

· 实验研究 ·

糖皮质激素对晶状体上皮细胞生物学功能调控作用的生物信息学分析

闫楚凡 韩笑 张劲松

中国医科大学附属第四医院眼科, 沈阳 110059

通信作者: 张劲松, Email: cmu4h_zjs@163. com

【摘要】 目的 利用生物信息学方法分析糖皮质激素对晶状体上皮细胞(LECs)生物学功能的影响,并预测相关的微小 RNA(miRNA)。**方法** 下载 GSE3040 数据集,设置 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松处理的人 LECs 细胞株 HLE-B3 细胞为实验组,1 $\mu\text{mol/L}$ 二甲亚砜(DMSO)处理的 HLE-B3 细胞为对照组,利用 GEO2R 工具分析 2 个组间的差异表达基因。利用 Metascape 网站进行差异基因功能富集分析,通过 EdU 细胞增殖实验检测 2 个组间细胞增殖差异。通过 STRING 网站和 cytoscape 软件构建蛋白互作网络图,cytohubba app 计算出 hub 基因,采用实时荧光定量 PCR 法检测 2 个组间 hub 基因的表达差异。利用 mirCode 数据库预测与 hub 基因相关的 miRNA。**结果** 实验组与对照组间分析出 341 个差异基因,其中上调基因为 300 个,下调基因为 41 个。下调基因中差异最显著的 5 个基因是 *SLC12A1*、*MED13L*、*ALDH5A1*、*SLC15A3* 和 *WWC1* 基因;上调基因中差异最显著的 5 个基因是 *SCNN1A*、*ANKRD36*、*FKBP5*、*PYY* 和 *ADH1B* 基因。列出了富集量排名前 20 的生物学功能关键词,结果显示富集量最大的是对 HLE-B3 细胞增殖的负向调节。实验组细胞增殖率为 $(8.09 \pm 0.20)\%$,低于对照组的 $(39.63 \pm 0.80)\%$,差异有统计学意义($t = 38.43, P < 0.01$)。前 10 位 hub 基因分别是 *SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*GHRH1*、*CXCL5*、*PPBP*、*CX3CR1*、*PYY*、*EDNRA* 和 *GRK5*,实时荧光定量 PCR 结果显示 2 个组间 *SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*PYY*、*EDNRA* 和 *GRK5* mRNA 相对表达量比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 hub 基因相关性强的前 6 位 miRNA 分别是 miR-15abc、miR-214、miR-23abc、miR-129-5p、miR-132 和 miR-24。**结论** 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松即可对 HLE-B3 细胞的增殖产生负性调控作用。*SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*PYY*、*EDNRA* 和 *GRK5* 基因可能是糖皮质激素的作用靶点,miR-15abc、miR-214、miR-23abc、miR-129-5p、miR-132 和 miR-24 最可能与 hub 基因相关。

【关键词】 白内障;糖皮质激素;生物信息学分析;晶状体上皮细胞;生物学功能;Hub 基因;微小 RNA

基金项目:国家自然科学基金项目(81870644)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190821-00359

Regulatory effect of glucocorticoid on the biological function of lens epithelial cells: a bioinformatics analysis

Yan Chufan, Han Xiao, Zhang Jinsong

Department of Ophthalmology, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110059, China

Corresponding author: Zhang Jinsong, Email: cmu4h_zjs@163. com

[Abstract] Objective To analyze the effect of glucocorticoid on the biological function of lens epithelial cells (LECs) by bioinformatics and predict related microRNA (miRNA). **Methods** GSE3040 database was downloaded and the human LECs line (HLE-B3) cells in the experimental group were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone, and HLE-B3 cells in the control group were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ dimethyl sulfoxide (DMSO). GEO2R was used to analyze the differentially expressed genes between the two groups. Metascape website was employed to analyze the functional enrichment of differentially expressed genes, and EdU cell proliferation assay was performed to detect the difference in cell proliferation between the two groups. STRING website and cytoscape software were used to construct protein-protein interaction network. Hub genes were calculated by cytohubba app, and quantitative real-time PCR was performed to detect the expression levels of hub genes between the two groups. MirCode website was used to predict the related miRNAs. **Results** A total of 341 differentially expressed genes were detected between the experimental group and the control group, among which there were 300 up-regulated genes and 41 down-regulated genes. *SLC12A1*, *MED13L*, *ALDH5A1*, *SLC15A3* and *WWC1* were the top five down-regulated genes and *SCNN1A*, *ANKRD36*, *FKBP5*, *PYY* and *ADH1B* were the top five up-regulated genes. The top 20 terms of functional enrichment were listed, and the negative regulation of HLE-B3 cells proliferation showed the most

enrichment. Cell proliferation rate in the experimental group was $(8.09 \pm 0.20)\%$, which was significantly lower than $(39.63 \pm 0.80)\%$ in the control group ($t = 38.43, P < 0.01$). The top ten hub genes were *SST, CXCL8, GRM1, GNRH1, CXCL5, PPBP, CX3CR1, PYY, EDNRA* and *GRK5*, and quantitative real time PCR confirmed that the expression levels of *SST, CXCL8, GRM1, PYY, EDNRA* and *GRK5* mRNA were statistically different (all at $P < 0.05$). The top six miRNAs which might be associated with hub genes were miR-15abc, miR-214, miR-23abc, miR-129-5p, miR-132 and miR-24. **Conclusions** The $1 \mu\text{mol/L}$ glucocorticoid can negatively regulate the proliferation of HLE-B3 cells. *SST, CXCL8, GRM1, PYY, EDNRA* and *GRK5* may be hub genes and miR-15abc, miR-214, miR-23abc, miR-129-5p, miR-132, miR-24 are most likely to relate to them.

