

生物信息学方法对地塞米松致开角型青光眼潜在靶基因的确定和分析

刘丽玲 李德玲 曾伟婷 张心怡 徐建刚 余敏斌

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东省眼科视觉科学重点实验室, 广州 510060

通信作者: 余敏斌, Email: yuminbin@mail.sysu.edu.cn

【摘要】 目的 利用生物信息学方法寻找地塞米松致开角型青光眼的潜在靶基因。方法 在 GEO 数据库检索激素类青光眼相关数据集, 选取数据集 GSE16643、GSE37474 和 GSE124114, 采用 GEO2R 分析, 对 GSE37474 和 GSE124114 差异表达数据进行 GSEA 分析, 并对 3 个数据集差异表达数据绘制 Venn 图取 3 个交集数据集, 通过基因本体论 (GO)/京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 对交集基因注释和富集分析并比对 GTEx Portal 的正常组织, 通过 STRING 得到对应的蛋白网络, 最后将找到的候选基因在 UCSC 和 JASPAR 上查找转录因子。将人眼原代小梁细胞分为地塞米松组和对照组, 分别用 500 nmol/L 地塞米松 2 ml 和等体积乙醇溶液培养 7 d, 采用 Western blot 法检测小梁细胞中 BDKRB1 和 TAGLN 蛋白表达。结果 GSEA 分析 GSE37474 和 GSE124114 数据集差异基因在补体和凝血级联通路富集; 3 个数据集共有的基因有 89 个, 通过 GO 分析发现这些基因主要是调控细胞外基质胶原形成, GO 分析得分最高、含有胶原的细胞外基质的基因在 GTEx Portal 找到与成纤维细胞有关。通过 STRING 蛋白互作网络分析关键基因簇发现, ACTA2、MYL9、TAGLN、LMOD1 间关系密切。UCSC 和 JASPAR 上查找到 BDKRB1、NID1、MFGE8 和 TAGLN 的转录因子 SP1。地塞米松组 BDKRB1 和 TAGLN 蛋白相对表达量分别为 1.32 ± 0.14 和 0.44 ± 0.09 , 明显高于对照组的 1.00 ± 0.00 和 0.20 ± 0.10 , 差异均有统计学意义 ($t = -3.61, 2.89$, 均 $P < 0.05$)。结论 生物信息学分析表明地塞米松作用于小梁细胞后转录因子 SP1 是开角型青光眼发生的靶基因, 主要参与小梁细胞向肌成纤维细胞转化过程调节。

【关键词】 地塞米松; 开角型青光眼; 小梁网; 差异表达基因; 肌成纤维细胞; 生物信息学; 体外实验

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211214-00683

Search for potential target genes in dexamethasone-induced open-angle glaucoma by bioinformatics

Liu Liling, Li Deling, Zeng Weiting, Zhang Xinyi, Xu Jianguang, Yu Minbin

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Yu Minbin, Email: yuminbin@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To predict potential target genes in dexamethasone-induced open-angle glaucoma via bioinformatics technology. **Methods** The GEO datasets GSE16643, GSE37474, and GSE124114 were used to analyze the differentially expressed genes by GEO2R. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed on the differentially expressed genes between GSE37474 and GSE124114. Intersection of the three datasets were displayed by Venn diagram. The annotation and enrichment analysis of the intersection genes were performed through Gene Ontology (GO)/Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis and then were compared with normal tissue in GTEx Portal database. The corresponding protein interaction network was obtained by STRING. Finally, the candidate genes were searched for their transcription factors in UCSC and JASPAR. Primary human trabecular cells were divided into dexamethasone group and control group, treated with 2 ml 500 nmol/L dexamethasone and the same amount of ethanol, respectively. The expression of BDKRB1 and TAGLN in trabecular cells was detected by Western blot. **Results** Differential genes between GSE37474 and GSE124114 datasets enriched in complement and coagulation cascade by GSEA. There were 89 intersecting genes of the three datasets. These genes mainly regulated the formation of extracellular matrix by GO analysis. The gene with the highest enrichment score and collagen-containing extracellular matrix was found to be associated with fibroblasts in GTEx Portal database. ACTA2, MYL9, TAGLN, and LMOD1 were closely related in STRING protein-protein interaction network. Transcription factor SP1 in UCSC and JASPAR according to related genes, BDKRB1, NID1, MFGE8 and TAGLN. The relative expression levels of BDKRB1 and TAGLN proteins were 1.32 ± 0.14 and 0.44 ± 0.09 in dexamethasone group, respectively, which were significantly

higher than 1.00 ± 0.00 and 0.20 ± 0.10 in the control group, respectively ($t = -3.61, 2.89$; both at $P < 0.05$).

Conclusions Bioinformatics analysis showed that transcription factor SP1 may play a role in human trabecular meshwork cells to myofibroblasts transition after dexamethasone treatment.

