

跨膜蛋白 26 在视网膜中的特异表达及其与原发性开角型青光眼的关系

尹焱 冒瑶 杨正林 黄璐琳

电子科技大学医学院 四川省人民医院医学检验中心 人类疾病基因研究四川省重点实验室, 成都 610072

通信作者: 黄璐琳, Email: huangluling@yeah.net

【摘要】 目的 预测跨膜蛋白 26(TMEMP26)的跨膜结构,观察该蛋白在人和小鼠视网膜中的表达情况,并探讨其与原发性开角型青光眼(POAG)的关系。方法 将人和小鼠 TMEMP26 的氨基酸序列输入跨膜蛋白结构预测软件(MemBrain)预测该蛋白的跨膜结构;选取 SPF 级 21 周龄 C57BL/6 小鼠 5 只及遗体捐赠人眼球 1 个,制作视网膜冰冻切片;采用免疫组织化学法观察 TMEMP26 在人和小鼠视网膜中的表达及定位;结合 TMEMP26 在视网膜的特异表达情况推测该基因可能的功能及其对眼的影响;在与 TMEMP26 相关眼病的文献中检索该基因单核苷酸多态性(SNP)变异情况。结果 预测人和小鼠的 TMEMP26 均为 8 次跨膜蛋白,具有相似的 8 个疏水性跨膜结构域、4 个亲水胞质结构域和 5 个亲水胞膜外区结构域,2 种 TMEMP26 的结构域氨基酸残基数目存在细微差别;且在人和小鼠的视网膜中, TMEMP26 蛋白均仅在外丛状层(OPL)和内丛状层(IPL)特异表达;全基因组关联分析数据提示 TMEMP26 与 POAG 呈弱相关。结论 TMEMP26 为多次跨膜蛋白,主要在视网膜的 IPL 和 OPL 表达,该基因与 POAG 呈弱相关。

【关键词】 人跨膜蛋白 26; 小鼠跨膜蛋白 26; 蛋白跨膜结构; 视网膜; 内丛状层; 外丛状层; 原发性开角型青光眼

基金项目: 国家自然科学基金项目(81970839、81670895); 四川省科技厅项目(2021YFS0033)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200112-00021

Specific expression of transmembrane protein 26 in retina and its association with primary open-angle glaucoma

Yin Yi, Mao Yao, Yang Zhenglin, Huang Lulin

School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Department of Medical Genetics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, Chengdu 610072, China

Corresponding author: Huang Lulin, Email: huangluling@yeah.net

【Abstract】 Objective To predict the transmembrane structure of transmembrane protein 26 (TMEMP26), observe its expression in human retina and mouse retina, and investigate the relationship between it and primary open-angle glaucoma (POAG). **Methods** The transmembrane structure of TMEMP26 in human and mouse was obtained by inputting its amino acid sequences into the transmembrane protein structure prediction software, MemBrain. The expression and location of TMEMP26 in human and mouse retinas were observed through frozen retinal sections stained with anti-TMEMP26 antibody, which came from a human donor and five SPF-grade C57BL/6 mice. The possible function of TMEMP26 gene and its influence on eyes were inferred on the basis of the specific expression of TMEMP26 in retina. The single nucleotide polymorphism mutation of TMEMP26 gene was searched in literature related to ocular diseases. The use and care of animals complied with the Regulations on the Management of Experimental Animals. This research protocol was approved by an Ethics Committee of Sichuan Provincial People's Hospital (No. 2019-36). **Results** Both human and mouse TMEMP26 were eight transmembrane proteins with similar eight hydrophobic transmembrane domains, four hydrophilic cytoplasmic domains and five hydrophilic extracellular membrane domains. Small differences in the number of amino acid residues in the domains of TMEMP26 were found. In both human and mouse retina, TMEMP26 gene was only specifically expressed in the outer plexiform layer (OPL) and inner plexiform

layer (IPL). *TMEM26* was weakly associated with POAG in a published data. **Conclusions** *TMEM26* is a multi-pass transmembrane protein, mainly expressed in IPL and OPL of the retina. *TMEM26* gene is weakly related to POAG.

[Key words] *TMEM26* protein, human; *Tmem26* protein, mouse; Protein transmembrane structure; Retina; Inner plexiform layer; Outer plexiform layer; Primary open-angle glaucoma

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81970839, 81670895); Project of Sichuan Provincial Science and Technology Department (2021YFS0033)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200112-00021

