

· 实验研究 ·

RNA 测序法比较 POAG 与非 POAG 供体眼球小梁网基因表达的差异

刘丽芳 曾锦惠 黄楚开 王耿 张铭志

汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心 515041

通信作者:张铭志, Email: zms@jsiec.org

【摘要】 **目的** 使用 RNA 测序技术比较原发性开角型青光眼(POAG)与正常人小梁网组织基因表达谱的差异,探讨 POAG 可能的基因学病因。**方法** 实验组小梁网组织来自汕头国际眼科中心行小梁切除术的 3 例 POAG 患者,对照组小梁网组织来自汕头眼库的 2 例非 POAG 供体眼球。提取 2 个组小梁网组织 RNA 进行测序获得基因表达谱,用 R 软件包 edgeR 分析实验组与对照组基因表达的差异,用 DAVID 生物信息分析网站对差异基因进行基因本体(GO)及功能注释聚类分析。采用 KOBAS 3.0 进行 PANTHER 富集通路分析,揭示 POAG 可能的基因学病因。**结果** (1)RNA 测序共得到 28 821 条基因,2 个组间有统计学差异的基因 22 条[错误发现率(FDR)<0.05],其中转录表达上升的基因 1 条,转录表达下降的基因 21 条;(2)表达差异的基因功能集中,生物学过程涉及角化、表皮发育、中间丝细胞骨架组织等,细胞成分涉及角蛋白丝、中间丝、细胞外泌体、触珠蛋白-血红蛋白复合体等,分子功能涉及结构分子活性、细胞骨架结构组成等;(3)与差异基因相关的 PANTHER 富集通路主要包括纤溶酶原激活级联反应、p38 MAPK、氧化应激反应及 p53 通路等。**结论** 角蛋白表达异常、中间丝细胞骨架结构改变、血纤维蛋白溶酶原激活级联反应以及 p38 MAPK 等通路调控改变引起的小梁网及细胞外基质重塑可能是 POAG 发病的原因。其中,与发病机制相关的差异基因主要包括细胞骨架相关基因及细胞外基质重塑相关基因,细胞骨架及细胞外基质可作为青光眼治疗的靶组织。

【关键词】 原发性开角型青光眼;小梁网;RNA 测序

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030310504);汕头市医学科技人才培养及临床技术提升计划项目(汕府科[2019]106号)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191018-00451

Differential gene expression profiles of trabecular meshwork between POAG and non-POAG donated eyes by using RNA-sequencing

Liu Lifang, Zeng Jinhui, Huang Chukai, Wang Geng, Zhang Mingzhi

Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041, China

Corresponding author: Zhang Mingzhi, Email: zms@jsiec.org

【Abstract】 **Objective** To investigate gene basis of primary open angle glaucoma (POAG) by comparing gene expression profile of trabecular meshwork between POAG patients and normal controls by using RNA-sequencing. **Methods** Trabecular meshwork specimen were obtained from trabeculectomy (POAG group, $n=3$) or donated eyes (control group, $n=2$). RNA was extracted and sequenced in both groups, gene expression profiles were analyzed and compared between them, and different expression genes associated with POAG were revealed by using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) and Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) gene list analysis. Written informed consent was obtained from each patient or the family members prior to entering the study cohort. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong [No. EC20140311 (3)-P01]. **Results** (1) Total of 28 821 genes were obtained from RNA-sequencing, 22 genes were statistically significant between the two groups, of which one gene was up-regulated and 21 genes were down-regulated; (2) Genes that expressed differently had concentrated functions, biological process involved keratinization, epidermis development and intermediate filament cytoskeleton organization, cellular component related to keratin filament, intermediate filament, extracellular exosome and haptoglobin-hemoglobin complex, molecular function related to structural molecule activity and structural constituent of cytoskeleton; (3) Significantly enriched PANTHER pathways were plasminogen

activating cascade, p38 MAPK pathway, oxidative stress response and p53 pathway. **Conclusions** Trabecular meshwork and extracellular matrix remodeling due to abnormal keratin expression, structural change of intermediate filament cytoskeleton and misregulation of plasminogen activating cascade, p38 MAPK pathway were possible etiology of POAG. Differential expressed genes that related to POAG mainly involve cytoskeleton associated genes and extracellular matrix remodeling genes. Thus, regulation of these genes may have an effect on glaucomatous treatment.

