

# MeCP2 诱导的视网膜色素上皮细胞转录组和 m6A 的改变

张咏雅 李晓华 赵雪茹 李雪

郑州大学人民医院眼科 河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科与视觉科学重点实验室 河南省医学科学院眼科研究所, 郑州 450003

通信作者: 李晓华, Email: xhl\_6116@163.com

**【摘要】目的** 探讨重组人甲基 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 处理的视网膜色素上皮 (RPE) 细胞中 mRNA 和 N6-甲基腺嘌呤 (m6A) 改变及其机制。**方法** 将传代 ARPE-19 细胞贴壁培养后分为正常对照组和 MeCP2 组, 正常对照组细胞采用正常培养液培养, MeCP2 组细胞于含终质量浓度 20 ng/ml 重组人 MeCP2 蛋白培养液中, 连续培养 72 h。提取细胞内总 RNA 进行转录组测序 (RNA-seq) 和甲基化免疫共沉淀测序 (MeRIP-seq) 分析。采用 edgeR 软件包根据  $P < 0.05$  筛选差异表达基因 (DEGs) 和差异甲基化基因 (DMGs)。采用基因本体论 (GO) 富集分析对差异基因进行生物学功能描述, 采用京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 进行通路富集分析。筛选出 DEGs 与 DMGs 交集的基因, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测各组差异基因 mRNA 表达水平。**结果** 共筛选出 DEGs 100 个, DMGs 7 441 个, 富集分析发现 DEGs 与细胞外基质 (ECM)-受体相互作用、细胞分裂、细胞周期和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路等相关, DMGs 与微管细胞骨架、血管生成、表皮生长因子受体 (ErbB) 信号通路、晚期糖基化终末产物 (AGEs)-糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路、Notch 信号通路和转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路等相关。DEGs 中 24 个基因表达增加, 76 个基因表达减少; DMGs 中 5 个基因含有高甲基化峰, 7 439 个基因含有低甲基化峰, 注释峰后, 正常对照组有 7 626 个基因发生 m6A 甲基化, MeCP2 组有 8 006 个基因发生 m6A 甲基化, 2 个组间有 7 360 个交集基因。正常对照组和 MeCP2 组的 m6A 甲基化富集于转录本的 CDS、内含子和 3'-非翻译区 (3'UTR) 区域, 其甲基化比例分别为 23.62%/22.27%、48.53%/48.35% 和 23.66%/25.28%。联合分析发现 2 个上皮-间充质转化 (EMT) 相关基因 *CSPG5* 和 *RBPI* 的 mRNA 和 m6A 水平均降低。荧光定量 PCR 结果显示, MeCP2 组 *CSPG5*、*RBPI*、*ZNF484* mRNA 相对表达量均明显低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $t = 7.885, 7.613, 7.345$ , 均  $P < 0.01$ )。**结论** RPE 细胞中 MeCP2 对 EMT 的调控机制与 m6A 甲基化修饰相关。*CSPG5* 和 *RBPI* 基因可能是 m6A 甲基化的靶基因, 参与 MeCP2 调控的 EMT 过程。

**【关键词】** 增生性玻璃体视网膜病变; 视网膜色素上皮细胞; MeCP2; m6A; MeRIP-seq; 上皮-间充质转化

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81770952)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230920-00105

## MeCP2-induced alterations of transcriptome and m6A modification in retinal pigment epithelial cell

Zhang Yongya, Li Xiaohua, Zhao Xueru, Li Xue

Department of Ophthalmology, Zhengzhou University People's Hospital, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Henan Academy of Innovations in Medical Science, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Li Xiaohua, Email: xhl\_6116@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate mRNA and N6-methyladenosine (m6A) changes in retinal pigment epithelium (RPE) cells treated with recombinant human methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) and the mechanisms. **Methods** The passaged ARPE-19 cells were divided into normal control and MeCP2 groups after adhesion culture. Cells in the normal control group were continuously cultured in normal culture medium, and the cells in the MeCP2 group were cultured in culture medium containing a final concentration of 20 ng/ml of recombinant human MeCP2 protein for 72 hours. Transcriptomic sequencing (RNA-seq) and methylated RNA immunoprecipitation sequencing (MeRIP-seq) were used to extract and analyze total RNA. Differentially methylated genes (DMGs) and differentially expressed genes (DEGs) were screened using the edgeR software package based on  $P < 0.05$ . The biological function of differential genes was determined by gene ontology (GO) enrichment analysis, and the pathway enrichment analysis was performed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Intersection of genes between DEGs and DMGs were screened, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the mRNA expression levels of differential genes. **Results** A total of 100 DEGs and 7 441 DMGs genes were screened.

According to enrichment analysis, the DEGs were enriched to extracellular matrix (ECM)-receptor interaction, cell division, phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway and so on. The DMGs were associated with microtubule cytoskeleton, angiogenesis, epidermal growth factor receptor (ErbB) signaling pathway, advanced glycation end-products (AGEs)-glycation end-products receptor (RAGE) signaling pathway, mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, Notch signaling pathway and transforming growth factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway and so on. There were 24 up-regulated and 76 down-regulated DEGs. Five DMGs had hypermethylation peaks, and 7 439 DMGs had hypomethylation peaks. After annotation of peaks, 7 626 genes in the normal control group and 8 006 genes in the MeCP2 group had m6A methylation, with 7 360 intersecting genes between the two groups. The m6A methylation in the normal control group and MeCP2 group was concentrated in the CDS, intron and 3'-untranslated region (3'UTR) regions of the transcript, with the methylation ratio of 23.62%/22.27%, 48.53%/48.35% and 23.66%/25.28%, respectively. Joint analysis showed that *CSPG5* and *RBPI* genes related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) had lower amount of mRNA and m6A. Fluorescence quantitative PCR results showed that the relative mRNA expression levels of *GSPG5*, *RBPI* and *ZNF484* in MeCP2 group were significantly lower than those in normal control group ( $t = 7.885, 7.613, 7.345$ ; all at  $P < 0.01$ ).

**Conclusions** The regulatory mechanism of MeCP2 on EMT in RPE cells is related to m6A methylation modification. *CSPG5* and *RBPI* genes may be the target genes of m6A methylation and participate in the EMT regulated by MeCP2.

