

基于单细胞转录组测序探讨小鼠脉络膜新生血管内皮细胞的病理特征

温立势¹ 张泉² 严宏祥¹ 李曼红¹ 苏静波¹ 常天芳¹ 王雨生¹ 孙嘉星¹

¹空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所,西安 710032;²空军军医大学基础医学院学员六大队,西安 710032

孙嘉星现为空军军医大学基础医学院神经生物学教研室博士后,西安 710032

温立势和张泉对本文有同等贡献

通信作者:孙嘉星,Email:sjxsjx001@163.com;王雨生,Email:wangys003@126.com

【摘要】 目的 基于单细胞转录组测序(scRNA-seq)探讨小鼠脉络膜新生血管(CNV)中内皮细胞(EC)的分子表达与病理特征。**方法** 取6只6~8周龄C57BL/6小鼠按照随机数字表法随机分为2个组,每组3只,处死后摘取双眼眼球,分别采用剪碎脉络膜巩膜复合体法和刮取脉络膜法分离脉络膜组织,采用胰蛋白酶/I型胶原酶37℃连续消化制得单细胞悬液,流式细胞术检测细胞活率及EC比例,确定单细胞悬液制备方法。选取6只小鼠随机分为正常对照组和CNV组,每组3只,其中CNV组小鼠建立激光诱导的CNV模型;于造模后7d制备单细胞悬液,采用10xGenomics进行单细胞分离并构建测序文库,Illumina Novaseq6000进行高通量测序,获得基因表达矩阵;根据文献报道并参考Cellmarker数据库定义细胞亚群;选取EC亚群进行拟时序分析,生成各个细胞分化状态(State)的基因表达矩阵,筛选CNV-EC并初步分析表达特征。另选取6只小鼠建立CNV模型,于造模后7d取小鼠眼球制备冰冻切片,免疫荧光染色检测EC标志物Pecam1与线粒体外膜蛋白Tomm20、mt-Co1和毛细血管标志物Kdr、Plvap的共定位及面积占比情况,并统计血管直径。**结果** 剪碎复合体和刮取脉络膜所制备单细胞悬液的细胞活率分别为99.4%和99.1%,符合测序要求;流式细胞术检测EC占比约为1.58%。scRNA-seq结果显示,正常对照组和CNV组小鼠脉络膜均包含13个细胞亚群,与正常对照组比较,CNV组视锥/视杆细胞、EC和造血系细胞比例增加,视网膜色素上皮(RPE)细胞和施万细胞比例相应减少。在所有细胞亚群中,EC比例为18.40%。EC拟时序分析显示,脉络膜EC可分为4个State,CNV组中位于State 2状态的EC比例为29.1%,较正常对照组的9.5%明显升高;差异基因分析显示,State 2 EC中线粒体相关基因 $mt-Nd4$ 和 $mt-Atp6$ 等表达上调而毛细血管基因 Kdr 和 $Esm1$ 等表达显著下调。免疫荧光染色结果显示,CNV区域内Tomm20和mt-Co1在Pecam1阳性EC内表达分布面积比例分别为(19.50±4.68)%和(4.64±2.82)%,明显高于正常区域的(3.00±2.09)%和(0.18±0.34)%,差异均有统计学意义($t=7.88, 3.84$, 均 $P<0.01$)。CNV区域内Kdr和Plvap在Pecam1阳性EC内表达面积比例分别为(1.50±0.29)%和(0.79±0.97)%,明显低于正常区域的(31.30±5.44)%和(10.43±2.28)%,差异均有统计学意义($t=13.40, 9.48$, 均 $P<0.01$)。CNV区域血管直径为(5.52±1.85) μm ,明显大于正常区域的(4.21±1.84) μm ,差异有统计学意义($t=9.57, P<0.001$)。**结论** CNV发生时,脉络膜组织中EC比例增加,CNV-EC呈现线粒体代谢活化和毛细血管特性丢失的病理特征,提示EC线粒体活化可能在CNV生成中具有一定的作用。

【关键词】 脉络膜新生血管;内皮细胞;线粒体;毛细血管;单细胞测序

基金项目: 国家自然科学基金项目(81900870、81770936、82000905);中国博士后科学基金项目(2021MD703956);陕西省高校科协青年人才托举计划项目(20220305)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221202-00563

Investigation of endothelial cell pathological characteristics in murine choroidal neovascularization model based on single-cell RNA sequencing

Wen Lishi¹, Zhang Quan², Yan Hongxiang¹, Li Manhong¹, Su Jingbo¹, Chang Tianfang¹, Wang Yusheng¹, Sun Jiaxing¹

¹Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Eye Institute of Chinese PLA, Xi'an 710032, China; ²Cadet Team 6 of School of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sun Jiaxing is a postdoctoral fellow at the Department of Neurobiology, School of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Wen Lishi and Zhang Quan contributed equally to this article



Corresponding authors: Sun Jiaying, Email: sjxsjx001@163.com; Wang Yusheng, Email: wangys003@126.com

[Abstract] Objective To investigate the molecular expression and pathological features of endothelial cell (EC) in a murine model of choroidal neovascularization (CNV) based on single-cell RNA sequencing (scRNA-seq). **Methods** Six C57BL/6 mice aged 6–8 weeks were randomly divided into two groups, with 3 mice in each group. Bilateral eyeballs were enucleated. The choroidal tissues from the two groups were isolated by shearing the complex and scraping the choroid, respectively. Single-cell suspension was prepared by continuous digestion with trypsin/type I collagenase at 37 °C, and the cell viability and EC ratio were detected by flow cytometry to determine the preparation method of single-cell suspension. Another 6 mice were randomly assigned into the control group and the CNV group, with 3 mice in each group. The CNV model was induced by laser photocoagulation and single-cell suspensions were prepared 7 days after modeling. Gene expression library construction was performed using the Chromi-um (10x Genomics) instrument. High throughput sequencing was performed using the Illumina Novaseq6000 to obtain the expression matrix. The EC subpopulations were classified according to previous researches and the Cellmarker database. Pseudo-time analysis was performed in EC, revealing the gene expression matrix of different states. CNV-EC were further selected with preliminary analysis of the expression characteristics. Another 6 mice were selected to establish the CNV model and eyeball frozen sections were prepared 7 days after modeling. Expression and distribution as well as the area percentage of EC marker Pecam1, mitochondrial outer membrane proteins Tomm20 and mt-Co1, and capillary markers Kdr and Plvap were observed by immunofluorescence staining, and the vascular diameter was calculated. The use and care of animals followed the ARVO statement. This study protocol was approved by the Experimental Animal Welfare and Ethics Committee of Air Force Military Medical University (No. 20200181). **Results** The cell viability of the single-cell suspension prepared from choroidal-scleral fragments and choroidal scrapings was 99.4% and 99.1%, respectively, both of which met the sequencing requirements. The percentage of EC detected by flow cytometry was approximately 1.58%. The scRNA-seq result revealed that both the normal control and CNV groups contained 13 choroidal cell clusters. Compared with the normal control group, the proportions of rod/cone photoreceptor cells, EC and hematopoietic cells all increased, while the retinal pigment epithelium (RPE) and Schwan cells reduced in the CNV group. Among all clusters, EC constituted 18.4%. The pseudo-time analysis demonstrated that EC could be further divided into 4 states. The percentage of state 2 EC was 29.1% in the CNV group, which was significantly higher than 9.5% in the normal control group. Differentially expressed gene analysis showed that the expression of mitochondrion-related genes, including *mt-Nd4* and *mt-Atp6*, were upregulated in state 2 EC, while capillary-related genes, including *Kdr* and *Esm1*, were downregulated. Immunofluorescent staining revealed that the area of Tomm20 and mt-Co1 in Pecam1-positive EC in the CNV area was (19.50±4.68)% and (4.64±2.82)%, respectively, which were both higher than (3.00±2.09)% and (0.18±0.34)% in normal area ($t=7.88, 3.84$; both at $P<0.01$). The area of *Kdr* and *Plvap* in Pecam1-positive EC in the CNV area was (1.50±0.29)% and (0.79±0.97)%, respectively, which were both lower than (31.30±5.44)% and (10.43±2.28)% in the normal area ($t=13.40, 9.48$; both at $P<0.01$). The vascular diameter in the CNV area was (5.52±1.85) μm , which was larger than (4.21±1.84) μm in the normal area ($t=9.57, P<0.001$). **Conclusions** When CNV occurs, the proportion of EC in choroid increases, and CNV-EC shows pathologic features of mitochondrial metabolic activation and loss of capillary properties, suggesting the mitochondrial activation of EC may play a role in the formation of CNV.

