

剥脱综合征患者房水蛋白质组学分析

徐钊¹ 王礼明¹ 冯强² 张丹丹² 阿依古再丽² 郭如如¹ 东莉洁¹ 魏瑞华¹ 刘爱华¹

¹天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室,天津 300384; ²和田地区人民医院眼科,和田 848000

通信作者:刘爱华,Email:liuaihua8136@126.com

【摘要】 **目的** 分析剥脱综合征(XFS)患者房水蛋白质的表达差异。**方法** 收集2020年6月至2021年1月在和田地区人民医院拟行手术治疗的维吾尔族年龄相关性白内障患者和XFS伴白内障患者各10例,分别作为白内障组和XFS组。术中借助超声乳化手术通道吸取前房中部50~100 μ l房水。通过非标记定量蛋白质组学质谱分析技术对房水中提取的蛋白进行分析,以白内障组作为对照组,并根据 $P < 0.05$ 、差异倍数 > 1.5 的标准筛选得到XFS组的差异表达蛋白。通过基因本体论(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析来探讨XFS组差异表达蛋白的功能及调控信号通路。**结果** 与白内障组相比,XFS组共鉴定出25个差异表达蛋白,这些蛋白主要涉及细胞黏附、受体、水解酶、分子运输等。表达下调的蛋白有14个,包括补体H因子相关蛋白1(CFHR1)、内质网分子伴侣BiP(HSPA5)、双糖链蛋白多糖(BGN)、FRAS1相关的细胞外基质蛋白2(FREM2)、血红蛋白亚基 δ (HBD)、血红蛋白亚单位 γ 1(HBG1)、棕榈酰蛋白水解酶2(PPT2)等。表达上调的蛋白有11个,包括转化生长因子结合蛋白2(LTBP2)、极低密度脂蛋白受体、层粘连蛋白亚基 α 2(LAMA2)、凝血因子IX(F9)等。其中,FREM2为XFS组差异表达最显著的蛋白,其在XFS组个体样本中表达水平基本一致。GO分析显示,这些差异蛋白主要定位于胶原蛋白的细胞外基质、结合珠蛋白-血红蛋白复合物、血浆脂蛋白颗粒和溶酶体腔;分子功能和生物学过程显示,HBD和HBG1参与细胞解毒过程,PPT2参与水解酶活性,BGN和LTBP2参与糖胺聚糖结合。KEGG信号通路分析显示,CFHR1和F9参与补体和凝血级联通路;FREM2和LAMA2参与细胞外基质相互作用通路。**结论** XFS的进展可能与细胞外基质蛋白的改变、血-房水屏障破坏以及潜在的炎症反应有关。显著下调的FREM2可能作为XFS潜在的生物学标志物。

【关键词】 剥脱综合征; 房水; 蛋白质组学; FRAS1相关的细胞外基质蛋白2; 生物学信息分析

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2020D01A06); 天津医科大学眼科医院临床研究中心青年专项基金(2020QN02); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYZDXK-037A)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221101-00509

Proteomic analysis of aqueous humor in patients with exfoliation syndrome

Xu Zhao¹, Wang Liming¹, Feng Qiang², Zhang Dandan², Ayiguzaili Tuerdimaimaiti², Guo Ruru¹, Dong Lijie¹, Wei Ruihua¹, Liu Aihua¹

¹Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China;

²Department of Ophthalmology, People's Hospital of Hotan District, Hotan Prefecture 848000, China

Corresponding author: Liu Aihua, Email: liuaihua8136@126.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the differential expressions of proteins in aqueous humor in patients with exfoliation syndrome (XFS). **Methods** A total of 20 patients were enrolled in the Department of Ophthalmology, People's Hospital of Hotan District from June 2020 to January 2021, including 10 patients with age-related cataract and 10 XFS patients combined with cataract, which were classified as cataract group and XFS group, respectively. A total of 50 to 100 μ l aqueous humor was obtained in the middle of the anterior chamber through the intraoperative phacoemulsification channel. The proteins extracted from aqueous humor were analyzed by label-free quantitative proteomics technology. The cataract group was set as the control group, and the differentially expressed proteins (DEPs) in XFS group were screened according to $P < 0.05$ and fold change > 1.5 . Gene ontology (GO) function analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway analysis were used to explore the function and regulatory signaling pathways of DEPs in the XFS group. This study adhered to the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. 2020KY[L]-21). Written informed consent was obtained from each subject. **Results** In comparison with the cataract group, 25 DEPs were identified in the XFS group, primarily involved in cell adhesion, receptor, hydrolase, and molecular transport. Specifically, there were 14 down-regulated proteins including complement factor H-related protein 1 (CFHR1), endoplasmic reticulum chaperone BiP (HSPA5), biglycan (BGN), FRAS1-related extracellular matrix protein 2 (FREM2), hemoglobin subunit delta (HBD), hemoglobin subunit gamma-1 (HBG1), lysosomal

thioesterase PPT2 (PPT2) etc., and 11 up-regulated proteins including latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 (LTBP2), very low-density lipoprotein receptor (VLDLR), laminin subunit alpha-2 (LAMA2), coagulation factor IX (F9). Among them, FREM2 was the most significantly differentially expressed protein in XFS group with consistent expression levels across individual samples. GO analysis revealed that these DEPs mainly localized to the extracellular matrix of collagen, bound globin-hemoglobin complex, plasma lipoprotein particles and lysosomes. Molecular functions and biological processes showed that HBD and HBG1 were involved in cellular detoxification, PPT2 in hydrolase activity, and BGN and LTBP2 in glycosaminoglycan binding. KEGG signaling pathway analysis indicated that CFHR1 and F9 were associated with complement and coagulation cascade pathways, and FREM2 and LAMA2 were linked to the extracellular matrix interaction pathway. **Conclusions** Disease progression of XFS may be associated with changes in extracellular matrix proteins, disruption of the blood-aqueous humor barrier, and potential inflammatory responses. The significant down-regulation of FREM2 protein may be a potential biomarker for XFS.

