

· 实验研究 ·

Wnt5a 作用下人胚胎干细胞定向分化为晶状体小体的差异表达基因分析

陈奕嘉 李金燕 欧阳帅 罗莉霞

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510623

通信作者: 罗莉霞, Email: luolixia@gzoc.com

【摘要】 目的 探讨人胚胎干细胞(hESCs)定向分化为晶状体小体(LB)过程中非经典 Wnt 信号通路配体 Wnt5a 对晶状体发育的作用。方法 选取人 H9 胚胎干细胞系,采用 mTeSR 培养基进行干细胞培养。“三阶段法”诱导 hESCs 分化为 LB。培养至 18 d,将细胞分为对照组和 Wnt5a 处理组,其中 Wnt5a 处理组培养基中添加 500 ng/ml Wnt5a。培养至 35 d,在倒置显微镜下观察细胞形态变化和 LB 的大小并提取对照组和 Wnt5a 处理组的总 RNA 进行转录组测序(RNA-Sequence)检测,表达差异大于 1.5 倍且 $P \leq 0.05$ 被定义为差异表达基因(DEGs),进行生物信息学分析。结果 培养结束时发现,与对照组相比,Wnt5a 处理组细胞形成的 LB 面积明显变大。转录组测序结果显示,与对照组相比,Wnt5a 处理组中 478 个基因表达下调,201 个基因表达上调,其中 Wnt5a 可使晶状体细胞分化及晶状体特异基因的表达上调。生物信息学分析结果显示,Wnt5a 主要参与了细胞外基质(ECM)改变的过程,提示在晶状体细胞分化中,Wnt5a 可改变 ECM;同时,富集结果还显示经 Wnt5a 处理,上皮-间充质转化过程相关过程受抑制,提示 Wnt5a 还可抑制晶状体细胞,特别是晶状体上皮细胞的异常分化;此外,Wnt5a 还可影响晶状体细胞骨架重塑。结论 Wnt5a 可能通过上调 MAPK/ERK 级联信号调整 ECM 的结构成分,影响晶状体细胞骨架重塑,从而促进晶状体细胞的分化。

【关键词】 人胚胎干细胞; 晶状体小体; Wnt5a; 高通量测序

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2019A1515011452)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200308-00156

Differentially expressed genes analysis on the role of Wnt5a in lentoid body induction from human embryonic stem cells

Chen Yijia, Li Jinyan, Ouyang Shuai, Luo Lixia

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510623, China

Corresponding author: Luo Lixia, Email: luolixia@gzoc.com

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of Wnt5a in lentoid body (LB) induction from human embryonic stem cells (hESCs). **Methods** A “three-stage” protocol was used for LB differentiation from hESCs *in vitro*, and Wnt5a level was modified by adding exogenous 500 ng/ml Wnt5a on day 18 as Wnt5a treatment group. Cells of control group and Wnt5a treatment group were collected on day 35. Cells were photographed by using the Zeiss Axio Observer Z1 microscope. Transcriptome sequencing was applied by Illumina. Genes with P value ≤ 0.05 and fold change ≥ 1.5 were identified as differentially expressed genes (DEGs). Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were used to determine the biological functions of DEGs. **Results** Compared with the control group, larger lentoid bodies were obtained in the Wnt5a treatment group. Transcriptome sequencing result showed that 478 genes were down-regulated and 201 genes were up-regulated in the Wnt5a treatment group compared with the control group, and Wnt5a up-regulated both lens cell differentiation and lens specific gene expression. Bioinformatics analysis result showed that most DEGs were involved in extracellular matrix remodeling, suggesting that Wnt5a regulated extracellular matrix remodeling during lens cell differentiation. The enrichment analysis result also showed that epithelial-to-mesenchymal transformation related processes were inhibited after Wnt5a treatment, suggesting that Wnt5a inhibited the abnormal differentiation of lens cells (especially lens epithelial cells) during lens cell differentiation. Wnt5a influenced the processes related to cytoskeleton remodeling. **Conclusions** Wnt5a may act in lens cells through MAPK/ERK signaling pathways to affect ECM and cell cytoskeletal organization, which provides a new direction for studying lens development.

[Key words] Human embryonic stem cell; Lentoid body; Wnt5a; High throughput RNA sequencing

Fund program: The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019A1515011452)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200308-00156

晶状体是眼重要的屈光组织,无血管和神经分布,且细胞来源单一,为体外研究其发育过程和分子调控机制提供了良好的工具^[1-2]。Wnt 信号通路在晶状体的发育中起重要作用,分为经典通路和非经典通路。经典通路为 β -catenin 依赖性,可调控晶状体祖细胞的增生、分化、凋亡等,在晶状体的早期发育中起重要作用^[3];非经典 Wnt 信号通路不依赖 β -catenin,目前认为该通路参与晶状体发育后期晶状体纤维细胞分化、定向延伸的调控^[4]。其中,Wnt5a 是非经典 Wnt 信号通路的配体,通过与跨膜受体 Frizzled 和共受体结合,激活下游 Rho 家族的小分子鸟苷酸三磷酸酶(Rho GTPases),从而活化非经典 PCP 通路和下游 JNK 信号通路^[5],但其在晶状体发育中的作用尚不明确。课题组前期在诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)分化为晶状体小体(lentoid body, LB)的实验体系中已证实 Wnt5a 在晶状体细胞分化和维持晶状体形态中起着重要作用,但具体机制不明^[6]。本研究采用转录组测序技术检测 Wnt5a 作用下 hESCs 定向分化为 LB 的差异基因表达,利用生物信息学方法分析测序结果,揭示 Wnt5a 对晶状体发育的作用,为完善体外晶状体模型提供新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

