

引文格式:朱恺,顾永昊,孙思勤. RNA 干扰 MMP-2 基因对人晶状体上皮细胞增殖及移行能力的影响[J]. 眼科新进展,2015,35(3):235-239. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2015. 0063

【实验研究】

RNA 干扰 MMP-2 基因对人晶状体上皮细胞增殖及移行能力的影响

朱恺 顾永昊 孙思勤

作者简介:朱恺,男,1988 年 3 月出生,安徽合肥人,在读硕士研究生。联系电话:0551-62283120; E-mail: drzhukai@163. com

About ZHU Kai: Male, born in March, 1988. Postgraduate student. Tel: + 86-551-62283120; E-mail: drzhukai@163. com

收稿日期:2014-10-18
修回日期:2014-12-28
本文编辑:付中静
作者单位:230001 安徽省合肥市,安徽省立医院眼科
通讯作者:孙思勤, E-mail: drsunsiqin@163. com

Received date: Oct 18, 2014
Accepted date: Dec 28, 2014
From the Department of Ophthalmology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China
Responsible author: SUN Si-Qin, E-mail: drsunsiqin@163. com

Effects of RNA interference targeting MMP-2 on proliferation and migration of human lens epithelial cells

【Key words】 matrix metalloproteinase-2; human lens epithelial cells; cells proliferation; migration; RNA interference; short hairpin RNA

【Abstract】 Objective To investigate the effects of RNA interference targeting matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) on proliferation and migration of human lens epithelial cells (hLEC) *in vitro*, and explore the new methods of prevention and treatment of posterior capsule opacification (PCO). Methods Two plasmid vectors were designed and synthesized, one of them contained a short hairpin RNA (shRNA) targeting MMP-2 inserted and another one was inserted without expression of MMP-2. Then hLEC SRA01/04 *in vitro* culture were transfected by the two plasmid vectors, named MMP-2 silence group and negative control group respectively, and hLEC were cultured in DMEM of an equal volume compared with the upper two groups as blank control group. At 24 hours after transfection, MMP-2 mRNA and protein in hLEC were detected by real-time PCR and Western blot. The ability of proliferation was determined by MTT assay at 24 hours, 48 hours and 72 hours after transfection. Cell scratch assay was used at 24 hours and 48 hours after transfection to evaluate the ability of migration. Results At 24 hours after transfection, the relative quantities of MMP-2 mRNA and protein of MMP-2 silence group were 0.202 ± 0.075 and 80.856 ± 2.165 , which were decreased by 80.6% and 55.1% respectively compared with blank control group (1.041 ± 0.163 and 184.419 ± 3.584 , all $P < 0.05$), and there was no statistical difference between negative control group and blank control group ($P > 0.05$); MTT assay showed that there was no statistical difference in cell proliferation between MMP-2 silence group and negative control group ($P > 0.05$), and the two groups had statistically difference compared with blank control group (all $P < 0.05$); Cell scratch assay was quantified by ratio of migrated heal, and the ratio of MMP-2 silence group were $(20.36 \pm 4.14)\%$ and $(23.19 \pm 5.62)\%$ respectively at 24 hours and 48 hours after transfection, which were significant decreased compared with blank control group [$(41.26 \pm 4.57)\%$ and $(67.61 \pm 8.80)\%$] and negative control group [$(36.28 \pm 2.28)\%$ and $(74.48 \pm 9.21)\%$] (all $P < 0.05$), however, there was no statistical difference between negative control group and blank control group ($P > 0.05$). Conclusion MMP-2 shRNA can effectively reduce secretion of MMP-2 mRNA and protein of hLECSRA01/04 *in vitro* culture, simultaneously, migration is inhibited. However, there is no enough evidence to prove that proliferation is connected to the change of MMP-2.