[Key words] Exfoliation syndrome; Aqueous humor; Proteomics; FRAS1-related extracellular matrix protein 2; Bioinformatics

Fund program: General Project of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020D01A06); Special Fund for Youth of Clinical Research Center in Tianjin Medical University Eye Hospital (2020QN02); Tianjin Key Medical Discipline (Specialty) Construction Project (TJYXZDXK-037A)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221101-00509

剥脱综合征 (exfoliation syndrome, XFS) 是一种年龄相关性疾病,起病隐匿,早期无临床表现,其准确诊断需要有经验的临床医生对患者扩瞳后于裂隙灯显微镜下进行检查,因此,发病率常被严重低估^[1-2]。XFS 进展快速,药物治疗预后差,会导致剥脱性青光眼 (exfoliative glaucoma, XFG),加速白内障的发展^[3]。在中国,香港地区 60 岁及以上人群 XFS 的患病率为 0.4%^[4];与此相比,维吾尔族人口中 60 岁及以上人群的患病率为 2.2%,而 80 岁及以上人群的患病率进一步上升至 9.5%^[5]。在新疆地区,许多 XFS/XFG 患者因缺乏有效诊断和治疗视力受到影响或丧失。因此,寻找易于诊断的生物学标志物并了解该病的病理过程十分必要。根据剥脱物在光学显微镜下的特征以及超微结构,XFS 病理特征表现为纤维组织过度生产或分解不足,导致纤维基质在眼内外多种组织中慢性积累、聚集并逐渐沉积,其中显著的部位是晶状体前表面和瞳孔边缘^[6-7]。XFS 的全基因组关联研究表明,赖氨酸氧化酶样蛋白 1 基因编码区的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 以及钙通道基因 *CACNA1A* 的 SNP 与 XFS 发生风险有关,并推测这 2 个基因通过不同机制引起细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 代谢紊乱,从而参与 XFS 病理过程^[8-13],但基因组研究并不能清楚地解释 XFS 具体的病理生理机制。相对于基因组学而言,基于质谱的蛋白质组学研究具有整体性和动态性特点。目前,该技术已被广泛应用于生物医药领域^[14-15],相关研究结果不仅有利于加深对疾病机制的理解,还能够获取新的疾病生物学标志物,并为分子靶向治疗提供新的思路。目前已有不同国家关于 XFS 相关蛋白质组学研究的报道,研究结果涵

盖了细胞生长因子、炎症因子、抗氧化因子、补体蛋白、氧化应激标志物和血液蛋白衍生物的改变,以及基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂失调等^[16-18]。房水对眼压和眼前节微环境的维持至关重要^[19-20]。目前尚未有关于中国 XFS 患者房水蛋白质组学研究的报道。本研究采用非标记定量蛋白质组学技术,以维吾尔族年龄相关性白内障患者房水的蛋白作为对照组,鉴定维吾尔族 XFS 患者房水中的差异蛋白,并进行生物信息学分析探讨这些蛋白的改变,以期更好地理解 XFS 发生的分子机制,并筛选 XFS 的生物学标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源及分组 收集 2020 年 6 月至 2021 年 1 月在和田地区人民医院拟行手术治疗的维吾尔族年龄相关性白内障患者和 XFS 伴白内障患者各 10 例,分别作为白内障组和 XFS 组。单纯年龄相关性白内障纳入标准:晶状体皮质和核混浊,眼压 < 21 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa);前房角开放;视盘正常。XFS 伴白内障诊断标准^[2,21]:裂隙灯显微镜下可见瞳孔缘明显灰白色小片状剥脱物碎屑,而且其部分或全部色素皱褶缺失,扩瞳后可见晶状体前囊表面附有沉着物。房角镜检查可见小梁区色素沉着,同时伴有白内障。2 个组排除标准:(1)高度近视者;(2)眼部有炎症者;(3)3 个月内有眼部手术史者;(4)有高血压、糖尿病等并发眼底病变者。白内障组还需排除有青光眼家族史及其他眼部疾病者。2 个组患者年龄、性别构成比、眼压比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 1)。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,研究方案经天津医科大

学眼科医院伦理委员会审核批准[批文号:2020KY(L)-21],所有受检者均了解本研究方法和目的,并签署知情同意书。

表 1 2 个组患者基线资料比较
Table 1 Comparison of baseline characteristics between two groups

组别	例数/眼数	年龄 ($\bar{x}\pm s$, 岁) ^a	性别构成比 (男/女, 例) ^b	眼压 ($\bar{x}\pm s$, mmHg) ^a
白内障组	10/10	74.70±7.59	9/1	16.82±3.49
XFS 组	10/10	72.20±4.64	9/1	14.60±3.63
<i>t</i> 值		0.889	-	1.395
<i>P</i> 值		0.386	1.000	0.180

注:(a:独立样本 *t* 检验;b:Fisher 确切概率法) -:无数据;XFS:剥脱综合征 1 mmHg=0.133 kPa

Note:(a:Independent samples *t*-test;b:Fisher exact test) -:no data; XFS:exfoliation syndrome 1 mmHg=0.133 kPa

1.1.2 主要试剂及仪器 NH_4HCO_3 、尿素、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)(HPLC 级别)(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(美国 Promega 公司);乙腈、甲醇、异丙醇、乙醇、甲酸(HPLC 级别)、水(LC-MS 级别)(美国 Merck 公司);蛋白酶抑制剂(瑞典 Roche 公司)。Nanodrop 分光光度计(美国 Thermo 公司);Triple TOF 6600 质谱系统、EksptnanoLC 415 液相色谱(美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 方法

1.2.1 患者信息采集 所有患者均进行年龄、性别、既往眼部及全身病史等基本信息采集。眼科检查包括视力、屈光度、Goldmann 压平眼压计、视野、超声生物显微镜以及检眼镜检查。

