

# 紫外线照射后人晶状体上皮细胞的 iTRAQ 定量蛋白质组学研究

陈晓娟, 张国伟, 李鹏飞, 康丽华, 管怀进

引用: 陈晓娟, 张国伟, 李鹏飞, 等. 紫外线照射后人晶状体上皮细胞的 iTRAQ 定量蛋白质组学研究. 国际眼科杂志 2023; 23(4):551-556

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81974129, 82171038, 82101101)

作者单位: (226001) 中国江苏省南通市, 南通大学附属医院眼科研究所

作者简介: 陈晓娟, 硕士, 住院医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 管怀进, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障. guanhjeye@163.com

收稿日期: 2022-04-18 修回日期: 2023-03-07

## 摘要

**目的:** 探索氧化损伤状态下人晶状体上皮细胞 (SRA01/04) 的蛋白表达变化, 以期为年龄相关性白内障 (ARC) 发病机制的研究提供新的蛋白靶点。

**方法:** 将 SRA01/04 细胞分为实验组和对照组, 实验组即细胞通过紫外线 (UVB) 照射以构建细胞氧化损伤模型, 照射时长为 10min; 对照组即细胞未经任何处理。应用同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术对这两组细胞进行蛋白组测序, 以差异倍数 > 1.2 且  $p < 0.05$  的标准筛选差异表达蛋白 (DEPs), 并通过基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 数据库分别对上调和下调显著性前 50 的 DEPs 进行功能富集分析, 利用 Pathway commons 构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络。

**结果:** 本研究共筛选出 552 个 DEPs。相比于对照组, 实验组中上调的 DEPs 有 176 个, 包括 HMGB1、USP1 等, 下调的 DEPs 有 376 个, 包括 POLR2A、POLR2B 等。GO 和 KEGG 富集分析显示上调和下调显著性前 50 的 DEPs 参与了多种重要的生物学过程和信号通路。PPI 网络提示氧化损伤修复 (ODR) 相关蛋白在 UVB 诱导的氧化损伤中可能起关键作用。

**结论:** UVB 照射 SRA01/04 细胞可致多种蛋白, 尤其是 ODR 相关蛋白的表达发生改变, 这些研究结果为深入探索 ARC 发病机制以及研究与治疗靶点相关的蛋白质或通路提供了细胞层面的参考。

**关键词:** 年龄相关性白内障; 蛋白质组学; 紫外线照射; 氧化损伤修复; 人晶状体上皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.4.04

## Isobaric tags for relative and absolute quantitation quantitative proteomics research of human lens epithelial cells after ultraviolet-B irradiation

Xiao-Juan Chen, Guo-Wei Zhang, Peng-Fei Li, Li-Hua Kang, Huai-Jin Guan

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81974129, 82171038, 82101101)

Eye Institute, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Huai - Jin Guan. Eye Institute, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. guanhjeye@163.com

Received:2022-04-18 Accepted:2023-03-07

## Abstract

• **AIM:** To investigate the changes of protein expressions in human lens epithelial cells (SRA01/04) undergoing oxidative damage, hoping to provide new protein target for the pathogenesis of age-related cataract (ARC).

• **METHODS:** SRA01/04 cells were divided into experimental group and control group. In the experimental group, cells were irradiated with ultraviolet-B (UVB) for 10min to establish the model of oxidative damage, whereas cells in the control group were untreated. Protein expression profile from the two groups was sequenced by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). The filtering criteria that fold change > 1.2 and  $p < 0.05$  was used to determine the differentially expressed proteins (DEPs). Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database were utilized for functional enrichment analysis of the top 50 DEPs with either up-regulated or down-regulated significance. Furthermore, Pathway commons software was used to establish the protein-protein interaction (PPI) network.

• **RESULTS:** Overall, 552 DEPs were screened out. A total of 176 DEPs were up-regulated in the experimental group compared with the control group, including HMGB1 and USP1, while 376 DEPs were down-regulated, including POLR2A and POLR2B. GO and KEGG enrichment analysis indicated that the top 50 DEPs with up-regulated or down-regulated significance were involved in various crucial biological processes and signaling pathways. PPI network revealed that oxidative damage repair (ODR)-related proteins might play a key role in UVB-induced oxidative damage.

• **CONCLUSIONS:** The expressions of multiple proteins, especially ODR-related proteins, can be altered in SRA01/04 cells via UVB irradiation. These findings may provide cellular-related insights into the pathogenesis of ARC and into proteins or pathways associated with therapeutic targets.