【关键词】 基质金属蛋白酶-2;人晶状体上皮细胞;细胞增殖;移行;RNA 干扰;短发夹 RNA

【摘要】 目的 研究 RNA 干扰 基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)表达对体外培养的人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, hLECs)增殖、移行的影响。探讨 RNA 干扰技术抑制 LECs 增殖、移行的可行性,以探索防治后发性白内障的新方法。方法 设计构建含有靶向 MMP-2 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒载体和不含靶向 MMP-2 的 shRNA 阴性对照质粒载体,体外转染 hLECs SRA01/04,分别标记为 MMP-2 沉默组和阴性对照组;以等体积培养液代替转染质粒培养作为空白对照组。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测转染后 24 h MMP-2 mRNA 及 MMP-2 蛋白的表达水平。MTT 比色法测定细胞转染后 24 h、48 h 以及 72 h 时 hLECs 的增殖能力。细胞划痕实验方法测定转染后 24 h、48 h 时 hLECs 的移行愈合率。结果 转染 24 h 后 MMP-2 沉默组 mRNA 及其蛋白的相对表达水平分别为 0.202 ± 0.075 、 80.856 ± 2.165 ,与空白对照组 1.041 ± 0.163 和 184.419 ± 3.584 比较分别下降了 80.6% 和 55.1%,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),而阴性对照组与空白对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);MTT 比色法检测结果显示,各时间点的细胞增殖能力 MMP-2 沉默组与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 2 组较空白对照组均有所下降,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);细胞划痕实验示转染 24 h 与 48 h 后 MMP-2 沉默组的移行愈合率分别为 $(20.36 \pm 4.14)\%$ 和 $(23.19 \pm 5.62)\%$,较空白对照组 $(41.26 \pm 4.57)\%$ 和 $(67.61 \pm 8.80)\%$ 以及阴性对照组的 $(36.28 \pm 2.28)\%$ 和 $(74.48 \pm 9.21)\%$ 均明显降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),阴性对照组与空白对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 靶向 MMP-2 shRNA 可以有效降低 hLECs

SRA01/04 MMP-2 mRNA 和蛋白表达,抑制细胞的移行,但尚不能认为对细胞增殖能力有影响。RNA 干扰 MMP-2 的表达可有效抑制 hLECs 的移行。

后发性白内障,又称之为后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO),它本质上是机体的一种创伤修复反应过程。目前研究表明 PCO 是由白内障术后残留的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, hLEC) 在后囊膜上移行、增殖、分化为肌成纤维细胞,聚集于后囊膜上,从而导致后囊膜皱缩混浊^[1]。基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是依赖钙-锌离子的内源性蛋白水解酶家族之一,其底物主要为 IV 型胶原和层黏连蛋白的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM),在细胞移行过程中起重要作用。正常晶状体囊膜的基质成分主要是 IV 型胶原,因此 MMP-2 浓度的增高可以强化 ECM 的降解,易化细胞的增殖、移行,相反,其表达受后 ECM 降解乏力,细胞的移行就会减弱^[2]。RNA 干扰是通过人为导入与内源性靶基因具有相同序列的小双链 RNA,再通过一系列酶促反应使得内源性靶基因降解,从而阻止目的基因表达的方法。本研究就是利用含有靶向 MMP-2 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的质粒转染体外培养的 (human lens epithelial cells, hLECs) SRA01/04,观察并探讨 MMP-2 的表达变化及其对 hLECs 增殖、移行的影响,以期探寻防治 PCO 的新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 hLECs 株 SRA01/04 (上海博谷生物科技有限公司);DNA 转染试剂、质粒提取试剂盒、荧光定量试剂、鼠抗人 β -actin 抗体、羊抗人 MMP-2 抗体、山羊抗小鼠 IgG 及兔抗山羊 IgG (北京康为世纪生物科技有限公司);TRIzol Reagent 试剂 (美国 Invitrogen 公司);引物 (上海生工生物科技有限公司);逆转录试剂盒 (RevertAidTM first Strand cDNA Synthesis Kit, 立陶宛 Fermentas 公司);RIPA 细胞裂解液 (碧云天生物技术研究所有)。

