

低氧诱导视网膜色素上皮细胞损伤的生物学机制转录组测序分析

卢聪 史平玲 杨琪翔 宋昊 李苗 张贝贝 宋宗明

河南大学人民医院 河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003

通信作者: 宋宗明, Email: szmeyes@126.com

【摘要】 目的 利用转录组测序(RNA-seq)和生物信息学技术对低氧与常氧条件下人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 细胞的差异表达基因(DEGs)及信号通路的变化进行分析,探讨低氧诱导 ARPE-19 细胞损伤的生物学机制。方法 将 ARPE-19 细胞分为低氧处理组和常氧对照组,分别采用体积分数 1% 和 21% O₂ 处理细胞 8、24、48、72 h,采用实时荧光定量 PCR 法检测不同时间点血管内皮生长因子(VEGF)和低氧诱导因子(HIF-1 α) mRNA 相对表达量。分别对 2 个组处理后 8 h 和 24 h 的 ARPE-19 细胞进行 RNA-seq 及生物信息学分析,以 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 为条件筛选出 DEGs,并对 DEGs 进行聚类热图分析、基因本体论(GO)功能富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析及蛋白-蛋白互作(PPI)网络分析。采用实时荧光定量 PCR 法检测低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后 DEGs 中可能与低氧有关的基因 mRNA 相对表达量。采用细胞活力检测试剂盒验证 2 个组不同时间点低氧对 ARPE-19 细胞的损伤作用。结果 低氧处理组 8、24、48、72 h VEGF 和低氧处理组 8、24、48 h HIF-1 α mRNA 相对表达量均高于常氧对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中低氧处理后 8 h 和 24 h 各因子 mRNA 表达差异较大。低氧诱导 8 h,低氧处理组与常氧对照组间筛选显著 DEGs 共 62 个,其中显著上调基因 45 个,显著下调基因 17 个;低氧诱导 24 h,2 个组间筛选显著 DEGs 共 255 个,其中显著上调基因 228 个,显著下调基因 27 个。DEGs 的 GO 功能分析主要富集在蛋白质降解、核苷酸生物合成及物质转运等进程。KEGG 通路分析主要富集在 PI3K-Akt、cGMP-PKG 以及其他与代谢、细胞周期、细胞生长和细胞凋亡密切相关的信号通路。PPI 网络分析发现核心基因 *HPCA*、*MT3* 和 *NOS3* 等。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后,低氧相关基因 *DEPPI*、*NPPB*、*PDZK1*、*HILPDA*、*TCEA3*、*NDRG1* 和 *RORC* 的 mRNA 表达水平升高,*TFRC*、*NQO1* 的 mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。低氧诱导 ARPE-19 细胞后 8 h 和 24 h,细胞形态均正常,生长状态较好,未出现死亡细胞,低氧诱导 48 h 后 ARPE-19 细胞出现死亡,低氧诱导 72 h 后死亡细胞数量增加。结论 与代谢相关的 PI3K-Akt、cGMP-PKG 信号通路可能参与低氧诱导的 ARPE-19 细胞损伤作用,*HPCA*、*MT3*、*NOS3* 核心基因可作为功能性靶基因,在低氧反应中起到关键作用。

【关键词】 视网膜色素上皮细胞; 低氧; 差异表达基因; 转录组测序

基金项目: 河南省科技攻关项目(192102310075); 河南省医学科技攻关省部共建项目(SBGJ2018080); 河南省卫生健康科技英才海外研修工程项目(HWYX2019131)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201127-00799

Transcriptomics analysis of hypoxia-induced retinal pigment epithelium cell injury

Lu Cong, Shi Pingling, Yang Qixiang, Song Hao, Li Miao, Zhang Beibei, Song Zongming

Henan University People's Hospital, Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Song Zongming, Email: szmeyes@126.com

[Abstract] Objective To analyze differentially expressed genes (DEGs) and the changes of signal pathways in human retinal pigment epithelium cells (ARPE-19) under hypoxic and normoxic conditions and to explore the biological mechanism of hypoxia-induced ARPE-19 cell damage via transcriptome sequencing (RNA-seq) and bioinformatics technology. **Methods** The ARPE-19 cells were divided into the hypoxia treatment group and the normoxia control group treated with 1% and 21% O₂ by volume for 8, 24, 48, 72 hours, respectively. The relative expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) mRNA were detected with real-time fluorescent quantitative PCR at different time points. RNA-seq and bioinformatics analysis were performed at 8 hours and 24 hours after hypoxia and normoxia treatment. DEGs were screened out under the conditions of $|\log_2FC| \geq 1$ and $P \leq 0.05$. Then the cluster heat map analysis, Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and protein-protein interaction network analysis were also carried out. Real-time fluorescent quantitative PCR was employed at 24 hours after hypoxia to detect the relative mRNA expression of genes that might be related to hypoxia in DEGs. Cell viability kit was used to verify and compare the damage effect of hypoxia on ARPE-19 cells at different time points between the two groups. **Results** The relative mRNA expression levels of VEGF at 8, 24, 48 and 72 hours after hypoxia treatment and the relative HIF-1 α mRNA expression levels at 8, 24 and 48 hours after hypoxia treatment were significantly higher than those of the normoxia control group (all at $P < 0.05$). There were large differences in the mRNA expression levels at 8-hour and 24-hour treatment between the two groups. A total of 62 significant DEGs were screened between the hypoxia treatment group and the normoxia control group after 8-hour hypoxia treatment, among which 45 genes were significantly up-regulated and 17 genes were significantly down-regulated. A total of 255 significant DEGs were screened out between the hypoxia treatment group and the normoxia control group after 24-hour hypoxia treatment, among which 228 genes were significantly up-regulated and 27 genes were significantly down-regulated. The GO functional analysis of DEGs was mainly enriched in processes such as protein degradation, nucleotide biosynthesis, and material transport. KEGG pathway analysis was mainly enriched in PI3K-Akt, cGMP-PKG, and other signaling pathways closely related to metabolism, cell cycle, cell growth, and apoptosis. The core genes *HPCA*, *MT3* and *NOS3* were found by protein-protein interaction network analysis. Real-time fluorescent quantitative PCR test results showed that after 24-hour hypoxia treatment, the mRNA expression levels of hypoxia related genes *DEPPI1*, *NPPB*, *PDZK1*, *HILPDA*, *TCEA3*, *NDRG1* and *RORC* in ARPE-19 cells were significantly increased and the mRNA expression levels of *TFRC* and *NQO1* were significantly decreased (all at $P < 0.05$). The cell morphology was normal and the growth state was good without dead cells after 8-hour and 24-hour hypoxia treatment in ARPE-19 cells. There were dead cells after 48-hour hypoxia treatment, and the number of dead cells was increased at 72 hours after hypoxia treatment. **Conclusions** The PI3K-Akt and cGMP-PKG signaling pathways related to metabolism may be involved in hypoxia-induced injury of ARPE-19 cells. Core genes of *HPCA*, *MT3* and *NOS3* can be used as functional target genes and play key roles in hypoxia response of cells.