1.2.2 样本采集、储存及制备 (1) 样本采集和储存 2 个组患者均采用常规超声乳化白内障吸除联合人工晶状体植入术,术中于 2:00 位行前房穿刺,用 1 号针头接 1 ml 针筒借手术穿刺通道进入前房中部,缓慢抽吸房水 50~100 μl ,至前房开始变浅时停止,拔出针筒后将房水注入无菌冻存管,投入液氮中,快速于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱低温保存。(2) 样本制备 向样本中加入 500 μl 尿素裂解液(8 mol/L 尿素,50 mmol/L NH_4HCO_3 ,1 倍罗氏蛋白酶抑制剂),室温裂解 5 min。冰上超声破碎(能量设置为 35%,超声 3 s,停 3 s,超声 2 min),20 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,再重复离心 1 次。二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)测定蛋白浓度。每个样本取 100 μg 蛋白,加入 DTT(终浓度 10 mmol/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;加入 IAA(终浓度 40 mmol/L),避光室温孵育 1 h。取集合管标记样本编号,加入 300 μl NH_4HCO_3 平衡相对分

子质量 10 000 超滤管 2 次,14 000 $\times g$ 离心 15 min,加入 100 μg 还原烷基化后的样本,室温 14 000 $\times g$ 离心 15 min,加入 300 μl NH_4HCO_3 清洗 3 次;更换收集管,加入 80 μl NH_4HCO_3 到超滤管中,加入 3 μg 胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12~16 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 $\times g$ 离心 20 min,加入 100 μl 蒸馏水离心冲洗 2 次,收集滤液,向收集管中加入 1% 甲酸终止酶切,60 $^{\circ}\text{C}$ 真空蒸干。30 μl 0.1% 甲酸水重悬样本, Nanodrop 测量浓度。

1.2.3 非标记液相色谱与串联质谱法鉴定样本中的差异蛋白 (1) 数据依赖采集(data-dependent acquisition, DDA)模式的质谱分析 从每个样本中取出 10 μg 左右的肽段合成 1 个样本 S。从样本 S 中取出 10 μg 进行 DDA 模式的质谱分析,剩余的 S 样本进行自制的高 pH 反相柱的分馏。配制分馏所需试剂,缓冲液 A:100% 乙腈;缓冲液 B:0.1% 甲酸;洗脱液:6%→141 μl 0.1% 三乙胺、9 μl 乙腈,9%→136.5 μl 0.1% 三乙胺、13.5 μl 乙腈,12%→132 μl 0.1% 三乙胺、18 μl 乙腈,15%→127.5 μl 0.1% 三乙胺、22.5 μl 乙腈,18%→123 μl 0.1% 三乙胺、27 μl 乙腈,21%→118.5 μl 0.1% 三乙胺、31.5 μl 乙腈,25%→112.5 μl 0.1% 三乙胺、37.5 μl 乙腈,30%→105 μl 0.1% 三乙胺、45 μl 乙腈,35%→97.5 μl 0.1% 三乙胺、52.5 μl 乙腈,将 1 层 C18 膜用铁丝填入 200 μl 枪头,用 200 μl 缓冲液 A 溶解 30 mg 耐高 pH C18 填料,将填料加入到分馏柱中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 000 $\times g$ 离心 2 min,加入 200 μl 缓冲液 A 清洗 1 次,再加入 200 μl 缓冲液 B 清洗 3 次,分馏柱留存备用。将酶切后的肽段装载到分馏柱中,重复装载 3~5 次,200 μl 缓冲液 B 清洗 3 次,加入 150 μl 不同浓度的洗脱液,按梯度洗脱,每个分馏柱中分别取 4 μg 肽段进行 DDA 模式的质谱分析。(2) 液相质谱参数 采用 EksptnanoLC 415 液相色谱 Triple TOF 6600 质谱系统分离鉴定房水样本中蛋白。将酶切后的肽段用 A 相(0.1% 甲酸,2% 乙腈,97.9% 蒸馏水)装载到 AB SCIEX 的捕获柱(10 mm \times 0.3 mm, C18 填料规格为 5 μm , 120 A),流速为 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。使用不同梯度的 B 相(97.9% 乙腈,2% 蒸馏水,0.1% 甲酸)洗脱捕获柱,洗脱的肽段经过分析柱(150 mm \times 0.3 mm, C18 填料规格为 3 μm , 120 A)形成带电喷雾,进入质谱检测。B 相梯度为 0 min-5%, 1 min-6%, 40 min-22%, 52 min-80%, 55 min-80%, 56 min-5%, 60 min-5%, 流速为 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。DDA 扫描时质谱参数:TOF MS 累加时间为 0.25 s,相对分子质量扫描范围为 300~1 500,电荷选择+2~+5 价离子,质量偏差 50 ppm 以内,每个循环内最大检测离子数为

60,每次检测隔离已检测离子 15 s,碎裂能量模式选择动态的碎裂模式。产生离子的累加时间为 0.035 s,采用高灵敏的扫描模式。数据非依赖采集 (data-independent acquisition, DIA) 扫描时质谱参数:TOF MS 累加时间为 0.25 s,二级采用高灵敏的扫描方式,可变窗口数为 95 个,每个窗口累加时间为 35 ms,相对分子质量扫描范围为 100~1 500。采用 SWATH Variable Window Calculator_V1.1 程序计算每个可变窗口的相对分子质量范围,95 个窗口相对分子质量范围参照文件夹(原始数据及质谱参数\\variable windows)。

1.2.4 质谱数据处理及生物信息学分析 使用 Proteinpilot 软件(版本 5.0.1)对 DDA 模式采集的原始数据进行数据库的搜索。酶切方式为胰蛋白酶。数据库为 Uniprot 人数据库(含 20 368 个已注释蛋白,发布于 2020 年 3 月)。自定义 protScore > 0.05。将 Proteinpilot 的搜库结果导入到 SWATH 软件 Peakview(版本 2.0)中作为数据库,对 DIA 采集的数据进行定量。参数设置:每个蛋白选取 6 个肽段,每个肽段选取 6 个离子对,肽段鉴定可信度设置为 99%,假阳性率设置为 1%,排除修饰肽段,峰提取窗口 10 min,质量偏差 50 ppm 以内。每 10 min 选取 2 个内源性肽段进行保留时间的矫正,输出峰面积作为定量值。对蛋白表达数据的处理:采用 R 语言 preprocessCore 包的中位数标准化函数对原始定量值进行中位数校正,对转换后的数据进行 Log₂ 转换,使其满足正态分布。去除没有基因名的蛋白,采用 R 语言 stats 包 t.test 函数对蛋白表达进行差异分析,筛选 $P < 0.05$ 且变化倍数 (fold change, FC) 绝对值 > 1.5 的蛋白作为差异蛋白。基因本体论 (gene ontology, GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路分析使用 clusterProfiler 软件包进行富集分析。其中,GO 分析从生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面对差异表达蛋白进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。计量资料数经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组间差异比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料数据以频数表示,2 个组计数资料的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。将每个样本筛选出的差异蛋白表达值使用 Corrplot 软件包进行 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据质控与差异蛋白表达水平的层次聚类分析