• **KEYWORDS:** age-related cataract; proteomics; ultraviolet-B irradiation; oxidative damage repair; human lens epithelial cells

**Citation:** Chen XJ, Zhang GW, Li PF, et al. Isobaric tags for relative and absolute quantitation quantitative proteomics research of human lens epithelial cells after ultraviolet-B irradiation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(4):551-556

## 0 引言

年龄相关性白内障(age-related cataract, ARC)是晶状体失去透明性而发生混浊的疾病,现已成为全球造成视力障碍乃至失明的重要因素。手术摘除混浊晶状体联合植入人工晶状体仍是目前最有效的治疗方式,但手术始终是一种有创性的手段,可引起后发性白内障、黄斑囊样水肿、术后眼内炎等系列并发症<sup>[1]</sup>。因此,眼科医生也在不断探索能够从源头预防白内障发生或延缓其进展的新方法。氧化损伤是目前较为公认的 ARC 发病机制,尤其是 DNA 氧化损伤。本课题组前期已证实,氧化损伤修复(oxidative damage repair, ODR)相关基因的异常表达与 ARC 的发生发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。因此,及时有效地修复 ODR 相关基因对保持晶状体透明度至关重要。既往研究发现紫外线(ultraviolet-B, UVB)照射可能是造成晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)氧化损伤进而导致 ARC 形成的重要环境因素之一<sup>[3-5]</sup>。然而,UVB 在调控 ARC 发生发展过程中的具体分子机制仍未明确。近年来,随着蛋白质组学技术的发展,更多研究趋向于借助高通量测序对不同类型白内障发生发展的分子机制进行分析<sup>[6-8]</sup>。

本研究利用 UVB 照射人晶状体上皮细胞株(SRA01/04)构建氧化损伤模型模拟 ARC,采用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术联合液相色谱-串联质谱技术定量分析氧化损伤过程中 LECs 内蛋白质,特别是 ODR 相关蛋白的表达量变化情况,同时利用生物信息学方法对测序结果进行深入分析,以期揭示 ODR 相关蛋白在 ARC 发生发展中的重要作用,从而为发现防治 ARC 的潜在蛋白靶点提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验细胞来源 人晶状体上皮细胞系(SRA01/04)购自日本理化学研究所。

1.1.2 主要试剂及仪器 4.5g/L DMEM 基础培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素(美国 Gibco 公司);胎牛血清(阿根廷 Natocor 公司);Hanks 平衡盐溶液(上海碧云天生物技术有限公司)。CO<sub>2</sub>细胞培养箱、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 ThermoFisher Scientific 公司);手提式紫外灯(中国精科公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 SRA01/04 细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清、100U/mL(商品单位)青霉素及 100μg/mL 链霉素的完全培养基中,置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。待细胞长至 90%融合时,以 1:2 比例传代,每 2d 更换 1 次培养基。选用第 3 代细胞进行实验。按是否用 UVB 照射将细胞分为实验组和对照组,每组均进行 3 次生物学重复。

1.2.2 紫外线照射方法 紫外灯光谱范围 275~400nm,峰值为 310nm,将细胞置于紫外灯下 5cm 处,强度为 0.09mW/cm<sup>2</sup>,照射时间为 10min<sup>[9]</sup>。照射前去除培养基,加入 Hanks 平衡盐溶液,照射时打开培养皿盖。照射结束后,弃 Hanks 液,加入完全培养基,置于细胞培养箱中继续培育 24h,以备后续实验。

1.2.3 蛋白质提取和酶解 各样品采用 SDT[4%(w/v) SDS, 100mmol/L Tris/HCl pH 7.6, 0.1mol/L DTT]裂解法提

取蛋白质,用 BCA 法测量蛋白质浓度,随后采用滤纸收集样品法进行蛋白质酶解。每份样品取 30μL 蛋白质溶液,加入 DTT 至终浓度为 100mmol/L,沸水浴 5min,冷却至室温。加入 200μL UA buffer 混匀,离心后弃滤液,重复该步骤 1 次。加入 100μL IAA buffer,振荡 1min,室温避光反应 30min,随后离心 15min。加入 100μL UA buffer 离心 15min,重复该步骤 2 次。加入 100μL 10 倍稀释的 Dissolution buffer,离心 15min,重复该步骤 2 次。加入 40μL Trypsin buffer,振荡 1min,37℃放置 16~18h。换新收集管,离心 15min;再加入 40μL 上述 Dissolution buffer,离心 15min,收集滤液。

1.2.4 强阳离子交换色谱分级 各样品取 100μg 肽段,按照 AB SCIEX 公司 iTRAQ 标记试剂盒说明书<sup>[10]</sup>进行标记。随后,将每组标记后的肽段混合,采用 AKTA Purifier 100 进行分级。缓冲液 A 液为 10mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25% CAN, pH 3.0, B 液为 10mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500mmol/L KCl, 25% ACN, pH 3.0。色谱柱以 A 液平衡,样品由进样器上样到色谱柱进行分离,流速为 1mL/min。液相梯度如下:0~22min, B 液线性梯度为 0%~8%;22~47min, B 液线性梯度为 8%~52%;47~50min, B 液线性梯度为 52%~100%;50~58min, B 液维持在 100%;58min 以后, B 液重置为 0%。洗脱过程中监测 214nm 的吸光度值,每隔 1min 收集洗脱组分,分别冻干后采用 C<sub>18</sub> Cartridge 脱盐。