**[Key words]** Proliferative vitreoretinopathy; Retinal pigment epithelial cells; MeCP2; m6A; MeRIP-seq; Epithelial-mesenchymal transition

**Fund program:** General Program of National Natural Science Foundation of China (81770952)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20230920-00105

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是复发性视网膜脱离的重要原因, 发病机制复杂, 病理变化多样<sup>[1]</sup>。目前, 玻璃体切割术是 PVR 的主要治疗方法, 但术后仍有复发的可能。PVR 的病理特征是细胞增殖并迁移到玻璃体, 以及广泛的胶质增生。在与 PVR 相关的视网膜前膜中已鉴定出多种细胞类型, 如视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经胶质细胞和巨噬细胞。RPE 细胞的上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程被认为是 PVR 发展的关键步骤之一<sup>[2-5]</sup>。甲基 CpG 结合蛋白 2 (methyl-CpG binding proteins 2, MeCP2) 是一种甲基化的 DNA 结合蛋白, 研究发现其异常表达与 EMT、纤维化等多种病理状况有关<sup>[6-9]</sup>。本课题组之前的研究发现,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和 P-MeCP2-421 在人 PVR 膜上均高表达和双标记; 在 RPE 细胞中敲减 MeCP2 会抑制转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 诱导的 Smad2/3 激活、I 型胶原和纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 的表达, 表明 MeCP2 在介导 RPE 细胞 EMT/纤维化中发挥关键作用<sup>[10]</sup>。N6-甲基腺嘌呤 (N6-methyladenosine, m6A) 是常见的 mRNA 内部化学修饰, 有研究发现肿瘤细胞 EMT 过程中, 关键转录因子 Snail 发生 m6A 修饰<sup>[11]</sup>。越来越多的研究表明, m6A 甲基化修饰参与多种生物过程, 如细胞增殖、血管生成、纤维化和炎症反应等<sup>[12-15]</sup>。本课题组前期采用 m6A 甲基化免疫共沉淀测序 (methylated

RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) 和转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 分析 TGF- $\beta$  处理 RPE 的差异甲基化基因 (differentially methylated genes, DMGs) 和差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 进一步的关联分析确定 12 个差异基因与 EMT 相关<sup>[16]</sup>。我们前期通过形态学实验发现重组蛋白 MeCP2 处理 RPE 细胞后细胞形态转变为纺锤形或不规则三角形, 具有间质细胞特征。但在 RPE 细胞中 m6A 修饰与 MeCP2 的关系尚不完全清楚。本研究采用 RNA-seq 和 MeRIP-seq 技术分析 MeCP2 对 RPE 细胞 mRNA 表达和 m6A 修饰的影响, 并探讨 m6A 甲基化在 MeCP2 调控 RPE 细胞 EMT 中的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 人 RPE 细胞系 ARPE-19 (CRL-2302) 购自美国典型培养物保藏中心。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 培养基 (含有 100 IU/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素)、0.25% 胰蛋白酶 (北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清 (10099141C, 美国 Gibco 公司); 重组人 MeCP2 蛋白 (美国 MedChemExpress 公司); TRIzol 试剂 (15596026, 美国 Invitrogen 公司); DNase I (2270A)、逆转录试剂盒 (RR047A) (日本 Takara 公司); Oligod (T) 磁珠 (N401-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); m6A 抗体 (202203, 德国 Synaptic Systems 公司); KC-Digital™ Stranded mRNA Library Prep Kit (DR08502, 武

汉康测科技有限公司)。超微量分光光度计(DS-11, 美国 DeNovix 公司); Novaseq 6000 测序仪(美国 Illumina 公司); StepOnePlus PCR 系统(RR820A, 日本 Takara 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 将 ARPE-19 细胞株置于含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中培养。待细胞生长至 80% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 加入培养基制备细胞悬液, 接种至培养皿中并调整细胞密度为  $2 \times 10^6$  个。细胞贴壁后, 更换为含 1% 胎牛血清、青链霉素双抗的新鲜 DMEM 培养基。将细胞分为 2 个组, 正常对照组常规培养, MeCP2 组培养基中添加终质量浓度为 20 ng/ml 的重组人 MeCP2 蛋白, 继续培养 72 h。每组制备 3 个平行标本。

**1.2.2 总 RNA 提取** 参照 TRIzol 试剂说明书提取各组细胞总 RNA, 用 DNase I 酶解残余 DNA。采用超微量分光光度计检测总 RNA 的质量、完整性和浓度后, 送往武汉康测科技有限公司进行测序分析。

**1.2.3 文库构建及测序** 分别采用 2 和 50 μg 总 RNA 进行 RNA-seq 和 MeRIP-seq。用 Oligod(T) 磁珠富集聚腺苷化 RNA, 应用 20 mmol/L ZnCl<sub>2</sub> 将 RNA 裂解成 100~200 nt 的片段。将 10% 的 RNA 片段设置为输入组, 其余设置为免疫共沉淀组, 用 m6A 抗体进行免疫共沉淀。使用 KC-Digital™ Stranded mRNA Library Prep Kit 构建文库, 文库产物在 Novaseq 6000 测序仪上进行测序。实验重复 3 次。

**1.2.4 DEGs 和 DMGs 的筛选** 使用 FastQC 对原始数据进行质量分析, 并使用 Trimmomatic<sup>[17]</sup> 进行过滤。通过 UMI 工具对数据进行聚类, 并对每个子集群进行多次对齐, 以消除偏差和错误。后续利用 STAR 软件将测序数据与人基因组 GRCh38.p13 进行比对。使用 RSeQC<sup>[18]</sup> 评估映射 reads (读长) 的分布、覆盖均匀性和链特异性。应用 exomePeak 软件包<sup>[19]</sup> 预测高强度和高分辨率的 m6A 峰, 并应用 bedtools 工具进一步注释。应用 Homer 软件进行基序分析, 以获得丰富的基序。应用 deepTools 工具<sup>[20]</sup> 分析所有转录本各功能区 m6A 峰的分布, 应用 bedtools 工具<sup>[21]</sup> 分析相应染色体上 m6A 峰的分布。

所有在基因组中注释基因的数据由 feature Counts 计算, 以 RPKM 值作为基因表达的一个度量。RPKM =  $\frac{\text{某个样本 mapping 到特定基因外显子上的所有 reads}}{\text{某个样本的所有 reads 总和}(\text{百万}) \times \text{某个基因的长度}(\text{kb})}$ 。其中, RPKM 为每千个碱基的转录每百万映射读取的

reads; mapping 法用于评估基因组组装质量; reads 指的是测序仪单次测序所得到的碱基序列。采用 edgeR 软件包<sup>[22]</sup> 以样本中同一个基因表达水平的变化倍数 (fold change, FC) > 1.5 且 P 值 < 0.05 筛选 DEGs 和 DMGs。

**1.2.5 DEGs 和 DMGs 的富集分析和图形制作** 使用 Omicshare 工具 (<https://www.omicshare.com/>) 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析, 以确定 DEGs 和 DMGs 的富集路径, P < 0.05 为明显富集。通过输入每个样本的所有读数得到主成分分析图和散点图。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测差异基因 mRNA 表达水平** 将细胞接种至 6 孔板中, 调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/孔, 对细胞进行分组处理, 培养 72 h 后, 收集各组细胞, 使用 Trizol 提取 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 并使用带有 TB Green 试剂的 StepOnePlus PCR 系统检测硫酸软骨素蛋白多糖 5 (chondroitin sulfate proteoglycan 5, CSPG5)、锌指蛋白 484 (zinc finger protein 484, ZNF484)、视黄醇结合蛋白 1 型 (retinol binding protein 1, RBP1) mRNA 水平。各基因引物见表 1, 由河南尚亚生物技术有限公司合成。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 60 °C 延长 5 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算靶基因 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 目的基因 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences for PCR

