

THP1 细胞过表达腺病毒介导的 *PEDF* 抑制炎症过程中关键基因的鉴别

张媛媛 吴红莲 徐嫚鸿 李筱荣 邵彦

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 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 天津市眼科学与视觉科学国际联合研究中心, 天津 300384

通信作者: 邵彦, Email: sytmueh@163.com

【摘要】 目的 鉴别人单核细胞白血病细胞 THP1 过表达腺病毒介导的色素上皮衍生因子 (*PEDF*) 抑制炎症过程中的关键基因。方法 对 THP1 细胞过表达腺病毒介导的 *PEDF* 进行蛋白质组学分析。将 THP1 细胞分为 GFP 组和 *PEDF* 组, 分别用 GFP 腺病毒和 *PEDF* 腺病毒感染细胞; 将 THP1 细胞分为甘露醇组、高糖组、高糖+GFP 组和高糖+*PEDF* 组, 分别用 D-甘露醇、D-无水葡萄糖、GFP 腺病毒和 *PEDF* 腺病毒培养 4、4、3 和 3 d; 将 *Pedf*^{-/-} 小鼠采用随机数表法分为 *Pedf*^{-/-} 组和 *Pedf*^{-/-} 糖尿病组, 每组 12 只, 另取 10 只 C57BL/6 小鼠为对照组, 取小鼠视网膜进行实验。采用实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因 (DEGs) 的 mRNA 在视网膜组织和 THP1 细胞系中的表达水平。与 GSE5504 数据集进行 DEGs 交集, 使用 String 数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络, Cytoscape 软件及 MCODE 应用程序提取 PPI 网络模块, 与 Set1 数据集取交集并找到关键基因。采用 Western blot 在 THP1 细胞和 *Pedf*^{-/-} 小鼠中验证关键基因的表达水平。结果 通过蛋白质组学和生物信息学分析, 筛选出 Set1 数据集中的 105 个差异蛋白。实时荧光定量 PCR 结果显示, *PEDF* 组细胞中 ARF5、TCF25 和 KCTD9 mRNA 相对表达量明显高于 GFP 组, RNPS1、CSF1R、OGA、IBA57 和 MGST2 mRNA 相对表达量明显低于 GFP 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。对照组、*Pedf*^{-/-} 组和 *Pedf*^{-/-} 糖尿病组视网膜组织中表达显著下调的 TCF25、KCTD9、ARF5 mRNA 和表达显著上调的 CSF1R、RNPS1、IBA57 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 64.057, 27.561, 37.179, 65.757, 44.024, 34.248$, 均 $P < 0.001$); 与对照组相比, *Pedf*^{-/-} 组 TCF25、KCTD9、ARF5 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); *Pedf*^{-/-} 糖尿病组 TCF25、KCTD9、ARF5 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1、IBA57 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 *Pedf*^{-/-} 组相比, *Pedf*^{-/-} 糖尿病组 TCF25 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1 和 IBA57 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Set1 数据集与 GSE5504 数据集交集后得到 20 个差异蛋白, 主要富集于基因表达的正向调控、ERK1 和 ERK2 级联的正向调节、胰岛素分泌的正向调节参与细胞对葡萄糖刺激的反应和抗原加工与递呈通路上。通过构建 PPI 网络和 Cytoscape 软件中 MCODE 插件筛选出关键基因 *CSF1R*。Western blot 结果显示, 高糖组和高糖+GFP 组中细胞 CSF1R 相对表达量分别为 1.961 ± 0.085 和 1.000 ± 0.069 , 分别高于甘露醇组的 1.000 ± 0.072 和高糖+*PEDF* 组的 0.469 ± 0.079 , 差异均有统计学意义 ($t = 14.940, 8.765$, 均 $P < 0.01$); *Pedf*^{-/-} 糖尿病组中视网膜 CSF1R 相对表达量为 1.633 ± 0.192 , 高于 *Pedf*^{-/-} 组的 1.000 ± 0.050 , 差异有统计学意义 ($t = 5.537, P < 0.01$)。结论 *CSF1R* 可能为 THP1 细胞过表达腺病毒介导的 *PEDF* 抑制炎症过程中的关键基因和治疗靶点。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 炎症; 色素上皮衍生因子; 生物信息学; *CSF1R* 基因; THP1 细胞

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81900891)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230607-00219

Identification of key genes involved in the inhibition of inflammation by overexpression of *PEDF* adenovirus in THP1 cells

Zhang Yuanyuan, Wu Honglian, Xu Manhong, Li Xiaorong, Shao Yan

Tianjin Key Laboratory of Retinal Function and Diseases, Tianjin International Joint Research Center of Ophthalmology and Vision Science, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Shao Yan, Email: sytmueh@163.com

[Abstract] Objective To identify the key genes in the process inhibiting inflammation by overexpression adenovirus-mediated pigment epithelium-derived factor (*PEDF*) gene in human monocytic leukemia cells THP1.

Methods Proteomic analysis of THP1 overexpressing adenovirus-mediated *PEDF* gene was performed. The THP1 cells were divided into GFP and *PEDF* groups, transfected with *GFP* and *PEDF* adenovirus, respectively. The THP1 cells were divided into mannitol group, high glucose group, high glucose+GFP group, and high glucose+*PEDF* group, which were cultured with mannitol for 4 days, anhydrous glucose for 4 days, *GFP* adenovirus for 3 days, and *PEDF* adenovirus for 3 days, respectively. The *Pedf*^{-/-} mice were divided into *Pedf*^{-/-} group and *Pedf*^{-/-} diabetes group according to the random table method, with 12 mice in each group. Another 10 C57BL/6 mice were taken as the control group. Mouse retinas were collected for experiments. The mRNA expression levels of differentially expressed genes (DEGs) in retina and THP1 cells were verified by real-time fluorescence quantitative PCR. The DEGs were intersected with the GSE5504 dataset, and the protein-protein interaction (PPI) network was built using the String database. Modules of the PPI were extracted using the Cytoscape software and the MCODE application. Intersections were taken with the Set1 dataset and key genes were found. The expression levels of key genes in THP1 cells and *Pedf*^{-/-} mice were verified by Western blot. The feeding and operation of experimental animals were in accordance with the regulations of the State Science and Technology Commission on the management of experimental animals and approved by the Animal Management and Use Committee of Tianjin Medical University (No. TTY2023120217).

Results Through proteomics and bioinformatics analysis, 105 DEGs in the Set1 dataset were screened. The results of real-time PCR showed that the relative expression levels of *ARF5*, *TCF25* and *KCTD9* mRNA were significantly higher and the relative expression levels of *RNPS1*, *CSF1R*, *OGA*, *IBA57* and *MGST2* mRNA were significantly lower in *PEDF* group than in GFP group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.001$). There were significant overall differences in the relative expression levels of down-regulated *TCF25*, *KCTD9* and *ARF5* mRNA and up-regulated *CSF1R*, *RNPS1* and *IBA57* mRNA among control group, *Pedf*^{-/-} group and *Pedf*^{-/-} diabetes group ($F = 64.057, 27.561, 37.179, 65.757, 44.024, 34.248$; all at $P < 0.001$). Compared with control group, the relative expression levels of *TCF25*, *KCTD9* and *ARF5* mRNA were decreased and the relative expression levels of *CSF1R* and *RNPS1* mRNA were increased in *Pedf*^{-/-} group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). Compared with control group, the relative expression levels of *TCF25*, *KCTD9* and *ARF5* mRNA were decreased and the relative expression levels of *CSF1R*, *RNPS1* and *IBA57* mRNA were increased in *Pedf*^{-/-} diabetes group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). Compared with *Pedf*^{-/-} group, the relative expression level of *TCF25* mRNA was decreased and the relative expression levels of *CSF1R*, *RNPS1* and *IBA57* mRNA were increased in *Pedf*^{-/-} diabetes group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). After intersection with the GSE5504 dataset, 20 differential proteins were obtained, which were mainly enriched in positive regulation of gene expression, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of insulin secretion involved in cell response to glucose stimulation and antigen processing and presentation pathways. The key gene *CSF1R* was screened by constructing PPI network and MCODE plugin in Cytoscape software. Western blot results showed that the expression levels of *CSF1R* in high glucose group and high glucose+GFP group were 1.961 ± 0.085 and 1.000 ± 0.069 , which were higher than 1.000 ± 0.072 in mannitol group and 0.469 ± 0.079 in high glucose+*PEDF* group, respectively, and the differences were statistically significant ($t = 14.940, 8.765$; both at $P < 0.01$). The expression of *CSF1R* in the retina of *Pedf*^{-/-} diabetes group was 1.633 ± 0.192 , which was higher than 1.000 ± 0.050 in *Pedf*^{-/-} group, and the difference was statistically significant ($t = 5.537, P < 0.01$).