1.2.5 LC-MS/MS 数据采集 每份分级样品采用纳升流速的 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离。缓冲液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)。色谱柱以 95% 的 A 液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, 100μm×2cm, nanoViper C18),经过分析柱(Thermo Scientific EASY column, 10cm, ID 75μm, 3μm, C18-A2)分离,流速为 300nL/min。样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。检测方式为正离子,母离子扫描范围为 300~1 800m/z。

1.2.6 生物信息学分析 基于两组样本间的蛋白质表达差异倍数(fold change, FC)和 *t* 检验得到的 *p* 值两个因素绘制火山图,按 FC>1.2 倍(上调>1.2 倍或下调<0.83 倍)且 *p*<0.05 的标准筛选差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)。基因本体论(gene ontology, GO)及京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析分别对 DEPs 进行 GO 注释(<http://geneontology.org/>)和 KEGG 注释(<http://www.kegg.jp/>),然后进行富集性分析。首先将 DEPs 向 GO 及 KEGG 数据库的各个生物过程或通路映射,统计每个生物过程或通路中的蛋白数,然后用超几何分布检验,以全蛋白质组的 GO 或 KEGG 注释情况为背景,得到 DEPs 显著富集的 GO 生物过程和 KEGG 通路,选取排名前 20 的生物过程和通路。通过 Pathway commons 数据库(<http://www.pathwaycommons.org/>)查找 DEPs 之间的蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

## 2 结果

2.1 构建晶状体上皮细胞氧化损伤模型 对照组 SRA01/04 细胞未经任何处理,包膜完整,呈长梭形,贴壁生长;实验组 SRA01/04 细胞经 UVB 照射 10min 后,细胞体积缩小,呈圆形改变,见图 1。

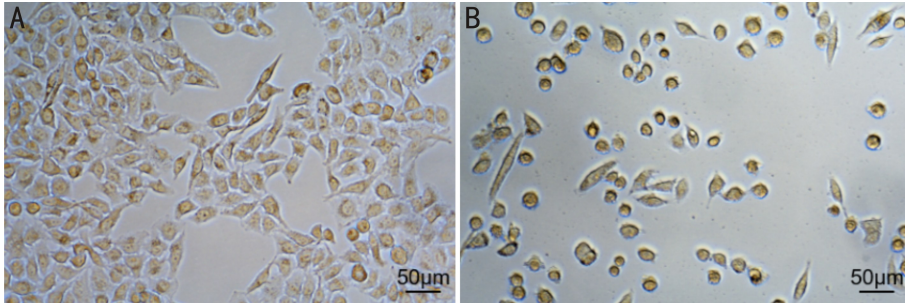


图1 UVB照射前后晶状体上皮细胞的形态学改变 A:对照组;B:实验组。

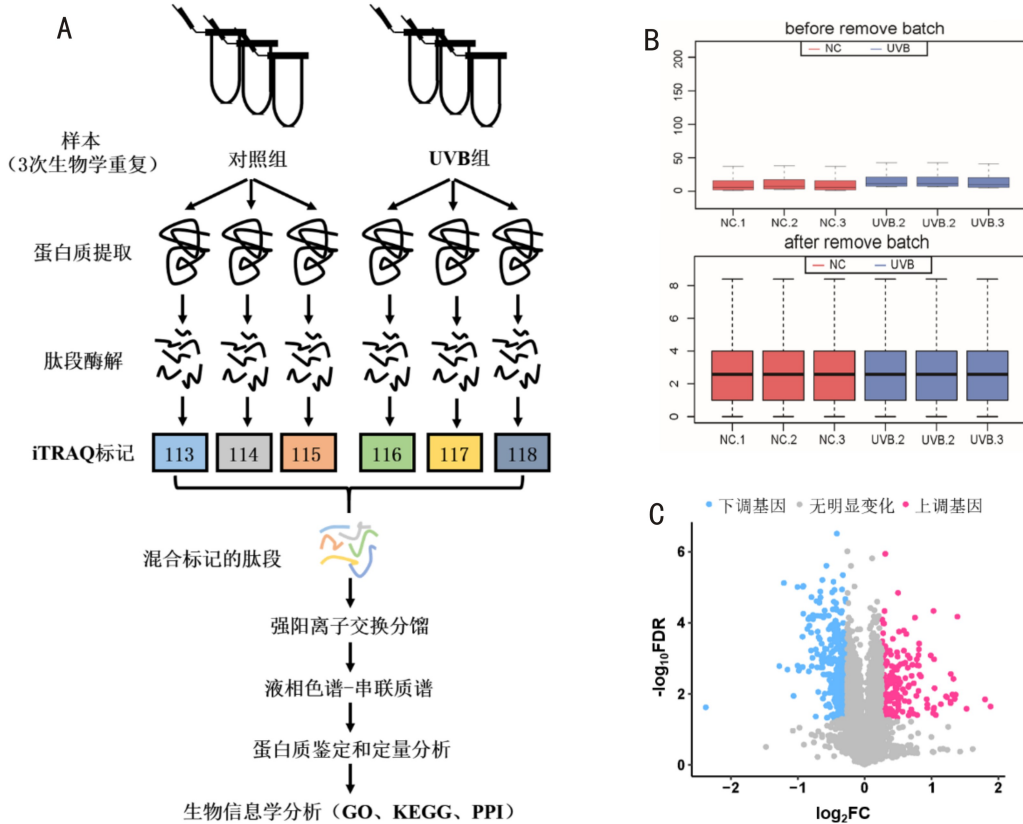


图2 蛋白质差异表达情况 A:本研究实验流程图;B:数据归一化前后的箱线图;C:可定量蛋白表达情况。UVB组/UVB:实验组;NC:对照组;FDR:统计学可信度;FC:倍数变化。