[Key words] Dexamethasone; Glaucoma, open-angle; Trabecular meshwork; Differentially expressed genes; Myofibroblast; Bioinformatics; *In vitro* experiment

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20211214-00683

青光眼是一种因视神经损伤导致视力丧失的疾病,其发病涉及到多基因和环境因素,其中病理性高血压是其主要危险因素。临床上,多种系统性疾病和眼科疾病常用糖皮质激素类药物进行治疗,其长期使用可能会引起眼压升高,若不及时治疗会导致青光眼,甚至致盲。糖皮质激素进入靶组织后须与其受体 (glucocorticoid receptor alpha, GR α) 结合,受体通过改变构象并移位到细胞核中发挥作用。GR α 与糖皮质激素配体结合诱导或抑制靶基因的转录可占人基因组的 10%~20%^[1]。有研究发现,地塞米松使细胞外基质中相关的降解酶减少,导致基质堆积在小梁网,同时使小梁网骨架交联成肌动蛋白交联网络^[2-7],这些变化引起房水流出受阻,最后导致眼压升高。随着生物基因组测序工程技术的快速发展,许多生物学实验数据不断积累,互联网上公布了不同类型的分子生物学数据库,如核酸数据库、基因表达数据库、蛋白组学数据库、代谢组学数据库等,并提供相关的数据查询和数据处理服务。以计算机为工具查找相关数据库,对生物信息进行储存、检索和分析是生物信息学的重要应用领域。目前常用的生物信息学研究主要包括差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)、基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析和加权基因共表达网络分析。近年来研究者通过测序发现了激素类青光眼与正常人的差异表达基因及信号通路的变化,但是生物信息学工具分析的数据与实际并非完全相符,需要更多的实验验证结果。本研究拟借助 GEO 数据库寻找地塞米松致开角型青光眼的潜在靶基因并用体外实验加以验证,为激素性青光眼的精准治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人眼原代小梁细胞 (美国 Sciencell 公司)。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、Trizol、lipofectamine RNAiMAX、DAPI(2145S35) (美国 Invitrogen 公司);地

塞米松 (美国 Sigma 公司);BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (美国 GLPBIO 公司);兔抗人 BDKRB1 抗体 (ab75148) (美国 Abcam 公司);鼠抗人 TAGLN 抗体 (sc-53932) (美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 LMOD1 抗体 (15117-1-AP) (美国 Proteintech 公司);兔抗人 β -actin 抗体 (4970)、兔抗人 GAPDH 抗体 (5174S)、山羊抗兔二抗 (7074S)、马抗鼠二抗 (7076S) (美国 CST 公司);ECL 化学发光液 (美国 Merck Millipore 公司)。超高灵敏度化学发光成像系统 (ChemDoc Touch) (美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同生物信息学方法对地塞米松处理眼小梁细胞生物学功能的评估

1.2.1.1 通过 GEO 数据库检索激素类青光眼相关数据集 以“Dexamethasone AND Open-angle glaucoma”作为关键词在 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)^[8] 数据库上搜索相关数据集,最后选定 GSE16643、GSE37474 和 GSE124114。其中 GSE16643 基于 GPL6480 平台,使用 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F 芯片,包含 TM86 和 TM93 各 3 组配对样本;GSE37474 基于 GPL570 平台,利用 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 芯片分析,包含 5 组配对样本;GSE124114 基于 GPL6244 平台,利用 [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array 芯片分析获得,包含 9 组配对样本。

1.2.1.2 GEO2R 法分析小梁细胞差异基因 GSE37474、GSE124114 和 GSE16643 数据经过 GEO2R 得到相应的差异基因,采用 t 检验和 Benjamini-Hochberg 方法计算校正后 P 值。选择有意义的差异基因标准为 \log_2 倍数变化 (fold change, FC) 绝对值 > 1 且 $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 。从中选择最有意义的基因,通过 R 软件以 \log_2 FC 为横坐标、 $-\log_{10}(P \text{ value})$ 为纵坐标绘制 GSE37474 和 GSE124114 数据集差异基因的火山图。采用 DAVID (<http://david.ncifcrf.gov>)^[9] 找出数据集之间的交集基因。

1.2.1.3 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 软件对数据集 GSE37474 和 GSE124114 进行富集分析 用

1 个预先定义的基因集中的基因来评估在以表型相关性排序的基因表中的分布趋势,从而判断其对表型的贡献。数据集选取 MSigDB 数据库中 c2. cp. v7. 2. symbols. gmt 基因集合分析。Y 轴代表 1 个基因集, X 轴为每个基因集中核心分子对应的 logFC 分布情况;每个基因集对应 1 个山峰,山峰的形状代表该基因集中核心分子的 LogFC 分布情况,其中峰高对应的位置代表大部分分子的 logFC 集中在这个位置;图中每个峰下面还有 1 根小的竖线代表该组的核心分子,线越集中的位置说明该组数据在这个区间越集中,对应的是山峰的峰值;如果对应的基因集 NES 为负值,则一般该基因集的峰会在 0 的左侧;如果对应的基因集 NES 为正,则一般该基因集的峰会在 0 的右侧。一般认为满足错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0. 25 且 $P. adjust < 0. 05$ 即为显著富集^[10]。