对白内障组与 XFS 组中样本数据进行 Pearson 相关性分析,结果显示样本间的相关系数均 ≥ 0.76 ,各样本数据的重复性较好(图 1A)。从聚类热图的左侧聚类树中可看出每个样本间差异蛋白的表达基本一致,样本间差异蛋白的重复性好(图 1B)。

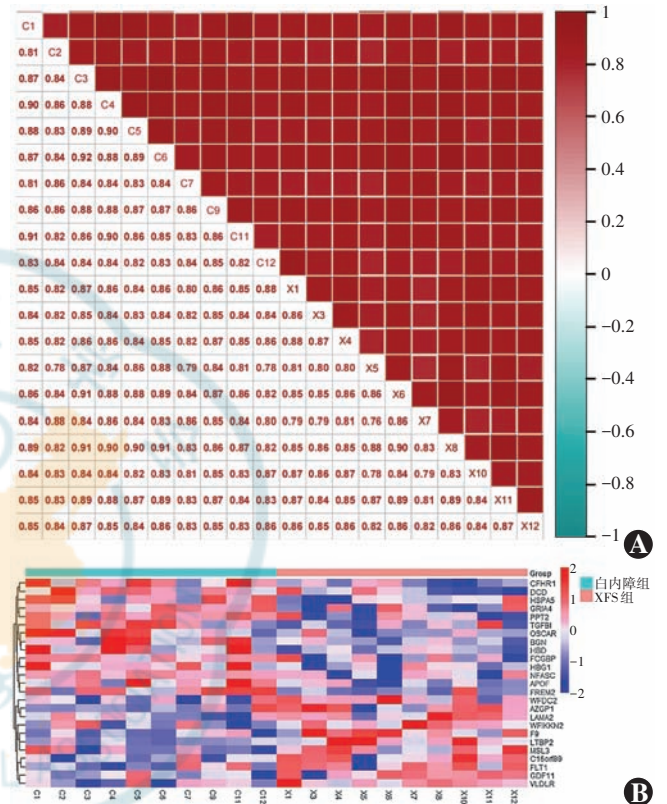


图 1 数据质控 A:样本间的相关性分析 相关性越高表明数据稳定性越好 B:差异蛋白聚类热图 红色代表样本蛋白高表达,蓝色代表蛋白低表达 XFS:剥脱综合征

Figure 1 Data quality control A: Correlation analysis between samples Higher correlations indicated better data B: Differential protein cluster heatmap Red represented up-regulated protein expression in samples and blue represented down-regulated protein expression in samples XFS:exfoliation syndrome

2.2 2 个组差异表达蛋白分析

以白内障组为对照组,XFS 组房水中共鉴定出差异蛋白 25 个。其中,表达下调蛋白 14 个,包括补体 H 因子相关蛋白 1 (complement factor H-related protein 1, CFHR1)、内质网分子伴侣 BiP (endoplasmic reticulum chaperone BiP, HSPA5)、双糖链蛋白多糖 (biglycan, BGN)、FRAS1 相关的细胞外基质蛋白 2 (FRAS1-related extracellular matrix protein 2, FREM2)、血红蛋白亚基 δ (hemoglobin subunit delta, HBD)、血红蛋白亚单位 $\gamma 1$ (hemoglobin subunit gamma-1, HBG1)、转化生长因子- β 诱导蛋白 IG-H3 (transforming growth factor-beta-induced protein IG-H3, TGFBI)、载脂蛋白 F

(apolipoprotein F, APOF)、棕榈酰蛋白水解酶 2 (lysosomal thioesterase PPT2, PPT2) 等。其中, FREM2 差异表达最显著, 在个体样本中表达水平基本一致 (图 1B); 表达上调蛋白 11 个, 包括转化生长因子结合蛋白 2 (latent-transforming growth factor beta-binding protein 2, LTBP2)、极低密度脂蛋白受体 (very low-density lipoprotein receptor, VLDLR)、层粘连蛋白亚基 $\alpha 2$ (laminin subunit alpha-2, LAMA2)、生长分化因子 11 (growth/differentiation factor 11, GDF11)、锌 $\alpha 2$ 糖蛋白 (zinc-alpha-2-glycoprotein, AZGP1)、凝血因子 IX

(coagulation factor IX, F9) 和 WAP、Kazal、免疫球蛋白、Kunitz 和 NTR 结构域蛋白 (WAP, Kazal, immunoglobulin, Kunitz and NTR domain-containing protein 2, 2WFTKKN2) 等。按蛋白质功能分类主要包括细胞黏附、分子运输、受体、水解酶、蛋白质结合调节、纤维组装等, 分别占 16%、12%、16%、16%、16% 和 8%。其中, 明显上调的 LTBP2、VLDLR、LAMA2、GDF11, 明显下调的 CFHR1、HSPA5、BGN、FREM2 与 ECM 代谢、纤维化和炎症反应相关 (表 2)。

表 2 XFS 组和白内障组房水样本中的差异蛋白及蛋白分类
Table 2 Differential proteins in aqueous humor samples between XFS and cataract groups and classification of the proteins