**2.2 DEPs 的筛选** 本研究实验流程图见图 2A,经蛋白质提取、肽段酶解、iTRAQ 标记及质谱分析等一系列步骤后共鉴定出 6567 个蛋白质。随后,经内部校正和归一化后,两组数据集的批量效应被消除(图 2B)。火山图显示,与对照组相比,实验组中上调的 DEPs 有 176 个,包括 HMGB1、USP1 等与线粒体自噬、蛋白质泛素化修饰相关的蛋白;下调的 DEPs 有 376 个,包括 POLR2A、POLR2B 等 ODR 相关蛋白(图 2C)。

**2.3 DEPs 的 GO 和 KEGG 功能富集分析** 本研究利用网络工具 DAVID 分别对上调和下调显著性前 50 的 DEPs 进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。目前针对 GO 的富集分析主要从生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cellular component, CC)3 个方面进行显著性分析,其中 BP 最为关键,故在本研究中仅列举了 BP 层面排名前 20 的词条,上调显著性前 50 的 DEPs 主要富集于免疫反应、细胞代谢过程的负调控、免疫反应的调控、炎症反应及组织迁移等(图 3A);而下调显著性前 50 的 DEPs 主要富集于 RNA 加工、细胞周

期、核糖体生物合成、rRNA 加工及细胞周期的调控等(图 3B)。KEGG 信号通路富集分析发现,上调显著性前 50 的 DEPs 主要富集于补体与凝血级联通路、凋亡及线粒体自噬等(图 4A),而下调显著性前 50 的 DEPs 主要富集于真核生物中的核糖体生物合成和 PI3K-Akt 信号通路(图 4B)。

**2.4 PPI 网络的构建** 本研究采用 Pathway commons 软件构建 DEPs 的 PPI 网络可视化图(图 5A,节点越大,即 betweenness 越大,说明该节点在其他节点之间的调节能力越强,提示该蛋白越重要)。进一步展示 PPI 网络属性(图 5B),其中 ODR 相关蛋白占 21.6%,佐证了 ODR 相关蛋白的重要性。上调和下调显著性前 50 的 DEPs 中与 ODR 相关的蛋白质见表 1。为了分析 ODR 相关蛋白与其他 DEPs 之间的相互作用强度,本研究分别计算了 1000 个随机网络相互作用值(图 5C 曲线)和实际网络相互作用值(图 5C 黑线),结果显示,实际网络相互作用值明显高于随机网络,且  $p < 0.05$  说明 ODR 相关蛋白与其他 DEPs 之间的相互作用较为紧密,提示 ODR 相关蛋白可能在 UVB 诱导的氧化损伤中发挥至关重要的作用。

