

慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰人脐带间充质干细胞的定量蛋白质组学研究

蒋依琳 张晓敏 邵先锋 安金颖 苏琳 蒋元丰 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

通信作者:李筱荣,Email:xiaorli@163.com

【摘要】 目的 探讨慢病毒介导色素上皮衍生因子 (*PEDF*) 基因修饰后人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 的蛋白质组学变化。方法 将 hUCMSCs 分为基因修饰组和对照组,基因修饰组采用慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰 hUCMSCs,对照组为正常 hUCMSCs,提取各组细胞蛋白;采用 FASP 酶切法制备蛋白质样本,进行液相-质谱联用仪检测,采用 SWATH 模式采集数据。根据蛋白检测结果,进行差异蛋白分析及相应蛋白基因本体论 (GO) 分析和 Reactome 信号通路显著性富集分析。结果 共鉴定出 5 361 个可定量蛋白,与对照组相比,实验组慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰后差异表达倍数 >1.5 且 $P < 0.05$ 的蛋白共 432 个,其中上调蛋白 219 个,包括丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 F 成员 1 (SERPINF1) (*PEDF*)、DEAD-box 家族螺旋酶 59 (DDX59)、血小板反应蛋白 1 (THBS1) 等;下调蛋白 213 个,包括 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (COL1A1)、COL18A1 等。GO 分析结果显示,差异蛋白主要参与纤维蛋白溶解、细胞外结构构建、转运蛋白活性调节、仲醇及胆固醇生物合成、辅酶代谢、肽酶活性调节等多种生物学进程;Reactome 信号通路显著性富集分析表明,差异蛋白主要涉及胰岛素样生长因子结合蛋白调节的胰岛素样生长因子的运输和摄取、蛋白质翻译后修饰磷酸化、细胞外基质构成、糖皮质激素代谢等信号通路。结论 慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs 可通过调节多种蛋白的表达水平,改变细胞外基质结构,调节与细胞增生、自我更新和多能性相关的蛋白表达水平。

【关键词】 色素上皮衍生因子; 脐带; 间充质干细胞; 蛋白质组学; 新生血管性眼病; 治疗

基金项目:天津市教委科研项目 (2019KJ177)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00408

Quantitative proteomic analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells with pigment epithelium-derived factor gene modification mediated by lentivirus

Jiang Yilin, Zhang Xiaomin, Shao Xianfeng, An Jinying, Su Lin, Jiang Yuanfeng, 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

Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protein expression changes of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) modified with pigment epithelium-derived factor (*PEDF*) gene mediated by lentivirus.

Methods The hUCMSCs were divided into the control group and experimental group. Cells in the control group were normal hUCMSCs and the cells in experimental group were hUCMSCs with *PEDF* modification. The proteins from the two groups were collected and processed by FASP method. Samples were fractionated by liquid chromatography and analyzed by tandem mass spectrometry, and SWATH mode was applied. Differential protein analysis, Gene Ontology (GO) analysis and Reactome pathway enrichment analysis were performed. **Results** A total of 5 361 quantified proteins were detected in this experiment, of which 432 proteins were differentially expressed (fold change > 1.5, $P < 0.05$). There were 219 of the 432 proteins up-regulated, including serpin family F member 1 (SERPINF1) (*PEDF*), DEAD-box helicase 59 (DDX59) and thrombospondin 1 (THBS1), etc., whereas 213 proteins were down-regulated, including collagen type I alpha 1 (COL1A1), COL18A1, etc. GO analysis indicated that the differential proteins were mainly involved in fibrinolysis, extracellular structure organization, regulation of transporter activity, biosynthetic process of secondary alcohol and cholesterol, coenzyme metabolic process and regulation of peptidase activity, etc.

Reactome pathway analysis showed that the differential proteins were mostly involved in regulation of insulin like growth factor (IGF) transport and uptake by IGF binding protein, post-translational protein phosphorylation, extracellular matrix organization, metabolism of steroids. **Conclusions** After gene modification with *PEDF* mediated by lentivirus, the expression of many proteins in hUCMSCs were changed. *PEDF* gene modification can alter the structure of extracellular matrix and regulate the expression of proteins associated with cell proliferation, self-renewal and multipotency.

[**Key words**] Pigment epithelium-derived factor; Umbilical cord; Mesenchymal stem cells; Proteomics; Neovascular eye disease; Therapy

Fundprogram: Scientific Research Project of Tianjin Education Commission (2019KJ177)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00408