膜蛋白是一种功能性蛋白,在生物体内承担着十分重要的作用,参与细胞增生分化、生长代谢、物质交换和能量转化等生物过程^[1]。根据蛋白在膜上分离的难易程度,可将膜蛋白分为膜整合蛋白、膜锚定蛋白和外膜蛋白。跨膜蛋白是膜整合蛋白的一种,在生物体内起着信号转导、小分子物质或离子跨膜转运等作用^[2],其至少存在一段跨膜结构,因此将跨膜蛋白结构分为跨膜区、胞膜外区和胞质区,其结构对蛋白的功能具有重要作用。跨膜蛋白 26 基因(transmembrane protein 26 gene, *TMEM26*)是含有 6 个外显子的编码跨膜蛋白的基因,在人和小鼠中均有表达,且均位于 10 号染色体上,该基因编码一段相对分子质量约为 41 600 的多次跨膜蛋白^[3]。目前,已证明 *Tmem26* 在小鼠的胚胎中表达,且受时间和空间的调控^[3];该基因在乳腺癌细胞中表达,其蛋白结构对细胞药物治疗应答存在影响^[4];该基因也在气道上皮和肺实质细胞中表达,是与肺功能下降、慢性阻塞性肺病发病机制相关的候选基因^[5]; *TMEM26* 也被鉴定为一种米色脂肪细胞的表面标志物^[6-7]。虽然 *TMEM26* 已被报道在以上组织或细胞内表达,但其具体功能,尤其在眼中的作用及功能尚不清楚。青光眼是主要的致盲眼病之一,主要包括慢性闭角型青光眼、原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)和剥脱性青光眼等常见类型。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)损失是青光眼的致病关键^[8-9];内丛状层(inner plexiform layer, IPL)由 RGC 树突、双极细胞轴突和无长突细胞形成的纤维网状层组成,其厚度是评估 POAG 的潜在生物标志^[10]。本研究拟探讨 *TMEM26* 在视网膜中的表达情况,并根据本课题组已报道的数据探讨 *TMEM26* 基因变异与 POAG 的关联情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 选取 SPF 级 21 周龄健康 C57BL/6 小鼠 5 只,体质量为 25~31 g,由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供,实验动物的喂养及使用均遵循

《实验动物管理条例》。1 个人眼球来自于遗体捐赠。本研究获四川省人民医院伦理委员会批准[批文号:伦审(研)2019 年第 36 号],人体标本的来源与使用均获得捐赠者家属签字同意。

1.1.2 主要试剂及仪器 质量分数 4% 多聚甲醛通用型组织固定液(北京 Biosharp 公司);质量分数 30% 蔗糖溶液、体积分数 0.25% Triton X-100(北京索莱宝科技有限公司);OCT 冷冻切片包埋剂(美国 Sakura 公司);兔抗 *TMEM26* 多克隆抗体(TA330777, 美国 Origene 公司);Isolent B4 594(英国 MKBio 公司);体积分数 5% 山羊血清、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔荧光二抗、DAPI、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(上海碧云天生物技术有限公司)。解剖显微镜(SZX10, 日本 Olympus 公司);显微解剖器械(深圳华阳生物技术有限公司);冰冻切片机(BK-2318, 山东博科生物产业有限公司);恒温烘箱(DHP-9052, 上海和呈仪器制造有限公司);激光扫描共聚焦显微镜(LSM800, 德国 Carl Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白跨膜结构预测 从 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>)中获得人和小鼠的 *TMEM26* 氨基酸序列,将氨基酸序列输入 MemBrain 3.0 中,预测跨膜结构。

1.2.2 免疫荧光染色法观察 *TMEM26* 在人和小鼠视网膜中的表达及定位 在解剖显微镜下剪去角膜,用 4% 多聚甲醛完全浸没眼球,固定 2 h 后用 PBS 洗去残留的多聚甲醛;在解剖显微镜下用镊子轻轻取出晶状体,将取出晶状体后的眼球用 30% 蔗糖浸没,脱水 2 h,将其取出用 OCT 包埋剂包埋。将包埋好的组织置于 -80 °C 冰箱,用于冰冻切片。切片制作完成后,将其在 37 °C 烘箱中烘烤 1 h,使组织切片完全固定于载玻片,用免疫组化笔圈出切片位置,使用含 5% 山羊血清和 0.25% Triton X-100 的 PBS 溶液封闭 1 h;使用兔抗 *TMEM26* 多克隆抗体(1:200)4 °C 避光孵育过夜;使用 Alexa-488 山羊抗兔二抗(1:500)及 DAPI 避光孵育 2 h;PBS 清洗,封片后采用激光扫描共聚焦显微镜

观察并拍照。

1.2.3 免疫荧光双重染色法观察 TMEM26 与血管定位关系 参照 1.2.2 方法行 TMEM26 免疫荧光染色,进行视网膜 Isolectin B4 血管内皮细胞标记染色,加入 Isolectin B4(1:200),4 ℃ 避光孵育过夜;用 PBS 冲洗 10 min,封片后激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照,蓝色为 DAPI,绿色为 TMEM26,红色为视网膜血管。

1.2.4 TMEM26 基因的 SNP 分析 与本课题组前期研究结果^[11]的数据进行比对,分析 TMEM26 在 1 007 例 POAG 患者与 1 009 个正常人的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)变异情况,总结数据,筛选出 $P < 0.01$ 的显著性变异。

1.3 数据处理

采用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 UCSC 等网站查询 TMEM26 基因和蛋白的信息;通过 MemBrain 3.0 跨膜结构预测网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/>)预测蛋白的跨膜结构。使用 DNAMAN 进行氨基酸序列比对,通过 AI 编辑跨膜蛋白图像。