[**Key words**] Primary open angle glaucoma; Trabecular meshwork; RNA-sequencing

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030310504); Medical Technology Talents Cultivation and Clinical Technique Enhancement Program of Shantou City (Scientific Program of ShanTou Government, [2019], number 106)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191018-00451

青光眼是一组以视网膜神经节细胞进行性死亡、视神经萎缩及视野缺损为特征的不可逆性致盲眼病,小梁网的结构改变及功能损伤引起的眼压升高是其已知的危险因素之一,但小梁网损伤确切的分子机制尚不明确。获取小梁网的基因表达信息可拓宽我们对小梁网细胞的功能认知,进而揭示其在眼压调节及青光眼病程进展中的作用。基因芯片法及标记测序法是评估基因转录水平常用的方法,但既往关于此方面的研究主要存在以下不足:(1)研究对象主要采用非青光眼或健康捐献眼、活体动物模型、分离及培养的小梁网组织/细胞体外实验^[1-3]; (2)仅能获得已知基因序列的转录信息,无法识别基因的动态表达^[4]; (3)小梁网的特异性细胞标志物及基因转录过程尚不明确^[5],小梁网或细胞外基质的差异表达及其对眼压的动态调节过程仍无定论^[6],原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)相关的信号转导通路亟待进一步验证^[7]。随着研究的进展, RNA 测序法逐渐成为识别基因表达信息的金标准,其不依赖于已有基因序列,可发现未知转录区域及低表达水平的基因,在获取新的序列信息时可对数据进行重新分析,具有高灵敏度、高通量、实验周期短、所需样本量小、花费相对较低等优点^[4]。RNA 测序法已被应用于青光眼及视神经损伤等相关基础研究中,如青光眼动物模型组织的基因差异表达、成人/胚胎小梁网的基因转录特点、糖皮质激素敏感与糖皮质激素非敏感者小梁网细胞的基因差异表达、青光眼术后结膜组织瘢痕化以及视神经轴突损伤后鼠类视网膜的转录变化等研究^[8-12],但关于人类 POAG 小梁网组织 RNA 测序方面的研究仍鲜有报道。本研究拟采用 RNA 测序法比较 POAG 与非 POAG 供体眼球小梁网组织基因表达的差异,探讨 POAG 可能的基因学病因。

1 材料与方法

1.1 材料

纳入 2015 年 1 月至 2016 年 12 月在汕头国际眼

科中心行小梁切除术的 POAG 患者 3 例,术中收集小梁网组织作为实验组;对照组小梁网组织来自汕头眼库 2 例非 POAG 供体眼球。实验组纳入标准:确诊为 POAG 的患者^[13];排除标准:先天性青光眼、继发性青光眼、遗传性眼病或小梁切除术中联合使用抗代谢药物者。对照组纳入标准:非 POAG 患者且人类免疫缺陷病毒阴性;排除标准:有眼部感染、眼部恶性肿瘤或转移瘤、长期糖皮质激素用药史、青光眼病史、青光眼家族史或有眼外伤史者。收集实验组研究对象的性别、年龄等基本资料,进行眼压、房角、杯盘比、视野等眼科检查,记录对照组研究对象的全身及眼部病史、眼部大体情况,条件允许时附加裂隙灯显微镜检查结果。实验组和对照组的一般资料见表 1。本研究获汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心伦理委员会批准[批文号:EC20140311(3)-P01],入组前所有研究对象或家属均签署知情同意书。

表 1 实验组和对照组一般资料
Table 1 Clinical information of POAG patients and non-POAG donated eyes

组别	编号	年龄(岁)	性别	其余眼病	用药后眼压(mmHg)	死亡原因
实验组	P1	56	女	白内障	24	-
	P2	62	男	白内障	24	-
	P3	71	女	白内障	19	-
对照组	C1	38	男	无	-	消化道出血
	C2	53	男	白内障	-	直肠癌癌

注:(1 mmHg=0.133 kPa) POAG:原发性开角型青光眼;-:不清楚
Note:(1 mmHg=0.133 kPa) POAG:primary open angle glaucoma;-:unclear

1.2 方法

1.2.1 小梁组织的获取及保存 实验组行常规小梁切除术,术中使用眼科圆规尺量出长 3 mm、宽 1 mm 的标记,标记前界位于角巩膜缘灰白线,后界位于小梁与巩膜交界处,15°刀及维纳斯剪切除小梁网组织。对照组小梁网组织获取方法同实验组。小梁网组织取出

