

# 基于串联质谱标签技术的甲状腺相关眼病 眼外肌蛋白组学研究

孟庆媛 梁舒婷 王毅 王乐今 赵明威 吴夕

北京大学人民医院眼科 眼视光中心 眼病与视光医学研究所 视网膜脉络膜疾病诊治研究  
北京市重点实验室 北京大学医学部眼视光学院, 北京 100044

通信作者: 吴夕, Email: doctorwuxi@126.com

**【摘要】** **目的** 使用串联质谱标签(TMT)方法筛选甲状腺相关眼病(TAO)继发限制性斜视患者和共同性斜视患者的眼外肌差异表达蛋白。**方法** 收集 2019 年 8 月至 2020 年 12 月于北京大学人民医院眼科诊断为 TAO 继发限制性斜视并行斜视矫正术 5 例患者的眼外肌标本, 收集同期 5 例共同性内斜视行斜视矫正术患者的眼外肌作为对照。采用基于 TMT 的蛋白质组学技术, 对 TAO 组和对照组眼外肌的差异表达蛋白进行筛选及生物信息学分析。设定倍数变化  $\geq 1.2$  或  $\leq 0.83$  且  $P$  值  $< 0.05$  作为筛选差异表达蛋白的阈值。利用 UniProtGOA 蛋白数据库和 STRING 蛋白网络互作数据库分析差异表达蛋白的基因本体(GO)注释、KEGG 通路富集和蛋白-蛋白相互作用关系。**结果** TAO 组与对照组眼外肌总差异表达蛋白数量为 53 个, 其中表达上调蛋白 34 个, 表达下调蛋白 19 个。通过 GO 注释发现, 按其生物学过程分类, 这些差异表达蛋白主要参与了对刺激的反应过程、多细胞生物过程、代谢过程、发育过程、细胞内信号转导、正向生物调控过程; KEGG 通路富集分析发现差异表达蛋白主要参与了局部黏附、紧密连接、细胞骨架调控、凋亡等通路。蛋白-蛋白相互作用分析发现肌球蛋白重链 2、肌球蛋白重链 7、肌球蛋白调节轻链、 $\alpha$  辅肌动蛋白 2、纤维蛋白原  $\alpha$  链和纤维蛋白原  $\beta$  链 6 个关键蛋白。**结论** TAO 继发限制性斜视患者与共同性斜视患者的眼外肌中蛋白表达存在差异, 肌球蛋白、辅肌动蛋白、细丝蛋白可能通过参与细胞骨架调控、局部黏附等参与 TAO 的发病机制。

**【关键词】** 甲状腺相关眼病; 限制性斜视; 蛋白组学; 质谱分析法

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2020YFC2008200)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210802-00442

## Proteomic analysis of extraocular muscles from patients with thyroid-associated ophthalmopathy by tandem mass tag

Meng Qingyu, Liang Shuting, Wang Yi, Wang Lejin, Zhao Mingwei, Wu Xi

Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Eye Diseases and Optometry Institute, Beijing Key Laboratory of Diagnosis and Therapy of Retinal and Choroid Diseases, College of Optometry, Peking University Health Science Center, Beijing 100044, China

Corresponding author: Wu Xi, Email: doctorwuxi@126.com

**【Abstract】** **Objective** To identify the proteins differentially expressed in extraocular muscles between restrictive strabismus patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and concomitant esotropia patients by proteomic analysis using tandem mass tag (TMT). **Methods** Extraocular muscles samples from 5 restrictive strabismus patients with TAO and 5 concomitant esotropia patients were collected at Peking University People's Hospital from August 2019 to December 2020. All the patients received strabismus surgery. Differentially expressed proteins (DEPs) in extraocular muscles samples were identified by quantitative proteomic analysis and bioinformatic analysis based on TMT. Fold change  $\geq 1.2$  or  $\leq 0.83$  and  $P$  value  $< 0.05$  was regarded as the threshold to screen DEPs. GO annotation, KEGG pathways enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) network of DEPs were conducted through UniProtGOA and STRING. This study protocol was approved by the Ethics Committee of Peking University People's Hospital (No. 2021PHB058-001). **Results** A total of 53 DEPs were identified, 34 of which were up-regulated and 19 were down-regulated. The biological processes DEPs mainly participated included response to stimulation, multicellular organismal process, metabolism, developmental process, intracellular signal transduction, and positive regulation of biological process. DEPs were involved in pathways including focal adhesion,

tight junction, regulation of action cytoskeleton, and apoptosis. Six key proteins identified using PPI network were myosin heavy chain 2, myosin heavy chain 7, myosin regulatory light chain,  $\alpha$ -actinin-2, fibrinogen alpha chain and fibrinogen beta chain. **Conclusions** There are DEPs in extraocular muscles between restrictive strabismus patients with TAO and concomitant esotropia patients. Myosin, actinin and filamin may be involved in the pathogenesis of TAO through regulation of actin cytoskeleton and focal adhesion.

