

· 实验研究 ·

基于转录组测序研究实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠视网膜 mRNA 差异表达

刘强¹ 廖荣丰¹ 俞华² 董立红²¹安徽医科大学第一附属医院眼科, 合肥 230032; ²安徽医科大学附属巢湖医院眼科, 合肥 238000

刘强现在安徽医科大学附属巢湖医院眼科, 合肥 238000

通信作者: 廖荣丰, Email: liaorfyk@126.com

【摘要】 目的 通过转录组测序筛选实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)小鼠视网膜差异表达基因。**方法** 采用随机数字表法将 20 只 8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠随机分为 2 组, 每组 10 只。其中 EAU 组小鼠后肢内侧皮下及尾部静脉注射光感受器间维生素 A 类结合蛋白₁₋₂₀ 和完全弗氏佐剂乳化液, 腹腔注射百日咳毒素行 EAU 造模, 对照组小鼠皮下注射相应体积磷酸盐缓冲液。造模后 21 d, 采用裂隙灯显微镜检查小鼠眼前节炎症情况, 眼底照相观察视网膜血管并进行炎症评分; 采用苏木精-伊红染色观察各组小鼠视网膜组织形态改变。收集各组小鼠视网膜组织, 提取 RNA 并构建 cDNA 文库, 进行转录组测序, 使用 R 语言 clusterProfiler 包筛选出 EAU 中的差异表达基因并进行 GO 和 KEGG 富集分析, 采用实时荧光定量 PCR 验证视网膜组织中核心差异表达基因的表达。**结果** 造模第 21 天, EAU 组小鼠临床评分为 (2.83±0.94) 分, 明显高于对照组的 (1.89±0.93) 分, 差异有统计学意义 ($t=2.290, P<0.05$), EAU 组小鼠视网膜血管出现迂曲及扩张, 组织病理学显示视网膜中有大量炎性细胞浸润, 确定 EAU 小鼠造模成功。对小鼠视网膜组织进行转录组测序, 共鉴定 32 473 个基因, 筛选出差异表达基因 154 个, 其中上调基因 79 个 (前 3 位分别为 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7*), 下调基因 75 个 (前 3 位分别为 *Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11*)。GO 富集分析显示, 差异表达基因多与免疫应答和细胞因子作用有关; KEGG 通路富集分析显示, 差异表达基因主要富集于 Toll 样通路和细胞因子信号通路。与对照组比较, EAU 组视网膜组织 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7* 相对表达量上调, *Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11* 表达量下调, 差异均有统计学意义 ($t=9.755, 5.358, 6.289, 4.312, 6.577, 6.118$, 均 $P<0.05$)。**结论** EAU 小鼠视网膜组织中关键基因 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7*、*Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11* 表达存在明显差异, 主要与细胞因子相互作用通路、Toll 样受体传导通路有关。

【关键词】 转录组测序; 实验性自身免疫性葡萄膜炎; 差异表达基因**基金项目:** 安徽省高校科研项目 (2023AH050643); 安徽省转化医学研究院科研基金 (2021zhxy-C57)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241007-00280

Differential expression of retinal mRNA in experimental autoimmune uveitis mice based on transcriptome sequencing

Liu Qiang¹, Liao Rongfeng¹, Yu Hua², Dong Lihong²¹Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; ²Department of Ophthalmology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000, China

Liu Qiang now works at Department of Ophthalmology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000, China

Corresponding author: Liao Rongfeng, Email: liaorfyk@126.com

[Abstract] Objective To screen differentially expressed genes in the retinas of mice with experimental autoimmune uveitis (EAU) through transcriptome sequencing. **Methods** Twenty 8-week-old SPF grade male C57BL/6J mice were randomly divided into EAU group and control group by random number table method, with 10 mice in each group. In the EAU group, an emulsion of interphotoreceptor retinoid-binding protein 1-20 and complete Freund adjuvant was injected subcutaneously into the inner side of the hind limbs and intravenously into the tail vein of the mice, and pertussis toxin was injected intraperitoneally to establish the EAU model. In the control group, mice were subcutaneously injected with the corresponding volume of phosphate buffer solution. On the 21st day after model