[Key words] Choroidal neovascularization; Endothelial cells; Mitochondria; Capillaries; Single-cell RNA sequencing

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81900870, 81770936, 82000905); China Postdoctoral Science Foundation (2021MD703956); Young Talent Fund of University Association for Science and Technology in Shaanxi, China (20220305)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221202-00563

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 等多种致盲眼病的共同病理基础^[1]。CNV 形成机制复杂,受多种细胞的多种因子调控,其中血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 是其主要效应细胞^[2]。既往研究已揭示缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及 Notch 等信号通路对于 CNV-EC 的关键调控作用^[3-5],但多基于脉络膜-巩

膜复合体进行研究,对 CNV-EC 分子表达特征的理解仍有限。探讨并揭示 CNV-EC 的病理特征有望进一步理解 CNV 的发病机制,为开发新的 CNV 治疗靶点提供理论依据。近年来,单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 技术日臻成熟,可以高分辨率地检测混杂样本内单个细胞的基因表达情况,从而区分不同细胞类群、追踪细胞发育轨迹及分析细胞间相互作用,为研究细胞的异质性提供了极大便利^[6-8]。scRNA-seq 已广泛应用于发育、肿瘤和心血管

疾病等多种研究^[9-10]。在眼科学领域, scRNA-seq 技术已应用于揭示不同分区的视网膜细胞种类与功能, 以及多种神经细胞的再分类、特异性标志物的识别和发育过程的评估^[11]。Voigt 等^[12]、Lehmann 等^[13] 和 Rohlenova 等^[14] 先后报道了 AMD 患者脉络膜组织及 CNV 模型小鼠脉络膜的细胞分群及病理标志物, 揭示了免疫及代谢相关的潜在发病机制。目前, CNV-EC 的病理性分子表达和功能特点尚未完全阐明。本研究优化小鼠脉络膜单细胞悬液制备方法, 基于 scRNA-seq 技术分析激光诱导的小鼠 CNV 模型中的脉络膜细胞分群与 EC 分化状态, 并结合免疫荧光染色, 进一步探讨 CNV-EC 的病理特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(体重 18~22 g) 18 只购自空军军医大学实验动物中心。小鼠饲养于 12 h/12 h 明暗交替环境下, 均喂食普通饲料(西安华仁生物科技有限公司), 实验期间自由饮食。实验动物的使用与饲养遵循视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范, 本研究方案经空军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准(批文号: 20200181)。

1.1.2 主要试剂及仪器 Hanks 平衡盐溶液(Hanks balanced salt solution, HBSS)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、红细胞裂解液、多聚甲醛溶液(武汉博士德生物工程有限公司); Dulbecco 改良培养基(Dulbecco modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(苏州新赛美生物科技有限公司); I 型胶原酶、DNA 酶、戊巴比妥钠、Triton X-100(美国 Sigma 公司); 台盼蓝(北京索莱宝科技有限公司); 大鼠血清、7-氨基-放线菌素 D(7-amino-actinomycin D, 7-AAD) 活性染色液(美国 Invitrogen 公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(西安科昊生物技术有限公司); BV421 标记的大鼠抗小鼠 Pecam1 单克隆抗体(562939)(美国 BD 公司); 山羊抗小鼠 Pecam1 单克隆抗体(AF3628)(美国 R&D 公司); 兔抗小鼠 Tomm20 单克隆抗体(ab186734)、小鼠抗小鼠 mt-Co1 单克隆抗体(ab14705)、兔抗小鼠 Kdr 多克隆抗体(ab5473)(美国 Abcam 公司); 大鼠抗小鼠 Plvap 单克隆抗体(120501)(美国 Biologend 公司); Alexa Fluor 488 标记的驴抗小鼠 IgG 抗体(A-21202)、Alexa Fluor 488 标记的驴抗大鼠 IgG 抗体(A-21208)、

Alexa Fluor 594 标记的驴抗山羊 IgG 抗体(A-11058)、Alexa Fluor 647 标记的驴抗兔 IgG 抗体(A-31573)(美国 Invitrogen 公司); 含 DAPI 封片液(上海碧云天生物技术有限公司)。532 nm 倍频掺钕钇铝石榴石激光器(美国 IRIS 公司); 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); 流式细胞仪(Canto II, 美国 BD 公司); 激光扫描共聚焦显微镜(FV1000, 日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同方法制备脉络膜单细胞悬液 选取 6 只小鼠, 按照随机数字表法随机分为 2 个组, 每组 3 只。采用质量分数 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 颈椎脱臼法处死后立即摘取双眼眼球; 于冰上操作, 将眼球浸泡于 HBSS 中, 去除眼前节和玻璃体, 分别采用挖耳匙直接刮下脉络膜或剪碎脉络膜巩膜复合体方法获取脉络膜组织, 将同一小鼠双眼脉络膜组织合并于 1 个 1.5 ml 离心管内, 每管加入 500 μ l 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液和 5 μ l DNA 酶, 37 $^{\circ}$ C 震荡消化 30 min, 4 $^{\circ}$ C 下 160 \times g 离心 4 min, 弃上清; 每管加入 450 μ l 无血清 DMEM、50 μ l I 型胶原酶和 5 μ l DNA 酶重悬沉淀, 37 $^{\circ}$ C 震荡消化 20 min, 所得细胞消化液过 40 μ m 细胞筛网以去除细胞团和未消化组织, 将 3 只小鼠脉络膜消化液混合, 4 $^{\circ}$ C 下 160 \times g 离心 4 min, 弃上清; 加入 2 ml 红细胞裂解液, 冰浴震荡 3 min; 加入 PBS 终止裂解, 4 $^{\circ}$ C 下 160 \times g 离心 4 min, 弃上清; 加入 300 μ l PBS 重悬沉淀, 制成单细胞悬液。

1.2.2 流式细胞术测定细胞活率及 EC 比例 配制含体积分数 5% FBS 的 PBS 流式洗液。(1) 检测细胞活率 取不同制备方法获得的脉络膜单细胞悬液, 加入 7-AAD 活性染色液(1:1 000 稀释), 流式细胞仪上机检测 7-AAD 阴性细胞比例即为细胞活率。(2) 检测 EC 比例 取新配制的脉络膜单细胞悬液, 以每 1.5 ml EP 管约 1×10^6 个细胞调整细胞量, 加入 10 μ l 大鼠血清冰浴封闭 10 min, 加入 40 μ l 含有 0.5 μ l BV421 标记的 Pecam1 单克隆抗体, 冰浴孵育 30 min; 加入流式洗液(5% FBS 溶液)洗涤, 4 $^{\circ}$ C 下 160 \times g 离心 5 min, 收集沉淀; PBS 重悬细胞, 加入 7-AAD 活性染色液(1:1 000 稀释), 流式细胞仪上机检测 BV421 阳性的 EC 比例。

1.2.3 CNV 模型建立 选取 6 只小鼠, 按照随机数字表法分为正常对照组和 CNV 组, 每组 3 只, 用于单细胞悬液制备与测序。参照文献[15-16]的方法对 CNV 组小鼠单眼建立激光诱导的 CNV 模型: 小鼠适应性喂养 1 周后, 经 1% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳; 小鼠眼前放置角膜

接触镜,通过裂隙灯显微镜以 532 nm 倍频激光(光斑直径 75 μm ,功率 90 nW,曝光时间 100 ms)距离视盘 1.0~1.5 视盘直径(papillary diameter, PD)周围均匀做 5 个光凝点,以光凝作用后有气泡产生或伴轻度声响为 Bruch 膜击穿成功标志,视作有效光斑。

1.2.4 scRNA-seq 及分析 采用刮取脉络膜法分别制备正常对照组及 CNV 组小鼠脉络膜组织的单细胞悬液,经 0.4% 台盼蓝染色液手动计算细胞数及细胞活率后,交由广州基迪奥生物科技有限公司构建单细胞 RNA 文库、进行高通量测序和生物信息学分析。其基本流程如下:将样品加载到 10x Genomics 平台的胶珠微滴扩增体系内,充分混匀后生成油滴包裹的单细胞凝胶珠,使用单细胞建库试剂盒进行 RNA 提取、逆转录合成互补 DNA、DNA 酶切及测序接头芯片添加、PCR 扩增等,最终获得测序文库,采用 Illumina 测序平台的双端测序模式对建好的文库进行高通量测序。采用 Cell Ranger 3.0.2 pipeline 软件将原始测序数据解构,并与 University of California San Francisco (UCSC) 数据库中的小鼠参考基因组进行配对。在正常对照组和 CNV 组中分别测得 596 个和 618 个细胞。对测得的单个细胞进行质控过滤,质控条件包括:(1)单个细胞中测得的基因数量为 200~8 000;(2)单个细胞中唯一分子识别符(unique molecular identifier, UMI)总数小于 40 000,去除多细胞效应;(3)单个细胞中 UMI 的线粒体基因表达量比例小于 25%,去除可能的死亡细胞。经质控后,正常对照组和 CNV 组的剩余细胞数分别为 564 个和 583 个。采用 R 4.1.1 软件的 Seurat 3.0 程序包对测序数据进行无监督聚类分析获得基因表达矩阵,并生成二维 t-SNE 图对正常对照组和 CNV 组细胞的基因表达进行可视化展示。以差异倍数(fold change, FC) >1.5 且 $P<0.05$ 为差异表达基因。scRNA-seq 测序数据已上传至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) SRA 数据库(编号:PRJNA914550)。