Conclusions *CSF1R* may be a key gene and therapeutic target for the inhibition of inflammation by overexpression of adenovirus-mediated *PEDF* gene in THP1 cell.

[Key words] Diabetic retinopathy; Inflammation; Pigment epithelium-derived factor; Bioinformatics; *CSF1R* gene; THP1 cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81900891)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230607-00219

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 和年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是主要的致盲眼病。炎症是视网膜水肿和损伤

的重要原因,也是视网膜疾病进展的潜在因素^[1]。DR会影响视网膜的神经元和微血管系统,其发展与炎症因子的作用有关,而这些炎症因子与小胶质细胞的激

活有关^[2]。小胶质细胞是单核吞噬细胞,可视为视网膜的组织驻留巨噬细胞。在静止状态下,小胶质细胞通过吞噬作用和控制低度炎症来维持视网膜中的组织稳态^[3]。然而,长期高血糖引起的组织应激会引发小胶质细胞过度反应,同时产生促炎细胞因子和趋化因子,从而导致慢性炎症^[4]。人单核细胞白血病细胞 THP1 可被诱导分化为单核/巨噬细胞,已作为体外细胞模型被广泛用于单核/巨噬细胞功能、机制和信号通路等相关研究^[5]。色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是一种由视网膜色素上皮分泌的内源性糖蛋白,最初被确定为视网膜色素上皮细胞中的神经营养因子^[6]。PEDF 已被证明在多种类型细胞和组织中可以减轻炎症反应,在介导细胞免受氧化应激损伤方面发挥核心作用^[7]。据报道, PEDF 可通过抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的视网膜微血管内皮细胞增殖来抑制视网膜新生血管形成^[8]。然而, PEDF 在早期 DR 中的保护作用尚不完全清楚,因此深入阐明 PEDF 抑制炎症的机制,寻找视网膜疾病的关键治疗靶点,对临床诊疗以及改善患者预后具有重要意义。高通量蛋白质组学技术可用于探索细胞内蛋白的种类和动态变化,找到涉及视网膜炎过程中的差异蛋白^[9]。随着蛋白质组学的发展,生物信息学在视网膜疾病研究领域中的应用也越来越广泛,结合大数据整合挖掘与 DR 和 AMD 等视网膜疾病发生和发展相关的关键 hub 基因,对筛选潜在的生物标志物及寻找新的视网膜疾病治疗靶点具有重要的临床意义^[10]。由于蛋白质组学技术受限于仪器的精度,存在一定的假阳性率,故需要在基因水平和蛋白水平对 DEGs 进行验证。本研究借助蛋白质组学技术和生物信息学技术寻找 PEDF 抗炎过程中的关键基因并对其进行验证,为深入探索 DR 等视网膜疾病的发生机制、后续临床诊疗及靶向干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物来源 THP1 细胞株购自中国科学院干细胞库。选取 SPF 级 7 周龄健康雄性 PEDF 基因缺陷小鼠 (*Pedf*^{-/-}) 12 只和 C57BL/6 小鼠 10 只, *Pedf*^{-/-} 小鼠源自 C57BL/6 小鼠品系背景,购自美国 Regeneron Pharmaceuticals 公司, C57BL/6 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。实验前排除眼部疾病及其他异常。实验动物的饲养及操作符合国家科学技术委员会《实验动物管理条例》规定,并获得天津医

科大学动物管理及使用委员会批准(批文号: TTY2023120217)。

1.1.2 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养基、青霉素、链霉素、Dulbecco PBS、胎牛血清(美国 Gibco 公司);佛波醇酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、尿素、NH₄HCO₃、DL-二硫苏糖醇、吡啶乙酸、甲酸、乙腈(美国 Sigma 公司);D-无水葡萄糖(Cat#G8150)、D-甘露醇(Cat#8140)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);PEDF 腺病毒、GFP 腺病毒[汉恒生物科技(上海)有限公司];EZBioscience RNA 提纯分离试剂盒(B0004DP)、EZBioscience 逆转录试剂盒(A0010CGQ)、2 倍 SYBR green qPCR 试剂盒(A0012-R1)(美国 EZBioscience 公司);无水乙醇、异丙醇[盛鑫源(天津)化工有限公司];巨噬细胞集落刺激因子 1 受体(colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R)抗体(#3152)、兔抗 IgG(#7074)、β-actin 抗体(bs-0061R)(北京博奥森生物技术有限公司);1 倍罗氏蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司)。LightCycler 480 仪(瑞士 Roche 公司);质谱仪(AB SCIEX TripleTOF® 6600 系统)(美国 AB SCIEX 公司);通用电泳仪[PE60102,莫纳(苏州)生物科技有限公司];凝胶成像仪(Geldoc-it2310,美国 UVP 公司);Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Varioskan™ LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 THP1 细胞培养 THP1 细胞以含 10% 胎牛血清、青霉素(100 IU/ml)(商品单位)、链霉素(100 μg/ml)和 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育。根据细胞状态,隔 2~3 d 进行换液,细胞密度达 1×10⁶ 个/ml 时进行传代,长至对数生长期时用于后续实验。

1.2.2 蛋白制样及细胞谱分析 将生长状态良好的 THP1 细胞计数后按照 5×10⁶ 个细胞/皿加入 6 cm 皿中,同时加入 PMA 使其质量浓度为 100 ng/ml,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,细胞贴壁状态良好,进行病毒感染时细胞融合率为 30%~50%,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)=200 加入 PEDF 和 GFP 腺病毒。将其分为 GFP 组和 PEDF 组,每组 3 个样本。PEDF、GFP 病毒滴度分别为 6.534×10⁹ 和 8.316×10⁹ PFU/ml,每孔病毒量(μl)=MOI×细胞数/病毒滴度(PFU/ml)×1 000。感染前将病毒在冰上慢慢融化,吸去细胞原有培养基,加入 1/2 体积新鲜培养基,每个皿中加入合适体积病毒轻轻混匀进行感染,感染后 6~8 h 吸去含病毒的培养基,换上新鲜培养基。

48 h 后使用 0.3 ml 尿素裂解液收集蛋白,冰上超声破碎蛋白后使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,各取 100 μ g 蛋白利用超滤辅助样品制备酶切方法提取蛋白肽段,并进行液相色谱-串联质谱分析。

1.2.3 蛋白数据分析 对 DDA 模式采集到的原始数据在 ProteinPilot 软件(版本 5.0.1)中进行数据库的搜索(Uniprot 人数据库,含 20 368 个已注释蛋白, released 2020.03),采用 SWATH 软件 Peakview(版本 2.0)对搜索结果进行定量,对原始定量值使用 R 语言 preprocessCore 包的 normalize.median 函数进行中位数校正,对校正后的数据进行 Log₂ 转换,使其满足正态分布。去除基因名字缺失的蛋白,使用 R 语言 Limma 包对 2 个组蛋白表达进行差异分析,将满足筛选标准,即 $P < 0.05$ 且差异倍数(fold change, FC) $|\log_2 FC| > 0.5$ 的蛋白作为差异蛋白。采用 R 语言的 Corplot 包进行 Pearson 相关性分析,使用 Stats 包中的 Prcomp 函数进行主成分分析,校正后的 P 值设置为 < 0.05 。使用 ClusterProfiler 包对基因本体论(gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路进行富集分析,参照 String 数据库(版本 11.0)对差异蛋白进行蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析。

1.2.4 细胞分组及处理 以 5×10^5 个细胞/孔将 THP1 细胞接种到 24 孔板中,分为 GFP 组和 PEDF 组,待 THP1 细胞均匀贴壁后按照 MOI=200 加入相应体积 GFP 腺病毒、PEDF 腺病毒,每组 4 个样本,48 h 后采用 EZBioscience RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA,采用 EZBioscience 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,具体步骤参考试剂盒说明书。用 D-无水葡萄糖诱导 THP1 细胞构建体外高糖损伤模型,将细胞分为甘露醇组(含 5.5 mmol/L D-甘露醇的培养基处理 4 d)、高糖组(含 60 mmol/L D-无水葡萄糖的培养基处理 4 d)、高糖+GFP 组(含 60 mmol/L D-无水葡萄糖的培养基处理 1 d 后导入 GFP 腺病毒继续培养 3 d)和高糖+PEDF 组(含 60 mmol/L D-无水葡萄糖的培养基处理 1 d 后导入 PEDF 腺病毒继续培养 3 d),用于后续实验。