establishment, the anterior segment inflammation of the mouse eyes was examined using a slit-lamp microscope. Retinal blood vessels were observed by fundus photography and clinical inflammation was scored. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes in the retinal tissues of the two groups. Retinal tissues were collected from two groups of mice. RNA was extracted and cDNA libraries were constructed for transcriptome sequencing. The clusterProfiler package in R programming language was used to screen for differentially expressed genes in EAU, and to conduct GO and KEGG enrichment analyses. The expression of core differentially expressed genes in the retinal tissues was then verified using real-time fluorescent quantitative PCR. The breeding and use of experimental animals were in compliance with the relevant regulations of the Animal Ethics Committee of Anhui Medical University. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Anhui Medical University (No. LLSC20221208). **Results** On the 21st day after model establishment, the clinical score of the EAU group was 2.83 ± 0.94 , significantly higher than 1.89 ± 0.93 of the control group, and the difference was statistically significant ($t = 2.290, P < 0.05$). The retinal blood vessels of mice in the EAU group showed tortuosity and dilation. Histopathological examination revealed a large number of inflammatory cell infiltrations in the retina, indicating successful establishment of the EAU mouse model. Transcriptome sequencing of the mouse retinal tissues identified a total of 32 473 genes, and 154 differentially expressed genes were screened out. Among them, 79 genes were up-regulated with *Gm38574*, *Tmem81*, *Ptpn7* being top three and 75 genes were down-regulated with *Gm19802*, *Fga*, *Cyp3a11* being top three. GO enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were mostly related to immune response and cytokine action. KEGG pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were mainly enriched in the Toll-like pathway and cytokine signaling pathway. Compared with the control group, the relative expression levels of *Gm38574*, *Tmem81*, and *Ptpn7* in the retinal tissues of the EAU group were up-regulated, while the expression levels of *Gm19802*, *Fga*, and *Cyp3a11* were down-regulated, and the differences were statistically significant ($t = 9.755, 5.358, 6.289, 4.312, 6.577, 6.118$; all $P < 0.05$). **Conclusions** There are significant differences in the key genes *Gm38574*, *Tmem81*, *Ptpn7*, *Gm19802*, *Fga*, and *Cyp3a11* in the retinal tissues of EAU mice, mainly correlated with the cytokine interaction pathway, Toll-like receptor signaling pathway.

[Key words] Transcriptome sequencing; Experimental autoimmune uveitis; Differentially expressed genes

Fund program: Scientific Research Project of Universities in Anhui Province (2023AH050643); Scientific Research Fund Project of Anhui Institute of Translational Medicine (2021zhyx-C57)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20241007-00280

葡萄膜炎是一种常见的自身免疫性眼部疾病,可致视力严重下降或永久性视力丧失^[1]。其发病多与系统性免疫紊乱相关^[2-3];但免疫细胞和分子在疾病发生和发展中的作用至今尚无定论^[4-5]。实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)为葡萄膜炎研究提供了重要的模型^[6]。近年来转录组技术迅速发展,为深入揭示免疫系统稳态维持及病理失调的分子机制提供了关键技术支撑^[7-8]。Li等^[9]通过转录组测序研究EAU大鼠虹膜组织,确定NOD样受体信号通路在EAU虹膜病理改变中起关键作用;李学佳等^[10]通过对EAU小鼠视网膜差异表达基因进行转录组分析发现, lncRNA 5033413D16Rik可以抑制抗原特异性Th17细胞致病性相关基因的表达。而针对EAU小鼠视网膜组织的转录组测序研究仍不够深入。本研究旨在采集EAU小鼠的视网膜样本进行全转录组测序,筛选出差异常表达基因,进行GO富集和KEGG通路分析,以探究EAU可能的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周龄野生型雄性C57BL/6J小鼠20只,体质量18~28 g,购自安徽医科大学实验动物中心,饲养于安徽医科大学动物房。实验动物的饲养和使用均符合安徽医科大学动物伦理委员会相关规定,实验方案经安徽医科大学生物医学伦理委员会审核批准(批文号:LLSC20221208)。

1.1.2 主要试剂及仪器 3%戊巴比妥钠由安徽医科大学附属巢湖医院麻醉科提供;光感受器间维生素A类结合蛋白₁₋₂₀(interphotoreceptor retinoid-binding protein₁₋₂₀, IRBP₁₋₂₀)、完全弗氏佐剂(美国Med Chem Express公司);百日咳毒素(美国Sigma公司);总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR染料(美国Thermo Fisher公司)。裂隙灯显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司);眼底激光扫描仪(Daytona,英国OPTOS公司);实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 采用随机数字表法将小鼠分为 EAU 组和对照组,每组 10 只。EAU 组小鼠后肢内侧皮下及尾部静脉注射 200 μ l 含 400 μ g IRBP₁₋₂₀、350 μ g 完全弗氏佐剂(含结核分枝杆菌)的乳化液,腹腔注射 5 g/ml 百日咳毒素 100 μ l,24 h 后腹腔再次注射 100 μ l 百日咳毒素。对照组小鼠皮下注射 PBS 溶液 200 μ l。免疫后 21 d(炎症反应达高峰期)对 2 个组小鼠行眼前节检查及视网膜照相,通过裂隙灯显微镜、视网膜照相评估 EAU 严重程度。

1.2.2 裂隙灯显微镜检查 EAU 小鼠炎症评分 免疫后 21 d,裂隙灯显微镜下观察小鼠结膜、角膜、虹膜,前房及视网膜,同时由 2 名观察者独立进行临床评分。参照 Caspi 分级标准,评分标准见表 1。