新生血管性眼病是一类常见的眼部疾病,其发生与病理条件下眼部血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平升高密切相关,抗 VEGF 药物可在一定程度上发挥治疗新生血管性眼病的效果,然而,长期使用抗 VEGF 药物存在促进纤维血管膜产生和造成视网膜萎缩等风险^[1]。因此,探索具有 VEGF 抑制作用的新型新生血管治疗制剂对于眼部新生血管性疾病的治疗具有重要意义。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)最早发现于人视网膜色素上皮细胞的条件培养基中,被认为具有神经保护特性^[2]。随后的研究发现 PEDF 可通过诱导活化内皮细胞凋亡和拮抗 VEGF 从而发挥抑制血管生成的作用^[3-4],是天然存在的有效抗新生血管因子。PEDF 在血浆中半衰期较短,外源性给药不易达到理想的治疗效果,其临床转化受到限制。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)技术的飞速发展和基因修饰技术的兴起为 PEDF 的临床应用带来了希望。MSCs 是一类具有自我更新、高度增生、多向分化、归巢迁移、低免疫原性特点的成体干细胞,具有损伤修复、神经保护、免疫抑制、营养、基因工程载体等作用。研究表明, MSCs 在炎症、退行性疾病、免疫性疾病中均可发挥一定的治疗作用^[5-7]。在眼科领域,已证实 MSCs 可用于治疗视网膜及视神经病变、眼部外伤、干眼等眼部疾病^[8-9]。基因修饰技术通过基因组修饰改变细胞遗传物质,改善和增强生物细胞功能^[10]。*PEDF* 基因修饰 MSCs 有望发挥二者的协同作用,增强对眼科相关疾病的治疗作用。经 *PEDF* 基因修饰的 MSCs 作为治疗新生血管性疾病和神经退行性疾病的新生物制剂,目前已用于脑、肺脏、肝脏和肠道肿瘤的治疗研究^[11-14];在眼科领域,研究发现 *PEDF* 基因修饰 MSCs 对糖尿病大鼠的视网膜组织具有保护作用^[15]。基因修饰在改变细胞目的基因表达水平的同时可引起细胞的一系列变化,但目前尚未有研究对此进行深入探讨。蛋白质组学技术可用于探索细胞内蛋白的种类及动态变化,为基因修饰后 MSCs 蛋白质组

学及功能特点的研究提供新思路。本研究拟采用定量蛋白质组学技术对慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰后的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)中蛋白表达量进行测定,结合基因本体论(Gene Ontology, GO)分析和 Reactome 信号通路显著性富集对差异蛋白进行生物信息学分析,为深入了解 *PEDF* 基因修饰后 hUCMSCs 的功能变化提供实验依据,为其应用于新生血管性眼病的临床治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs 和正常 hUCMSCs 由北京贝来生物科技有限公司提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、尿素、钒酸钠、氟化钠、脱氧胆酸钠(美国 Sigma 公司);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche 公司);胰蛋白酶(美国 Progenia 公司)。96 孔板(美国 Corning 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);Triple TOF 6600 质谱仪、ekspert nanoLC 415 液相色谱仪(美国 AB Sciex 公司)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰 hUCMSCs 蛋白质谱样本的制备 以 3 株不同脐带来源的正常 hUCMSCs 为对照组(批号: B00361、B00160、B00055),以 3 株慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的对照组同源 hUCMSCs 作为实验组(批号: PEDF-17015、PEDF-17003-2、PEDF-17003-1),对照组及实验组细胞均为 P5 代。室温条件下 1 000×g 离心 5 min,使用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,加入 8 mol/L 尿素裂解液,室温下裂解 5 min。将样本置于冰上进行超声破碎,超声能量为 35%,超声

3 s, 停 3 s, 超声时长为 2 min。20 °C 条件下 14 000×g 离心 10 min。取上清液, 采用 BCA 法测定样本蛋白浓度。每个样本取等量蛋白, 加入终浓度为 10 mmol/L 的 DTT 37 °C 孵育 1 h, 断开蛋白二硫键。加入终浓度为 40 mmol/L 的 IAA 室温条件下避光孵育 1 h 进行烷基化反应。在集合管上标记样本编号, 采用 150 μl 甲醇溶液平衡相对分子质量 10 000 超滤管 2 次, 20 °C 下 14 000×g 离心 5 min。加入 50 mmol/L 的碳酸氢铵(NH₄HCO₃)平衡液 300 μl 冲洗 2 次。每管加入 100 μg 处理后的样本, 4 °C 条件下 14 000×g 离心 20 min。加入 NH₄HCO₃ 溶液 300 μl, 清洗 3 次, 更换收集管, 加入 NH₄HCO₃ 溶液 75 μl 至超滤管中, 加入 3 μg 胰蛋白酶, 37 °C 孵育 12~16 h。用移液枪吹打混匀超滤管中的样本, 4 °C 条件下 14 000×g 离心 20 min, 加入 NH₄HCO₃ 溶液 50 μl 冲洗 2 次, 向收集管中加入体积分数 1% 甲酸溶液终止酶切反应, 60 °C 真空蒸干后, 每管加入 0.1% 甲酸水溶液 30 μl 重悬获得肽段样本, 采用 NanoDrop 微量分光光度计测定肽段浓度。