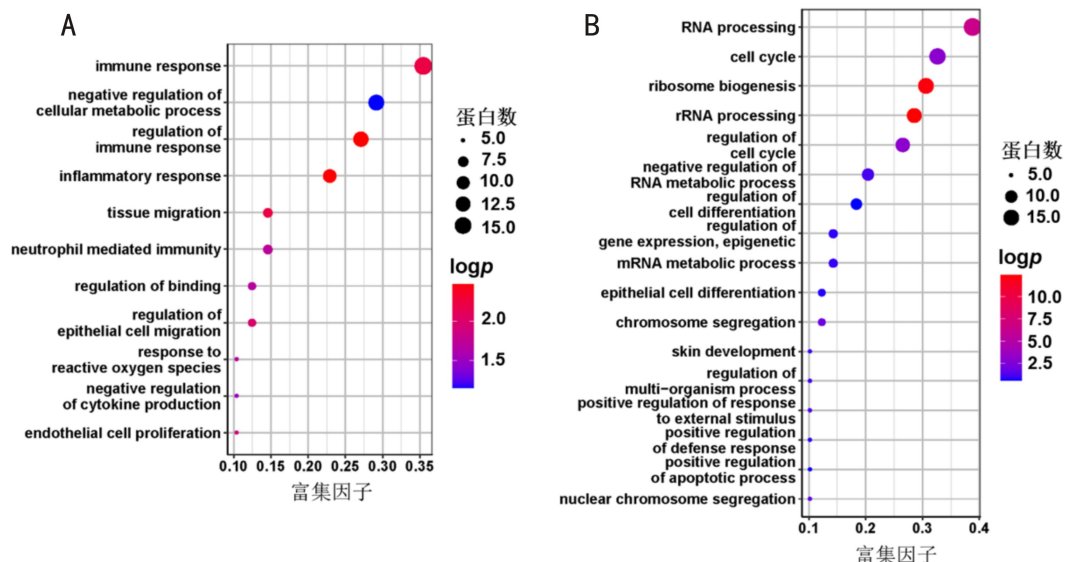


图3 DEPs的GO富集分析 A:上调显著性前50的DEPs的GO富集分析;B:下调显著性前50的DEPs的GO富集分析。

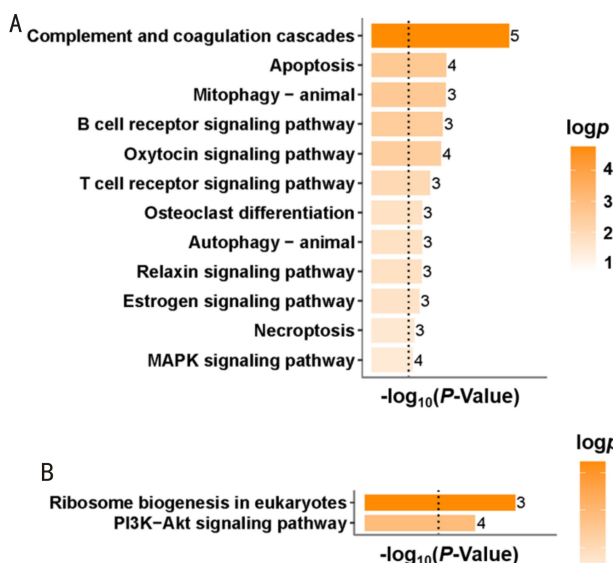


图4 DEPs的KEGG信号通路富集分析 A:上调显著性前50的DEPs的KEGG信号通路富集分析;B:下调显著性前50的DEPs的KEGG信号通路富集分析。

表1 前50位显著上下调的DEPs中与氧化损伤相关的蛋白列表

蛋白代码	基因名称	蛋白名称	<i>p</i>	倍数变化
P05412	<i>JUN</i>	Transcription factor AP-1	2.617535	$6.820 \times 10^{-5}$
P01100	<i>FOS</i>	Proto-oncogene c-Fos	2.042590	$4.711 \times 10^{-5}$
P29317	<i>EPHA2</i>	Ephrin type-A receptor 2	1.563899	$8.340 \times 10^{-4}$
P02649	<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	1.524120	$1.356 \times 10^{-3}$
P62745	<i>RHOB</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1.339117	$2.870 \times 10^{-4}$
P09429	<i>HMGB1</i>	High mobility group protein B1	1.241517	$7.300 \times 10^{-4}$
O94782	<i>USP1</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	1.220953	$8.530 \times 10^{-4}$
P10599	<i>TXN</i>	Thioredoxin	1.214942	$1.050 \times 10^{-4}$
P60709	<i>ACTB</i>	Actin, cytoplasmic 1	1.201767	$3.350 \times 10^{-4}$
P11388	<i>TOP2A</i>	DNA topoisomerase 2-alpha	0.789595	$4.730 \times 10^{-5}$
Q9H967	<i>WDR76</i>	WD repeat-containing protein 76	0.773866	$5.050 \times 10^{-5}$
P08581	<i>MET</i>	Hepatocyte growth factor receptor	0.721716	$1.480 \times 10^{-4}$
P30876	<i>POLR2B</i>	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	0.689090	$6.400 \times 10^{-5}$
Q9UFF9	<i>CNOT8</i>	CCR4-NOT transcription complex subunit 8	0.613312	$6.440 \times 10^{-5}$
Q9H3M7	<i>TXNIP</i>	Thioredoxin-interacting protein	0.608387	$2.490 \times 10^{-5}$
Q9UNS1	<i>TIMELESS</i>	Protein timeless homolog	0.586277	$6.090 \times 10^{-5}$
Q9H8V3	<i>ECT2</i>	Protein ECT2	0.576815	$1.920 \times 10^{-5}$
P24928	<i>POLR2A</i>	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	0.565439	$7.150 \times 10^{-5}$