[Key words] Retinal pigment epithelium cell; Hypoxia; Differentially expressed genes; RNA sequencing

Fund program: Science and Technology Research Project of Henan Province (192102310075); Provincial and Ministry Co-construction Project of Medical Science and Technology in Henan Province (SBJ2018080); Health Science and Technology Talents Overseas Training Project of Henan Province (HWYX2019131)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201127-00799

持续的视网膜缺血、缺氧会造成组织细胞损伤,引起细胞凋亡或坏死,进而导致糖尿病视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞和早产儿视网膜病变等疾病的发生和发展,造成严重的视力损害^[1]。研究表明,缺氧能够

引起视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞以及视网膜血管功能的紊乱,在缺氧环境中 RPE 细胞会持续表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[2-4],促使视网膜及脉

络膜微血管内皮细胞不断分裂增生,形成异常新生血管,继而引起视力的不可逆损害。因此,减缓甚至阻止视网膜缺血缺氧进程变得尤为重要。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factors-1 α , HIF-1 α)是一种重要的核转录调节因子,在缺氧条件下被激活,并诱导包括 VEGF 在内的多种基因产物的表达^[5]。RPE 细胞位于神经视网膜外的色素细胞层,与上层视网膜感光细胞和下层脉络膜紧密相连并滋养视网膜感光细胞,在缺血或低氧状态下极易受到影响并造成损伤^[2,6-7]。深入探讨低氧诱导 RPE 细胞损伤的分子机制有助于相关疾病的早期防治,改善患者预后。转录组测序技术又称 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq),具有高通量、全方位、快速获取转录本的特点^[8-9]。用于定量基因在细胞、组织、器官乃至整个机体中的表达异质性,在破译基因组结构和功能、识别细胞生物系统下的遗传网络、建立应对疾病、病原体的分子生物标志物等方面发挥着重要作用^[10-12]。生物信息学技术是采用计算机技术结合信息论方法对蛋白质、核酸信息进行采集、存储、传递以及分析的学科,通过数据库建设、序列分析、结构分析与功能预测、大规模功能表达谱分析、代谢网络建模分析等,整合数据量巨大的核酸、蛋白质信息,使之成为具有明确生物学意义的生物信息^[13-14]。本实验拟通过 RNA-seq 及生物信息学技术分析低氧与常氧处理下的 ARPE-19 细胞基因表达谱变化,探讨低氧诱导的 RPE 细胞损伤发生和发展可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ARPE-19 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(11011-8611,浙江天杭生物科技股份有限公司);DMEM-F12 培养基、胰蛋白酶-EDTA 溶液(北京索莱宝科技有限公司);Trizol[®] 试剂(美国 Thermo Fisher 公司);逆转录试剂盒 PrimeScript[™] RT reagent kit with gDNA Eraser、实时荧光定量 PCR 试剂盒 TB Green[®] premix Ex Taq[™] II 试剂(日本 Takara Biotechnology 公司);实时荧光定量 PCR 引物(上海生物工程股份有限公司);细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司)。细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);Stepone Plus 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将保存于液氮中的 ARPE-19 细胞置于 37 ℃ 恒温水浴锅中解冻复苏,待细胞融化后快速转移至含体积分数 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基 15 ml 的离心管中混匀,室温下 156 \times g 离心 5 min,弃上清,用 1 ml 培养基悬浮细胞沉淀,吹打均匀后将细胞置于 25 cm² 细胞培养瓶中,每瓶中加入 3~4 ml 培养基进行培养。待 ARPE-19 细胞密度达到 80%~90% 进行传代培养,弃去培养基,使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 2 次。每瓶加入 1 ml 质量分数 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化液,放入细胞培养箱消化 2 min 取出。每瓶加入 1 ml DMEM-F12 培养基终止胰蛋白酶消化,转移至 15 ml 离心管,156 \times g 离心 5 min,弃上清液。加入 DMEM-F12 培养基吹匀,进行细胞计数,以 2 \times 10⁷/皿细胞的密度将 ARPE-19 细胞接种至直径 10 cm 培养皿中,并置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育,待细胞贴壁生长后将细胞分为常氧对照组和低氧处理组,分别置于体积分数 21% 和 1% O₂ 的三气培养箱中继续培养 8、24、48 和 72 h,收集细胞,以进行后续实验。

1.2.2 RNA-seq 及生物信息学分析 低氧处理组与常氧对照组各设 6 个细胞生物学重复样本,于处理后 8 h 和 24 h 各组各收集 3 个细胞样本,使用 2 ml/皿 Trizol[®] 试剂进行处理,每个样品取 1 ml 送至武汉华大医学检验所提取总 RNA,通过 Fragment Analyzer 进行浓度和质量检测,质量合格的 RNA 使用 BGISEQ-500 平台进行 RNA-seq,测序长度为 SE50,绝大多数转录本被完整覆盖,同时 reads 均匀分布在转录本的各个区域。原始数据(raw reads)以 FASTQ 格式记录,经 Trimmomatic 软件过滤掉包含接头的 reads(接头污染)、未知碱基 N 含量大于 5% 的 reads(N 表示无法确定的碱基信息)、低质量 reads(质量值 Q<10 的碱基数占整个 reads 总碱基的比例大于 20% 以上的 reads),得到高质量 clean reads,以保证结果的可靠性。使用 HISAT 将 clean reads 比对到参考基因组序列,使用 Bowtie2 将 clean reads 比对到参考基因序列,使用标准化算法 FPKM (fragments per kilo-base per million mapped fragments),即每百万个片段中比对上某转录本每千碱基长度的片段数目作为基因表达水平的衡量指标。本研究将 $|\log_2 FC| \geq 1$ 、 $P \leq 0.05$ 的基因作为筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的标准,对 DEGs 进行生物信息学分析。用火山图描绘低氧刺激 ARPE-19 细胞 8 h 和 24 h 后 DEGs 的分布情况。使用 R 语言中的 pheatmap 包对 DEGs 进行基

