

高糖条件下人视网膜微血管周细胞的定量蛋白组学研究

肖梦然 张晓敏 邵先锋 肖静 杨付花 张慧 Vicki L. Ea 李筱荣

天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室
300384

通信作者:李筱荣,Email:xiaorli@163.com

【摘要】 目的 利用定量蛋白组学技术探索高糖状态下人视网膜微血管周细胞(HRMPCs)的蛋白表达变化,为糖尿病视网膜病变(DR)早期周细胞缺失的机制研究提供新的蛋白靶点。方法 将 HRMPCs 分为对照组和高糖组,分别用葡萄糖浓度为 25 mmol/L 和 35 mmol/L 的 DMEM 培养基培养 48 h,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法测定各组 HRMPCs 活性。提取各组细胞的蛋白并进行酶切,得到肽段,取 2 μ g 肽段进行飞行时间质谱(TOF-MS)检测,质谱的采集模式为数据依赖性(DDA),对得到的蛋白表达信息进行生物信息学分析。结果 高糖组的 HRMPCs 数量较对照组明显减少,且高糖组的部分细胞出现体积变小、变形等改变。CCK-8 实验结果显示,高糖组 HRMPCs 吸光度(A_{450})值为 0.75 ± 0.04 ,明显低于对照组的 0.91 ± 0.05 ,差异有统计学意义($t=5.784, P=0.0002$)。本研究共鉴定到 1 972 个可定量蛋白,其中差异蛋白有 54 个(差异倍数 >1.5)。相比于对照组,高糖组细胞中上调的差异蛋白有 13 个,包括 CTNNA1、CTBP2 等,下调的差异蛋白有 41 个,包括 SQSTM1、HMGCS1 等。这些差异蛋白主要参与了三羧酸循环、有氧呼吸等生物学过程。结论 高糖刺激 HRMPCs 会改变多种蛋白的表达,进而影响细胞的呼吸作用和 ATP 的生成,最终导致周细胞的缺失。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;蛋白组学;人视网膜微血管周细胞

基金项目:国家自然科学基金项目(81870675)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.004

Proteomic research of human retinal microvascular pericytes stimulated with high glucose

Xiao Mengran, Zhang Xiaomin, Shao Xianfeng, Xiao Jing, Yang Fuhua, Zhang Hui, Vicki L. Ea, Li Xiaorong

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

【Abstract】 Objective To determine the changes of protein expressions in human retinal microvascular pericytes (HRMPCs) stimulated with high glucose by using quantitative proteomics, which provides new clues for future investigation of diabetic retinopathy (DR). **Methods** HRMPCs were divided into two groups. The cells in control group were cultured in DMEM basic medium with 25 mmol/L glucose, while the cells in high glucose group were cultured in DMEM medium with 35 mmol/L glucose. The amount of living cells was measured by cell counting kit-8 (CCK-8). The proteins were collected from the two groups and then were digested with trypsin. Peptides of 2 μ g were injected into the time of flight-mass spectrometer and the acquisition mode was DDA. The results were further analyzed using bioinformatics software. **Results** CCK-8 results showed that the absorbance (A_{450}) of HRMPCs in high glucose group was 0.75 ± 0.04 , which was significantly lower than 0.91 ± 0.05 in control group ($t=5.784, P=0.0002$). In total, 1 972 proteins were identified and 54 of them were significantly different between the two groups (fold change >1.5). Among them, 13 proteins were up-regulated, including CTNNA1 and CTBP2; while 41 proteins were down-regulated, including SQSTM1 and HMGCS1. The differentially expressed proteins were mainly involved in citric acid cycle and aerobic respiration. **Conclusions** The expressions of many proteins in HRMPCs change under the stimulation of high glucose, which may influence the respiration and the ATP production of cells and eventually induce the loss of pericyte.