后立即保存于 10 倍体积的 RNA 保护剂 (Invitrogen RNAlater® RNA Stabilization Solution), 置于 4 °C 冰箱 24 h, 保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.2 人小梁网组织标本 RNA 提取 用 PicoPure® RNA Isolation Kit (美国 ThermoFisher 公司) 行小梁网组织 RNA 提取, 实验步骤严格遵循厂家提供的说明书。将小梁网组织块从 RNA 保护剂中取出, 用经质量分数 1% 焦碳酸二乙酯处理的维纳斯剪及有齿镊将其剪碎至颗粒状, 然后转移至微量离心管, 移取 100 μ l 提取缓冲液至微量离心管并使用移液器反复吹打, 使小梁网颗粒均匀悬浮于提取缓冲液中。将微量离心管置于 42 °C 中孵育 30 min, 3 000 \times g 离心 2 min。将包含 RNA 的上清液移至新的微量离心管, 加入 100 μ l 体积分数 70% 的乙醇溶液, 使用移液器吹打以混合液体。移取 250 μ l 孵育缓冲液至试剂盒纯化柱的滤膜上, 室温下孵育 RNA 纯化柱滤膜 5 min, 在其自身附带收集管中 16 000 \times g 离心 RNA 纯化柱 1 min。将 XB 缓冲液和乙醇混合液移至经孵育缓冲液预处理的 RNA 纯化柱, 绑定 RNA 至 RNA 纯化柱, 100 \times g 离心 2 min, 16 000 \times g 离心 30 s 以去除溢流液。移取 100 μ l 洗涤缓冲液 1 至 RNA 纯化柱, 8 000 \times g 离心 1 min。移取 100 μ l 洗涤缓冲液 2 至 RNA 纯化柱, 8 000 \times g 离心 1 min。再移取 100 μ l 洗涤缓冲液 2 至 RNA 纯化柱, 16 000 \times g 离心 2 min。检查 RNA 纯化柱是否有液体残留在滤膜上, 如果滤膜上有液体残留则 16 000 \times g 离心 1 min。将 RNA 纯化柱移至新的 0.5 ml 微量离心管, 移取 20 μ l 洗出缓冲液到 RNA 纯化柱滤膜正上方, 室温孵育 RNA 纯化柱 1 min。1 000 \times g 离心 RNA 纯化柱微量离心管装置 1 min 以甩脱 EB 缓冲液, 16 000 \times g 离心 1 min 以甩脱 RNA。

1.2.3 RNA 质量分析、扩增及测序 用 NanoDrop® 分光光度计 (美国 ThermoFisher 公司) 定量提取的 RNA, 保存于干冰中, 由北京安诺优达基因科技有限公司进行纯度、浓度与完整性检测; 使用 K5500 微量分光光度计 (北京凯奥科技发展公司) 进行纯度检测, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 及 Agilent RNA 6000 Pico Kit (美国 Agilent 公司) 进行浓度和完整性检测。总 RNA 用 Smart-Seq2 法进行逆转录和扩增, 产物 cDNA 纯化后取 1 μ l 检测浓度及完整性。扩增产物行建库测序, 原始数据以 FASTQ 格式记录, 原始资料经 Trimmomatic 软件过滤和处理后得到净数据。

1.2.4 差异基因筛选及功能通路分析 使用 R 软件包 edgeR (exact test for negative binomial distribution, Bioconductor package in R software) 分析实验组与对照

组小梁网组织的差异表达, 选定分散阈值 0.4 进行 exactTest, 取错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 进行过滤, 2 组基因表达差异的大小采用倍数变化 (fold change, FC) 来衡量, 所有数据进行 Log₂ 转换, 以 $|\text{Log}_2 \text{FC}| \geq 1$ (即 $\text{FC} \geq 2$)、 $-\text{Log}_{10}(P \text{ 值}) > 1.3$ ($-\text{log}_{10} 0.05 = 1.3$) 为统计学差异标准^[14]。用 DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.7) 生物分析网站对差异基因进行本体及功能注释聚类分析, 用 KOBAS 3.0 进行 PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) 富集通路分析, 当校正 P 值 < 0.05 (Benjamini 法) 时认为差异有统计学意义^[15]。

2 结果

2.1 小梁网组织 RNA 及 cDNA 扩增产物质量分析

RNA 样本的 A_{260}/A_{280} 值为 2.0 ± 0.4 , RNA 完整性指数约为 7。扩增 cDNA 满足建库需要, 在 1~2 kb 片段长度范围内存在明显的目的产物主峰 (图 1), 完整性较好。文库片段大小、浓度合格 (表 2)。5 个样本的数据质量平均值 (Phred score) 均在 30 以上。

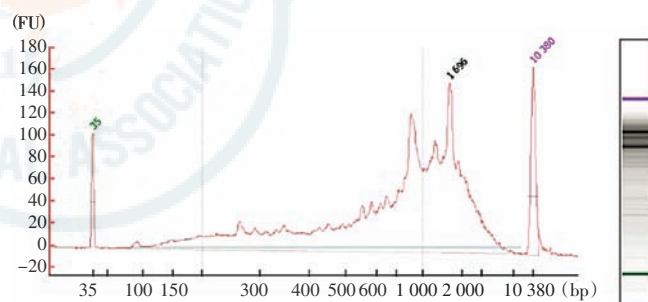


图 1 cDNA 扩增检测结果

Figure 1 Testing results of amplified cDNA

表 2 建库测序检测结果
Table 2 Testing results of library sequencing

文库编号	片段大小 (bp)	浓度 (nmol/L)	检测结果
P1	359	202.70	合格
P2	358	74.48	合格
P3	361	125.84	合格
C1	349	41.66	合格
C2	347	150.75	合格