因间与样本间的聚类热图分析。每列代表 1 个样品, 每行代表 1 个转录本, 颜色越红表达量越高, 颜色越绿表达量越低。采用 Dr. TOM 系统对 DEGs 进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能注释分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 筛选出参与调控低氧反应的信号通路, 采用 String 数据库和 Cytoscape 软件构建 ARPE-19 细胞处理 24 h 后 DEGs 的蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络图, 寻找参与低氧反应的功能性靶基因。连线代表基因间的调控关系。颜色越亮、图标越大代表该基因在网络中与其他基因关系越密切, 功能越重要。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测与低氧相关基因的 mRNA 表达水平 将 1.2.1 中收集的 ARPE-19 细胞使用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 经 Thermo SPECTRONIC 200 分光光度计检测其浓度和吸光度 (A) 值。采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 定量 VEGF、HIF-1 α mRNA 表达量, 预实验以对低氧刺激较为敏感的 VEGF 和 HIF-1 α 在 mRNA 水平上发生的变化为条件筛选合适时间点进行 RNA-seq。根据预实验中不同时间点 mRNA 表达量的差异结果并结合相关文献报道^[4, 15-16], 选择 mRNA 表达差异较大的 8 h、24 h 这 2 个时间点, 收集样本后进行 RNA-seq。根据测序结果和文献报道, 筛选 DEGs 中可能与低氧相关的 9 个基因 *DEPPI*、*NPPB*、*PDZKI*、*HILPDA*、*TCEA3*、*NDRG1*、*RORC*、*TFRC* 和 *NQO1*, 验证高通量测序结果的准确性。设计 9 个基因的正向引物和反向引物 (表 1), 以 β -actin 为内参基因。使用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应; 用于定量的反应体系包括 TB Green[®] Premix Ex Taq II 10.0 μ l, ROX reference Dye 0.4 μ l, 正向引物和反向引物各 2.0 μ l, cDNA 模板 5.6 μ l, 共 20.0 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火, 延伸 30 s, 40 个循环; 同一样品设置 3 个重复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各个基因的 mRNA 相对表达水平。

1.2.4 细胞活性荧光染色检测低氧环境下细胞生存状态 取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种至 24 孔细胞培养板中, 每孔 2×10^4 个细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1% O₂ 培养箱孵育 8、24、48、72 h 后, 弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 使用细胞活力检测试剂盒按照说明书向孔内加入检测试剂进行染色, 使用 ImageJ 软件分析及荧光显微镜成像观察低氧处理后不同时间点细胞的生存状态。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。本研究中计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 mean \pm SD 表示。常氧对照组与低氧处理组不同时间点 VEGF、HIF-1 α 和 DEGs mRNA 相对表达量的比较采用独立样本 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个组不同时间点 ARPE-19 细胞中 VEGF、HIF-1 α mRNA 相对表达量比较

低氧处理组 8、24、48、72 h VEGF 和低氧处理组 8、24、48 h HIF-1 α mRNA 相对表达量均高于常氧对照组, 差异均有统计学意义 (均 P<0.05); 2 个组 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 相对表达量在 24 h 时差异最大, 其次是 8 h (表 2)。本实验选择 8 h、24 h 作为低氧处理时间, 处理后收集样本进行 RNA-seq。

表 1 2 个组 DEGs 引物序列
Table 1 Primer sequence of DEGs in the two groups

基因	NM. 序列号	引物序列 (5'-3')	log ₂ FC
<i>DEPPI</i>	NM_145980.2	正向: GTGAGTCTATATCTCGACTGGC 反向: ACTGAAACGTCCGGTGTATGT	1.574 349
<i>NPPB</i>	NM_008726.6	正向: TGGAAACGTCCGGGTTACAG 反向: CTGATCCGGTCCATCTTCCT	1.419 870
<i>PDZKI</i>	NM_002614.4	正向: CATGATCCTGACCGTCGGAAA 反向: TGCTCACTGGACCTGAAACTG	1.452 112
<i>HILPDA</i>	NM_001193365.1	正向: AAGCATGTGTTGAACCTCTACC 反向: TGTGTGGCTAGTTGGCTTCT	1.397 986
<i>NDRG1</i>	NM_001135242.2	正向: CTCCTGCAAGAGTTTGTATGTCC 反向: FCATGCCGATGTCATGGTAGG	1.260 060
<i>RORC</i>	NM_005060.4	正向: CTGGCATGTCCCGAGATG 反向: GAGGGTCTTGACCACTGG	1.836 842
<i>TCEA3</i>	NM_003196.3	正向: CCCCAAAACACCTAGCAGC 反向: CTTTATGTCCTGCTCTTGAG	1.230 815
<i>TFRC</i>	NM_011638.4	正向: GGCTACTTGGGCTATTGTAAAGG 反向: CAGTTTCTCCGACAACCTTTCTCT	-2.138 634
<i>NQO1</i>	NM_000903.3	正向: GAAGAGCACTGATCGTACTGGC 反向: GGATACTGAAAGTCCGACGGG	-1.101 194

注: DEGs: 差异表达基因; FC: 倍数变化
Note: DEGs: differentially expressed genes; FC: fold change

表 2 2 个组 ARPE-19 细胞处理后不同时间点 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 相对表达量的比较 (mean \pm SD)

Table 2 Comparison of the relative mRNA expression levels of VEGF and HIF-1 α in ARPE-19 cells after treatment at different time points between the two groups (mean \pm SD)

组别	样本量	不同时间点 VEGF mRNA 相对表达量			
		8 h	24 h	48 h	72 h
常氧对照组	3	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.08
低氧处理组	3	2.06 \pm 0.07	2.49 \pm 0.10	1.47 \pm 0.09	1.29 \pm 0.10
<i>t</i> 值		11.72	17.51	5.64	3.85
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	0.02

组别	样本量	不同时间点 HIF-1 α mRNA 相对表达量			
		8 h	24 h	48 h	72 h
常氧对照组	3	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.05
低氧处理组	3	1.96 \pm 0.15	2.00 \pm 0.07	1.53 \pm 0.13	1.20 \pm 0.11
<i>t</i> 值		8.74	9.93	6.55	2.70
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

注:(独立样本 *t* 检验) VEGF:血管内皮生长因子;HIF-1 α :低氧诱导因子-1 α
 Note:(Independent-samples *t* test) VEGF:vascular endothelial growth factor;HIF-1 α :hypoxia-inducible factors-1 α

2.2 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后样品测序数据

常氧、低氧处理 ARPE-19 细胞 8 h、24 h 后测序共得到 12 组转录组数据,原始数据过滤掉测序接头序列、未知碱基序列、低质量序列后得到高质量测序数据 clean reads(表 3)。

表 3 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后样品测序数据过滤后的 reads 质量统计

Table 3 Quality statistics of filtered reads from the sequencing data after 8-hour and 24-hour treatment of ARPE-19 cells in the two groups

样本名称	过滤后 reads		
	reads 数目 (M)	Q20 (%)	Q30 (%)
8 h 常氧组 1	22.84	98.78	95.18
8 h 常氧组 2	22.84	98.73	95.01
8 h 常氧组 3	22.84	98.78	95.32
8 h 低氧组 1	22.88	98.86	95.49
8 h 低氧组 2	22.82	98.76	95.15
8 h 低氧组 3	22.87	98.75	95.14
24 h 常氧组 1	25.12	98.00	93.95
24 h 常氧组 2	25.95	97.69	93.17
24 h 常氧组 3	25.95	97.90	93.76
24 h 低氧组 1	25.95	97.84	93.61
24 h 低氧组 2	23.93	97.80	93.55
24 h 低氧组 3	25.94	97.79	93.44

注:Q20 为过滤后质量不低于 20 的碱基比例,Q30 为过滤后质量不低于 30 的碱基比例

Note:Q20 was the ratio of bases with a quality of no less than 20 after filtration, and Q30 was the ratio of bases with a quality of no less than 30 after filtration