表 1 EAU 小鼠模型炎症评分表 Table 1 Inflammation scoring table of EAU mouse model		
眼部表现	病变程度	评分
结膜充血	无	0
	轻度	1
	中度	2
	重度	3
前房渗出	无	0
	少量	1
	大量	2
前房积脓	无	0
	有	1
瞳孔	正常	0
	后粘连	1
视网膜血管	正常	0
	血管扩张	1

注:EAU:实验性自身免疫性葡萄膜炎
Note:EAU:experimental autoimmune uveitis

1.2.3 苏木精-伊红染色观察各组小鼠视网膜组织形态改变 免疫后 21 d,每组取 10 只小鼠,向小鼠腹腔内注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,处死后取出眼球,4%多聚甲醛固定,脱水,二甲苯中透明,浸蜡,包埋,沿眼轴方向切片,厚度 5 μ m。切片进行 65 $^{\circ}$ C 脱蜡,二甲苯和乙醇梯度脱水,蒸馏水冲洗,苏木素染色,冲洗,将视网膜切片放入盐酸乙醇分色后,蒸馏水冲洗,放入 85%乙醇后转到伊红中染色,中性树脂封片,晾干。光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4 视网膜总 RNA 提取及 cDNA 文库构建 免疫后 21 d,2 个组各任意选取 6 只小鼠,戊巴比妥钠腹腔内注射过量麻醉处死后迅速在冰上分离小鼠视网膜,液氮冻存后将组织研磨成粉末,借助总 RNA 提取试剂

盒完成总 RNA 提取和纯化,通过逆转录试剂盒将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA,构建 cDNA 文库,包括连接适配器、文库扩增和纯化等步骤。

1.2.5 测序分析及差异表达基因的筛选 对构建好的 cDNA 文库进行高通量测序,在华大基因 DNBSEQ 平台上完成,去除测序原始数据中包含低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads。使用 HISAT 将 clean reads 比对到参考基因组序列。差异表达基因的筛选标准为 $|\text{Log}_2 \text{差异倍数}| \geq 1$ 且 $Q \text{ 值} \leq 0.05$ 。利用 DESeq 软件对 2 个组之间的差异表达基因进行鉴定并计算差异倍数,采用负二项分布检验进行差异显著性检验,最终根据差异倍数及差异显著性检验结果来筛选差异表达基因。

1.2.6 GO 富集及 KEGG 通路分析 使用 R 语言 clusterProfiler 包,对差异表达基因进行 GO 富集及 KEGG 通路分析,以 $Q \text{ 值} \leq 0.05$ 为显著富集。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 验证核心差异表达基因 2 个组各另取 4 只小鼠视网膜组织,常规提取总 RNA,逆转录为 cDNA。在 PCR 反应管中分别加入双蒸水 8.2 μ l、SYBR Green Master Mix 10 μ l、正反向引物各 0.4 μ l、cDNA 1.0 μ l,合成混合体系。引物购自生工生物(上海)有限公司(表 2),采用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,72 $^{\circ}$ C 退火及延伸 20 s,共 40 个循环。实验独立重复 3 次,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。

表 2 各目的基因引物序列 Table 2 Primer sequences of the target genes		
目的基因		引物序列(5'-3')
Gm38574	正向	GAAACCTACATCCCCCTCC
	反向	TTTTGGGCGGTACTCAGAA
Tmem81	正向	GGGCTGTGCAAACTCCAGT
	反向	CTTAAACCCACAGGCTGCATGA
Ptpn7	正向	AGCATGAACCACGAACCAGT
	反向	AGAACTCCACACACCCCTA
Gm19802	正向	TGAGGTCCAGGATGGCATAGC
	反向	AAGGGAGAGATGGTTGTTTGCTT
Fga	正向	GCCCAACGAGAGACTGTGAT
	反向	CCATCTCCCAAACCTGGTCTC
Cyp3a11	正向	AGCATTGAGGAGGATCACACAC
	反向	CCCTGCTTGTGTGTCAGCA

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,

以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 个组间各目的基因相对表达量比较采用独立样本 t 检验。采用双尾检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAU 小鼠眼部炎症评估及评分比较

免疫后 21 d, 与对照组相比, EAU 组小鼠的视网膜血管充血明显, 色泽鲜红(图 1)。免疫后 21 d, EAU 组小鼠炎症评分为(2.83±0.94)分, 显著高于对照组的(1.89±0.93)分, 差异有统计学意义($t=2.290, P<0.05$)(图 2)。