1.2.5 细胞定义和标志物表达 根据已有文献报道^[13]和 CellMarker 数据库(<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>)检索情况,分析正常对照组和 CNV 组细胞的基因表达矩阵中标志基因表达情况;选择基质细胞标志物 Pdgfrb 和 Colla1, EC 标志物 Cdh5、Pecam1 和 Flt1, RPE 标志物 Rpe65, 平滑肌细胞标志物 Acta2, 造血系细胞标志物 Ptprc、视锥/视杆细胞标志物 Pde6a 和施万细胞标志物 Mbp 对各细胞群进行编号和定义,用小提琴图展示各类细胞亚群的标志基因表达情况。

1.2.6 细胞分化状态拟时序分析 在所有 CNV 组和正常对照组中筛选高表达 Pecam1、Cdh5 和 Flt1 的细胞亚群 6~7, 定义为 EC 群;通过 Monocle 3.0 程序包生成细胞状态转变过程中每个细胞必须经历的基因表达变化序列,并形成基因表达变化的整体轨迹;同时,利用所有细胞中基因表达水平的信号,基于不同分化状态细胞的基因表达水平,以 $FC>1.5$ 和 $P<0.05$ 筛选不同分化状态差异表达基因。

1.2.7 基因集富集分析 在 GEO 数据库中下载 CNV 相关 bulk RNA-seq 数据集(GSE129743)系列矩阵文件,将其导入 GSEA 4.2.3 程序,依据样本信息按正常对照组和 CNV 组进行样本分类。从 MSigDB 数据库中下载相关基因集,选择“no_collapse”模式进行相应通路的富集分析,并生成相应热图。

1.2.8 眼杯冰冻切片及免疫荧光染色 取造模后第 7 天小鼠 6 只,采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,20 ml PBS 经左心室全身灌注,分离造模眼眼球并置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 h,剪开角膜,去除眼前节,制成眼杯,置于质量分数 30% 蔗糖溶液中脱水至沉底。用组织冰冻切片 OCT 包埋剂包埋后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻,行 7~9 μm 厚冰冻切片;将冰冻切片于室温下干燥 2 h, PBS 洗涤 1 次;用含体积分数 1% BSA 和 0.5% Triton X-100 的 PBS 室温通透封闭 0.5 h;添加 Pecam1 抗体(1:50 稀释)、Tomm20 抗体(1:200 稀释)、mt-Co1 单克隆抗体(1:200 稀释)、Kdr 抗体(1:200 稀释)、Plvap 单克隆抗体(1:100 稀释) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗涤后,分别加入相应荧光标记 IgG 抗体(均 1:200 稀释)室温孵育 2 h;PBS 洗涤,用含 DAPI 的封片液封片,激光扫描共聚焦显微镜下观察并采集图片。采用 Adobe Photoshop 2022(美国 Adobe 公司)测量各组免疫荧光图片中 CNV 区域与正常区域(眼底形态结构规整且未发生 CNV 的周围区域)目标蛋白 Tomm20、mt-Co1、Kdr、Plvap 阳性区域与 Pecam1 阳性区域的面积比例及血管直径。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.3.1 软件(美国 GraphPad Software 公司)进行统计分析。各计量资料经 S-W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐,组间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 小鼠脉络膜组织单细胞悬液的制备

2.1.1 不同制备方法的细胞活率对比 剪碎复合体

法和刮取脉络膜法获得的细胞悬液中细胞活率分别为99.4%和99.1%，均满足单细胞测序的样本要求(图1)。

2.1.2 刮取脉络膜制备单细胞悬液中 EC 比例 流式细胞术结果显示,在活细胞中 Pecam1 阳性细胞占比约为 1.58%(图2)。

2.2 各组小鼠脉络膜 scRNA-seq 分析

2.2.1 细胞亚群分析 测序结果二维 t-SNE 图显示,在小鼠脉络膜组织中可鉴定得到 13 个细胞亚群,依据细胞标志物可进一步鉴定亚群 1~5 为基质细胞(高表达 *Pdgfrb* 和 *Col1a1*),亚群 6~7 为 EC(高表达 *Cdh5*、*Pecam1* 和 *Flt1*),亚群 8 为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞(高表达 *Rpe65*),亚群 9 为平滑肌细胞(高表达 *Pdgfrb* 和 *Acta2*),亚群 10 为造血系细胞(高表达 *Ptprc*),亚群 11 为视锥/视杆细胞(高表达 *Pde6a*),亚群 12~13 为施万细胞(高表达 *Mbp*)等(图 3A, B)。此外,正常对照组与 CNV 组小鼠脉络膜组织的细胞亚群种类无明显变化,但与正常对照组比较, CNV 组视锥/视杆细胞、EC 和造血系细胞比率显著升高,而 RPE 细胞和施万细胞比率相应降低(图 3C)。

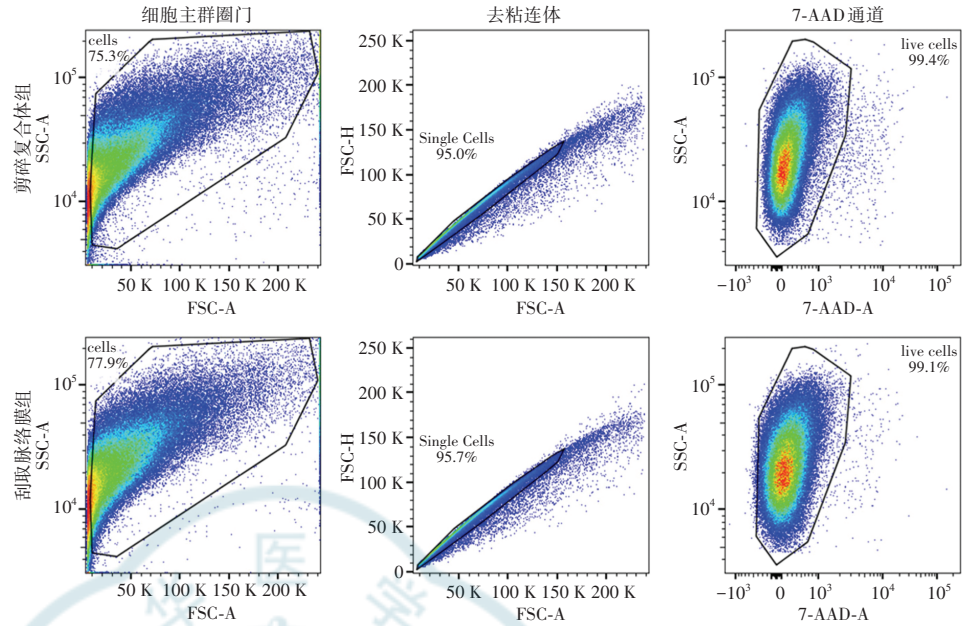


图 1 流式细胞术测定不同方法制备单细胞悬液的细胞活率 剪碎复合体组可见细胞主群占 75.3%，应用 FSC-H 和 FSC-A 参数去粘连后,单个细胞占 95%，在单个细胞中,7-AAD 阴性活细胞即细胞活率,占 99.4%；刮取脉络膜组可见细胞主群占 77.9%，应用 FSC-H 和 FSC-A 参数去粘连后单个细胞占 95.7%，7-AAD 阴性活细胞即细胞活率,占 99.1% (所圈为阴性群位置) FSC:前向散射;SSC:侧向散射;7-AAD:7-氨基-放线菌素 D

Figure 1 Cell viability in single cell suspensions prepared via different methods by flow cytometry For cells from choroidal-scleral fragments, the major cell group accounted for 75.3%. After the removal of debris, single cells accounted for 95%. In single cells, 7-AAD negative live cells accounted for 99.4%. For cells from choroidal scrapings, the major cell group accounted for 77.9%. After the removal of debris, single cells accounted for 95.7%. In single cells, 7-AAD negative live cells accounted for 99.1% (7-AAD negative cells were gated) FSC: forward scatter; SSC: side scatter; 7-AAD: 7-amino-actinomycin D

2.2.2 EC 分化状态分析 EC 群二维 t-SNE 图显示 EC 标志物 *Pecam1*、*Cdh5*、*Flt1* 在亚群 6~7 中富集(图 4A)。CNV 组与正常对照组 EC 的差异基因火山图显示,共检测出上调基因 370 个,下调基因 292 个(图 4B);相关差异基因见表 1~2。整体 EC 拟时序分析结果显示,脉络膜 EC 可进一步划分为 4 个分化状态(State 1~4)(图 4C)。CNV 组中位于 State 2 状态的