2.3 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs 分析

低氧处理 8 h 和 24 h 后显著 DEGs 中有 9 个相同基因(图 1)。低氧刺激 ARPE-19 细胞 8 h 和 24 h 后 DEGs 的分布情况见图 2。低氧处理 8 h,低氧处理组与常氧对照组间相比共筛选出 62 个 DEGs,其中显著上调基因 45 个,显著下调基因 17 个。低氧处理 24 h,2 个组间共筛选出 255 个显著 DEGs,其中显著上调基因 228 个,显著下调基因 27 个。

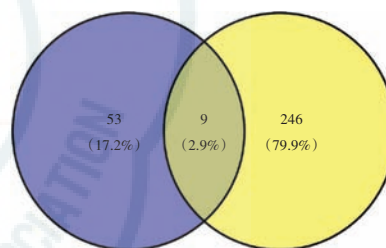


图 1 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs Venn 图 紫色表示处理 8 h 后显著 DEGs 的基因个数;黄色表示处理 24 h 后显著 DEGs 的基因个数;灰色表示处理 8 h 和 24 h 显著 DEGs 中相同的基因个数

Figure 1 Venn diagram of DEGs in ARPE-19 cells after 8-hour and 24-hour hypoxia treatment between the two groups The color purple represented the number of significantly differentially expressed genes after 8-hour treatment; the color yellow represented the number of significantly differentially expressed genes after 24-hour treatment; the color gray represented the number of identical significantly differentially expressed genes between 8-hour and 24-hour treatment

2.4 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs 的聚类热图分析

每组 3 个生物学样本重复性较好,同组样本间具有较高的相关性,2 个组各时间点在整个基因表达方面存在明显差异(图 3)。

2.5 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs 的 GO 功能注释分析

低氧处理 8 h 后 2 个组 DEGs 没有显著富集 GO 功能进程,处理 24 h 后 2 个组 DEGs 经过 GO 功能富集分析在 25 个生物学进程条目、17 个细胞组分条目、11 个分子功能条目($P \leq 0.05$)。对所有 DEGs 进行 GO 功能注释,结果显示在生物学过程中前 20 个富集的条目功能主要为蛋白质降解、核苷酸生物合

成、超氧化物自由基清除、肌动蛋白纤维及物质转运等进程;在分子功能中,整合与催化活性条目富集程度最高;在细胞组分本体中,细胞条目富集程度最高(图 4)。

2.6 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示,低氧处理 8 h 后 2 个组间 DEGs 没有 KEGG 显著富集通路,处理 24 h 后 2 个组间 DEGs 筛选出 17 条 KEGG 显著富集通路 ($P \leq 0.05$),主要富集在 PI3K-Akt、cGMP-PKG 信号通路以及其他与代谢、细胞周期、细胞生长和细胞凋亡、铁死亡密切相关的信号通路(图 5)。

2.7 2 个组 ARPE-19 细胞处理 24 h 后 DEGs 的 PPI

网络分析

低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后筛选到的 DEGs 通过 String 平台得到关键基因 *HPCA*、*MT3* 和 *NOS3*,所对应的靶蛋白海马素钙结合蛋白(hippocalcin, HPCA)、金属硫蛋白 3(metallothionein, MT3)、一氧化氮合酶 3(nitric oxide synthase, NOS3)可能是网络中最重要靶点蛋白(图 6)。

2.8 低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后与低氧相关的 DEGs 的验证

低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后, *DEPPI*、*NPPB*、*PDZK1*、*HILPDA*、*TCEA3*、*NDRG1* 和 *RORC* 的 mRNA 表达水平显著上调, *TFRC*、*NQO1* 的 mRNA 表达水平显著下调(表 4),与测序结果变化一致。

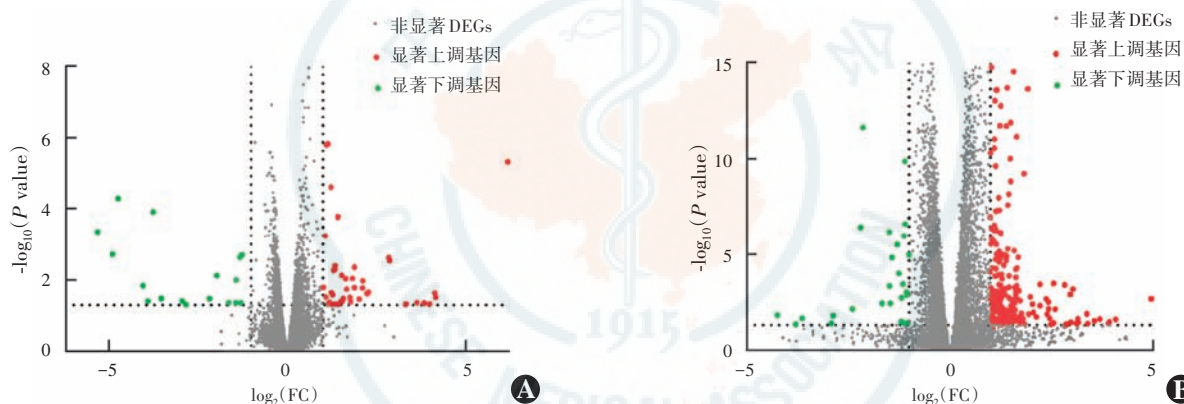


图 2 2 个组 ARPE-19 细胞处理 8 h、24 h 后 DEGs 火山图 A:低氧处理 8 h DEGs 火山图 B:低氧处理 24 h DEGs 火山图 FC:倍数变化;DEGs:差异表达基因

Figure 2 Volcano plot of DEGs in ARPE-19 cells after 8-hour and 24-hour hypoxia treatment between the two groups A:Volcano plot of DEGs after 8-hour hypoxia treatment B:Volcano plot of DEGs after 24-hour hypoxia treatment FC:fold change;DEGs:differentially expressed genes

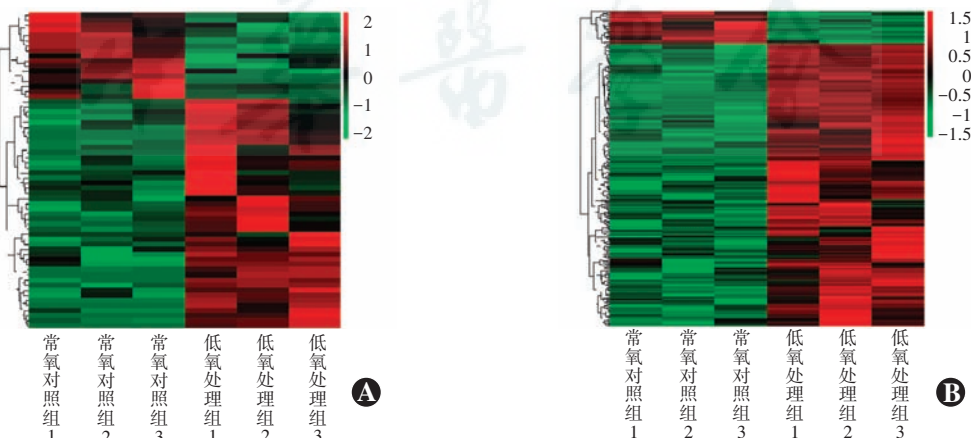


图 3 2 个组 ARPE-19 细胞低氧处理 8 h、24 h 后 DEGs 聚类热图分析 每列代表 1 个样品,每行代表 1 个转录本,颜色越红则表达量越高,颜色越绿则表达量越低,2 个组在整体基因表达方面存在明显差异 A:低氧处理 8 h DEGs 聚类热图 B:低氧处理 24 h DEGs 聚类热图