1.2.5 实验动物分组及处理 采用完全随机分组设计将 24 只 $Pedf^{-/-}$ 小鼠通过随机数表法分为 $Pedf^{-/-}$ 组和 $Pedf^{-/-}$ 糖尿病组,每组 12 只;另取 10 只 C57BL/6 小鼠为对照组。 $Pedf^{-/-}$ 糖尿病组小鼠适应性喂养 1 周,造模前禁食不禁水 12 h,腹腔内注射链脲佐菌素(55 mg/kg)制备糖尿病模型,连续 5 d,72 h 后空腹血

糖 ≥ 16.7 mmol/L 为模型制备成功。全部小鼠继续喂养 7 周,每周监测血糖、体质量,期间均无小鼠死亡。7 周后经检测 $Pedf^{-/-}$ 糖尿病组共有 10 只小鼠造模成功。取 $Pedf^{-/-}$ 组、 $Pedf^{-/-}$ 糖尿病组和对照组小鼠视网膜进行后续实验。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测视网膜组织和 THP1 细胞系中各目的基因 mRNA 表达水平 细胞和小鼠视网膜按如前所述的方法处理分别提取 RNA 并逆转录为 cDNA,以 1 μ g cDNA 为模板,应用 EZBioscience 2 倍 SYBR green qPCR 试剂盒,按照说明书进行实时荧光定量 PCR 检测。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。引物通过 PubMed NCBI 基因库在线设计,Primer Blast 在线核对相应种属特异性,由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.7 基因数据集选取及共同差异表达基因数据处理 GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)是一个高通量基因表达数据、芯片和微阵列的公共功能基因组学数据库。从 GEO 数据库中选择 GSE5504 数据集,该数据来源于人外周血单核细胞,外周血样来自 3 个个体。采用 LPS 对不同个体的外周血单核细胞进行 0、2、4、8、24 h 不同时间的刺激。采用在线工具 GEO2R 分析 GSE5504 数据集中 2 h 与 24 h 刺激的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),删除无基因符号的探针集,同一基因符号对应的各个探针集,取表达最大值。以 $|\log_2 FC| > 0.5$ 、 $P < 0.05$ 作为标准筛选 DEGs,并将结果可视化为热图和散点图。将本研究数据集与 GSE5504 数据集进行交集分析,应用在线工具 Venn 获得 2 个数据集共有的 DEGs。Log₂FC > 0.5 为上调基因,Log₂FC < -0.5 为下调基因,利用在线网站(<http://www.sangerbox.com/>)进行火山图绘制。通过 DAVID(version 6.8, <http://david.ncicrf.gov/>)综合数据库对 DEGs 进行 GO 及 KEGG 分析,探讨 DEGs 参与的生物学过程、细胞组分及分子功能, $P < 0.05$ 认为显著富集。将 DEGs 列表导入 String 数据库(<https://cn.string-db.org/>),建立 DEGs 的 PPI 网络分析,设定信度为 0.15。采用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件,以 node score cutoff = 0.2、k-core = 2 和 Max. depth = 100 为标准确定核心模块。同时通过 CytoHubba 内的 3 种算法(DMNC、MNC、MCC)来筛选关键基因,并与 Set1 数据集中变化程度排名前十的 DEGs 取交集,整合分析结果最终筛选出 hub 基因。

表 1 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	来源	扩增片段长度(bp)
<i>PEDF</i>	GGATCGTCTTTGAGAAGAAGCTG	CTCACGGTCTCTCTTCATCC	人源	298
<i>ARF5</i>	GGCCTCATCTTTGTGGTGGA	GTTAGCGCTTTGACAGCTCG	人源	286
<i>TCF25</i>	CACCCCTGTTGAGTCTCAC	GATGAGCCTCCACTCTCTG	人源	268
<i>KCTD9</i>	AGCCCCAAGAACGGAAAGAT	ATGAGCTGTCCATGACGCAA	人源	277
<i>RNPS1</i>	CTGAACCTGGGCTGCTCTTT	CCTTGGTGGCCCTTTATCTT	人源	278
<i>CSF1R</i>	AAGCTCGAATCCCTCAACA	AGGCCTCCACCATGACTTTG	人源	256
<i>OGA</i>	GCCCGTACAAAGGAAGATCC	ACTTGCCTACTCATGACTACA	人源	166
<i>IBA57</i>	CATCTTGTACGGGCTCCAGG	GTATAGCGCGAGGTGCTTCT	人源	100
<i>MGST2</i>	TACAAAGTTACGCCCCAGC	CTGTTTGCAATCCCAGGGC	人源	290
<i>GAPDH</i>	CTGGGCTACACTGAGCACC	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	人源	101
<i>TCF25</i>	AGGGTCTCGGAACAGTCTAA	CTCCGAGGATTCTCTGTGC	鼠源	94
<i>KCTD9</i>	TCACAACAACAAGGAGCACT	CGGGAAAGATCAGCACCCT	鼠源	397
<i>ARF5</i>	ACAGTGTGGGATGTTGGAGG	ACAAAGATGAGGCCCTGAGTG	鼠源	83
<i>CSF1R</i>	GGTTGTAGAGCCGGTGAAA	AAGAGTGGCCGGATCTTTG	鼠源	233
<i>RNPS1</i>	GAAGATGCTGCTCTTTGGCG	GGTAGGAGAAGGAGCCCTAGT	鼠源	203
<i>IBA57</i>	TATCGACCAATGAGCTGCCG	GCAGTTCAACAACAGCCCATAC	鼠源	140
<i>GAPDH</i>	AGCTCGGTGTAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	鼠源	123

注:PCR:聚合酶链式反应;PEDF:色素上皮衍生因子;ARF5:ADP 核糖基化因子 5;TCF25:转录因子 25;KCTD9:钾离子四聚体耦合通道调节基因 9;RNPS1:富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白;CSF1R:巨噬细胞集落刺激因子 1 受体;OGA:氧连接乙酰氨基葡萄糖糖苷酶;IBA57:铁硫簇组装因子 IBA57;MGST2:显著下调的差异蛋白有微体谷胱甘肽 S 转移酶 2;GADPH:磷酸甘油醛脱氢酶

Note:PCR:polymerase chain reaction;PEDF:pigment epithelium-derived factor;ARF5:ADP ribosylation factor 5;TCF25:transcription factor 25;KCTD9:potassium channel tetramerization domain containing 9;RNPS1:RNA binding protein with serine rich domain 1;CSF1R:colony stimulating factor 1 receptor;OGA:O-GlcNAcase;IBA57:iron-sulfur cluster assembly factor IBA57;MGST2:microsomal glutathione S-transferase 2;GADPH:gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.8 Western blot 法检测 CSF1R 在 THP1 细胞和 *Pedf*^{-/-} 小鼠视网膜中的表达情况 以 RIPA:PMSF=99:1 的比例配制裂解液并加入细胞和新鲜分离的小鼠视网膜组织中,于低温环境使用匀浆器充分研磨视网膜组织后静置 1.5~2 h。低温离心机提前预冷,离心半径 7 cm,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 25 min,吸取上清液,以 BCA 法进行蛋白定量。制备 7.5% 分离胶和 5% 浓缩胶,所得蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶分离,待电泳结束后以湿转法转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温封闭 2 h。加入 CSF1R 抗体(1:1 000 稀释)和 β-actin(1:2 000 稀释),4 ℃ 摇床孵育过夜,次日 TBST 洗膜,加入 IgG(1:2 000 稀释),室温下摇床震动孵育 2 h,洗膜除去游离二抗,用 1:1 配置的 ECL 曝光并置印迹膜于成像分析仪自动成像,采用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以 CSF1R 灰度值与 β-actin 灰度值之比表示目标蛋白的表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 27.0 和 Graphpad 7 软件进行统计分析

及作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 个组间各指标的差异比较采用独立样本 *t* 检验;多组间 mRNA 相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白的筛选