1.2 方法

1.2.1 hLECs 的培养 hLECs 株 SRA01/04 培养于含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 孵育箱中培育,待细胞融合达 90% 时,予以 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化,按 1 : 2 进行传代。转染前 1 d,将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板,并划分为 3 组:MMP-2 沉默组 (构建含有靶向 MMP-2 shRNA 的质粒转染 hLECs)、阴性对照组 (构建的阴性质粒转染 hLECs)、空白对照组 (等体积培养液常规培养)。

1.2.2 干扰质粒构建 根据 GeneBank 中 MMP-2 的基因序列 (NM_001127891),参照小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的设计原则,选择 1 条符合特征的靶序列 (TGAAGGACACACTA-

AAGAA),然后根据靶序列合成发夹样两端配对 siRNA 寡核苷酸链,中间以 Loop (CTCGAG) 相连,最终 shRNA 序列为 5' -CCGGCTGAAGGACACACTA-AAGAACTCGAGTTCTTTAGTGTGTCCTTCAGCTTTTC-3'。同时设计一条空白质粒作为阴性对照。将含有上述质粒的 GV248 重组载体的大肠杆菌 Ecoli-TOP10 菌液复苏、培养,挑取单克隆扩大培养。质粒提取后测定浓度并调整浓度为 20 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹。以上质粒、载体设计合成由上海吉凯基因化学技术有限公司协助完成。

1.2.3 质粒转染 脂质体法将含有靶向 MMP-2 的 shRNA 干扰质粒和阴性对照质粒转染 hLECs;空白对照组用等体积的不含胎牛血清和抗生素 (“双无”) 的 DMEM 培养。首先弃去各组中的旧培养液,用 “双无” 的 DMEM 清洗 2 次,加入 “双无” 的 DMEM 各 900 μ L。将 10 μ L 干扰质粒与 12 μ L 脂质体分别用 “双无” 的 DMEM 培养液稀释,终体积为 50 μ L,充分混匀室温下孵育 5 min 后迅速混合,再于室温下孵育 20 min。加入培养液于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱继续培养 6 h,同法进行阴性对照质粒的转染。培养 6 h 后弃去培养液,各孔加入 1 mL 含体积分数 10% 胎牛血清和筛选抗生素的 DMEM 培养液继续培养。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法检测各组细胞 MMP-2 mRNA 表达 hLECs 经转染 24 h 后用 Trizol 一步法提取各组细胞的总 RNA,按照操作说明书通过逆转录合成 cDNA,再以 GAPDH 基因作为内参照进行实时荧光定量 PCR 检测。MMP-2 引物:上游 5' -TACGATGGAGCGCTAATGG-3',下游 5' -CAGGTATTGCACTGCCAACTC-3';GAPDH 引物:上游 5' -GCCGCATCTTCTTTTGCCTC-3',下游 5' -TACGACCAAATCCGTTGACTCC-3'。扩增条件:95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环。结果用相对表达量 (relative quantity, RQ) 统计。RQ = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, $\Delta\Delta$ Ct = (实验组 Ct_{目的基因} - 实验组 Ct_{GAPDH}) - (参照组 Ct_{目的基因} - 参照组 Ct_{GAPDH})。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 MMP-2 蛋白的表达 hLECs 经过转染 24 h,向各组细胞加入裂解液 RIPA,离心后收集细胞总蛋白;将蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶加样孔内,每孔 10 μ L 进行电泳,时间为浓缩胶 80 V 电压 30 min,分离胶 120 V 电压 1 h;再以恒流电 150 mA 3 h 转移至 PVDF 膜;转膜完毕后用封闭液 (1 g 脱脂奶粉溶于 20 mL PBS) 封闭 1 h,充分洗涤后分别孵育 β -actin、MMP-2 一抗于 4 °C 下过夜;PBS 洗膜 3 次,每次 5 min,加入相应二抗,室温孵育 1 h 后 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 显色曝光。结果采用灰度分析软件进行分析。