hESC H9 细胞系由中山大学中山眼科中心陈舒怡教授惠赠。基质胶(Matrigel,美国 BD 公司);mTeSR 培养基、消化液(加拿大 StemCell 公司);牛血清清蛋白和蛋白酶抑制剂 PMSF(美国 Sigma 公司);DMEM/F-12 培养基、非必需氨基酸、GlutaMAX 添加剂、N2 添加剂、B27 添加剂(美国 Gibco 公司);重组生长因子 Noggin、骨形态发生蛋白 4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)、BMP7、Wnt3a、成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)(美国 Peprotech 公司);逆转录试剂盒 Prime Script RT Master Mix、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq、DNase I(日本 TaKaRa 公司);测序试剂盒 VAHTS mRNA-seq v2 Library Prep Kit(美国 Illumina 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hESCs 体外培养和诱导分化为 LB hESCs 培养在提前用 Matrigel 包被的培养板里,以 mTeSR 培养基为常规培养基,细胞置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,每天换液。细胞生长至 70%~80%融合时使用消化液在 37 °C 消化 5 min 后,然后以 1:4 的比例传代至预铺 Matrigel 胶的 12 孔板中,每天

换液。待细胞生长至 80%~90%时更换为基础培养基(DMEM/F-12+质量分数 0.05%牛血清清蛋白+质量分数 1%非必需氨基酸+2 mmol/L GlutaMax 添加剂+N2 添加剂+B27 添加剂),并记为第 0 天。采用三阶段法^[7]按如下顺序依次在基础培养基中加入各生长因子,将 hESCs 诱导分化为 LB:在第 0~6 天(第 1 阶段)加入 100 ng/ml Noggin;在第 7~18 天(第 2 阶段)加入 20 ng/ml BMP4、20 ng/ml BMP7 和 100 ng/ml FGF2;在第 19~32 天(第 3 阶段),对照组加入 20 ng/ml Wnt3a 和 100 ng/ml FGF2, Wnt5a 处理组在对照组的基础上添加 500 ng/ml Wnt5a,隔天换液。倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

1.2.2 RNA 的提取 取各组定向分化第 35 天的细胞,加入 1 ml TRIzol 充分裂解细胞,用 200 μ l/ml 酚氯仿剧烈振荡,收集上层溶解 RNA 的水相,加入 0.5 ml 异丙醇中沉淀,离心半径 8.5 cm,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;向沉淀中加入 1 ml 体积分数 75%乙醇,振荡洗涤 RNA,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,空气中干燥 10 min,加入无 RNA 酶水溶解沉淀,于 -80 °C 冰箱保存。各组实验独立重复 2 次。

1.2.3 高通量测序技术进行各组 LB 的转录组测序

使用 DNase I 纯化提取的细胞 RNA。取 5 μ g RNA 使用 VAHTS 试剂盒建立测序文库:polyA 标记的磁珠分离 mRNA,之后打断为 200~300 bp 的片段,经逆转录、末端修复以及末端加 A 碱基,片段化的 cDNA 结合在测序接头上。所建文库在中山眼科中心国家重点实验室使用 Illumina HiSeq 2500 进行双端测序。用 Tophat v2.0.12 匹配测序结果到人类参考基因组(ENSEMBL database),并通过 HTSeq v0.6.0 计算基因转录表达量,以每 1 百万个拼接上的短序列中拼接到外显子上的每 1 000 个碱基上的短序列数(fragments per kilobase of exon permillion fragments mapped, FPKM)来标准化基因表达量,定义 FPKM ≥ 2 为表达基因。

1.2.4 应用生物信息学方法筛选和分析 Wnt5a 处理

下 LB 的差异基因 (1)将原始读段经过去除接头和低质量的读段后得到高质量读段;(2)使用 Tophat v2.0.12 匹配测序结果到人类参考基因组数据库(ENSEMBL database, <http://www.ensembl.org/index.html>);(3)通过 HTSeq v0.6.0 计算基因转录表达量,以每 1 百万个拼接上的短序列中拼接到外显子上的每 1 000 个碱基上的 FPKM 来标准化基因表达量,用 DESeq/DESeq216 来定义 2 个样本之间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。P 值经 Benjamini 和 Hochberg 方法进行调整。2 个组间基因

表达的差异倍数变化 (fold change, FC) 大于 1.5 倍和 $P \leq 0.05$ 被定义为 DEGs; (4) 采用 IGV (Integrative Genomics Viewer) 对差异基因进行层次聚类分析; (5) DEGs 使用 Gene Ontology 数据库 (<http://geneontology.org/>) 进行 GO 富集分析, 筛选富集到的 GO 条目, 并显示相关的生物学功能和过程; 进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>) 通路富集分析, 筛选 DEGs 富集到的通路。

2 结果

2.1 Wnt5a 作用下 hESCs 定向分化为 LB 的形态变化

未进行分化的 hESCs 呈圆形, 培养至第 18 天时细胞形态变为梭形。对照组细胞和处理组细胞在培养至第 35 天时均可形成有立体结构的透明结构, 即 LB。与对照组相比, Wnt5a 处理组细胞形成的 LB 面积明显变大 (图 1)。

2.2 测序数据的概述和质量评估

第 35 天分别收集对照组和 Wnt5a 处理组的细胞, 进行转录组测序; 每组均有 2 次重复, 分别标记为 (1) 和 (2)。经测序后, 每组平均获得了约 8.4×10^7 M 原始读段, 测序的 Q30 比例均在 92% 以上, 说明本次测序质量较好。经匹配处理后, 每组均至少获得了 7.0×10^7 匹配读段, 匹配率均在 95% 以上 (表 1)。