1. 2. 1. 4 GTEX Portal 数据库查询正常人成纤维细胞中差异基因表达量 将 GO 分析得分最高组的相关基因群导入 GTEX Portal 数据库 (<https://www.gtexportal.org/>) 中,寻找基因群在正常人成纤维细胞的表达量每百万条 reads 的转录本 (transcripts per million, TPM)^[11]。

1. 2. 1. 5 线上 STRING 网站寻找差异基因蛋白互作网络 采用 STRING (<https://string-db.org/>)^[12] 分析 GSE16643、GSE37474 和 GSE124114 差异基因的交集对应 DEG 的蛋白间网络分析。蛋白分子间物理和功能联系通过智能计算预测、高通量实验、共表达网络等得出。设置蛋白间 interaction score > 0. 4 阈值并绘制相应的网络图。采用 Cytoscape v3. 6. 6 软件可视化并构建蛋白间互作网络^[13],相互连接最多的节点称为关键节点 (hub nodes)^[14]。

1. 2. 1. 6 线上 JASPAR 和 UCSU 数据库寻找相关转录因子 将上述生信工具找到的差异基因输入 UCSC (genome-asia.ucsu.edu/index.html)^[15] 寻找相关启动子序列,并与 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>)^[16] 连接寻找转录因子和结合位点信息。

1. 2. 2 实验观察地塞米松对培养小梁细胞的影响

1. 2. 2. 1 细胞培养及分组 第 2~6 代原代细胞复苏后培养在含体积分数 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基中,置于 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长融合达 90% 时进行传代培养,取处于对数期的细胞加入 500 nmol/L 地塞米松 2 ml 培养 7 d,设为地塞米松组。对照组加入等体积乙醇溶液培养 7 d。实验重复 3 次。

1. 2. 2. 2 Western blot 法检测小梁细胞中 BDKRB1 和

TAGLN 蛋白表达 采用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离蛋白转膜至 PVDF 膜。将膜放在快速 BSA 封闭液中封闭 10 min,分别加入一抗 BDKRB1 (1 : 800)、TAGLN (1 : 500)、LMO1 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 2 000)、GAPDH (1 : 2 000),4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后,加入相应二抗 (1 : 2 000),室温下孵育 1 h;加入超敏 ECL 化学发光液显色,采用凝胶成像系统采集图像,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -actin 和 GAPDH 为内参,计算各组细胞中目的蛋白相对表达量。

1. 3 统计学方法

采用 SPSS 20. 0 和 Graphpad Prism 7 软件进行统计分析并作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;对照组和地塞米松组中 BDKRB1 和 TAGLN 蛋白相对表达量比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 数据集信息处理和差异基因筛选

GEO2R 分析发现,GSE37474 有 15 个有意义的差异基因,其中上调 12 个,下调 3 个;GSE124114 有 13 个有意义的差异基因,其中上调 8 个,下调 5 个(图 1)。

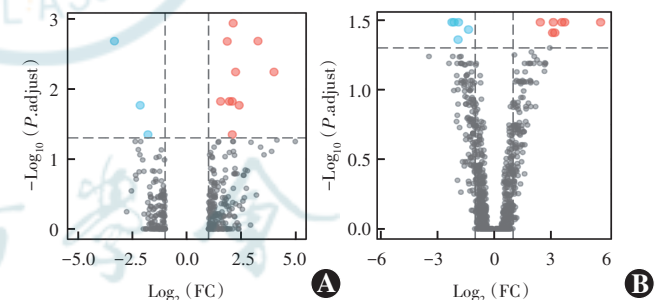


图 1 眼小梁细胞 GSE37474 和 GSE124114 差异表达基因火山图 蓝色代表表达下调基因,红色代表表达上调基因 A:GSE37474 B:GSE124114 FC:倍数变化

Figure 1 Volcano plot of differentially expressed genes in human trabecular meshwork in GSE37474 and GSE124114 datasets Blue spots represented the down-regulated genes and red spots represented the up-regulated genes A:GSE37474 B:GSE124114 FC:fold change

2. 2 GSEA 软件对数据集 GSE37474 和 GSE124114 的富集分析

经过软件分析,GSE37474 和 GSE124114 基因集中满足 $FDR < 0. 25$ 且 $P. adjust < 0. 05$ 的数据集分别有 250 个和 71 个,其中 GSE37474 排名前 10 且与激素类青光眼有关的数据集有 7 个,分别为花生四烯酸代谢相关通路、细胞黏附分子相关通路、趋化因子信号相关