1.2.6 MTT 比色法检测细胞增殖能力 取对数生长期的 hLECs 进行转染,6 h 后进行消化并接种至 96 孔板内,每孔 150 μ L 细胞悬液,每组设 6 个复孔。于转染后 24 h、48 h 以及 72 h,向各组细胞中每孔加入 MTT(5 g \cdot L⁻¹)30 μ L,置 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 5% CO₂ 孵育箱中反应 4 h,然后弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,低速振荡 10 min,使结晶物完全溶解,于 490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.7 细胞划痕实验观察、细胞移行愈合率测定 用 10 μ L 微量移液枪头在 6 孔板内垂直划痕,PBS 轻轻冲洗掉脱落细胞,重复 2 次,于倒置显微镜下观察并拍摄照片记作 0 h。再加入含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 孵育箱中常规培育。24 h 及 48 h 后观察拍照,计算各组细胞移行愈合率。细胞移行愈合率 = (初始划痕宽度 - 24 h/48 h 后划痕宽度)/初始划痕宽度^[3]。

1.3 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件进行数据的统计学处理,数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间计数资料的比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 两两比较分析方法,MTT 结果采用秩和检验、Nemenyi 法进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 干扰对细胞内 MMP-2 mRNA 表达水平的影响 转染 24 h 后,空白对照组相对表达水平为 1.041 \pm 0.163,阴性对照组为 1.711 \pm 1.017,MMP-2 沉默组为 0.202 \pm 0.075,3 组间差异有统计学意义 ($F = 9.65, P < 0.05$)。MMP-2 沉默组 mRNA 相对表达水平较空白对照组和阴性对照组明显下降,差异均有统计学意义 (q 分别为 3.447、6.199,均为 $P < 0.05$);阴性对照组与空白对照组相比,差异无统计学意义 ($q = 2.753, P > 0.05$)。MMP-2 沉默组 mRNA 相对表达水平较空白对照组下降了 80.6%。

2.2 RNA 干扰对细胞内 MMP-2 蛋白表达水平的影响 Western blot 结果通过灰度分析显示(图 1),转染 24 h 后空白对照组、阴性对照组、MMP-2 沉默组 MMP-2 蛋白的相对表达量分别为 184.419 \pm 3.584、180.037 \pm 1.890、80.856 \pm 2.165,3 组间差异有统计学意义 ($F = 1950.4, P < 0.01$)。空白对照组与阴性对照组比较,差异无统计学意义 ($q = 3.304, P > 0.05$);而 MMP-2 沉默组较空白对照组和阴性对照组表达量均降低,差异均有统计学意义 (q 分别为 78.085、74.780,均为 $P < 0.05$)。MMP-2 沉默组相对蛋白表达量较空白对照组下降了 55.1%。

2.3 RNA 干扰对细胞增殖能力的影响 各组 OD₄₉₀ 值检测见表 1,3 组随时间延长,OD 值逐渐增高,差异有统计学意义 (F 值分别为 33.01、22.77、29.33,均为 $P < 0.01$)。转染 24 h、48 h 以及 72 h 各时间点 3 组间的 OD 值差异均有统计学意义 (F 值分别为 75.30、8.90、16.82,均为 $P < 0.01$)。其中,与

空白对照组比较,各时间点 MMP-2 沉默组、阴性对照组的 OD 值均下降,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);各时间点 MMP-2 沉默组与阴性对照组比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$,见表 1)。

Figure 1 MMP-2 change at 24 hours after transfection (Western blot) hLECs 转染 24 h 后 MMP-2 蛋白变化(Western blot)

表 1 MTT 法检测干扰后增殖能力 OD₄₉₀ 变化
Table 1 Ability of OD490 change after transfection using MTT assay

Group	24 hours	48 hours	72 hours
Blank control	0.6983 \pm 0.0815	0.7395 \pm 0.1497	1.4705 \pm 0.4398
Negative control	0.4382 \pm 0.0836 \blacktriangle	0.5745 \pm 0.1735 \blacktriangle	0.9776 \pm 0.3475 \blacktriangle
MMP-2 silence	0.4573 \pm 0.0804 $\blacktriangle\#$	0.5478 \pm 0.1864 $\blacktriangle\#$	0.9419 \pm 0.2436 $\blacktriangle\#$