基因	引物序列 (5'-3')
CSPG5	正向: GTCAGTGTGCGACCTCTCC
	反向: CCAGATGTAGTCTCGGTGT
ZNF484	正向: CACACACCTGGTTCTCAAG
	反向: GGTTACATTCACAAGCAGTCACT
RBP1	正向: GTACTGGAAGATGTTGTCACAC
	反向: GATGATCATATGGTCACCGTCC
GAPDH	正向: GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA
	反向: GAGTCCTCCACGATACCAAAG

注: PCR: 聚合酶链式反应; CSPG5: 硫酸软骨素蛋白多糖 5; ZNF484: 锌指蛋白 484; RBP1: 视黄醇结合蛋白 1 型; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note: PCR: polymerase chain reaction; CSPG5: chondroitin sulfate proteoglycan 5; ZNF484: zinc finger protein 484; RBP1: retinol binding protein 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析, 采用 Graphpad Prism 9.0 软件绘制图表。计量数据资料经

Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。正常对照组与 MeCP2 组间各计量资料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 RNA-seq 的 DEGs 富集分析

共鉴定出 100 个 DEGs,其中与正常对照组比较,MeCP2 组 24 个基因表达增加,76 个基因表达减少(图 1A)。热图分析显示,在正常对照组以及

MeCP2 组中,3 个重复样本的基因表达差异具有一致性(图 1B)。GO 分析显示,DEGs 主要与细胞分裂、细胞黏附、生物调节、细胞外基质组织和结构成分有关(图 1C)。KEGG 分析显示,DEGs 主要参与焦点黏附、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-受体相互作用、蛋白消化吸收、MAPK 信号通路和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路(图 1D)。

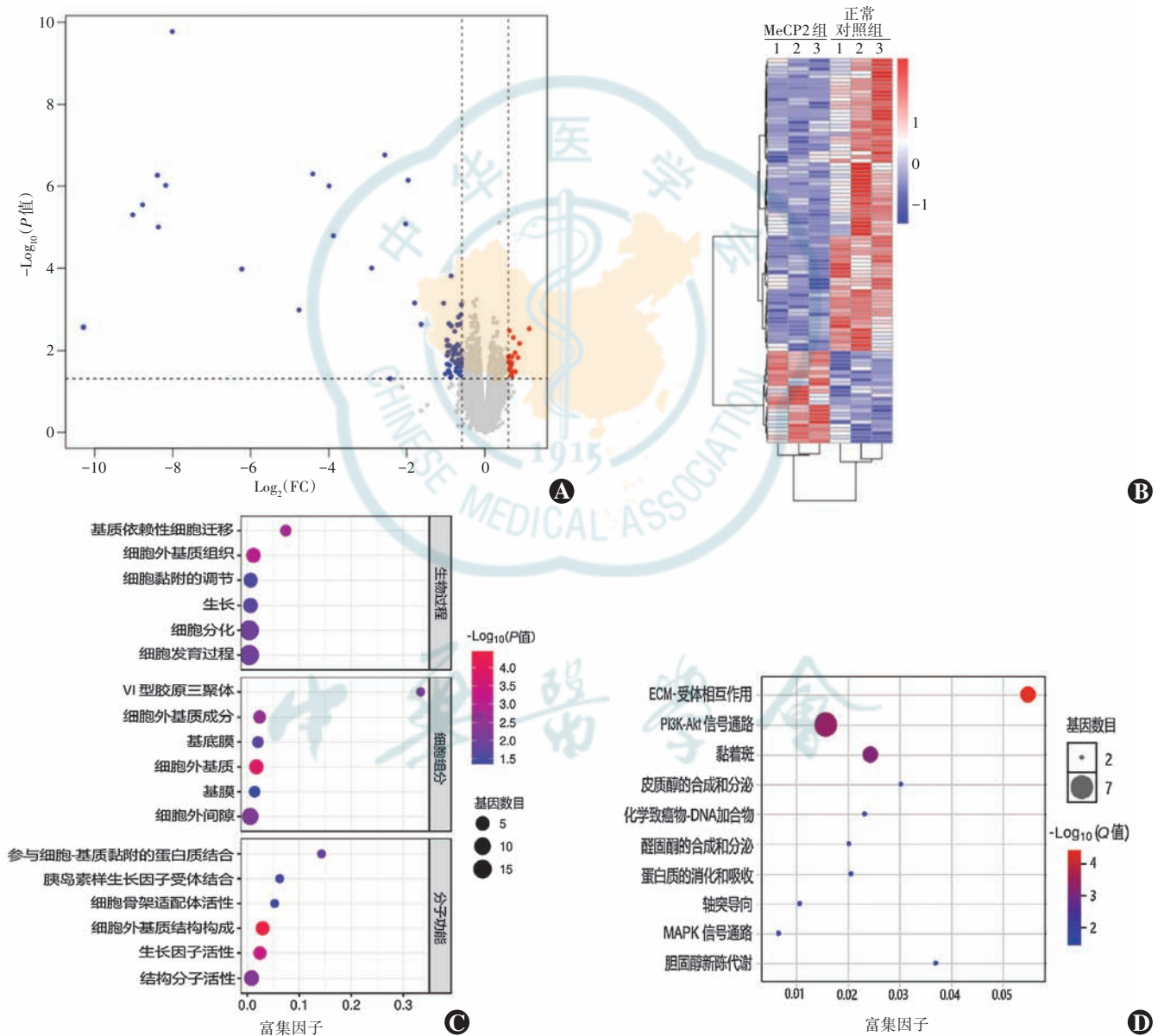


图 1 重组人 MeCP2 蛋白诱导 RPE 细胞中 DEGs 分析 A:DEGs 火山图 蓝点表示表达下调的基因,灰点表示表达无差异的基因,红点表示表达上调的基因 B:DEGs 热图 红色表示高表达基因,蓝色表示低表达基因 C:DEGs 的 GO 富集分析 D:DEGs 的 KEGG 富集分析 圆点大小表示基因富集的数量,圆点颜色表示基因富集程度 FC:变化倍数;MeCP2:甲基 CpG 结合蛋白 2;ECM:细胞外基质;PI3K:磷脂酰肌醇 3 激酶;AKT:蛋白激酶 B

Figure 1 Expression analysis of DEGs in RPE cells induced by recombinant human MeCP2 protein A:Volcano plot of DEGs Blue dots indicated down-regulated genes. Gray dots indicated genes with undifferentiated expression. Red dots indicated up-regulated genes B:Heat map of DEGs Red color indicated highly expressed genes and blue color indicated lowly expressed genes C:GO enrichment analysis of DEGs D:KEGG enrichment analysis of DEGs Dot size indicated the number of genes enriched, and dot color indicated the degree of gene enrichment FC: fold change; MeCP2: methyl-CpG binding proteins 2; ECM: extracellular matrix; PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; AKT: protein kinase B