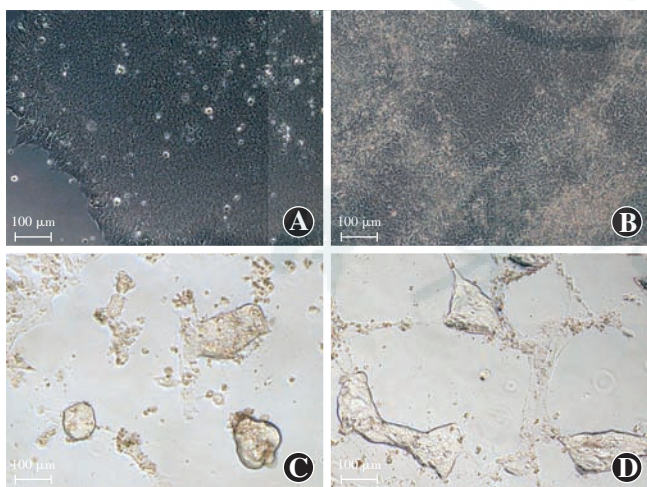


图 1 光学相差显微镜下各组 hESCs 定向分化为 LB 的形态变化 ($\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: 未分化的 hESCs B: 培养第 18 天时细胞形态明显改变, 呈梭形 C: 培养第 35 天时对照组细胞有 LB 形成 D: 培养第 35 天时 Wnt5a 处理组细胞形成 LB, 且面积较对照组大

Figure 1 Characterization of lentoid bodies obtained from hESCs in different groups (bar = $100 \mu\text{m}$) A: The morphology of hESCs on day 0 B: On day 18, hESCs rapidly differentiated, showing a spindle-shape appearance C: Lentoid bodies were formed on day 35 in the control group D: Lentoid bodies formed on day 35 in the Wnt5a treatment group, and the hESCs-derived lentoid bodies were larger than those in the control group

表 1 测序数据概述和质量评估
Table 1 Statistics of raw and matched reads from RNA-seq analysis

样品	原始读段	高质量读段	Q30 比例 (%)	匹配读段	匹配率 (%)
对照组 1	82 071 388	73 209 080	92.7	70 198 237	95.9
对照组 2	81 518 740	74 234 162	93.5	71 071 530	95.7
Wnt5a 处理组 1	81 803 708	74 163 124	93.2	71 347 284	96.2
Wnt5a 处理组 2	86 204 238	76 316 632	92.4	73 029 790	95.7

2.3 各组基因表达谱分析

将对照组和 Wnt5a 处理组细胞进行分层聚类分析, 结果显示各组内的生物学重复被聚为一类, 说明各组重复性较好 (图 2)。差异基因分析结果显示, 与对照组相比, Wnt5a 处理组中表达差异的基因 ($FC \geq 1.5$ 且 $P \leq 0.05$) 共有 679 个, 其中上调基因 201 个, 下调基因 478 个。

2.4 Wnt5a 处理下晶状体相关基因的表达

Wnt5a 处理后, 晶状体特异性标记基因 *CRYBA1*、*CRYBB3*、*CRYGC*、*BFSP2*、*CRYGA*、*BFSP1*、*CRYAB*、*CRYBB2*、*CRYGS*、*CRYGD* 和 *CRYGEP* 表达变化的 FC 分别为 1.74、1.64、1.77、1.72、2.24、1.57、1.87、2.13、2.03、1.59 和 1.50, 表达均显著上调 (图 3)。

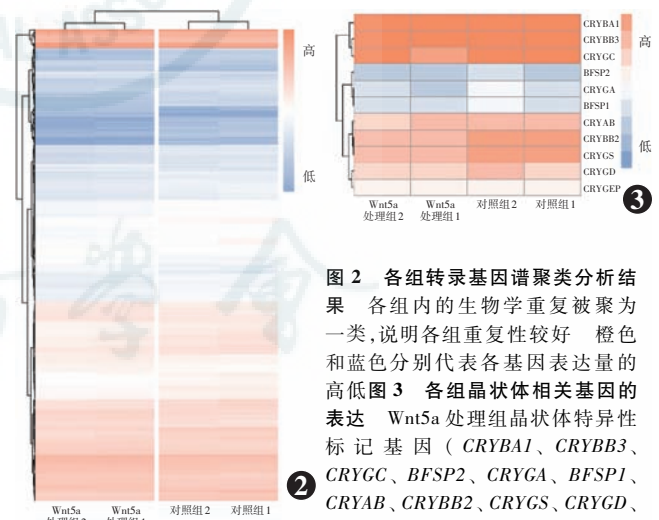


图 2 各组转录基因谱聚类分析结果 各组内的生物学重复被聚为一类, 说明各组重复性较好 橙色和蓝色分别代表各基因表达量的高低 图 3 各组晶状体相关基因的表达 Wnt5a 处理组晶状体特异性标记基因 (*CRYBA1*、*CRYBB3*、*CRYGC*、*BFSP2*、*CRYGA*、*BFSP1*、*CRYAB*、*CRYBB2*、*CRYGS*、*CRYGD*、*CRYGEP*) 的表达较对照组显著上

调 橙色和蓝色分别提示各基因表达量的高低

Figure 2 Heat map of DEGs in the control group and Wnt5a treatment group

Biological repeats within each group were grouped together, indicating high repeatability of each group. The color indicates higher (orange) or lower (blue) level of gene expression Figure 3 Lens-specific gene expression in the control group and Wnt5a treatment group The expression levels of lens-specific genes (*CRYBA1*, *CRYBB3*, *CRYGC*, *BFSP2*, *CRYGA*, *BFSP1*, *CRYAB*, *CRYBB2*, *CRYGS*, *CRYGD*, *CRYGEP*) in the Wnt5a treatment group were higher than those in the control group. The color indicates higher (orange) or lower (blue) level of gene expression