蛋白质组学结果揭示 2 个组共 6 个样本间的分布状态及概率密度,小提琴图表明数据具有极高的重复性。蛋白质组学分析共鉴定出 3 569 个蛋白,将该数据集命名为 Set1,根据结果绘制热图和差异蛋白分布散点图。与 GFP 组相比, PEDF 组 |LogFC| > 0.5 且 *P* < 0.05 的蛋白共 105 个,其中上调差异蛋白 52 个,下调差异蛋白 53 个。显著上调的差异蛋白主要有钾离子四聚体耦合通道调节基因 9 (potassium channel tetramerization domain containing

9, KCTD9)、谷胱甘肽过氧化物酶 7 (glutathione peroxidase 7, GPX7)、转录因子 25 (transcription factor 25, TCF25)、线粒体编码 NADH 脱氢酶 1 (mitochondrially encoded nadh:ubiquinone oxidoreductase core subunit 1, MT-ND1)、ADP 核糖基化因子 5 (ADP ribosylation factor 5, ARF5);显著下调的差异蛋白有微体谷胱甘肽 S 转移酶 2 (microsomal glutathione s-transferase 2, MGST2)、氧连接乙酰氨基葡萄糖糖苷酶 (O-GlcNAcase, OGA)、富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein with serine rich domain 1, RNPS1)、CSF1R、铁硫簇组装因子 IBA57 (iron-sulfur cluster assembly factor IBA57, IBA57) 等(图 1, 表 2)。

2.2 差异蛋白功能信息学分析及 PPI 调控网络

GO 分析结果显示,在生物学过程方面,105 个 DEGs 主要集中在 RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控、蛋白质转运、基因表达的正向调控和细胞内蛋白质转运。细胞成分方面,105 个 DEGs 主要富集在细胞质、细胞核、细胞质溶胶和核浆。分子功能方面,DEGs

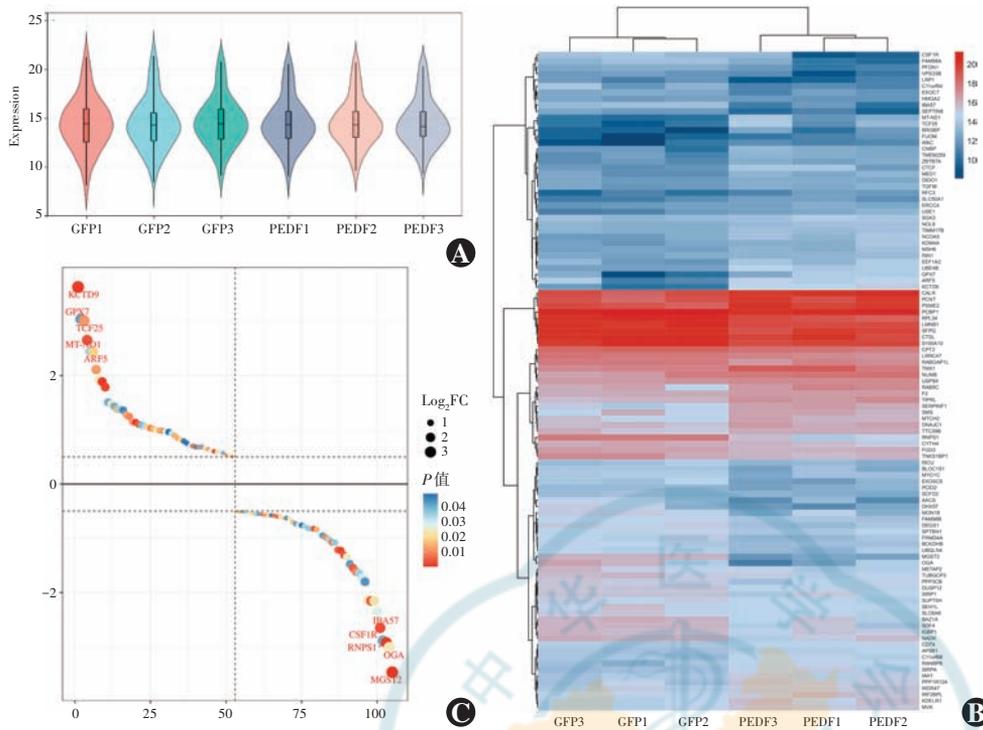


图 1 THP1 过表达 PEDF 腺病毒蛋白质组学分析 A:小提琴图分析表明组内相关性高、重复性好 B: GFP 组与 PEDF 组差异蛋白聚类热图 右侧为差异蛋白基因,红色方格代表上调,蓝色方格代表下调 C:差异表达蛋白分布散点图 GFP:绿色荧光蛋白;PEDF:色素上皮衍生因子;FC:变化倍数;KCTD9:钾离子四聚体耦合通道调节基因 9;GPX7:谷胱甘肽过氧化物酶 7;TCF25:转录因子 25;MT-ND1:线粒体编码 NADH 脱氢酶 1;ARF5:ADP 核糖基化因子 5;MGST2:微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 2;OGA:氧连接乙酰氨基葡萄糖糖苷酶;RNPS1:富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白;CSF1R:巨噬细胞集落刺激因子 1 受体;IBA57:铁硫簇组装因子 IBA57

Figure 1 Proteomic information analysis of PEDF overexpressed adenovirus in THP1 cells A: Violin plot analysis showed high intra-group correlation and good repeatability B: Heat map of differentially expressed proteins between GFP and PEDF groups On the right side, differentially expressed protein genes were shown, and red squares represented up-regulated proteins and blue squares represented down-regulated proteins C: Scatter plot showing distribution of differentially expressed proteins GFP: green fluorescent protein; PEDF: pigment epithelium-derived factor; FC: fold change; KCTD9: potassium channel tetramerization domain containing 9; GPX7: glutathione peroxidase 7; TCF25: transcription factor 25; MT-ND1: mitochondrially encoded nadh; ubiquinone oxidoreductase core subunit 1; ARF5: ADP ribosylation factor 5; MGST2: microsomal glutathione s-transferase 2; OGA: O-GlcNAcase; RNPS1: RNA binding protein with serine rich domain 1; CSF1R: colony stimulating factor 1 receptor; IBA57: iron-sulfur cluster assembly factor IBA57

富集在蛋白质结合和 RNA 结合。KEGG 途径分析显示,DEGs 参与了抗原加工与递呈、内质网中的蛋白质加工和谷胱甘肽代谢等通路中。PPI 网络分析结果显示,蛋白质网络共有 105 个节点(蛋白)和 436 个边(蛋白之间的相互联系)。利用 MCODE 插件进行蛋白质模块分析,获得最显著模块和 6 个关键基因,模块由 6 个节点和 13 条边组成,这 6 个节点分别为具有富含丝氨酸结构域的 RNA 结合蛋白 1 (RNA binding protein with serine rich domain 1, RNPS1)、剪接因子富含脯氨酸和谷氨酰胺 (splicing factor proline and glutamine rich, SFPQ)、Prefoldin 亚基 1 (Prefoldin subunit 1, PFDN1)、外泌体成分 5 (exosome component 5, EXOSC5)、DExH-Box 解旋酶 57 (DExH-Box helicase 57, DHX57) 和 CCHC 型锌指核酸结合蛋白 (CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein, CNBP) (图 2)。

表 2 上调及下调排名前 5 位的差异蛋白信息
Table 2 Information of the top five up-regulated and top five down-regulated proteins

变化形式	蛋白	基因	FC
上调	钾离子四聚体耦合通道调节基因 9	<i>KCTD9</i>	3.63
上调	谷胱甘肽过氧化物酶 7	<i>GPX7</i>	3.04
上调	转录因子 25	<i>TCF25</i>	3.01
上调	线粒体编码 NADH 脱氢酶 1	<i>MT-ND1</i>	2.66
上调	ADP 核糖基化因子 5	<i>ARF5</i>	2.45
下调	微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 2	<i>MGST2</i>	-3.47
下调	氧连接乙酰氨基葡萄糖糖苷酶	<i>OGA</i>	-3.01
下调	富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白	<i>RNPS1</i>	-2.92
下调	巨噬细胞集落刺激因子 1 受体	<i>CSF1R</i>	-2.89
下调	铁硫簇组装因子 IBA57	<i>IBA57</i>	-2.65

注:FC:差异倍数
Note:FC:fold change

2.3 不同细胞和小鼠视网膜组织中差异蛋白 mRNA 表达比较

PEDF 组细胞中 ARF5、TCF25 和 KCTD9 mRNA 相对表达量明显高于 GFP 组,差异均有统计学意义 ($t = 25.337, 6.986, 12.850$, 均 $P < 0.001$); PEDF 组中 RNPS1、CSF1R、OGA、IBA57 和 MGST2 mRNA 相对表达量明显低于 GFP 组,差异均有统计学意义 ($t = 13.849, 23.268, 8.254, 16.021, 11.105$, 均 $P < 0.001$) (表 3)。