## 2.2 各组 RPE 细胞中 m6A 修饰模式

注释峰后,正常对照组和 MeCP2 组分别有 7 626 和 8 006 个基因发生 m6A 甲基化,其中 7 360 个基因发生交集(图 2A)。m6A 甲基化经常发生在 RRACH 基序中(图 2B)。

正常对照组和 MeCP2 组的 m6A 甲基化富集于转录本的 CDS、内含子和 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3' UTR),其甲基化比例分别为 23.62%/22.27%、48.53%/48.35%和 23.66%/25.28%(图 2C, D)。通过计算 RPE 细胞中 m6A 峰的数量,发现 m6A 修饰发生来自每个染色体的转录本中(图 2E)。

## 2.3 m6A MeRIP-seq 的 DMGs 富集分析

DMGs 分析发现只有 5 个基因含有高甲基化峰, 7 439 个基因含有低甲基化峰(图 3A)。每个染色体

上均分布有 DMGs,其中 1 号染色体有 776 个 DMGs, Y 染色体上有 4 个 DMGs(图 3B)。

GO 富集分析显示,DMGs 与代谢过程和细胞结构有关(图 3C)。KEGG 分析显示,DMGs 主要富集于细胞代谢、RNA 加工途径(包括剪接体和 RNA 转运)、凋亡、肌动蛋白细胞骨架调控以及 PI3K-Akt、mTOR、MAPK 和 AMPK 的信号通路(图 3D)。具有高甲基化峰的 4 个基因分别为 *EGR1*、*CHN2*、*ZNF711* 和 *CPLANE1*,具有低甲基化峰的前 4 个基因分别为 *CST3*、*TNRC6C*、*CD320* 和 *ZNF202*(表 3),这些基因参与细胞增殖迁移<sup>[23]</sup>、细胞生长调控<sup>[24]</sup>、细胞凋亡<sup>[25]</sup>、转录调控。

## 2.4 各组 *CSPG5*、*ZNF484* 和 *RBPI* 基因相对表达量比较

DEGs 与 DMGs 筛选出交集的基因有 *CSPG5*、*ZNF484* 和 *RBPI*(表 4),其 mRNA 水平均下调,m6A 甲基化均降低。实时荧光定量 PCR 检测证实,MeCP2 组 *CSPG5*、*ZNF484* 和 *RBPI* mRNA 相对表达量均明显低于正常对照组,差异均有统计学意义( $t = 7.885, 7.613, 7.345$ ,均  $P < 0.01$ )(表 5)。

## 3 讨论

m6A 是真核生物中丰富的 mRNA 修饰方式,参与 RPE 细胞许多生理和病理过程,并对 RPE 细胞 EMT 过程至关重要<sup>[15,26-27]</sup>。MeCP2 也被证明参与 RPE 细胞 EMT 和纤维化的形成过程<sup>[10]</sup>,本课题组前期通过形态学实验发现重组蛋白 MeCP2 处理 RPE 细胞后,使得细胞形态转变为纺锤形或不规则三角形,具有间质细胞特征。为了研究 RPE 细胞中 m6A 甲基化和 MeCP2 之间的联系,本研究对 MeCP2

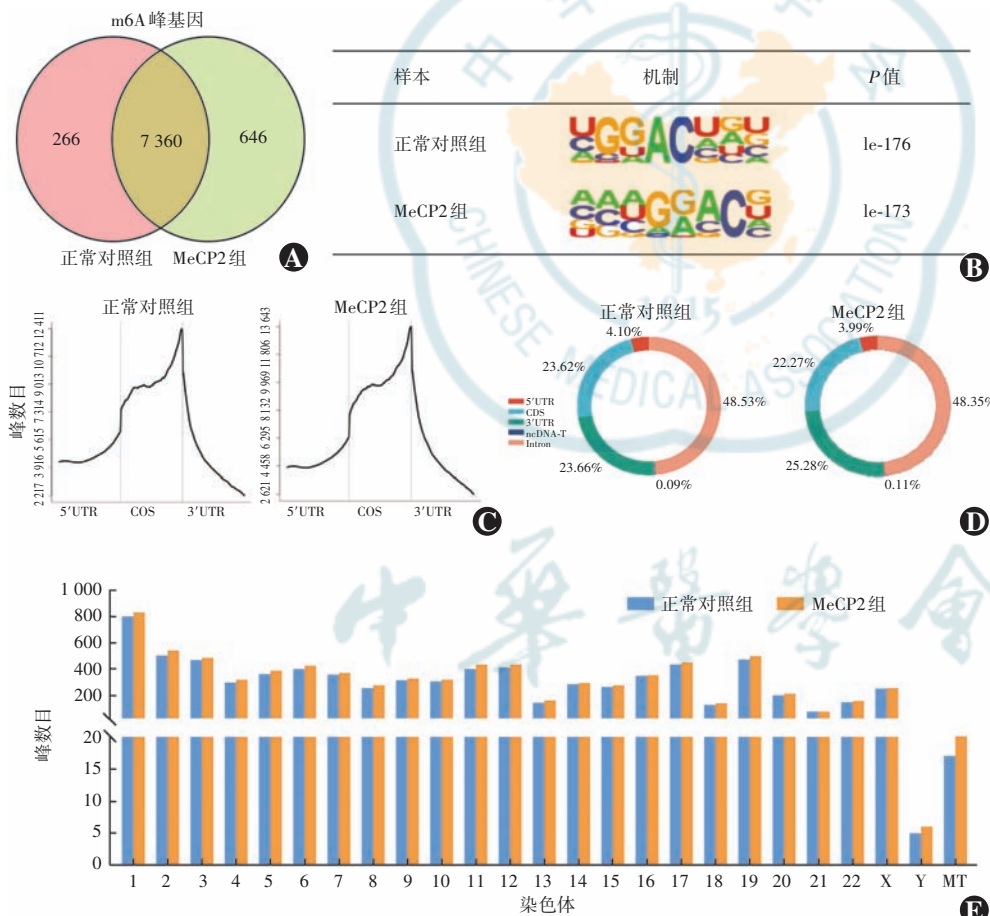


图 2 正常对照组和 MeCP2 组 RPE 细胞中 m6A 整体修饰模式 A:正常对照组和 MeCP2 组中 m6A 甲基化修饰基因的 Venn 图 B:正常对照组和 MeCP2 组中保守的 m6A 共有基序 C:m6A 甲基化在转录本不同位点的分布 D:基因各功能区中 m6A 峰的分布情况 E:m6A 甲基化在不同染色体转录本中的分布 MeCP2:甲基 CpG 结合蛋白 2;m6A:N6-甲基腺嘌呤;UTR:非翻译区;CDS:编码序列;ncDNA-T:非编码 DNA 的转录本;MT:线粒体染色体

Figure 2 Overall modification pattern of m6A in RPE cells of normal control and MeCP2 groups A:Venn analysis of m6A methylation-modified genes in normal control and MeCP2 groups B:Conserved m6A common motifs in normal control and MeCP2 groups C:Distribution of m6A methylation at different sites in the transcript D:Distribution of m6A peaks in each functional region of genes E:Distribution of m6A methylation in transcripts on different chromosomes MeCP2: methyl-CpG binding proteins 2; m6A: N6-methyladenosine; UTR: untranslated region; CDS: coding sequence; ncDNA-T: transcripts of noncoding DNA; MT: mitochondrial chromosome