1.2.2 质谱检测法鉴定细胞中可定量蛋白及其表达 样本进行高 pH 反向分馏处理后, 取 1.5 μg 肽段, 用含 0.1% 甲酸、体积分数 2% 乙腈的水溶液以 3 μl/min 流速将其加载至 C18 预柱上(100 μm×2 cm, C18 填料规格为 3 μm、120 Å)。使用不同梯度的洗脱剂洗脱预柱, 洗脱剂为 97.9% 乙腈、体积分数 2% 水和 0.1% 甲酸, 洗脱肽段经分析柱(150 μm×15 cm, C18 填料规格为 1.9 μm、120 Å)分离并进入质谱检测。洗脱剂梯度为 0 min-5%、2 min-10%、65 min-22%、91 min-35%、92 min-80%、105 min-80%、106 min-5%、120 min-5%, 流速为 500 nl/min。数据采集模式为 SWATH。质谱采集参数: 飞行时间质谱(time of flight mass spectrometer, TOF-MS)累加时间为 0.05 s, 二级采用高灵敏扫描方式, 可变窗口数为 100 个, 每个窗口累加时间为 30 ms, 质量扫描范围为 100~1 500, 使用 SWATH Variable Window Calculator_V1.1 程序计算每个可变窗口的质量范围。

1.2.3 质谱数据的生物信息学分析 对 SWATH 模式采集的数据进行定量, 定量时参数设置: 每个蛋白选取 6 个肽段, 每个肽段选取 6 个离子对, 肽段可信度为 99%, 假阳性率为 1%, 排除修饰肽段, 峰值提取窗口为 10 min, 质量偏差 50 ppm 以内。每 10 min 选取 2 个内源性肽段进行保留时间矫正, 输出峰面积作为原始定量值。对所获定量值进行 log₂ 转换, 使其分布接近正态分布。采用 R 语言 preprocessCore 包中的 normalize.

median 函数对 log₂ 转换后的数据进行归一化, 去除无基因名字的蛋白, 对所获数据进行生物信息学分析。采用 R 语言 corrplot 包进行 Pearson 相关分析, 采用火山图和聚类分析热图观察组间差异蛋白表达情况, 采用 R 语言 clusterProfiler 包进行 GO 分析和 Reactome 信号通路富集, 采用 String 11.0 数据库分析蛋白-蛋白间相互作用, 作用强弱以节点大小和连线粗细表示。

1.3 统计学方法

采用 R 语言 stats 包 t.test 函数进行统计分析, 计量资料经直方图检验接近正态分布, 采用均衡分组单因素干预两水平研究设计, 实验组与对照组间蛋白表达差异比较采用独立样本 *t* 检验, 差异表达倍数 >1.5 且 *P*<0.05 的蛋白为差异蛋白。

2 结果

2.1 慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后 hUCMSCs 蛋白表达变化

质谱分析共鉴定出 5 361 个可定量蛋白。与对照组相比, 实验组慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后差异表达倍数 >1.5 且 *P*<0.05 的蛋白共 432 个, 其中上调蛋白 219 个, 包括丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 F 成员 1 (serpin family F member 1, SERPINF1)、DEAD-box 家族螺旋酶 59 (DEAD-box helicase 59, DDX59)、血小板反应蛋白 1 (thrombospondin 1, THBS1) 等; 下调蛋白 213 个, 包括 I 型胶原蛋白 α1 链 (collagen type I alpha 1 chain, COL1A1)、COL18A1 等(图 1, 2)。Pearson 相关分析显示, 实验组与对照组样本组内及组间蛋白表达量相关系数均 ≥0.96, 表明数据具有极高重复性(图 3)。

2.2 慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后差异蛋白 GO 和 Reactome 信号通路分析

GO 分析结果显示, 与对照组相比, 实验组慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后上调蛋白参与纤维蛋白溶解、细胞外结构构建、一氧化氮介导的信号转导调节、转运蛋白活性调节等生物学进程, 位于细胞-基质连接、焦点连接等处, 显著富集的分子功能包括肌动蛋白结合、蛋白质-脂质复合物结合、脂蛋白颗粒结合、细胞外基质结构组成等; 下调蛋白参与的生物学进程包括仲醇及胆固醇生物合成、甾醇生物合成调控、辅酶代谢、肽酶活性调节、细胞-基质黏附等, 分布于胶原三聚体、胶原蛋白细胞外基质、内质网腔等处, 显著富集的分子功能包括具有抗拉强度的细胞基质结构组成、血小板衍生生长因子结合、辅酶结合、氧化还原酶活性调节等(图 4)。

