

## · 实验研究 ·

## 高度近视患者房水非标记定量蛋白质组学分析

薛敏 任新军 柯屹峰 刘巨平 范小娥 李筱荣

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 天津市眼科学与视觉科学国际联合研究中心 300384

薛敏现在安徽省第二人民医院眼科,合肥 230041

通信作者:李筱荣,Email:xiaorli@163.com

**【摘要】目的** 采用定量蛋白质组学技术分析高度近视患者房水中的蛋白质组谱。**方法** 纳入 2019 年 1—8 月在天津医科大学眼科医院于白内障手术中用 1 ml 注射器采集伴或不伴高度近视的年龄相关性白内障患者房水标本各 34 例 34 眼(每例 100  $\mu$ l),分别作为高度近视白内障组和单纯白内障组。各组分别选取 16 例 16 眼房水标本,采用 BCA 法进行蛋白定量并比较,采用非标记液相色谱串联质谱分析得到 2 个组的差异表达蛋白。进一步将生物大数据用基因本体功能富集和京都基因与基因组百科全书通路富集分析差异表达蛋白的功能和信号转导通路。各组分别选取 18 例 18 眼房水标本采用酶联免疫吸附实验(ELISA)进行质谱检测结果的扩大样本量验证。**结果** 高度近视白内障组房水标本平均蛋白质量浓度为(1 134.91 $\pm$ 104.78)ng/L,明显高于单纯白内障组的(706.71 $\pm$ 85.43)ng/L,差异有统计学意义( $t=11.977, P<0.01$ )。2 个组患者房水标本中共鉴定出 463 个可定量蛋白质,其中 86 个差异表达蛋白质,包括 49 个表达上调蛋白和 37 个表达下调蛋白。这些差异表达蛋白的分类主要包括蛋白结合活性调节因子、细胞外基质蛋白、载体蛋白、细胞间信号分子、蛋白质修饰酶等,分别占 32.70%、14.50%、9.10%、9.10%和 7.30%。生物信息学分析表明,86 个差异表达蛋白主要富集在补体激活及其调节、急性炎症反应、细胞外基质组织重塑等生物学过程。其中 21 个差异表达蛋白富集于补体和凝血级联通路,15 个差异表达蛋白富集于细胞外基质-受体相互作用通路,8 个差异表达蛋白富集于 PI3K-Akt 信号通路。ELISA 结果表明,随机选取的 3 个差异表达蛋白在 2 个组之间表达变化趋势均与非标记定量蛋白质组学分析结果一致。**结论** 高度近视白内障与单纯白内障之间房水蛋白质表达谱有显著变化,高度近视与炎症和免疫相互作用以及细胞外基质的重塑密切相关。

**【关键词】** 高度近视;非标记;蛋白质组学;房水;病理机制

**基金项目:** 天津医科大学眼科医院高水平创新型人才培养基金杰出学者项目(YDYRCXM-A2018-01);安徽省卫生健康委科研基金项目(AHWJ2021b107);安徽医科大学校科研基金项目(2020xkj085)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200716-00503

**Label-free quantitative proteomic analysis of aqueous humor in patients with high myopia**

Xue Min, Ren Xinjun, Ke Yifeng, Liu Juping, Fan Xiaoe, Li Xiaorong

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin International Joint Research and Development Centre of Ophthalmology and Vision Science, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Xue Min is working at the Department of Ophthalmology of Anhui NO. 2 Provincial People's Hospital, Hefei 230041, China  
Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com.

**[Abstract] Objective** To characterize proteomic profile in aqueous humor of patients with high myopia using quantitative proteomic analysis. **Methods** Sixty-eight age-related cataract patients were divided into high myopic cataract group and simple cataract group according to that they had high myopia or not, with 34 patients (34 eyes) in each group. Aqueous humor samples (100  $\mu$ l/patient) were collected from each patient using a 1 ml tuberculin syringe during cataract surgery at Tianjin Medical University Eye Hospital from January 2019 to August 2019. Sixteen samples from each group were selected for protein quantification and comparison by BCA method. The differentially expressed proteins between the two groups were analyzed using label-free liquid chromatography tandem mass spectrometry. The function and signal transduction pathways of differentially expressed proteins were further analyzed by Gene Ontology enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Eighteen aqueous humor samples from each group were selected to verify the results of mass spectrometry by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This study protocol adhered to the Declaration of Helsinki. The use of human samples was approved by an Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. 2020KY[L]-40). Written informed consent was obtained