差异蛋白分类	Uniprot ID	蛋白英文缩写	蛋白英文全称	蛋白中文全称	FC(X/C)	P 值	上调/下调
细胞黏附	Q5SZK8	FREM2	FRAS1-related extracellular matrix protein 2	FRAS1 相关的细胞外基质蛋白 2	2.8	0.002 347	下调
	094856	NFASC	neurofascin	神经束蛋白	2	0.028 938	下调
	Q15582	TGFB1	transforming growth factor-beta-induced protein IG-H3	转化生长因子- β 诱导蛋白 IG-H3	1.6	0.026 650	下调
分子运输	P24043	LAMA2	laminin subunit alpha-2	层粘连蛋白亚基 $\alpha 2$	3.3	0.032 472	上调
	P02042	HBD	hemoglobin subunit delta	血红蛋白亚基 δ	2.4	0.013 864	下调
	Q13790	APOF	apolipoprotein F	载脂蛋白 F	2.3	0.009 011	下调
受体	P69891	HGB1	hemoglobin subunit gamma-1	血红蛋白亚单位 $\gamma 1$	2	0.022 536	下调
	Q8IYS5	OSCAR	osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	破骨细胞相关免疫球蛋白样受体	2	0.025 251	下调
	P48058	GRIA4	glutamate receptor 4	谷氨酸受体 4	1.6	0.029 058	下调
水解酶	P17948	FLT1	vascular endothelial growth factor receptor 1	血管内皮生长因子受体 1	1.8	0.042 626	上调
	P98155	VLDLR	very low-density lipoprotein receptor	极低密度脂蛋白受体	3	0.022 024	上调
	Q9UMR5	PPT2	lysosomal thioesterase PPT2	棕榈酰蛋白水解酶 2	1.7	0.017 604	下调
蛋白质结合调节	P81605	DCD	dermcidin	人源性多肽	1.6	0.026 542	下调
	P11021	HSPA5	endoplasmic reticulum chaperone BiP	内质网分子伴侣 BiP	1.5	0.037 656	下调
	P00740	F9	coagulation factor IX	凝血因子 IX	3	0.005 454	上调
纤维组装	Q03591	CFHR1	complement factor H-related protein 1	补体 H 因子相关蛋白 1	1.5	0.003 721	下调
	Q9Y6R7	FCGBP	IgG-Fc-binding protein	IgG-Fc 片段结合蛋白	1.6	0.042 300	下调
	P25311	AZGP1	zinc-alpha-2-glycoprotein	锌 $\alpha 2$ 糖蛋白	2.2	0.042 518	上调
其他	Q8TEU8	WFIKKN2	WAP, Kazal, immunoglobulin, Kunitz and NTR domain-containing protein 2	WAP、Kazal、免疫球蛋白、Kunitz 和 NTR 结构域蛋白 2	2.7	0.033 360	上调
	P21810	BGN	biglycan	双糖链蛋白多糖	1.6	0.039 996	下调
	Q14767	LTBP2	latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	转化生长因子结合蛋白 2	4.2	0.004 244	上调
其他	095390	GDF11	growth/differentiation factor 11	生长分化因子 11	1.8	0.049 255	上调
	Q8N5Y2	MSL3	male-specific lethal 3 homolog	雄性特异性致死 3 同源物	3.1	0.044 290	上调
	Q14508	WFDC2	WAP four-disulfide core domain protein 2	WAP 四二硫化物核心域蛋白 2	3.1	0.044 394	上调
	Q6UX73	C16orf89	UPF0764 protein C16orf89	UPF0764 蛋白 C16orf89	3.6	0.038 855	上调

注: X/C 指 XFS 组相对于白内障组 XFS: 剥脱综合征; FC: 差异倍数

Note: X/C indicates that XFS group versus cataract group XFS: exfoliation syndrome; FC: fold change

2.3 生物信息学分析

GO 分析结果显示,在生物学过程中,与白内障组相比,XFS 组房水差异表达的蛋白主要富集于蛋白结合负调控、跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路、蛋白质跨膜运输、轴突导向、细胞氧化解毒等;在细胞组分方面,XFS 组差异蛋白主要定位于含胶原蛋白的 ECM、结合珠蛋白-血红蛋白复合物、血浆脂蛋白颗粒、溶酶体腔、肌膜、黏着斑等;在分子功能方面,XFS 组差异蛋白的分子功能主要为 ECM 结构成分、氧化还原酶活性(作用于过氧化物作为受体)、ECM 结合、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、棕榈酰(蛋白质)水解酶活性等(图 2)。其中可能参与 XFS 过程重要的分析结果包括:在生物学过程中,CFHR1、HSPA5、WFIKK2 参与蛋白结合负调控过程,GDF11、HSPA5、LTBP2、WFIKK2 参与跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路过程,HBD/HBG1 参与细胞解毒过程。细胞组分定位中,AZGP1、BGN、F9、FREM2、LAMA2、LTBP2、TGFB1 定位于胶原蛋白的 ECM,HBD、HBG1 定位于结合珠蛋白-血红蛋白复合物,APOF、VLDLR 定位于血浆脂蛋白颗粒,BGN、PPT2 定位于溶酶体。分子功能中,BGN、LAMA2、LTBP2、TGFB1 分子功能为 ECM 结构成分,HBD、HBG1 分子功能为氧化还原酶活性(作用于过氧化物作为受体),PPT2 分子功能为棕榈酰(蛋白质)水解酶活性,BGN、LTBP2 分子功能为糖胺聚糖结合。

KEGG 通路富集分析表明,XFS 组差异表达蛋白主要富集于补体和凝血级联通路、ECM 受体相互作用通路(图 3)。其中,下调的 CFHR1 和上调的 F9 参与补体和凝血级联通路;下调的 FREM2 和上调的 LAMA2 参与 ECM 相互作用通路。

3 讨论

XFS 涉及 ECM 中弹性组织合成异常,导致异常的纤维性物质(extracellular fibrillary material, XFM)产生并沉积于睫状体、虹膜、晶状体、小梁网等眼内部位^[3]。XFS 受到复杂环境与基因的共同作用,有遗传倾向。不同种族、地区人群的 XFS 患病率不同^[22]。本研究收集新疆维吾尔族 XFS 伴白内障以及年龄相关性白内障患者的房水,通过非标记蛋白质组学技术鉴定出 XFS 组房水中差异表达的蛋白 LTBP2、VLDLR、LAMA2、GDF11 表达升高,CFHR1、HSPA5、BGN、FREM2 表达下降,这些差异蛋白与 ECM 代谢、纤维化和炎症反应有关。经 GO 分析,在细胞组分方面 HBD 和 HBG1 富集于结合珠蛋白-血红蛋白复合物,APOF