Note: Compared with blank control group, $\blacktriangle P < 0.05$; Compared with negative control group, $\#P > 0.05$

2.4 RNA 干扰对细胞迁移能力的影响 根据细胞划痕实验结果(图 2)计算出各组细胞移行愈合率,细胞转染 24 h、48 h,3 组的移行愈合率差异有统计学意义 (F 分别为 41.36、59.98,均为 $P < 0.01$,见表 2)。其中,MMP-2 沉默组与空白对照组相比,移行愈合率明显下降,差异均有统计学意义 (q 分别为 12.312、12.356,均为 $P < 0.01$);而阴性对照组较空白对照组的移行愈合率无明显变化,差异均无统计学意义 (q 分别为 2.934、1.911,均为 $P > 0.05$);MMP-2 沉默组较阴性对照组有明显下降,差异均有统计学意义 (q 分别为 9.379、14.268,均为 $P < 0.01$)。

表 2 细胞划痕实验检测干扰后细胞移行愈合率
Table 2 Ratio of migrated heal after transfection using cell scratch assay

Group	24 hours	48 hours
Blank control	(41.26 \pm 4.57) %	(67.61 \pm 8.80) %
Negative control	(36.28 \pm 2.28) %	(74.48 \pm 9.21) %
MMP-2 silence	(20.36 \pm 4.14) %	(23.19 \pm 5.62) %
<i>F</i>	41.36	59.98
<i>P</i>	0.00	0.00

3 讨论

PCO 作为白内障术后的最常见并发症,5 a 发生率为 28%,儿童发生率高达 78%^[4]。目前最为有效的治疗手段是 YAG 激光后囊膜切开术,但是激光治疗有可能损伤人工晶状体并引起眼压增高、黄斑囊样水肿、视网膜脱离等诸多并发症,而且儿童白内障患者依从性差,往往无法配合治疗而耽误病情,增加了弱视等并发症发生的风险。PCO 主要是由于白内障术后残余的 LECs 在一系列生长因子、炎症因子作

Figure 2 Results of cell scratch assay at each time point 各时间点细胞划痕实验结果

用下,在后囊膜上增殖、移行,上皮细胞向间皮细胞转化最后生成肌成纤维细胞,这些活化的肌成纤维细胞不断分泌 ECM,导致基质挛缩、胶原沉积、细胞聚集,最后引起囊袋皱缩混浊,其实质是对于手术的创伤修复反应,而在这一过程中 MMP-2 表达活跃,降解 ECM 特别是Ⅳ型胶原,促进细胞移行^[1,2],Seo-mun 等^[5]利用基因转染使 LECs 的 MMP-2 过表达后发现细胞移行能力明显增强,Wong 等^[6]研究证实 MMP 抑制剂 GM6001 可以通过抑制 MMP-2 表达从而抑制体外培养的 hLECs 移行和囊袋皱缩,而本实验利用转染技术抑制体外培养的 LECs MMP-2 表达后,细胞的移行能力明显减弱,这不仅证明 MMP-2 在 LECs 移行中的重要性,也可设想是否可以靶向抑制 MMP-2 的表达来降低 PCO 的发生发展。但是 MMPs 家族在 ECM 重建过程中是有协同作用的,且在白内障摘出人工晶状体植入术后晶状体后囊上 MMP-1、MMP-2、MMP-9 均有表达。Wormstone 等^[7]通过实验分析白内障摘出合并人工晶状体植入术后患者的囊袋,发现 MMP-2、MMP-9 不断产生;而李俊红等^[8]在此基础上研究发现在体外培养的晶状体囊袋内 MMP-2 浓度明显高于 MMP-9,这就说明 MMP-2 表达在 PCO 过程中可能更为重要。Eldred 等^[9]更进一步利用 MMP-2 siRNA 靶向干扰和 MMP-2 中和抗体作用证实,单独阻止 MMP-2 的活性足以抑制 TGF-β2 表达,从而降低基质挛缩和后囊膜褶皱的发生,