【Key words】 Diabetic retinopathy; Proteomics; Human retinal microvascular pericyte

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81870675)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.004

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)作为工作年龄人群致盲的首要原因,已受到广泛关注。根据病变的严重程度,DR可分为非增生性糖尿病视网膜病变(nonproliferative DR, NPDR)和增生性糖尿病视网膜病变(proliferative DR, PDR)。目前针对DR的治疗手段主要有全视网膜光凝(pan retinal photocoagulation, PRP)、抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)眼内注射和玻璃体切割手术,但各种方法存在一定的局限性,并且都无法真正控制DR的进展。因此眼科医生们也一直在探寻治疗DR的新方法,比如间充质干细胞治疗^[1-2]。DR的治疗重在早期干预,如果能在DR早期控制其病理发展,将明显改善患者预后,因此对DR早期的发病机制研究具有重要的意义。DR的特征性病变包括基底膜增厚、内皮细胞紧密连接减弱、周细胞的缺失、血管通透性增加和微动脉瘤等,其中视网膜微血管周细胞在DR早期疾病进展的控制中发挥着重要作用,其缺失使其对内皮细胞的增生控制减弱,容易产生新生血管^[3]。有研究表明高糖导致周细胞的缺失与GAPDH/Siah1凋亡通路的激活有关^[4],另有研究表明色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)可以通过谷胱甘肽过氧化物酶途径发挥抗氧化作用,从而抑制高糖或H₂O₂导致的周细胞凋亡及功能缺失。然而,对DR中周细胞缺失的原因仍然缺乏系统性研究。蛋白组是由有机体产生或修饰的整套蛋白质,并且会随时间或有机体状态的不同而发生改变^[5]。近年来,液相串联质谱仪已成为蛋白组学研究领域的重要工具,其具有高灵敏度、高分辨率、高通量的特点,能够对研究对象的蛋白表达进行大规模的定量或定性分析。因此本研究中利用液相串联质谱仪定量分析高糖环境下人视网膜微血管周细胞(human retinal microvascular pericytes, HRMPCs)的蛋白表达,筛选差异蛋白,为DR基础研究或临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞来源 HRMPCs购于上海雅吉生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 4.5 g/L DMEM基础培养基、DPBS溶液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、青链霉素(美国Gibco公司);L-(+)-葡萄糖、D-(+)-葡萄糖、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(dithiothreitol,

DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)(美国Sigma公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(日本Dojindo化学研究所);甲酸、乙腈(德国Merck公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。96孔板、6 cm培养皿(美国Corning公司);0.22 μm除菌过滤器(美国PALL公司);倒置相差显微镜(日本Olympus公司);CO₂细胞培养箱(美国Thermo Scientific公司);Infinite M200型酶标仪(瑞士Tecan公司);Tri Tof 6600质谱仪、ekspert nanoLC 415液相色谱仪(美国AB SCIEX公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将HRMPCs置于体积分数5% CO₂的细胞培养箱中37℃恒温培养,待细胞融合度达到80%~90%时,吸出培养基,无菌PBS清洗1~2遍,加入1 ml胰蛋白酶,于37℃培养箱中消化2 min,取出后在倒置显微镜下观察,发现细胞变小、变圆并呈流沙样流动即可加入2 ml DMEM培养基中止消化,轻轻吹打混匀细胞并收集至15 ml离心管中,1 000×g离心5 min,弃上清,用1 ml DMEM培养基重悬细胞,按1:2的比例将细胞接种于6 cm培养皿中。取培养至3~5代后细胞进行后续实验。

1.2.2 高糖模型的建立 将D-(+)-葡萄糖加入DMEM基础培养基中配制浓度为35 mmol/L葡萄糖的高糖型DMEM培养基,加入等量L-(+)-葡萄糖配制等渗透压DMEM基础培养基,葡萄糖浓度为25 mmol/L,用0.22 μm除菌过滤器过滤。将HRMPCs分为对照组和高糖组,高糖组HRMPCs在高糖型DMEM培养基中培养,对照组细胞使用含25 mmol/L葡萄糖的等渗透压培养基,于细胞培养箱中培养48 h。

1.2.3 CCK-8法测定各组HRMPCs活性 取第3代HRMPCs接种于96孔板中,细胞贴壁后参照1.2.2部分进行分组处理,培养48 h后向每孔中加入体积分数10% CCK-8溶液,避光培养4 h,酶标仪测量每孔在450 nm处的吸光度(A₄₅₀)值。每组设置6个复孔,重复测量3次,取平均值。