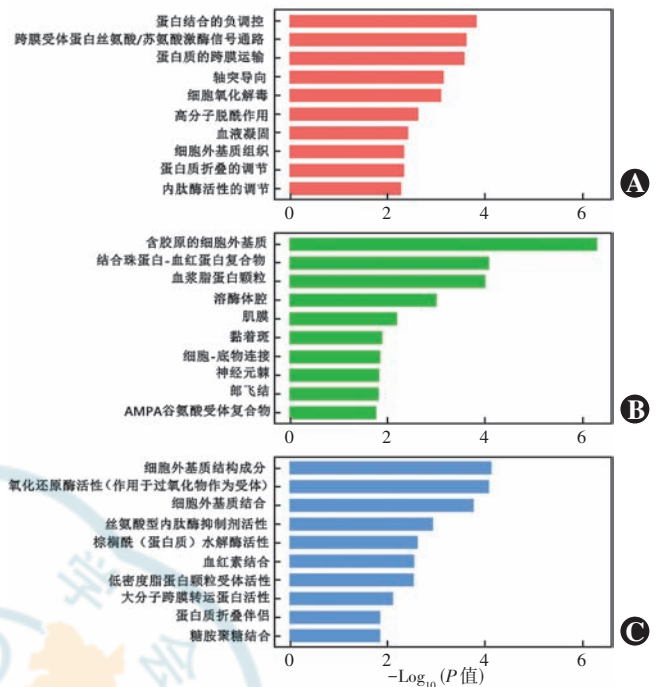


图 2 白内障组与 XFS 组房水差异表达蛋白的 GO 富集分析 A:生物学过程 B:细胞组分 C:分子功能
Figure 2 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins between XFS group and cataract group A: Biological process B: Cell component C: Molecular function

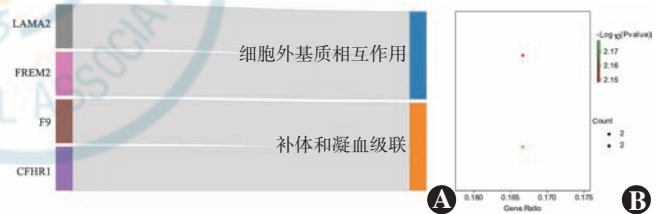


图 3 白内障组与 XFS 组房水差异表达蛋白的 KEGG 信号通路富集分析 A:桑基图 B:气泡图 LAMA2:层粘连蛋白亚基 α2; FREM2:FRAS1 相关的细胞外基质蛋白 2; F9:凝血因子 IX; CFHR1:补体 H 因子相关蛋白 1; Count:富集蛋白的数量
Figure 3 KEGG signaling pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins between XFS group and cataract group A: Sankey diagram B: Bubble chart LAMA2: laminin subunit alpha-2; FREM2: FRAS1-related extracellular matrix protein 2; F9: coagulation factor IX; CFHR1: complement factor H-related protein 1; Count: the amount of enriched proteins

和 VLDLR 富集于血浆脂蛋白颗粒,这些血浆来源的蛋白提示血-房水屏障存在损伤以及 HBD 和 HBG1 含量降低可能与房水中氧化解毒有关。其中,下调的 FREM2 作为本研究蛋白质组学分析中差异最显著的蛋白,在 XFS 组个体样本中表达水平基本一致;KEGG 分析显示,FREM2 和 LAMA 参与 ECM 受体相互作用通路。FREM2 作为 FREM2-FRAS1-FREM1 蛋白复合体的成员,有助于上皮-间充质结合,其表达会动态改变 ECM,为胚胎形成过程中的细胞迁移和重排提供底

物^[23]。有研究发现, *FREM2* 蛋白对眼睑和眼球发育有重要作用, *FREM2* 基因突变功能丧失会影响眼部形态^[24]。因此, *FREM2* 表达的下调可能会引起眼组织 ECM 的改变, 从而引发和加重 XFS 进展。 *FREM2* 有望成为 XFS 潜在的生物学标志物, 并为早期诊断和预防 XFS 提供可能, 从而阻止疾病进展及其他眼内并发症的发生。

LTBP2 由 *LTBP2* 基因编码, 是一种与微原纤维 1 相关的 ECM 蛋白^[25], 其可以直接与微原纤维 1 相互作用而作为 XFM 重要的组成部分^[26]。多项研究表明, *LTBP2* 与器官纤维化和氧化应激有关^[27-29]。 *LTBP2* 可通过核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号转导通路调节肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化, 抑制 *LTBP2* 表达可能是治疗肺纤维化的潜在方法^[30]。在青光眼研究中, 氧化应激和 *LTBP2* 改变对 ECM 和小梁网细胞凋亡的影响可能是由 TGF- β 和 BMP 信号通路所激活介导^[31]。也有研究表明, XFS 与 *LTBP2* 基因突变有关^[32]。 *LTBP2* 在 XFS 中除参与 XFM 的构成外, 也可能引起眼前节组织氧化应激和纤维化, 加重 XFS 疾病进展。 *GDF11* 属于 TGF- β /BMP 超家族的成员, 其信号转导通过 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体传播^[33]。 *GDF11* 在不同器官促/抗纤维化方面的作用是复杂的, 依赖于所在器官^[34]。在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 中, *GDF11* 对视网膜血管内皮细胞、周细胞凋亡有保护作用, 可抑制视网膜炎症反应以及改善血-视网膜屏障的破坏, 从而抑制 DR 进展^[35]。 XFS 患者房水中 *GDF11* 表达升高, 提示其可能对眼前节组织炎症反应起到抑制作用。