[**Key words**] Cataract; Glucocorticoid; Bioinformatics analysis; Lens epithelial cells; Biological function; Hub gene; MicroRNA

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81870644)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190821-00359

糖皮质激素性白内障多见于全身或局部长期使用糖皮质激素者,其发病机制尚未完全阐明。许多生物学过程被证明与糖皮质激素性白内障的发生相关,如细胞分化异常和糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 的激活等^[1-3];糖皮质激素还导致晶状体中 E 钙黏附蛋白和 N 钙黏附蛋白的表达量下降,而细胞黏附在晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的正常分化和迁移中有重要作用^[4]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种长度为 18~22 个核苷酸的非编码 RNA,与基因的 3' 端非翻译区结合,通过抑制基因的转录来影响蛋白的表达。既往研究发现,miR-29a 可以靶向抑制 GR mRNA 的表达,同时其本身的表达量又依赖于 GR 的激活,形成一个负反馈回路,这个特点在糖皮质激素治疗过程中有助于减缓 GR 水平的逐渐降低^[5],这为糖皮质激素性白内障的治疗提供了新的思路。目前关于 miRNA 与糖皮质激素性白内障的研究尚未见报道。本研究基于生物信息学方法分析经地塞米松处理的 LECs 中差异基因的表达及其相关的生物学功能,筛选并验证 hub 基因的表达,预测与其最有可能相关的 miRNA,以期对白内障的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 LECs 细胞株 HLE-B3 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 地塞米松、Trixon X-100 (北京索莱宝科技有限公司);二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司);MEM 培养液、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (江苏凯基生物技术股份有限公司);胎牛血清 (澳洲 AusGeneX 公司);青链霉素混合液 (美国 HyClone 公司);RNA iso Plus、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司);质量分数 4% 多聚甲醛 (武汉博士德生

物工程有限公司);甘氨酸 (大连美仑生物技术有限公司);mRNA 引物 (武汉金开瑞生物工程有限公司);EdU 细胞增殖检测试剂盒 (广州锐博科技有限公司)。PCR 逆转录仪 (美国 Bio-Rad 公司);实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司);荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 不同生物信息学方法对地塞米松处理的 HLE-B3 细胞生物学功能的评估

1.2.1 GEO2R 法分析 HLE-B3 细胞差异基因 从公开数据库 GEO 中下载 GSE3040 数据集,该数据集由 Gupta 等^[6]上传。该数据集中,用 DMSO 处理的 HLE-B3 细胞设置为对照组,经过 $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松处理 16 h 的 HLE-B3 细胞设置为实验组,每组 3 个样本。通过 Affymetrix Human Genome U133A Array 平台,得到不同样本间基因表达数据。参照文献^[7]的方法,利用 GEO 数据库的生信分析工具 GEO2R,以倍数变化 >2 、 P 值 <0.05 为条件筛选分析 2 个组间差异基因的表达。利用 graphGP 网站 (<https://www.ehbio.com/ImageGP/>),以 logFC 为横坐标、 $-\log_{10}(P \text{ value})$ 为纵坐标绘制该数据集差异基因的火山图。蓝色代表下调基因,紫色代表上调基因,黄色代表表达无差异的基因。

1.2.2 利用 Metascape 网站进行差异基因功能富集分析 打开 Metascape 网站 (<http://metascape.org/gp/index.html/>)^[8],将之前得到的差异基因名称或者基因 ID 输入基因列表并提交,即可获取功能富集柱图。所有富集到的词条来源于 GO 生物学过程、KEGG 通路、Reactome 基因集、Canonical 通路及 CORUM。收集 P 值 <0.01 、最小计数为 3、富集因子 >1.5 的项,并根据成员的相似性进行分组。在对丰富项进行层次聚类时,采用 Kappa 分数作为一致性度量,一致性 >0.3 的子树作为 1 个聚类,选择集群中最具统计意义的术语来表示集群。

1.2.3 作图法分析 hub 基因 利用 STRING 数据库 (v10.5, <https://string-db.org/cgi/input.pl>) 获得差异基因相互关系数据,将其导入 cytoscape 软件^[9],分析并制作蛋白互作网络图,在 cytoscape 中安装 cytohubba app,选择 MCC 方法分析前 25 位 hub 基因及其相互关系,颜色越深表示基因重要性越高。