2.5 DEGs 的 GO 富集分析及 KEGG 富集分析

GO 富集分析将 679 个 DEGs 按照实现的分子功能、构成细胞的组分和参与的生物学过程进行分类。结果显示,在分子功能方面,Wnt5a 主要导致了晶状体结构(structural constituent of eye lens)、细胞外基质结构(extracellular matrix structural constituent)相关的改变;在细胞成分方面,Wnt5a 主要导致细胞外基质(extracellular matrix)相关的改变;在生物学过程方面,Wnt5a 主要导致晶状体发育(lens development in camera-type eye)、视觉发育的显著差异(visual perception)(图 4A)。其中,视觉系统发育和晶状体发育的条目变化最为显著(图 4B,C)。Wnt5a 处理后,上调基因主要富集于晶状体发育(lens development in

camera-type eye)相关的生物过程,下调基因主要富集于微管细胞骨架(microtubule cytoskeleton organization)相关的生物过程(图 5)。

DEGs 经过 KEGG 通路富集提示,受 Wnt5a 显著影响的基因富集于 37 条通路(图 6A)。KEGG 分析结果显示,经 Wnt5a 处理后,细胞外基质受体相互作用通路(ECM-receptor interaction)和局部黏附通路(focal adhesion)等显著改变(图 6B,C)。其中,上调基因富集结果中钙离子信号通路(calcium signalling pathway)、细胞因子受体相互作用通路(cytokine-cytokine receptor interaction)具有显著变化;下调基因主要富集于细胞外基质受体相互作用通路(ECM-receptor interaction)(图 7)。

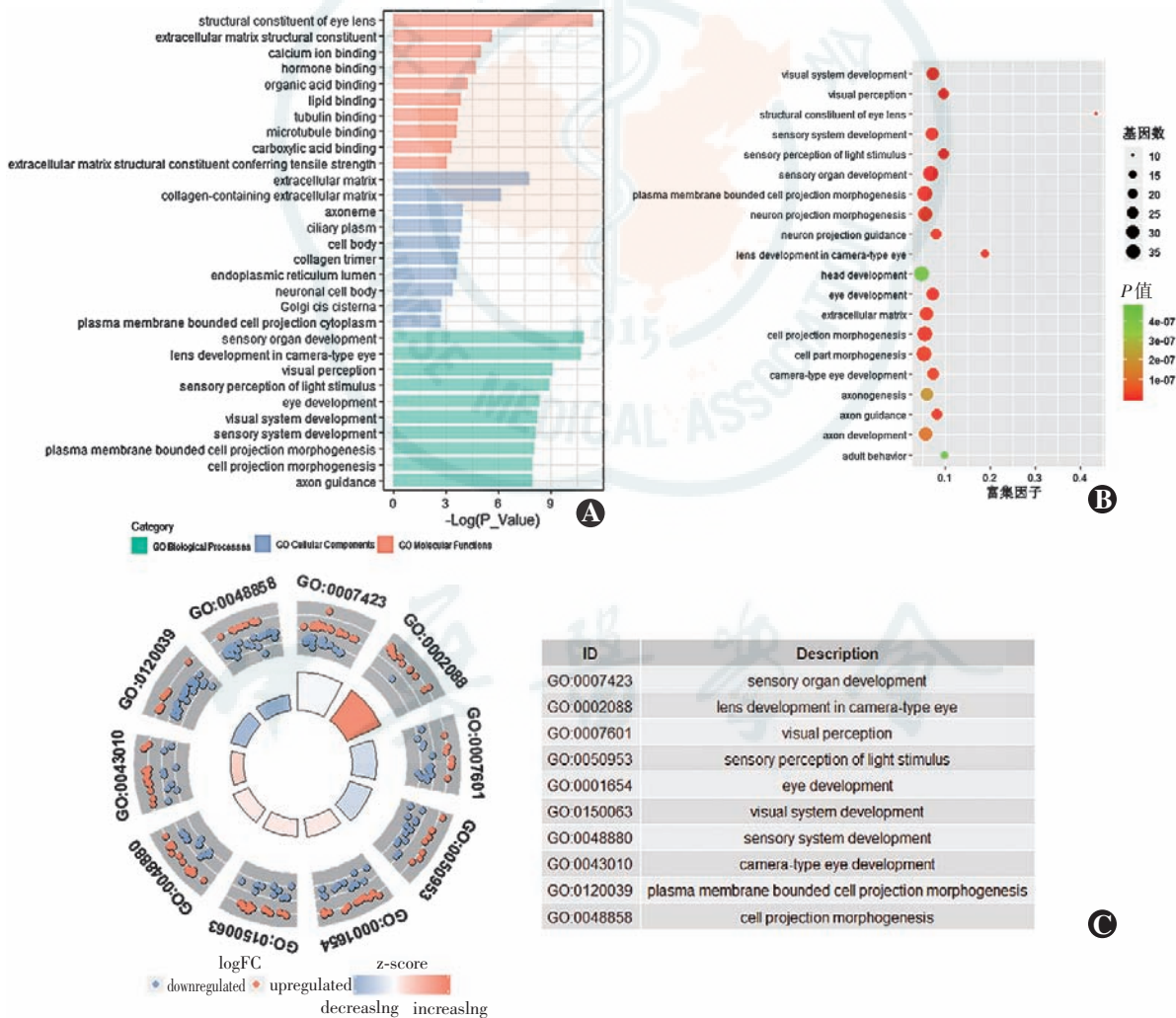


图 4 Wnt5a 处理组与对照组之间差异基因的 GO 富集分析结果 A: Wnt5a 处理前后,DEGs 分别富集的生物学过程、构成细胞的组分和实现的分子功能分类排名前 10 的 GO 词条。绿色代表生物学过程,蓝色代表构成细胞的组分,橙色代表实现的分子功能 B: Wnt5a 处理前后,DEGs 富集整体分析排名前 20 的词条 C: Wnt5a 处理前后,DEGs 富集整体分析排名前 10 的生物学过程词条。根据基因表达的 FC 定义上调或下调,橙色代表上调,蓝色代表下调,z-score 的高低提示该生物学水平可能升高或下降 Figure 4 Gene ontology analysis of DEGs A: The top 10 most enriched GO terms of DEGs after Wnt5a treatment. The three GO categories included biological process (green), cellular component (blue), and molecular function (orange) B: Scatter plot of top 20 enriched GO terms of DEGs after Wnt5a treatment C: The top 10 most enriched GO terms of DEGs after Wnt5a treatment. Gene expressions were defined as up-regulated (orange) and down-regulated (blue) according to logFC. The higher the Z-score valued, the higher activity the enriched pathway acted