对照组、*Pedf*^{-/-} 组和 *Pedf*^{-/-} 糖尿病组视网膜 TCF25、KCTD9、ARF5、CSF1R、RNPS1、IBA57 mRNA 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ($F = 64.057, 27.561, 37.179, 65.757, 44.024, 34.248$, 均 $P < 0.001$);

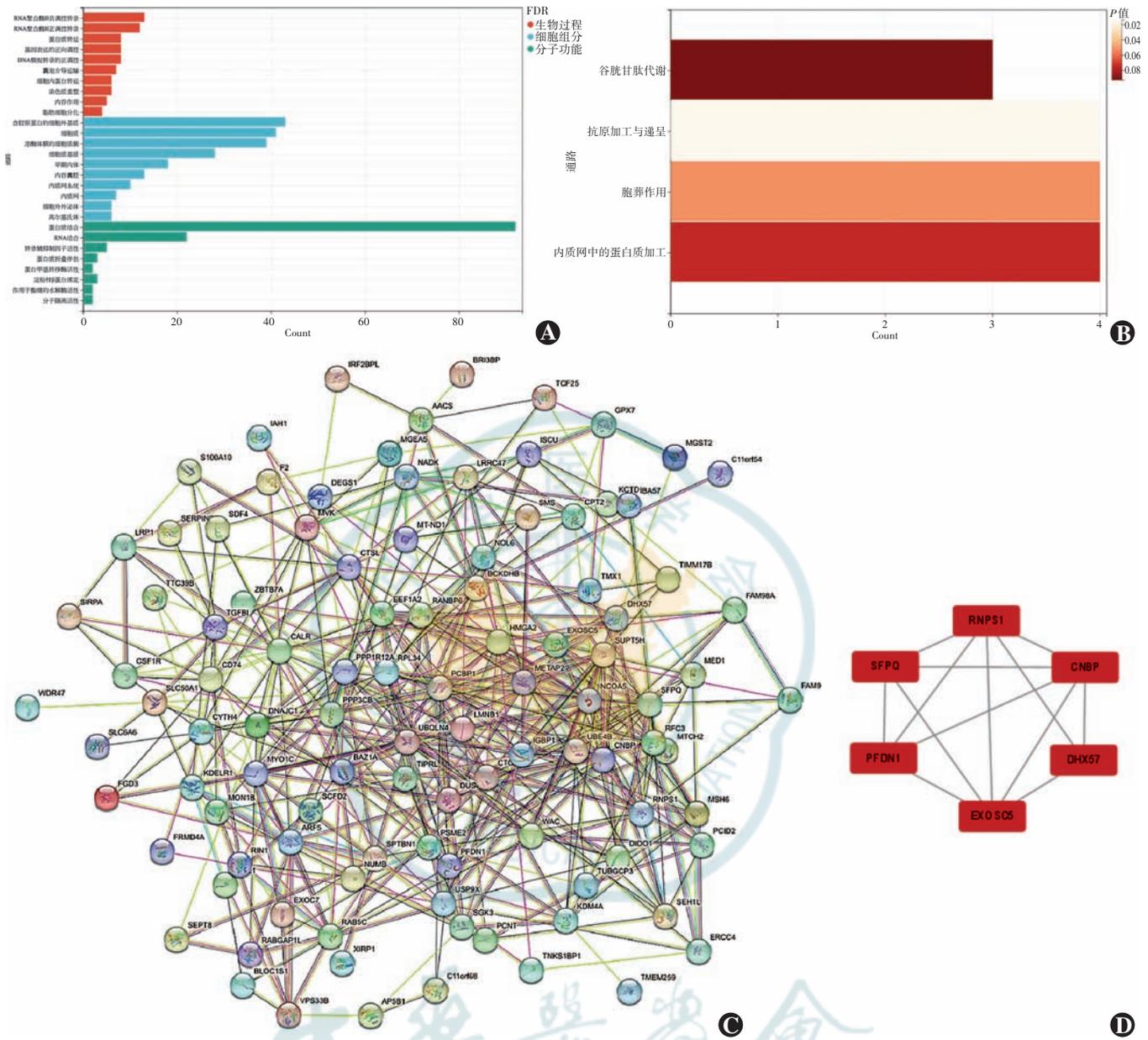


图 2 DEGs 功能富集及互作网络 A: 差异蛋白的 GO 分析 B: 差异蛋白的 KEGG 通路分析 C: *PEDF* 过表达差异蛋白的 PPI 网络图 D: PPI 中关键基因图 RNPS1: RNA 结合蛋白 1; SFPQ: 剪接因子富含脯氨酸和谷氨酰胺; CNBP: CCHC 型锌指核酸结合蛋白; PFDN1: Prefoldin 亚基 1; DHX57: DExH-Box 解旋酶 57; EXOSC5: 外泌体成分 5

Figure 2 Functional enrichment and interaction network of DEGs A: GO analysis results of differential proteins B: KEGG pathway analysis results of differential proteins C: PPI network diagram of *PEDF* overexpressed differential proteins D: Map of key genes in PPI RNPS1: RNA binding protein with serine rich domain 1; SFPQ: splicing factor proline and glutamine rich; CNBP: CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein; PFDN1: Prefoldin subunit 1; DHX57: DExH-Box helicase 57; EXOSC5: exosome component 5

与对照组相比, *Pedf*^{-/-} 组 TCF25、KCTD9、ARF5 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); *Pedf*^{-/-} 糖尿病组 TCF25、KCTD9、ARF5 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1、IBA57 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 *Pedf*^{-/-} 糖尿病组相比, *Pedf*^{-/-} 糖尿病组 TCF25 mRNA 相对表达量降低, CSF1R、RNPS1 和 IBA57 mRNA 相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

2.4 Set1 数据集与 GSE5504 数据集共同 DEGs 的筛选及富集分析

在 GSE5504 数据集中, 共鉴定出 3 697 个 DEGs, 其中 2 044 个上调, 1 653 个下调。利用 Venn 图对 2 个数据集中的 DEGs 进行分析, 共检测到 20 个 DEGs, 其中 10 个上调, 10 个下调。使用 DAVID 工具对 20 个 DEGs 进行分析, GO 分析结果发现 DEGs 的生物学过程主要富集于基因表达的正向调控、ERK1 和 ERK2 级联的正向调节、凋亡过程负向调控、胰岛素分

表 3 2 个组细胞中 ARF5、TCF25、KCTD9、RNPS1、CSF1R、OGA、IBA57 和 MGST2 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression of ARF5, TCF25, KCTD9, RNPS1, CSF1R, OGA, IBA57 and MGST2 mRNA between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	ARF5	TCF25	KCTD9	RNPS1
GFP 组	4	1.000±0.337	1.000±0.042	1.000±0.193	1.000±0.114
PEDF 组	4	9.104±0.544	1.779±0.219	2.842±0.212	0.181±0.033
<i>t</i> 值		25.337	6.986	12.850	13.849
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	样本量	CSF1R	OGA	IBA57	MGST2
GFP 组	4	1.000±0.051	1.000±0.141	1.000±0.056	1.000±0.118
PEDF 组	4	0.175±0.049	0.385±0.048	0.531±0.018	0.125±0.105
<i>t</i> 值		23.268	8.254	16.021	11.105
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:(独立样本 *t* 检验) ARF5:ADP 核糖基化因子 5;TCF25:转录因子 25;KCTD9:钾离子四聚体耦合通道调节基因 9;RNPS1:富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白;CSF1R:巨噬细胞集落刺激因子 1 受体;OGA:氧连接乙酰氨基葡萄糖苷酶;IBA57:铁硫簇组装因子 IBA57;MGST2:微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 2;GFP:绿色荧光蛋白;PEDF:色素上皮衍生因子

Note:(Independent samples *t*-test) ARF5:ADP ribosylation factor 5;TCF25:transcription factor 25;KCTD9:potassium channel tetramerization domain containing 9;RNPS1:RNA binding protein with serine rich domain 1;CSF1R:colony stimulating factor 1 receptor;OGA:O-GlcNAcase;IBA57:iron-sulfur cluster assembly factor IBA57;MGST2:microsomal glutathione S-transferase 2;GFP:green fluorescent protein;PEDF:pigment epithelium-derived factor