**[Key words]** Thyroid-associated ophthalmopathy; Strabismus, restrictive; Proteomics; Tandem mass tag

**Fund program:** National Key R&D Program of China (2020YFC2008200)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210802-00442

甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy, TAO) 为自身免疫性疾病<sup>[1-2]</sup>。眼外肌和眶脂肪等眼眶内组织以及甲状腺组织是免疫反应攻击的靶目标,可致眼外肌纤维瘢痕化、失去弹性和眶内软组织增容,进而导致不同程度眼球突出、眼睑闭合不全、眼睑退缩迟滞,甚至压迫性视神经病变等系列眼部特征<sup>[3]</sup>。TAO 常累及下直肌及内直肌,形成限制性下斜视和内斜视<sup>[4]</sup>。TAO 患者常出现明显复视,严重影响患者的生活质量。TAO 的具体致病机制尚不明确<sup>[5-6]</sup>。串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 是一种多肽体外标记技术,采用多重同位素标签与肽段的氨基发生共价结合反应,可实现同时对 10 个不同样品中蛋白质的定性和定量分析。TMT 具有定量准确、重复性好、灵敏度高优点,被广泛用于差异表达蛋白分析研究中<sup>[7]</sup>。本研究拟采用蛋白质同位素标记定量分析技术联合液相色谱 TMT 技术对 TAO 继发限制性斜视眼外肌和共同性斜视眼外肌进行测定,筛选差异表达蛋白,并对这些蛋白的功能进行生物信息学分析,找出参与 TAO 发生和发展的潜在生物标志物,为进一步研究 TAO 的发病机制提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2019 年 8 月至 2020 年 12 月于北京大学人民医院眼科诊断为 TAO、限制性斜视并行斜视矫正术患者共 5 例,术中收集眼外肌标本。纳入同期共同性内斜视并行斜视矫正术患者 5 例,术中收集眼外肌标本作为对照组。本研究方案经北京大学人民医院伦理委员会批准 (批文号:2021PHB058-001)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 TMT 标记与质谱检测

**1.2.1.1 蛋白质酶解** 取各组肌肉标本与裂解液和 2 粒钢珠放入研磨机研磨进行组织裂解,于 4 °C 条件下 20 000×g 离心 30 min,取上清;加入 4 倍体积预冷的 TCA-丙酮,−20 °C 沉淀 2 h 以上;4 °C 条件下 20 000×g 离心 30 min,加入 3 倍体积的纯丙酮,−20 °C 沉淀

20 min;4 °C 条件下 20 000×g 离心 30 min,此操作重复 3 次,清洗沉淀。在沉淀中加入裂解液,超声 5 min 助溶,超声条件为超声 2 s,间隔 3 s,功率 180 W;4 °C 条件下 20 000×g 离心 30 min,取上清,并采用 Bradford 法测定样本蛋白质量浓度。每组样本取 30 μg 裂解液,加入到 10K 超滤管中,于 4 °C 条件下 14 000×g 离心 40 min,弃废液;加入 200 μl 质量分数 50% 四乙基溴化铵 (triethylammonium bicarbonate, TEAB),于 4 °C 条件下 14 000×g 离心 40 min,弃废液。重复上述步骤 2 遍,加入 1 μg/μl 胰蛋白酶 Trypsin,每 100 μg 蛋白底物加入 3.3 μg 酶,37 °C 水浴 24 h。冻干消化液,每管使用 25 μl 100 mmol/L TEAB 复溶肽段。

**1.2.1.2 肽段 TMT 标记** 从 4 °C 取出标记试剂,并将其平衡至室温,每管标记试剂中加入 41 μl 乙腈,涡旋 1 min。将混好的标记试剂加入到肽段中,不同样品用不同大小的同位素标记,混匀并室温静置 1 h;加入 8 μl 质量分数 5% 羟胺,室温静置 15 min。将样品混合并真空抽干。

**1.2.1.3 反相高效液相色谱分离** 色谱柱为 phenomenex Luna SCX 250 mm×4.60 mm 100Å,流动相中水相为 95% H<sub>2</sub>O+5% 乙腈,有机相为 95% 乙腈+5% H<sub>2</sub>O,均用氨水调至 pH=9.8。取 1.2.1.2 步骤抽干的样品,用 1 ml 水相溶解,4 °C 条件下 15 000×g 离心 10 min,收集上清进行梯度洗脱,得到预分离的色谱图。出峰 1 min 后开始收集洗脱液,每 30 s 收集 1 管,将 130 min 洗脱液合并成 10 个组分并进行真空抽干。

**1.2.1.4 质谱检测及差异蛋白筛选** 使用高精度液质联用型质谱 (Q-Exactive-Orbitrap, 美国 Thermo Fisher 公司) 检测肽段信号,扫描质谱完成后得到质谱信号总图,再将其转换为 mgf 文件。应用 Mascot 软件 (MASCOT 2.3.01) 进行定性检索与定量分析。使用 Swiss Human 数据库物种名称,并用错误发现率 <1% 的标准对蛋白鉴定结果进行过滤。肽段相对定量根据离子的相对丰度,蛋白相对定量结果根据肽段相对定量结果统计得出。差异蛋白质的筛选标准为同一蛋白在某一组相对于另一组的差异倍数 >1.2 倍或 <0.83 倍,且  $P < 0.05$ 。