from each patient prior to surgery. **Results** The mean protein mass concentration of aqueous humor sample in the high myopic cataract group was  $(1\,134.91 \pm 104.78)$  ng/L, which was significantly higher than that in the simple cataract group  $(706.71 \pm 85.43)$  ng/L, showing statistically significant difference ( $t = 11.977, P < 0.01$ ). A total of 463 proteins were identified and 86 proteins were found to be differentially expressed, including 49 up-regulated proteins and 37 down-regulated proteins in the two groups. These differentially expressed proteins were mainly protein-binding activity modulator, extracellular matrix protein, carrier protein, intercellular signal molecule, protein modifying enzyme and so on, accounting for 32.70%, 14.50%, 9.10%, 9.10% and 7.30%, respectively. Bioinformatics analysis showed that 86 differentially expressed proteins were mainly related to biological processes such as complement activation and regulation, acute inflammatory response, and extracellular matrix tissue remodeling. Among them, 21 differentially expressed proteins were enriched in the complement and coagulation cascades pathways, 15 in the extracellular matrix-receptor interaction pathway, and 8 in the PI3K-Akt signaling pathway. ELISA results showed that the expression trends of three randomly selected differentially expressed proteins of the two groups were consistent with the results of label-free quantitative proteomic analysis. **Conclusions** There are significant changes in proteomic profiles of aqueous humor between the high myopia cataract patients and simple cataract patients. High myopia is closely associated with inflammation and immune interactions, and remodeling of extracellular matrix.

[Key words] High myopia; Label-free; Proteomics; Aqueous humor; Pathogenic mechanism

**Fund program:** The Outstanding Scholar Project of High Level Innovative Talent Training Foundation of Tianjin Medical University Eye Hospital (YDYRCXM-A2018-01); Scientific Research Foundation of Anhui Provincial Health Commission (AHWJ2021b107); Scientific Research Foundation of Anhui Medical University (2020xkj085)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200716-00503

高度近视是指近视屈光度  $> -6.00$  D、眼轴长度  $> 26.5$  mm 的屈光状态,随着眼轴长度的增加可导致后巩膜葡萄肿、脉络膜新生血管、脉络膜/视网膜退行性病变等并发症,从而严重影响视力,是低视力和致盲的主要原因之一<sup>[1]</sup>。据估计,到 2050 年,全球高度近视患者将达到 9.38 亿人,造成严重的经济和社会负担<sup>[2]</sup>。高度近视的确切发病机制尚未完全阐明,这也是目前仍缺乏有效防治近视措施的根本原因。近年来,蛋白质组学技术的发展为探索高度近视的病理机制提供了新的思路。非标记蛋白质组学技术是一种不依赖于同位素标记的新型蛋白质定量技术,利用液相色谱和质谱串联对蛋白质酶解肽段进行分析,比较不同样本中相应肽段的信号强度,通过解析质谱数据对相应的蛋白质进行定量鉴定,已广泛应用于疾病标志物筛选、疾病发病机制探索、新药开发等生物医学领域<sup>[3-4]</sup>。房水是一种重要的眼内液,对维持眼的正常功能有重要意义,主要参与眼组织的物质代谢及免疫反应<sup>[5]</sup>。在眼部疾病发生和发展过程中,房水中的蛋白质成分也会发生变化,并且与疾病的发病机制和/或预后有关<sup>[6-8]</sup>。探讨高度近视眼房水蛋白质组学变化能深入了解高度近视的发病机制及开展高度近视的精准防控提供重要参考,但目前关于房水蛋白质组学变化与高度近视发生和发展的关系鲜见报道。本研究利用非标记定量蛋白质组学技术测定高度近视患者房水中蛋白质组学变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源及分组** 于 2019 年 1—8 月连续收集在天津医科大学眼科医院接受超声乳化晶状体摘出联合人工晶状体植入术的 68 例 68 眼年龄相关性白内障患者的房水标本,其中合并高度近视者和单纯年龄相关性白内障者各 34 例 34 眼,分别作为高度近视白内障组和单纯白内障组。使用 rpwr 功能分析 R 软件包计算样本量,当功效水平 = 0.8、效应值 = 0.5、显著性水平 = 0.05 时,  $n = 11.92$ 。考虑到临床样本研究中可能存在较大的个体差异,将样本量扩大到每组 16 例 16 眼进行房水蛋白质谱检测分析,另取每组 18 例 18 眼采用 ELISA 法对质谱法测定数据进行验证。高度近视白内障组纳入标准:眼轴长度  $\geq 26.5$  mm,近视屈光度  $> -6.00$  D,明显豹纹样眼底改变。单纯白内障组纳入标准:眼轴长度为 22.0~24.0 mm,屈光度  $< -0.5$  D,不伴有任何眼底病变。排除标准:有眼外伤史者;有高度近视相关并发症治疗史者;有除白内障或高度近视外的其他眼病者;使用全身抗代谢药物、免疫抑制剂或糖皮质激素等者。2 个组患者性别构成比、年龄比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );眼轴长度、屈光度比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (表 1)。本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会审核批准[批文号:2020KY(L)-40]。所有患者对研究方法和目的知情并签署知情同意书。