本实验中 MMP-2 沉默组的 LECs 移行能力明显下降,证明 MMP-2 在此过程中作用显著;TGF-β 是一种可以促进细胞表达 MMP-2 的因子,并且 RNA 干扰 TGF-β 基因可以抑制层纤连蛋白、平滑肌肌动蛋白的产生和 LECs 的移行^[10];另外 Awasthi 等^[11]利用 TGF-β2 处理 LECs 后测得 MMP-2 mRNA 和蛋白表达均增加,而采用 MMP 抑制剂后 MMP-2 mRNA 和蛋白表达显著降低。由此可见,TGF-β 表达降低后,MMP-2 表达明显下降,后囊膜上 ECM 挛缩、胶原沉积和细胞聚集减少,从而降低 LECs 移行,因此,研究 MMP-2 的变化对 PCO 的产生起到无可替代的作用。近年来 RNA 干扰作为一项新型的重要的基因诊断、基因治疗方法,已得到越来越多的关注、应用,目前已经有利用 RNA 干扰 bcl-2、bFGF 基因诱导体外培养的 hLECs 凋亡的实验研究^[12-13],RNA 干扰应用于晶状体疾病的诊治存在前景。本实验就是利用靶向 MMP-2 shRNA 质粒转染体外培养的 hLECs,观察抑制 MMP-2 表达对细胞增殖、移行是否有影响。

本实验中,通过直接构建针对 MMP-2 基因的靶向 shRNA 体外转染 hLECs,发现 MMP-2 mRNA 和蛋白表达明显降低,随之细胞的移行能力也明显降低,而实验同时也表明 MMP-2 沉默组与阴性对照组细胞的增殖能力有所下降,但它们两者间并没有明显差异,推测这是由于转染试剂存在一定的细胞毒性作用,一定程度上抑制了细胞的增殖。结果表明

MMP-2 与 LECs 的移行作用密切相关,但与增殖能力关系可能不大。

如前所述,利用 MMP 广谱抑制剂可以有效抑制 MMP 的表达,但由于其毒性和非特异性,相比 RNA 干扰技术通过靶向抑制的方法,在临床应用上存在较大风险。RNA 干扰技术治疗 PCO 有创伤小、副作用低、宜操作、费用少、依从性强等优势,是未来基因治疗发展方向之一。本研究利用特异性靶向 MMP-2 shRNA 干扰体外培养的 hLECs,证明抑制 MMP-2 表达可以降低 LECs 的移行,为进一步利用 RNA 干扰技术防治 PCO 提供了依据和思路。

参考文献

1 Wormstone IM. Posterior capsule opacification;a cell biological perspective[J]. *Exp Eye Res*,2002,74(3):337-347.
2 Wederell ED,de Iongh RU. Extracellular matrix and integrin signaling in lens development and cataract[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2006,17(6):759-776.
3 赵红梅,于靖,盛敏杰,陈铁卉. 胰岛素样生长因子结合蛋白-6 对 RPE 细胞增殖和迁移的影响[J]. *眼科新进展*,2012,32(3):208-210.
4 Cheng JW,Wei RL,Cai JP,Xi GL,Zhu H,Li Y,*et al*. Efficacy of different intraocular lens materials and optic edge designs in preventing posterior capsular opacification;a meta-analysis[J]. *Am J Ophthalmol*,2007,143(3):428-436.