2.2 2 个组差异表达基因及其功能

将实验组与对照组的小梁网组织转录组进行比较, 共获取 28 821 条基因, 其中转录表达上调的基因 1 条, 转录表达下调的基因 21 条 (图 2)。表达变化的基因按 FDR 由小到大排列, 这些基因由于 POAG 引起表达变化的可能性由大到小 (表 3)。

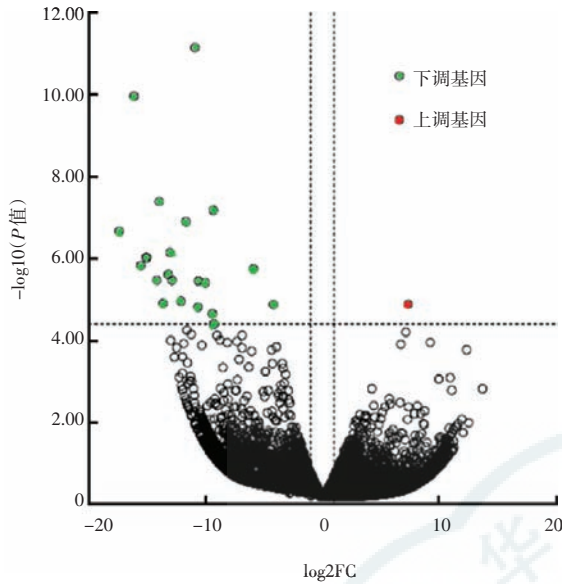


图 2 实验组与对照组差异表达基因火山图 绿色点代表下调基因,红色点代表上调基因 FC:倍数变化
Figure 2 Volcanic map of differential expressed genes between the experimental and control group Green represents down-regulated genes, red represents up-regulated genes FC:fold change

表 3 实验组与对照组差异表达基因及其概率

Table 3 Differential expressed genes and their probability between experimental and control groups

基因简称	Log2FC	FDR
HP	-10.932 798 17	2.00E-07
KRT16	-16.165 321 28	1.61E-06
SPRR2A	-14.008 653 17	4.43E-04
DARC	-9.363 202 48	5.49E-04
CSF3	-11.706 394 93	8.43E-04
KRT6A	-17.430 825 22	1.20E-03
SAA2	-13.103 778 51	3.51E-03
GJB2	-15.087 123 91	3.71E-03
AQP3	-15.120 699 41	3.71E-03
KRT14	-15.581 595 59	5.19E-03
MMP3	-5.909 954 74	5.68E-03
KRT6C	-13.227 520 34	7.25E-03
GJB6	-10.649 393 43	8.35E-03
LY6D	-12.915 095 71	8.35E-03
KRT6B	-14.209 721 81	8.35E-03
SPRR2E	-10.048 140 58	8.60E-03
SBSN	-12.128 249 37	2.36E-02
DUSP1	-4.202 904 843	2.40E-02
HBA1	7.362 578 703	2.40E-02
KRTDAP	-13.678 634 75	2.40E-02
SFN	-10.677 756 44	2.66E-02
S100A2	-9.440 896 56	3.73E-02

注:FC:倍数变化;FDR:错误发现率
 Note:FC:fold change;FDR:false discovery rate

把表达差异有统计学意义的基因导入 DAVID 生物信息网站进行分析,发现表达差异的基因功能较集中,生物学过程涉及角化(GO:0031424)、表皮发育(GO:0008544)以及中间丝细胞骨架组织(GO:0045104),细胞成分涉及角蛋白丝(GO:0045095)、中间丝(GO:0005882)、细胞外泌体(GO:0070062)以及触珠蛋白-血红蛋白复合物(GO:0031838),分子功能涉及结构分子活性(GO:0005198)及细胞骨架结构组成(GO:0005200)(图3)。与差异基因相关的PANTHER富集通路主要包括纤溶酶原激活级联反应(P00050)、p38 MAPK(P05918)、氧化应激反应(P00046)、p53(P00059)等(图4)。