2 结果

2.1 TMEM26 跨膜结构

在 UCSC 中查询人 TMEM26 的氨基酸残基有 368 个,小鼠 Tmem26 的氨基酸残基有 366 个。将 2 种来源的 TMEM26 进行氨基酸序列比对,同源率为 69.46%。人 TMEM26 蛋白包括 8 个疏水性跨膜结构域、4 个亲水胞质结构域和 5 个亲水胞膜外区结构域;且有 2 个螺旋跨膜结构连接的亲水性胞质结构氨基酸残基数仅有 2 个,是小胞质结构域。小鼠 Tmem26 蛋白预测结果与人 TMEM26 相似,同样含有 8 个跨膜结构域、5 个亲水胞膜外区结构域和 4 个亲水胞质结构域。人和小鼠 TMEM26 多肽链 N-端和 C-端均位于胞膜外,具有相似的跨膜结构域、胞膜外结构域和胞质结构域,整体跨膜结构相似。但两者的结构域氨基酸残基组成数存在细微差别,对于 2 个“背靠背”(back-to-back)螺旋跨膜结构,在人的 TMEM26 中,第 1 个 back-to-back 螺旋跨膜结构由 E2-V30 的 29 个氨基酸残基组成,第 2 个 back-to-back 螺旋跨膜结构由 E33-K57 的 25 个氨基酸残基组成;小鼠 Tmem26 中的 2 个 back-to-back 螺旋跨膜结构分别由 E2-K31 的 30 个氨基酸残基、H34-K57 的 24 个氨基酸残基构成。此外,氨基酸残基数目差别最大的是位于多肽末端的胞膜外结构域,人的 TMEM26 比小鼠的 Tmem26 多 2 个氨基酸残基(图 1,表 1)。

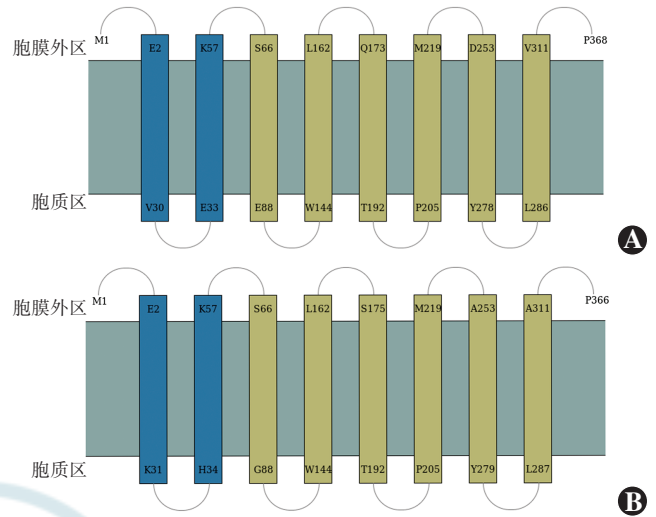


图 1 人与小鼠 TMEM26 的跨膜结构 蓝色所示为“背靠背”螺旋跨膜结构,黄色为非“背靠背”螺旋跨膜结构 A:人 B:小鼠
Figure 1 Transmembrane structure of TMEM26 protein in human and mouse The color blue presented back-to-back transmembrane helices, and the color yellow showed non-back-to-back transmembrane helices A: Human B: Mouse

表 1 TMEM26 蛋白跨膜结构具体位置^[12-16]
Table 1 Specific amino acid sequences of transmembrane structure of TMEM26 protein

人 TMEM26 蛋白跨膜结构		小鼠 Tmem26 蛋白跨膜结构	
氨基酸残基顺序	位置	氨基酸残基顺序	位置
1- 1	胞膜外区	1- 1	胞膜外区
2- 30	跨膜区	2- 31	跨膜区
31- 32	胞质区	32- 33	胞质区
33- 57	跨膜区	34- 57	跨膜区
58- 65	胞膜外区	58- 65	胞膜外区
66- 88	跨膜区	66- 88	跨膜区
89-143	胞质区	89-143	胞质区
144-162	跨膜区	144-162	跨膜区
163-172	胞膜外区	163-174	胞膜外区
173-192	跨膜区	175-192	跨膜区
193-204	胞质区	193-204	胞质区
205-219	跨膜区	205-219	跨膜区
220-252	胞膜外区	220-252	胞膜外区
253-278	跨膜区	253-279	跨膜区
279-285	胞质区	280-286	胞质区
286-311	跨膜区	287-311	跨膜区
312-368	胞膜外区	312-366	胞膜外区

注:TMEM26:跨膜蛋白 26;氨基酸残基顺序为 N 端-C 端,位置是相对于膜的位置

Note: TMEM26; transmembrane protein 26; The sequence of amino acid residue was N-terminal to C-terminal, and the position was relative to cell membrane

2.2 TMEM26 在视网膜中的表达

在人视网膜中, TMEM26 主要在视网膜的外丛状层(outer plexiform layer, OPL)和 IPL 特异性表达,且不在细胞核内表达(图 2)。在小鼠的视网膜切片中, Tmem26 的表达情况与人视网膜的表达情况相似,主要表达在视网膜的 OPL 和 IPL,且不在细胞核内表达(图 3)。Isolectin B4 染色结果显示, Tmem26 不在血管细胞中表达(图 4)。