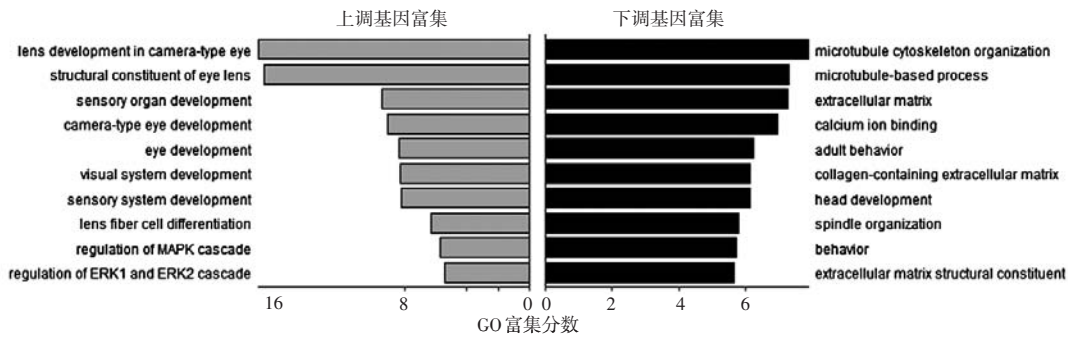


图 5 差异上调基因和下调基因 GO 富集结果 上调基因主要富集于晶状体的发育,下调基因主要富集于微管细胞骨架组织。GO 富集分数通过 $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 计算得到,数值越大提示富集程度越高

Figure 5 Gene ontology analysis of down-regulated and up-regulated DEGs The up-regulated DEGs were obviously enriched in lens development. The down-regulated DEGs were obviously enriched in microtubule cytoskeleton organization. The higher the GO enrichment score valued, the greater the pathway was enriched Go: Gene Ontology