1.2.4 mirCode 预测与 hub 基因相关的 miRNA 在 mirCode 数据库 (<http://www.mircode.org>)^[10] 中下载已知的高度保守的 miRNA 数据集,筛选出可能与前 10 个 hub 基因有调控关系的 miRNA,利用 cytoscape 软件,制作出预测的 hub 基因与 miRNA 的调控网状图。蓝色六边形点代表筛选出的关键 hub 基因,紫色圆点是与其相关的 miRNA。

1.3 地塞米松处理后 HLE-B3 细胞生物学功能变化的离体细胞实验

1.3.1 细胞培养及分组 将冻存的 HLE-B3 细胞从 -80 ℃ 冰箱中取出,迅速将冻存管放到 37 ℃ 水浴锅中轻轻摇晃解冻 1~2 min,置于低速离心机中,离心半径 16 cm,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液。用 1 ml 完全培养基重悬细胞并将其均匀接种于直径 6 cm 培养皿中,添加 3 ml 完全培养基。置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 温箱中培养,待细胞融合至 80%~90% 时用胰蛋白酶消化并 1:3 传代。取处于对数生长期的细胞 (第 3 代及以后的细胞),分别加入 1 μmol/L DMSO 和 1 μmol/L 地塞米松,置于 37 ℃、5% CO₂ 温箱中培养 16 h,作为对照组和实验组,进行后续实验。

1.3.2 EdU 实验检测 HLE-B3 细胞增生情况 取处于对数生长期的 HLE-B3 细胞接种至 96 孔板中,分别设置实验组和对照组,每组 3 个复孔。用完全培养基按 1 000:1 稀释 EdU 溶液,终浓度为 50 μmol/L,每孔加入 100 μl 该培养基,温箱孵育 2 h,弃培养液, PBS 清洗 2 次,每次 5 min。每孔加入 4% 多聚甲醛 50 μl 室温下固定 30 min,弃固定液,每孔加入质量浓度 2 mg/ml 甘氨酸 50 μl,脱色摇床孵育 5 min 后弃液,每孔加入 100 μl PBS,脱色摇床清洗 5 min 后弃液。每孔加入 100 μl 体积分数 0.5% TritonX-100 脱色摇床孵育 10 min, PBS 清洗 1 次,5 min。每孔加入 100 μl Apollo 染色反应液,避光室温摇床孵育 30 min 后弃液 (之后步骤均避光进行),每孔加入 0.5% Triton X-100 各 100 μl,摇床清洗 2 次,每次 10 min。每孔加入 100 倍稀释 Hoechst33342 各 50 μl,室温下孵育 5 min 复染核, PBS 清洗 3 次,每次 5 min。荧光显微镜下观察染色情况,绿色荧光染色细胞为增生期细胞,蓝色荧光染色细胞为活细胞。细胞增生率 = 增生期细胞数/活细

胞数×100%。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 hub 基因相对表达量 采用 Trizol 法分别提取实验组和对照组 HLE-B3 细胞的 RNA,分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,将其逆转录成 cDNA,前 10 个 hub 基因的引物序列见表 1。采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 实验,按照试剂盒说明书步骤进行实验。实验条件:96 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火延伸 34 s,共 40 个循环,添加熔解曲线。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 糖皮质激素处理 HLE-B3 细胞中排名前 10 位 hub 基因的引物序列

Table 1 The primer sequence of top 10 hub genes in glucocorticoid treated HLE-B3 cells

引物名称	序列 (5'-3')
<i>SST</i>	正向:CTCCCTCGGACCCAGACTC 反向:AGGGCATCATTCTCCGTCTGG
<i>CXCL8</i>	正向:AGCTCTGTGTGAAGGTGCACT 反向:TGGGGTGGAAAGGTTTGGAGT
<i>GRM1</i>	正向:CCTCTGATGTTGTCCGATGC 反向:CCCTGCGCTTCTTCTTCGGA
<i>GNRH1</i>	正向:TCTACTGACTTGCTGCGTGGA 反向:CGTTGGGTTTCTGCCAGTTGA
<i>CXCL5</i>	正向:GCTGCGTTGCGTTTGTTTACA 反向:CGTTCTTCAGGGAGGCTACCA
<i>GRK5</i>	正向:GACCCTCCCTTCGTTCCAGAC 反向:ATTGACGCCCTTCACAGTGA
<i>PPBP</i>	正向:GGAAGTGATCGGGAAGGAAC 反向:ATCTGGGTCCAGGCAGATTTT
<i>CX3CR1</i>	正向:ACAGCAAGAAGCCCAAGAGTG 反向:AGGGCAAAGTGGCTACAAACA
<i>PYY</i>	正向:AGGAGCTGAACCGCTACTACG 反向:GGGGAAGAAGCTTTTGGAAAG
<i>EDNRA</i>	正向:GATCACCGTCTCAACCTCTG 反向:AAAGGAATCCCAATTCCTCTGA