Figure 3 Cluster heat map of DEGs in ARPE-19 cells after 8-hour and 24-hour treatment between the two groups Each column represented a sample, and each row represented a transcript. Deeper red color represented higher expression level, and deeper green color meant lower expression level. There were significant differences in overall gene expression between the two groups A:Cluster heat map of DEGs after 8-hour hypoxia treatment B:Cluster heat map of DEGs after 24-hour hypoxia treatment

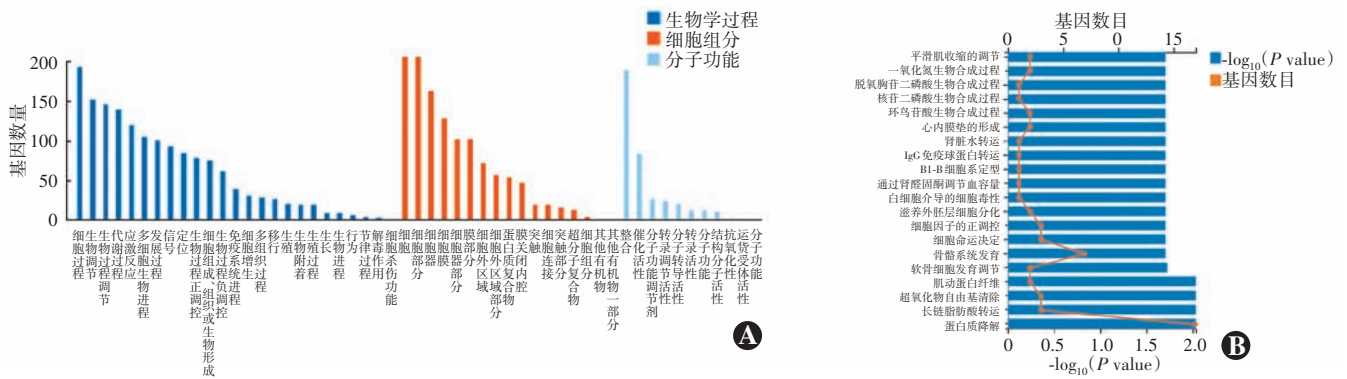


图 4 2 个组 ARPE-19 细胞处理 24 h 后 DEGs 的 GO 功能富集分析图 柱状图代表显著富集的 GO 条目 ($P \leq 0.05$), 折线代表该条目包含的基因个数 A: GO 功能分析 B: GO 生物学进程分析

Figure 4 GO functional enrichment analysis of DEGs in ARPE-19 cells after 24-hour treatment between the two groups Histogram represented the enriched GO terms ($P \leq 0.05$), and the broken line represented the number of genes contained in the entry A: GO function analysis B: GO biological process analysis

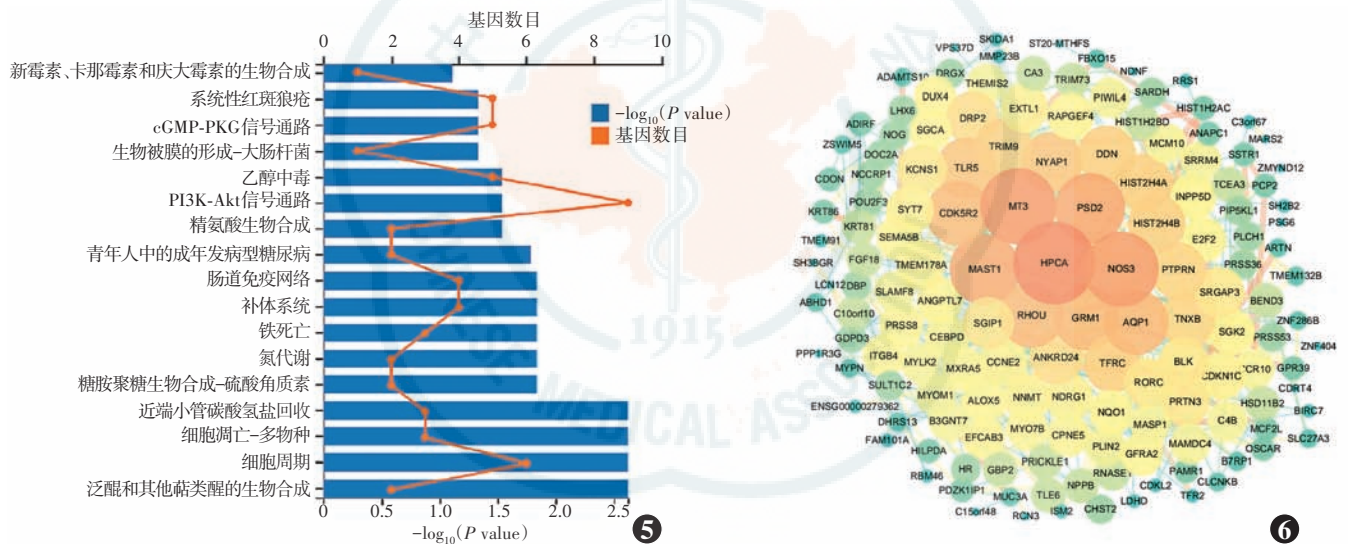


图 5 2 个组 ARPE-19 细胞处理 24 h 后 DEGs 的 KEGG 通路富集分析 柱状图为显著富集的 KEGG 通路条目 ($P \leq 0.05$); 折线图为富集 KEGG 通路靶基因个数 图 6 低氧处理 ARPE-19 细胞 24 h 后 DEGs 的 PPI 网络图 网络图中的连线代表基因间的调控关系, 颜色越亮、图标越大代表该基因在网络中与其他基因关系越密切, 功能越重要

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis of DEGs in ARPE-19 cells after 24-hour treatment The histogram represented the significantly enriched KEGG pathway terms ($P \leq 0.05$), and the line graph pictured the number of target genes enriched in KEGG pathway

Figure 6 The PPI network of DEGs in ARPE-19 cells after 24-hour hypoxia treatment The lines in the network diagram represented the regulatory relationship between genes. Brighter color and larger icon meant that the gene was more closely related to other genes in the network and its function was more important