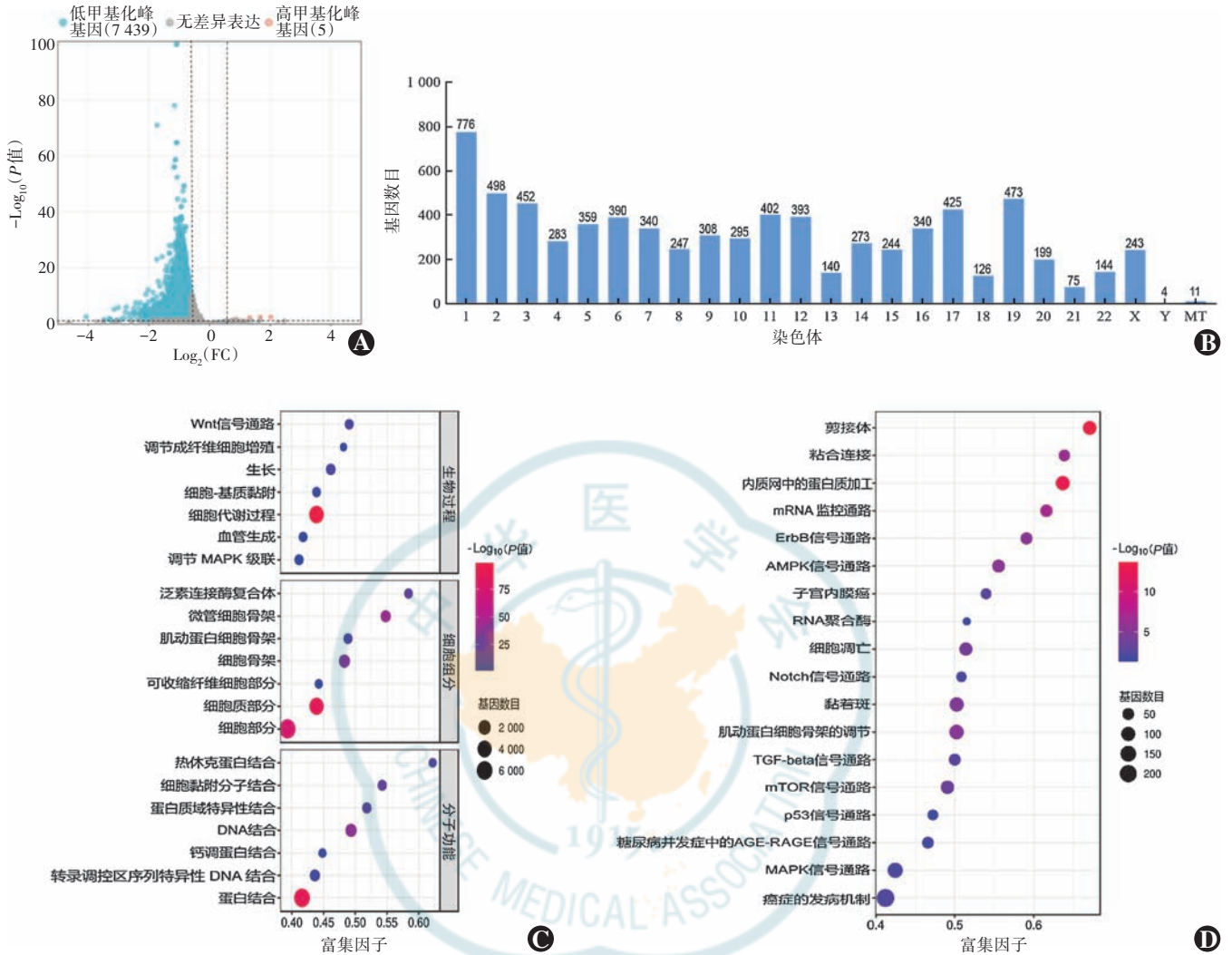


图 3 重组人 MeCP2 蛋白诱导 RPE 细胞中 DMGs 分析 A:DMGs 火山图 蓝点表示表达下调的甲基化峰基因,灰点表示表达无差异的甲基化峰基因,红点表示表达上调的甲基化峰基因 B:DMGs 在不同染色体上的分布 C:DMGs 的 GO 富集分析 D:DMGs 的 KEGG 富集分析 FC:变化倍数;ErbB:表皮生长因子受体;TGF:转化生长因子;AGE:晚期糖基化终末产物;RAGE:糖基化终末产物受体

Figure 3 Expression analysis of DMGs in RPE cells induced by recombinant human MeCP2 protein A:Volcano plot of DMGs Blue dots indicated down-regulated methylation peak genes. Gray dots indicated methylation peak genes with undifferentiated expression. Red dots indicated up-regulated methylation peak genes B:Distribution of DMGs on different chromosomes C:GO enrichment analysis of DMGs D:KEGG enrichment analysis of DMGs FC:fold change;ErbB:epidermal growth factor receptor;TGF:transforming growth factor;AGE:advanced glycation end products;RAGE:receptor for glycosylated end products

表 3 具有高甲基化峰和低甲基化峰的前 4 个基因  
Table 3 Top 4 genes with hypermethylation and hypomethylation peaks

基因	基因描述	染色体	起始	终止	log <sub>2</sub> FC	P 值	注释
EGR1	早期生长反应蛋白	5	138468016	138468216	0.773 0	0.048 2	3'UTR
CHN2	嵌合蛋白-2;SH2 结构域超家族;Rho gtpase 激活蛋白结构域	7	29400674	29400724	1.328 3	0.006 6	CDS
ZNF711	锌指蛋白-711;锌指 C2H2 超家族	X	85271608	85271833	1.674 7	0.004 3	CDS
CPLANE1	5 号染色体开放读码框-42;Joubert 综合征相关蛋白	5	37183277	37183427	2.023 2	0.003 8	CDS
CST3	胱抑素结构域;蛋白酶抑制剂-I25	20	23628655	23628730	-4.066 7	0.002 8	3'UTR
TNRC6C	三核苷酸重复序列基因 6C 蛋白	17	78049658	78049708	-3.482 8	0.048 4	ncDNA-T
CD320	低密度脂蛋白受体样超家族	19	8302126	8302176	-3.320 8	0.015 1	3'UTR
ZNF202	锌指蛋白-202;SCAN 结构域;锌指 C2H2 超家族	11	123725638	123725688	-3.265 2	0.022 6	3'UTR

注:FC:变化倍数;UTR:非翻译区;CDS:编码序列;ncDNA-T:非编码 DNA 的转录本

Note:FC:fold change;UTR:untranslated region;CDS:coding sequence;ncDNA-T:transcripts of non-coding DNA