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 和 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析。计量资料的数据经 K-S 检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表示;实验组和对照组中的 *SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*GNRH1*、*CXCL5*、*PPBP*、*CX3CR1*、*PYY*、*EDNRA*、*GRK5* 的 mRNA 相对表达量差异比较,以及 HLE-B3 细胞增生值差异比较均采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地塞米松作用后 LECs 中差异基因的筛选

通过 GEO2R 分析数据,得到 341 个差异基因,其中上调基因为 300 个,下调基因为 41 个。下调基因中差异最显著的 5 个基因是 *SLC12A1*、*MED13L*、

ALDH5A1、*SLC15A3* 和 *WWC1* 基因;上调基因中差异最显著的 5 个基因是 *SCNN1A*、*ANKRD36*、*FKBP5*、*PYY* 和 *ADH1B* 基因(图 1)。

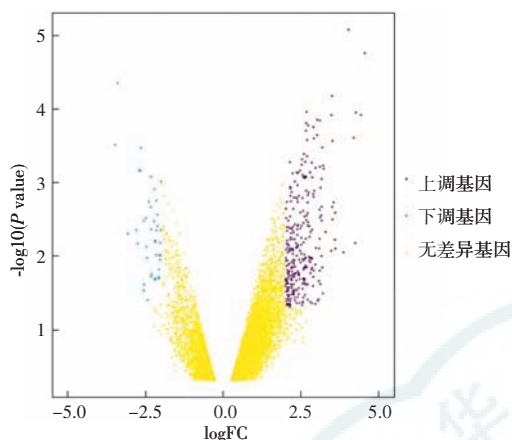


图 1 HLE-B3 细胞差异基因表达火山图 蓝色代表在糖皮质激素性白内障中表达下调的基因,紫色代表糖皮质激素性白内障中表达上调的基因,黄色代表表达无差异的基因

Figure 1 Volcano plot of differentially expressed genes in HLE-B3 cell Blue spots represented the down-regulated genes and purple spots represented the up-regulated genes, and yellow spots represented the genes without statistic difference in expression level in glucocorticoid induced cataract

2.2 地塞米松作用后 2 个组 HLE-B3 细胞增殖值比较

HLE-B3 细胞差异基因生物学功能富集分析列出了 341 个差异表达基因富集量最多的前 20 个词条,结果显示富集量最大的是对 HLE-B3 细胞增殖的负向调节 [$-\log_{10}(P) = 5.73$],第 2 和第 3 分别是细胞对脂多糖的反应 [$-\log_{10}(P) = 5.14$] 和细胞外基质的降解 [$-\log_{10}(P) = 5.12$] (图 2)。EdU 细胞增殖实验结果显示,实验组细胞增殖率为 $(8.09 \pm 0.20)\%$,明显低于对照组的 $(39.63 \pm 0.80)\%$,差异有统计学意义 ($t = 38.43, P < 0.01$) (图 3)。

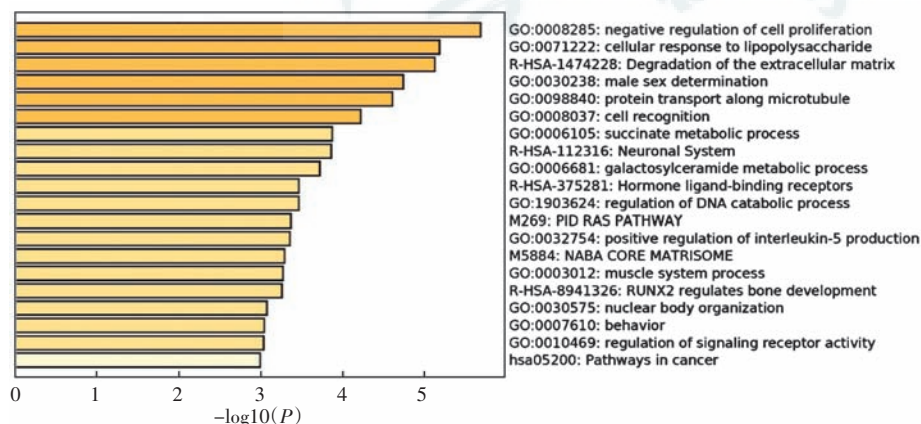


图 2 HLE-B3 细胞差异基因生物学功能富集分析 列出 341 个差异基因富集到的前 20 个词条

Figure 2 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes in HLE-B3 cell The top 20 terms in functional enrichment analysis among 341 differentially expressed genes

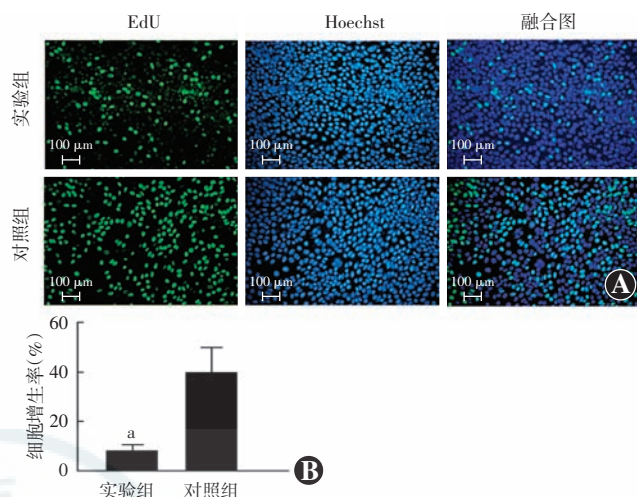


图 3 EdU 细胞增殖实验检测地塞米松对 HLE-B3 细胞增殖的调控作用 A:实验组和对照组细胞染色(标尺 = 100 μm) 蓝色代表细胞核,绿色代表增殖期细胞 B:实验组与对照组 LECs 增殖率比较与对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