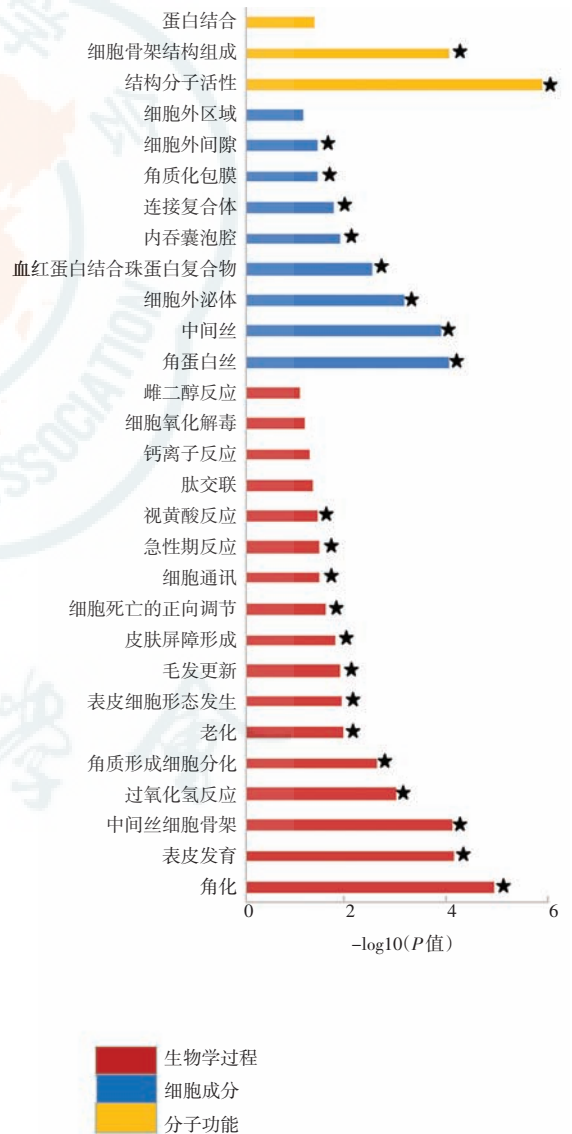


图 3 差异基因的生物过程、细胞成分及分子功能分析 ★:有统计学意义的 GO

Figure 3 Biological process, cellular component and molecular function of differential expressed genes ★: represents statistically significant GO terms

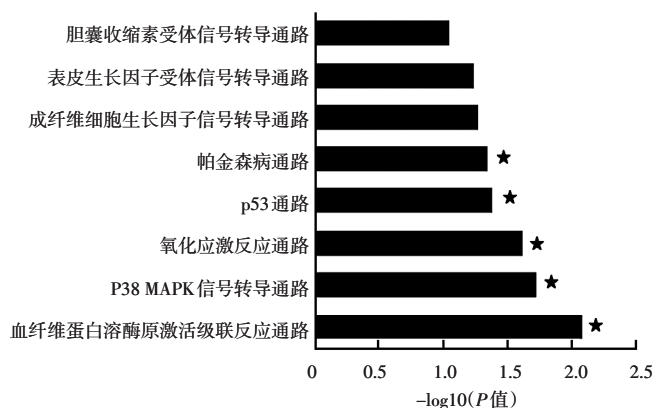


图 4 差异基因涉及的信号转导通路 ★: 有统计学意义的通路

Figure 4 Signal transduction pathways of differential expressed genes ★: statistically significant pathways

3 讨论

既往转录分析主要依靠基因芯片法,而 RNA 测序法的兴起使转录分析不再依赖预先设计的序列探针即可对转录活动进行检测,从而提供更高的检测通量以及更广泛的检测范围,是目前研究基因转录的金标准^[16]。对比分析研究表明 RNA 测序法与基因芯片法测得的结果高度相关,但 RNA 测序法在低表达水平时检测基因存在及差异表达方面的敏感度及准确性更高^[17]。本研究通过 RNA 测序法比较 POAG 与非 POAG 供体眼球小梁网组织基因表达的差异,结果发现实验组与对照组小梁网差异基因涉及的生物学过程包括角化、表皮发育、中间丝细胞骨架组织等,参与的基因主要有 *KRT16*、*KRT14*、*KRT6C*、*KRT6A*、*SPRR2A*、*SPRR2E* 和 *SFN*,其中角蛋白基因的作用最为突出。角蛋白是中间丝蛋白家族的重要成员,其主要表达于上皮细胞^[18],可动态调控细胞结构、体积、弹性、增殖性以及细胞运输、蛋白质翻译、应激反应等过程^[19-21],在细胞分化、发育、移行、浸润、黏附以及细胞与细胞外基质交互作用等过程中发挥重要作用^[18,21-22],并可保护细胞免受凋亡损伤^[19]。在应激及微环境发生变化的情况下,角蛋白通过磷酸化过程调节细胞顺应性、调节角蛋白与其他蛋白的相互作用、抑制角蛋白变性而发挥保护作用^[23],但角蛋白持续磷酸化所致的角蛋白丢失将引起上皮-间充质转化^[24]。虽然小梁网细胞在本质上不属于上皮细胞,但其可表现出类似上皮-间充质转化的特征,即细胞间连接缺失、获得间充质细胞表型、细胞活动度增加、细胞外基质表达上升、对细胞外基质的黏附作用增强^[25],而细胞外基质过度表达最终导致小梁网组织纤维化及房水流出通道阻力增加。