CFHR1 是一种补体调节因子。在年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的研究中, *CFHR1* 可通过抑制补体激活产物 C5a 的产生, 抑制中性粒细胞趋化, 从而具有抗炎活性, *CFHR1* 失调会影响 AMD 中的炎症反应和疾病进展^[36]。 *HASP5* 有助于蛋白质折叠、运送内质网、通过内质网相关降解去除蛋白质和调节内质网中的 Ca^{2+} 稳态。此外, *HSPA5* 可通过激活未折叠蛋白质反应途径, 促进自噬, 抑制细胞凋亡^[37]。关于正常眼压性青光眼 (normal tension glaucoma, NTG) 的研究结果显示, *HASP5* 的 G 等位基因多态性可能是 NTG 发展的保护因素^[38]。 *BGN* 是 ECM 的关键成分, 其参与胶原纤维的支架形成并介导细胞信号转导。 *BGN* 通过与不同受体相互作用发挥促炎或抗炎作用, 其在巨噬细胞上与 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 2/TLR4 和

CD14 相互作用, 激活 B 细胞产生 NF- κ B, 上调促炎细胞因子表达, 加剧炎症反应。但相反地, *BGN*/TLR4 和 CD44 在巨噬细胞上的相互作用有助于自噬体的形成, 激活自噬并抑制损伤引起的炎症反应^[39]。这些对炎症反应有抑制作用和对细胞有保护作用蛋白的失调会进一步加重 XFS 眼前节炎症反应和疾病进展。

本研究使用质谱检测结合生物学信息分析来探讨我国新疆维吾尔族 XFS 患者房水差异表达的蛋白。基于以上对 XFS 患者房水中蛋白改变的探讨, 差异蛋白富集的组织来源提示 XFS 患者血-房水屏障破坏的病理过程会使房水中出现来源于血液途径的蛋白^[16]。根据 XFM 的蛋白质汇聚模型研究指出, 房水中异常来源的血液蛋白与 ECM 异常变化的蛋白相互作用结合参与 XFM 的形成和累积^[17]。此外, 与炎症相关的差异蛋白表明潜在的炎症在 XFS 的病理机制中可能扮演重要角色^[18]。显著下调的 *FREM2* 可能作为 XFS 潜在的生物学标志物。本研究的不足之处在于临床样本取样受地域限制, 并且缺乏有效的细胞和动物实验模型。因此, 对这些差异蛋白的验证及其在 XFS 病理过程中的作用仍需进一步进行实验设计。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 徐钊: 直接参与选题、实施研究、收集数据、分析/解释数据、统计学分析、文章撰写及修改; 王礼明: 收集数据、分析数据、修改文章; 冯强: 收集样本、分析数据; 张丹丹: 收集样本、实施研究; 阿依古再丽: 收集样本、统计分析; 郭如如: 实施研究、解释数据; 东莉洁: 酝酿和设计实验、指导研究; 魏瑞华: 指导实验、文章修改; 刘爱华: 直接参与选题、酝酿和设计实验、对文章知识性内容的审阅及定稿

参考文献

- [1] Vesti E, Kivelä T. Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2000, 19 (3): 345-368. DOI: 10.1016/s1350-9462(99)00019-1.
- [2] Konstas A, Ringvold A. Epidemiology of exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1: S4-S11. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000908.
- [3] Ritch R, Schlötzer-Schrehardt U. Exfoliation syndrome [J]. *Surv Ophthalmol*, 2001, 45(4): 265-315. DOI: 10.1016/s0039-6257(00)00196-x.
- [4] Young AL, Tang WW, Lam DS. The prevalence of pseudoexfoliation syndrome in Chinese people [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88 (2): 193-195. DOI: 10.1136/bjo.2003.021816.
- [5] Ma YN, Xie TY, Chen XY. Multiple gene polymorphisms associated with exfoliation syndrome in the Uygur population [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2019, 2019: 9687823 [2023-11-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6525838/>. DOI: 10.1155/2019/9687823.
- [6] Ritch R. Systemic associations of exfoliation syndrome [J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2016, 5 (1): 45-50. DOI: 10.1097/APO.0000000000000187.
- [7] Schlötzer-Schrehardt U, Naumann GO. Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome [J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141 (5): 921-937. DOI: 10.1016/j.ajo.2006.01.047.
- [8] Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, et al. Common sequence