1.2.4 各组细胞蛋白提取和酶切 分别取对照组和高糖组细胞融合度大于90%的HRMPCs,经胰蛋白酶消化后转移至1.5 ml离心管中,预冷PBS清洗3次,加入500 μl尿素裂解液,室温下裂解5 min。将样品置于冰上进行超声破碎,超声能量为35%,超声3 s间隔3 s,共2 min。15℃条件下16 000×g离心10 min。取上清液,稀释20倍后用BCA法测蛋白浓度,加入10 mmol/L

DTT 进行还原,37 °C 孵育 1 h,加入 40 mmol/L IAA,在室温下避光孵育 1 h,加入 10 mmol/L DTT 终止反应,37 °C 孵育 1 h。用 400 μ l 50 mmol/L 碳酸氢铵平衡 10 kDa 超滤管 1 次,15 °C 下 14 000 $\times g$ 离心 10 min。加入 100 μ g 处理后的蛋白样本并用 50 mmol/L 的碳酸氢铵将体积补齐到 400 μ l,15 °C 下 14 000 $\times g$ 离心 15 ~ 20 min。用 400 μ l 50 mmol/L 碳酸氢铵清洗 3 次,更换收集管,加 50 μ l 50 mmol/L 碳酸氢铵到超滤管中,加入 2 μ g 胰蛋白酶,37 °C 孵育 4 h,加入 3 μ g 胰蛋白酶孵育 12 ~ 16 h。用移液枪将超滤管中的样本吹打混匀,4 °C 下 14 000 $\times g$ 离心 15 ~ 20 min,用 50 μ l 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液冲洗 3 次,向收集管中加入体积分数 1% 甲酸水溶液终止酶切,60 °C 真空蒸干。12 μ l 体积分数 0.1% 甲酸水重悬样本,取 2 μ g 肽段进行质谱定量。

1.2.5 质谱检测 用含 0.1% 甲酸和体积分数 2% 乙腈的水溶液作为加样缓冲液将 2 μ g 肽段载入到 C18 的预柱上(350 μ m \times 0.5 mm,填料规格 3 μ m,120A)。洗脱剂为 0.1% 甲酸和 98% 乙腈,用不同梯度的洗脱剂洗脱预柱,肽段经过 C18 分析柱分离(75 μ m \times 15 cm,填料规格 3 μ m,120A),随后进入质谱进行检测。洗脱剂的有效洗脱梯度为 5% ~ 35%,有效时间为 91 min,流速为 0.3 μ l/min。数据的采集模式为 DDA。质谱采集参数:飞行时间质谱(time of flight-mass spectrometer, TOF-MS)累加时间为 250 ms,质量扫描范围为 300 ~ 1 500 Da,电荷选择+2 ~ +5 价,质量偏差 50 ppm 以内,每次检测隔离已检测离子 15 s,碎裂方式选择动态能量碎裂。Production 累加时间为 50 ms,质量扫描范围为 100 ~ 1 500 Da,采用高灵敏的扫描模式。

1.2.6 数据的解析 使用 Maxquant 软件对质谱原始数据定量,参数设置:酶切方式选择 trypsin/p,且最多允许 2 个漏切位点,前体离子最大质量偏差为 0.1 Da,碎片离子最大质量偏差为 50 ppm。动态修饰选择甲硫氨酸的氧化、氮端乙酰化、丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸的磷酸化,固定修饰选择半胱氨酸 Carbamidomethyl,每个肽段最多允许含有 5 个修饰位点。仪器种类选择 AB SCIEX 的 Q-TOF,最短肽段长度为 6 个氨基酸,最大肽段相对分子质量为 5 000 Da。谱图和蛋白的阳性发现错误率(false discovery rate, FDR) \leq 0.01。蛋白定量时,使用 Unique+razor 的肽段进行定量