表 1 2 个组房水标本来源患者基线特征比较  
Table 1 Comparison of demography between the two groups

组别	例数/ 眼数	性别构成比 <sup>a</sup> (男/女, n)	年龄 <sup>b</sup> (mean±SD, 岁)	眼轴长度 <sup>b</sup> (mean±SD, mm)	屈光度 <sup>b</sup> (mean±SD, D)	LOCS II
高度近视白内障组	16/16	8/8	58.3±4.0	28.23±1.26	-12.12±2.83	C2N2P2
单纯白内障组	16/16	7/9	56.9±5.8	23.27±0.53	-0.14±0.31	C2N2P2
$\chi^2/t$ 值		0.125	0.950	17.160	-34.346	-
<i>P</i> 值		0.723	0.350	<0.01	<0.01	-

注: (a:  $\chi^2$  检验; b: 独立样本 *t* 检验) LOCS II: 晶状体混浊程度分类系统 II; -: 未进行统计学分析  
Note: (a:  $\chi^2$  test; b: Independent-samples *t* test) LOCS II: lens opacities classification system II; -: statistical analysis not performed

**1.1.2 主要试剂及仪器** 盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社); 质量分数 0.5% 聚维酮碘溶液(上海利康消毒高科技公司); BCA 试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司); 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒(上海酶联生物有限公司); 胰蛋白酶(美国 Promega 公司)。裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司); 双目间接检眼镜(德国 Keeler 公司); IOLMaster 光学生物测量仪、手术显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); Nanodrop 分光光度计(美国 Thermo 公司); Eksportnano LC 415 液相色谱、TripleTOF 6600 质谱系统(美国 AB SCIEX 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 房水样本的收集及处理** (1) 标本收集 术眼采用盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉, 采用 0.5% 聚维酮碘溶液冲洗结膜囊 2 次, 平衡盐溶液充分冲洗结膜囊。为了避免血红蛋白及其他眼表污染物, 在行任何眼内操作之前于手术显微镜下用 1 ml 结核菌素注射器在透明角膜缘处穿刺进入前房, 采集房水标本 100  $\mu$ l, 迅速转移至 EP 管中, -80  $^{\circ}$ C 冻存备用。(2) 样品的制备 在 50  $\mu$ l 房水中加入 8 mol/L 尿素裂解液 350  $\mu$ l, 室温下裂解 5 min。冰上超声破碎, 超声能量比例为 35%, 超声 3 s 后停 3 s, 间断超声 2 min。15  $^{\circ}$ C 下 16 000 $\times$ g 离心 10 min。取上清, 采用 BCA 试剂盒测定房水标本中蛋白浓度。取 100  $\mu$ g 蛋白, 加入浓度为 1 mol/L 的二硫苏糖醇 1  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入浓度为 1 mol/L 的吡啶乙酸 4  $\mu$ l, 避光、37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。平衡相对质量分数 10 000 超滤管 1 次(加入浓度为 50 mmol/L 的碳酸氢铵 400  $\mu$ l, 14 000 $\times$ g 离心 10 min), 加入 100  $\mu$ g 还原烷基化后的样本, 15  $^{\circ}$ C 下 14 000 $\times$ g 离心 20 min, 加入 400  $\mu$ l 碳酸氢铵清洗 3 次, 更换收集管, 加入 50  $\mu$ l 碳酸氢铵至超滤管中, 加入 2  $\mu$ g 测序级胰蛋白酶, 37  $^{\circ}$ C 孵

育 12~16 h。用移液枪混匀超滤管中的样本, 4  $^{\circ}$ C 下 14 000 $\times$ g 离心 20 min, 加 50  $\mu$ l 碳酸氢铵冲洗 3 次, 向收集管中加入体积分数 1% 的甲酸终止酶切, 60  $^{\circ}$ C 下真空蒸干。取 12  $\mu$ l 体积分数 0.1% 甲酸重悬样本, Nanodrop 分光光度计测量浓度, 取等量的肽段进行质谱检测。

## 1.2.2 非标记液相色谱串联质谱法检测房水标本中差异表达蛋白

采用 Eksportnano LC 415 液相色谱和 TripleTOF 6600 质谱系统鉴定房水中蛋白质。用上样缓冲液(体积分数 0.1% 甲酸、2% 乙腈、97.9% 水)将 2  $\mu$ g 酶切后的肽段载入到 C18 填充的离子阱上(100  $\mu$ m $\times$ 2 cm, 填料规格为 3  $\mu$ m, 120 A)。使用梯度缓冲液(0.1% 甲酸、97.9% 乙腈、2% 水)洗脱离子阱, 肽段经过 C18 填充的柱子后(150  $\mu$ m $\times$ 15 cm, 填料规格为 1.9  $\mu$ m, 120 A), 形成带电的离子喷雾, 离子喷雾进入质谱进行检测。梯度缓冲液的有效洗脱梯度为 5%~35%, 有效时间为 91 min, 流速为 400 nl/min。质谱参数: 飞行时间质谱累加时间为 0.25 s, 质量扫描范围为 300~1 500 m/z, 电荷选择 +2~+5 价离子, 质量偏差 50 ppm 以内, 每个循环内最大监测离子数为 60, 每次检测隔离已检测离子 16 s, 碎裂能量模式选择动态碎裂模式。产物离子累加时间为 0.04 s, 采用高灵敏扫描模式。采用 Maxquant 软件(版本 1.6.3.4)对质谱采集的原始数据进行 Uniprot 人类数据库的搜索。对人类数据库搜索后的数据进行统计分析, 筛选 *P* 值 < 0.05 且差异倍数大于 2 的差异表达蛋白, 对每个可定量蛋白的变化倍数以 2 为底数取对数作为横坐标, 将 *P* 值以 10 为底数取负对数作为纵坐标得到差异表达蛋白的火山图。