通路、补体和凝血级联通路、细胞因子和其受体连接通路、细胞外基质受体连接通路和黏着斑相关信号通路;其中,GSE37474 排名前 10 且与激素类青光眼有关的数据集有 4 个,分别为补体和凝血级联通路、细胞外基质受体连接通路、黏着斑相关信号通路和溶解酶相关信号通路。可以看出补体和凝血级联通路、细胞外基质受体连接通路和黏着斑相关信号通路为共同信号通路(图 2)。

2.3 数据集间差异表达基因及其功能通路

根据样品信息和数据矩阵信息,用韦恩图得到 GSE37474、GSE124114 和 GSE16643 交集差异基因有 89 个;在 DAVID 网站的功能分析 GO 发现这 89 个基因主要参与细胞外结构和基质的形成过程(图 3)。经 KEGG 分析发现有 3 条信号通路与目标基因有关,分别是酪氨酸代谢、细胞色素 P450 药物代谢和脂肪酸生物合成途径。将 GO 分析得分最高、含有胶原的细胞外基质的基因在 GTEx Portal 数据库里寻找发现其主要表达在成纤维细胞中(表 1)。

表 1 GSE124114、GSE37474 和 GSE16643 数据集差异基因的 GO 富集分析含胶原的细胞外基质相关基因在正常成纤维细胞中的表达量
Table 1 Relative expression of collagen-containing extracellular matrix-associated genes in normal fibroblasts of GSE16643, GSE37474 and GSE124114 datasets by GO enrichment analysis

基因	TPM
SERPINA3	2.62
COL8A2	2.44
F3(TF)	142.60
MFGE8	161.50
NID1	326.10
OMD	1.18
SLPI	2.08
COL14A1	0.94
GDF15	23.82
PRG4	0.83

注:GO:基因本体论;TPM:每百万条 reads 的转录本
 Note:GO:Gene Ontology;TPM:transcripts per million

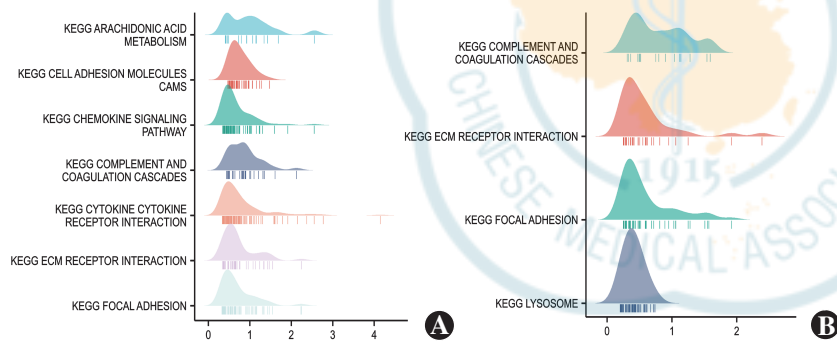


图 2 GSEA 软件对数据集 GSE37474 和 GSE124114 富集分析比较 列出前 10 个差异基因富集且与激素类青光眼有关的通路

Figure 2 Analysis of GSEA result of GSE37474 and GSE124114 datasets Top 10 pathways related to dexamethasone-glaucoma were displayed

2.4 差异基因中的核心基因及其功能通路

为了从交集差异基因中筛选核心基因,89 个基因经 STRING 网站上进一步分析,包含 87 个节点和 50 条关系线,平均聚类系数为 0.28。其中与肌肉收缩相关的核心基因有 LMOD1、ACTA2、MYL9;与肌动蛋白结合相关的核心基因有 LMOD1、TAGLN;与细胞溶质相关的核心基因有 LMOD1、ACTA2、MYL9;与血管平滑肌收缩相关的核心基因有 ACTA2、MYL9(表 2,图 4)。

2.5 与 BDKRB1、NID1、MFGE8 和 TAGLN 相关的转录因子

在 UCSC 上找到基因的启动序列,结合 JASPAR 找到 BDKRB1、NID1、MFGE8 和 TAGLN 的共同转录因子为 SP1 以及预测结合序列(表 3)。

2.6 各组小梁细胞中 BDKRB1、TAGLN 和 LMOD1 蛋白表达量比较

Western blot 分析显示,地塞米松组 BDKRB1 和 TAGLN 蛋白条带较对照组明显增强。地塞米松组 BDKRB1 和 TAGLN 蛋白相对表达量为 1.32 ± 0.14 和 0.44 ± 0.09 ,高于对照组的 1.00 ± 0.00 和 0.20 ± 0.10 ,差异均有统计学意义