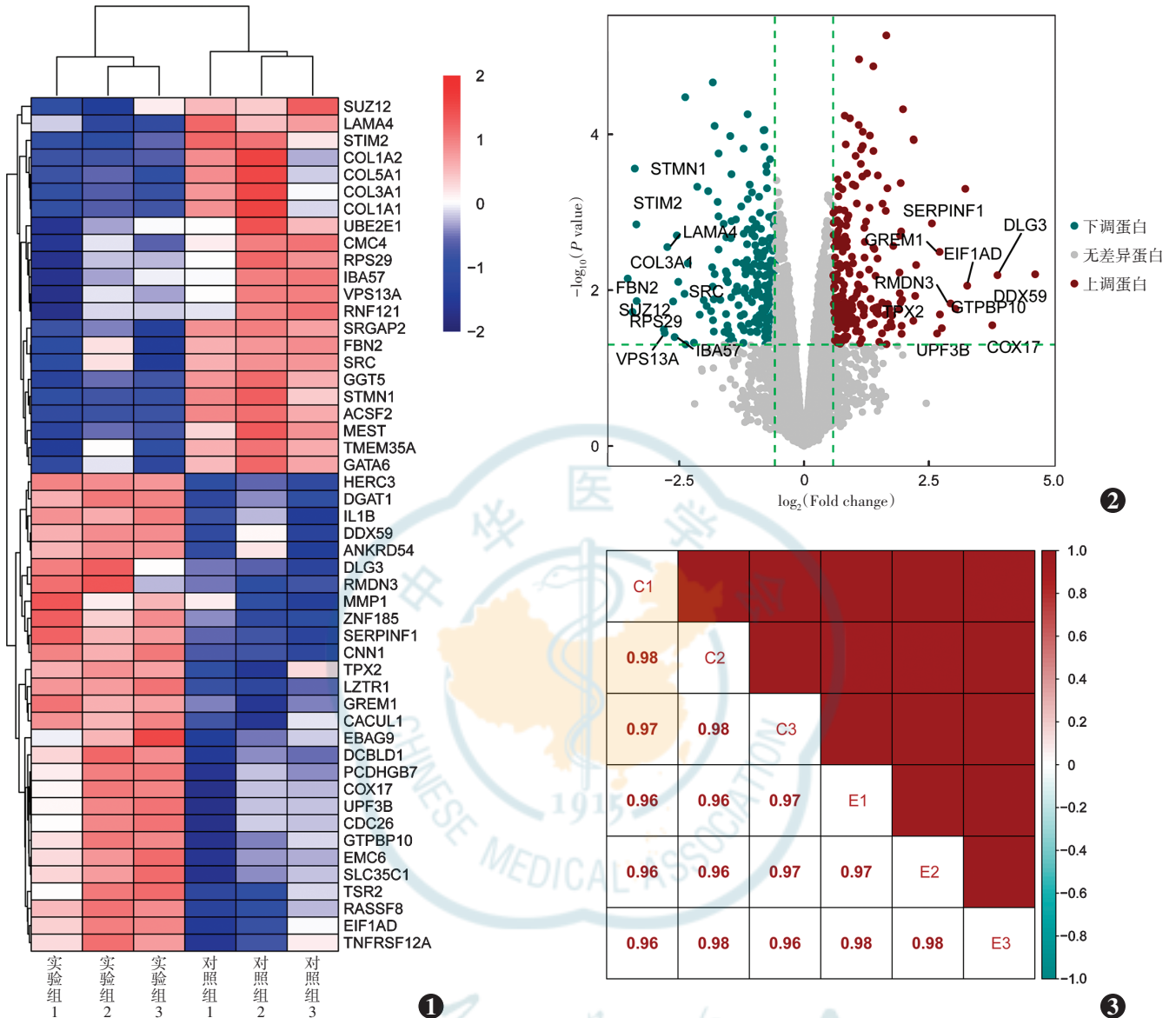


图 1 实验组和对照组差异蛋白聚类热图 实验组为慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs, 对照组为正常 hUCMSCs。右侧为差异蛋白基因, 红色方格代表上调蛋白, 蓝色方格代表下调蛋白 COL1A2: I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链; IL: 白细胞介素; DDX: DEAD-box 家族螺旋酶; SERPINF: 丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 F 成员 **图 2 慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰后差异蛋白火山图** 红点表示上调蛋白, 绿点表示下调蛋白 COL3A1: III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链; SERPINF: 丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员 F; DDX: DEAD-box 家族螺旋酶 **图 3 实验组和对照组样本间差异蛋白表达量 Pearson 相关分析** C: 对照组, 为正常 hUCMSCs; E: 实验组, 为慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs

Figure 1 Heat map of differentially expressed proteins between the experimental group and control group Cells in the experimental group were hUCMSCs with *PEDF* gene modification mediated by lentivirus, and cells in the control group were normal hUCMSCs. On the right were the genes of differentially expressed proteins. Red squares represented up-regulated proteins, and blue squares were down-regulated proteins COL1A2: collagen type I alpha 2 chain; IL: interleukin; DDX: DEAD-box helicase; SERPINF: serpin family F member **Figure 2 Volcano plots of differentially expressed proteins after *PEDF* gene modification mediated by lentivirus** Red dots indicated up-regulated proteins, and green dots were down-regulated proteins COL3A1: collagen type III alpha 1 chain; SERPINF: serpin family F member; DDX: DEAD-box helicase **Figure 3 Pearson correlation analysis of samples between the two groups** C: Normal group with the normal hUCMSCs; E: Experimental group with *PEDF* gene-modified hUCMSCs mediated by lentivirus

Reactome 信号通路分析结果显示, 实验组慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰后上调蛋白主要参与胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin like growth factor binding protein, IGFBP) 调节 IGF 的运输和摄取及翻译后蛋白质磷酸化等通路, 下调蛋白主要参与细胞外基质构成、糖皮质激素代谢等通路 (图 5)。