且每个蛋白至少含 2 个肽段,采用 iBAQ 算法计算定量值,除 Oxidation[M] 和 Acetyl[Protein N-term] 修饰外,所有含其他翻译后修饰的肽段均不用于蛋白定量。

1.2.7 生物信息学分析 对定量数据进行生物信息学分析。利用 Pearson 相关分析进行样本间的相关性分析;用 matrixTests 0.1.2 进行差异蛋白的筛选;并用 pheatmap 1.0.12 绘制热图,ggplot2 绘制火山图;利用 clusterProfiler 3.10.1 进行基因注释(Gene Ontology, GO)分析及 Reactome 通路的富集分析;用 STRING 11.0 进行蛋白间相互作用的分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。各组细胞 A_{450} 值比较采用独立样本 t 检验,差异蛋白的筛选采用单因素方差分析。Pearson 相关分析使用 R 语言(版本 3.5.3)psych 包进行分析, α 可信水平设置为 0.05。

2 结果

2.1 对照组和高糖组 HRMPCs 形态和活性比较

典型的视网膜微血管周细胞呈宽大、扁平、不规则形,培养后 48 h 高糖组的 HRMPCs 数量较对照组明显减少,且高糖组部分细胞出现体积变小、变形等改变(图 1)。CCK-8 法结果显示,高糖组 HRMPCs A_{450} 值为 0.75 ± 0.04 ,明显低于对照组的 0.91 ± 0.05 ,差异有统计学意义($t=5.784, P=0.0002$)(图 2)。

2.2 高糖刺激 HRMPCs 蛋白表达变化

Pearson 线性相关分析显示 2 个组内蛋白表达量相关系数均大于 0.84(图 3A),表明数据具有很高的重复性。本研究共鉴定到 1 972 个可定量蛋白(定量值不含有 missing value 的蛋白数),大部分蛋白的表达无明显变化,其中差异蛋白有 54 个,高糖刺激后明显上调的蛋白有 13 个,包括 CTNNB1、CTBP2 等与 Wnt 信号通路及细胞凋亡密切相关的蛋白;明显下调的蛋白有 41 个,包括 SQSTM1、AXL 等与细胞自噬、细胞凋亡有关的蛋白(图 3B,C)。



图 1 光学显微镜下观察对照组和高糖组 HRMPCs 形态 高糖组细胞出现体积变小、变形等改变 A:对照组 B:高糖组 图 2 对照组和高糖组 HRMPCs 的增殖值比较 与对照组比较,^a $P<0.001$ (独立样本 t 检验, $n=6$)