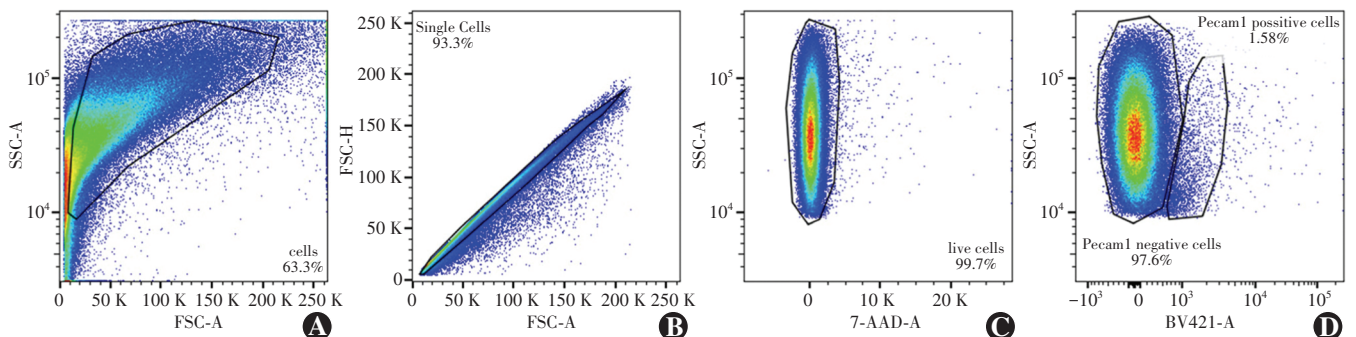


图 2 流式细胞术测定刮取脉络膜制备单细胞悬液中 EC 占比 A:细胞主群圈门细胞主群占 63.3% B:去粘连体单个细胞占 93.3% C:7-AAD 通道 7-AAD 阴性活细胞占 99.7% D:Pecam1 通道(Pecam1)阳性细胞约占 1.58% FSC:前向散射;SSC:侧向散射;7-AAD:7-氨基-放线菌素 D

Figure 2 EC Gating strategy to quantify Pecam1⁺ endothelial cells in suspension from choroidal scrapings A:The major cell group accounted for 63.3% B: After the removal of debris, single cells accounted for 93.3% C: After the removal of doublets, 7-AAD negative live cells accounted for 99.7% D: Proportion of BV421 (Pecam1) positive cells in live cells was around 1.58% FSC: forward scatter; SSC: side scatter; 7-AAD: 7-amino-actinomycin D

EC 比例为 29.1%，较正常对照组的 9.5% 明显升高 (图 4D)，提示其可能是病理性 CNV-EC。相较于其他分化状态，State 2 EC 的线粒体呼吸链复合体相关基因表达增加，而毛细血管特征基因表达降低 (图 4E)。各 State 的主要上调基因如表 3~6，其中，State 1 主要表达毛细血管特征基因 *Car4*、*Esm1* 和 *Kdr* 等；State 2 主要表达线粒体呼吸链复合体相关基因 *mt-Nd4*、*mt-Atp6* 等；State 4 主要表达核糖体相关基因 *Rpl10-ps3*、*Rbp1* 等；而 State 3 主要上调基因包括 *Itgb4*、*Hykk* 等，

无明确的功能富集。

2.3 CNV-EC 的病理特征验证

2.3.1 CNV-EC 线粒体特征蛋白分布面积 造模后 7 d，CNV 组冰冻切片免疫荧光染色显示，新生血管区域可见线粒体外膜蛋白 Tomm20 和线粒体呼吸链复合体 IV 亚基 mt-Co1 在 Pecam1 阳性 EC 内表达分布面积比例分别为 (19.50±4.68)% 和 (4.64±2.82)%，明显高于正常区域的 (3.00±2.09)% 和 (0.18±0.34)%，差异均有统计学意义 ($t = 7.88, P < 0.001$; $t = 3.84,$

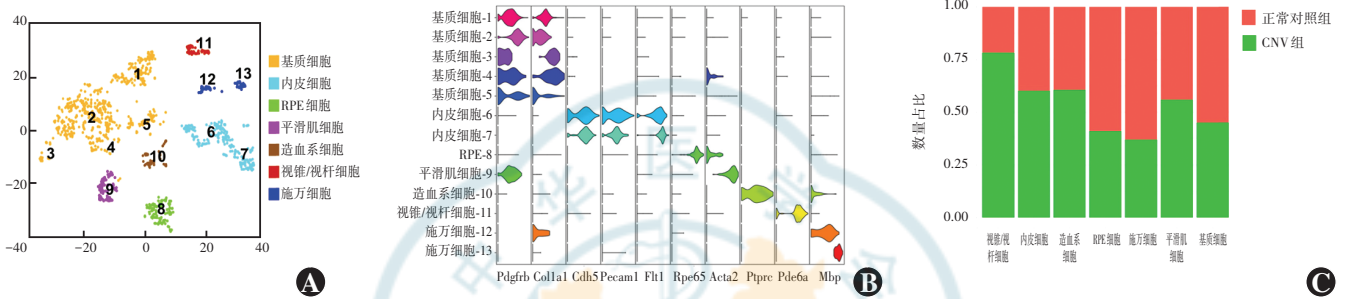


图 3 正常对照组和 CNV 组小鼠脉络膜 scRNA-seq 结果的细胞亚群分析 A: scRNA-seq 结果二维 t-SNE 图 数字示意不同细胞亚群,共鉴定 13 个细胞亚群 B:各细胞亚群标志物小提琴图 共鉴定 7 种细胞类型 C:正常对照组和 CNV 组各细胞亚群占比图 RPE:视网膜色素上皮; CNV:脉络膜新生血管

Figure 3 scRNA-seq analysis of choroidal cells from control and CNV mice A: 2D t-SNE plot of scRNA-seq result The numbers indicated the different cell subpopulations and a total of 13 cell subpopulations were identified B: Violin plot of typical cell markers in distinguished cell subtypes A total of 7 cell types were identified C: The proportion of each type of cells in choroidal tissues from control and CNV mice RPE: retinal pigment epithelium; CNV: choroidal neovascularization

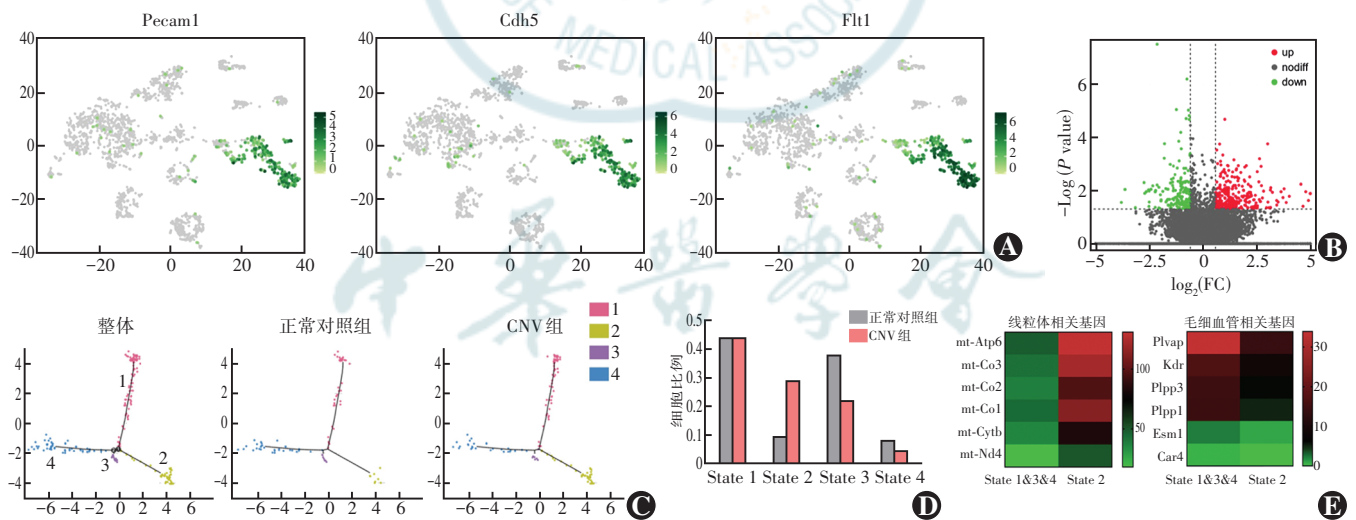


图 4 EC 亚群拟时序分析 A: 二维 t-SNE 图示意 EC 标志物 *Pecam1*、*Cdh5* 和 *Flt1* 在脉络膜细胞中的表达分布,由此提取 EC 群进行进一步分析 B: CNV 组与正常对照组 EC 差异基因分布火山图 ($FC > 1.5; P < 0.05$) C: EC 群拟时序分析图 可将细胞分为 4 个分化状态,不同颜色示意拟时间轴差异化状态的群 D:正常对照组和 CNV 组 EC 中各分化状态细胞比例 可见 CNV 组 State 2 比例明显增加 E: EC 中 State 2 与其他分化状态线粒体相关基因和毛细血管相关基因表达热图 State 2 EC 中线粒体呼吸链复合体相关基因表达增加,而毛细血管特征基因表达降低 FC: 差异倍数; CNV: 脉络膜新生血管

Figure 4 Pseudo-time analysis of EC cluster A: 2D t-SNE plot showing the distribution of EC markers *Pecam1*, *Cdh5* and *Flt1* in choroidal cells. ECs were selected for further analysis B: Volcano plot showing the distribution of differentially expressed genes of ECs between the CNV group and normal control group ($FC > 1.5; P < 0.05$) C: Pseudo-time trajectory of ECs Cells were divided into 4 states. Different states in the pseudo-time analysis were color-coded D: The proportion of EC in different states from normal and CNV mice The number of ECs in state 2 increased evidently in CNV group E: Heatmap showing the expression of mitochondrial respiratory chain-related genes and capillary genes of EC in different states The expression of mitochondrial respiratory chain related genes were upregulated and the capillary genes were downregulated in state 2 EC in compared with state 1, 3 and 4 EC FC: fold change; CNV: choroidal neovascularization