1.2.2 生物信息学分析

1.2.2.1 蛋白注释方法 基于 UniProtGOA 数据库对差异表达蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析注释。使用基于蛋白序列算法的软件 Proteome Discoverer 1.4 以及相应的 InterPro 结构域数据库对鉴定的差异表达蛋白进行蛋白结构域注释。

1.2.2.2 蛋白质功能富集 蛋白质的功能富集分为 GO 富集分析、通路富集分析以及蛋白结构域富集分析 3 个部分。蛋白的 GO 注释被分为生物进程、细胞组分和分子功能。以鉴定到的蛋白为背景, 采用 Fisher 精确检验评价差异表达蛋白。GO 富集检验以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。利用 InterPro 数据库分析差异表达蛋白功能结构域的富集情况。结构域单元富集检验以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

1.2.2.3 蛋白质相互作用网络分析 以 STRING (V. 10.5) 蛋白网络互作数据库为参照, 将来源于不同比较组中的差异蛋白数据库编号或蛋白序列与之对比, 按照置信度  $> 0.7$  (高置信度) 提取得到差异蛋白互作关系。并用 CytoScape 软件 (版本号: 3.2.1) 生成相互作用网络连接。

2 结果

2.1 差异蛋白筛选

鉴定到总肽段谱图数量为 24 265, 肽段数量为 9 140, 唯一肽段数量为 8 011, 蛋白质数量为 1 697。TAO 组与对照组总差异表达蛋白数量 53 个, 其中上调蛋白 34 个, 下调蛋白 19 个 (表 1)。蛋白质定量火山图见图 1。

表 1 TAO 组与对照组眼外肌的差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in extraocular muscular samples of thyroid-associated ophthalmopathy patients

UniProt 数据库编号	蛋白名称	P 值	TAO 组/对照组 倍数变化	UniProt 数据库编号	蛋白名称	P 值	TAO 组/对照组 倍数变化
P02743	Serum amyloid P-component	0.013 4	3.41	P02790	Hemopexin	0.017 8	1.81
B3KVN0	Solute carrier family 2	0.046 3	3.23	P32119	Peroxisiredoxin-2	0.000 2	1.75
A0A140VJJ6	Testicular tissue protein Li 70	<0.000 1	3.18	A0A3B3ISX9	Tenascin-X	0.015 5	1.71
P02671	Fibrinogen alpha chain	<0.000 1	2.86	P01024	Complement C3	0.001 4	1.66
P02042	Hemoglobin subunit delta	0.004 7	2.87	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	0.000 3	1.63
Q6VFFQ6	Hemoglobin beta chain (fragment)	0.033 8	2.87	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.002 4	1.51
P00918	Carbonic anhydrase 2	0.000 1	2.77	Q13228	Selenium-binding protein 1	0.045 0	1.41
Q9UK54	Hemoglobin beta subunit variant (fragment)	0.000 2	2.76	P21333	Filamin-A	0.000 1	1.40
A0A1S5UZ39	Hemoglobin subunit alpha	<0.000 1	2.65	P00738	Haptoglobin	0.041 4	1.37
Q05DK5	ADD2 protein (fragment)	0.020 0	2.64	A0A087WTA8	Collagen alpha-2(I) chain	0.041 1	0.80
G4V2I8	Anion exchange protein	0.000 2	2.60	Q15149	Plectin 1	0.023 7	0.65
P02760	Protein AMBP	0.042 9	2.50	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	0.013 4	0.51
P02675	Fibrinogen beta chain	<0.000 1	2.45	Q14315	Filamin-C	0.037 4	0.47
A0A024R9Q1	Thrombospondin 1, isoform CRA_a	0.021 4	2.43	A6NGQ3	Obscurin	0.014 2	0.44
A0A024R462	Fibronectin 1, isoform CRA_n	0.002 6	2.26	B4DFP1	Phosphoglucosyltransferase-1	0.045 2	0.42
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	0.000 9	2.25	P40925	Malate dehydrogenase	0.036 9	0.40
P00915	Carbonic anhydrase 1	<0.000 1	2.23	D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	<0.000 1	0.39
Q4VB86	EPB41 protein	0.045 5	2.21	Q9Y2K3	Myosin heavy chain 15	0.000 6	0.37
P16157	Ankyrin-1	0.001 2	2.21	A0A087X0T3	Myosin heavy chain 7B	0.000 2	0.34
C0JYY2	Apolipoprotein B (including Ag(X) antigen), isoform CRA_a	0.003 4	2.18	P35609	Alpha-actinin-2	0.001 7	0.34
B4E1D8	C4b-binding protein alpha chain	0.036 2	2.17	P52179	Myomesin-1	0.024 9	0.32
P04040	Catalase	0.000 4	2.14	P12883	Myosin heavy chain 7	0.000 3	0.29
Q4ZGM8	Hemoglobin alpha-2 globin mutant (fragment)	0.001 0	2.09	A0A384NPX1	Epididymis secretory sperm binding protein	0.016 5	0.29
B2RMS9	Inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma kallikrein-sensitive glycoprotein)	0.038 2	1.98	P06732	Creatine kinase M-type	0.010 3	0.29
P30043	Flavin reductase (NADPH)	0.008 6	1.88	Q9UKX2	Myosin heavy chain 2	<0.000 1	0.27
				B4DRW6	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	0.008 2	0.26
				O14983	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	0.010 5	0.26
				Q96A32	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	0.022 2	0.23