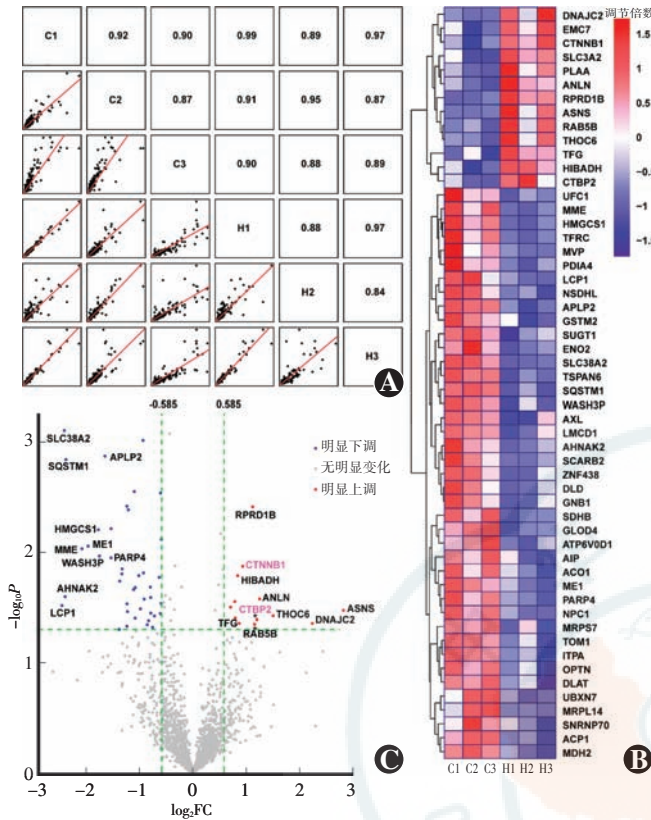


图 3 高糖刺激 HRMPCs 引起的蛋白表达改变 A: 各组样本的蛋白表达量 Pearson 线性相关分析 C: 对照组; H: 高糖组 B: 差异蛋白的聚类分析 heatmap 红色代表上调的蛋白, 蓝色代表下调的蛋白 C: 对照组; H: 高糖组 C: 可定量蛋白的表达信息火山图 图中 2 条竖虚线代表 FC 分别为 0.67 和 1.5 时的分界线, 横虚线代表 P 值为 0.05 的分界线 FC: 蛋白差异倍数

2.3 差异蛋白的 GO 分析

GO 分析可以对差异蛋白进行分类, 通过 GO 分析可以了解差异蛋白参与的生物相关功能, 主要包括生物过程和分子功能。与对照组比较, 高糖组中显著下调的生物过程包括枸橼酸代谢过程、三羧酸循环、有氧呼吸、乙酰辅酶 A 代谢过程、前体代谢产物和能量的生成过程、丙酮酸代谢过程和辅酶代谢过程等, 而显著富集的分子功能包括氧化还原酶活性、细胞黏附分子结合和 NAD 结合等, 其中参与氧化还原酶活性以及 NAD 结合的蛋白有 CTBP2 和 HIBADH, 与细胞黏附分子结合有关的蛋白有 ANLN、CTNNB1 和 SLC3A2 (图 4)。

2.4 差异蛋白 Reactome 通路

分析

利用 Reactome 数据库对差异蛋白进行信号通路分析, 共富集到 6 条下调的信号通路和 1 条上调的通路。下调的信号通路多数与三羧酸循环有关, 提示高糖刺激 HRMPCs 后, 其能量代谢减少, 可能会引起乳酸增多; 其他下调的通路还包括铁的吸收和转运以及丙酮酸脱氢酶复合物的调节等 (图 5)。上调的通路为 Wnt 信号通路, 其激活与细胞凋亡有关。

2.5 差异蛋白间的相互作用

对差异蛋白进行蛋白-蛋白间相互作用分析, 按照蛋白已知的功能对相互作用的蛋白进行分类, 主要分为物质代谢、泛素结合、三羧酸循环、物质转运、线粒体自噬及其他六类。在物质代谢与线粒体自噬分类中, 蛋白表达均下调, 而在泛素结合、三羧酸循环、物质转运分类中, 均出现了表达上调和下调的蛋白。蛋白间相互作用的强弱以节点大小表示, 图 6 显示关联较紧密的蛋白有 TFRC、ACO1、MME、MDH2 和 SDHB 等, 主要与物质代谢、转运及三羧酸循环等功能相关。

3 讨论

近年来, 有研究利用蛋白组学技术研究病理状态下细胞或生物体的蛋白表达变化, 来寻找生物标志物或进行进一步的机制探索。利用蛋白组学研究发现在增生性玻璃体视网膜病变中原有的玻璃体蛋白质发生

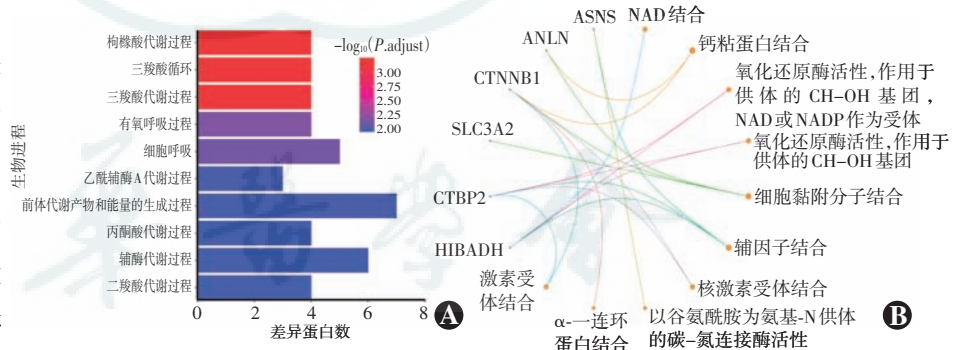


图 4 高糖状态下差异蛋白的 GO 分析 A: 差异蛋白参与的生物进程 横坐标为参与该生物进程的差异蛋白数, 条形图的颜色按照矫正后的 P 值大小进行填充 B: 差异蛋白的分子功能分析