表 4 各组视网膜中 TCF25、KCTD9、ARF5、CSF1R、RNPS1 和 IBA57 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression of TCF25, KCTD9, ARF5, CSF1R, RNPS1 and IBA57 mRNA in retina among three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	TCF25	KCTD9	ARF5	CSF1R	RNPS1	IBA57
对照组	4	1.000±0.128	1.000±0.114	1.000±0.159	1.000±0.247	1.000±0.066	1.000±0.056
<i>Pedf</i> ^{-/-} 组	4	0.651±0.712 ^a	0.558±0.111 ^a	0.537±0.399 ^a	2.290±0.238 ^a	1.924±0.206 ^a	1.325±0.445
<i>Pedf</i> ^{-/-} 糖尿病组	4	0.219±0.841 ^{ab}	0.429±0.117 ^a	0.439±0.456 ^a	3.221±0.330 ^{ab}	3.752±0.699 ^{ab}	2.690±0.284 ^{ab}
<i>F</i> 值		64.057	27.561	37.179	65.757	44.024	34.248
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,^a*P*<0.05;与 *Pedf*^{-/-} 组相比,^b*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) TCF25:转录因子 25;KCTD9:钾离子四聚体耦合通道调节基因 9;ARF5:ADP 核糖基化因子 5;CSF1R:巨噬细胞集落刺激因子 1 受体;RNPS1:富含丝氨酸结构域 1 的 RNA 结合蛋白;IBA57:铁硫簇组装因子 IBA57;*Pedf*:色素上皮衍生因子

Note:Compared with control group,^a*P*<0.05;compared with *Pedf*^{-/-} group,^b*P*<0.05(One-way ANOVA,LSD-*t* test) TCF25:transcription factor 25;KCTD9:potassium channel tetramerization domain containing 9;ARF5:ADP ribosylation factor 5;CSF1R:colony stimulating factor 1 receptor;RNPS1:RNA binding protein with serine rich domain 1;IBA57:iron-sulfur cluster assembly factor IBA57;*Pedf*:pigment epithelium-derived factor

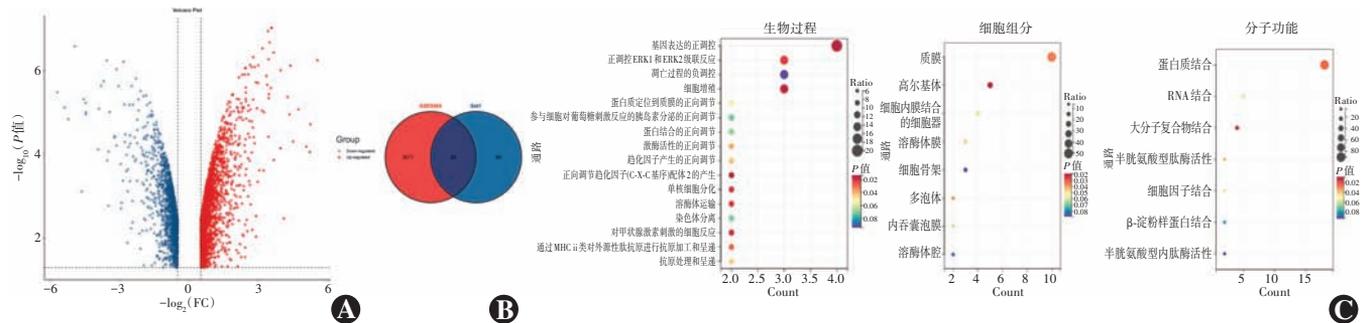


图 3 Set1 数据集与 GSE5504 数据集交集 DEGs 的筛选及富集分析 A:GSE5504 差异蛋白火山图 红点代表上调蛋白,蓝点代表下调蛋白 FC:差异倍数 B:Set1 数据集与 GSE5504 数据集 DEGs 的基因数 Venn 图 红色代表 GSE5504 数据集,蓝色代表 Set1 数据集 C:GO 分析交集基因
Figure 3 Screening and enrichment analysis of intersection DEGs between Set1 and GSE5504 datasets A:Volcano map of differential proteins in GSE5504 dataset Red dots represented up-regulated proteins and blue dots represented down-regulated proteins FC:fold change B:Venn plot of gene number of DEGs between Set1 and GSE5504 datasets Red represented GSE5504 dataset and blue represented Set1 dataset C:GO analysis results of intersection genes

泌的正向调节参与细胞对葡萄糖刺激的反应;细胞组分主要富集于等离子体膜、高尔基体、胞内膜结合细胞器;分子功能主要富集于蛋白结合、核糖核酸绑定、大分子络合物结合等功能上(图 3)。

2.5 PPI 网络构建及关键基因筛选

Cytoscape 软件结果显示 PPI 网络共有 20 个节点和 21 个边,通过 MCODE 插件分析后共得到 4 个枢纽基因。与 Set1 数据集中变化程度排名前十的 DEGs 取交集,整合分析结果最终筛选出 *CSF1R* 基因(图 4,表 5)。

2.6 不同条件下 THP1 细胞和视网膜中 CSF1R 表达水平比较

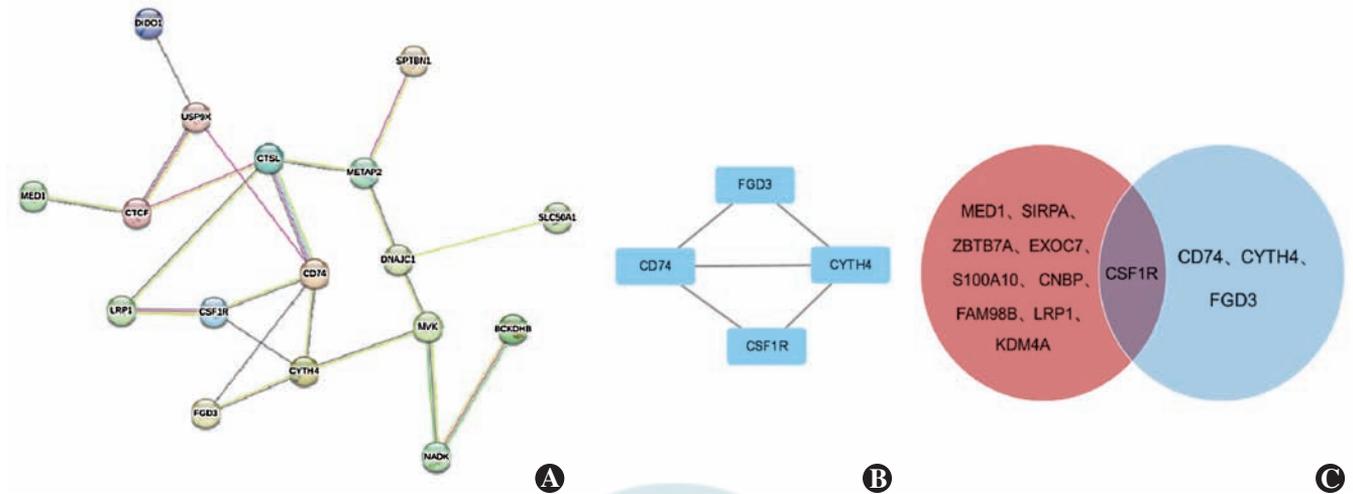


图 4 PPI 网络构建及 hub 基因筛选 A: 2 个数据集交集后 DEGs 的 PPI 网络图 B: hub 基因 C: 2 个数据集差异显著 DEGs 韦恩图 红色代表 Set1 数据集中差异显著 DEGs, 蓝色代表 GSE4404 数据集中差异显著 DEGs CD74: HLA II 型组织适合性抗原 γ 链; CYTH4: 细胞附着蛋白 4 重组蛋白; CSF1R: 集落刺激因子 1 受体基因; FGD3: FYVE、RhoGEF 和 PH 结构域蛋白 3; MED1: 中介复合体亚基 1; SIRPA: 信号调节蛋白 α ; ZBTB7A: 含有 7A 的锌指和 BTB 结构域; EXOC7: Exocyst 复合体组分 7; S100A10: S100 钙结合蛋白 A10; CNBP: CCHC-型锌指核酸结合蛋白; FAM98B: 序列相似的家族 98 成员 B; LRP1: Ldl 受体相关蛋白 1; KDM4A: 赖氨酸去甲基化酶 4A