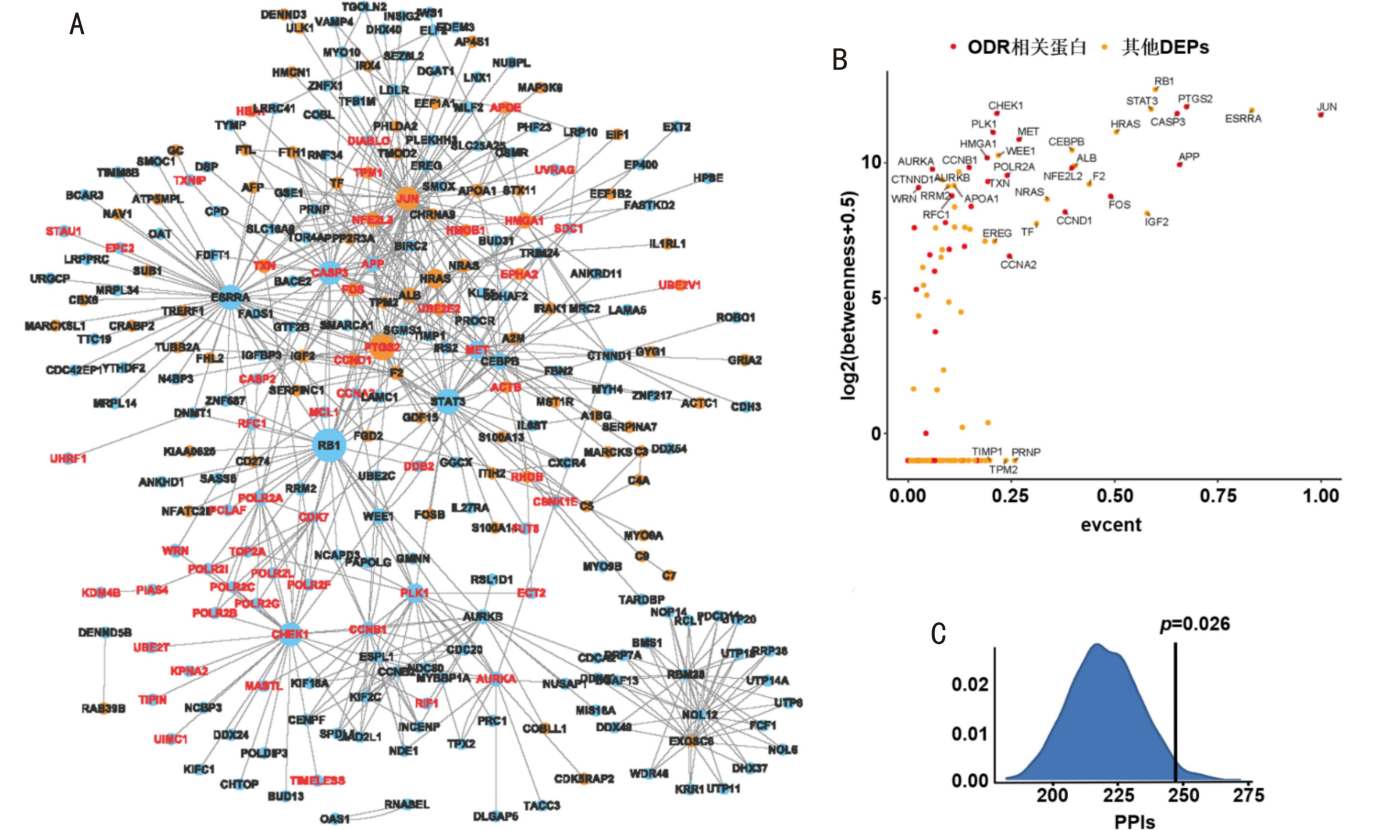


图 5 PPI 网络的构建 A:DEPs 的 PPI 网络图,红色字体表示与 ODR 相关的 DEPs,黑色字体表示其他 DEPs,黄色节点表示蛋白表达上调,蓝色节点表示蛋白表达下调,节点的大小表示 betweenness 大小,即该节点在其他节点之间的调控能力,节点越大提示该蛋白越重要;B:PPI 网络属性图,图中标注的是网络属性值大于 90%分位数的蛋白,betweenness 表示中介中心性,evcent 表示特征向量中心度;C:ODR 相关蛋白与其他 DEPs 之间的相互作用强度,横坐标表示 PPI 数量,纵坐标表示 1000 个随机网络相互作用值的密度。

### 3 讨论

氧化损伤与 ARC 在内的多种退行性疾病的病因密切相关<sup>[11]</sup>。越来越多的研究表明 UVB 照射是造成 LECs 氧化损伤的最主要环境因素之一<sup>[12-13]</sup>。UVB 照射可致 LECs 中活性氧含量显著增加,继而引起细胞内 DNA 氧化损伤和蛋白质的氧化修饰等系列改变<sup>[9,14]</sup>。晶状体是人体内蛋白质含量最高的组织,由 90%的结构性蛋白和 10%的功能性蛋白构成。研究发现,ODR 相关蛋白、热休克蛋白以及一些酶类,如去泛素化酶等功能性蛋白表达量的改变可能参与 ARC 的发生发展<sup>[15-17]</sup>。由此可见,功能性蛋白虽然含量甚微,但其改变可能是引起 ARC 的始动因素,不容忽视。因此,为探索 ARC 发生发展的具体分子机制,本研究通过 iTRAQ 技术对比 UVB 照射前后 LECs 中蛋白质表达量的变化情况,尤其是 ODR 相关蛋白的表达量,利用生物信息学深入分析测序结果,旨在挖掘防治 ARC 的潜在蛋白靶点。