**1.2.3 生物信息学对房水中差异表达蛋白进行分析** 为进一步探索差异表达蛋白的功能, 用基因本体(Gene Ontology, GO) (<http://geneontology.org/>) 功能注释对差异表达蛋白进行生物学过程、分子功能和细胞成分功能分析。进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 通路注释分析, 以深入了解这些差异表达蛋白参与的重要代谢和/或信号转导通路。

**1.2.4 ELISA 法对质谱测定的数据进行验证** 从主要差异表达蛋白中随机选取 3 个蛋白(C8B、DAG1、

TGFBI), 采用 ELISA 法对质谱测定的数据进行验证。步骤如下: (1) 标准品的加样 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50  $\mu\text{l}$ ; (2) 加样 分别设空白孔和待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40  $\mu\text{l}$ , 再加待测样品 10  $\mu\text{l}$ 。(3) 加酶 每孔加入酶标试剂 100  $\mu\text{l}$ , 空白孔除外。(4) 温育 用封板膜封板后 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 60 min。(5) 配液 将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。(6) 洗涤 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干。(7) 显色 每孔先加入显色剂 A 50  $\mu\text{l}$ , 再加入显色剂 B 50  $\mu\text{l}$ , 轻轻震荡混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 15 min。(8) 终止 每孔加终止液 50  $\mu\text{l}$ , 终止反应(此时蓝色立转黄色)。(9) 测定 以空白孔调零, 波长 450 nm 处依序测量各孔的吸光度(A)值。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实符合正态分布, 以 mean $\pm$ SD 表示, 计数资料采用频数和百分数表示。高度近视白内障组与单纯白内障组间计数资料差异比较采用  $\chi^2$  检验, 组间计量资料差异比较采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2 个组房水标本中蛋白质量浓度比较

高度近视白内障组房水标本平均蛋白质量浓度为 (1 134. 91 $\pm$ 104. 78) ng/L, 明显高于单纯白内障组的 (706. 71 $\pm$ 85. 43) ng/L, 差异有统计学意义 ( $t = 11. 977$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.2 2 个组房水标本中差异表达蛋白

2 个组房水标本中共鉴定出可定量蛋白 463 个, 高度近视白内障组与单纯白内障组房水标本比较有 86 个差异表达蛋白, 包括 49 个表达上调蛋白和 37 个表达下调蛋白。表达上调蛋白主要为单核细胞分化抗原 CD14、抗凝血酶 III (antithrombin-III, SERPINC1)、补体 4B (complement 4B, C4B)、C9、C8B、C3 和血浆蛋白酶 C1 抑制剂 (plasma protease C1 inhibitor, SERPING1)。表达下调蛋白主要为生长因子  $\beta$  诱导蛋白 (transforming growth factor- $\beta$ -induced protein, TGFBI)、肌营养不良蛋白相关糖蛋白 1 (dystroglycan 1, DAG1)、胶原蛋白 4A1 [collagen alpha-1 (IV) chain, COL4A1]、骨桥蛋白 (osteopontin, SPP1) 和 COL5A1 等 (图 1, 表 2)。差异表达蛋白的分类主要是蛋白结合

活性调节因子 (PC00095)、细胞外基质蛋白 (PC00102)、载体蛋白 (PC00219)、细胞间信号分子 (PC00207)、蛋白质修饰酶 (PC00260) 和代谢物间转换酶 (PC00262), 分别占 32. 7%、14. 5%、9. 1%、9. 1%、7. 3% 和 5. 5%, 转运相关蛋白 (PC00227)、支架蛋白 (PC00226)、细胞黏附分子 (PC00069)、核酸结合蛋白 (PC00171)、跨膜信号受体 (PC00197) 和防御/免疫蛋白 (PC00090) 均占 3. 6% (图 2)。