$P < 0.01$) (图 5A~D); 结合已发表的 CNV 大量细胞转录组测序 (bulk RNA-seq, GSE129743) 数据显示, 与正常对照组相比, CNV 组样本中线粒体外膜相关基因集富集程度升高 (图 5E)。

2.3.2 CNV-EC 毛细血管特征性蛋白表达 造模后 7 d, 眼杯冰冻切片免疫荧光染色显示, 新生血管区域毛细血管特征性标志物 Kdr 和 Plvap 在 Pecam1 阳性 EC 内表达面积比例分别为 $(1.50 \pm 0.29)\%$ 和 $(0.79 \pm 0.97)\%$, 低于正常区域的 $(31.30 \pm 5.44)\%$ 和 $(10.43 \pm 2.28)\%$, 差异均有统计学意义 ($t = 13.40$ 、 9.48 , 均 $P < 0.001$) (图 6A~D); 此外, 已发表的 CNV bulk RNA-seq 数据分析显示, 与正常对照组相比, CNV 样本中毛细血管相关基因集富集减少 (图 6E)。

2.3.3 CNV 血管直径变化 为进一步明确 CNV 中的血管结构改变, 对脉络膜血管直径进行统计分析, 结果显示, CNV 区域血管直径为 $(5.52 \pm 1.85) \mu\text{m}$, 明显高于正常区域的 $(4.21 \pm 1.84) \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($t = 9.57$, $P < 0.001$) (图 7A, B)。此外, 针对 CNV bulk RNA-seq 数据的 GSEA 分析提示 CNV 样本中动脉发育相关基因集上调 (图 7C), 与本文 CNV 中血管形态的转变趋势一致。

表 1 CNV 组 EC 中 Top10 上调基因
Table 1 Top 10 upregulated genes in EC in CNV group

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>Pcdhb14</i>	6.640	0.013
<i>Helq</i>	6.183	0.013
<i>Rho</i>	5.220	0.012
<i>Dus31</i>	4.913	0.023
<i>Phf21b</i>	4.789	0.011
<i>Snx29</i>	4.661	0.039
<i>Ube2v1</i>	4.563	0.005
<i>Elmod2</i>	4.023	0.016
<i>Zdhhc14</i>	3.879	0.028
<i>Tram2</i>	3.779	0.008

注: CNV: 脉络膜新生血管; EC: 内皮细胞
Note: CNV: choroidal neovascularization; EC: endothelial cell

表 2 正常对照组 EC 中 Top10 上调基因
Table 2 Top 10 upregulated genes in EC in normal control group

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>Unc13c</i>	3.812	0.028
<i>Prmt9</i>	3.640	0.009
<i>Ift52</i>	3.159	0.044
<i>Lig3</i>	2.757	0.005
<i>Zdhhc9</i>	2.725	0.012
<i>Spryd7</i>	2.655	0.011
<i>Magee1</i>	2.551	0.009
<i>Kbtbd3</i>	2.533	0.039
<i>Psmg3</i>	2.522	0.010
<i>Cox16</i>	2.518	0.027

注: CNV: 脉络膜新生血管; EC: 内皮细胞
Note: CNV: choroidal neovascularization; EC: endothelial cell

表 3 EC 中 State 1 相比其他分化状态主要上调差异基因
Table 3 Major upregulated genes in state 1 EC compared with state 2,3,4

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>Car4</i>	4.112	<0.001
<i>Esm1</i>	3.219	<0.001
<i>Plvap</i>	2.195	<0.001
<i>Kdr</i>	2.089	<0.001
<i>Flt1</i>	0.583	<0.001

注: EC: 内皮细胞
Note: EC: endothelial cell

表 4 EC 中 State 2 相比于其他分化状态主要上调差异基因
Table 4 Major upregulated genes in state 2 compared with state 1,3,4

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>mt-Nd4</i>	1.432	<0.001
<i>mt-Atp6</i>	1.421	<0.001
<i>mt-Co3</i>	1.392	<0.001
<i>mt-Nd3</i>	1.356	<0.001
<i>mt-Nd2</i>	1.324	<0.001

注: EC: 内皮细胞
Note: EC: endothelial cell

表 5 EC 中 State 3 相比于其他分化状态主要上调差异基因
Table 5 Major upregulated genes in state 3 compared with state 1, 2, 4

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>Itgb4</i>	3.591	0.002
<i>Hykk</i>	3.498	<0.001
<i>Zfp780b</i>	2.890	<0.001
<i>Pgm1</i>	2.717	0.002
<i>Cnnm2</i>	2.706	0.001

注:EC:内皮细胞
Note:EC:endothelial cell

表 6 EC 中 State 4 相比于其他分化状态主要上调差异基因
Table 6 Major upregulated genes in state 4 compared with state 1, 2, 3

基因	Log ₂ (差异倍数)	P 值
<i>Rpl10-ps3</i>	1.897	0.001
<i>Rbp1</i>	1.525	0.002
<i>Rps9</i>	1.520	<0.001
<i>Rps15a</i>	1.490	<0.001
<i>Rps27rt</i>	1.450	<0.001

注:EC:内皮细胞
Note:EC:endothelial cell

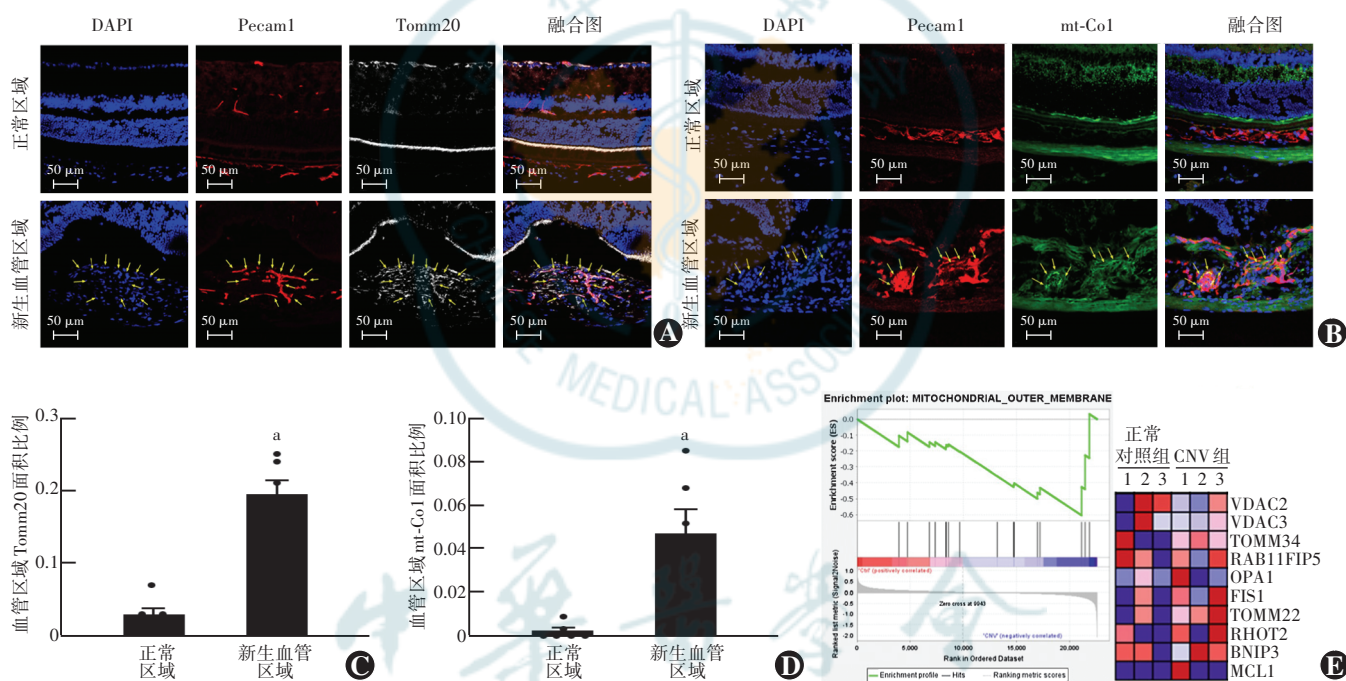


图 5 小鼠 CNV 造模后 7 d 线粒体特征蛋白在 EC 的表达改变 A: 眼杯冰冻切片 Pecam1 和 Tomm20 免疫荧光染色 ($\times 400$, 标尺 = 50 μm) 红色荧光为 EC 标志物 Pecam1, 蓝色荧光为细胞核染料 DAPI, 灰色荧光标记线粒体外膜蛋白 Tomm20, CNV 区域 EC 内 Tomm20 分布 (黄色箭头) 较正常区域显著增多 B: 眼杯冰冻切片 Pecam1 和 mt-Co1 免疫荧光染色 ($\times 400$, 标尺 = 50 μm) 红色荧光为 EC 标志物 Pecam1, 蓝色荧光为细胞核染料 DAPI, 绿色荧光标记线粒体复合 IV 蛋白 mt-Co1, CNV 区域 EC 内 mt-Co1 分布 (黄色箭头) 较正常区域显著增多 C: EC 内新生血管区域与正常区域 Tomm20 面积占比 (Tomm20/Pecam1) 比较 与正常区域比较, $^a P < 0.001$ (独立样本 *t* 检验, $n = 6$) D: EC 内新生血管区域与正常区域 mt-Co1 面积占比 (mt-Co1/Pecam1) 比较 与正常区域比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 6$) E: GSE129743 数据库中正常对照组和 CNV 组全脉络膜组织线粒体外膜相关基因集富集分析 可见线粒体外膜相关基因在 CNV 组中呈现上调趋势 CNV: 脉络膜新生血管