表 4 2 个组 ARPE-19 细胞处理 24 h 后 DEGs mRNA 相对表达量的比较 (mean±SD)
Table 4 Comparison of relative mRNA expression levels of DEGs in ARPE-19 cells after 24-hour treatment between the two groups (mean±SD)

组别	样本量	各基因 mRNA 相对表达量								
		DEPPI	NPPB	PDZK1	HILPDA	NDRG1	TCEA3	RORC	TFRC	NQO1
常氧对照组	3	1.00±0.07	1.00±0.21	1.00±0.30	1.00±0.06	1.00±0.19	1.00±0.04	1.00±0.17	1.00±0.13	1.00±0.10
低氧处理组	3	7.95±0.45	4.05±0.32	2.97±0.27	2.36±0.33	1.79±0.03	1.53±0.20	4.13±0.59	0.29±0.01	0.27±0.03
t 值		26.19	13.51	8.39	6.95	7.15	4.42	8.84	9.13	7.62
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 t 检验) DEGs: 差异表达基因
Note: (Independent-samples t test) DEGs: differentially expressed genes

2.9 低氧处理 ARPE-19 细胞不同时间点活性荧光染色细胞状态变化

低氧处理 ARPE-19 细胞 8 h、24 h 后,细胞形态均正常,生长状态较好,未出现死亡细胞,低氧处理 48 h 后 ARPE-19 细胞出现死亡,低氧处理 72 h 后死亡细胞数量增加(图 7)。

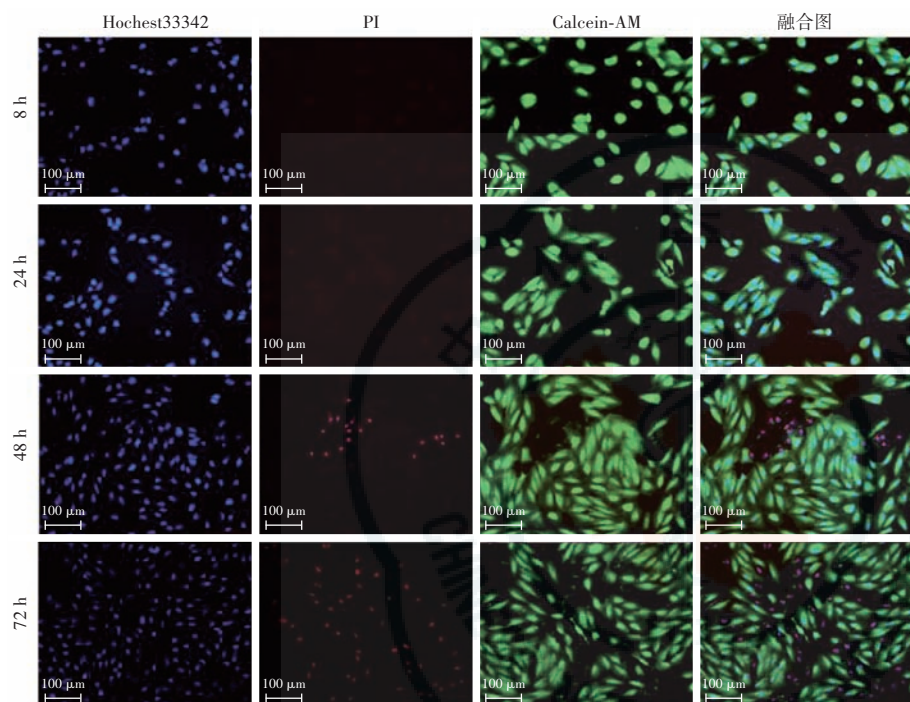


图 7 低氧诱导后不同时间点 ARPE-19 细胞活性荧光染色($\times 200$, 标尺 = 100 μm) 8 h、24 h 时,细胞无死亡;48 h 后细胞出现死亡;72 h 后死亡细胞数量显著增加 蓝色荧光为 Hochest33342 标记细胞核;红色荧光为 PI 标记已破膜的死细胞;绿色荧光为 Calcein-AM 标记具有细胞活性的细胞

Figure 7 Fluorescent staining of ARPE-19 cells at different time points after hypoxia induction ($\times 200$, bar = 100 μm) No cell death at 8 hours and 24 hours after hypoxia treatment; cell death occurred at 48 hours of hypoxia treatment; the number of dead cells was significantly increased after 72 hours of hypoxia treatment Nuclei showed blue fluorescence by Hochest33342 staining; the dead cells with broken membranes presented red fluorescence by PI staining; the cells with activity displayed green fluorescence by Calcein-AM staining

3 讨论

缺血、缺氧影响视网膜疾病的发生和发展,是许多眼病共同的病理特征^[17-18]。在细胞水平上,缺血、缺氧诱导的视网膜损伤包括线粒体酶活性降低、钙稳态损伤、能量衰竭和缺氧引起的氧化应激^[1]。因此,针对低氧诱导细胞损伤的研究对于恢复正常的视网膜环境、干预和防止视网膜不可逆损伤至关重要。本实验采用 RNA-seq 和生物信息学分析方法研究低氧诱导的 ARPE-19 细胞损伤的分子机制,为研究缺血、缺氧性视网膜疾病的病理过程提供实验依据。

近年来随着 RNA-seq 的迅速发展,其被广泛地应用于基因表达及调控的研究中^[19-20]。本研究发现,

cGMP-PKG 信号通路在低氧条件下参与细胞活化及抗氧化反应,对细胞起到保护作用。研究表明,NO-cGMP-PKG 通路的激活被认为是抑制细胞凋亡的重要途径^[21];PI3K-Akt 是 HIF-1 α 的主要上游调控因子之一,在低氧损伤进程中发挥了关键作用^[22]。低氧环境下,PI3K-Akt 信号通路被激活,通过活化生存相关的

蛋白和失活凋亡相关的蛋白调节 HIF-1 α 的表达来发挥功能^[23-24], HIF-1 α 又可进一步调控下游 VEGF 变化,促进缺血适应^[4,25]。研究表明,通过 PI3K/Akt 通路可减弱氧化应激诱导的细胞损伤^[26]。VEGF 是一种重要的生长因子,与细胞和新生血管生长密切相关^[3]。HIF-1 α 作为适应缺氧反应的主要转录调节因子,缺氧条件下其表达量升高,能够激活多个基因的转录、增加蛋白产物氧输送、促进代谢进程以适应低氧环境。HIF-1 α 和 VEGF 均为 PI3K-Akt 低氧相关信号通路的下游因子^[23],低氧可激活 PI3K-Akt 通路,VEGF 和 HIF-1 α mRNA 高表达是低氧诱导细胞损伤模型建立的关键指标。

本研究进行 PPI 网络分析发现了处于核心位置的关键基因 *HPCA*、*MT3* 和 *NOS3*,其中 *HPCA* 基因编码的蛋白质是视网膜和大脑中发现的神经元特异性钙结合蛋白家族成员,在光感受器细胞中以钙敏感方式调节光信号转导。