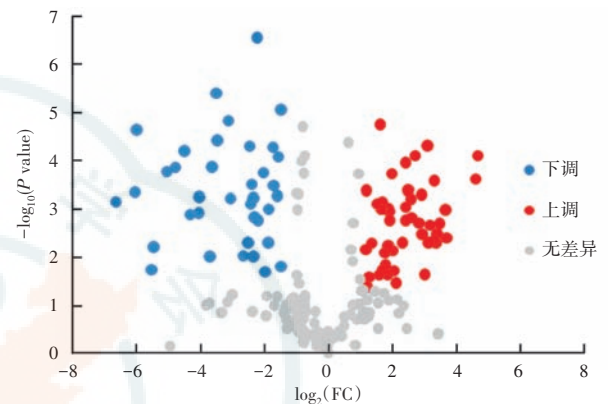


图 1 差异表达蛋白火山图 蓝色表示表达下调蛋白, 红色表示表达上调蛋白, 灰色表示组间表达量无差异蛋白 FC: 倍数变化

Figure 1 Volcano plot of differentially expressed proteins Blue dots indicated down-regulated proteins, and red dots were up-regulated proteins, and gray dots represented non-differential proteins between the two groups FC: fold change

表 2 高度近视白内障组和单纯白内障组房水标本中主要差异表达蛋白情况

Table 2 Main differentially expressed proteins in the aqueous humor samples between the high myopia cataract group and simple cataract group

蛋白名称	差异倍数	P 值	表达变化
CD14	45.23	0.000 003	上调
SERPINC1	34.52	0.000 230	上调
C4B	31.42	0.000 041	上调
C9	28.67	0.000 354	上调
C8B	25.76	0.002 416	上调
C3	25.42	0.006 834	上调
SERPING1	14.65	0.002 546	上调
DAG1	0.02	0.030 506	下调
TGFBI	0.06	0.000 436	下调
COL4A1	0.12	0.000 013	下调
SPP1	0.10	0.001 437	下调
COL5A1	0.23	0.002 531	下调

注: SERPINC1: 抗凝血酶 III; C4B: 补体 4B; SERPING1: 血浆蛋白酶 C1 抑制剂; DAG1: 肌营养不良蛋白相关糖蛋白 1; TGFBI: 转化生长因子  $\beta$  诱导蛋白; COL4A1: 胶原蛋白 4A1; SPP1: 骨桥蛋白

Note: SERPINC1: antithrombin-III; C4B: complement 4B; SERPING1: plasma protease C1 inhibitor; DAG1: dystroglycan 1; TGFBI: transforming growth factor- $\beta$ -induced protein; COL4A1: collagen alpha-1 (IV) chain; SPP1: osteopontin

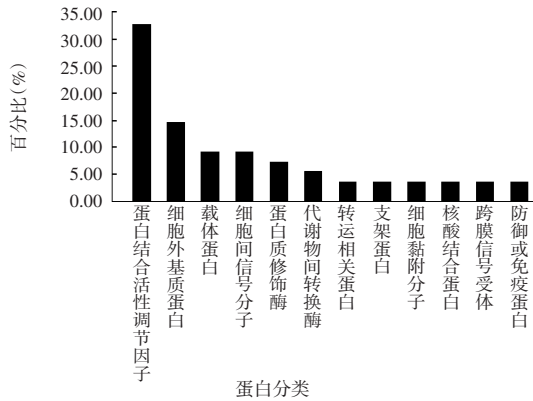


图 2 2 个组房水标本中差异表达蛋白分类 横坐标表示差异表达蛋白的分类,纵坐标表示各分类在 86 个差异表达蛋白中所占数量的百分比

Figure 2 Classification of differentially expressed proteins in the aqueous humor samples of the two groups The abscissa represented the classification of differentially expressed proteins, and the ordinate were the percentage of each type in the 86 differentially expressed proteins

### 2.3 2 个组生物信息学分析

**2.3.1 GO 分析** 86 个差异表达蛋白与不同的生物学过程、分子功能和细胞成分有关,这 3 个方面的前 10 条重要功能条目和相应的差异表达蛋白数目显示见图 3。差异表达蛋白主要富集在补体激活及其调节、细胞黏附、急性炎症反应、细胞外基质组织、细胞蛋白代谢等生物学过程以及丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、内肽酶抑制剂活性、肝素结合和晶状体的结构组成等分子功能;在细胞组分方面,差异表达蛋白主要定位于细胞外基质、细胞外区域、细胞外间隙、血液微粒和细胞外囊泡等。

**2.3.2 KEGG 分析** 86 个差异表达蛋白富集于 12 条代谢或信号转导通路(表 3)。21 个差异表达蛋白富集于补体和凝血级联通路,15 个差异表达蛋白富集于细胞外基质-受体相互作用通路,8 个差异表达蛋白富集于 PI3K-Akt 信号通路。

### 2.4 2 个组质谱数据验证

ELISA 检测结果显示,高度近视白内障组中随机选择的 C8B 蛋白表达量为(127.300±3.132)pg/ml,明显高于单纯白内障组的(109.200±2.904)pg/ml,高度近视白内障组中随机选择的 DAG1 和 TGFBI 蛋白表达量分别为(24.320±1.608)ng/ml 和(626.900±23.110)pg/ml,明显低于单纯白内障组的(30.900±2.183)和(725.500±24.660)pg/ml,差异均有统计学意义( $t = 4.233, P < 0.01; t = 2.426, P = 0.020; t = 2.918, P = 0.006$ ),表达变化趋势与非标记定量蛋白质组学分析结果均一致(图 4)。