注: TAO: 甲状腺相关眼病

Note: TAO: thyroid-associated ophthalmology

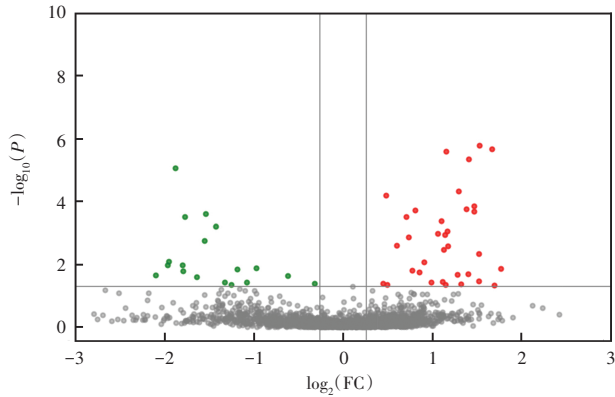


图 1 差异表达蛋白火山图 红点代表表达上调蛋白,绿点代表表达下调蛋白,灰点代表无显著差异表达蛋白 FC:差异倍数

Figure 1 Volcano plot of differentially expressed proteins Red dots represented up-regulated proteins, and green ones indicated down-regulated proteins. Gray dots were proteins with no significant difference in expression FC:fold change

## 2.2 差异表达蛋白功能信息学分析

2.2.1 差异表达蛋白 GO 分析 从分子功能上看,差异表达蛋白具有结合和转运的功能;按生物学过程分

类,这些蛋白主要参与了对刺激的反应过程、多细胞生物过程、代谢过程、发育过程、细胞内信号转导、正向生物调控过程;按细胞构成分类,这些蛋白主要定位于细胞内、胞浆、细胞外区域、细胞质中(图 2)。

2.2.2 差异表达蛋白 KEGG 通路富集分析 细胞过程分类显示,差异表达蛋白主要参与雌激素信号通路、心肌细胞肾上腺能信号、心肌收缩、白细胞前移、胃酸分泌、寿命调节通路、血小板及胰液分泌;环境信息处理分类显示,差异表达蛋白主要参与糖化、氨基酸核磁、丙酮酸代谢、TCA 代谢循环、维生素 B12 代谢、氮代谢、碳代谢。人类疾病分类显示,差异表达蛋白主要参与阿尔兹海默症、肥厚性心肌病、扩张性心肌病、病毒性心肌病等;新陈代谢分类显示,差异表达蛋白主要参与钙通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、MAPK 信号通路;生物体系统分类显示,差异表达蛋白主要参与局部黏附、紧密连接、细胞骨架调控、吞噬、凋亡等通路(图 3)。其中显著富集的通路及相应差异蛋白见表 2。

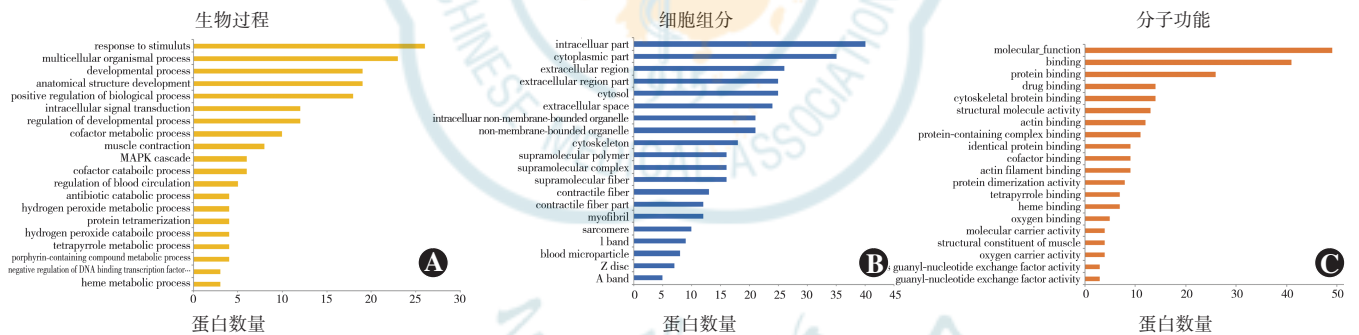


图 2 差异表达蛋白 GO 分析 A:生物过程分析 B:细胞组分分析 C:分子功能分析

Figure 2 Gene Ontology annotation for differentially expressed proteins A:Biological process B:Cellular component C:Molecular function