2.3 TMEM26 基因的 SNP 分析与 POAG 关联情况

由于 TMEM26 蛋白在视网膜中的表达集中在 IPL 及 OPL, 比较特殊, 为了探讨该基因是否与眼病有关, 我们基于本课题组已发表的全基因组关联分析数据^[11], 探讨了 TMEM26 与 POAG 的关系。在 1 007 例具有高眼压特征的 POAG 患者样本与 1 009 例正常人样本的关联分析结果中, 发现 TMEM26 区域的 26 个 SNP 位点, 与 POAG 存在弱相关性 ($P < 0.05$), 其中 10:63203054 位点信号最强 ($P = 0.0017, OR = 0.76$), 提示该区域对 POAG 可能具有弱保护作用(表 2)。

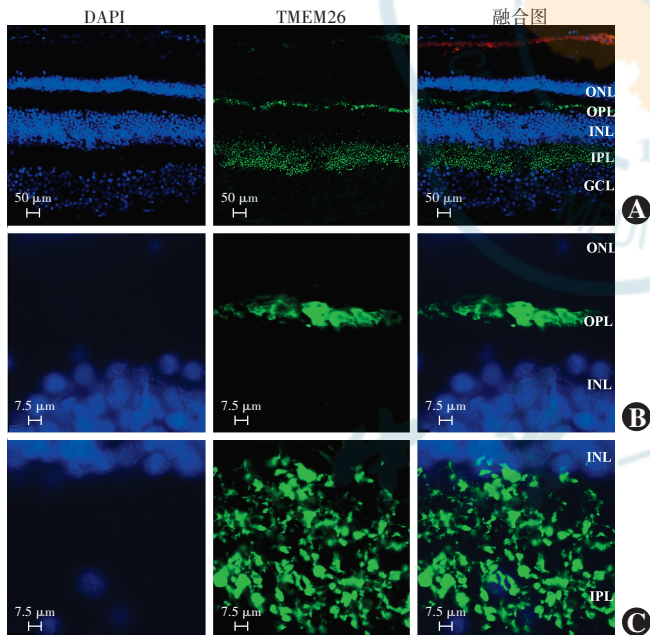


图 2 TMEM26 在人视网膜中的表达 TMEM26 阳性细胞呈绿色荧光(Alexa Fluor 488), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A: TMEM26 在视网膜的整体表达情况 主要在 OPL 和 IPL 表达 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: TMEM26 在 OPL 的表达情况 ($\times 630$, 标尺 = $7.5 \mu\text{m}$) C: TMEM26 在 IPL 的表达情况 ($\times 630$, 标尺 = $7.5 \mu\text{m}$) DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; TMEM26: 跨膜蛋白 26; ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; INL: 内核层; IPL: 内丛状层; GCL: 神经节细胞层

Figure 2 Expression of TMEM26 in human retina TMEM26-positive cells showed green fluorescence (Alexa Fluor 488), and nuclei presented blue fluorescence (DAPI) A: Distribution of TMEM26 in human retina TMEM26 was mainly expressed in OPL and IPL ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) B: Expression of TMEM26 in OPL ($\times 630$, bar = $7.5 \mu\text{m}$) C: Expression of TMEM26 in IPL ($\times 630$, bar = $7.5 \mu\text{m}$) DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; TMEM26: transmembrane protein 26; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer

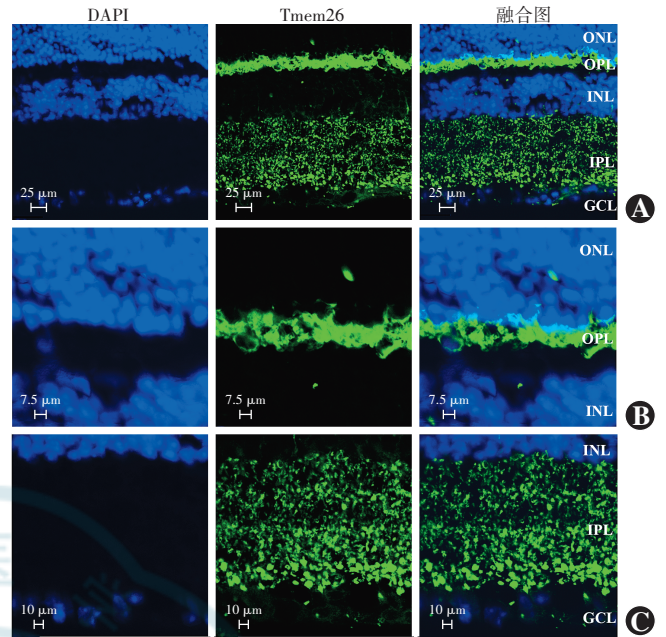


图 3 Tmem26 在小鼠视网膜中的表达 Tmem26 阳性细胞呈绿色荧光(Alexa Fluor 488), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI) A: Tmem26 在视网膜的整体表达情况 主要在 OPL 和 IPL 表达 ($\times 400$, 标尺 = $25 \mu\text{m}$) B: Tmem26 在 OPL 的表达情况 ($\times 630$, 标尺 = $7.5 \mu\text{m}$) C: Tmem26 在 IPL 的表达情况 ($\times 630$, 标尺 = $10 \mu\text{m}$) DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; Tmem26: 跨膜蛋白 26; ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; INL: 内核层; IPL: 内丛状层; GCL: 神经节细胞层