本研究结果显示,与对照组相比,实验组的蛋白质表达水平以下调趋势为主,即表达水平降低的蛋白质数量明显多于表达水平升高的蛋白质。研究发现,多种参与调控细胞周期的蛋白质,如衰老标记蛋白 30 (senescence marker protein 30, SMP30)<sup>[18]</sup>、谷氧还蛋白 1 (glutaredoxin 1, Grx1)<sup>[19]</sup> 等的表达量均在白内障模型中减少。本研究中,GO 分析提示下调显著性前 50 的 DEPs 主要参与 RNA 加工、细胞周期、核糖体生物合成等过程,这些结果将有助于挖掘更多潜在的参与调控 LECs 细胞周期的蛋白质,为从源头干预引起 LECs 细胞周期停滞的因素奠定基础。此

外,KEGG 分析提示下调显著性前 50 的 DEPs 主要富集于真核生物中的核糖体生物合成和 PI3K-Akt 信号通路。PI3K-Akt 信号通路作为一种典型的抗氧化、抗凋亡通路可在 ARC 形成早期被激活,其失活会减弱 LECs 增殖和迁移的能力<sup>[20]</sup>。本研究中,PI3K-Akt 信号通路的几个关键蛋白(LAMA5、MET 等)在 UVB 诱导的氧化损伤过程中表达量降低。然而,目前尚无 LAMA5、MET 和其他关键蛋白在 ARC 研究领域中的相关报道,因此研究这些蛋白在 ARC 病理过程中发生的功能变化及具体调控机制具有重要意义。

本研究发现的上调蛋白中 HMGB1 是存在于真核细胞内的一种非组蛋白染色体结合蛋白,其表达量增加与多种疾病(包括肿瘤、心血管疾病、白内障)密切相关<sup>[21-23]</sup>。Kang 等<sup>[24]</sup> 研究发现,  $H_2O_2$  介导的氧化损伤可促进癌细胞和成纤维细胞内 HMGB1 蛋白的表达和细胞外释放。在  $H_2O_2$  诱导的白内障氧化损伤模型中, HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达量均增加<sup>[22]</sup>,这与本研究测序结果一致。本研究发现的另一上调的蛋白 USP1 属于一种去泛素化酶,是维持蛋白质稳定性的关键调控因子之一,通常与 USP1 相关因子 1 (USP1-associated factor 1, UAF1) 形成复合物,参与靶向调控同源重组修复通路、Fanconi 通路等多种氧化损伤修复通路<sup>[25]</sup>。研究发现, USP1 蛋白表达量增加可提示肝癌时疾病预后较差<sup>[26]</sup>。本研究中, USP1 蛋白的表达水平经 UVB 诱导的氧化损伤后也升高,其表达上调对 LECs 凋亡和自噬等细胞过程会产生何种影响仍有待后续实验验证。

本研究构建 PPI 网络图显示,在 DEPs 中存在多个 ODR 相关蛋白。基于课题组长期致力于 ODR 相关基因表观遗传学变化的研究发现,OGG1、WRN、ERCC6 等基因的表观遗传学改变(如 DNA 甲基化)与 ARC 的发生发展密切相关<sup>[2-3,27]</sup>。而本研究则将焦点由基因转录调控机制转移至蛋白质表达变化层面,以探索介导 ARC 进展的潜在蛋白靶点。POLR2A 和 POLR2B 是晶状体内核苷酸切除修复通路上的关键分子,其蛋白表达水平在 UVB 照射后均显著下降。既往研究通过对 ARC 患者及对照者晶状体前囊膜标本进行微阵列分析,发现两者的 mRNA 表达水平并无明显改变<sup>[28]</sup>。那么,引起这两种蛋白质减少的具体机制是什么以及这两种蛋白质的缺失是否会影响 ARC 的进展,这些问题还需进一步探讨。值得注意的是,本研究仅限于细胞层面,POLR2A、POLR2B 等蛋白质的表达变化情况还需在人体标本中进行验证。

综上所述,本研究采用 iTRAQ 技术联合液相色谱-串联质谱技术检测了 UVB 诱导的细胞氧化损伤模型中的蛋白质表达谱,弥补了既往蛋白质组学技术的缺陷,极大地提高了晶状体内低丰度蛋白,尤其是 ODR 相关蛋白的检出率。通过生物信息学分析证实 ODR 相关蛋白在 ARC 发生发展过程中的重要作用。这些研究结果有助于我们在后续的实验深入探索 ARC 的确切分子机制,为 ARC 的防治提供新思路。