Figure 5 Expression of mitochondrial protein in EC 7 days following CNV modeling A: Immunofluorescence staining of choroidal-scleral complex frozen section for Pecam1 and Tomm20 ($\times 400$, bar = 50 μm) EC marker Pecam1, mitochondrial outer membrane Tomm20 and cell nucleus (DAPI) showed red, gray and blue, respectively. There was more Tomm20 distributed in EC in the CNV area (yellow arrows) compared with normal area B: Immunofluorescence staining of choroidal-scleral complex frozen section for Pecam1 and mt-Co1 ($\times 400$, bar = 50 μm) EC marker Pecam1, mitochondrial complex IV mt-Co1 and cell nucleus (DAPI) showed red, green and blue, respectively. There was more mt-Co1 distributed in EC in the CNV area (yellow arrows) compared with normal area C: Comparison of the ratio of Tomm20/Pecam1 double positive area to Pecam1 positive area between neovascular area and normal area Compared with normal area, $^a P < 0.001$ (Independent samples *t*-test, $n = 6$) D: Comparison of the ratio of mt-Co1/Pecam1 double positive area to Pecam1 positive area between neovascular area and normal area Compared with normal area, $^a P < 0.01$ (Independent samples *t*-test, $n = 6$) E: Gene Set Enrichment Analysis of whole choroid mitochondrial outer membrane-associated gene sets in GSE129743 database for control and CNV groups The expression of mitochondrial related genes was upregulated in CNV group CNV: choroidal neovascularization

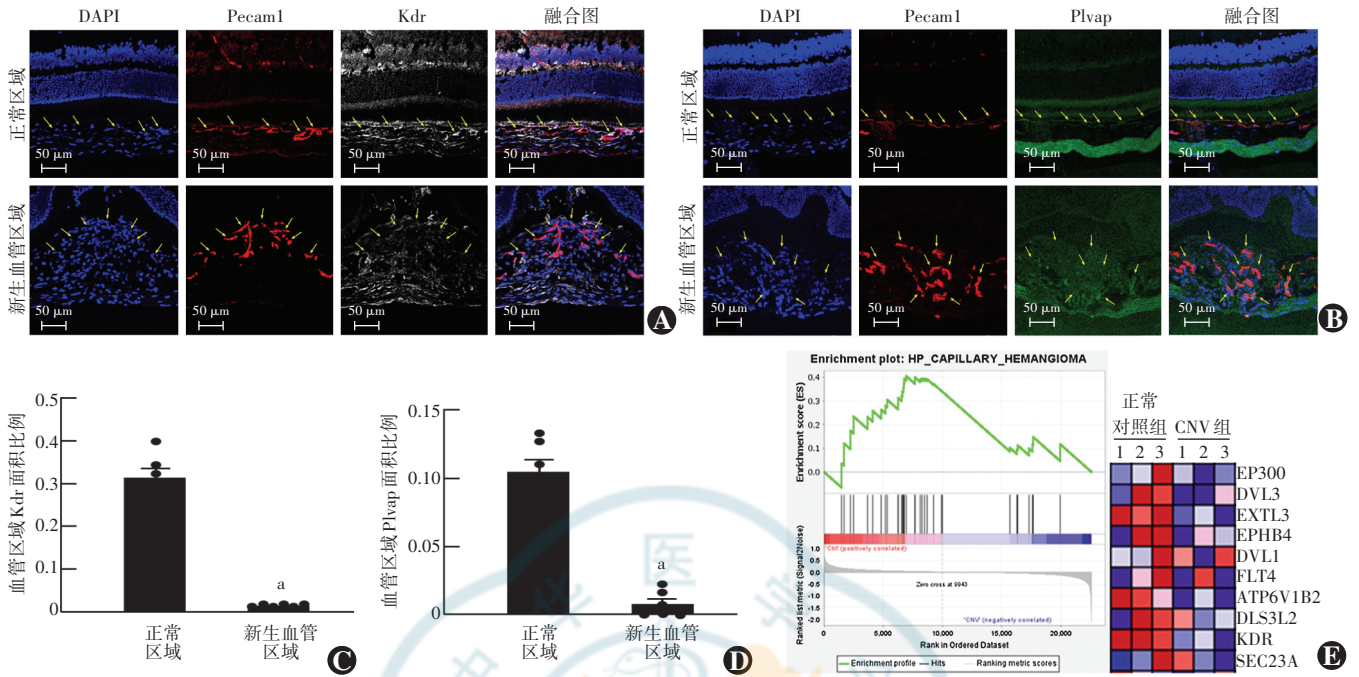


图 6 小鼠造模后 7 d 毛细血管内皮标志物在 EC 的表达改变 A: 眼杯冰冻切片 Pecam1 和 Kdr 免疫荧光染色 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 红色荧光为 EC 标志物 Pecam1, 蓝色荧光为细胞核染料 DAPI, 灰色荧光标记毛细血管标志物 Kdr, CNV 区域 EC 内 Kdr 分布 (黄色箭头) 较正常区域显著增多 B: 眼杯冰冻切片免疫荧光染色 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 红色荧光为 EC 标志物 Pecam1, 蓝色荧光为细胞核染料 DAPI, 绿色荧光标记毛细血管标志物 Plvap, CNV 区域 EC 内 Kdr 分布 (黄色箭头) 较正常区域显著增多 C: EC 内新生血管区域及正常区域 Kdr 面积占比 (Kdr/Pecam1) 比较 与正常区域比较, $^*P < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) D: EC 内新生血管区域及正常区域 Plvap 面积占比 (Plvap/Pecam1) 比较 与正常区域比较, $^*P < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) E: GSE129743 中正常对照组和 CNV 组全脉络膜组织毛细血管相关基因集 GSEA 分析 可见毛细血管相关基因在 CNV 中表达减少 CNV: 脉络膜新生血管

Figure 6 Expression of capillary endothelial marker in EC 7 days following CNV modeling A: Immunofluorescence staining of choroidal-scleral complex frozen section for Pecam1 and Kdr ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) EC marker Pecam1, capillary marker Kdr and cell nucleus (DAPI) showed red, gray and blue, respectively. There was more Kdr distributed in EC in the CNV area (yellow arrows) compared with normal area B: Immunofluorescence staining of choroidal-scleral complex frozen section for Pecam1 and Plvap ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) EC marker Pecam1, capillary marker Plvap and cell nucleus (DAPI) showed red, green and blue, respectively. There was more Plvap distributed in EC in the CNV area (yellow arrows) compared with normal area C: Comparison of the ratio of Kdr/Pecam1 double positive area to Pecam1 positive area between neovascular area and normal area Compared with normal area, $^*P < 0.001$ (Independent samples t -test, $n = 6$) D: Comparison of the ratio of Plvap/Pecam1 double positive area to Pecam1 positive area between neovascular area and normal area Compared with normal area, $^*P < 0.01$ (Independent samples t -test, $n = 6$) E: Gene Set Enrichment Analysis of whole choroidal capillary-associated gene sets in GSE129743 database for control and CNV groups The expression of capillary-associated genes was downregulated in CNV group CNV: choroidal neovascularization

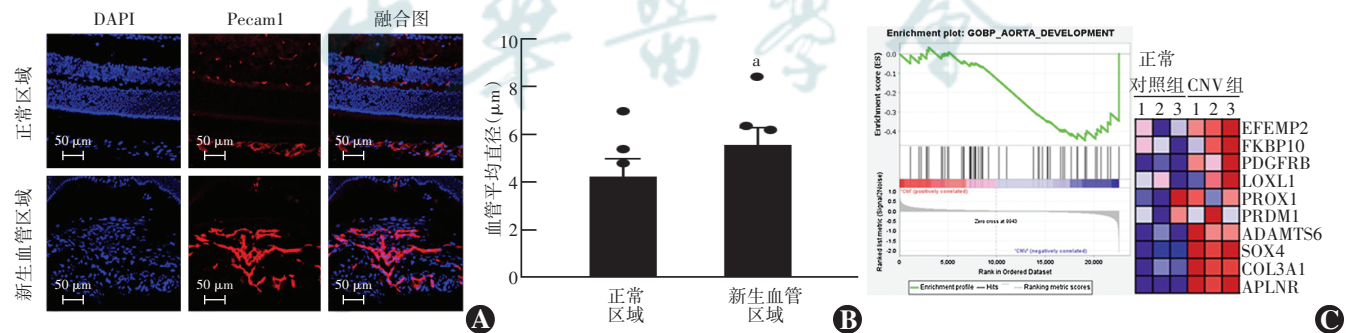


图 7 小鼠造模后 7 d 脉络膜血管平均直径分析 A: 眼杯冰冻切片 Pecam1 免疫荧光染色 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 红色荧光为 EC 标志物 Pecam1, 蓝色荧光为细胞核染料 DAPI, 可见新生血管区域较正常区域管径更为迂曲粗大 B: 新生血管区域及正常区域 Pecam1 阳性血管直径比较 与正常区域比较, $^*P < 0.001$ (配对样本 t 检验, $n = 6$) C: GSE129743 中, 正常对照组和 CNV 组全脉络膜组织毛细血管相关基因集 GSEA 分析, 可见动脉发育相关基因在 CNV 中表达升高 CNV: 脉络膜新生血管