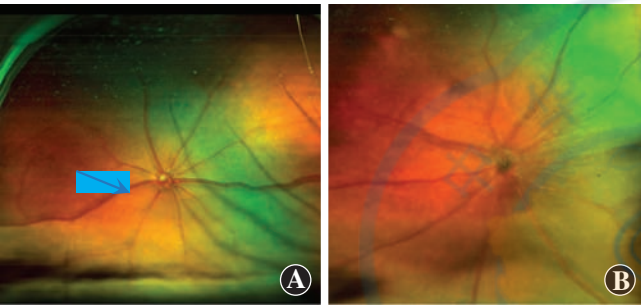


图 1 2 个组小鼠扫描激光视网膜检查图像(×40) 可见 EAU 组视盘周边血管充血明显, 色泽鲜红(蓝色箭头) A: EAU 组 B: 对照组
Figure 1 Scanning laser retinal images of mice in two groups (×40) The peripapillary blood vessels in the EAU group were significantly hyperemic, appearing bright red (blue arrow) A: EAU group B: Control group

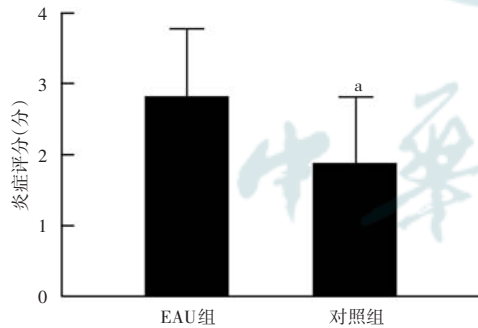


图 2 各组小鼠免疫 21 d 炎症评分比较 与 EAU 组相比, $^aP<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=10$) EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎
Figure 2 Comparison of inflammation scores on day 21 after immunization between two groups Compared with EAU group, $^aP<0.05$ (Independent samples t -test, $n=10$) EAU: experimental autoimmune uveitis

2.2 EAU 小鼠视网膜组织形态改变

小鼠免疫后 21 d, 组织病理学结果显示, 对照组视网膜组织结构正常; EAU 组小鼠大量巨噬细胞和中性粒细胞浸润脉络膜、视网膜及视网膜下, 视网膜结构紊乱, 神经纤维层见大量炎性细胞浸润(图 3)。

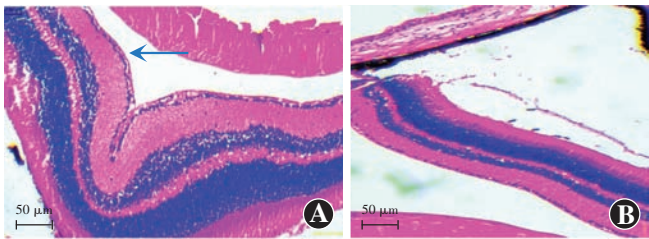


图 3 免疫后 21 d 各组小鼠组织病理学改变(HE × 100, 标尺 = 50 μm) 与对照组相比, EAU 组小鼠视网膜出现炎症反应(蓝色箭头) A: EAU 组 B: 对照组
Figure 3 Histopathological changes in mouse tissues in each group on day 21 after immunization (HE × 100, scale bar = 50 μm) Compared with the control group, an inflammatory response was observed in mouse retinas in the EAU group (blue arrow) A: EAU group B: Control group

2.3 各组小鼠视网膜差异表达基因筛选

共鉴定 32 473 个基因, 筛选出 154 个差异表达基因, 其中上调基因 79 个(前 3 位分别为 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7*), 下调基因 75 个(前 3 位分别为 *Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11*)(表 3, 图 4)。

表 3 上调与下调前 10 位的差异表达基因 Table 3 Top 10 upregulated and top 10 downregulated differentially expressed genes			
基因	Log ₂ FC	P 值	Q 值
<i>Gm38574</i>	5.353	0.002	0.012
<i>Tmem81</i>	4.713	<0.001	<0.001
<i>Ptpn7</i>	4.311	0.002	0.011
<i>Cxcl9</i>	4.160	<0.001	<0.001
<i>Ccr2</i>	4.160	0.003	0.017 8
<i>Prn</i>	4.093	0.004	0.022
<i>Gpr150</i>	3.990	0.006	0.030
<i>Gm40814</i>	3.876	0.008	0.042
<i>Gbp10</i>	3.464	<0.001	<0.001
<i>Cytip</i>	3.450	0.002	0.013
<i>Gm17748</i>	-3.969	0.006	0.033
<i>Cyp4a1</i>	-4.009	0.005	0.029
<i>Gm5458</i>	-4.045	0.005	0.026
<i>Fgb</i>	-4.097	<0.001	<0.001
<i>Ahsg</i>	-4.179	0.003	0.017
<i>Serpina1a</i>	-4.532	<0.001	0.005
<i>Htd2</i>	-4.537	<0.001	0.004
<i>Cyp3a11</i>	-4.594	<0.001	0.003
<i>Fga</i>	-5.010	<0.001	<0.001
<i>Gm19802</i>	-5.251	<0.001	<0.001