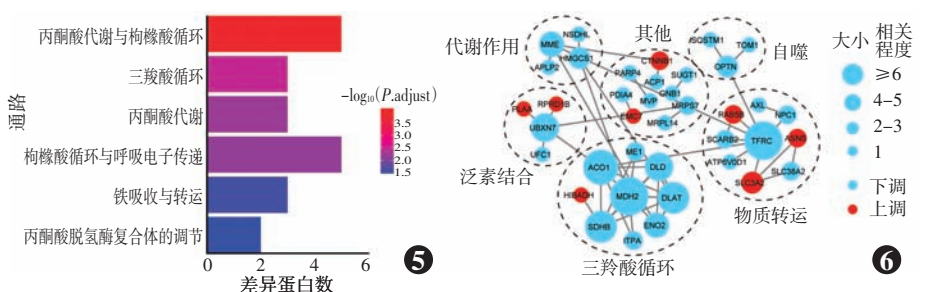


图 5 高糖状态下差异蛋白 Reactome 通路分析 条形图颜色按照矫正后 P 值进行填充 图 6 差异蛋白的蛋白-蛋白间相互作用 节点越大代表关联性越强

降解,而血清中的部分蛋白明显上调,表明其发病过程中有血-视网膜屏障破坏^[6]。通过对糖尿病性白内障和年龄相关性白内障患者晶状体蛋白组学的差异对比,发现 α B 晶状体蛋白和 β B1 晶状体蛋白加速了糖尿病性白内障的发展^[7]。已有针对 DR 的蛋白组学相关研究报道,样本来源涵盖了动物模型及临床样本^[8-10],但是针对视网膜微血管周细胞的蛋白组学研究尚未见报道。周细胞是视网膜血管中最先受到影响的细胞,因此对周细胞的研究更能反映 DR 早期的微血管病理变化。用高糖刺激 HRMPCs 是成熟的细胞 DR 造模方法,该方法简单易行,能够在体外模拟糖尿病时周细胞所处的环境。这样的设计确保本研究得出的结果更有针对性,更能代表周细胞在不受其他混杂因素影响的条件所发生的变化。然而,人体在糖尿病状态下的改变十分复杂,本研究中仅检测了高糖环境下周细胞蛋白表达的改变,检测结果不能代表疾病的整体改变,这也是本研究的不足之处。

本研究中利用高分辨质谱共检测到 54 个表达有显著差异的蛋白。上调的蛋白 CTNNB1,即 β -catenin,是 Wnt 信号通路中的一个关键蛋白^[11]。Chen 等^[12]研究发现, β -catenin 水平在 DR 患者的视网膜和 DR 动物模型中均有升高,与本研究结果一致。另一个上调的蛋白 CTBP2 在食管癌中被证实能抑制顺铂造成的细胞凋亡^[13],同样 CTBP2 在前列腺癌中影响 VEGFA、FSHR、FHL2 和 SMAD3 等与血管生成有关的因子,并通过 c-Myc 通路促进细胞增生,CTBP2 在视网膜神经节细胞中同样发挥着抗凋亡的作用^[14-16]。另一个上调蛋白 THOC6 是 THO/TREX 复合体的一员,其参与 mRNA 的加工和核转运。研究发现 THOC6 在中脑和眼中高表达,且敲低 THOC6 后细胞凋亡有所增加^[17]。本研究中高糖组 CTBP2 和 THOC6 表达均明显上调,可能与负反馈调节机制相关,即 HRMPCs 在高糖刺激下,发生凋亡的同时可能会代偿性地激活 CTBP2 和 THOC6 等抗凋亡因子的表达。