Figure 3 The effect of dexamethasone on HLE-B3 cell proliferation tested by EdU proliferation assay A: Staining results of the experimental group and control group (bar = 100 μm) Blue spots represented cell nuclei, and green spots represented cells in proliferation B: Comparison of LECs proliferation rate between the two groups Compared with the control group, $^*P < 0.01$ (Independent-samples t test, $n = 3$)

2.3 地塞米松作用后 2 个组 HLE-B3 细胞中 hub 基因 mRNA 相对表达量比较

排名前 10 位的 hub 基因分别为 *SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*GNRH1*、*CXCL5*、*PPBP*、*CX3CR1*、*PYY*、*EDNRA* 和 *GRK5* 基因,其中唯一下调的是 *GRK5* 基因,其余表达均上调(图 4)。实时荧光定量 PCR 结果显示,在得到的 10 个 hub 基因中,实验组 HLE-B3 细胞中 *SST*、*CXCL8*、*GRM1*、*PYY* 和 *EDNRA* mRNA 相对表达量较对照组明显升高, *CXCL5* 和 *GRK5* mRNA 的相对表达量较对照组明显降低,2 个组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 2 个组 *GNRH1*、*PPBP* 和 *CX3CR1* mRNA 相对表达量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.4 HLE-B3 细胞中与 hub 基因相关的 miRNA 预测

mirCode 预测结果显示,与 hub 基因关联最密切的前 6 位 miRNA 分别是 miR-15abc、miR-214、miR-23abc、miR-129-5p、miR-132 和 miR-24(图 5)。

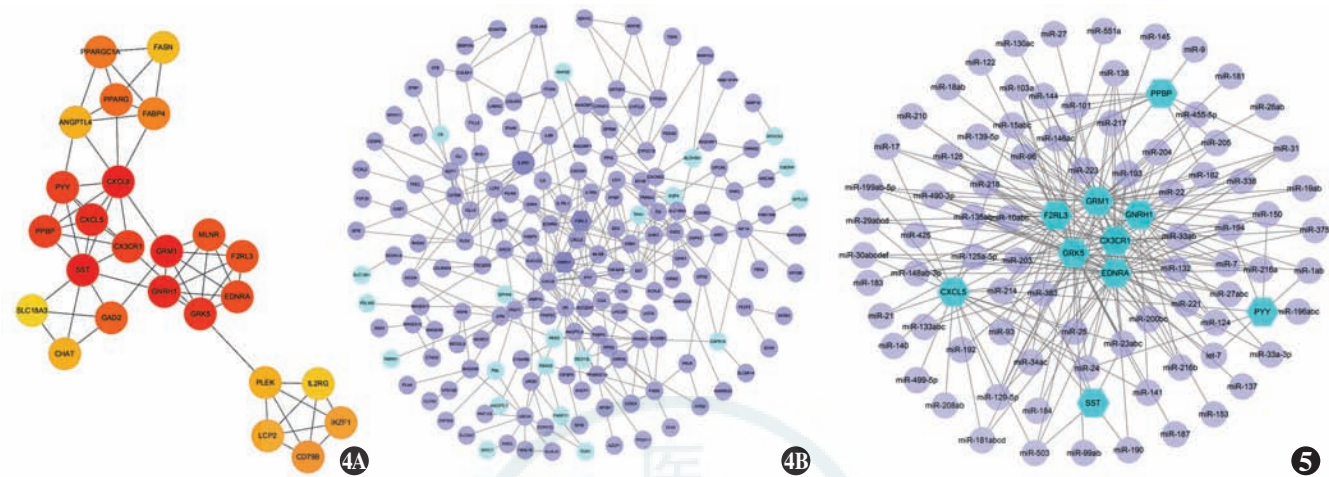


图 4 hub 基因及蛋白互作网络图 A:糖皮质激素处理 HLE-B3 细胞中的 hub 基因 基因的颜色由红变黄,代表重要性逐渐降低 B:差异基因的蛋白互作网络图 紫色的点代表在糖皮质激素处理 HLE-B3 细胞中表达上调的基因,蓝色的点代表表达下调的基因 图 5 与 hub 基因相关的 miRNAs 蓝色六边形点代表筛选出的 hub 基因,紫色圆点代表与其相关的 miRNA