注: FC: 差异倍数
Note: FC: fold change

2.4 差异表达基因的 GO 富集及 KEGG 通路分析

筛选出的显著性差异表达基因的 GO 富集分析中, 细胞组分包括细胞外基质、血小板颗粒、血液微小

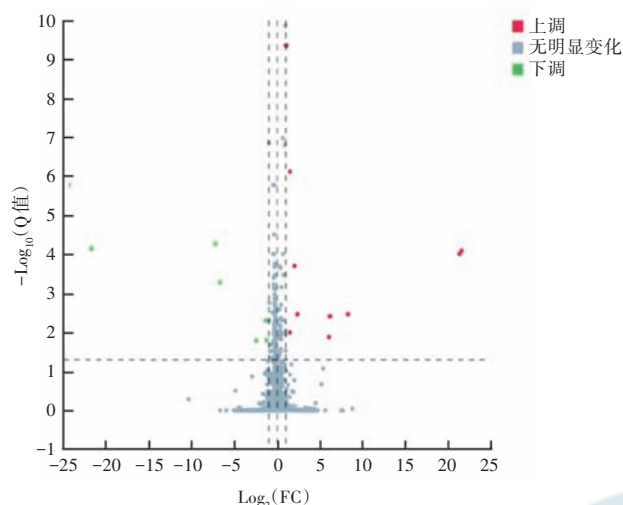


图 4 2 个组小鼠差异表达基因火山图 FC: 差异倍数
Figure 4 Gene expression difference volcano plot map of two groups of mice FC: fold change

颗粒、多泡小体、内质网、胞膜、血红蛋白复合物、囊泡腔、成熟乳糜微粒、细胞表面、内质网膜、收缩纤维; 分子功能包括连接酶活性、对细菌反应、免疫系统反应、防御反应、细胞对于干扰素反应、细胞因子介导的信号通路; 生物过程包括细胞因子结合、信号受体结合、GTP 酶活性等(图 5)。这些显著性差异的 GO 富集分析主

要与免疫应答和细胞因子作用有关。

差异表达基因 KEGG 通路富集分析显示, 主要通路包括细胞因子相互作用通路(8 个基因)、视黄醇代谢通路(6 个基因)、Toll 样受体传导通路(4 个基因)、TNF 传导通路(4 个基因); KEGG 疾病富集分析显示, 差异表达基因与变应性鼻炎、拇趾和跗骨强直及发育异常疾病相关(图 6)。

2.5 核心差异表达基因相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 与对照组相比, EAU 组视网膜组织内 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7* 相对表达量明显升高, *Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11* 相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 9.755$ 、 5.358 、 6.289 、 4.312 、 6.577 、 6.118 , 均 $P < 0.05$) (表 4)。

3 讨论

本研究通过 RNA 转录组测序对 EAU 小鼠视网膜组织进行深入分析, 发现视网膜中 154 个基因在 EAU 小鼠中具有显著变化。GO 富集和 KEGG 通路分析发现差异基因均与细胞因子作用和免疫应答过程有关, 实时荧光定量 PCR 验证结果与转录组测序结果一致。该研究揭示了 EAU 发病机制中可能涉及的生物学通

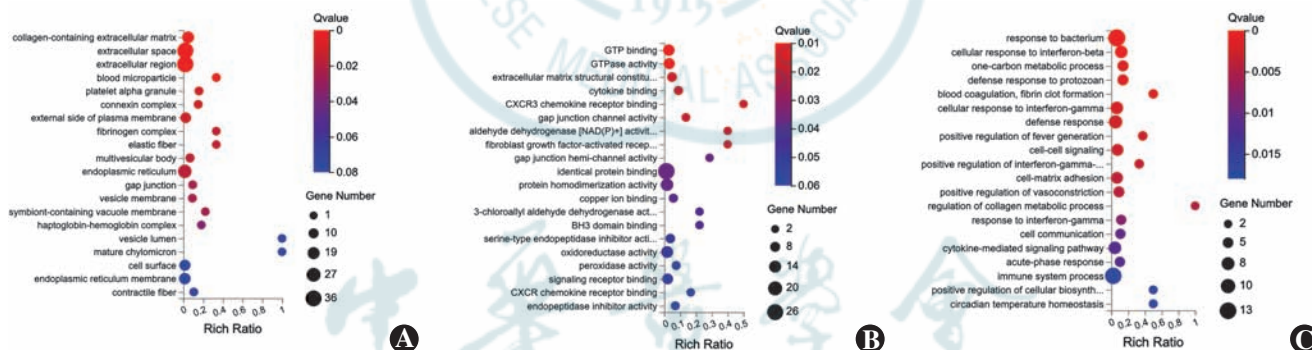


图 5 2 个组差异表达基因 GO 富集条目 A: 细胞组分 B: 生物过程 C: 分子功能
Figure 5 GO enrichment terms of differentially expressed genes between two groups A: Cellular component B: Biological process C: Molecular function