而低氧环境下,细胞内的钙稳态极易被破坏,因此 *HPCA* 基因的表达易受缺氧的影响^[27]; *MT3* 基因在缺氧环境中易被诱导而表达升高,参与细胞抗氧化应激和凋亡,该基因表达的蛋白可保护细胞免受低氧损伤^[28]; *NOS3* 基因主要参与精氨酸和脯氨酸的代谢及氧化应激,可以促进 NO 的产生,通过 cGMP 介导的信号转导通路参与血管平滑肌松弛过程,在缺血、缺氧时,通过调节活性氮与活性氧来减少细胞因缺血受到的损伤^[29]。这些基因的功能主要与应对氧化应激相关。

本研究中低氧处理 8 h 与 24 h 测序重合的 9 个基因中,除 *TFRC*、*RORC* 基因可能参与低氧反应,其余基因有关低氧方面的研究较少,与低氧诱导细胞损伤、代谢进程等无明显直接关系,因此本研究中选择可能与

低氧相关的基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 实验结果与测序结果一致。其中黄体酮诱导的蜕膜蛋白由 *DEPPI* 基因编码, 参与低氧反应与自噬等细胞途径的激活, 其表达受氧化应激调控^[30]; *RORC* 基因可有效抑制 HIF-1 α 的活性, 并调控其转录表达, 抑制肿瘤细胞的增生^[31]; *NDRG1* 在缺氧条件下表达明显上调, 在调节细胞分化、增生、凋亡、血管生成、肿瘤进展方面发挥重要作用^[32]; *HILPDA* 是一种与缺氧诱导脂滴形成相关的基因, 参与肝细胞、脂肪细胞、巨噬细胞以及肿瘤细胞等脂质代谢进程^[33]; *NPPB*、*PDZK1* 和 *TCEA3* 也多参与代谢、细胞的生长与分化等进程。 *TFRC* 是参与铁代谢的关键因子^[34], 参与铁死亡过程, 低氧环境下 *TFRC* mRNA 的表达受 HIF-1 α 的调节。因此进一步研究铁死亡信号通路在低氧诱导细胞损伤中的作用, 将成为我们后续研究的重点之一。

本实验不仅在分子水平上进行验证, 还对低氧处理后 ARPE-19 细胞状态的变化进行表型研究。本实验推测, 24~48 h 的细胞可能处于对数生长期, 此时细胞增生较多, 密度增加; 随着缺氧时间的延长, 细胞活力逐渐下降, 至 48 h 出现细胞死亡, 此时细胞增生能力也逐渐降低, 细胞密度缓慢增加。本实验方案起始状态细胞密度为 2×10^4 个/孔, 相对较少。随着观察时间的延长, 细胞会有不同程度的增生。此时会出现细胞活性减弱, 密度增加的现象。

本研究方法学的局限性: (1) 缺血、缺氧性视网膜疾病发病机制复杂, 体外细胞实验的培养环境及培养条件不能完全模拟体内缺氧情况, 还需通过动物实验进一步验证; (2) 采用生物信息学方法分析低氧相关基因及信号通路的改变, 但未对这些基因及信号通路做更深入的研究, 仍需要进一步实验探索。

综上所述, 本研究推测 cGMP-PKG、PI3K-Akt、细胞凋亡、铁死亡信号通路参与了 ARPE-19 细胞的低氧反应, *DEPPI*、*NPPB*、*PDZK1*、*HILDA*、*TCEA3*、*NDRG1*、*RORC*、*TFRC* 和 *NQO1* 基因可能在 ARPE-19 细胞应对低氧损伤中起到关键作用。 *HPCA*、*MT3* 和 *NOS3* 基因可作为研究缺血、缺氧相关眼底病的潜在功能性靶基因。这些通路及基因与缺氧诱导的细胞损伤有一定相关性, 在视网膜缺血、缺氧疾病的病理过程中发挥重要作用, 有望成为治疗缺血、缺氧性视网膜疾病的新靶点。

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] Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, et al. Retinal ischemia: mechanisms

- of damage and potential therapeutic strategies[J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1): 91-147. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2003. 12. 001.
- [2] 雷祥, 粟占荣, 范珂. 丹参酮 II A 对缺氧状态下视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(5): 342-347. DOI: 10. 37 60/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 05. 005.
- Lei X, Li ZR, Fan K. Inhibitory effect of Tanshinone II A on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells in hypoxia and its mechanism[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(5): 342-347. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 05. 005.
- [3] Bahrami B, Shen W, Zhu L, et al. Effects of VEGF inhibitors on human retinal pigment epithelium under high glucose and hypoxia[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2019, 47(8): 1074-1081. DOI: 10. 1111/ceo. 13579.
- [4] Arjamaa O, Aaltonen V, Piippo N, et al. Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255(9): 1757-1762. DOI: 10. 1007/s00417-017-3711-0.
- [5] Kurihara T, Westenskow PD, Friedlander M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 801: 275-281. DOI: 10. 1007/978-1-4614-3209-8_35.
- [6] Caceres PS, Rodriguez-Boulan E. Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases [J]. Curr Opin Cell Biol, 2020, 62: 37-45. DOI: 10. 1016/j. ceb. 2019. 08. 001.
- [7] Li KR, Zhang ZQ, Yao J, et al. Ginsenoside Rg-1 protects retinal pigment epithelium (RPE) cells from cobalt chloride (CoCl₂) and hypoxia assaults [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(12): e84171 [2020-11-05]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/24386346. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0084171.
- [8] Hong M, Tao S, Zhang L, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research [J/OL]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 166 [2020-11-05]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33276803. DOI: 10. 1186/s13045-020-01005-x.
- [9] 刘丽芳, 曾锦惠, 黄楚开, 等. RNA 测序法比较 POAG 与非 POAG 供体眼球小梁网基因表达的差异 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(8): 646-652. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20191018-00451.
- Liu LF, Zeng JH, Huang CK, et al. Differential gene expression profiles of trabecular meshwork between POAG and non-POAG donated eyes by using RNA-sequencing [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(8): 646-652. DOI: 10. 37 60/cma. j. cn115989-20191018-00451.
- [10] Marco-Puche G, Lois S, Benítez J, et al. RNA-seq perspectives to improve clinical diagnosis [J/OL]. Front Genet, 2019, 10: 1152 [2020-11-10]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/31781178. DOI: 10. 3389/fgene. 2019. 01152.
- [11] Low TY, Mohtar MA, Ang MY, et al. Connecting proteomics to next-generation sequencing: proteogenomics and its current applications in biology [J/OL]. Proteomics, 2019, 19(10): e1800235 [2020-11-10]. http://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/30431238. DOI: 10. 1002/pmic. 201800235.
- [12] Wang C, Liu H, Yang M, et al. RNA-seq based transcriptome analysis of endothelial differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2020, 59(5): 834-842. DOI: 10. 1016/j. ejvs. 2019. 11. 003.
- [13] 刘亚文, 张红燕, 阳灵燕. 共词分析国内外生物信息学领域研究态势 [J]. 生物信息学, 2020, 18(3): 186-194. DOI: 10. 12113/201911001.
- Liu YW, Zhang HY, Yang LY. Research situation analysis of domestic and international bioinformatics based on co-word analysis [J]. Chin J Bioin, 2020, 18(3): 186-194. DOI: 10. 12113/201911001.
- [14] Lo Giudice C, Hernández I, Ceci LR, et al. RNA editing in plants: a comprehensive survey of bioinformatics tools and databases [J]. Plant Physiol Biochem, 2019, 137: 53-61. DOI: 10. 1016/j. plaphy. 2019. 02. 001.
- [15] Wu J, Ke X, Ma N, et al. Formononetin, an active compound of Astragalus