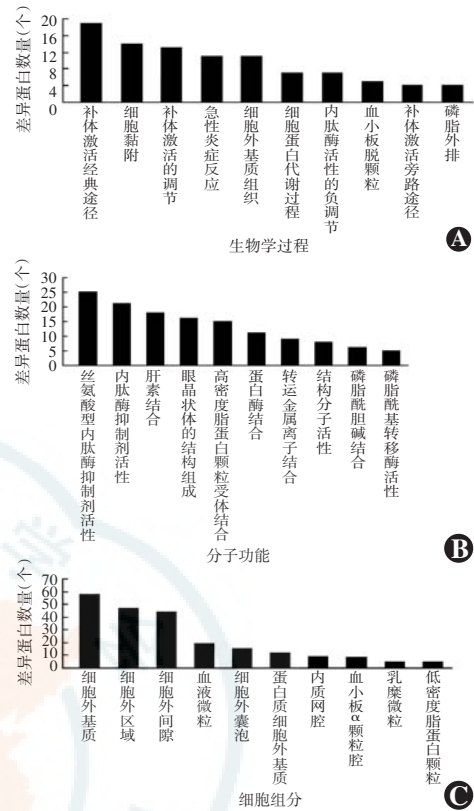


图 3 2 个组差异表达蛋白 GO 分析结果 A:“生物学过程”前 10 条富集结果 B:“分子功能”前 10 条富集结果 C:“细胞组分”前 10 条富集结果

Figure 3 GO analysis results of differentially expressed proteins between the two groups A: The top 10 enrichment results of “biological process” analysis B: The top 10 enrichment results of “molecular function” analysis C: The top 10 enrichment results of “cellular component” analysis

表 3 2 个组差异表达蛋白 KEGG 通路富集结果  
Table 3 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins between the two groups

编号	通路名称	差异表达蛋白数目	P 值
hsa04610	补体和凝血级联	21	1.55×10 <sup>-20</sup>
hsa04512	细胞外基质-受体相互作用	15	4.16×10 <sup>-11</sup>
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	8	5.26×10 <sup>-8</sup>
hsa05146	阿米巴病	7	1.31×10 <sup>-5</sup>
hsa05322	系统性红斑狼疮	6	5.28×10 <sup>-4</sup>
hsa05133	百日咳	5	5.28×10 <sup>-4</sup>
hsa05150	金黄色葡萄球菌感染	4	0.002 506
hsa04974	蛋白质的消化和吸收	4	0.009 854
hsa05020	朊病毒疾病	3	0.012 741
hsa05134	军团杆菌病	3	0.030 506
hsa03320	PPAR 信号通路	3	0.045 245
hsa05222	小细胞肺癌	3	0.069 051

注:KEGG:京都基因与基因组百科全书  
Note:KEGG:Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

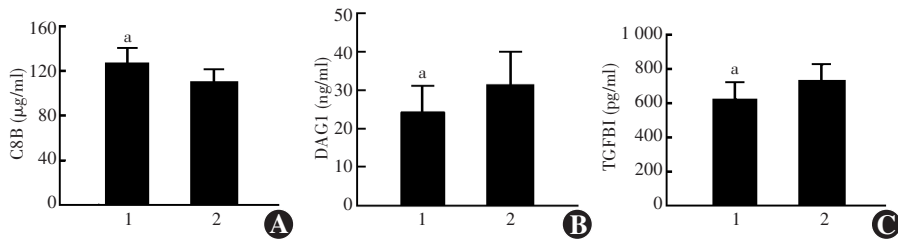


图4 2个组随机选择的3个差异表达蛋白ELISA验证与单纯白内障组比较,  $^*P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 36$ ) A: 2个组 C8B 表达量比较 B: 2个组 DAG1 表达量比较 C: 2个组 TGFBI 表达量比较 1: 高度近视白内障组; 2: 单纯白内障组 C8B: 补体 8B; DAG1: 肌营养不良相关糖蛋白 1; TGFBI: 转化生长因子  $\beta$  诱导蛋白

**Figure 4 Validation of three randomly selected differentially expressed proteins from the two groups by ELISA** Compared with the simple cataract group,  $^*P < 0.05$  (Independent-samples  $t$  test,  $n = 36$ ) A: Comparison of C8B expression level between the two groups B: Comparison of DAG1 expression level between the two groups C: Comparison of TGFBI expression level between the two groups 1: high myopic cataract group; 2: simple cataract group C8B: complement 8B; DAG1: dystroglycan 1; TGFBI: transforming growth factor- $\beta$ -induced protein