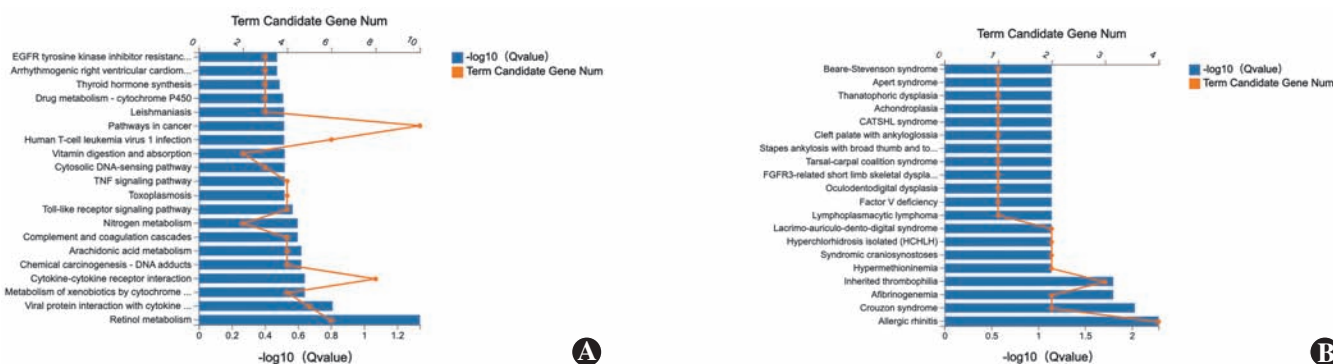


图 6 2 个组差异表达基因 KEGG 通路分析 A: 富集通路 B: 富集疾病
Figure 6 KEGG pathways analysis of differentially expressed genes between two groups A: Enriched pathway B: Enriched disease

表 4 2 个组核心差异基因 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of relative mRNA expression of the core differentially expressed genes between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>Gm38574</i>	<i>Tmem81</i>	<i>Ptpn7</i>	<i>Gm19802</i>	<i>Fga</i>	<i>Cyp3a11</i>
对照组	1.001±0.218	2.400±0.184	1.279±0.120	2.139±0.200	3.622±0.134	2.584±0.138
EAU 组	1.898±0.797	3.623±1.359	2.503±0.153	1.151±0.111	2.340±0.142	1.475±0.117
<i>t</i> 值	9.755	5.358	6.289	4.312	6.577	6.118
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01

注:EAU:实验性自身免疫性葡萄膜炎
Note:EAU;experimental autoimmune uveitis

路,为进一步研究 EAU 的发病机制提供了重要参考。

研究自身免疫性葡萄膜炎发病机制相关的转录变化有助于发现潜在的治疗靶点,Zhu 等^[11]通过 RNA 测序揭示 EAU 小鼠视网膜细胞中抗原呈递和 T 细胞激活相关基因表达发生改变。Lipski 等^[12]对 EAU 小鼠视网膜内皮细胞进行转录组分析发现,有 82 个基因在视网膜内皮细胞的发育过程中起关键作用,其中 5 个基因(*erpina3n*、*lcn2*、*ackr1*、*lrg1* 和 *lamc3*)的蛋白表达在内层血-视网膜屏障细胞水平得到验证,证明视网膜参与 EAU 小鼠的病理过程。

本研究发现上调基因前 3 位分别为 *Gm38574*、*Tmem81*、*Ptpn7*,下调基因前 3 位分别为 *Gm19802*、*Fga*、*Cyp3a11*。KEGG 通路富集分析显示,*Gm38574* 基因与免疫系统、细胞修复复制及生长相关,*Ptpn7* 基因与免疫细胞浸润相关,*Ttpn7* 对免疫治疗的预测价值显著^[13],*Fga* 基因与免疫系统和病毒感染有关,上述基因与葡萄膜炎的相关研究较少。Du 等^[14]采用黄连素治疗 EAU 小鼠,结果显示灌胃给药可以显著影响小鼠脾脏组织中免疫相关通路基因,且明显改善 EAU 小鼠肠道微生物群,增加了具有免疫调节能力的细菌数量,证实了 EAU 模型免疫通路发生改变。EAU 大鼠血浆中差异表达蛋白主要参与代谢和免疫过程,与补体和凝血级联、代谢途径、NF- κ B、PI3K-Akt、Toll 样受体和自噬密切相关^[15]。上述研究结果均提示免疫通路在 EAU 发病中具有关键作用。

Guo 等^[16]研究证实,EAU 小鼠部分视网膜差异表达基因可能与 T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路以及 Toll 样受体信号通路活化有关。此研究为 Toll 样受体信号通路在葡萄膜炎发病机制中发挥关键作用提供了支持,表明该通路可能成为自身免疫性葡萄膜炎的新型治疗靶点。

综上所述,本研究通过转录组测序技术研究 EAU 小鼠视网膜的差异表达基因,发现 EAU 小鼠视网膜组织中免疫反应、细胞因子相互作用相关基因的表达发

生变化。本研究为深入理解 EAU 的发病机制提供了新的靶点,可能为临床应用提供更多的参考价值,未来还需通过体内外实验和临床研究来进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘强:实验操作、论文撰写;廖荣丰:研究设计、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿;俞华、董立红:数据统计分析

志谢 感谢安徽医科大学基础医学院张胜权和张素梅老师进行实验技术指导

参考文献

[1] Uhl PB, Szober CM, Amann B, et al. In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis[J]. J Proteomics, 2014, 109: 50-62. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.06.020.