Figure 3 Expression of Tmem26 in mouse retina Tmem26-positive cells showed green fluorescence (Alexa Fluor 488), and nuclei presented blue fluorescence (DAPI) A: Distribution of Tmem26 in mouse retina Tmem26 was mainly expressed in OPL and IPL ($\times 400$, bar = $25 \mu\text{m}$) B: Expression of Tmem26 in OPL ($\times 630$, bar = $7.5 \mu\text{m}$) C: Expression of Tmem26 in IPL ($\times 630$, bar = $10 \mu\text{m}$) DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; Tmem26: transmembrane protein 26; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer

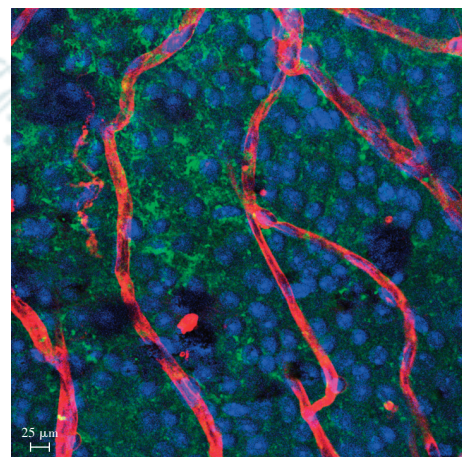


图 4 小鼠视网膜 Tmem26 蛋白与血管定位关系 ($\times 200$, 标尺 = $25 \mu\text{m}$) Tmem26 阳性细胞呈绿色荧光(Alexa Fluor 488), 小鼠视网膜血管呈红色荧光(GS-IB4), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI), 显示 Tmem26 在小鼠血管细胞中未见表达

Figure 4 The co-location of Tmem26 protein and vessels in mouse retina ($\times 200$, bar = $25 \mu\text{m}$) Tmem26-positive cells showed green fluorescence (Alexa Fluor 488), and mouse retinal vessels were red fluorescence (GS-IB4), and nuclei presented blue fluorescence (DAPI). Tmem26 was not expressed in vessel cells of mouse

表 2 10 号染色体上 *TMEM26* 基因在 1 007 例 POAG 患者与 1 009 例正常人中的变异情况
Table 2 Variation of *TMEM26* gene in chromosome 10 among 1 007 POAG cases and 1 009 healthy controls

SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	SE	L95	U95
10:63177991	63177991	T	0.197 9	0.231 6	C	6.752	0.009 363	0.818 5	0.077 13	0.703 7	0.952 1
10:63192407	63192407	A	0.277 6	0.318 6	AT	8.062	0.004 520	0.821 7	0.069 20	0.717 5	0.941 1
10:63192414	63192414	TA	0.282 6	0.322 1	AA	7.412	0.006 480	0.829 0	0.068 90	0.724 3	0.948 9
10:63203054	63203054	C	0.130 8	0.166 0	CA	9.845	0.001 703	0.755 8	0.089 43	0.634 3	0.900 6
10:63205791	63205791	C	0.199 4	0.233 1	T	6.714	0.009 568	0.819 4	0.076 93	0.704 7	0.952 8
10:63206161	63206161	G	0.199 4	0.233 1	C	6.714	0.009 568	0.819 4	0.076 93	0.704 7	0.952 8
10:63206361	63206361	A	0.199 4	0.233 1	G	6.714	0.009 568	0.819 4	0.076 93	0.704 7	0.952 8
10:63216093	63216093	T	0.197 9	0.233 1	A	7.344	0.006 728	0.811 7	0.077 05	0.697 9	0.944 0
10:63221214	63221214	T	0.073 2	0.097 4	C	7.562	0.005 963	0.731 2	0.114 20	0.584 6	0.914 6
10:63221768	63221768	T	0.194 4	0.230 1	C	7.649	0.005 681	0.807 3	0.077 49	0.693 5	0.939 7
10:63230738	63230738	A	0.196 9	0.231 6	T	7.172	0.007 406	0.813 4	0.077 21	0.699 1	0.946 2
10:63232038	63232038	T	0.196 9	0.232 1	C	7.372	0.006 624	0.811 1	0.077 18	0.697 2	0.943 6
10:63233671	63233671	C	0.259 5	0.299 2	G	7.837	0.005 118	0.820 9	0.070 55	0.714 9	0.942 6
10:63236941	63236941	T	0.196 9	0.231 6	G	7.172	0.007 406	0.813 4	0.077 21	0.699 1	0.946 2
10:63240804	63240804	G	0.196 9	0.231 1	GA	6.974	0.008 271	0.815 6	0.077 24	0.701 1	0.948 9
10:63248358	63248358	A	0.196 9	0.231 1	G	6.974	0.008 271	0.815 6	0.077 24	0.701 1	0.948 9
10:63257002	63257002	C	0.209 9	0.247 0	T	7.821	0.005 163	0.809 9	0.075 45	0.698 6	0.939 0
10:63259495	63259495	T	0.209 9	0.247 0	C	7.821	0.005 163	0.809 9	0.075 45	0.698 6	0.939 0
10:63264872	63264872	C	0.195 9	0.233 6	T	8.446	0.003 658	0.799 3	0.077 18	0.687 1	0.929 8
10:63267630	63267630	T	0.207 4	0.244 5	TA	7.891	0.004 969	0.808 5	0.075 75	0.696 9	0.937 9
10:63270969	63270969	A	0.207 4	0.244 0	C	7.687	0.005 563	0.810 7	0.075 77	0.698 8	0.940 5
10:63271946	63271946	AT	0.206 9	0.244 0	A	7.905	0.004 931	0.808 2	0.075 81	0.696 6	0.937 7
10:63280046	63280046	C	0.205 9	0.243 0	G	7.933	0.004 854	0.807 6	0.075 93	0.695 9	0.937 2
10:63281627	63281627	A	0.200 4	0.238 6	G	8.518	0.003 516	0.799 9	0.076 57	0.688 4	0.929 4
10:63286848	63286848	C	0.194 9	0.232 6	A	8.478	0.003 594	0.798 6	0.077 31	0.686 3	0.929 3
10:63286859	63286859	A	0.196 4	0.233 1	C	8.005	0.004 665	0.804 0	0.077 17	0.691 2	0.935 3