Figure 7 Average choroidal vessel diameter 7 days following CNV modeling A: Immunofluorescence staining of choroidal-scleral complex frozen section for Pecam1 ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) EC marker Pecam1 showed red and cell nucleus (DAPI) presented blue. More tortuous and dilated vessels appeared in the neovascular area in comparison with the normal area B: Comparison of the diameter of Pecam1 positive vessels between neovascular and normal areas Compared with normal area, $^*P < 0.001$ (Paired samples t -test, $n = 6$) C: Gene Set Enrichment Analysis of whole choroidal capillary-associated gene sets in GSE129743 database for control and CNV groups The expression of aorta development related genes was upregulated in CNV group CNV: choroidal neovascularization

3 讨论

CNV 是一系列复杂致盲眼病的共同病理改变,其发生机制涉及多种细胞的共同参与和交互作用^[1]。EC 是 CNV 的主要效应细胞,揭示 CNV-EC 病理特征有助于加深对 CNV 发病机制的理解,并为其新治疗靶点的开发提供理论依据^[17]。本研究应用激光诱导的小鼠 CNV 模型,基于 scRNA-seq 分析及形态学验证,探讨了脉络膜 EC 的差异分化状态,观察到 CNV-EC 出现线粒体分布增加和毛细血管向微血管转化的病理特征,并为后续相关 CNV 研究提供组学参考。

由于 mRNA 在细胞内的降解更新速率极快,制备高质量、高细胞活率(通常需>90%)的单细胞悬液是获得可靠 scRNA-seq 数据的前提。既往报道的小鼠眼球各组织的单细胞悬液可依靠胶原酶、胰蛋白酶或中性蛋白酶于 37 °C 消化 15~40 min 后得到,但细胞组织的分离状态及消化处理的时间优化条件有待进一步确定^[18]。结合文献报道和预实验优化,本研究中选择胰蛋白酶/I 型胶原酶 37 °C 连续消化的方式,检测并比较了剪碎脉络膜复合体和刮取脉络膜 2 种方式制备单细胞悬液的可靠性,结果显示所得到细胞悬液的细胞活率均高于 99%。由于刮取脉络膜进行消化可最大程度降低巩膜中细胞组分的影响,更接近脉络膜组织的真实细胞组成,且通过观察消化后悬液中的组织团块剩余情况,可见刮除脉络膜组更为清澈且无巩膜碎屑,细胞消化更为充分,因此后续选择该方法制备单细胞悬液。流式细胞术测得单细胞悬液中 EC 约占 1.58%,而最终 scRNA-seq 结果显示约占 18%,这可能是由于胰蛋白酶消化部分破坏了细胞表面抗原,导致荧光抗体的灵敏度低于 scRNA-seq 的分辨率,以及流式细胞术检测时不可避免地将部分细胞碎片圈入分析门导致细胞总数偏高,测量值低于真实值。此外,在 Voigt 等^[11]的研究中,应用免疫荧光染色检测人脉络膜中 EC 约占 18%,但相应的单细胞测序结果仅为 4%,其原因可能在于受 Bruch 膜和细胞外基质包被的脉络膜 EC 较其他细胞更难解离,为保证细胞活率,酶消化相对不充分。而 Lehmann 等^[13]对正常 C57BL/6 小鼠脉络膜进行 scRNA-seq 研究,结果显示脉络膜中 EC 约占 25%,与本研究的 18% 相近;同时提示部分未充分解离的 EC 可能在测序前被滤去;这也是后续研究需要进一步完善的地方。

在将 scRNA-seq 结果可视化后,通过二维 t-SNE 图展示 CNV 中的细胞分布及其分子表达特征,可见 CNV 和正常脉络膜组织的细胞种类均包括成纤维细

胞、EC 等,与既往研究相似^[13]。在这些细胞类型中,脉络膜基质细胞可分为 4 个亚群,包括周细胞、成纤维细胞、间充质细胞等多种细胞类型。既往研究表明,脉络膜基质细胞对 CNV 具有复杂的调控作用;Alexander 等^[19]研究发现,体外分离培养的人脉络膜基质细胞具有间充质细胞表型并发挥抗血管生成作用;Lehmann 等^[13]研究表明,脉络膜基质细胞高表达 *Gli1*,可被 EC 来源的 *Ihh* 调控,介导 CNV 中的免疫反应。而这些细胞的具体类型、表达特点和功能尚需进一步研究。此外,对比正常脉络膜和 CNV 中不同类型的细胞比例发现,视锥/视杆细胞在 CNV 中显著增加,这可能与 CNV 处视网膜组织粘连有关;EC 比例在 CNV 中增加,符合新生血管过程;造血系细胞在 CNV 组也出现了增加,这部分细胞包括淋巴免疫细胞及骨髓来源细胞,从组学角度进一步证实骨髓来源的干祖细胞及免疫细胞参与 CNV 形成;而 RPE 细胞、施万细胞在 CNV 组相对减少,可能与脉络膜组织损伤有关。

脉络膜 EC 具有相对独特的分子表达特征。人眼黄斑区脉络膜血管可分为毛细血管层、Sattler 层(中小血管)和 Haller 层(大血管)^[20]。研究表明,除表达 EC 特异性标志物 *Pecam1* 和 *Cdh5* 外,脉络膜动脉 EC 高表达 *Sema3G* 和 *Hey1* 等特征性基因,静脉 EC 高表达 *Darc* 等特征性基因,而毛细血管 EC 高表达 *Ca4* 和 *Plvap* 特征性基因^[12]。为进一步揭示脉络膜 EC 的亚群和功能状态,本研究筛选 *Pecam1* 和 *Cdh5* 阳性的 EC 群并进行拟时分析,结果显示脉络膜 EC 可被进一步划分为 4 个分化状态。根据上调基因类型,分析 State 1 为典型的毛细血管 EC,State 2 出现线粒体基因高表达,提示代谢改变与线粒体功能活化;State 4 主要表达核糖体相关基因,可能处于蛋白合成活跃或增生状态;而 State 3 的基因表达暂无明确的功能特征。此外,位于 State 2 的 EC 比例在 CNV 中显著增加,提示其可能为病理性 CNV-EC。

EC 功能障碍是 CNV 发病的重要机制之一^[2]。截至目前,共 3 项单细胞相关研究在不同层面探讨了 CNV-EC 的病理特征。其中,Lehmann 等^[13]研究指出,CNV-EC 高表达 *Rgcc* 基因,可介导促炎相关分子表达;此外 *Egr1*、*Atf3* 等细胞应激和损伤相关基因也在 CNV-EC 中呈高表达;Rohlenova 等^[14]通过比较 CNV 造模小鼠和正常小鼠脉络膜 EC 在 t-SNE 图上的分布差异来确定 CNV-EC;并针对 CNV-EC 中的代谢相关基因进行了差异分析和富集分析,发现其中生物合成相关的糖酵解、核酸合成、三羧酸循环、氧化磷酸化等相关基因均上调活化;认为以上病理性改变可能与细

胞增生及细胞外基质重塑相关。本研究结果显示,线粒体呼吸链基因 *mt-ND4*、*mt-Atp6* 等的高表达与毛细血管特征基因 *Kdr* 等丢失是 State 2 CNV-EC 的突出特征。线粒体是细胞内实现能量转化的主要结构,EC 中线粒体相关基因的上调可能与线粒体数量增多、功能增强及代谢功能活化改变相关,并对促进细胞增生和转变等产生影响^[21]。通过对线粒体外膜蛋白 Tomm20 和线粒体呼吸链复合体 IV 亚基 *mt-Co1* 进行免疫荧光染色,我们进一步证实了 CNV-EC 线粒体分布增多,提示其代谢方式改变。除转录组学数据证实分子改变之外,在形态方面,新生血管区域表现为管径扩张和走行迂曲,提示由毛细血管向微血管转变。而临床相关研究也揭示,随病变发展,部分 CNV 分支减少,管径增粗,血管团中毛细血管比例减少而小动脉比例增加^[22];相较于毛细血管为主的 CNV,小动脉型 CNV 对抗 VEGF 治疗不敏感,并可伴随出血、纤维化等症状导致的预后不良^[23-25]。本研究在小鼠 CNV 模型中关于 EC 毛细血管特征丢失的发现与临床上的 CNV 转归具有一定相似性,进一步明确调控这一表型的分子和代谢机制,有望深入揭示 CNV 的发生和发展特点。