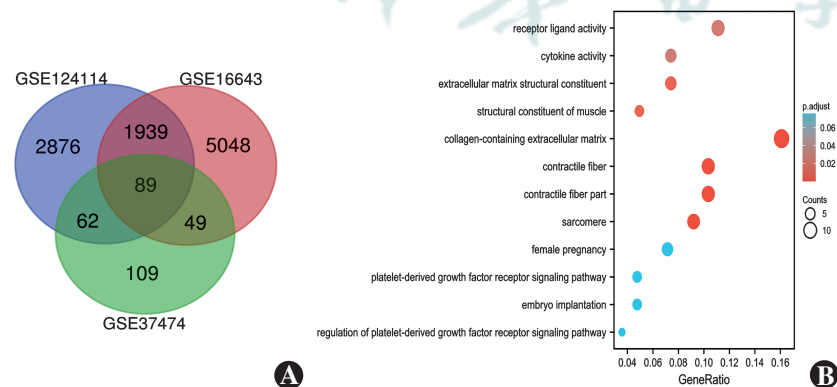


图 3 GSE16643、GSE37474 和 GSE124114 数据集交集的韦恩图与数据集交集差异基因的 GO 富集分析 A:3 个数据集差异显著 DEG 的基因数韦恩图 紫色代表 GSE124114;粉色代表 GSE16643;绿色代表 GSE374734 B:GO 分析交集基因的功能组构成

Figure 3 Venn diagram and GO enrichment analysis of intersectional genes of GSE16643, GSE37474 and GSE124114 datasets A: Venn diagram Purple for GSE124114, pink for GSE16643, green for GSE124114 B: GO functional analysis of intersectional genes

表 2 STRING 分析得到的关键基因
Table 2 STRING analysis of key genes among GSE16643, GSE37474 and GSE124114 datasets

分类	功能	数目	P 值	FDR	核心基因
GOTERM_BP_DIRECT	肌肉收缩	3	0.000 12	0.086 980 929	<i>LMOD1</i> 、 <i>ACTA2</i> 、 <i>MYL9</i>
GOTERM_MF_DIRECT	肌动蛋白结合	2	0.048 598 347	23.870 702 52	<i>LMOD1</i> 、 <i>TAGLN</i>
GOTERM_CC_DIRECT	细胞溶质	3	0.087 212 636	48.964 153 44	<i>LMOD1</i> 、 <i>ACTA2</i> 、 <i>MYL9</i>
KEGG_PATHWAY	血管平滑肌收缩	2	0.017 008 286	8.463 993 952	<i>ACTA2</i> 、 <i>MYL9</i>

注: FDR: 错误发现率
Note: FDR: false discovery rate

表 3 *BDKRB1*、*NID1*、*MFGE8* 和 *TAGLN* 基因相关的转录因子 SP1 及相关结合位点信息
Table 3 Transcription factor SP1 and binding sites in *BDKRB1*、*NID1*、*MFGE8* and *TAGLN*

基因	矩阵 ID	名称	得分	相对得分	序列 ID	首端	末端	链	预测序列
<i>BDKRB1</i>	MA0079.1	MA0079.1.SP1	8.27	0.87	Hg38_refGene_NM_000710	783	792	+	tgggcaggat
<i>NID1</i>	MA0079.1	MA0079.1.SP1	8.89	0.89	Hg38_refGene_NM_002508	203	212	+	gggggatggt
<i>MFGE8</i>	MA0079.1	MA0079.1.SP1	8.78	0.89	Hg38_refGene_NM_001310319	109	118	-	ttggctgggt
<i>TAGLN</i>	MA0079.1	MA0079.1.SP1	9.74	0.93	Hg38_refGene_NM_003186	217	226	-	ggggctggga

义 ($t = -3.61, 2.89$, 均 $P < 0.05$)。地塞米松组和对照组 *LMOD1* 蛋白相对表达量分别为 0.56 ± 0.02 和 0.49 ± 0.07 , 差异无统计学意义 ($t = -1.71, P > 0.05$) (图 5, 6)。

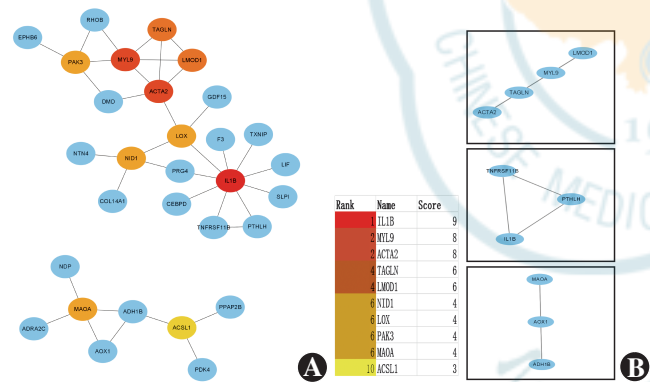


图 4 STRING 分析差异表达的蛋白互作关系网络及 hub 基因 A: 蛋白互作关系网络 B: hub 基因
Figure 4 STRING protein-protein interaction network and hub genes A: Protein-protein interaction network B: Hub genes