表 4 DEGs 与 DMGs 交集基因  
Table 4 Intersection of genes between DEGs and DMGs

基因	基因描述	m6A 甲基化水平	Log <sub>2</sub> FC(m6A)	m6A 位点	mRNA 水平	Log <sub>2</sub> FC(mRNA)
<i>RBPI</i>	视黄醇结合蛋白-1	降低	-0.794 9	CDS	降低	-0.770 7
<i>CSPG5</i>	硫酸软骨素蛋白多糖-5	降低	-1.869 5	CDS	降低	-0.659 2
<i>ZNF484</i>	锌指 C2H2 超家族	降低	-1.565 2	CDS	降低	-0.588 6

注: DEGs: 差异表达基因; DMGs: 差异甲基化基因; m6A: N6-甲基腺嘌呤; FC: 变化倍数; RBPI: 视黄醇结合蛋白 1 型; CSPG5: 硫酸软骨素蛋白多糖 5; ZNF484: 锌指蛋白 484

Note: DEGs: differentially expressed genes; DMGs: differentially methylated genes; m6A: N6-methyladenine; FC: fold change; RBPI: retinol-binding protein type 1; CSPG5: chondroitin sulfate proteoglycan 5; ZNF484: zinc finger protein 484

表 5 2 个组中 *CSPG5*、*ZNF484* 和 *RBPI* mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of relative expression of *CSPG5*, *ZNF484* and *RBPI* mRNA between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	<i>CSPG5</i>	<i>ZNF484</i>	<i>RBPI</i>
正常对照组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
MeCP2 组	3	0.722±0.050	0.757±0.045	0.894±0.020
<i>t</i> 值		7.885	7.613	7.345
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 *t* 检验) *CSPG5*: 硫酸软骨素蛋白多糖 5; *ZNF484*: 锌指蛋白 484; *RBPI*: 视黄醇结合蛋白 1 型

Note: (Independent samples *t*-test) *CSPG5*: chondroitin sulfate proteoglycan 5; *ZNF484*: zinc finger protein 484; *RBPI*: retinol-binding protein type 1

诱导的 RPE 细胞进行了全转录组 m6A 修饰分析。MeRIP-seq 显示, 正常对照组和 MeCP2 组分别有 7 626 和 8 006 个 m6A 峰基因, 每个染色体的转录本中都有 m6A 修饰, 与本课题组之前的研究结果一致<sup>[16]</sup>。m6A 甲基化在转录本不同区域的修饰位点上保守的, 优先在终止密码子附近和 3'UTR 范围内<sup>[28]</sup>。此外, 35% 的 m6A 修饰位于 CDS 区, 并通过解析 mRNA 二级结构来调控翻译<sup>[29]</sup>。本研究也发现, m6A 修饰在转录本的 CDS、内含子和 3'UTR 区域大量存在, 并以终止密码子为中心。甲基转移酶样蛋白 3-甲基转移酶样蛋白 14 复合物 (methyltransferase-like 3-methyltransferase-like 14, METTL3-METTL14) 可优先识别哺乳动物细胞中 RRACH 基序的 m6A 甲基化位点<sup>[30]</sup>。与此一致, 本研究结果也证实了 m6A 甲基化主要发生在 RPE 细胞的 RRACH 基序。这些结果表明, m6A 甲基化是 RPE 细胞中普遍存在的一种保守的 RNA 修饰。

在本研究中, MeCP2 诱导 RPE 细胞后共筛选出 100 个 DEGs。富集分析结果显示, DEGs 参与 ECM-受体相互作用、MAPK 信号通路和 PI3K-Akt 信号转导通路。ECM-受体相互作用与 RPE 的 EMT 过程密切相关, 对细胞的生长、分化、迁移和存活起着重要作

用<sup>[31-32]</sup>。PI3K/Akt 信号通路介导细胞周期、细胞生长、凋亡、代谢、血管生成、迁移、分化和 EMT<sup>[33-34]</sup>。在 RPE 细胞 EMT 过程中, 参与 PVR 过程的细胞因子可以结合并刺激 Tyr 上跨膜受体的磷酸化, 进而通过 PI3K/Akt 通路、ERK/MAPK 通路和 p38/MAPK 通路参与 EMT 的发生<sup>[35-36]</sup>。这些信号通路均与 PVR 的发展有关。

本研究发现, 7 444 个 DMGs 中只有 5 个基因 (占 0.07%) m6A 高甲基化, 其余均为 m6A 低甲基化。KEGG 分析发现, DMGs 在紧密连接、焦点黏附和肌动蛋白细胞骨架调控中富集, 分别影响上皮细胞极性、细胞迁移和细胞稳态等<sup>[37-39]</sup>。DMGs 富集通路还包括 mTOR 信号通路、ErbB 信号通路、AMPK 信号通路、Notch 信号通路、TGF- $\beta$  信号通路、P53 信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 MAPK 信号通路等。mTOR 信号通路可以改变蛋白激酶 C 磷酸化水平和直接磷酸化激活 Akt 来参与 EMT 的调控<sup>[40]</sup>。在 PVR 过程中, TGF- $\beta$  与其受体结合激活 PI3K, 导致 Akt 磷酸化, 抑制糖原合成酶激酶 3, 促进 RPE 细胞的 EMT<sup>[41-42]</sup>。Notch 信号通路可能参与了 RPE 细胞迁移和增殖的调控<sup>[43-44]</sup>。Wang 等<sup>[45]</sup> 研究发现, Notch 信号可通过改变 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路介导大鼠肝纤维化形成。P53 信号通路也与 EMT 过程相关, 野生型 p53 负向调控 EMT 的启动和转移, 而突变型 p53 促进肿瘤细胞 EMT<sup>[46]</sup>。本研究结果表明, RPE 细胞中 m6A 甲基化和 EMT 之间存在潜在的关系。

RPE 细胞的 EMT 过程在视网膜疾病, 如 PVR、新生血管性年龄相关性黄斑病变和增生性糖尿病视网膜病变的发病机制中起重要作用<sup>[47-49]</sup>。RPE 细胞的 EMT 机制已经被广泛研究, 然而, RPE 细胞 EMT 的表观遗传调控, 尤其是 RNA 修饰在很大程度上仍然未知。在本研究中, 重组人 MeCP2 处理 RPE 细胞后 2 个 EMT 相关基因 *CSPG5* 和 *RBPI* 的 m6A 甲基化水平降低。然而, m6A 是否调控 MeCP2 诱导的 EMT 相关

基因的表达, m6A 对 MeCP2 诱导 EMT 相关基因的调控是发生在转录前还是转录后, 以及 m6A 是否参与调节 EMT 相关基因 RNA 的稳定性及翻译水平等, 仍有待后续的研究探索。未来需进一步关注低 m6A 修饰对 MeCP2 诱导的 EMT 相关基因和蛋白水平变化的影响, 以寻找 PVR 等 EMT 相关视网膜疾病新的治疗靶点。

综上所述, 本研究提供了重组人 MeCP2 蛋白处理 RPE 细胞后 m6A 修饰谱; 进一步的关联分析发现, 2 个 EMT 相关基因 *CSPG5* 和 *RBPI* 在 m6A 甲基化水平和 mRNA 水平上均发生了改变, 表明这 2 个基因可能是 MeCP2 蛋白调控 EMT 过程中 m6A 甲基化的靶基因。