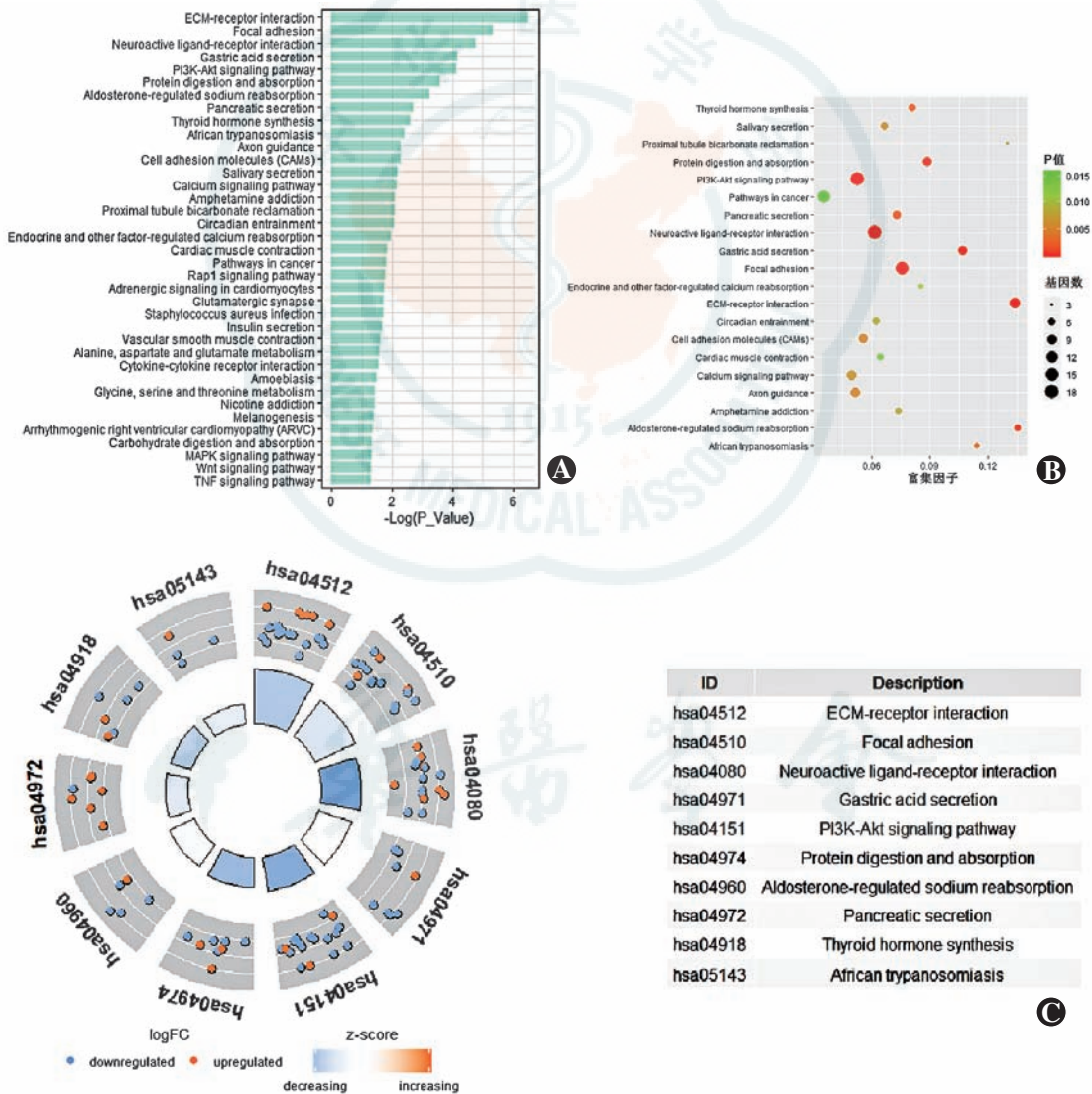


图 6 Wnt5a 处理组与对照组之间差异基因 KEGG 通路富集结果 A: Wnt5a 处理前后, DEGs 的 KEGG 富集结果。横坐标数值越大提示富集程度越高 B: Wnt5a 处理前后, DEGs 富集 KEGG 排名前 20 的信号通路 C: Wnt5a 处理前后, DEGs 富集 KEGG 排名前 10 的信号通路。根据基因表达的 FC 定义上调或下调, 橙色代表上调基因, 蓝色代表下调基因, z-score 的高低提示该通路活性可能升高或下降

Figure 6 KEGG analysis of DEGs A: Enriched KEGG signaling pathways of all the DEGs. Higher abscissa represented the higher enrichment score B: Scatter plot of top 20 enriched KEGG pathways of DEGs after Wnt5a treatment C: The top 10 most enriched KEGG pathways of DEGs. Gene expressions were defined as up-regulated (orange) and down-regulated (blue) according to logFC. The higher the Z-score valued, the higher activity the enriched pathway acted

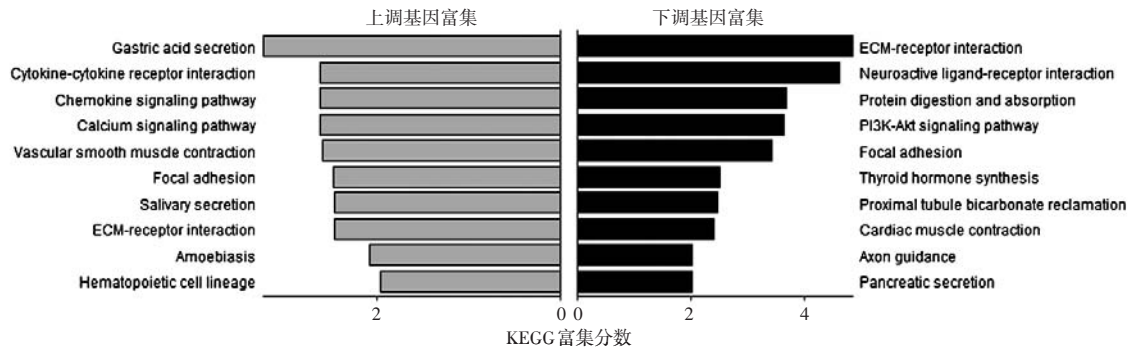


图 7 差异上调基因和下调基因 KEGG 富集结果 上调基因主要富集于钙离子信号通路、细胞因子受体相互作用通路,下调的基因主要富集于细胞外基质受体相互作用通路。KEGG 富集分数通过 $-\log_{10}(P)$ 值计算得到,数值越大提示富集程度越高

Figure 7 KEGG analysis of down-regulated and up-regulated DEGs The up-regulated DEGs were enriched in Calcium signaling pathway and Cytokine-receptor interaction pathway. The down-regulated DEGs were enriched in ECM-receptor interaction pathway. The higher the Rich factor valued, the greater the pathway was enriched KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

3 讨论

先天性白内障是儿童致盲的主要眼病,多由晶状体的发育缺陷引起。晶状体的发育过程受到多种生长因子信号通路和转录因子的调控,目前尚未研究完全。近年来,大量研究表明 Wnt 信号通路在干细胞命运决定和胚胎发育中起重要作用^[8-10]。因此,更好地了解 Wnt 信号如何调节细胞分化和发育对于探索晶状体发育过程至关重要。hESCs 诱导分化为 LB 的实验体系可以较好地模拟体内晶状体分化发育过程^[7]。课题组前期已验证该体系诱导的 3 个阶段依次对应体内晶状体发育的前基板外胚层阶段、晶状体基板阶段、晶状体泡 (lens vesicle, LV) 和晶状体细胞分化阶段^[11];在第 3 阶段外源性添加 Wnt5a 后,发现获得的 LB 数量增多、面积增大;在分子水平上,发现 Wnt5a 处理后编码晶状体结构蛋白、晶状体纤维发育相关基因 *PROX1* 和晶状体主要内源性蛋白的基因表达明显升高^[6]。这些结果提示, Wnt5a 可促进 LB 形态发生以及晶状体细胞的体外分化过程。然而, Wnt5a 在晶状体细胞分化中的具体作用机制尚不清楚。

本研究中将对照组和 Wnt5a 处理组进行转录组测序,分析 Wnt5a 处理后改变的基因表达谱和对应的生物学过程,以明确 Wnt5a 在 hESCs 体外定向分化为 LB 过程中的潜在作用机制。本研究中层聚类分析结果显示,2 个组细胞的基因表达谱总体差异不大。本研究猜测,这是由于诱导体系第 3 阶段对应的是 LV 和晶状体细胞分化阶段,即由 LV 分化为晶状体上皮/纤维或是晶状体上皮分化为晶状体纤维,基因表达谱变化不大,因而聚类分析差异较小。