### 3 讨论

目前,高度近视仍缺乏有效的治疗手段,当其出现脉络膜新生血管、脉络膜和视网膜退行性病变时将严重影响患者视力,甚至致盲,因此积极寻找高度近视的潜在发病机制,开发有效的治疗靶点,并预测其进展和预后具有重要意义。房水是维持眼正常功能的重要眼内液,研究表明房水蛋白质组与眼部疾病密切相关,包括角膜、晶状体、视网膜、脉络膜、巩膜等结构病变,在眼部正常稳态被破坏后,房水中的蛋白质量和种类也会发生相应的变化,甚至有些蛋白可以被用来作为疾病诊断或治疗的生物标志物<sup>[9-13]</sup>。在本研究中,32个房水标本共鉴定出463种蛋白质,与单纯白内障组相比,高度近视白内障组中发现49种上调蛋白和37种下调蛋白。在另一项与高度近视相关的蛋白质组学分析中,10个房水标本发现有210种差异表达蛋白,包括123种上调蛋白和87种下调蛋白<sup>[14]</sup>。对比这2项高度近视蛋白质组学研究结果发现,很多变化明显的差异表达蛋白的表达趋势都是一致的,如CD14、C8B、C4B和COL4A1等。本研究通过GO富集分析和KEGG通路分析,发现免疫和炎症的相互作用以及细胞外基质重塑在高度近视的发病机制中起着主要作用。

KEGG通路分析表明,富集度最显著的为补体和凝血级联通路,包含21个差异表达蛋白,与GO分析结果一致。据报道,这些蛋白质中的大多数具有促炎功能,其中一些在近视患者中已被发现有上调趋势<sup>[15-16]</sup>。此外,其他KEGG富集通路(PI3K-Akt信号通路、阿米巴病、系统性红斑狼疮、百日咳、金黄色葡萄

球菌感染、朊病毒疾病、军团杆菌病、PPAR信号通路、小细胞肺癌)都与免疫和炎症相互作用有关。GO分析也表明,差异表达蛋白的生物学过程在补体激活和急性炎症反应中富集度高。Serpina家族中许多炎症蛋白表达明显上调,如Serpinc1、Serping1等。Wei等<sup>[16]</sup>报道,巩膜和脉络膜的急性炎症会导致近视,这表明炎症可能在近视的进展中起作用。临床研究发现系统性红斑狼疮、葡萄膜炎或脉络膜炎等免疫炎症性疾病患者的近视发生率较高。以上研究表明炎症可能影响近视的发展。此外,有研究发现补体系统在自身免疫性葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变和年龄相关性黄斑变性等多种眼部疾病表达紊乱<sup>[17-18]</sup>。在本研究中,许多差异表达蛋白,如C8B、C9、C4B、C3等,是参与补体激活和调节的关键免疫蛋白,在高度近视白内障组中明显上调。差异表达蛋白的GO分析结果显示,差异表达蛋白主要富集到补体激活和调节生物学过程中,提示高度近视患者存在免疫调节活化。由此可见,补体激活与炎症的相互作用在高度近视的发病机制中起着重要作用。免疫和炎症相关治疗可能是高度近视一种新的临床治疗策略,可能成为未来的一个研究方向。

在本研究中,多种差异表达蛋白为支架蛋白和细胞黏附分子(如COL4A1、COL5A1和SPPI),且KEGG分析中高度富集了细胞外基质-受体相互作用通路,这些均与GO分析结果一致。DAG1是肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物的组成成分,参与了细胞骨架与细胞外基质之间附着的主要作用机制,经常在肌-眼-脑综合征的研究中被报道<sup>[19]</sup>。肌-眼-脑综合征患者常合并严重的先天性近视,其致病机制之一就是外周膜蛋白DAG1糖基化异常<sup>[20]</sup>。与单纯白内障组相比,高度近视白内障组TGFBI明显下降,这与另一项有关高度近视蛋白质组学研究结果一致<sup>[14]</sup>。TGFBI蛋白是一种分泌型细胞外基质蛋白,已被证实能调节多种细胞的附着<sup>[21]</sup>。巩膜合成和分泌TGFBI蛋白,在促进与近视发展相关的巩膜细胞外基质重塑中起着重要作用<sup>[22]</sup>。TGFBI蛋白可调节人巩膜成纤维细胞在成纤维细胞层界面上附着于I型胶原,从而调节层状滑移量、巩膜黏弹性和巩膜延长速率<sup>[22]</sup>。虽然导致高度近视发生和发展的病因尚不清楚,但这些都与巩膜生物力

学特性改变有关的细胞外基质生化变化被认为是导致眼轴增长和近视发展的原因。

本研究通过非标记定量液相色谱串联质谱蛋白质组学分析发现,高度近视患者房水蛋白质组谱发生了显著变化,并通过了 ELISA 实验的验证。生物信息学分析表明这些差异表达蛋白与免疫和炎症相互作用以及细胞外基质的重塑密切相关。研究结果为免疫炎症相互作用和细胞外基质重塑在高度近视中发挥重要作用提供了新证据,但其具体的作用机制仍有待进一步研究。本研究的不足之处在于,由于临床样本取材的限制,无法获得年轻的高度近视患者和正常人的房水样本进行蛋白质组学研究,但本研究在最大程度上控制了 2 个组白内障基线病情的一致性,从而降低了白内障对研究结果的影响。