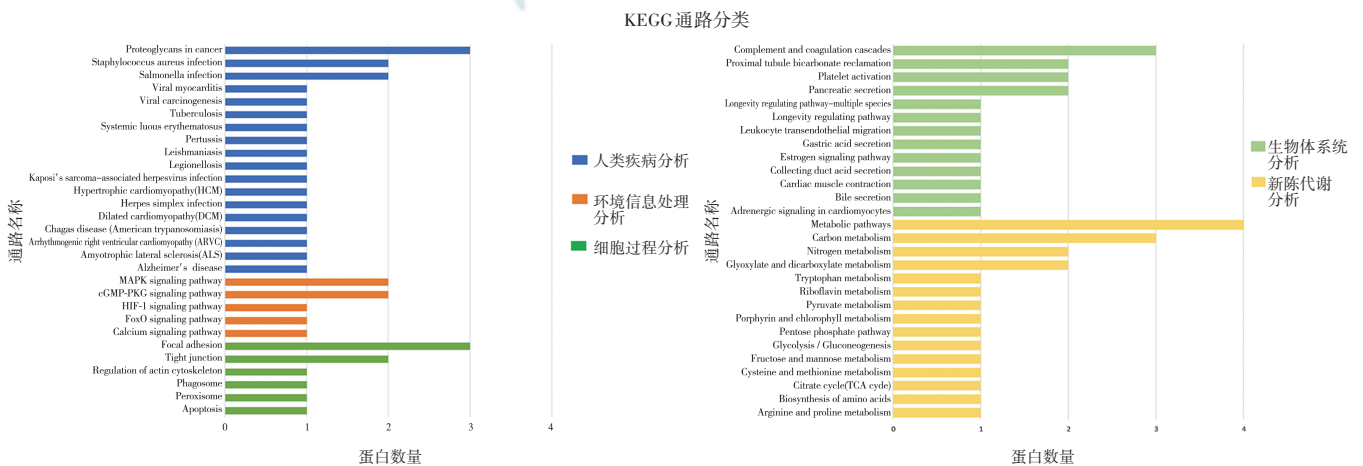


图 3 差异表达蛋白的 KEGG 富集通路分析

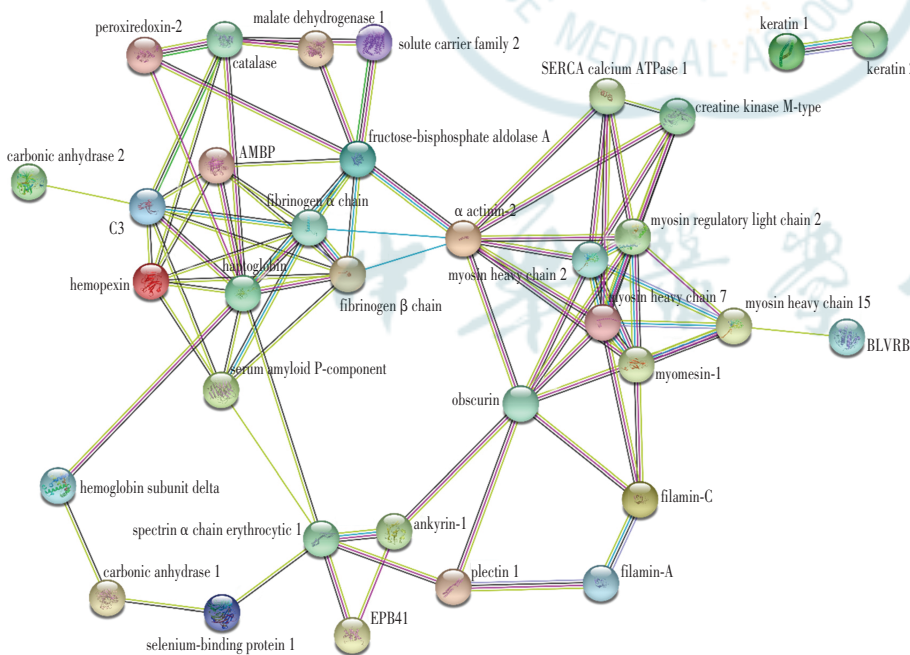
Figure 3 KEGG pathway analysis of differentially expressed proteins

**表 2 KEGG 显著富集通路**  
**Table 2 Significantly enriched KEGG pathways**

通路名称	差异蛋白名称	差异蛋白数量
代谢通路	Flavin reductase (NADPH), Creatine kinase M-type, Fructose-bisphosphate aldolase A, Malate dehydrogenase	4
碳代谢	Catalase, Fructose-bisphosphate aldolase A, Malate dehydrogenase	3
局部黏附	Filamin-C, Filamin-A, Myosin regulatory light chain 2	3
紧密连接	Myosin heavy chain 2, Myosin heavy chain 15	2
MAPK 信号通路	Filamin-C, Filamin-A	2
cGMP-PKG 信号通路	Myosin heavy chain 7, Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	2

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

**2.2.3 蛋白蛋白相互作用的调控网络** 形成了一包含 34 个节点和 85 条边的复杂调控网络,平均节点度为 5,聚类系数为 0.524,发现肌球蛋白重链 2(myosin heavy chain 2, MYH2)、MYH7、肌球蛋白调节轻链(myosin regulatory light chain 2, MYLPF)、 $\alpha$  辅肌动蛋白 2( $\alpha$ -actinin-2, ACTN2)、纤维蛋白原  $\alpha$  链(fibrinogen  $\alpha$  chain, FGA)和  $\beta$  链(fibrinogen  $\beta$  chain, FGB)6 个关键蛋白(图 4)。