2.3 慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰后差异蛋白相互作用

差异蛋白相互作用分析显示, 上调蛋白中, THBS1、COL13A1、载脂蛋白 B 等与其他差异蛋白具有较强的相互作用; 下调蛋白中, COL1A1、COL18A1、整合素亚基 $\beta 5$ 等与其他差异蛋白具有较强相互作用, 其中 COL1A1 与 SERPINF1 相互作用明显 (图 6)。

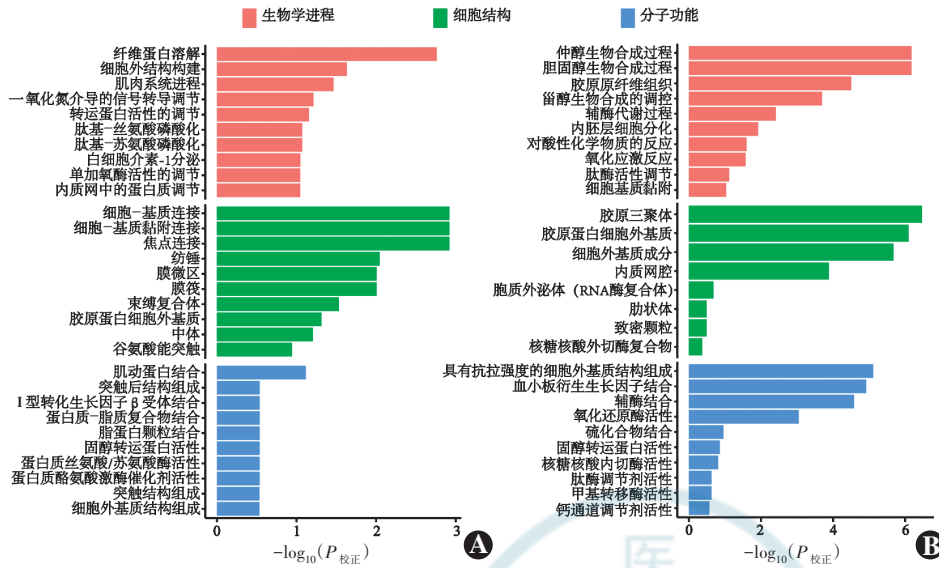


图 4 慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后差异蛋白 GO 分析 纵坐标为基因注释富集条目;横坐标为校正后 P 值,该值越小表示富集越显著 A:上调蛋白 B:下调蛋白

Figure 4 GO analysis result of differentially expressed proteins after PEDF gene modification The ordinate showed the enrichment of GO annotation terms, and the abscissa showed the corrected P value. The smaller the P value, the more significant the enrichment A: Up-regulated proteins B: Down-regulated proteins

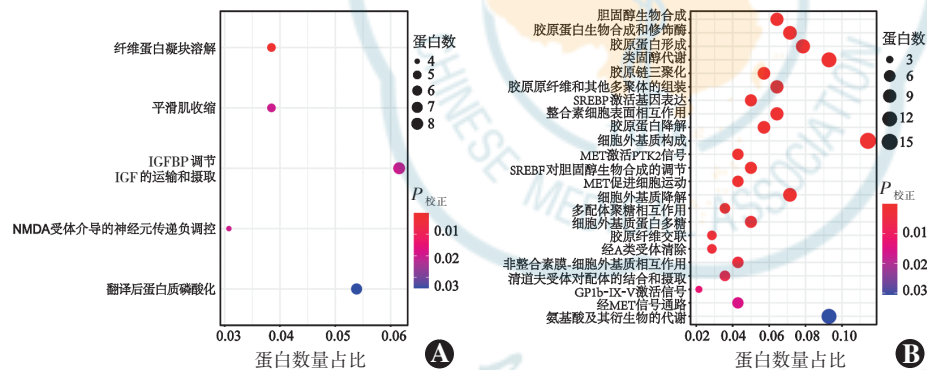


图 5 慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后差异蛋白参与的信号通路分析 纵坐标为 Reactome 信号通路富集条目;横坐标为参与相应通路的差异蛋白数目与鉴定出的总蛋白数比值;点的颜色表示校正后 P 值,该值越小,表示参与相应信号通路的差异蛋白富集越显著;点的大小表示参与相应信号通路的差异蛋白数目,该点越大,表示该通路中差异蛋白数目越多 A:上调蛋白 B:下调蛋白 IGFBP:胰岛素样生长因子结合蛋白;NMDA: N-甲基-D-天冬氨酸;SREBP:固醇调节元件结合蛋白;PTK:酪氨酸激酶

Figure 5 Reactome pathway analysis result of differentially expressed proteins after PEDF gene modification The ordinate showed the enriched Reactome pathways and the abscissa showed the ratio of the number of proteins in each pathway to the number of differentially expressed proteins. The color of the dot displayed the corrected P value. The smaller the P value, the more significant the enrichment of differential proteins involved in the corresponding signaling pathway. The size of the dot indicated the number of differentially expressed proteins involved in the corresponding signaling pathway. The larger the dot, the greater the number of differential proteins in the pathway A: Up-regulated proteins B: Down-regulated proteins IGFBP: insulin like growth factor binding protein; NMDA: N-methyl-D-aspartic acid; SREBP: sterol regulatory element binding protein; PTK: phosphotyrosine kinase