Figure 4 Hub genes and protein-protein interaction network A:Hub genes in glucocorticoid treated HLE-B3 cells The spots color changed from red to yellow,which meant the importance of genes gradually decreased B:Protein-protein interaction network of differentially expressed genes Purple spots represented the up-regulated genes and blue spots represented the down-regulated genes in the glucocorticoid-treated HLE-B3 cells Figure 5 The miRNAs associated with hub genes The blue hexagons represented hub genes,and purple spots represented miRNAs related to them

表 2 2 个组 HLE-B3 细胞中前 10 位 hub 基因 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)											
Table 2 Comparison of the relative mRNA expression levels of top 10 hub genes in HLE-B3 cells between the two groups (mean±SD)											
组别	样本量	不同基因 mRNA 相对表达量									
		SST	CXCL8	GRM1	GNRH1	CXCL5	GRK5	PPBP	CX3CR1	PYY	EDNRA
对照组	3	1.02±0.13	1.00±0.06	1.00±0.06	1.03±0.16	1.00±0.06	1.02±0.15	1.06±0.25	1.00±0.01	1.36±0.08	1.05±0.21
实验组	3	2.09±0.12	1.53±0.11	2.08±0.35	0.60±0.03	0.47±0.12	0.26±0.02	0.80±0.02	0.97±0.04	4.35±0.09	7.17±1.56
t 值		5.992	4.168	3.041	2.569	4.051	5.114	1.026	0.792	25.190	3.882
P 值		0.004	0.014	0.038	0.060	0.015	0.007	0.363	0.473	<0.01	0.017
注:独立样本 t 检验 Note:Independent-samples t test											

3 讨论

随着糖皮质激素越来越广泛地应用于临床,糖皮质激素性白内障患病人数也逐渐增多,早在 1960 年就有研究者发现在长期使用糖皮质激素治疗风湿性关节炎的患者中,有 39% 在治疗过程中出现后囊下白内障^[11]。单一的基因表达差异不足以解释疾病形成的原因。本研究通过高通量测序获得基于糖皮质激素作用于人 HLE-B3 细胞的差异基因,从而模拟糖皮质激素性白内障的发病过程中基因表达的数据。利用现有的生物分析工具,分析出大量有表达差异的基因及其之间的相互作用关系,以及具体影响了哪些生物学功能。

既往研究多认为,糖皮质激素通过促进 LECs 向间质细胞的转化,从而导致后囊下白内障的形成,且其发生率随着糖皮质激素剂量的增加而升高^[12]。本研

究通过差异基因的功能富集分析发现,1 μmol/L 地塞米松很可能会抑制 HLE-B3 细胞的增生,并通过 EdU 实验证实了这一点。之前有研究表明低浓度 (100 nmol/L) 的地塞米松可以促进 LECs 的增生^[3],由此可以推测随着地塞米松浓度的增加,其逆转了对细胞增生的调控作用。晶状体由 LECs 和其分化而来的纤维细胞构成,后囊下白内障主要由 LECs 过度增生及上皮-间质转化异常造成。既往研究发现地塞米松能够抑制鼠晶状体上皮外植体中 LECs 的上皮-间质转化^[13],本研究发现地塞米松能够抑制 LECs 增生,因此其有可能应用于白内障的治疗。

已有研究发现,SST 基因在糖尿病视网膜病变和黄斑水肿患者玻璃体中表达减低^[14-15];CXCL8 基因在糖尿病视网膜病变患者房水中的表达水平远高于无视网膜病变糖尿病患者,它能介导白细胞的激活与血管

内皮细胞的黏附^[16]; *CXCL5* 基因在干眼患者泪液中的表达量升高^[17]; *GRK5* 基因可以促进视紫红质磷酸化, 导致夜盲^[18]; *PPBP* 基因的表达量在视网膜中央静脉阻塞患者玻璃体中显著升高^[19]; *CX3CR1* 基因可以调控小胶质细胞介导的光感受器的退化, 是视网膜色素变性的潜在治疗靶点^[20-21]; 阻断 *EDNRA* 基因可以抑制病理性新生血管生成, 并提高早产儿视网膜病变患者的视力^[22]; 但 *GRM1*、*GHRH*、*PYY* 和 *F2RL3* 尚未见在眼科学领域的研究报道。本研究中排名前 10 位的 hub 基因在白内障以及糖皮质激素性白内障中均无具体研究, 它们能否延缓疾病的发生或治疗糖皮质激素性白内障还有待进一步探讨; 同时, 糖皮质激素性白内障的 hub 基因多与视网膜疾病相关, 2 种疾病之间是否有相互关系, 目前仍不清楚。