- variants in the *LOXLI* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma [J]. *Science*, 2007, 317 (5843) : 1397-1400. DOI: 10. 1126/science. 1146554.
- [9] Aung T, Ozaki M, Mizoguchi T, et al. A common variant mapping to *CACNA1A* is associated with susceptibility to exfoliation syndrome [J]. *Nat Genet*, 2015, 47 (4) : 387-392. DOI: 10. 1038/ng. 3226.
- [10] Aboobakar IF, Johnson WM, Stamer WD, et al. Major review: exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 154 : 88-103. DOI: 10. 1016/j. exer. 2016. 11. 011.
- [11] 郭梦颖, 杨梦婷, 玛依努, 等. *LOXLI* 基因启动子区单核苷酸多态性与维吾尔族剥脱综合征发病的关联性研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33 (8) : 733-738. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 014.
- Guo MY, Yang MT, Ma YN, et al. Association between single nucleotide polymorphisms at *LOXLI* promoter and Uygur patients with exfoliation syndrome [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33 (8) : 733-738. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 014.
- [12] 曹婷婷. 假性囊膜剥脱综合征发病机制研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (10) : 950-953. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 10. 018.
- Cao TT. Progress of pathogenesis research on pseudoexfoliation syndrome [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32 (10) : 950-953. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 10. 018.
- [13] 殷燕, 樊宁, 刘旭阳. 剥脱综合征的分子遗传学研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33 (8) : 760-763. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 019.
- Yin Y, Fan N, Liu XY. Advances in molecular genetics of exfoliation syndrome [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33 (8) : 760-763. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 08. 019.
- [14] 季美超, 付斌, 张养军. 基于质谱的蛋白质组学方法新进展 [J]. *质谱学报*, 2021, 42 (5) : 862-877. DOI: 10. 7538/zpxb. 2021. 0091.
- Ji MC, Fu B, Zhang YJ. Recent progress of analytical methods of proteomics based on mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2021, 42 (5) : 862-877. DOI: 10. 7538/zpxb. 2021. 0091.
- [15] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J]. *Nature*, 2000, 405 (6788) : 837-846. DOI: 10. 1038/35015709.
- [16] Chakraborty M, Rao A. Alternate causes for pathogenesis of exfoliation glaucoma, a multifactorial elastotic disorder: a literature review [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44 (3) : 1191-1202. DOI: 10. 3390/cimb44030078.
- [17] Lee RK. The molecular pathophysiology of pseudoexfoliation glaucoma [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2008, 19 (2) : 95-101. DOI: 10. 1097/ICU. 0b013e3282f49cda.
- [18] Park DY, Kim M, Cha SC. Cytokine and growth factor analysis in exfoliation syndrome and glaucoma [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62 (15) : 6 [2023-11-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8662569/>. DOI: 10. 1167/iovs. 62. 15. 6.
- [19] Liu A, Wang L, Feng Q, et al. Low expression of *GSTP1* in the aqueous humour of patients with primary open-angle glaucoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (6) : 3063-3079. DOI: 10. 1111/jemm. 16361.
- [20] Roy Chowdhury U, Hann CR, Stamer WD, et al. Aqueous humor outflow: dynamics and disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (5) : 2993-3003. DOI: 10. 1167/iovs. 15-16744.
- [21] Kasim B, İrkeç M, Alikışifoğlu M, et al. Association of *LOXLI* gene polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma and primary open angle glaucoma in a Turkish population [J]. *Mol Vis*, 2013, 19 : 114-120.
- [22] Stein JD, Pasquale LR, Talwar N, et al. Geographic and climatic factors associated with exfoliation syndrome [J]. *Arch Ophthalmol*, 2011, 129 (8) : 1053-1060. DOI: 10. 1001/archophthalmol. 2011. 191.
- [23] Timmer JR, Mak TW, Manova K, et al. Tissue morphogenesis and vascular stability require the *Frem2* protein, product of the mouse myelencephalic blebs gene [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (33) : 11746-11750 [2023-11-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16087869/>. DOI: 10. 1073/pnas. 0505404102.
- [24] Zhang X, Wang D, Dongye M, et al. Loss-of-function mutations in *FREM2* disrupt eye morphogenesis [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 181 : 302-312. DOI: 10. 1016/j. exer. 2019. 02. 013.
- [25] Hirani R, Hanssen E, Gibson MA. LTBP-2 specifically interacts with the amino-terminal region of fibrillin-1 and competes with LTBP-1 for binding to this microfibrillar protein [J]. *Matrix Biol*, 2007, 26 (4) : 213-223. DOI: 10. 1016/j. mathio. 2006. 12. 006.
- [26] Zenkel M. Extracellular matrix regulation and dysregulation in exfoliation syndrome [J]. *J Glaucoma*, 2018, 27 Suppl 1 : S24-S28. DOI: 10. 1097/IJG. 0000000000000902.
- [27] Pang XF, Lin X, Du JJ, et al. LTBP2 knockdown by siRNA reverses myocardial oxidative stress injury, fibrosis and remodelling during dilated cardiomyopathy [J/OL]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 228 (3) : e13377 [2023-11-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31512380/>. DOI: 10. 1111/apha. 13377.
- [28] Sideek MA, Teia A, Kopecki Z, et al. Co-localization of LTBP-2 with FGF-2 in fibrotic human keloid and hypertrophic scar [J]. *J Mol Histol*, 2016, 47 (1) : 35-45. DOI: 10. 1007/s10735-015-9645-0.
- [29] Enomoto Y, Matsushima S, Shibata K, et al. LTBP2 is secreted from lung myofibroblasts and is a potential biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132 (14) : 1565-1580. DOI: 10. 1042/CS20180435.
- [30] Zou M, Zou J, Hu X, et al. Latent transforming growth factor- β binding protein-2 regulates lung fibroblast-to-myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis via NF- κ B signaling [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2021, 12 : 788714 [2023-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8740300/>. DOI: 10. 3389/fphar. 2021. 788714.
- [31] Suri F, Yazdani S, Elahi E. *LTBP2* knockdown and oxidative stress affect glaucoma features including TGF β pathways, ECM genes expression and apoptosis in trabecular meshwork cells [J]. *Gene*, 2018, 673 : 70-81. DOI: 10. 1016/j. gene. 2018. 06. 038.
- [32] Jelodari-Mamaghani S, Haji-Seyed-Javadi R, Suri F, et al. Contribution of the latent transforming growth factor- β binding protein 2 gene to etiology of primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation syndrome [J]. *Mol Vis*, 2013, 19 : 333-347.
- [33] Zhang Y, Wei Y, Liu D, et al. Role of growth differentiation factor 11 in development, physiology and disease [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8 (46) : 81604-81616 [2023-11-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29113418/>. DOI: 10. 18632/oncotarget. 20258.
- [34] Frohlich J, Vinciguerra M. Candidate rejuvenating factor GDF11 and tissue fibrosis: friend or foe? [J]. *Geroscience*, 2020, 42 (6) : 1475-1498. DOI: 10. 1007/s11357-020-00279-w.
- [35] Mei W, Zhu B, Shu Y, et al. GDF11 protects against glucotoxicity-induced mice retinal microvascular endothelial cell dysfunction and diabetic retinopathy disease [J/OL]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 537 : 111422 [2023-11-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720721002665?via%3Dihub>. DOI: 10. 1016/j. mee. 2021. 111422.
- [36] Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD) [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19 (23) : 4694-4704. DOI: 10. 1093/hmg/ddq399.
- [37] Wang J, Lee J, Liem D, et al. *HSPA5* Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum [J]. *Gene*, 2017, 618 : 14-23. DOI: 10. 1016/j. gene. 2017. 03. 005.
- [38] Lee CC, Wang TC, Wang HY, et al. Association between *HSPA5* promoter polymorphisms and a reduced risk of normal tension glaucoma [J]. *Ophthalmic Res*, 2022, 65 (4) : 474-480. DOI: 10. 1159/000524173.
- [39] Roedig H, Nastase MV, Wygrecka M, et al. Breaking down chronic inflammatory diseases: the role of biglycan in promoting a switch between inflammation and autophagy [J]. *FEBS J*, 2019, 286 (15) : 2965-2979. DOI: 10. 1111/febs. 14791.

(收稿日期: 2023-11-25 修回日期: 2024-04-22)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)