注: *TMEM26*: 跨膜蛋白 26; POAG: 原发性开角型青光眼; SNP: 单核苷酸多态性; BP: 碱基对位置 (Hg19); A1: 第一等位基因编码; F_A: 病例等位基因频率; F_U: 对照等位基因频率; A2: 第二等位基因编码; CHISQ: 非随机缺失的 χ^2 检验; P: 固定效应元分析 P 值; OR: 固定效应评估值; SE: 系数的标准差; L95: CMH 检验优势比置信区间的下界; U95: CMH 检验优势比置信区间的上界 (数据来源于文献 [11] 原始数据集)

Note: *TMEM26*: transmembrane protein 26; POAG: primary open-angle glaucoma; SNP: single nucleotide polymorphism; BP: base pairs (Hg19); A1: base of major allele; F_A: allele frequencies of affected patients; F_U: allele frequencies of healthy controls; A2: base of minor allele; CHISQ: χ^2 test; P: P value of fixed effect meta-analysis; OR: assessed value of the fixed effects; SE: standard error of coefficient; L95: lower confidence interval for the odds ratio in Cochran-Mantel-Haenszel test; U95: upper confidence interval for the odds ratio in Cochran-Mantel-Haenszel test (Data were from the original data set of reference 11)

3 讨论

TMEM26 是跨膜蛋白家族中的一员, 亚细胞定位于细胞膜上, 通过免疫组织化学染色观察到该蛋白在细胞质侧表达, 不在细胞核内表达, 其表达模式推测可能为突触, 具有分泌神经递质的作用。膜蛋白对于物质转运、受体识别等具有重要意义, 尤其是跨膜蛋白。多次跨膜的跨膜蛋白的跨膜结构通常可以形成物质转运通道; 起连接作用的跨膜蛋白的亲水性结构域通常也具有调控作用, 如通道开关和蛋白招募等, 因此研究跨膜蛋白的跨膜结构对于理解和探讨跨膜蛋白的功能具有重要意义。人和小鼠 *TMEM26* 跨膜结构的比较

可为动物实验部分的研究提供依据, 并为最终结合到人的眼病提供参考。人和小鼠 *TMEM26* 蛋白结构的细微差别可能表示两者的调控作用以及对于物质的转运存在某些差别, 但其具体意义仍需进一步研究。目前对 *TMEM26* 的研究相对较少, 作为蛋白编码基因, 最常见的转录本是由 6 个外显子构成的约 6 kb 的 mRNA。除此之外, 还有额外的转录本, 如在小鼠中, *Tmem26* 基因外显子 2 和外显子 3 之间还存在一段 82 bp 的外显子 2a, 插入外显子 2a 会导致移码突变, 其最终结果是在外显子 3 中引入早期终止密码子, 使得翻译提前终止, 从而导致 *Tmem26* 表达异常^[3]。