#### 参考文献

- 1 Chen X, Zhou DY, Shen J, et al. Prevalence and risk factors on age-related cataract and surgery in adults over 50 years old in Binhu District, Wuxi, China. *Int J Ophthalmol* 2020; 13(3): 445-451
- 2 Wang Y, Li F, Zhang GW, et al. Altered DNA methylation and expression profiles of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in lens tissue from age-related cataract patients. *Curr Eye Res* 2015; 40(8): 815-821
- 3 Wang Y, Li F, Zhang GW, et al. Ultraviolet-B induces ERCC6 repression in lens epithelium cells of age-related nuclear cataract through coordinated DNA hypermethylation and histone deacetylation. *Clin Epigenetics* 2016; 8: 62
- 4 Cheng TY, Xu MD, Qin B, et al. lncRNA H19 contributes to oxidative damage repair in the early age-related cataract by regulating miR-29a/TDG axis. *J Cell Mol Med* 2019; 23(9): 6131-6139
- 5 Xiang J, Chen Q, Kang LH, et al. LncRNA PLCD3-OT1 functions as a CeRNA to prevent age-related cataract by sponging miR-224-5p and regulating PLCD3 expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(14): 4670-4680
- 6 周海燕, 严宏, 严唯佳, 等. 基于 iTRAQ 的不同眼轴长度核性白内障患者晶状体差异表达蛋白分析. *中华实验眼科杂志* 2019; 37(12): 956-961
- 7 Zhou HY, Yan H, Yan WJ, et al. Quantitative proteomics analysis with iTRAQ in human lenses with nuclear cataracts of different axial lengths. *Mol Vis* 2016; 22: 933-943
- 8 Zhou HY, Yan H, Wang LL, et al. Quantitative proteomics analysis by iTRAQ in human nuclear cataracts of different ages and normal lens nuclei. *Proteom Clin Appl* 2015; 9(7-8): 776-786
- 9 Xiang J, Kang LH, Gao HB, et al. BLM can regulate cataract progression by influencing cell vitality and apoptosis. *Exp Eye Res* 2019; 178: 99-107
- 10 Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteom* 2004; 3(12): 1154-1169

- 11 Luo J, Mills K, le Cessie S, et al. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? *Ageing Res Rev* 2020; 57: 100982
- 12 Mi Y, Wei CQ, Sun LY, et al. Melatonin inhibits ferroptosis and delays age-related cataract by regulating SIRT6/p-Nrf2/GPX4 and SIRT6/NCOA4/FTH1 pathways. *Biomed Pharmacother* 2023; 157: 114048
- 13 Guo Y, Guo CJ, Zhang J, et al. The protective mechanism of Grx2 in ultraviolet-B (UVB)-induced cataract formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 613: 107-112
- 14 Chen XJ, Zhang GW, Li PF, et al. SYVN1-mediated ubiquitination and degradation of MSH3 promotes the apoptosis of lens epithelial cells. *FEBS J* 2022; 289(18): 5682-5696
- 15 Xu BW, Kang LH, Zhang GW, et al. The changes of 8-OHdG, HOGG1, APE1 and Pol  $\beta$  in lenses of patients with age-related cataract. *Curr Eye Res* 2015; 40(4): 378-385
- 16 Cui XK, Du CX, Wan SM, et al. Deficiency of heat shock factor 4 promotes lens epithelial cell senescence through upregulating p21<sup>cip1</sup> expression. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis* 2021; 1867(11): 166233
- 17 Rudolph T, Sjölander A, Palmér MS, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) S18Y polymorphism in patients with cataracts. *Ophthalmic Genet* 2011; 32(2): 75-79
- 18 Chen X, Li SM, Li YW, et al. Effect of senescence marker protein 30 on the proliferation and apoptosis of human lens epithelial cells SRA01/04. *Int J Ophthalmol* 2018; 11(4): 553-558
- 19 Fan Q, Li D, Zhao ZN, et al. Protective effect of Glutaredoxin 1 against oxidative stress in lens epithelial cells of age-related nuclear cataracts. *Mol Vis* 2022; 28: 70-82
- 20 Cui GF, Wang LD, Huang WJ. Circular RNA HIPK3 regulates human lens epithelial cell dysfunction by targeting the miR-221-3p/PI3K/AKT pathway in age-related cataract. *Exp Eye Res* 2020; 198: 108128
- 21 Zhang JL, Zheng HF, Li K, et al. miR-495-3p depresses cell proliferation and migration by downregulating HMGB1 in colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 2022; 20(1): 101
- 22 Xu D, Zhu HY, Fu QD, et al. Ketamine delays progression of oxidative and damaged cataract through regulating HMGB-1/NF- $\kappa$ B in lens epithelial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2018; 40(4): 303-308
- 23 Syukri A, Hatta M, Amir M, et al. Doxorubicin induced immune abnormalities and inflammatory responses via HMGB1, HIF $_1$ - $\alpha$  and VEGF pathway in progressive of cardiovascular damage. *Ann Med Surg* 2022; 76: 103501
- 24 Kang R, Livesey KM, Zeh HJ 3rd, et al. HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. *Autophagy* 2011; 7(8): 904-906
- 25 Zang WC, Yang CZ, Li TT, et al. Cellular redox sensor HSCARG negatively regulates the translesion synthesis pathway and exacerbates mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(51): 25624-25633
- 26 Liao YN, Shao ZL, Liu Y, et al. USP1-dependent RPS16 protein stability drives growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40(1): 201
- 27 Zhu X, Zhang GW, Kang LH, et al. Epigenetic regulation of Werner syndrome gene in age-related cataract. *J Ophthalmol* 2015; 2015: 579695
- 28 Li F, Wang Y, Zhang GW, et al. Expression and methylation of DNA repair genes in lens epithelium cells of age-related cataract. *Mutat Res* 2014; 766-767: 31-36