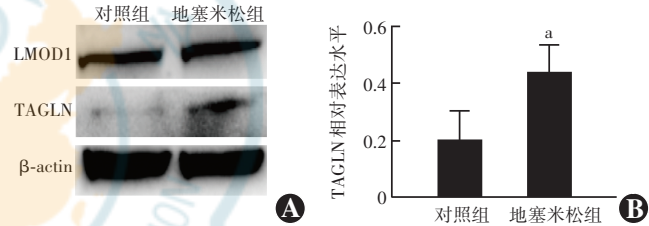


图 6 地塞米松处理小梁细胞对 *LMOD1* 和 *TAGLN* 蛋白表达影响 A: 对照组和地塞米松组 *LMOD1* 和 *TAGLN* 蛋白表达电泳图 B: 对照组和地塞米松组 *TAGLN* 蛋白相对表达量比较 与对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) β -actin: β -肌动蛋白
Figure 6 Relative expression of *LMOD1* and *TAGLN* protein between control and dexamethasone groups A: *LMOD1* and *TAGLN* protein expression bands of the two groups B: Comparison of the relative expression levels of *TAGLN* protein Compared with control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t test, $n = 3$)

3 讨论

由于糖皮质激素在临床治疗中不可或缺,其产生的不良反应日益引起许多研究者的关注,其中研究较多的是地塞米松对眼房水流出通道的影响。本研究选取的 GSE37474 来自平均年龄 65 岁老年人群,而 GSE124114 是来自平均年龄为 25 岁青年人,但 GSEA 结果显示 2 个组的基因富集变化有相似结果。本研究选择富集分析中排名靠前的补体和凝血级联通路的 *BDKRB1* 蛋白表达进行分析,结果显示地塞米松会引起其表达增加。*BDKRB1* 属于激肽激酶-激肽系统的组成部分,激肽是小分子多肽,当机体受到损伤时激肽能作为炎症和疼痛的调节分子。缓激肽 (bradykinin, BK)、lys-BK、desArg9-BK 和 lys-desArg9-BK 通过 *BDKRB1* 和 *BDKRB2* 2 个不同的受体发挥作用。lys-

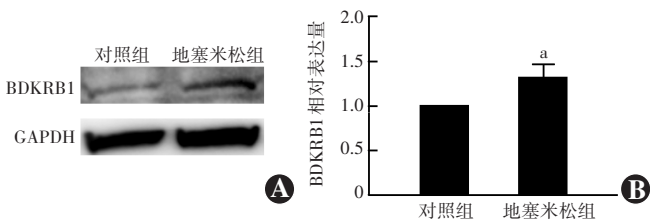


图 5 地塞米松处理小梁细胞对 *BDKRB1* 蛋白表达影响 A: 对照组和地塞米松组 *BDKRB1* 蛋白表达电泳图 B: 对照组和地塞米松组 *BDKRB1* 蛋白相对表达量比较 与对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
Figure 5 Relative expression of *BDKRB1* protein between control and dexamethasone groups A: *BDKRB1* protein expression bands of the two groups B: Comparison of the relative expression levels of *BDKRB1* protein Compared with control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t test, $n = 3$) GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

BK、desArg9-BK 多肽能激活 BDKRB1, 而 BK、lys-BK 则激活 BDKRB2。BDKRB1 和 BDKRB2 均属于 G 蛋白偶联受体超家族的 7 个跨膜结构域, 具有 7 个跨膜结构、1 个胞外氨基末端和 1 个胞质羧基末端的共同结构^[17]。BDKRB2 分布广泛并调节大部分缓激肽的生物活动, 然而 BDKRB1 在脑和脊髓正常的生理状态很难被检测到, 在炎症或组织损伤时显著上调^[18]。目前暂未见 BDKRB1 在眼小梁细胞中检出的报道, 本研究结果显示地塞米松处理后该蛋白表达上调, 可以监测其炎症反应活动的程度。

本研究中联合 3 个数据集 GSE37474、GSE124114 和 GSE16643 的差异基因的交集分析, 在 STRING 蛋白互作分析中发现 2 个与骨架变化相关新的基因, 即 *TAGLN* 和 *LOMD1*。Leung 等^[19] 研究显示, 在地塞米松作用小梁细胞后经芯片测序检测出的 *TAGLN* 比正常对照组显著升高。*TAGLN* 属于钙蛋白家族, 编码一种对形状变化敏感的激动蛋白结合蛋白, 但其具体作用仍需进一步研究。*Leiomodin 1 (LMOD1)* 是一种控制血管或内脏平滑肌收缩的蛋白, 主要在甲状腺中高表达, 同时也存在于眼部肌肉、骨骼肌和卵巢等组织中, 主要在 Graves 甲状腺疾病和甲状腺相关眼部疾病中有报道^[20], 目前尚未见该基因参与青光眼发病的报道。本研究结果显示, 经过地塞米松处理体外小梁细胞, *TAGLN* 蛋白相对表达量较对照组增加, 但 *LOMD1* 蛋白未见显著增加。从 STRING 蛋白互作图可以看出, *TAGLN* 与 *ACTA2* 相关, 提示 *TAGLN* 参与小梁细胞在地塞米松作用下细胞骨架的变化。