晶状体的发育是一个复杂的过程,随着上皮细胞

增生、逐渐延伸分化为晶状体纤维细胞而逐渐成熟^[12-13]。随着晶状体纤维细胞的分化,晶状体蛋白和骨架蛋白大量表达^[14],因而可根据晶状体细胞表达谱的变化推断出晶状体的成熟状态。本研究中,编码 β -晶状体蛋白、 γ -晶状体蛋白和晶状体细胞骨架蛋白的基因均在 Wnt5a 的处理下显著上调。BFSP1 (beaded filament structural protein 1, filensin) 和 BFSP2 是晶状体特异的细胞骨架蛋白,其表达水平随纤维细胞的拉长不断增高,是晶状体纤维细胞分化的标志^[15]; *CRYBA1*、*CRYBB3*、*CRYBB2*、*CRYGC*、*CRYGA* 等基因调控 β -晶状体蛋白和 γ -晶状体蛋白的表达,这 2 种蛋白是晶状体纤维细胞的特异蛋白^[16]。这些数据表明 Wnt5a 促进了体外晶状体纤维细胞分化。GO 功能富集分析结果也进一步验证了该结论,差异上调基因富集到了晶状体纤维细胞分化。同时,晶状体分化相关生物学过程在 Wnt5a 的处理下也发生显著改变,如晶状体的发育、眼发育和视觉系统的发育等。这也与我们之前的研究结果相一致,即 Wnt5a 可以通过促进体外晶状体纤维细胞的分化来促进 LB 的成熟。

在胚胎发育过程中,晶状体上皮细胞内的晶状体祖细胞增生并向晶状体赤道方向迁移,直至到达过渡区,在过渡区脱离细胞周期,开始分化为晶状体纤维细胞。为了维持上皮细胞增生和纤维细胞分化的平衡, MAPK/ERK 和 PI3K-AKT 通路信号互相拮抗,在这一过程中起到了重要作用^[17]。本研究中, Wnt5a 处理后的差异下调基因富集到了 PI3K-AKT 通路;上调基因富集到了 MAPK/ERK 信号级联的调控。PI3K 可以维持晶状体祖细胞的干性,抑制其分化,确保晶状体上皮细胞的增生^[18];ERK 是晶状体中含量丰富、活性程度高的 MAPKs,是晶状体纤维细胞分化过程中的必需成

分^[19-20]。以上结果表明, Wnt5a 可能打破了这一平衡,促进了上皮细胞向纤维细胞的分化。既往研究表明,在其他组织中 MAPK/ERK 信号级联还可以引起 ECM 的降解^[21]。我们进一步发现, Wnt5a 处理后确实引起了 ECM 的变化: ECM 的主要成分相关基因 *COL2A1*、*COL6A1*、*COL9A1* 和 *COL9A3* 等表达下降; GO 富集提示细胞外基质结构组成的改变; KEGG 富集到细胞外基质受体相互作用通路表达下降。Hendrix 等^[22]研究发现在体内发育过程中, ECM 的密度在视泡形成初期逐渐增高,随着晶状体凹的闭合和 LV 的形成而下降。结果提示, Wnt5a 可能通过 MAPK/ERK 级联反应调控 ECM 从而促进晶状体细胞的分化,同时通过影响 ECM 的成分结构来促进 LV 的形成。

晶状体上皮一生都在不断增生和分化,除了向纤维细胞分化外,还可能发生异常的分化,即上皮-间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)^[23]。KEGG 结果提示, Wnt5a 处理后黏着斑激酶通路、细胞外基质受体相互作用通路和细胞黏附分子通路表达下调。其中,黏着斑激酶通路可抑制晶状体上皮细胞的迁移,使细胞形态紊乱,引起上皮细胞异常分化为间充质细胞^[24];细胞间黏附分子的改变可直接导致上皮细胞功能和形态异常,是 EMT 的关键特征^[25];细胞外基质受体相互作用也参与了 EMT 的过程^[26]。此外, ECM 成分的减少也进一步提示了 EMT 的抑制。我们进一步推测, Wnt5a 可能在促进晶状体细胞分化的同时,抑制了晶状体上皮细胞的异常分化,维持 LB 的正常发育。

根据测序结果分析,在对应体内的 LV 和晶状体细胞分化阶段, Wnt5a 的处理还影响了细胞骨架的运动。细胞骨架在晶状体发育和透明中起着重要作用^[27]。本研究 KEGG 分析结果显示, Wnt5a 处理后富集到了 MAPK 通路和钙通路,这 2 条通路均与细胞骨架重塑密切相关^[28]。已有研究报道, Wnt5a 可以引导晶状体细胞迁移,并参与建立晶状体纤维细胞的极性^[29]。为进一步明确 Wnt5a 促进晶状体细胞分化的机制,极性与微管细胞骨架之间的具体联系是我们下一步要探讨的问题。

本研究中利用转录组测序分析了 Wnt5a 在 LB 体外分化中的作用,揭示了 Wnt5a 可能通过 MAPK/ERK 级联反应促进晶状体细胞分化的作用机制,为研究晶状体发育、晶状体再生提供了新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Bassnett S, Šikić H. The lens growth process[J]. Prog Retin Eye Res,