许多研究发现, miRNA 在疾病的发生和发展中十分重要, 目前一些 miRNA 相关药物已进入临床前试验和临床试验阶段, 如 miR-34 模拟物用于治疗血液系统恶性肿瘤已进入 I 期临床试验阶段, 它还可以抑制肺癌、肝癌的生长^[23]。在小鼠非小细胞肺癌模型中发现, miR-200 模拟物可以增强辐射敏感度并延长小鼠的生存时间^[24], 提示 miRNA 可以作为治疗疾病的新靶点。本研究预测出与 hub 基因相关的 miRNA 目前均未在激素性白内障中有具体研究, 但在高糖诱导的 LECs 上皮-间质转化模型中, miR-214 的表达量显著下降, 山奈酚和 lncRNA PVT1 都可以通过靶向调节 miR-214 来调控 LECs 的增生和上皮-间质转化^[25-26]; 经过正常晶状体与白内障晶状体测序对比后发现, miR-23 在透明晶状体中的表达水平高于白内障晶状体^[27]; 过表达 miR-24 直接作用于 *p53* 基因, 促进 LECs 凋亡^[28]。

综上所述, 本研究筛选了糖皮质激素性白内障模型中的差异基因并进行了功能富集分析, 发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松能够显著抑制 HLE-B3 细胞增生, 通过实验验证前 10 位 hub 基因中有 6 个与分析结果相符, 同时预测了与糖皮质激素性白内障最有可能相关的 6 个 miRNA, 可以作为下一步研究糖皮质激素性白内障的具体指标。需要说明的是, 本研究为离体细胞学研究, 并非来自在体模型, 如动物模型和人体标本研究, 研究结果是否与在体研究一致尚不清楚, 仍需进一步研究。

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] Wang C, Dawes LJ, Liu Y, et al. Dexamethasone influences FGF-

induced responses in lens epithelial explants and promotes the posterior capsule coverage that is a feature of glucocorticoid-induced cataract [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 111 : 79-87. DOI: 10.1016/j.exer.2013.03.006.

- [2] Gupta V, Wagner BJ. Expression of the functional glucocorticoid receptor in mouse and human lens epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5) : 2041-2046. DOI: 10.1167/iovs.02-1091.
- [3] 王祥群, 吴开力, 曾骏文. 糖皮质激素诱发白内障与 Ca^{2+} 介导效应的实验研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2005, 23 (2) : 125-127. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.02.004.
Wang XQ, Wu KL, Zeng JW. Effects of calcium on glucocorticoid-induced cataract in chicken embryo [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2005, 23 (2) : 125-127. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.02.004.
- [4] Lyu J, Kim JA, Chung SK, et al. Alteration of cadherin in dexamethasone-induced cataract organ-cultured rat lens [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5) : 2034-2040. DOI: 10.1167/iovs.02-0602.
- [5] Glantschnig C, Koenen M, Gil-Lozano M, et al. A miR-29a-driven negative feedback loop regulates peripheral glucocorticoid receptor signaling [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (5) : 5924-5941. DOI: 10.1096/fj.201801385RR.
- [6] Gupta V, Galante A, Soteropoulos P, et al. Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2005, 11 : 1018-1040.
- [7] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (Database issue) : D991-995 [2020-06-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193258/>. DOI: 10.1093/nar/gks1193.
- [8] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1) : 1523 [2020-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944313/>. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6.
- [9] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27 (3) : 431-432. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq675.
- [10] Jeggari A, Marks DS, Larsson E. miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (15) : 2062-2063. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts344.
- [11] Black RL, Oglesby RB, von Sallmann L, et al. Posterior subcapsular cataracts induced by corticosteroids in patients with rheumatoid arthritis [J]. *JAMA*, 1960, 174 : 166-171. DOI: 10.1001/jama.1960.63030020005014.
- [12] Ernst P, Baltzan M, Deschênes J, et al. Low-dose inhaled and nasal corticosteroid use and the risk of cataracts [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27 (6) : 1168-1174. DOI: 10.1183/09031936.06.00043005.
- [13] Sulaiman RS, Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in the eye [J]. *Steroids*, 2018, 133 : 60-66. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.11.002.
- [14] Carrasco E, Hernández C, Miralles A, et al. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (11) : 2902-2908. DOI: 10.2337/dc07-0332.
- [15] Simó R, Carrasco E, Fonollosa A, et al. Deficit of somatostatin in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (3) : 725-727. DOI: 10.2337/dc06-1345.
- [16] Cheung CM, Vania M, Ang M, et al. Comparison of aqueous humor cytokine and chemokine levels in diabetic patients with and without retinopathy [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 830-837.
- [17] Na KS, Mok JW, Kim JY, et al. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (9) : 5443-5450. DOI: 10.1167/iovs.11-9417.