本研究结果还显示实验组与对照组小梁网差异基因涉及的细胞成分主要包括角蛋白丝及中间丝,参与的基因主要有角蛋白丝相关基因(*KRT6C*、*KRT6A*、*KRT6B*、*KRT14*)和中间丝相关基因(*KRT6C*、*KRT6A*、*KRT16*、*KRT14*)。中间丝是细胞骨架蛋白的组成成分之一,其主要存在于细胞质中^[26]。细胞骨架可维持细胞及组织的完整性,在细胞形态稳定性、细胞存活、分裂、运动、运输、凋亡及增生过程中发挥重要作用^[27],并可通过形成伪足、改变细胞核硬度、细胞极性而在细胞黏附、收缩及移行过程中发挥作用^[28]。细胞骨架可决定并调节细胞及组织的硬度。破坏小梁网细胞骨架可显著增加房水流畅系数:细胞骨架干扰物拉春库林 B 体内作用后 30 min 人小梁网细胞的硬度明显下降,丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂 H-7 可通过抑制细胞收缩、增加细胞外间隙、清除细胞外基质而影响组织的硬度^[29]。在机械刺激或微环境发生改变时,细胞骨架可调节细胞对炎症因子的反应及细胞与细胞外基质的黏附作用而引起细胞增生及胶原生成,从而引起组织重塑及硬化^[30]。Raghunathan 等^[31]研究也发现,地塞米松作用后 3 d,小梁网细胞硬度增加 2 倍,同时伴随细胞外信号相关激酶的激活以及 α -平滑肌肌动蛋白的过度表达,与此同时,细胞外基质硬度增加 4 倍,细胞外基质相关蛋白表达水平升高。

另外,本研究结果表明实验组与对照组小梁网差异基因涉及的信号转导通路主要包括纤溶酶原激活级联反应、p38 MAPK、氧化应激反应、p53 等,参与的基因主要有 *MMP3* 和 *DUSP1*。血纤维蛋白溶酶原系统主要通过激活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)促进细胞外基质降解而发挥作用^[32]。小梁网同时产生 MMPs 及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs),MMPs 与 TIMPs 的比值影响细胞外基质的代谢;MMPs 分泌减少将引起细胞外基质堆积,而诱导 MMPs 的产生可减轻房水流出通道的阻力,当小梁网组织受到机械牵拉或灌注压力刺激时,MMPs 的表达水平升高但活性下降,从而引起细胞外基质蛋白表达变化、胶质细胞激活以及细胞外基质的重塑^[33]。本研究也证实 POAG 患者小梁网组织中 *MMP3* 基因的表达量下降(Log2 FC = -5.91)。p38 是 MAPK 家族成员之一,当 p38 MAPK 通路激活时,小梁网细胞中促炎因子白细胞介素 6 和富含半胱氨酸型酸性蛋白表达增多,富含半胱氨酸型酸性蛋白与细胞外基质蛋白结合调整生长因子的活性及 MMP 的表达^[34],阻断 p38 MAPK 通路可减少活性氧自由基的产生,从而减少小梁网细胞损伤及调

亡^[35]。*DUSP* 基因编码的蛋白为酪氨酸/苏氨酸双特异性磷酸酶,其可使 MAPK 激酶(4 个亚家族:ERK、p38、JNK 和 ERK5)去磷酸化,从而在调节细胞周期及凋亡过程中发挥重要作用^[36]。

RNA 测序结果表明,POAG 与非 POAG 供体眼球小梁网组织基因表达存在差异,但本研究仍存在一定的不足:首先,实验的样本量较小,无法排除因个体异质性而影响实验结果^[37];其次,实验组平均年龄大于对照组,分别为 63 岁和 45.5 岁,可能对实验结果造成干扰,因为 POAG 的发病率有随年龄增长而增加的趋势^[38];再者,本研究未通过 qRT-PCR 验证有统计学意义的差异表达基因,虽然本研究中发现的差异表达基因与 Liu 等^[39]的研究结果有相似之处,即 POAG 患者小梁网组织中角蛋白及 S100 钙结合蛋白的表达量降低,但基因亚型之间存在差异,仍需进一步研究证实;最后,表达上升及下调的基因数目较少,导致每个富集通路中包含的基因数目少,从而影响实验结果的可靠性。