**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** 张咏雅: 起草文章、实施研究、采集数据、统计分析、分析/解释数据; 李晓华: 设计实验、获取研究经费、指导实验、文章审阅、修改及定稿; 赵雪茹、李雪: 实施研究、采集数据、统计分析

## 参考文献

- [1] Zou H, Shan C, Ma L, et al. Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy [J/OL]. PeerJ, 2020, 8 : e10136 [ 2023 - 02 - 20 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33150072>. DOI: 10. 7717/peerj. 10136.
- [2] Ganser LR, Kelly ML, Herschlag D, et al. The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(8) : 474-489. DOI: 10. 1038/s41580-019-0136-0.
- [3] Lee D, Hong HS. Substance P alleviates retinal pigment epithelium dysfunction caused by high glucose-induced stress [J/OL]. Life (Basel), 2023, 13(5) : 1070 [ 2023-05-23 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37240715>. DOI: 10. 3390/life13051070.
- [4] Qin D, Jiang Y, Jin X. Effect of macrophage migration inhibitory factor on inflammatory cytokines and fibrogenic gene expression in human RPE cells [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(1) : 830-836. DOI: 10. 3892/mmr. 2019. 10277.
- [5] Priglinger SG, Siedlecki J, Hattenbach LO, et al. Proliferative vitreoretinopathy (PVR) surgery: Scar Wars: five steps to successful treatment of PVR detachment [J]. Ophthalmologe, 2021, 118(1) : 18-23. DOI: 10. 1007/s00347-020-01293-1.
- [6] He S, Barron E, Ishikawa K, et al. Inhibition of DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 suppresses RPE transdifferentiation: relevance to proliferative vitreoretinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(9) : 5579-5589. DOI: 10. 1167/iovs. 14-16258.
- [7] Mann J, Chu DC, Maxwell A, et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis [J]. Gastroenterology, 2010, 138(2) : 705-714, 714. DOI: 10. 1053/j.gastro. 2009. 10. 002.
- [8] Horvath PM, Monteggia LM. MeCP2 as an activator of gene expression [J]. Trends Neurosci, 2018, 41(2) : 72-74. DOI: 10. 1016/j.tins. 2017. 11. 005.
- [9] Li H, Zhong X, Chau KF, et al. Cell cycle-linked MeCP2 phosphorylation modulates adult neurogenesis involving the Notch signalling pathway [J/OL]. Nat Commun, 2014, 5 : 5601 [ 2023 - 03 - 25 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420914>. DOI: 10. 1038/ncomms6601.
- [10] Li X, Li X, He S, et al. MeCP2-421-mediated RPE epithelial-mesenchymal transition and its relevance to the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(16) : 9420-9427. DOI: 10. 1111/jcmm. 15602.
- [11] Yu X, Zhao H, Cao Z. The m6A methyltransferase METTL3 aggravates the progression of nasopharyngeal carcinoma through inducing EMT by m6A-modified Snail mRNA [J]. Minerva Med, 2022, 113(2) : 309-314. DOI: 10. 23736/S0026-4806. 20. 06653-7.
- [12] Xie F, Zheng Y, Fu W, et al. The m6A methyltransferase METTL16 inhibits the proliferation of pancreatic adenocarcinoma cancer cells via the p21 signaling pathway [J/OL]. Front Oncol, 2023, 13 : 1138238 [ 2023-05-25 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37182151>. DOI: 10. 3389/fonc. 2023. 1138238.
- [13] Ma X, Long C, Wang F, et al. METTL3 attenuates proliferative vitreoretinopathy and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells via wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(9) : 4220-4234. DOI: 10. 1111/jcmm. 16476.
- [14] Ni W J, Zhou H, Lu H, et al. Genetic and pharmacological inhibition of METTL3 alleviates renal fibrosis by reducing EVL m6A modification through an IGF2BP2-dependent mechanism [J/OL]. Clin Transl Med, 2023, 13(8) : e1359 [ 2023-09-03 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37537731>. DOI: 10. 1002/ctm2. 1359.
- [15] Wang Y, Chen Y, Liang J, et al. METTL3-mediated m6A modification of HMG A2 mRNA promotes subretinal fibrosis and epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. J Mol Cell Biol, 2023, 15(3) : mjad005 [ 2023-08-21 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36945110>. DOI: 10. 1093/jmcb/mjad005.
- [16] Zhao X, Li X, Li L, et al. Alterations of the m<sup>6</sup>A methylation induced by TGF- $\beta$ 2 in ARPE-19 cells [J/OL]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(7) : 148 [ 2023-08-21 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37525909>. DOI: 10. 31083/j. fbl2807148.
- [17] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30(15) : 2114-2120. DOI: 10. 1093/bioinformatics/btu170.
- [18] Wang L, Wang S, Li W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments [J]. Bioinformatics, 2012, 28(16) : 2184-2185. DOI: 10. 1093/bioinformatics/bts356.
- [19] Meng J, Lu Z, Liu H, et al. A protocol for RNA methylation differential analysis with MeRIP-Seq data and exomePeak R/Bioconductor package [J]. Methods, 2014, 69(3) : 274-281. DOI: 10. 1016/j. ymeth. 2014. 06. 008.
- [20] Ramfrez F, Dündar F, Diehl S, et al. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue) : W187-191. DOI: 10. 1093/nar/gku365.
- [21] Quinlan AR. BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2014, 47 : 11. 12. 1-34. DOI: 10. 1002/0471250953. bi1112s47.
- [22] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1) : 139-140. DOI: 10. 1093/bioinformatics/btp616.
- [23] Chen M, Lin WR, Lu CH, et al. Chimerin 2 genetic polymorphisms are associated with non-proliferative diabetic retinopathy in Taiwanese type 2 diabetic patients [J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(4) : 460-463. DOI: 10. 1016/j. jdiacomp. 2014. 04. 009.
- [24] Ni W, Perez AA, Schreiner S, et al. Characterization of the ZFX family of transcription factors that bind downstream of the start site of CpG island promoters [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(11) : 5986-6000. DOI: 10. 1093/nar/gkaa384.
- [25] Muhanhali D, Zhai T, Jiang J, et al. Long non-coding antisense RNA TNRC6C-AS1 is activated in papillary thyroid cancer and promotes cancer progression by suppressing TNRC6C expression [J/OL]. Front