**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] Neelam K, Cheung CM, Ohno-Matsui K, et al. Choroidal neovascularization in pathological myopia [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(5): 495-525. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.04.001.
- [2] Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050 [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(5): 1036-1042. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.01.006.
- [3] Latosinska A, Vougas K, Makridakis M, et al. Comparative analysis of label-free and 8-Plex iTRAQ approach for quantitative tissue proteomic analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137048 [2020-08-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26331617/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0137048.
- [4] Huang Q, Yang L, Luo J, et al. SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale [J]. *Proteomics*, 2015, 15(7): 1215-1223. DOI: 10.1002/pmic.201400270.
- [5] Duan X, Lu Q, Xue P, et al. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with myopia [J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 370-377.
- [6] Wildschütz L, Ackermann D, Witten A, et al. Transcriptomic and proteomic analysis of iris tissue and aqueous humor in juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis [J]. *J Autoimmun*, 2019, 100: 75-83. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.03.004.
- [7] Yang Q, Lu H, Song X, et al. iTRAQ-based proteomics investigation of aqueous humor from patients with Coats' disease [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158611 [2020-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27416065/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0158611.
- [8] Kang GY, Bang JY, Choi AJ, et al. Exosomal proteins in the aqueous humor as novel biomarkers in patients with neovascular age-related macular degeneration [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(2): 581-595. DOI: 10.1021/pr400751k.
- [9] Qu SC, Xu D, Li TT, et al. iTRAQ-based proteomics analysis of aqueous humor in patients with dry age-related macular degeneration [J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(11): 1758-1766. DOI: 10.18240/ijo.2019.11.15.
- [10] Pollreis A, Funk M, Breitwieser FP, et al. Quantitative proteomics of aqueous and vitreous fluid from patients with idiopathic epiretinal membranes [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 108: 48-58. DOI: 10.1016/j.exer.2012.11.010.
- [11] Zamora DO, Riviere M, Choi D, et al. Proteomic profiling of human retinal and choroidal endothelial cells reveals molecular heterogeneity related to tissue of origin [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 2058-2065. DOI: 10.1017/S0952523807070770.
- [12] 刘爱华, 王礼明, 吕瀛娟, 等. 原发性开角型青光眼房水差异表达蛋白分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(10): 799-806. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.007.  
Liu AH, Wang LM, Lyu YJ, et al. Analysis of different proteins in primary open angle glaucoma based on aqueous proteome [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37(10): 799-806. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.007.
- [13] Zhu Y, Bian J, Lu D, et al. Combined retinal proteome datasets in response to atropine treatment using iTRAQ and SWATH-MS based proteomics approaches in guinea pig myopia model [J/OL]. *Data Brief*, 2020, 33: 106526 [2020-08-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33304948/>. DOI: 10.1016/j.dib.2020.106526.
- [14] Ji Y, Rong X, Ye H, et al. Proteomic analysis of aqueous humor proteins associated with cataract development [J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(18): 1304-1309. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.08.006.
- [15] Herbert CP, Papadia M, Neri P. Myopia and inflammation [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2011, 6(4): 270-283.
- [16] Wei CC, Kung YJ, Chen CS, et al. Allergic conjunctivitis-induced retinal inflammation promotes myopia progression [J]. *EBioMedicine*, 2018, 28: 274-286. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.01.024.
- [17] Clark SJ, Bishop PN. The eye as a complement dysregulation hotspot [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(1): 65-74. DOI: 10.1007/s00281-017-0649-6.
- [18] Skeie JM, Mahajan VB. Proteomic landscape of the human choroid-retinal pigment epithelial complex [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132(11): 1271-1281. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.2065.
- [19] Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, et al. Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(5): 1283-1286. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6608.
- [20] Jiao H, Many H, Wang S, et al. Novel POMGnT1 mutations cause muscle-eye-brain disease in Chinese patients [J]. *Mol Genet Genomics*, 2013, 288(7-8): 297-308. DOI: 10.1007/s00438-013-0749-5.
- [21] Thapa N, Lee BH, Kim IS. TGFβ1/beta1-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-β [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12): 2183-2194. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.06.004.
- [22] Flitcroft DI, Loughman J, Wildsoet CF, et al. Novel myopia genes and pathways identified from syndromic forms of myopia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(1): 338-348. DOI: 10.1167/iovs.17-22173.

(收稿日期: 2020-07-16 修回日期: 2021-05-06)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

## 欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 核心期刊, 月刊, 80 面, 每月 10 日出版, 每期定价 26 元, 邮发代号: 36-13, 国内外公开发行, 欢迎到各地邮局订阅或直接与本编辑部联系订购。联系电话: 0371-87160872。

(本刊编辑部)