3 讨论

年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变和新生血管性青光眼等眼病均可出现眼部新生血管,严重危害患者视力,病变发生和发展与眼部 VEGF 水平密切相

关。对 VEGF 有拮抗作用的 PEDF 及与 PEDF 有协同作用的 MSCs 近年来受到眼科研究者的高度关注。本研究对慢病毒介导的 PEDF 基因修饰后 hUCMSCs 蛋白质组学变化进行分析,以期探索更有效的新生血管性眼病治疗方法提供新思路。

MSCs 来源广泛,不同来源的 MSCs 功能特点有所不同,目前研究中所涉及的 MSCs 主要来自骨髓、脐带、脂肪组织和沃顿胶等。MSCs 表达多种生物活性分子,可通过旁分泌的方式或细胞外囊泡介导调节组织微环境^[16]。近年来,有研究采用蛋白质组学技术探索不同类型 MSCs 及其分泌组的蛋白质表达水平,以深入了解 MSCs 的功能及作用机制。Islam 等^[17]对多种组织来源 MSCs 分泌组蛋白质组学分析,结果表明 hUCMSCs 中血小板衍生生长因子 β1、血小板衍生生长因子 D 和单核细胞趋化蛋白 1 等参与细胞信号传递的蛋白表达水平显著上调,而基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂和补体因子等分解代谢相关蛋白表达水平显著下调,深入研究发现 hUCMSCs 具有较好的抗炎和营养作用。Qiu 等^[18]进行的蛋白质组学分析表明, MSCs 衍生的胞外囊泡中半乳糖凝集素 3 结合蛋白、穿透素 3 和脑啡肽酶等蛋白可参与免疫调节、神经保护和多个器官疾病的治疗。尽管 MSCs 相关蛋白质组学研究较多,但针对基因修饰后 MSCs 蛋白质组学改变的研究尚未见报道。慢病毒属于逆转录病毒,对靶细胞毒性低,具有低免疫原性和较高转染效率的特点,可作为载体携带外源性目的基因转染至宿主细胞中,通过将外源基因

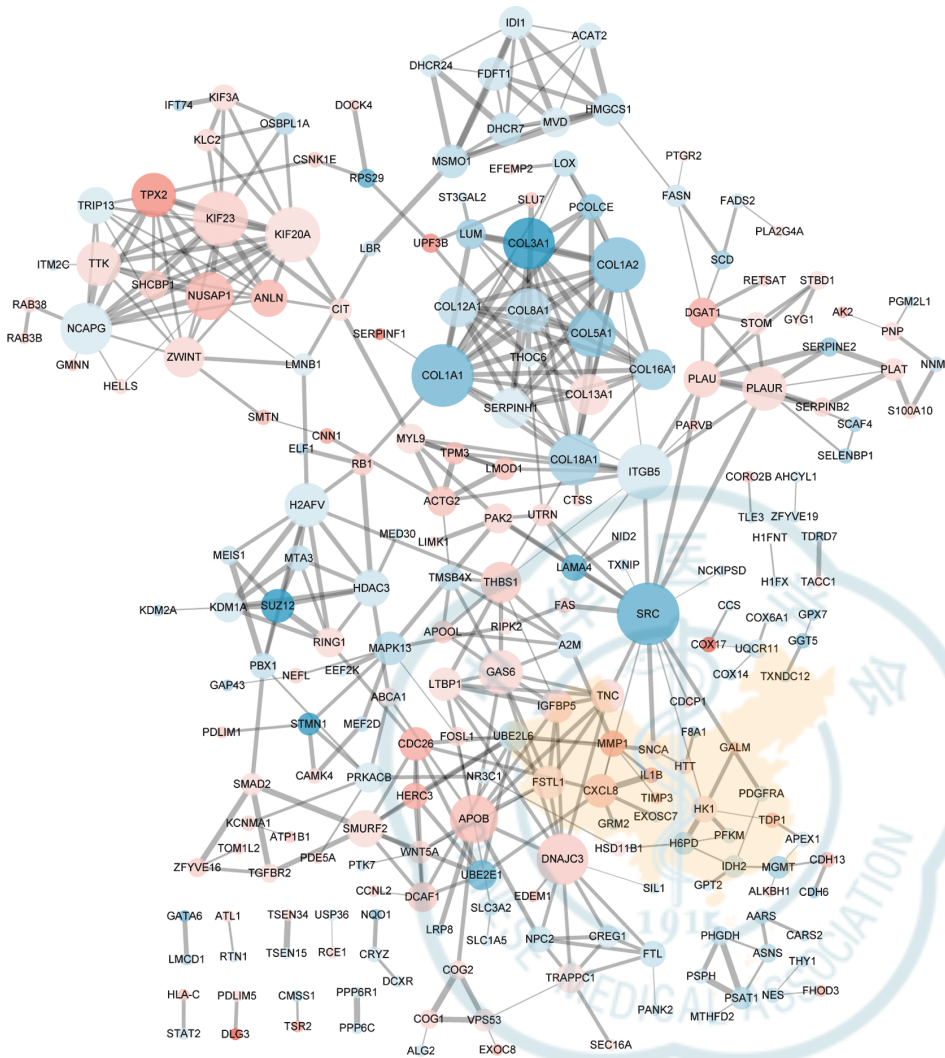


图 6 慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰后差异蛋白相互作用网络 差异蛋白及其相互作用以节点和连线表示,红点代表上调蛋白,蓝点代表下调蛋白。点的颜色深度表示差异蛋白变化倍数,颜色越深表明变化倍数越大;点的大小表示与该蛋白具有相互作用的蛋白数;连线表示蛋白间相互作用可信度 COL1A1: I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链;THBS: 血小板反应蛋白