- Endocrinol (Lausanne), 2018, 9 : 360 [ 2023-07-09 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038597>. DOI: 10. 3389/fendo. 2018. 00360.
- [ 26 ] Chen X, Wang Y, Wang J N, et al. m<sup>6</sup>A modification of circSPECC1 suppresses RPE oxidative damage and maintains retinal homeostasis [ J/OL ]. Cell Rep, 2022, 41 ( 7 ) : 111671 [ 2023-08-15 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36384115>. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2022. 111671.
- [ 27 ] Meng J, Liu X, Tang S, et al. METTL3 inhibits inflammation of retinal pigment epithelium cells by regulating NR2F1 in an m<sup>6</sup>A-dependent manner [ J/OL ]. Front Immunol, 2022, 13 : 905211 [ 2023-07-21 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35936005>. DOI: 10. 3389/fimmu. 2022. 905211.
- [ 28 ] Yue Y, Liu J, Cui X, et al. VIRMA mediates preferential m<sup>6</sup>A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation [ J/OL ]. Cell Discov, 2018, 4 : 10 [ 2023-08-27 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29507755>. DOI: 10. 1038/s41421-018-0019-0.
- [ 29 ] Mao Y, Dong L, Liu X M, et al. m<sup>6</sup>A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2 [ J/OL ]. Nat Commun, 2019, 10 ( 1 ) : 5332 [ 2023-08-25 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31767846>. DOI: 10. 1038/s41467-019-13317-9.
- [ 30 ] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation [ J ]. Nat Chem Biol, 2014, 10 ( 2 ) : 93-95. DOI: 10. 1038/nchembio. 1432.
- [ 31 ] Wei J, van der Wekken A J, Saber A, et al. Mutations in EMT-related genes in ALK positive crizotinib resistant non-small cell lung cancers [ J/OL ]. Cancers ( Basel ), 2018, 10 ( 1 ) : 10 [ 2023-08-04 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300322>. DOI: 10. 3390/cancers 10010010.
- [ 32 ] Sun HF, Yang XL, Zhao Y, et al. Loss of TMEM126A promotes extracellular matrix remodeling, epithelial-to-mesenchymal transition, and breast cancer metastasis by regulating mitochondrial retrograde signaling [ J ]. Cancer Lett, 2019, 440-441 : 189-201. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2018. 10. 018.
- [ 33 ] Wei R, Xiao Y, Song Y, et al. FAT4 regulates the EMT and autophagy in colorectal cancer cells in part via the PI3K-AKT signaling axis [ J/OL ]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38 ( 1 ) : 112 [ 2023-08-04 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832706>. DOI: 10. 1186/s13046-019-1043-0.
- [ 34 ] Su Q, Fan M, Wang J, et al. Sanguinarine inhibits epithelial-mesenchymal transition via targeting HIF-1 $\alpha$ /TGF- $\beta$  feed-forward loop in hepatocellular carcinoma [ J/OL ]. Cell Death Dis, 2019, 10 ( 12 ) : 939 [ 2023-09-09 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31819036>. DOI: 10. 1038/s41419-019-2173-1.
- [ 35 ] Chen X, Tzekov R, Su M, et al. Auranofin inhibits retinal pigment epithelium cell survival through reactive oxygen species-dependent epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling pathway [ J/OL ]. PLoS One, 2016, 11 ( 11 ) : e0166386 [ 2023-09-15 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27846303>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0166386.
- [ 36 ] Ozal SA, Gurlu V, Turkekel K, et al. Neferine inhibits epidermal growth factor-induced proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells through downregulating p38 MAPK and PI3K/AKT signalling [ J ]. Cutan Ocul Toxicol, 2020, 39 ( 2 ) : 97-105. DOI: 10. 1080/15569527. 2020. 1730882.
- [ 37 ] Kyuno D, Takasawa A, Kikuchi S, et al. Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells [ J/OL ]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2021, 1863 ( 3 ) : 183503 [ 2023-09-01 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33189716>. DOI: 10. 1016/j. bbamem. 2020. 183503.
- [ 38 ] Mishra Y G, Manavathi B. Focal adhesion dynamics in cellular function and disease [ J/OL ]. Cell Signal, 2021, 85 : 110046 [ 2023-08-15 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34004332>. DOI: 10. 1016/j. cellsig. 2021. 110046.
- [ 39 ] Marballi K, MacDonald J L. Proteomic and transcriptional changes associated with MeCP2 dysfunction reveal nodes for therapeutic intervention in Rett syndrome [ J/OL ]. Neurochem Int, 2021, 148 : 105076 [ 2023-08-26 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34048843>. DOI: 10. 1016/j. neuint. 2021. 105076.
- [ 40 ] Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, et al. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process [ J ]. Biochimie, 2019, 165 : 229-234. DOI: 10. 1016/j. biochi. 2019. 08. 003.
- [ 41 ] Shukal D, Bhadresha K, Shastri B, et al. Dichloroacetate prevents TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells [ J/OL ]. Exp Eye Res, 2020, 197 : 108072 [ 2023-05-27 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32473169>. DOI: 10. 1016/j. exer. 2020. 108072.
- [ 42 ] Zhang C, Su L, Huang L, et al. GSK3 $\beta$  inhibits epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ $\beta$ -catenin and PI3K/Akt pathways [ J ]. Int J Ophthalmol, 2018, 11 ( 7 ) : 1120-1128. DOI: 10. 18240/ijo. 2018. 07. 08.
- [ 43 ] Liu W, Jin G, Long C, et al. Blockage of Notch signaling inhibits the migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells [ J/OL ]. ScientificWorldJournal, 2013, 2013 : 178708 [ 2023-08-25 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453806>. DOI: 10. 1155/2013/178708.
- [ 44 ] Ha T, Moon KH, Dai L, et al. The retinal pigment epithelium is a notch signaling niche in the mouse retina [ J ]. Cell Rep, 2017, 19 ( 2 ) : 351-363. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2017. 03. 040.
- [ 45 ] Wang Y, Shen RW, Han B, et al. Notch signaling mediated by TGF- $\beta$ /Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats [ J ]. World J Gastroenterol, 2017, 23 ( 13 ) : 2330-2336. DOI: 10. 3748/wjg. v23. i13. 2330.
- [ 46 ] Tang Q, Su Z, Gu W, et al. Mutant p53 on the path to metastasis [ J ]. Trends Cancer, 2020, 6 ( 1 ) : 62-73. DOI: 10. 1016/j. trecan. 2019. 11. 004.
- [ 47 ] Yun J, Min JK. Elevated vitreous  $\alpha$ B-crystallin in patients with rhegmatogenous retinal detachment and association with proliferative vitreoretinopathy and retinal detachment area [ J ]. Int Ophthalmol, 2020, 40 ( 10 ) : 2461-2467. DOI: 10. 1007/s10792-020-01425-1.
- [ 48 ] Nashine S. Potential therapeutic candidates for age-related macular degeneration (AMD) [ J/OL ]. Cells, 2021, 10 ( 9 ) : 2483 [ 2023-09-10 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34572131>. DOI: 10. 3390/cells10092483.
- [ 49 ] Wu DI, Kase S, Liu YE, et al. Downregulation of alphaB-crystallin in retinal pigment epithelial cells exposed to diabetes-related stimuli *in vivo* and *in vitro* [ J ]. In Vivo, 2022, 36 ( 1 ) : 132-139. DOI: 10. 21873/invivo. 12684.

(收稿日期:2023-09-20 修回日期:2024-04-08)

(本文编辑:张宇 骆世平)