GO 富集分析部分主要集中在含有胶原的细胞外基质, 过多的胶原堆积在小梁网会阻塞房水的流出, 最终导致眼压升高^[21]。本研究把 GO 富集分析得分最高的相关基因在 GTEEx Portal 数据库中比对正常成纤维细胞表达, 发现在成纤维细胞中也有这几个基因的表达。地塞米松处理的小梁细胞转化生长因子 β 产生增加, 该细胞因子会促使小梁细胞转化为肌成纤维细胞^[22], 而后者在胶原产生上起到关键作用。正常情况下, 在组织受伤时肌成纤维细胞能一定程度修复缺失或损害细胞外基质, 促进胶原的产生、分泌及收缩, 进而产生瘢痕, 如果失调会发生纤维化的可能。此结果提示地塞米松处理后可能存在小梁细胞的间充质转化过程。

本研究尝试寻找相关的转录因子, 发现 *BDKRB1*、*NID1*、*MFGE8* 和 *TAGLN* 这 4 个基因与 SP1 有关。*SP1* 基因编码的蛋白是含有锌指结构的转录因子, 参与细

胞分化、转化、生长和凋亡, 免疫反应, 对 DNA 损伤的反应和染色质重塑^[23]。*ACTA2* 是肌成纤维细胞的标志物, *Vimentin* 是肌成纤维细胞转化的中间产物, 本研究发现 SP1 同时也是这两者的转录因子。虽然 SP1 在啮齿类动物和人类胚胎的发育上起到关键作用, 在正常组织中一般随年龄增长下调, 但在某些疾病, 特别是肿瘤中发现 SP1 升高^[24]。研究发现在无胸腺的小鼠中下调 SP1 能降低纤维肉瘤转变为纤维瘤的风险^[25], 另外, Jin 等^[26] 发现 SP1 介导的微小 RNA (microRNA, miR)-4295 可靶向肿瘤抑制因子 p63a mRNA 的 3' 非翻译区, 抑制 p63a 翻译, 进而促进正常尿道上皮细胞往上皮肿瘤发展; 致癌基因 *KRAS* 诱导 MCF10a 乳腺细胞的间充质转化是通过 SP1 介导对 miR-200 家族的抑制作用^[27], miR-200 家族具有抑制 *Kras* 体外细胞转化和体内肿瘤形成的作用; 在对叶酸抑制药物培美曲塞耐药的非小细胞肺癌 A400 细胞的研究中发现, *BMI1* 和 SP1 表达量较 A549 细胞上调, 同时 miR-145-5p 下调, 而 SP1 能促进间充质转化的发生^[28]。鉴于 SP1 在上述研究中具有间充质转化功能, 提示 SP1 可能参与了地塞米松处理后小梁细胞转化为肌成纤维细胞的过程。

综上所述, 本研究通过一系列的生信工具找到地塞米松作用于小梁细胞后发生的变化, 选取之前文献未报道的结果综合分析并关联其上游新靶点, 为地塞米松导致的激素性青光眼的治疗提供了新的思路。然而生信分析的结果只是预测手段, 仍需要更多实验验证该靶点的正确性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘丽玲: 直接参与选题、酝酿和设计实验、起草文章; 李德玲: 实施研究、采集数据; 曾伟婷、张心怡: 分析/解释数据; 徐建刚: 修改文章; 余敏斌: 对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿等