下调的蛋白中 SQSTM1 编码质粒在大鼠模型中有预防年龄相关性黄斑变性的作用^[18]。SQSTM1 与细胞自噬有关,以往研究表明,SQSTM1 能通过增加自噬来改善视网膜色素上皮细胞的存活^[19]。此外,p62/SQSTM1 对内质网应激诱导的细胞凋亡具有抑制作用^[20]。AXL 具有抑制细胞凋亡的作用,在乳腺癌细胞中下调 AXL 表达能够促进细胞凋亡^[21]。本研究中 AXL 表达的下调可能会促进周细胞的凋亡。目前在 DR 中未发现 AXL 相关的研究报道,因此对 AXL 在 DR 整个病理过程中及周细胞缺失中的作用进行研究

具有重要意义。

在 GO 分析和通路分析中,三羧酸循环均表现出明显的下调。三羧酸循环是有氧糖代谢的重要过程,可以利用碳水化合物、蛋白质和脂肪中的乙酰-CoA 合成 ATP,同时产生用于其他反应的特定氨基酸前体和还原剂 NADH。因此三羧酸循环途径的下调会导致细胞 ATP 合成减少,同时会激活无氧糖酵解途径导致乳酸等代谢物的堆积,诱导细胞凋亡,这与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和钙释放增加及线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 下降密切相关^[22]。上调的 Wnt 信号通路已被证明与 DR 的发生关系紧密,其下游靶基因包括炎症因子、VEGF 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF),其中 VEGF 的上调是 DR 病理性新生血管形成的重要原因^[12],而 CTGF 被证实与糖尿病中周细胞的减少有关,CTGF 敲除小鼠因糖尿病引起的周细胞缺失症状较非 CTGF 敲除小鼠相应减轻^[23]。Wnt 通路的激活也与细胞凋亡有关,有研究表明 Wnt 激动剂可诱导内质网应激和 caspase 非依赖性凋亡细胞死亡^[24]。

综上所述,本研究表明高糖刺激下 HRMPCs 的缺失可能与 SQSTM1 和 AXL 等蛋白的下调有关,此外有氧呼吸及三羧酸循环的下调导致细胞 ATP 合成不足和乳酸堆积,可能在周细胞的缺失中发挥重要作用;同时一些抗凋亡因子可能代偿性升高。后续实验可以考虑针对这些蛋白及通路进行深入研究,阐明其造成周细胞缺失的具体机制,寻找可能成为逆转周细胞缺失情况的靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁庆玲,李世迎,段平,等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗增生性糖尿病视网膜病变的安全性[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(11): 852-858. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 007. Liang QL, Li SY, Duan P, et al. Safety of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in proliferative diabetic retinopathy patients [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36 (11) : 852-858. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 007.
- [2] 陈莉,陈松. 间充质干细胞治疗早期糖尿病视网膜病变研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(7) : 667-671. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 07. 020. Chen L, Chen S. Research progress of mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(7) : 667-671. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 07. 020.
- [3] Beltramo E, Porta M. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(26) : 3218-3225.
- [4] Suarez S, McCollum GW, Jayagopal A, et al. High glucose-induced retinal pericyte apoptosis depends on association of GAPDH and Siah1 [J]. J Biol Chem, 2015, 290(47) : 28311-28320. DOI: 10. 1074/jbc. M115. 682385.
- [5] Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, et al. Comprehensive

- proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3): 601-613. DOI: 10. 1002/stem. 2298.
- [6] 于靖, 王方. 增生性玻璃体视网膜病变玻璃体中差异蛋白质组的鉴定 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29(4): 350-354. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 04. 015.
- Yu J, Wang F. Differentiation of vitreous proteome in human eye with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29(4): 350-354. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 04. 015.
- [7] 禹倩倩, 姚勇, 储兆东, 等. 糖尿病性白内障和年龄相关性白内障晶状体蛋白质组学的差异分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(6): 548-552. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 06. 016.
- Yu QQ, Yao Y, Chu ZD, et al. Difference analysis of proteome between diabetic cataract and age related cataract [J]. 2012, 30(6): 548-552. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 06. 016.
- [8] Vähätupa M, Nättinen J, Jylhä A, et al. SWATH-MS proteomic analysis of oxygen-induced retinopathy reveals novel potential therapeutic targets [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(8): 3294-3306. DOI: 10. 1167/iovs. 18-23831.
- [9] Li J, Lu Q, Lu P. Quantitative proteomics analysis of vitreous body from type 2 diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2018, 18(1): 151 [2019-02-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29940965>. DOI: 10. 1186/s12886-018-0821-3.
- [10] Gopalakrishnan V, Purushothaman P, Bhaskar A. Proteomic analysis of plasma proteins in diabetic retinopathy patients by two dimensional electrophoresis and MALDI-Tof-MS [J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(7): 928-936. DOI: 10. 1016/j. jdiacomp. 2015. 05. 021.
- [11] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22429-22433. DOI: 10. 1074/jbc. R600015200.
- [12] Chen Y, Hu Y, Zhou T, et al. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(6): 2676-2685. DOI: 10. 2353/ajpath. 2009. 080945.
- [13] Shi H, Mao Y, Ju Q, et al. C-terminal binding protein-2 mediates cisplatin chemoresistance in esophageal cancer cells via the inhibition of apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1): 167-176. DOI: 10. 3892/ijo. 2018. 4367.
- [14] Xuan Q, Zhong X, Li W, et al. CtBP2 is associated with angiogenesis and regulates the apoptosis of prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 1259-1267. DOI: 10. 3892/or. 2017. 5763.
- [15] Zhang C, Gao C, Xu Y, et al. CtBP2 could promote prostate cancer cell proliferation through c-Myc signaling [J]. *Gene*, 2014, 546(1): 73-79. DOI: 10. 1016/j. gene. 2014. 05. 032.
- [16] Wang W, Zhang G, Gu H, et al. Role of CtBP2 in the apoptosis of retinal ganglion cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 633-640. DOI: 10. 1007/s10571-015-0158-x.
- [17] Beaulieu CL, Huang L, Innes AM, et al. Intellectual disability associated with a homozygous missense mutation in THOC6 [J/OL]. *Orphanet J Rare Dis*, 2013, 8: 62 [2019-02-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621916>. DOI: 10. 1186/1750-1172-8-62.
- [18] Kolosova NG, Kozhevnikova OS, Telegina DV, et al. p62/SQSTM1 coding plasmid prevents age related macular degeneration in a rat model [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(8): 2136-2147. DOI: 10. 18632/aging. 101537.
- [19] Song C, Mitter SK, Qi X, et al. Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171940 [2019-02-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28222108>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0171940.
- [20] Park JS, Oh SY, Lee DH, et al. p62/SQSTM1 is required for the protection against endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death [J]. *Free Radic Res*, 2016, 50(12): 1408-1421. DOI: 10. 1080/10715762. 2016. 1253073.
- [21] Huang C, Huang YL, Wang CC, et al. Ampelopsin A and ampelopsin C induce apoptosis and metastasis through down-regulating AxL, TYRO3, and FYN expressions in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(10): 2818-2830. DOI: 10. 1021/acs.jafc. 8b06444.
- [22] Hsiao YP, Huang HL, Lai WW, et al. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT) [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 54(3): 175-184. DOI: 10. 1016/j. jdermsci. 2009. 02. 012.
- [23] van Geest RJ, Leeuwis JW, Dendooven A, et al. Connective tissue growth factor is involved in structural retinal vascular changes in long-term experimental diabetes [J]. *J Histochem Cytochem*, 2014, 62(2): 109-118. DOI: 10. 1369/0022155413512656.
- [24] Kato Y, Naiki Y, Komatsu T, et al. A Wnt pathway activator induces apoptosis and cell death in mouse monocytic leukemia cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(4): 479-483. DOI: 10. 3727/096504016X14721731148893.

(收稿日期: 2019-07-13 修回日期: 2019-08-01)

(本文编辑: 张宇)

读者 · 作者 · 编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件,如 2 个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者,视作自行撤稿。

(本刊编辑部)