综上,本研究优化了小鼠脉络膜组织单细胞悬液的制备方法,通过 scRNA-seq 技术,揭示了 CNV 和正常脉络膜组织中的细胞分群和特点;进一步拟时分析描绘 EC 不同分化状态差异,并观察到 CNV-EC 具有线粒体基因高表达和毛细血管基因丢失的分子表达特征;最后通过免疫荧光染色证实了 CNV-EC 中线粒体分布增加、*Kdr* 表达减少及血管管径增大,提示其线粒体代谢活化和向微血管转变的特征,与 CNV 临床特点具有一定相似性。后续研究可进一步解析线粒体活化及其引起的代谢产物改变对 CNV-EC 异常生物学行为的调控功能和机制,并关注这一变化是否介导 CNV 血管类型的转变,以期深入理解 CNV 的发病机制,为开发新治疗靶点提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 温立势:实验操作、采集数据、分析数据、起草文章;张泉:实验操作、起草文章;严宏祥、李曼红、苏静波、常天芳:参与实验;王雨生、孙嘉星:指导实验设计、参与实验、文章审阅及最终定稿

参考文献

- Brinks J, van Dijk E, Klaassen I, et al. Exploring the choroidal vascular labyrinth and its molecular and structural roles in health and disease [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2022, 87 : 100994 [2022 - 11 - 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34280556>. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2021. 100994.
- Yeo N, Chan E, Cheung C. Choroidal neovascularization: mechanisms of endothelial dysfunction [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2019, 10 : 1363 [2022 - 11 - 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31849644>. DOI: 10. 3389/fphar. 2019. 01363.
- Xie L, Wang Y, Li Q, et al. The HIF-1 α /p53/miRNA-34a/Klotho axis in retinal pigment epithelial cells promotes subretinal fibrosis and exacerbates choroidal neovascularization [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3) : 1700-1711. DOI: 10. 1111/jcmm. 16272.
- Tong JP, Yao YF. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis; a need for balanced expressions [J]. *Clin Biochem*, 2006, 39(3) : 267-276. DOI: 10. 1016/j. clinbiochem. 2005. 11. 013.
- Ahmad I, Balasubramanian S, Del Debbio CB, et al. Regulation of ocular angiogenesis by Notch signaling; implications in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6) : 2868-2878. DOI: 10. 1167/iovs. 10-6608.
- Potter SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8) : 479-492. DOI: 10. 1038/s41581-018-0021-7.
- Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: technical advancements and biological applications [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 59 : 36-46. DOI: 10. 1016/j. mam. 2017. 07. 003.
- Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8) : 1-14. DOI: 10. 1038/s12276-018-0071-8.
- Ke Y, Jian-Yuan H, Ping Z, et al. The progressive application of single-cell RNA sequencing technology in cardiovascular diseases [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154 : 113604 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36057222>. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2022. 113604.
- Zhang Y, Wang D, Peng M, et al. Single-cell RNA sequencing in cancer research [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1) : 81 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33648534>. DOI: 10. 1186/s13046-021-01874-1.
- Voigt AP, Mullin NK, Stone EM, et al. Single-cell RNA sequencing in vision research; insights into human retinal health and disease [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83 : 100934 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33383180>. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2020. 100934.
- Voigt AP, Mulfaul K, Mullin NK, et al. Single-cell transcriptomics of the human retinal pigment epithelium and choroid in health and macular degeneration [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(48) : 24100-24107 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31712411>. DOI: 10. 1073/pnas. 1914143116.
- Lehmann GL, Hanke-Gogokhia C, Hu Y, et al. Single-cell profiling reveals an endothelium-mediated immunomodulatory pathway in the eye choroid [J/OL]. *J Exp Med*, 2020, 217(6) : e20190730 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32196081>. DOI: 10. 1084/jem. 20190730.
- Rohlenova K, Goveia J, García-Caballero M, et al. Single-cell RNA sequencing maps endothelial metabolic plasticity in pathological angiogenesis [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(4) : 862-877. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2020. 03. 009.
- Lambert V, Lecomte J, Hansen S, et al. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11) : 2197-2211. DOI: 10. 1038/nprot. 2013. 135.
- Sun JX, Chang TF, Li MH, et al. SNAI1, an endothelial-mesenchymal transition transcription factor, promotes the early phase of ocular neovascularization [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3) : 635-652. DOI: 10. 1007/s10456-018-9614-9.
- Mettu PS, Allingham MJ, Cousins SW. Incomplete response to anti-VEGF therapy in neovascular AMD: exploring disease mechanisms and therapeutic opportunities [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 82 : 100906 [2022 - 11 - 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33022379>. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2020. 100906.
- Benedicto I, Lehmann GL, Ginsberg M, et al. Concerted regulation of retinal pigment epithelium basement membrane and barrier function by angiocrine factors [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8 : 15374 [2022 - 11 -

- 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524846>. DOI: 10.1038/ncomms15374.
- [19] Alexander N, Walshe J, Richardson NA, et al. Stromal cells cultivated from the choroid of human eyes display a mesenchymal stromal cell (MSC) phenotype and inhibit the proliferation of choroidal vascular endothelial cells *in vitro* [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 200 : 108201 [2022-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32888962>. DOI:10.1016/j.exer.2020.108201.
- [20] Baba T, Grebe R, Hasegawa T, et al. Maturation of the fetal human choriocapillaris [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (7) : 3503-3511. DOI:10.1167/iops.08-2614.
- [21] Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, et al. Endothelial cell metabolism [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98 (1) : 3-58. DOI: 10.1152/physrev.00001.2017.
- [22] Al-Sheikh M, Iafe NA, Phasukkijwatana N, et al. Biomarkers of neovascular activity in age-related macular degeneration using optical coherence tomography angiography [J]. *Retina*, 2018, 38 (2) : 220-230. DOI:10.1097/IAE.0000000000001628.
- [23] Lad EM, Grunwald L, Mettu PS, et al. Lesion morphology on indocyanine green angiography in age-related macular degeneration with classic choroidal neovascular membrane: implications for response to anti-VEGF treatment [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(14) : 5161 [2022-11-18]. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2358874&resultClick=1>.
- [24] Mettu PS, Crowell S, Shaw J, et al. Neovascular morphology on ICG angiography predicts response to anti-VEGF therapy in eyes with serous pigment epithelial detachments and age-related macular degeneration [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(14) : 2654 [2022-11-18]. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2353817&resultClick=1>.
- [25] Serrano NP, Shaw J, Mettu PS, et al. High-speed indocyanine green angiography in age related macular degeneration with fibrovascular pigment epithelial detachments [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(14) : 1151 [2022-11-18]. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2350537&resultClick=1>.

(收稿日期:2023-01-19 修回日期:2023-02-11)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对来稿中计量单位的使用要求

计量单位 计量单位的使用执行 GB 3100/3101/3102-1993《国际单位制及其应用/有关量、单位和符号的一般原则/(所有部分)量和单位》的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第3版(人民军医出版社2001年出版)。作者在撰写论文时应注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线为2条时本刊采用ng/(kg·min)的形式,而不用ng/kg/min的形式。应尽可能使用单位符号,也可以与非物理单位(如:人、次、台等)的汉字构成组合形式的单位,如:次/min。在叙述中请先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注明法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列出法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写1次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4 ng/L±18.2 ng/L”可以表示为“(75.4±18.2)ng/L”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号为*A*。

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局函[1998]126号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用毫米汞柱(mmHg)或厘米水柱(cmH₂O)为计量单位,但首次使用时应注明mmHg或cmH₂O与kPa的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa,1 cmH₂O=0.098 kPa)。

本刊对论文发表过程中利益冲突问题的处理和要求

本刊严格遵守《国际医学期刊编辑委员会》关于“生物医学期刊投稿的统一要求”,恪守公正、客观、科学性对待作者研究论文的原则,最大限度规避在稿件发表的各个环节中存在的潜在利益关系或冲突,尽量减少发表偏倚。作者投稿过程中应注明存在利益关系或冲突的审稿人姓名或机构,同时提供该研究获得的资助机构并提供相应的证明或文件的复印件。稿件在同行评审过程中实行三级审理制,同行评审过程至少要求在不同医疗机构的3人中进行,审稿过程中严格遵守保密原则,编辑部在综合评价多个同行评审专家的意见后确定稿件的录用与否。作者还应在文后致谢对该研究提供资助和帮助的人员并申明理由,或就该研究与文中涉及的医疗机构、生产厂家和药商之间有无利益关系进行声明。

本刊对来稿中电子版图片的要求

自我刊开通网上投稿以来,作者均采用将Word文档从网上在线投稿的方式,但部分来稿中所包含的图片像素较低,这些图片便于网上审稿,并不能用于制版印刷。因为显示器与彩印纸品的色彩形成截然不同,显示器应用红、绿、蓝的三原色原理发射光线形成图像,这种色彩形成的原理被称为RGB模式;而彩印印刷品是蓝、红、黄、黑四色油墨印制在纸制品上来形成彩色图像,这种原理被称为CMYK模式。那些在显示器上看起来比较清晰但分辨率较低的图片在实际印刷时不能转换为高质量CMYK模式的图片。为了保证论文的刊出质量及本刊的印刷出版质量,如果作者的来稿中附有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、细胞图,请作者将原图保存为TIFF格式或JPG格式,图片的分辨率至少300 dpi。

(本刊编辑部)