Figure 6 Interaction network of differentially expressed proteins after *PEDF* gene modification mediated by lentivirus Differentially expressed proteins and their interactions were represented by dots and lines. Red dots represented up-regulated proteins, and blue dots exhibited down-regulated proteins. The depth of the dot color indicated the fold change of the differential proteins. The darker the color, the greater the fold change. The size of the dot indicated the number of proteins that had an interaction with the protein. The line indicated the credibility of the interaction between the proteins COL1A1: collagen type I alpha 1 chain; THBS: thrombospondin

整合至宿主细胞基因上实现目的基因的长时间稳定表达。本研究通过观察慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs 蛋白质组学变化情况,探索慢病毒介导的 *PEDF* 基因修饰对细胞产生的影响。

本研究结果表明,慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰后的 hUCMSCs 共有 432 个蛋白表达水平发生显著改变。其中 SERPINF1, 即 *PEDF* 显著上调,表明慢病毒介导的基因修饰实现 hUCMSCs 中 *PEDF* 过表达。DEAD-box 家族 RNA 解旋酶参与转录、mRNA 剪接、翻译起始、RNA 转运和衰变等过程,在 RNA 代谢中发挥至关

重要的作用^[19]。本研究中,DEAD-box 家族 RNA 解旋酶中的 DDX59 显著上调。研究表明,DDX59 参与大脑发育,编码该蛋白的基因突变可导致中枢和外周神经系统发育受损^[20]。目前,尚未有研究将 DDX59 应用于神经系统疾病的治疗,其是否可与 PEDF 协同发挥眼部神经保护作用有待进一步探索。上调蛋白 THBS1 在调节生理性和病理性血管生成中起关键作用,已有研究将其应用于肿瘤治疗,结果表明其可通过抑制肿瘤血管形成起到抗肿瘤作用^[21]。另有研究发现,在化学性角膜灼伤中,移植的 MSCs 可通过旁分泌 THBS1、白细胞介素 (interleukin, IL)-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-6 等可溶性因子发挥抗炎和抗血管生成的治疗作用^[22]。THBS1 对眼部新生血管性疾病的治疗作用及其机制有待进一步研究。此外,研究证实 THBS1 可通过激活内源性 TGF- β 诱导 MSCs 增生,是 MSCs 重要的调节因子^[23]。本研究结果表明,慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰 hUCMSCs 后可引起 THBS1 表达水平升高,有望增强 hUCMSCs 抗血管生成和增生能力,协同

PEDF 发挥眼科疾病治疗作用。

细胞外基质为干细胞提供结构支持,参与干细胞功能调节的信号传导。研究表明,细胞外基质是 MSCs 多种生化和机械信号的储存库,这些信号可通过细胞表面受体-蛋白相互作用进行传导,进而影响细胞信号通路,改变细胞功能^[24]。本研究结果显示,COL1A1 与 *PEDF* 间相互作用较强,该蛋白与 COL1A2、COL3A1 和 COL5A1 等蛋白均为下调蛋白,参与细胞外基质结构组成,表明慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰后的 hUCMSCs 中多个参与细胞外基质构成的蛋白表达水平发生显著

改变,细胞功能可能由此受到明显影响。

研究表明,IGF 系统在干细胞生物学中发挥重要作用,IGF 可促进 MSCs 增生并减少其凋亡,促进 MSCs 自我更新和发挥多能性^[25]。本研究表明,IGFBP 调节的 IGF 运输和摄取通路明显上调,可增强 hUCMSCs 结合和摄取 IGF 的能力,从而优化自身功能。

综上所述,本研究结果显示慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs 中 *DDX59*、*THBS1* 表达水平升高,有望与 *PEDF* 发挥协同作用,应用于眼部新生血管性疾病及神经退行性病变的治疗。此外,*COL1A1* 等细胞外基质构成相关蛋白表达水平的改变及 *IGFBP* 调节 IGF 运输和摄取通路的上调影响 hUCMSCs 的信号传导,优化细胞功能,提升其眼科临床应用价值。未来可依据本研究分析结果深入探讨,寻找慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰 hUCMSCs 的治疗靶点,进一步探索慢病毒介导 *PEDF* 基因修饰的 hUCMSCs 在眼部新生血管性疾病治疗中的作用及机制。本研究为系列研究的一部分,整体研究周期较长,后续实验中我们将对质谱分析结果进行验证并对蛋白功能进行探索,进一步探讨慢病毒作为独立因素可能带来的影响。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢北京贝来生物科技有限公司刘拥军、刘广洋提供 hUCMSCs 细胞样本,为本研究的顺利开展做出重要贡献