5 Seomun Y,Kim J,Lee EH,Joo CK. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells[J]. *Biochem J*,2001,358(Pt 1):41-48.
6 Wong TT,Daniels JT,Crowston JG,Khaw PT. MMP inhibition prevents human lens epithelial cell migration and contraction of the lens capsule[J]. *Br J Ophthalmol*,2004,88(7):868-872.
7 Wormstone IM,Tamiya S,Anderson I,Duncan G. TGF-beta2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2002,43(7):2301-2308.
8 李俊红,陈凤华,王宁利. 基质金属蛋白酶抑制剂对培养的人晶状体上皮细胞移行抑制作用的研究[J]. *中华眼科杂志*,2008,44(4):315-320.
9 Eldred JA,Hodgkinson LM,Dawes LJ,Reddan JR,Edwards DR,Wormstone IM. MMP2 activity is critical for TGFβ2-induced matrix contraction-implications for fibrosis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2012,53(7):4085-4098.
10 Zheng D,Song T,Zhongliu X,Wu M,Liang J,Liu Y. Downregulation of transforming growth factor-β type II receptor prohibit epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium[J]. *Mol Vis*,2012,18:1238-1246.
11 Awasthi N,Wang-Su ST,Wagner BJ. Downregulation of MMP-2 and-9 by proteasome inhibition;a possible mechanism to decrease LEC migration and prevent posterior capsular opacification[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2008,49(5):1998-2003.
12 吴新华,卢奕,方艳文,蒋永祥,田洁. 短发夹状 RNA 干扰 bcl-2 后诱导人晶状体上皮细胞凋亡的实验研究[J]. *中华眼科杂志*,2009,45(7):636-640.
13 徐庆,贾仁兵. bFGF 小干扰 RNA 表达质粒抑制人晶状体上皮细胞增殖的实验研究[J]. *中华眼科杂志*,2008,44(12):1078-1082.



(上接第 230 页)

GAP-43 在弱视形成过程中究竟起多大作用,以及究竟是如何发挥这种作用的,从而采用一些干预手段促进 GAP-43 表达量增加和表达时间延长,促进受损轴突的再生、皮质神经元结构和功能可塑性的恢复,达到治疗弱视的目的。

参考文献

1 Mason MR,Campbell G,Caroni P,Anderson PN,Lieberman AR. Overexpression of GAP-43 in thalamic projection neurons of transgenic mice dose not enable them to regenerate axons through peripheral nerve grafts[J]. *Exp Neurol*,2000,165(1):143-152.
2 Gomez M,Hernandez ML,Pazos MR,Tolon RM,Pomero J,Fernandez-Ruiz J. Colocalization of CB 1 receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development;Evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance[J]. *Neuroscience*,2008,153(3):687-699.
3 Dijk F,Bergen AA,Kamphuis W. GAP-43 expression is upregu-

lated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage[J]. *Exp Eye Res*,2007,84(5):858-867.
4 Livingstone PD,Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways[J]. *Biochem Pharmacol*,2009,78(7):745-755.
5 Vernaleken I,Janouschek H,Raptis M,Hellmann S,Veselinovic T,Brocheler A,*et al*. Dopamine D2/3 receptor occupancy by quetiapine in striatal and extrastriatal areas[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*,2010,13(7):951-960.
6 Pescosolido N,Stefanucci A,Buomprisco G,Fazio S. Amblyopia treatment strategies and new drug therapies[J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*,2014,51(2):78-86.
7 Repka MX,Kraker RT,Beck RW,Atkinsin CS,Bacal DA,Bremer DL,*et al*. Pilot study of levodopa does as treatment for residual amblyopia in children aged 8years to younger than 18 years[J]. *Arch Ophthalmol*,2010,128(9):1215-1217.
10 Cauquil AS,Delaux S,Lestringant R,Taylor MJ,Trotter Y. Neral correlates of chromostereopsis;an evoked potential study[J]. *Neuropsychologia*,2009,47(12):2677-2681.
11 Kaneda M,Nagashima M,Mawatari K,Nunome T,Muramoto K,Sugitani K,*et al*. Growth-associated protein 43(GAP-43) is a biochemical maker for the whole period of fish optic nerve regeneration[J]. *Adv Exp Med Biol*,2010,664(2):97-104.