[2] Zhou L, Zhang J. Immune cells mediate the causal relationship between uveitis and colorectal cancer via Mendelian randomization analysis[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 25964. DOI: 10.1038/s41598-024-77758-z.

[3] Zhong Z, Su G, Kijlstra A, et al. Activation of the interleukin-23/interleukin-17 signalling pathway in autoinflammatory and autoimmune uveitis[J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 80: 100866. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100866.

[4] Wildner G, Diedrichs-Möhning M. Molecular mimicry and uveitis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 580636. DOI: 10.3389/fimmu.2020.580636.

[5] Agrawal R, Testi I, Bodaghi B, et al. Collaborative ocular tuberculosis study consensus guidelines on the management of tubercular uveitis-report 2: guidelines for initiating antitubercular therapy in anterior uveitis, intermediate uveitis, panuveitis, and retinal vasculitis[J]. Ophthalmology, 2021, 128(2): 277-287. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.06.052.

[6] Klaska IP, Forrester JV. Mouse models of autoimmune uveitis[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(18): 2453-2467. DOI: 10.2174/1381612821666150316122928.

[7] Ding S, Chen X, Shen K. Single-cell RNA sequencing in breast cancer: understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy[J]. Cancer Commun (Lond), 2020, 40(8): 329-344. DOI: 10.1002/cac2.12078.

[8] Liu S, Iorgulescu JB, Li S, et al. Spatial maps of T cell receptors and transcriptomes reveal distinct immune niches and interactions in the adaptive immune response[J]. Immunity, 2022, 55(10): 1940-1952. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.09.002.

[9] Li D, Huang C, Han X, et al. Integrated transcriptome analysis of iris tissues in experimental autoimmune uveitis[J]. Front Genet, 2022, 13: 867492. DOI: 10.3389/fgene.2022.867492.

[10] 李学佳, 张开朗, 陈思思, 等. lncRNA 5033413D16Rik 对实验性自身免疫性葡萄膜炎 Th17 细胞活性的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2024, 42(11): 983-990. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230220-00056.

Li XJ, Zhang KL, Chen SS, et al. Inhibitory effect of lncRNA 5033413D16Rik on the activity of T helper 17 cells in experimental autoimmune uveitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2024, 42(11): 983-990. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230220-00056.

[11] Zhu L, Li H, Wang R, et al. Identification of Hif1 α as a potential participant in autoimmune uveitis pathogenesis using single-cell transcriptome analysis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(5): 24. DOI: 10.1167/jovs.64.5.24.

[12] Lipski DA, Foucart V, Dewispelaere R, et al. Retinal endothelial cell phenotypic modifications during experimental autoimmune uveitis: a transcriptomic approach[J]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1): 106. DOI: 10.1186/s12886-020-1333-5.

- [13] Wang F, Wang X, Liu L, et al. Comprehensive analysis of PTPN gene family revealing PTPN7 as a novel biomarker for immuno-hot tumors in breast cancer[J]. Front Genet, 2022, 13: 981603. DOI: 10. 3389/fgene. 2022. 981603.
- [14] Du Z, Wang Q, Huang X, et al. Effect of berberine on spleen transcriptome and gut microbiota composition in experimental autoimmune uveitis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 106270. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2020. 106270.
- [15] Guo DD, Hu B, Tang HY, et al. Proteomic profiling analysis reveals a link between experimental autoimmune uveitis and complement activation in rats[J]. Scand J Immunol, 2017, 85(5): 331-342. DOI: 10. 1111/sji. 12539.
- [16] Guo D, Li J, Liu Z, et al. Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. Inflamm Res, 2015, 64(9): 683-696. DOI: 10. 1007/s00011-015-0848-3.
- (收稿日期: 2025-01-15 修回日期: 2025-08-12)
- (本文编辑: 张宇 骆世平)

· 病例报告 ·

晶状体前长悬韧带合并 *PROM1* 基因突变黄斑营养不良诊疗 1 例

冯晴 李渊 王天佐 孙新成

南京医科大学附属常州市第二人民医院眼科, 常州 213000

通信作者: 孙新成, Email: czeyedoctor@163. com

基金项目: 常州市高层次医学人才培养项目 (2022CZBJ075)

Long anterior zonules and macular dystrophy with variants in *PROM1* gene: a case report