- 2017, 60 : 181-200. DOI:10.1016/j.preteyeres.2017.04.001.
- [2] Donaldson PJ, Grey AC, Maceo HB, et al. The physiological optics of the lens[J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2017, 56 : e1-e24 [2020-03-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27639549/. DOI:10.1016/j.preteyeres.2016.09.002.
- [3] Fuhrmann S. Wnt signaling in eye organogenesis[J]. Organogenesis, 2008, 4(2) : 60-67. DOI:10.4161/org.4.2.5850.
- [4] Chen Y, Stump RJ, Lovicu FJ, et al. Wnt signaling is required for organization of the lens fiber cell cytoskeleton and development of lens three-dimensional architecture[J]. Dev Biol, 2008, 324(1) : 161-176. DOI:10.1016/j.ydbio.2008.09.002.
- [5] Zhou Y, Kipps TJ, Zhang S. Wnt5a signaling in normal and cancer stem cells[J/OL]. Stem Cells Int, 2017, 2017 : 5295286 [2020-05-19]. https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/5295286/. DOI:10.1155/2017/5295286.
- [6] Han C, Li J, Wang C, et al. Wnt5a contributes to the differentiation of human embryonic stem cells into lentoid bodies through the noncanonical Wnt/JNK signaling pathway[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(8) : 3449-3460. DOI:10.1167/iovs.18-23902.
- [7] Yang C, Yang Y, Brennan L, et al. Efficient generation of lens progenitor cells and lentoid bodies from human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. FASEB J, 2010, 24(9) : 3274-3283. DOI:10.1096/fj.10-157255.
- [8] Moon RT, Brown JD, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development[J]. Trends Genet, 1997, 13(4) : 157-162. DOI:10.1016/s0168-9525(97)01093-7.
- [9] Routledge D, Scholpp S. Mechanisms of intercellular Wnt transport[J/OL]. Development, 2019, 146(10) : 176073 [2020-05-19]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092504/. DOI:10.1242/dev.176073.
- [10] Miller JR. The Wnts[J/OL]. Genome Biol, 2002, 3(1) : REVIEWS3001 [2020-01-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150458/. DOI:10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001.
- [11] 韩琛璐,王春筱,李金燕,等.人胚胎干细胞定向分化为晶状体小体过程中晶状体发育相关转录因子的动态变化[J].中华实验眼科杂志, 2018, 36(7) : 500-507. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.004.
- [12] Han CL, Wang CX, Li JY, et al. Expression dynamics of lens development-associated transcription factors in human embryonic stem cell-induced lentoid body[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(7) : 500-507. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.004.
- [13] Cvekl A, Duncan MK. Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development[J]. Prog Retin Eye Res, 2007, 26(6) : 555-597. DOI:10.1016/j.preteyeres.2007.07.002.
- [14] Cvekl A, Ashery-Padan R. The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development[J]. Development, 2014, 141(23) : 4432-4447. DOI:10.1242/dev.107953.
- [15] Khan SY, Hackett SF, Lee MC, et al. Transcriptome profiling of developing murine lens through RNA sequencing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(8) : 4919-4926. DOI:10.1167/iovs.14-16253.
- [16] Tapodi A, Clemens DM, Uwineza A, et al. BFSP1 C-terminal domains released by post-translational processing events can alter significantly the calcium regulation of AQP0 water permeability[J/OL]. Exp Eye Res, 2019, 185 : 107585 [2020-05-19]. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483518307395? via%3Dihub. DOI:10.1016/j.exer.2019.02.001.
- [17] Graw J, Löster J. Developmental genetics in ophthalmology[J]. Ophthalmic Genet, 2003, 24(1) : 1-33. DOI:10.1076/opge.24.1.1.13888.
- [18] Wazin F, Lovicu FJ. The negative regulatory Spred1 and Spred2 proteins are required for lens and eye morphogenesis[J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 191 : 107917 [2020-05-19]. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014483519307171? via%3Dihub. DOI:10.1016/j.exer.2020.107917.
- [19] Li H, Mao Y, Bouaziz M, et al. Lens differentiation is controlled by the

- balance between PDGF and FGF signaling [J/OL]. PLoS Biol, 2019, 17(2): e3000133 [2020-05-19]. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3000133>. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000133.
- [19] Le AC, Musil LS. A novel role for FGF and extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated intercellular communication in the lens [J]. J Cell Biol, 2001, 154(1): 197-216. DOI: 10.1083/jcb.200101057.
- [20] Li DW, Liu JP, Wang J, et al. Expression and activity of the signaling molecules for mitogen-activated protein kinase pathways in human, bovine, and rat lenses [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(12): 5277-5286. DOI: 10.1167/iovs.03-0348.
- [21] Liu W, Xia P, Feng J, et al. MicroRNA-132 upregulation promotes matrix degradation in intervertebral disc degeneration [J]. Exp Cell Res, 2017, 359(1): 39-49. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.08.011.
- [22] Hendrix RW, Zwaan J. Changes in the glycoprotein concentration of the extracellular matrix between lens and optic vesicle associated with early lens differentiation [J]. Differentiation, 1974, 2(6): 357-362. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1974.tb00371.x.
- [23] Shirai K, Tanaka SI, Lovicu FJ, et al. The murine lens: A model to investigate *in vivo* epithelial-mesenchymal transition [J]. Dev Dyn, 2018, 247(3): 340-345. DOI: 10.1002/dvdy.24518.
- [24] Liu J, Xu D, Li J, et al. The role of focal adhesion kinase in transforming growth factor- β 2 induced migration of human lens epithelial cells [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(6): 3591-3601. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3912.
- [25] Yamben IF, Rachel RA, Shatadal S, et al. Scrib is required for epithelial cell identity and prevents epithelial to mesenchymal transition in the mouse [J]. Dev Biol, 2013, 384(1): 41-52. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.09.027.
- [26] Wei J, van der Wekken AJ, Saber A, et al. Mutations in EMT-related genes in ALK positive crizotinib resistant non-small cell lung cancers [J/OL]. Cancers (Basel), 2018, 10(1): 10 [2020-03-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29300322/>. DOI: 10.3390/cancers10010010.
- [27] Quinlan RA, Sandilands A, Procter JE, et al. The eye lens cytoskeleton [J]. Eye (Lond), 1999, 13 (Pt 3b): 409-416. DOI: 10.1038/eye.1999.115.
- [28] Rao PV, Maddala R. The role of the lens actin cytoskeleton in fiber cell elongation and differentiation [J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(6): 698-711. DOI: 10.1016/j.semedb.2006.10.011.
- [29] Dawes LJ, Sugiyama Y, Lovicu FJ, et al. Interactions between lens epithelial and fiber cells reveal an intrinsic self-assembly mechanism [J]. Dev Biol, 2014, 385(2): 291-303. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.10.030.

(收稿日期:2020-06-01 修回日期:2020-08-27)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions) 5个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行的研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文题名(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

本期英文缩略语名词解释

CRISPR/Cas9:成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)

VSX2:视觉系统同源框 2 (visual system homeobox 2)

(本刊编辑部)