**图 4 蛋白-蛋白相互作用网络**  
**Figure 4 Protein-protein interaction network**

**3 讨论**

研究认为,TAO 的靶点在眼眶成纤维细胞中,促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor,

TSHR)被认为是 Graves 病的主要自身抗原,与正常对照相比,TAO 患者眼眶成纤维细胞中 TSHR mRNA 的表达升高<sup>[8-9]</sup>。胰岛素样生长因子 1 受体(insulin like growth factor 1 receptor, IGF-1R)是一种跨膜酪氨酸激酶受体,可以与 TSHR 形成物理和功能复合物,激活 cAMP/PKA 通路和 PI3K 通路等下游信号通路,促进眼眶成纤维细胞的活化<sup>[10-11]</sup>。活化的眼眶成纤维细胞增生活性增强,可产生炎症介质,分化为脂肪细胞和肌成纤维细胞,并产生过量的细胞外基质成分<sup>[1,6]</sup>。但目前 TAO 的发病机制尚未明确,本研究应用 TMT 蛋白组学方法对 TAO 继发限制性斜视患者的眼外肌和共同性内斜视患者的眼外肌进行测定和分析,筛选出差异表达蛋白,为深入研究 TAO 的发病机制奠定实验基础。

功能注释分析结果显示,差异表达蛋白主要参与了应激反应、代谢、细胞信号转导等过程。KEGG 通路分析结果显示,差异表达蛋白主要参与了 MAPK 信号通路、FoxO 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、局部黏附通路、细胞骨架调控、细胞凋亡等通路。结合蛋白-蛋白相互作用分析,发现 TAO 潜在的关键蛋白,如 MYH2 和 MYH7、MYLPF、ACTN2 以及 FGA 和 FGB。

肌球蛋白是骨骼肌中分布最丰富的蛋白质,是粗肌丝的主要成分,在肌肉收缩和代谢中起重要作用,也是构成细胞骨架的重要成分。肌球蛋白是由 1 对重链和 2 对轻链构成;而后者则包括 1 对基本轻链和 1 对 MYLPF<sup>[12]</sup>。基本轻链的作用主要是稳定重链结构,调节性轻链 MYLPF 在调节肌球蛋白的活性中发挥作用,肌球蛋白轻链必须缠绕在重链上才能保持其天然的活性构象。既往研究发现,肌球蛋白重链多个亚型以及调节轻链的功能与横纹肌收缩有关<sup>[13-14]</sup>,TAO 患者中的 MYH2、MYH7、MYLPF 表达异常可能影响眼外肌纤维的收缩强度和速度,导致眼外肌功能异常。

肌动蛋白是细胞骨架的另一重要组成成分,其结构相对简单,并与肌球蛋白结合,构成了肌原纤维中的收缩蛋白<sup>[15]</sup>。ACTN2 属于肌动蛋白交联蛋白,位于肌节 Z 盘中,充当反平行肌动蛋白丝之间的连接,并通过结合

N 末端肌动蛋白,加强肌节的稳定性。ACTN 在稳定细胞黏附、调节细胞形状及细胞运动中发挥重要作用。ACTN2 基因突变可导致不同类型先天性肌病的发生<sup>[16]</sup>。本研究发现在 TAO 患者的眼外肌中,ACTN2 水平下调,提示 ACTN2 功能下降,可能破坏眼外肌的肌节稳定性,导致斜视的发生。

纤维蛋白原是由肝细胞合成并分泌的血浆蛋白凝血因子,参与机体凝血系统及感染和炎症过程<sup>[17]</sup>。甲状腺疾病和凝血系统关系密切<sup>[18]</sup>。研究提示纤维蛋白原与促甲状腺激素水平呈负相关,与游离甲状腺素 T3 和 T4 呈正相关<sup>[19]</sup>。本研究发现在 TAO 患者的眼外肌组织中 FGA 和 FGB 表达上调,可能与患者的甲状腺素水平有关。

细丝蛋白属于肌动蛋白结合蛋白,是一种重要的肌动蛋白交联剂<sup>[20]</sup>。细丝蛋白能与肌动蛋白结合,在调控细胞骨架的机械强度及可塑性方面起到重要作用。编码细丝蛋白的 *FLN* 基因突变可引起多个器官发育异常<sup>[21-22]</sup>。近年来研究表明,细丝蛋白在细胞与基质黏附和迁移的过程中起关键作用<sup>[21,23]</sup>。结合本研究的 KEGG 通路富集分析,发现细丝蛋白 A 和细丝蛋白 C 均参与了局部黏附通路和 MAPK 通路。彭娟等<sup>[24]</sup>检测到 TAO 患者眼外肌中黏附分子表达上调,提示细胞黏附通路在 TAO 发病中发挥作用。结合本次研究结果,提示细丝蛋白可能通过影响细胞黏附过程进而参与 TAO 的发生与发展。