参考文献

- [1] Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1816 [2021-03-01]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29925789/. DOI: 10.3390/ijms19061816.
- [2] Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity [J]. Exp Eye Res, 1991, 53(3): 411-414. DOI: 10.1016/0014-4835(91)90248-d.
- [3] Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis [J]. Science, 1999, 285(5425): 245-248. DOI: 10.1126/science.285.5425.245.
- [4] Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy [J]. Prog Retin Eye Res, 2007, 26(1): 1-37. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2006.09.002.
- [5] Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17): 3323-3348. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1.
- [6] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(6): 824-833. DOI: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
- [7] Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update [J]. Cell Transplant, 2016, 25(5): 829-848. DOI: 10.3727/096368915X689622.
- [8] Zakirova EY, Valeeva AN, Aimaletdinov AM, et al. Potential therapeutic application of mesenchymal stem cells in ophthalmology [J/OL]. Exp Eye Res, 2019, 189: 107863 [2021-03-20]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31669045/. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107863.
- [9] Ding S, Subbiah SK, Khan M, et al. Empowering mesenchymal stem cells for ocular degenerative disorders [J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1784 [2021-03-20]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30974904/. DOI: 10.3390/ijms20071784.
- [10] Yong SB, Chung JY, Song Y, et al. Recent challenges and advances in genetically-engineered cell therapy [J]. J Pharm Investig, 2018, 48(2): 199-208. DOI: 10.1007/s40005-017-0381-1.
- [11] Wang Q, Zhang Z, Ding T, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing PEDF decrease the angiogenesis of gliomas [J/OL]. Biosci Rep, 2013, 33(2): e00019 [2021-03-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22917444/. DOI: 10.1042/BSR20110124.
- [12] Yang L, Zhang Y, Cheng L, et al. Mesenchymal stem cells engineered to secrete pigment epithelium-derived factor inhibit tumor metastasis and the formation of malignant ascites in a murine colorectal peritoneal carcinomatosis model [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(3): 267-277. DOI: 10.1089/hum.2015.135.
- [13] Gao Y, Yao A, Zhang W, et al. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. Oncogene, 2010, 29(19): 2784-2794. DOI: 10.1038/onc.2010.38.
- [14] Chen Q, Cheng P, Yin T, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells producing pigment epithelium-derived factor in lung carcinoma [J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3): 527-534. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1015.
- [15] 张惟, 段红涛, 陈松, 等. *PEDF* 基因修饰人脐带间充质干细胞对糖尿病大鼠视网膜的保护作用 [J]. 中华眼科杂志, 2017, 53(7): 540-547. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.07.013. Zhang W, Duan HT, Chen S, et al. The protective effect of pigment epithelium-derived factor modified human umbilical cord mesenchymal stem cells on rats with diabetic retinopathy [J]. Chin J Ophthalmol, 2017, 53(7): 540-547. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.07.013.
- [16] 陈莉, 陈松. 间充质干细胞治疗早期糖尿病视网膜病变研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(7): 667-671. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.020. Chen L, Chen S. Research progress of mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(7): 667-671. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.07.020.
- [17] Islam A, Urbarova I, Bruun JA, et al. Large-scale secretome analyses unveil the superior immunosuppressive phenotype of umbilical cord stromal cells as compared to other adult mesenchymal stromal cells [J]. Eur Cell Mater, 2019, 37: 153-174. DOI: 10.22203/eCM.v037a10.
- [18] Qiu G, Zheng G, Ge M, et al. Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 359 [2021-03-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31779700/. DOI: 10.1186/s13287-019-1484-6.
- [19] Jarmoskaite I, Russell R. RNA helicase proteins as chaperones and remodelers [J]. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 697-725. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060713-035546.
- [20] Salpietro V, Efthymiou S, Manole A, et al. A loss-of-function homozygous mutation in *DDX59* implicates a conserved DEAD-box RNA helicase in nervous system development and function [J]. Hum Mutat, 2018, 39(2): 187-192. DOI: 10.1002/humu.23368.
- [21] Zhang X, Lawler J. Thrombospondin-based antiangiogenic therapy [J]. Microvasc Res, 2007, 74(2-3): 90-99. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.04.007.
- [22] Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury [J]. Stem Cells, 2008, 26(4): 1047-1055. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0737.
- [23] Belotti D, Capelli C, Resovi A, et al. Thrombospondin-1 promotes mesenchymal stromal cell functions via TGF β and in cooperation with PDGF [J]. Matrix Biol, 2016, 55: 106-116. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.03.003.
- [24] Ragelle H, Naba A, Larson BL, et al. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices [J]. Biomaterials, 2017, 128: 147-159. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.008.
- [25] Youssef A, Aboalola D, Han VK. The roles of insulin-like growth factors in mesenchymal stem cell niche [J/OL]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 9453108 [2021-03-26]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28298931/. DOI: 10.1155/2017/9453108.

(收稿日期:2021-03-30 修回日期:2021-08-06)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)