Feng Qing, Li Yuan, Wang Tianzuo, Sun Xincheng

The Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China

Corresponding author: Sun Xincheng, Email: czeyedoctor@163. com

Fund program: Changzhou High-Level Medical Talents Training Project (2022CZBJ075)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20241210-00344

患者男, 76 岁, 无明显诱因下双眼渐进性视力下降 3 年就诊。眼科检查示: 右眼视力为指数/30 cm, 矫正后无提高, 左眼最佳矫正视力为 0. 12; 眼压右眼为 12 mmHg (1 mmHg = 0. 133 kPa), 左眼为 16 mmHg; 色觉检查显示红绿色觉异常; 双眼结膜无充血, 角膜透明, 充分扩瞳后可见双眼晶状体混浊, 前囊周边均存在细小的放射状小带向晶状体中央延伸, 附着散在的色素颗粒 (图 1)。眼底检查示双眼视盘边界清, 黄斑区片状萎缩, 色素紊乱 (图 2A、B)。眼底自发荧光显示以黄斑为中心约 1.5 个视盘直径 (papilla diameter, PD) 范围内为低自发荧光, 外周环绕着粗条带状的高自发荧光 (图 2C、D); 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 显示双眼视网膜下均存在沉积物, 集中在黄斑周围, 视网膜色素上皮结构紊乱和视网膜外层萎缩 (图 2E、F); 荧光素眼底血管造影提示双眼黄斑区存在不规则荧光遮蔽和背景高荧光, 未见荧光素渗漏 (图 2G、H); 初步诊断为迟发性视网膜变性 (late-onset retinal degeneration, L-ORD) (双眼)、白内障 (双眼)、晶状体前长悬韧带 (long anterior lens zonules, LAZs) (双眼)。

患者父母眼部病史不详。通过对其子女进行详细的眼部检查, 未发现明显异常。采集患者本人及其 1 子 1 女的外周静脉血, 提取 DNA 进行全外显子高通量测序。结合受检者临床诊断和 OMIM 等数据库中基因对应疾病关系综合分析, 显示患者本人及其子女均

携带 *PROM1* c. * 580T>A, exon28 (28/28) 杂合变异 (图 3)。修正诊断为: 视网膜黄斑营养不良 (双眼)、白内障 (双眼)、LAZs (双眼)。

患者完善术前检查, 排除手术禁忌证后, 先后行右眼及左眼白内障超声乳化摘除联合人工晶状体植入术。在术中予以环形撕囊时, 发现悬韧带从前囊附着处断裂。术后 1 周复查最佳矫正视力右眼 0. 15, 左眼 0. 2, 人工晶状体正位, 眼压右眼 17 mmHg, 左眼 14 mmHg。术后 1 年复查, 最佳矫正视力右眼 0. 1, 左眼 0. 08; 眼压右眼 15 mmHg, 左眼 17 mmHg; 眼底检查示黄斑区病变范围较前略增大, OCT 显示黄斑区视网膜结构紊乱加重, 视网膜下及层间高密度沉积物增多 (图 4)。

讨论: 晶状体悬韧带通常止于距晶状体赤道 (1. 42±0. 24) mm 的前囊, 平均悬韧带长约 6. 86 mm; 悬韧带比正常长

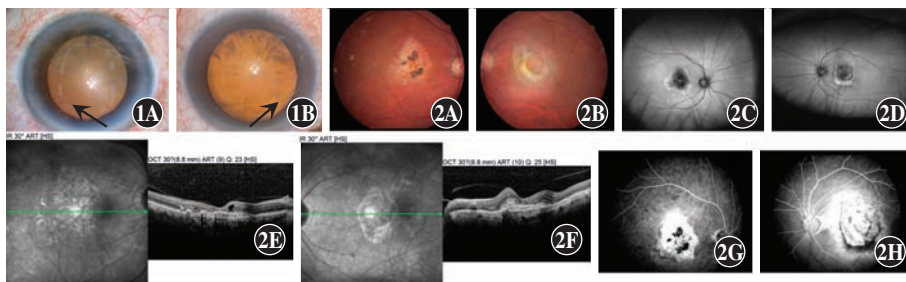


图 1 患者眼前节照相 双眼充分扩瞳后可见大量放射状纤维 (箭头) 从晶状体前囊周围向中央延伸 A: 右眼 B: 左眼 图 2 患者眼底多模式影像 眼底照相示双眼黄斑对称性环形萎缩灶伴色素沉着; 自发荧光显示双眼以黄斑为中心周围约 1.5 PD 范围内为低自发荧光, 外周环绕着粗条带状的高自发荧光; OCT 示黄斑中心凹周围约 2 PD 范围内视网膜色素上皮下弥漫大量高密度沉积物, 视网膜外层结构变性紊乱; 荧光素眼底血管造影示黄斑周围高背景荧光, 未见明显荧光素渗漏点 A、C、E、G: 右眼 B、D、F、H: 左眼