Figure 4 Construction of PPI network and screening of hub genes A: PPI network of DEGs after intersection of the two datasets B: hub genes C: Venn diagram of significantly different DEGs between the two datasets Red represented the significantly different DEGs in Set1 dataset, and blue represented the significantly different DEGs in GSE4404 dataset CD74: HLA class II histocompatibility antigen gamma chain; CYTH4: recombinant cytohesin 4; CSF1R: macrophage colony-stimulating factor 1 receptor; FGD3: FYVE, RhoGEF and PH domain containing protein 3; MED1: mediator complex subunit 1; SIRPA: signal regulatory protein alpha; ZBTB7A: zinc finger and BTB domain containing 7A; EXOC7: exocyst complex component 7; S100A10: S100 calcium binding protein A10; CNBP: CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein; FAM98B: family with sequence similarity 98 member B; LRP1: Ldl receptor related protein 1; KDM4A: lysine demethylase 4A

表 5 通过 CytoHubba 中不同算法计算 hub 基因得分情况
Table 5 Calculation of hub gene scores using different algorithms in CytoHubba

基因	DMNC 得分	MNC 得分	MCC 得分
CD74	0.308 98	3	6
CYTH4	0.308 98	3	5
CSF1R	0.307 79	2	3
FGD3	0.307 79	2	2

注: CD74: HLA II 型组织适合性抗原 γ 链; CYTH4: 细胞附着蛋白 4 重组蛋白; CSF1R: 集落刺激因子 1 受体; FGD3: FYVE、RhoGEF 和 PH 结构域蛋白 3

Note: CD74: HLA class II histocompatibility antigen gamma chain; CYTH4: recombinant Cytohesin 4; CSF1R: macrophage colony-stimulating factor 1 receptor; FGD3: FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3

Western blot 结果显示, 高糖组 CSF1R 条带灰度较甘露醇组明显增强, 高糖+PEDF 组 CSF1R 条带灰度较高糖+GFP 组明显减弱, *Pedf*^{-/-} 糖尿病组较 *Pedf*^{-/-} 组 CSF1R 蛋白条带灰度增强(图 5)。在细胞实验中, 高糖组和高糖+GFP 组中细胞 CSF1R 相对表达量为 1.961 ± 0.085 和 1.000 ± 0.069 , 分别高于甘露醇组的 1.000 ± 0.072 和高糖+PEDF 组的 0.469 ± 0.079 , 差异均有统计学意义 ($t = 14.940, 8.765$, 均 $P < 0.01$)。在动物实验中, *Pedf*^{-/-} 糖尿病组中视网膜 CSF1R 表达量为 1.633 ± 0.192 , 高于 *Pedf*^{-/-} 组的 1.000 ± 0.050 , 差异有统计学意义 ($t = 5.537, P < 0.01$)。

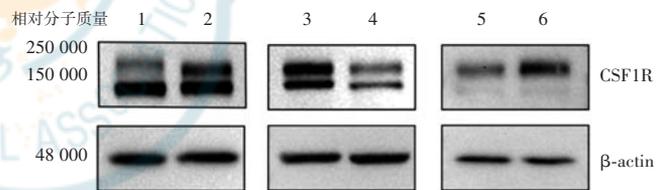


图 5 各处理组 THP1 细胞和视网膜中 CSF1R 蛋白表达电泳图 高糖组和高糖+PEDF 组 CSF1R 蛋白电泳条带灰度较甘露醇组和高糖+GFP 组明显增强, 高糖+PEDF 组 CSF1R 蛋白电泳条带灰度较高糖+GFP 组明显减弱 1: 甘露醇组; 2: 高糖组; 3: 高糖+GFP 组; 4: 高糖+PEDF 组; 5: *Pedf*^{-/-} 组; 6: *Pedf*^{-/-} 糖尿病组 CSF1R: 集落刺激因子 1 受体

Figure 5 Electrophoretogram of CSF1R protein expressions in THP1 cells and retinas from different treatment groups The gray scale of CSF1R protein in high glucose and *Pedf*^{-/-} diabetes groups was significantly higher than that in mannitol and *Pedf*^{-/-} groups, and the gray scale of CSF1R protein in high glucose+GFP group was significantly lower than that in high glucose+PEDF group 1: mannitol group; 2: high glucose group; 3: high glucose+GFP group; 4: high glucose+PEDF group; 5: *Pedf*^{-/-} group; 6: *Pedf*^{-/-} diabetes group CSF1R: macrophage colony-stimulating factor 1 receptor

3 讨论

视网膜疾病通常伴有炎症、血管异常和神经变性, 从而导致视力下降。慢性炎症是视网膜疾病缓慢进展、迁延不愈的重要病理因素之一, 其中葡萄糖水平升高导致 DR 的确切机制也与炎症过程有关^[11]。小胶质细胞是一种单核吞噬细胞, 可视为视网膜组织原位巨噬细胞^[12]。炎症因子与小胶质细胞(中枢神经系统

的常驻组织巨噬细胞)的激活有关。在静止状态下,小胶质细胞通过吞噬和控制轻度炎症帮助维持视网膜组织达到促炎和抗炎状态的平衡。然而,由于高血糖引起的长期组织应激使平衡被破坏,小胶质细胞过度反应,同时产生促炎因子和趋化因子,导致慢性炎症^[13]。在 DR 患者体内,外周血的单核巨噬细胞与视网膜的小胶质细胞均发生了不同程度数目及功能改变^[14]。*PEDF* 基因表达缺陷已被证明与上述疾病的进展密切相关^[15-16]。糖尿病患者的高糖环境直接下调视网膜色素上皮细胞中 *PEDF* 的表达,导致其失去对血管生成的抑制作用^[16]。在增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者的视网膜和玻璃体中 *PEDF* 表达水平下降,说明 *PEDF* 表达水平与人玻璃体液的总抗氧化能力相关,可能作为眼内源性抗氧化剂发挥作用,对 PDR 患眼具有保护作用^[17]。目前,以单纯抗 VEGF 为主的临床治疗措施仍对部分患者效果不佳或难以良好控制疾病进展与复发,因此以抗炎为共同目标的治疗措施被越来越多的研究者所关注^[18]。既往已有研究阐述了 *PEDF* 在抗炎方面的潜在作用^[19],本研究旨在阐明 THP1 过表达 *PEDF* 后的蛋白变化情况与细胞功能改变,为揭示 *PEDF* 抗炎机制提供可能的蛋白靶点。

本研究采用定量蛋白质组学技术对 THP1 细胞过表达 *PEDF* 腺病毒中蛋白表达情况进行检测,利用生物信息学知识对质谱结果进行分析并找出 105 个 DEGs,其中 52 个为上调基因,53 个为下调基因。功能分析结果表明,DEGs 主要参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控、蛋白质转运、基因表达的正向调控和细胞内蛋白质转运以及抗原加工递呈,其中巨噬细胞在抗原加工递呈中发挥了重要作用。为了进一步研究 *PEDF* 的抗炎作用,将本研究中 Set1 数据集与 GSE5504 的 DEGs 取交集,得到 20 个新的 DEGs,其中分别由 10 个上调和 10 个下调 DEGs 组成。功能分析结果表明,DEGs 主要集中于正向调节 ERK1 和 ERK2 级联、凋亡过程负向调控、胰岛素分泌的正向调节参与细胞对葡萄糖刺激的反应以及抗原加工与递呈通路。其中,ERK 处于 MAPK 信号通路中的传导关键位置,激活后的 ERK 从细胞质转移至细胞核,从而激活多种与细胞增殖、分化、迁移和血管生成相关的底物。研究表明,ERK1/2 在单核细胞和巨噬细胞中介导促炎信号传递,ERK1/2 的抑制减少了 LPS 诱导的原代人单核细胞趋化因子的产生^[20],说明这些信号通路的差异表达对于 DR 的发病机制具有重要作用。