蛋白结构对蛋白功能具有重要意义, 如是否存在

N-端信号肽和 C-端结构域的数量等都将影响蛋白功能^[17]。TMEM26 已被证实在 Jurkat T 细胞和乳腺癌细胞中是一种 N-糖基化蛋白^[7], 这种 N-糖基化修饰的 TMEM26 在质膜上的保留时间比非糖基化修饰的 TMEM26 更长, 证明 N-糖基化的 TMEM26 在质膜上具有重要功能^[4]。Hansel 等^[5]通过 Western blot 在人乳腺癌细胞中检测出 TMEM26 的几种同工蛋白, 主要包括含有 368 个氨基酸的非 N-糖基化蛋白 p40^{TMEM26}, 以及主要的 2 种通过 N-糖基化修饰形成的同工型蛋白 p44^{TMEM26} 和 p53^{TMEM26}^[4]。由于蛋白结构复杂, 预测的 8 次跨膜结构可能存在一定的误差, 如 Town 等^[3]和 Yuan 等^[18]预测 Tmem26 蛋白偏向于 7 次跨膜。TMEM26 具体的跨膜结构仍有待进一步研究。TMEM26 是米色脂肪细胞的表面标志物, 将白色脂肪组织褐变分化成米色脂肪组织是肥胖症十分有效的治疗手段, 其可改善肥胖症患者葡萄糖和脂质代谢, 及改善人类免疫缺陷病毒感染患者的心脏代谢健康, 可用于检测促褐变药物的米色细胞的增量效果^[19-22]。通过 GWAS 分析发现, TMEM26 与睡眠深度、紫杉烷对肺癌的治疗、抗精神病药氯氮平对精神分裂症的治疗、欧美人群儿童对食物过敏、二异氰酸酯哮喘发病机制和血压升高等方面均存在相关性^[23-28]。然而对 TMEM26 在视网膜中的功能研究较少。

位于 RGC 层的 RGC 与感光细胞之间有 2 层神经毡, 即 OPL 和 IPL, 在 OPL 感光细胞与纵向的双极细胞连接, 在 IPL 横向的水平细胞与神经节细胞连接。RGC 通过树突与 OPL 和 IPL 的中间神经细胞形成突触, 并连接到光感受器^[29]。感光细胞负责接受光刺激, 将光信号传递给神经细胞, 并由此经视神经传递中枢神经, 从而产生视觉影像。本研究结果显示, TMEM26 在人和小鼠视网膜 OPL 和 IPL 中特异性表达。因此, 进一步研究 TMEM26 的功能, 特别是其对视网膜以及视觉方面的影响具有重要意义。

根据 TMEM26 在视网膜 OPL 和 IPL 中的特异表达情况, 推测其表达模式主要为突触表达, 可能具有分泌神经递质的作用, 其分泌的神经递质可能会对 RGC 或视神经造成影响。基于结果显示 TMEM26 在 IPL 表达最高, 且 IPL 厚度与 POAG 显著相关^[10], 推测该基因可能与 POAG 有关。检索本课题组已有数据发现 TMEM26 与 POAG 呈弱相关, 但其突变具体的影响机制尚有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果显示, TMEM26 在视网膜 IPL 和 OPL 表达, 且在 IPL 表达最高, 通过该基因的 SNP 和外显子测序结果均显示 TMEM26 与 POAG 呈

弱相关。下一步我们将构建 *Tmem26* 敲除小鼠, 从模式生物角度来研究该基因或蛋白的功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 尹焱: 参与选题与实验设计、实验操作、数据整理、统计分析、论文撰写及修改; 冒瑶: 实验操作、数据整理; 杨正林: 工作支持、实验指导; 黄璐琳: 参与选题与设计实验、实验指导、论文修改及定稿、经费支持

参考文献

- [1] 赵克学, 梁浩勤, 李琼毅, 等. 跨膜蛋白 43 的研究进展[J]. 生物学报, 2019, 36(4): 74-77. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-1736. 2019. 04. 074.
- [2] Zhao KX, Liang HQ, Li QY, et al. Research progress of transmembrane protein 43[J]. J Biol, 2019, 36(4): 74-77. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-1736. 2019. 04. 074.
- [3] Ryu H, Fuwad A, Yoon S, et al. Biomimetic membranes with transmembrane proteins: state-of-the-art in transmembrane protein applications[J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1437 [2021-09-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30901910/>. DOI: 10. 3390/ijms20061437.
- [4] Town L, McGlenn E, Davidson TL, et al. Tmem26 is dynamically expressed during palate and limb development but is not required for embryonic survival[J/OL]. PLoS One, 2011, 6(9): e25228 [2021-09-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21980401/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0025228.
- [5] Nass N, Dittmer A, Hellwig V, et al. Expression of transmembrane protein 26 (TMEM26) in breast cancer and its association with drug response[J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(25): 38408-38426 [2021-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27224909/>. DOI: 10. 18632/oncotarget. 9493.
- [6] Hansel NN, Ruczinski I, Rafaels N, et al. Genome-wide study identifies two loci associated with lung function decline in mild to moderate COPD[J]. Hum Genet, 2013, 132(1): 79-90. DOI: 10. 1007/s00439-012-1219-6.
- [7] Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human[J]. Cell, 2012, 150(2): 366-376. DOI: 10. 1016/j. cell. 2012. 05. 016.
- [8] Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(4): 378-386. DOI: 10. 1038/nbt. 1532.
- [9] 周晓敏, 樊宁, 刘旭阳. 青光眼的分子遗传学研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(3): 263-269. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 03. 016.
- [10] Zhou XM, Fan N, Liu XY. Advances in molecular genetics of glaucoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(3): 263-269. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 03. 016.
- [11] Kim KE, Park KH, Yoo BW, et al. Topographic localization of macular retinal ganglion cell loss associated with localized peripapillary retinal nerve fiber layer defect[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(6): 3501-3508. DOI: 10. 1167/iovs. 14-13925.
- [12] Kim EK, Park HL, Park CK. Segmented inner plexiform layer thickness as a potential biomarker to evaluate open-angle glaucoma: dendritic degeneration of retinal ganglion cell[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182404 [2021-09-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771565/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0182404.