参考文献

- [1] Galon J, Franchimont D, Hiroi N, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells [J]. *FASEB J*, 2002, 16(1): 61-71. DOI: 10.1096/fj.01-0245.com.
- [2] Raghunathan VK, Morgan JT, Park SA, et al. Dexamethasone stiffens trabecular meshwork, trabecular meshwork cells, and matrix [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(8): 4447-4459. DOI: 10.1167/iovs.15-16739.
- [3] Mohd Nasir NA, Agarwal R, Krasilnikova A, et al. Effect of dexamethasone on the expression of MMPs, adenosine A1 receptors and NFkB by human trabecular meshwork cells [J/OL]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020, 31(6) [2022-03-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32697755/>. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0373.
- [4] Honjo M, Igarashi N, Nishida J, et al. Role of the autotaxin-LPA pathway in dexamethasone-induced fibrotic responses and extracellular matrix production in human trabecular meshwork cells [J]. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59 (1) : 21 - 30. DOI: 10. 1167/iov. 17-22807.
- [5] Clark R, Nosie A, Walker T, et al. Comparative genomic and proteomic analysis of cytoskeletal changes in dexamethasone-treated trabecular meshwork cells [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12 (1) : 194 - 206. DOI: 10. 1074/mcp. M112. 019745.
- [6] Hoare MJ, Grierson I, Brothie D, et al. Cross-linked actin networks (CLANs) in the trabecular meshwork of the normal and glaucomatous human eye in situ [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50 (3) : 1255-1263. DOI: 10. 1167/iov. 08-2706.
- [7] Duffy L, O'Reilly S. Functional implications of cross-linked actin networks in trabecular meshwork cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45 (2) : 783-794. DOI: 10. 1159/000487170.
- [8] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2013, 41 (Database issue) : D991-995 [2022-03-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531084/. DOI: 10. 1093/nar/gks1193.
- [9] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37 (1) : 1-13. DOI: 10. 1093/nar/gkn923.
- [10] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (43) : 15545-15550. DOI: 10. 1073/pnas. 0506580102.
- [11] GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans [J]. Science, 2015, 348 (6235) : 648 - 660. DOI: 10. 1126/science. 1262110.
- [12] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (Database issue) : D447 - D452 [2022-03-09]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383874/. DOI: 10. 1093/nar/gku1003.
- [13] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization [J]. Bioinformatics, 2011, 27 (3) : 431-432. DOI: 10. 1093/bioinformatics/btq675.
- [14] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J/OL]. BMC Syst Biol, 2014, 8 Suppl 4 (Suppl 4) : S11 [2022-03-15]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290687/. DOI: 10. 1186/1752-0509-8-S4-S11.
- [15] Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC [J]. Genome Res, 2002, 12 (6) : 996-1006. DOI: 10. 1101/gr. 229102.
- [16] Castro-Mondragon JA, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, et al. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (D1) : D165-D173 [2022-03-15]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8728201/. DOI: 10. 1093/nar/gkab1113.
- [17] Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins [J]. Pharmacol Rev, 1980, 32 (1) : 1-46.
- [18] Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study [J]. J Comp Neurol, 2003, 465 (3) : 372 - 384. DOI: 10. 1002/cne. 10846.
- [19] Leung YF, Tam PO, Lee WS, et al. The dual role of dexamethasone on anti-inflammation and outflow resistance demonstrated in cultured human trabecular meshwork cells [J]. Mol Vis, 2003, 9 : 425-439.
- [20] Hrdá P, Sterzl I, Vána S, et al. Endocrine orbitopathy and significance of autoantibodies against ID protein [J]. Cas Lek Cesk, 2007, 146 (3) : 273-277.
- [21] Last JA, Pan T, Ding Y, et al. Elastic modulus determination of normal and glaucomatous human trabecular meshwork [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (5) : 2147-2152. DOI: 10. 1167/iov. 10-6342.
- [22] Pattabiraman PP, Maddala R, Rao PV. Regulation of plasticity and fibrogenic activity of trabecular meshwork cells by Rho GTPase signaling [J]. J Cell Physiol, 2014, 229 (7) : 927-942. DOI: 10. 1002/jcp. 24524.
- [23] O'Connor L, Gilmour J, Bonifer C. The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease [J]. Yale J Biol Med, 2016, 89 (4) : 513-525.
- [24] Oh JE, Han JA, Hwang ES. Downregulation of transcription factor, Sp1, during cellular senescence [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353 (1) : 86-91. DOI: 10. 1016/j.bbrc. 2006. 11. 118.
- [25] Lou Z, O'Reilly S, Liang H, et al. Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation [J]. Cancer Res, 2005, 65 (3) : 1007-1017.
- [26] Jin H, Xu J, Guo X, et al. XIAP RING domain mediates miR-4295 expression and subsequently inhibiting p63 α protein translation and promoting transformation of bladder epithelial cells [J/OL]. Oncotarget, 2016, 7 (35) : 56540 - 56557 [2022-03-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27447744/. DOI: 10. 18632/oncotarget. 10645.
- [27] Zhong X, Zheng L, Shen J, et al. Suppression of microRNA 200 family expression by oncogenic KRAS activation promotes cell survival and epithelial-mesenchymal transition in KRAS-driven cancer [J]. Mol Cell Biol, 2016, 36 (21) : 2742-2754. DOI: 10. 1128/MCB. 00079-16.
- [28] Chang WW, Wang BY, Chen SH, et al. miR-145-5p targets Sp1 in non-small cell lung cancer cells and links to BMI1 induced pemetrexed resistance and epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (23) : 15352 [2022-03-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36499676/. DOI: 10. 3390/ijms232315352.

(收稿日期:2022-05-23 修回日期:2022-12-26)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊对稿件的学术要求

文稿须有较高的学术价值,具有创新性、科学性、导向性和实用性。文稿要求资料翔实、实事求是、立论新颖、方法学正确、论据充分、图表恰当、结果客观、结论可靠、论述严谨、符合逻辑、层次清晰、数据准确、语句通顺。

(本刊编辑部)