- membranaceous (Fisch) Bunge, inhibits hypoxia-induced retinal neovascularization via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10 : 3071-3081. DOI: 10. 2147/DDDT. S114022.
- [16] 朱婷芳,管峰,苗亮,等.大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)单核巨噬细胞低氧胁迫比较转录组学分析[J].海洋与湖沼,2020,51(2):335-344. DOI:10.11693/hyh20191100223.
- Zhu TF, Guan F, Miao L, et al. Comparative transcriptome analysis of mo/m ϕ in response to low oxygen stress in mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2020, 51 (2) : 335-344. DOI:10.11693/hyh20191100223.
- [17] Hardy P, Beauchamp M, Sennlaub F, et al. New insights into the retinal circulation; inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005, 72 (5) : 301-325. DOI:10.1016/j.plefa.2005.02.004.
- [18] 李艳荣,辛晓蓉.黄芪复方对急性低压缺氧大鼠视网膜 DNA 损伤的防护作用[J].中华实验眼科杂志,2021,39(1):7-12. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190903-00380.
- Li YR, Xin XR. Protective effect of *Radix Astragali seu Hedysari* compound on rat retinal DNA damage induced by acute hypobaric hypoxia [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39 (1) : 7-12. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190903-00380.
- [19] Xiang Y, Sun Y, Yang B, et al. Transcriptome sequencing of adenomyosis eutopic endometrium; a new insight into its pathophysiology [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (12) : 8381-8391. DOI:10.1111/jcmm.14718.
- [20] Bai DP, Lin XY, Wu Y, et al. Isolation of blue-green eggshell pigmentation-related genes from Putian duck through RNA-seq [J/OL]. BMC Genomics, 2019, 20 (1) : 66 [2020-11-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30660177>. DOI: 10.1186/s12864-019-5436-4.
- [21] Behera J, Nagarajan S, Saran U, et al. Nitric oxide restores peripheral blood mononuclear cell adhesion against hypoxia via NO-cGMP signalling [J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38 (3) : 319-329. DOI:10.1002/cbf.3502.
- [22] Rosen R, Vagaggini T, Chen Y, et al. Zeaxanthin inhibits hypoxia-induced VEGF secretion by RPE cells through decreased protein levels of hypoxia-inducible factors-1 α [J/OL]. Biomed Res Int, 2015 (3) : 687386 [2020-11-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25688362/>. DOI:10.1155/2015/687386.
- [23] Zhang J, Xu J, Dong Y, et al. Down-regulation of HIF-1 α inhibits the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer by inhibiting PI3K/AKT pathway and VEGF expression [J/OL]. Biosci Rep, 2018, 38 (6) : BSR20180741 [2020-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29899167>. DOI:10.1042/BSR20180741.
- [24] 顾霞,赵敏,王平义,等.低氧诱导因子 1 α 与低氧相关疾病信号通路的关系[J].中国组织工程研究,2021,25(8):1284-1289.
- Gu X, Zhao M, Wang PY, et al. Relationship between hypoxia inducible factor 1 alpha and hypoxia signaling pathway [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25 (8) : 1284-1289.
- [25] Zhang Z, Yao L, Yang J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (review) [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(4):3547-3554. DOI:10.3892/mmr.2018.9375.
- [26] Radwan RR, Karam HM. Resveratrol attenuates intestinal injury in irradiated rats via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Environ Toxicol, 2020, 35 (2) : 223-230. DOI:10.1002/tox.22859.
- [27] Bastianelli E, Takamatsu K, Okazaki K, et al. Hippocalcin in rat retina. comparison with calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin [J]. Exp Eye Res, 1995, 60 (3) : 257-266. DOI: 10.1016/s0014-4835 (05) 80108-3.
- [28] Wang B, Wood IS, Trayhurn P. PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368 (1) : 88-93. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.01.036.
- [29] Baker JE. Oxidative stress and adaptation of the infant heart to hypoxia and ischemia [J]. Antioxid Redox Signal, 2004, 6 (2) : 423-429. DOI: 10.1089/152308604322899495.
- [30] Stepp MW, Folz RJ, Yu J, et al. The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843 (6) : 1076-1088. DOI:10.1016/j.bbamer.2014.02.003.
- [31] 陈玮,王静,董曦.维甲酸相关孤儿核受体 C 可通过抑制糖酵解来调节宫颈癌细胞增殖[J].中国临床医学,2019,26(5):710-713. DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191298.
- Chen W, Wang J, Dong X. Retinoic-acid-related orphan nuclear receptor C regulates cervical cancer cell proliferation by inhibiting glycolysis [J]. Chin J Clin Med, 2019, 26 (5) : 710-713. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191298.
- [32] Li EY, Huang WY, Chang YC, et al. Aryl hydrocarbon receptor activates NDRG1 transcription under hypoxia in breast cancer cells [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 20808 [2020-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852918>. DOI:10.1038/srep20808.
- [33] de la Rosa Rodriguez MA, Kersten S. Regulation of lipid droplet homeostasis by hypoxia inducible lipid droplet associated HILPDA [J/OL]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020, 1865 (9) : 158738 [2020-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32417386>. DOI:10.1016/j.bbalip.2020.158738.
- [34] Basuli D, Tesfay L, Deng Z, et al. Iron addiction; a novel therapeutic target in ovarian cancer [J]. Oncogene, 2017, 36 (29) : 4089-4099. DOI:10.1038/onc.2017.11.

(收稿日期:2020-11-27 修回日期:2021-04-30)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本期英文缩略语名词解释

SMILE:飞秒激光小切口角膜基质透镜取出术 (small-incision lenticule extraction)

FS-LASIK:飞秒激光辅助准分子激光角膜原位磨镶术 (femtosecond laser-assisted laser in situ keratomileusis)

Smart:智能脉冲技术辅助的经上皮准分子激光角膜切削术 (smart pulse technology-assisted transepithelial photorefractive keratectomy)

CRT:角膜屈光矫治 (corneal refractive therapy)

LogMAR:最小分辨角对数 (logarithm of the minimum angle of resolution)

LASIK:准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)

(本刊编辑部)