- [11] Chen Y, Lin Y, Vithana EN, et al. Common variants near ABCA1 and in PMM2 are associated with primary open-angle glaucoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10): 1115–1119. DOI: 10.1038/ng.3078.
- [12] Yang J, Shen HB. MemBrain-contact 2.0: a new two-stage machine learning model for the prediction enhancement of transmembrane protein residue contacts in the full chain [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(2): 230–238. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx593.
- [13] Yin X, Yang J, Xiao F, et al. MemBrain: an easy-to-use online webserver for transmembrane protein structure prediction [J/OL]. *Nanomicro Lett*, 2018, 10(1): 2 [2021-09-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30393651/>. DOI: 10.1007/s40820-017-0156-2.
- [14] Xiao F, Shen HB. Prediction enhancement of residue real-value relative accessible surface area in transmembrane helical proteins by solving the output preference problem of machine learning-based predictors [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55(11): 2464–2474. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00246.
- [15] Yang J, Jang R, Zhang Y, et al. High-accuracy prediction of transmembrane inter-helix contacts and application to GPCR 3D structure modeling [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(20): 2579–2587. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt440.
- [16] Shen H, Chou JJ. MemBrain: improving the accuracy of predicting transmembrane helices [J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2399 [2021-09-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18545655/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0002399.
- [17] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model; application to complete genomes [J]. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567–580. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- [18] Yuan Z, Mattick JS, Teasdale RD. SVMtm: support vector machines to predict transmembrane segments [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(5): 632–636. DOI: 10.1002/jcc.10411.
- [19] Finlin BS, Memetimin H, Confides AL, et al. Human adipose beiging in response to cold and mirabegron [J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(15): e121510 [2021-09-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30089732/>. DOI: 10.1172/jci.insight.121510.
- [20] Lone J, Parry HA, Yun JW. Nobiletin induces brown adipocyte-like phenotype and ameliorates stress in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Biochimie*, 2018, 146: 97–104. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.11.021.
- [21] de Jong JM, Larsson O, Cannon B, et al. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers [J/OL]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308(12): e1085–e1105 [2021-09-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25898951/>. DOI: 10.1152/ajpendo.00023.2015.
- [22] Torriani M, Srinivasa S, Fitch KV, et al. Dysfunctional subcutaneous fat with reduced dicer and brown adipose tissue gene expression in HIV-infected patients [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(3): 1225–1234. DOI: 10.1210/jc.2015-3993.
- [23] Spada J, Scholz M, Kirsten H, et al. Genome-wide association analysis of actigraphic sleep phenotypes in the LIFE Adult Study [J]. *J Sleep Res*, 2016, 25(6): 690–701. DOI: 10.1111/jsr.12421.
- [24] Niu N, Schaid DJ, Abo RP, et al. Genetic association with overall survival of taxane-treated lung cancer patients—a genome-wide association study in human lymphoblastoid cell lines followed by a clinical association study [J/OL]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 422 [2021-09-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23006423/>. DOI: 10.1186/1471-2407-12-422.
- [25] Legge SE, Hamshere ML, Ripke S, et al. Genome-wide common and rare variant analysis provides novel insights into clozapine-associated neutropenia [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(10): 1502–1508. DOI: 10.1038/mp.2016.97.
- [26] Hong X, Hao K, Ladd-Acosta C, et al. Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6304 [2021-09-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25710614/>. DOI: 10.1038/ncomms7304.
- [27] Yucesoy B, Kaufman KM, Lumms ZL, et al. Genome-wide association study identifies novel loci associated with diisocyanate-induced occupational asthma [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 146(1): 192–201. DOI: 10.1093/toxsci/kfv084.
- [28] Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(6): 666–676. DOI: 10.1038/ng.361.
- [29] Kim EK, Park HL, Park CK. Relationship between retinal inner nuclear layer thickness and severity of visual field loss in glaucoma [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5543 [2021-09-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28717139/>. DOI: 10.1038/s41598-017-05282-4.

(收稿日期: 2021-10-12 修回日期: 2022-02-08)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

尼目克司(醋甲唑胺片) 杭州仟源保灵药业有限公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……后插页

递法明片 惠州市百吉瑞医药有限公司……后插页

中华医学会杂志社英文系列期刊 《中华医学杂志》社有限责任公司……后插页

中华医学期刊全文数据库 《中华医学杂志》社有限责任公司……后插页

欧蓝(人工晶状体) 天津高视晶品医疗技术有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底