- [18] Vishnivetskiy SA, Ostermaier MK, Singhal A, et al. Constitutively active rhodopsin mutants causing night blindness are effectively phosphorylated by GRKs but differ in arrestin-1 binding [J]. Cell Signal, 2013, 25(11): 2155-2162. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.07.009.
- [19] Ehlken C, Grundel B, Michels D, et al. Increased expression of angiogenic and inflammatory proteins in the vitreous of patients with ischemic central retinal vein occlusion [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126859 [2020-06-27]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25978399/. DOI: 10.1371/journal.pone.0126859.
- [20] Roche SL, Wyse-Jackson AC, Ruiz-Lopez AM, et al. Fractalkine-CX3CR1 signaling is critical for progesterone-mediated neuroprotection in the retina [J/OL]. Sci Rep, 2017, 7: 43067 [2020-06-28]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28216676/. DOI: 10.1038/srep43067.
- [21] Zabel MK, Zhao L, Zhang Y, et al. Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa [J]. Glia, 2016, 64(9): 1479-1491. DOI: 10.1002/glia.23016.
- [22] Patel C, Narayanan SP, Zhang W, et al. Activation of the endothelin system mediates pathological angiogenesis during ischemic retinopathy [J]. Am J Pathol, 2014, 184(11): 3040-3051. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.07.012.
- [23] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246.
- [24] Cortez MA, Valdecana D, Zhang X, et al. Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer [J]. Mol Ther, 2014, 22(8): 1494-1503. DOI: 10.1038/mt.2014.79.
- [25] Huang J, Chen Z, Lai Z, et al. Kaempferol ameliorates the regulatory effects of PVT1/miR-214 on epithelial-mesenchymal transition through the PAK4/ β -catenin axis in SRA01/04 cells [J/OL]. Future Med Chem, 2021 [2021-02-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33527844/. DOI: 10.4155/fmc-2020-0381. [published online ahead of print Feb 2, 2021].
- [26] Yang J, Zhao S, Tian F. SP1-mediated lncRNA PVT1 modulates the proliferation and apoptosis of lens epithelial cells in diabetic cataract via miR-214-3p/MMP2 axis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 554-561. DOI: 10.1111/jcmm.14762.
- [27] Wu C, Lin H, Wang Q, et al. Discrepant expression of microRNAs in transparent and cataractous human lenses [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(7): 3906-3912. DOI: 10.1167/iovs.11-9178.
- [28] Lu B, Christensen IT, Ma LW, et al. miR-24-p53 pathway evoked by oxidative stress promotes lens epithelial cell apoptosis in age-related cataracts [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5021-5028. DOI: 10.3892/mmr.2018.8492.

(收稿日期:2020-09-01 修回日期:2021-03-01)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 病例报告 ·

飞秒激光小切口透镜取出术后异物致弥漫性角膜炎诊疗一例

张又尹 肖宇 邓应平

四川大学华西医院眼科,成都 610041

通信作者:邓应平,Email:dyp558@163.com

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200527-00379

A case of diffuse keratitis caused by foreign body after small-incision lenticule extraction procedure

Zhang Youyin, Xiao Yu, Deng Yingping

Department of Ophthalmology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Deng Yingping, Email: dyp558@163.com

扫码观看
手术视频

患者,女,30岁,因右眼视物模糊,偶伴眼胀1个月余于2019年12月4日就诊于华西医院眼科。患者自述3个月前于外院行双眼飞秒激光小切口透镜取出术(small-incision lenticule extraction, SMILE),术后遵医嘱常规用药点眼,术后2个月因出现右眼视物模糊给予醋酸泼尼松龙滴眼液、玻璃酸钠滴眼液和溴莫尼定噻吗洛尔滴眼液点眼,症状无明显改善。眼科检查:左眼裸眼视力1.2,矫正视力 $-0.50\text{ DC} \times 10^\circ = 1.2^{-1}$,眼压16.0 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),眼前段检查未见异常;右眼裸眼视力0.8,矫正视力 $-0.50\text{ DS}/-0.75\text{ DC} \times 10^\circ = 1.2^{-1}$,眼压15.6 mmHg,结膜轻度充血,角膜颞上方可见长约3 mm的弧形角膜切口痕迹,12:00位角膜缘与瞳孔缘间的角膜层间以及5:00和6:00位瞳孔缘角膜层间可见3根细小丝状物,6:00位角膜缘与瞳孔缘间的角膜层间见一点状物,其周围轻度雾状混浊(图1),患眼前房深度正常,房水清,瞳孔圆,直径约3 mm,

瞳孔对光反射灵敏。诊断:右眼弥漫性角膜炎;右眼角膜云翳;双眼SMILE术后。右眼采用左氧氟沙星滴眼液和玻璃酸钠滴眼液点眼,每天4次。患者用药后4 d于表面麻醉下接受右眼角膜层间异物取出术,术中用针头分离原角膜切口,从原切口放入透镜分离器分离囊袋后面;用冲洗针头向囊袋内注入适量无菌平衡盐溶液,明确异物位置后用无菌平衡盐溶液反复冲洗并用冲洗针头小心分离异物,在此过程中将冲洗针头在角膜表面适当用力以协助异物冲洗;冲洗角膜及结膜,拭干并仔细对合角膜切口(视频1)。术后第1天,患者自觉视物模糊明显好转,右眼裸眼视力1.2,矫正视力 $-0.50\text{ DC} \times 180^\circ = 1.2$,眼压16.0 mmHg,结膜轻度充血,原异物所在位置角膜层间轻度片状雾状混浊,较术前范围稍扩大;左眼视力及眼前段检查无明显改变,眼压14.0 mmHg。右眼采用妥布霉素地塞米松滴眼液、左氧氟沙星滴眼液和玻璃酸钠滴眼液点眼,每天4次。术后第