既往研究证实, TSHR、IGF-1R、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 以及 IL-10 参与 TAO 的发病机制<sup>[25-26]</sup>。但本研究中,TAO 组和对照组的眼外肌标本中未发现上述分子蛋白存在显著性差异。究其原因,眼外肌样本中 TSHR 免疫染色阳性细胞和 TSHR mRNA 表达在 TAO 疾病早期较高,随着疾病持续时间的延长而减少;同时与活动性 Graves 眼病患者相比,非活动性 Graves 眼病患者眼眶脂肪/结缔组织中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 IL-10 等的 mRNA 表达水平较低<sup>[27-28]</sup>;本研究纳入的均为非活动期 TAO 患者,故 TSHR、IGF-1R、IL-6 和 IL-10 的蛋白表达水平上没有检测到明显差异。

综上,本研究利用 TMT 联合液相色谱串联质谱技术,对 TAO 继发性斜视眼外肌和共同性斜视眼外肌进行测定,筛选出 53 个差异表达蛋白,其中上调蛋白 34 个,下调蛋白 19 个;KEGG 通路富集分析发现差异蛋白主要参与了局部黏附、紧密连接、细胞骨架调控、吞噬、凋亡等通路。未来还需以此次研究结果为基础,开展蛋白功能和信号转导通路的细胞生物学研究

以进一步阐明 TAO 的发病机制,更有助于确定 TAO 治疗的潜在靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 孟庆娣:参与设计实验、实施研究、采集数据、解释数据、起草文章;梁舒婷:参与实施研究、采集数据、统计分析、修改文章;王毅:参与采集数据、指导研究、审阅文章;王乐今:参与采集数据、指导研究、修改文章;赵明威:参与设计实验、指导研究、审阅文章;吴夕:参与设计实验、实施研究、监督研究进展、审阅并修改文章

## 参考文献

- [1] Bahn RS. Graves' ophthalmopathy [J]. N Engl J Med, 2010, 362(8): 726-738. DOI: 10.1056/NEJMra0905750.
- [2] Ginsberg J. Diagnosis and management of Graves' disease [J]. CMAJ, 2003, 168(5): 575-585.
- [3] Subekti I, Pramono LA. Current diagnosis and management of Graves' disease [J]. Acta Med Indones, 2018, 50(2): 177-182.
- [4] Şahlı E, Gündüz K. Thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Turk J Ophthalmol, 2017, 47(2): 94-105. DOI: 10.4274/tjo.80688.
- [5] Taylor PN, Zhang L, Lee R, et al. New insights into the pathogenesis and nonsurgical management of Graves orbitopathy [J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16(2): 104-116. DOI: 10.1038/s41574-019-0305-4.
- [6] Wang ZM, Wang ZY, Lu Y. The role of cell mediated immunopathogenesis in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(7): 1209-1214. DOI: 10.18240/ijo.2019.07.24.
- [7] Moulder R, Bhosale SD, Goodlett DR, et al. Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling [J]. Mass Spectrom Rev, 2018, 37(5): 583-606. DOI: 10.1002/mas.21550.
- [8] Menconi F, Marocci C, Marinò M. Diagnosis and classification of Graves' disease [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4-5): 398-402. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.013.
- [9] Douglas RS, Afifiyan NF, Hwang CJ, et al. Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 430-438. DOI: 10.1210/jc.2009-1614.
- [10] Smith TJ, Janssen J. Insulin-like growth factor-I receptor and thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Endocr Rev, 2019, 40(1): 236-267. DOI: 10.1210/er.2018-00066.
- [11] 代佳灵, 何为民, 罗梦绮. 胰岛素样生长因子-1 对甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞的促生长作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(9): 805-810. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.008.
- [12] Dai JL, He WM, Luo MQ. Promoting effects of insulin-like growth factor-1 on proliferation of orbital fibroblasts derived from thyroid associated ophthalmopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(9): 805-810. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.008.
- [13] Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions [J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(6): 500-509. DOI: 10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7.
- [14] Wu L, Zhang S, Li X, et al. Integrative transcriptomics and proteomic analysis of extraocular muscles from patients with thyroid-associated ophthalmopathy [J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 193: 107962 [2021-11-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32057773. DOI: 10.1016/j.exer.2020.107962.
- [15] Hoh J. Myosin heavy chains in extraocular muscle fibres; distribution, regulation and function [J/OL]. Acta Physiol (Oxf), 2021, 231(2): e13535 [2021-11-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32640094. DOI: 10.1111/apha.13535.
- [16] Sweeney HL, Houdusse A, Robert-Paganin J. Myosin structures [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1239: 7-19. DOI: 10.1007/978-3-030-38062-5\_2.
- [17] Ranta-Aho J, Olive M, Vandroux M, et al. Mutation update for the ACTN2 gene [J/OL]. Hum Mutat, 2022 [2022-09-21]. http://

- pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/36116040. DOI:10. 1002/humu. 24470.
- [17] Litvinov RI, Pieters M, de Lange-Loots Z, et al. Fibrinogen and fibrin [J]. Subcell Biochem, 2021, 96 : 471-501. DOI: 10. 1007/978-3-030-58971-4\_15.
- [18] Elbers L, Fliers E, Cannegieter SC. The influence of thyroid function on the coagulation system and its clinical consequences [J]. J Thromb Haemost, 2018, 16(4) : 634-645. DOI:10. 1111/jth. 13970.
- [19] Ellervik C, Mora S, Kuś A, et al. Effects of thyroid function on hemostasis, coagulation, and fibrinolysis: a mendelian randomization study [J]. Thyroid, 2021, 31(9) : 1305-1315. DOI: 10. 1089/thy. 2021. 0055.
- [20] Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(2) : 138-145. DOI:10. 1038/35052082.
- [21] Zhou J, Kang X, An H, et al. The function and pathogenic mechanism of filamin A [J/OL]. Gene, 2021, 784 : 145575 [2021-11-25]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33737122. DOI: 10. 1016/j. gene. 2021. 145575.
- [22] Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins: organizers of cell structure and function [J]. Cell Adh Migr, 2011, 5(2) : 160-169. DOI: 10. 4161/cam. 5. 2. 14401.
- [23] Lamsoul I, Dupré L, Lutz PG. Molecular tuning of filamin A activities in the context of adhesion and migration [J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8 : 591323 [2021-11-25]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33330471. DOI: 10. 3389/fcell. 2020. 591323.
- [24] 彭娟, 许雪亮. 甲状腺相关眼病眼外肌组织黏附分子表达的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2007, 25(7) : 522-525. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2007. 07. 014.
- Peng J, Xu XL. Expression of intercellular adhesion molecule in extraocular muscles with thyroid associated ophthalmopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2007, 25(7) : 522-525. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2007. 07. 014.
- [25] Huang D, Xu N, Song Y, et al. Inflammatory cytokine profiles in the tears of thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250(4) : 619-625. DOI: 10. 1007/s00417-011-1863-x.
- [26] Shen J, Li Z, Li W, et al. Th1, Th2, and Th17 cytokine involvement in thyroid associated ophthalmopathy [J/OL]. Dis Markers, 2015, 2015 : 609593 [2021-11-30]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/26089587. DOI:10. 1155/2015/609593.
- [27] Boschi A, Ch D, Spiritus M, et al. Quantification of cells expressing the thyrotropin receptor in extraocular muscles in thyroid associated orbitopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89(6) : 724-729. DOI: 10. 1136/bjo. 2004. 050807.
- [28] Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, et al. TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2003, 58(3) : 280-287. DOI: 10. 1046/j. 1365-2265. 2003. 01708. x.

(收稿日期:2022-03-13 修回日期:2022-09-23)

(本文编辑:张宇 骆世平)

## 消息

## 中译版《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》出版发行

英文原著《Ryan's Retina Sixth Edition》是誉冠全球的经典视网膜研究专著,自 1989 年首版以来,一直被欧洲和美国的眼底病医生誉为眼底病领域的“圣经”,至今已 5 次再版,目前为第 6 版。中译版《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》由首都医科大学附属北京同仁医院眼科周楠博士独立翻译,由北京同仁医院眼科魏文斌教授主审,并有幸邀请学贯中西的惠延年教授为此译本做序,将于 2022 年 6 月 6 日(国际爱眼日)正式出版发行。

原著《Ryan's Retina Sixth Edition》由 Andrew P. Schachat, C. P. Wilkinson, David R. Hinton, Srinivas R. Sadda, Peter Wiedemann 等教授联合国际著名眼底病领域的专家倾力编著,是国际上公认为经典、实用的关于眼底病诊断与治疗的眼科学巨著,由 Elsevier 出版社出版,目前仅第 4 版有中文译版。本译著为原书第 6 版中译版,周楠博士在翻译过程中秉承认真、严谨的科学态度,力求在忠于原著的基础上做到信·达·雅。

该书分为上、中、下 3 卷本,共 159 篇。上卷共 4 篇 41 章,对视网膜影像及诊断、解剖学及生理学、视网膜损伤机制、遗传学、基础科学及临床转化进行深入论述;中卷共 55 章,详尽阐释视网膜变性和营养不良、视网膜血管病、脉络膜血管/Bruch 膜病、炎症性病变/葡萄膜炎及药物相关、光损伤、妊娠相关、视盘发育异常及外伤性视网膜病变的发生机制和诊疗方法;下卷共 63 章,详细介绍视网膜脱离巩膜扣带手术和玻璃体切除手术方法和机制以及视网膜、脉络膜和玻璃体肿瘤的诊疗原则和临床实践。

该书全面展示当今眼底病检查、诊断、治疗的最新理念和技术,代表了目前国际眼底病临床诊疗和应用基础进展的前沿研究,新版原著在既往经典知识的基础上更新了国际上相关的标准诊疗规范,增加了近年来眼科在 OCTA、视网膜干细胞移植、人工视网膜、人工智能等里程碑式突破性创新的国际前沿科技知识和进展,融入了创新药物的临床试验结果,是眼底病知识体系经典与创新的融合和发展。

该书是国际经典眼科学译著,由中国科学技术出版社出版,印刷精美,包含大量高清美图,便于广大眼科医师直观地理解深奥的眼科学知识和手术的精细操作,是眼科研究生、住院医师和视网膜内、外科医生学习眼底病基础知识和最新临床实践的力作。

《RETINA RYAN 视网膜(原书第 6 版)》共 2 683 页,铜版纸彩色印刷,定价 1 980 元;全国各大书店和网上商城均可订购。

(本刊编辑部)