总之,本研究结果表明角蛋白表达水平的变化、中间丝细胞骨架结构的改变以及纤溶酶原激活级联反应、p38 MAPK 信号转导通路调节异常引起的小梁网及细胞外基质重塑是 POAG 的可能病因。其中,与发病机制相关的差异基因主要包括细胞骨架相关基因(角蛋白丝相关基因 *KRT6C*、*KRT6A*、*KRT6B*、*KRT14* 和中间丝相关基因 *KRT6C*、*KRT6A*、*KRT16*、*KRT14*)及细胞外基质重塑相关基因(*MMP3* 和 *DUSP1*),提示细胞骨架及细胞外基质可作为青光眼治疗的靶组织。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- Pulliero A, Seydel A, Camoirano A, et al. Oxidative damage and autophagy in the human trabecular meshwork as related with ageing [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98106 [2019-10-11]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0098106>. DOI: 10.1371/journal.pone.0098106.
- Vranka JA, Acott TS. Pressure-induced expression changes in segmental flow regions of the human trabecular meshwork [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 158: 67-72. DOI: 10.1016/j.exer.2016.06.009.
- Danias J, Gerometta R, Ge Y, et al. Gene expression changes in steroid-induced IOP elevation in bovine trabecular meshwork [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12): 8636-8645. DOI: 10.1167/iovs.11-7563.
- Lozano DC, Choi D, Jayaram H, et al. Utilizing RNA-Seq to identify differentially expressed genes in glaucoma model tissues, such as the rodent optic nerve head [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1695: 299-310. DOI: 10.1007/978-1-4939-7407-8_20.
- Sathiyathan P, Tay CY, Stanton LW. Transcriptome analysis for the identification of cellular markers related to trabecular meshwork differentiation [J/OL]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 383 [2019-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436446/>. DOI: 10.1186/s12864-017-3758-7.
- Vranka JA, Bradley JM, Yang YF, et al. Mapping molecular differences and extracellular matrix gene expression in segmental outflow pathways of the human trabecular meshwork [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122483 [2020-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380331/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0122483.
- Liesenborghs I, LMT E, Kutmon M, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of trabecular meshwork gene expression data to unravel the molecular pathogenesis of primary open-angle glaucoma [J]. *Acta Ophthalmol*, 2020, 98(1): 48-57. DOI: 10.1111/aos.14154.
- Jakobs TC. Differential gene expression in glaucoma [J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(7): a020636 [2019-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066643/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a020636.
- Carnes MU, Allingham RR, Ashley-Koch A, et al. Transcriptome analysis of adult and fetal trabecular meshwork, cornea, and ciliary body tissues by RNA sequencing [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 167: 91-99. DOI: 10.1016/j.exer.2016.11.021.
- Bermudez JY, Webber HC, Brown B, et al. A comparison of gene expression profiles between glucocorticoid responder and non-responder bovine trabecular meshwork cells using RNA sequencing [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169671 [2019-10-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5222504/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0169671.
- Yu-Wai-Man C, Owen N, Lees J, et al. Genome-wide RNA-Sequencing analysis identifies a distinct fibrosis gene signature in the conjunctiva after glaucoma surgery [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5644 [2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514109/>. DOI: 10.1038/s41598-017-05780-5.
- Yasuda M, Tanaka Y, Omodaka K, et al. Transcriptome profiling of the rat retina after optic nerve transection [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28736 [2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926057/>. DOI: 10.1038/srep28736.
- Liu SA, Zhao ZN, Sun NN, et al. Transitions of the understanding and definition of primary glaucoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(23): 2852-2859. DOI: 10.4103/0366-6999.246069.
- Yang Y, Zhou R, Li W, et al. Dynamic transcriptome analysis reveals potential long non-coding RNAs governing postnatal pineal development in pig [J/OL]. *Front Genet*, 2019, 10: 409 [2019-10-16]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00409/full>. DOI: 10.3389/fgene.2019.00409.
- Wang X, Zou W, Yu H, et al. RNA sequencing analysis of chicken cecum tissues following eimeria tenella infection *in vivo* [J/OL]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(6): E420 [2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627390/>. DOI: 10.3390/genes10060420.
- Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, et al. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2014, 20: 138-142. DOI: 10.12659/MSMBR.892101.
- Martin SA, Dehler CE, Król E. Transcriptomic responses in the fish intestine [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 64: 103-117. DOI: 10.1016/j.dci.2016.03.014.
- Windoffer R, Beil M, Magin TM, et al. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia [J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(5): 669-678. DOI: 10.1083/jcb.201008095.
- Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, et al. Types I and II keratin intermediate filaments [J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4): a018275 [2019-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5880164/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a018275.
- Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(10): 2021-2032. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.03.005.
- Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA. The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(1): 47-56. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.10.018.
- Loschke F, Seltmann K, Bouameur JE, et al. Regulation of keratin network organization [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 32: 56-64. DOI:

- 10.1016/j.ceb.2014.12.006.
- [23] Sawant MS, Leube RE. Consequences of keratin phosphorylation for cytoskeletal organization and epithelial functions[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 330 : 171-225. DOI:10.1016/bs.ircmb.2016.09.005.
- [24] Kim HJ, Choi WJ, Lee CH. Phosphorylation and reorganization of keratin networks: implications for carcinogenesis and epithelial mesenchymal transition[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2015, 23 (4) : 301-312. DOI:10.4062/biomolther.2015.032.
- [25] Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017, 60 : 44-65. DOI:10.1016/j.preteyeres.2017.08.001.
- [26] Kim JS, Lee CH, Coulombe PA. Modeling the self-organization property of keratin intermediate filaments[J]. *Biophys J*, 2010, 99 (9) : 2748-2756. DOI:10.1016/j.bpj.2010.09.023.
- [27] Hohmann T, Dehghani F. The Cytoskeleton-A complex interacting meshwork[J/OL]. *Cells*, 2019, 8 (4) : 362 [2019-11-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523135/>. DOI:10.3390/cells8040362.
- [28] Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration[J/OL]. *Respir Res*, 2017, 18 (1) : 54 [2019-10-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385055/>. DOI:10.1186/s12931-017-0544-7.
- [29] Wang K, Read AT, Sulchek T, et al. Trabecular meshwork stiffness in glaucoma[J]. *Exp Eye Res*, 2017, 158 : 3-12. DOI:10.1016/j.exer.2016.07.011.
- [30] Joshi H, Morley SC. Cells under stress: The mechanical environment shapes inflammasome responses to danger signals[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106 (1) : 119-125. DOI:10.1002/JLB.3MIR1118-417R.
- [31] Raghunathan VK, Morgan JT, Park SA, et al. Dexamethasone stiffens trabecular meshwork, trabecular meshwork cells, and matrix[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (8) : 4447-4459. DOI:10.1167/iov.15-16739.
- [32] Sugioka K, Mishima H, Kodama A, et al. Regulatory mechanism of collagen degradation by keratocytes and corneal inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator[J]. *Cornea*, 2016, 35 Suppl 1 : S59-S64. DOI:10.1097/ICO.0000000000000995.
- [33] O'Callaghan J, Cassidy PS, Humphries P. Open-angle glaucoma: therapeutically targeting the extracellular matrix of the conventional outflow pathway[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21 (11) : 1037-1050. DOI:10.1080/14728222.2017.1386174.
- [34] Gauthier AC, Liu J. Epigenetics and signaling pathways in glaucoma[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017 : 5712341 [2019-10-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292191/>. DOI:10.1155/2017/5712341.
- [35] Yang Y, Liu X, Huang J, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation decrease tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in human trabecular meshwork cells[J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 2127-2136.
- [36] Wang J, Zhou JY, Kho D, et al. Role for DUSP1 (dual-specificity protein phosphatase 1) in the regulation of autophagy[J]. *Autophagy*, 2016, 12 (10) : 1791-1803. DOI:10.1080/15548627.2016.1203483.
- [37] Baccarella A, Williams CR, Parrish JZ, et al. Empirical assessment of the impact of sample number and read depth on RNA-Seq analysis workflow performance[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19 (1) : 423 [2019-10-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6234607/>. DOI:10.1186/s12859-018-2445-2.
- [38] Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, et al. Prevalence, incidence, and risk factors of primary open-angle glaucoma-a cohort study based on longitudinal data from a German public health insurance[J/OL]. *BMC Public Health*, 2019, 19 (1) : 851 [2020-02-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31262269/>. DOI:10.1186/s12889-019-6935-6.
- [39] Liu Y, Allingham RR, Qin X, et al. Gene expression profile in human trabecular meshwork from patients with primary open-angle glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (9) : 6382-6389. DOI:10.1167/iov.13-12128.

(收稿日期:2020-03-10 修回日期:2020-06-23)

(本文编辑:刘艳)

消息

《医学人工智能实践与探索》出版发行

《医学人工智能实践与探索》由中山大学中山眼科中心刘奕志教授、林浩添教授共同主编,中国医师协会智慧医疗分会主任委员董家鸿院士、亚太角膜病学会名誉主席谢立信院士、亚非眼科学会主席吴乐正教授分别作序推荐,于2020年7月由人民卫生出版社正式出版发行。

该书通过2个篇章18个章节的内容介绍,从医学人工智能的概念和方法、体系发展、学科建设、医疗体系和公共卫生管理、医学伦理、标准制定和法律监管等维度全方位介绍了医学人工智能的发展前景和未来可能,帮助读者建立正确有效的知识储备,更好地了解医学智能时代的脉搏,共同推动医学人工智能的研究和发展,适合医务工作者、医学人工智能研究人员和相关从业人员阅读。

购书途径:人民卫生出版社官方商城(<https://www.pmphall.com>);人民卫生出版社天猫旗舰店(<https://rmws.tmall.com>);人民卫生出版社销售部刘经理,联系电话:13910668535、010-59787226;全国各大新华书店,京东商城、当当网、亚马逊等网上书店均有售。



(本刊编辑部)