ophthalmol Suppl (1985)*, 1989, 190 : 1–96.
- [25] 刘晓弟, 丁琳. 84 例剥脱综合征临床分析 [J]. *新疆医学*, 2018, 48(7) : 735–738.
- Liu XD, Ding L. Clinical analysis about exfoliation syndrome among 84 cases [J]. *Xinjiang Med J*, 2018, 48(7) : 735–738.
- [26] Zenkel M, Schlötzer-Schrehardt U. The composition of exfoliation material and the cells involved in its production [J]. *J Glaucoma*, 2014, 23(8 Suppl 1) : S12–14. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000123.
- [27] Aung T, Ozaki M, Lee MC, et al. Genetic association study of exfoliation syndrome identifies a protective rare variant at *LOXL1* and five new susceptibility loci [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(7) : 993–1004. DOI: 10. 1038/ng. 3875.
- [28] Aung T, Chan AS, Khor CC. Genetics of exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 : S12–S14. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000928.
- [29] Richardson RB, Ainsbury EA, Prescott CR, et al. Etiology of posterior subcapsular cataracts based on a review of risk factors including aging, diabetes, and ionizing radiation [J]. *Int J Radiat Biol*, 2020, 96(11) : 1339–1361. DOI: 10. 1080/09553002. 2020. 1812759.
- [30] Su D, Hu S, Guan L, et al. Down-regulation of *GJA3* is associated with lens epithelial cell apoptosis and age-related cataract [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(1) : 159–164. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2017. 01. 050.
- [31] Rodgers UR, Weiss AS. Cellular interactions with elastin [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(7) : 390–398. DOI: 10. 1016/j. patbio. 2004. 12. 022.
- [32] Indik Z, Abrams WR, Kucich U, et al. Production of recombinant human tropoelastin: characterization and demonstration of immunologic and chemotactic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 280(1) : 80–86. DOI: 10. 1016/0003-9861(90)90521-y.
- [33] Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides [J]. *J Clin Invest*, 1982, 70(3) : 614–618. DOI: 10. 1172/jci110654.
- [34] Jung S, Rutka JT, Hinek A. Tropoelastin and elastin degradation products promote proliferation of human astrocytoma cell lines [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, 57(5) : 439–448. DOI: 10. 1097/00005072-199805000-00007.
- [35] Grosso LE, Parks WC, Wu LJ, et al. Fibroblast adhesion to recombinant tropoelastin expressed as a protein A-fusion protein [J]. *Biochem J*, 1991, 273 (Pt 3) : 517–522. DOI: 10. 1042/bj2730517.
- [36] Halper J. Basic Components of connective tissues and extracellular matrix: fibronectin, fibrinogen, laminin, elastin, fibrillins, fibulins, matrilins, tenascins and thrombospondins [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1348 : 105–126. DOI: 10. 1007/978-3-030-80614-9_4.
- [37] Liu Z, Huang S, Zheng Y, et al. The lens epithelium as a major determinant in the development, maintenance, and regeneration of the crystalline lens [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2023, 92 : 101112 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36055924/>. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2022. 101112.
- [38] Zenkel M. Extracellular matrix regulation and dysregulation in exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 : S24–S28. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000902.
- [39] John SW, Harder JM, Fingert JH, et al. Animal models of exfoliation syndrome, now and future [J]. *J Glaucoma*, 2014, 23(8 Suppl 1) : S68–S72. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000121.

(收稿日期: 2024-01-16 修回日期: 2024-08-11)

(本文编辑: 张宇 施晓萌)