为了寻找与炎症相关的 DR 新的生物标志物,本

研究借助多种网络计算手段对 20 个差异靶点进行了 PPI 分析以探寻关键蛋白,通过 MCODE 插件及 CytoHubba 算法共识别出影响炎症的 4 个标志性靶点蛋白,与 Set1 数据集中差异最大的 10 个基因取交集,整合分析结果最终得到 *CSF1R* 基因,此基因的异常高表达很可能是炎症产生的重要机制。*CSF1R* 是 CSF1 和白细胞介素 34(interleukin 34, IL-34)的细胞表面受体,IL-34 和 CSF1 是小胶质细胞正常发育和维持的必需细胞因子^[21]。CSF1 和 IL-34 可通过 *CSF1R* 发出信号以调节单核巨噬细胞的存活、增殖和分化,同时可释放促炎因子。*CSF1R* 在包括大脑皮层、甲状腺、肺、脾脏和肝脏在内的多种组织中表达,在造血干细胞、单核细胞、巨噬细胞和小胶质细胞等多个细胞亚群中表达,以调节其发育^[22]。据报道在糖尿病大鼠视网膜中,*CSF1* 与 *CSF1R* 的水平均有明显提高,并且随着糖尿病病程的延长,2 种因子的表达有增加趋势^[23]。有研究表明,小胶质细胞的激活由 M-CSF/*CSF1R* 信号介导,导致反应性小胶质细胞形成,释放促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和一氧化氮^[24]。在 DR 环境下,高血糖导致小胶质细胞激活,进而促进 *CSF1R* 表达上调^[25]。因此,上调的 *CSF1R* 可能在小胶质细胞参与 DR 的过程中发挥重要作用^[23],而抑制 *CSF1R* 可以防止慢性炎症对血-视网膜屏障的破坏^[26],*PEDF* 可能通过下调 *CSF1R* 的表达来调节 THP1 细胞的功能。本研究通过 Western blot 验证了 *CSF1R* 在细胞和视网膜中的表达情况,结果显示高糖环境下 *CSF1R* 的表达显著升高,并且在 *PEDF* 过表达干预后显著降低。

综上,本研究结果显示 *CSF1R* 可能为 THP1 细胞过表达腺病毒介导的 *PEDF* 抑制炎症过程中的关键基因和治疗靶点。本研究阐述了 THP1 细胞过表达 *PEDF* 腺病毒蛋白水平的变化与功能改变,为 DR 等视网膜疾病的机制研究和后续治疗提供了新的可能靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张媛媛:参与设计实验、实施研究、论文写作;吴红莲:参与设计实验、分析数据、文献检索;徐嫚鸿:指导研究、论文修改;李筱荣:参与设计实验;邵彦:参与设计实验、协调研究实施、修改论文及定稿

参考文献

- [1] Kaur G, Singh NK. The role of inflammation in retinal neurodegeneration and degenerative diseases [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23 (1) : 386 [2023-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8745623/>. DOI:10.3390/ijms23010386.
- [2] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128 (11) : 1580-1591.

- DOI:10.1016/j.optha.2021.04.027.
- [3] Yu C, Roubeix C, Sennlaub F, et al. Microglia versus monocytes: distinct roles in degenerative diseases of the retina [J]. Trends Neurosci, 2020, 43 (6) : 433-449. DOI: 10.1016/j.tins.2020.03.012.
- [4] Forrester JV, Kuffova L, Delibegovic M. The role of inflammation in diabetic retinopathy [J/OL]. Front Immunol, 2020, 11 : 583687 [2023-05-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677305/. DOI:10.3389/fimmu.2020.583687.
- [5] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23 (1) : 37-45. DOI:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- [6] Fudalej E, Justyniarska M, Kasareho K, et al. Neuroprotective factors of the retina and their role in promoting survival of retinal ganglion cells: a review [J]. Ophthalmic Res, 2021, 64 (3) : 345-355. DOI:10.1159/000514441.
- [7] Brook N, Brook E, Dharmarajan A, et al. Pigment epithelium-derived factor regulation of neuronal and stem cell fate [J/OL]. Exp Cell Res, 2020, 389 (2) : 111891 [2023-05-13]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035134/. DOI:10.1016/j.yexcr.2020.111891.
- [8] Sheibani N, Zaitoun IS, Wang S, et al. Inhibition of retinal neovascularization by a PEDF-derived nonapeptide in newborn mice subjected to oxygen-induced ischemic retinopathy [J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 195 : 108030 [2023-05-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7282953/. DOI:10.1016/j.exer.2020.108030.
- [9] 徐曼鸿, 李筱荣. 蛋白质组学在糖尿病视网膜病变炎症性生物标志物研究中的应用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40 (9) : 869-873. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200428-00294.
- Xu MH, Li XR. Application of proteomics in exploring the inflammatory biomarkers of diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40 (9) : 869-873. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200428-00294.
- [10] Yang Q, Feng M, Ma X, et al. Gene expression profile comparison between colorectal cancer and adjacent normal tissues [J]. Oncol Lett, 2017, 14 (5) : 6071-6078. DOI:10.3892/ol.2017.6915.
- [11] Zhang T, Ouyang H, Mei X, et al. Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells via inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway [J]. FASEB J, 2019, 33 (11) : 11776-11790. DOI:10.1096/fj.201802614RRR.
- [12] Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages [J]. Science, 2010, 330 (6005) : 841-845. DOI:10.1126/science.1194637.
- [13] Kinuthia UM, Wolf A, Langmann T. Microglia and inflammatory responses in diabetic retinopathy [J/OL]. Front Immunol, 2020, 11 : 564077 [2023-05-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33240260/. DOI:10.3389/fimmu.2020.564077.
- [14] Wu H, Wang M, Li X, et al. The metaflammatory and immunometabolic role of macrophages and microglia in diabetic retinopathy [J]. Hum Cell, 2021, 34 (6) : 1617-1628. DOI:10.1007/s13577-021-00580-6.
- [15] 蒋依琳, 张晓敏, 邵先锋, 等. 慢病毒介导 PEDF 基因修饰人脐带间充质干细胞的定量蛋白质组学研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39 (10) : 845-851. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00408.
- Jiang YL, Zhang XM, Shao XF, et al. Quantitative proteomic analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells with pigment epithelium-derived factor gene modification mediated by lentivirus [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39 (10) : 845-851. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200609-00408.
- [16] Xu M, Chen X, Yu Z, et al. Receptors that bind to PEDF and their therapeutic roles in retinal diseases [J/OL]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14 : 1116136 [2023-05-21]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10149954/. DOI:10.3389/fendo.2023.1116136.
- [17] Yokoi M, Yamagishi S, Saito A, et al. Positive association of pigment epithelium-derived factor with total antioxidant capacity in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2007, 91 (7) : 885-887. DOI:10.1136/bjo.2006.110890.
- [18] Yang Y, Liu Y, Li Y, et al. MicroRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105 (11) : 3404-3415. DOI:10.1210/clinem/dgaa538.
- [19] Yang SL, Chen SL, Wu JY, et al. Pigment epithelium-derived factor induces interleukin-10 expression in human macrophages by induction of PPAR gamma [J]. Life Sci, 2010, 87 (1-2) : 26-35. DOI:10.1016/j.lfs.2010.05.007.
- [20] Wong E, Xu F, Joffre J, et al. ERK1/2 has divergent roles in LPS-induced microvascular endothelial cell cytokine production and permeability [J]. Shock, 2021, 55 (3) : 349-356. DOI:10.1097/SHK.0000000000001639.
- [21] Muñoz-García J, Cochonneau D, Télèche S, et al. The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis [J]. Theranostics, 2021, 11 (4) : 1568-1593. DOI:10.7150/thno.50683.
- [22] Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N. IL-34 and CSF-1: similarities and differences [J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31 (5) : 486-495. DOI:10.1007/s00774-013-0476-3.
- [23] Liu W, Xu GZ, Jiang CH, et al. Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and its receptor in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Curr Eye Res, 2009, 34 (2) : 123-133. DOI:10.1080/02713680802650369.
- [24] Hao AJ, Dheen ST, Ling EA. Expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in microglia activation is linked to teratogen-induced neuronal damage [J]. Neuroscience, 2002, 112 (4) : 889-900. DOI:10.1016/s0306-4522(02)00144-6.
- [25] Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins [J]. Nature, 1990, 344 (6263) : 254-257. DOI:10.1038/344254a0.
- [26] Kokona D, Ebneter A, Escher P, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation [J/OL]. J Neuroinflammation, 2018, 15 (1) : 340 [2023-05-21]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30541565/. DOI:10.1186/s12974-018-1373-4.

(收稿日期:2024-05-10 修回日期:2024-09-02)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本期英文缩略语名词解释

PEDF:色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor)

VSIG4:V-set 和免疫球蛋白结构域 4 (V-set and immunoglobulin domain-containing 4)

ADOA:常染色体显性遗传性视神经萎缩 (autosomal dominant optic atrophy)

(本刊编辑部)

