

单细胞转录组测序技术在糖尿病视网膜病变中细胞机制的研究现状和进展

应嘉宁^{1,2}, 张艳艳², 易全勇²

引用: 应嘉宁, 张艳艳, 易全勇. 单细胞转录组测序技术在糖尿病视网膜病变中细胞机制的研究现状和进展. 国际眼科杂志, 2024, 24(8): 1266-1269.

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (No. LGF22H120013); 宁波市医学科技计划项目 (No. 2021Y57)

作者单位: ¹(315211) 中国浙江省宁波市, 宁波大学医学部; ²(315040) 中国浙江省宁波市眼科医院

作者简介: 应嘉宁, 女, 在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 易全勇, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. quanyong_yi@163.com

收稿日期: 2023-08-18 修回日期: 2024-06-20

摘要

糖尿病视网膜病变 (DR) 是糖尿病常见的视网膜并发症, 全身危险因素、炎症反应、氧化应激反应均参与了 DR 的发生与发展, 是工作年龄人群首要的致盲性眼病。传统的测序方式解释了 DR 的病理机制, 为临床的诊断及治疗提供了重要参考, 但仍具有局限性。近年来兴起的单细胞转录组测序技术 (scRNA-seq) 在单个细胞水平对 mRNA 进行转录组分析, 可精准识别视网膜疾病中新的细胞亚型, 鉴别罕见细胞, 揭示细胞的异质性, 有助于阐明视网膜疾病的发生发展轨迹, 深入探索与疾病有关的基因调控关系, 为今后精准医疗提供指导。文章就单细胞测序技术以及在 DR 研究中的应用进行综述, 探讨不同类型细胞在与 DR 相关的作用机制, 以期更好的将 scRNA-seq 应用于 DR 的研究中, 寻找潜在的治疗靶点从而助力 DR 相关研究的临床转化。

关键词: 单细胞转录组测序; 糖尿病视网膜病变; 细胞机制; 异质性

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.8.16

Current status and progress of single cell RNA sequencing in the cellular mechanisms of diabetic retinopathy

Ying Jianing^{1,2}, Zhang Yanyan², Yi Quanyong²

Foundation items: Zhejiang Provincial Basic Public Welfare Research Program (No. LGF22H120013); Ningbo Medical Science and Technology Program (No. 2021Y57)

¹Health Science Center, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China; ²Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Yi Quanyong. Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China. quanyong_yi@163.com

Received: 2023-08-18 Accepted: 2024-06-20

Abstract

• Diabetic retinopathy (DR) is one of the most common retinal complications of diabetes could cause irreversible loss of central vision in the working-age population. Current studies showed that systemic risk factors, inflammatory response, and oxidative stress played a central role in the development of DR. Although traditional sequencing methods have provided valuable insights into the pathogenesis of DR, offering crucial guidance for clinical diagnosis and treatment, they still possess certain limitations. In recent years, the emerging single-cell RNA sequencing technology (scRNA-seq) has enabled precise analysis of mRNA transcriptomes at the single-cell level. This technique accurately identifies novel cell subtypes in retinal diseases, detects rare cells, and reveals intercellular heterogeneity. It contributes to elucidating the pathogenesis and development of retinal diseases, and facilitates exploration of gene regulatory relationships associated with these disorders to provide valuable insights for future precision medicine. This article reviews the technology of single-cell sequencing and its application in DR research. It also explores the mechanisms of different types of cells associated with DR, aiming to enhance the utilization of scRNA-seq in DR research and identify potential therapeutic targets to improve clinical diagnosis and treatment of DR.

• **KEYWORDS:** single-cell RNA sequencing; diabetic retinopathy; cellular mechanism; heterogeneity

Citation: Ying JN, Zhang YY, Yi QY. Current status and progress of single cell RNA sequencing in the cellular mechanisms of diabetic retinopathy. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(8): 1266-1269.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者常见的视网膜微血管并发症, 也是导致工作年龄人群致盲的重要原因。根据流行病学调查显示, 我国约有 25% 的糖尿病患者同时患有 DR, 有研究报道 2 型糖尿病患者一旦被诊断为 DR, 每年约有 11% 的患者出现视力损害^[1]。随着人们生活水平的提高, DR 的防治已成为一个全球化的公共卫生挑战, 对该疾病病理生理学、发病机制

的研究一直是眼科学研究的重点方向。随着单细胞分离技术和高通量测序技术的不断发展,极大地推进了单细胞转录组测序技术(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)的进展。scRNA-seq 有助于研究者从单个细胞水平发现新的细胞亚型、揭示细胞的遗传结构和表达、阐明细胞生长发育的变化、分析细胞与细胞之间的异质性^[2]。目前 scRNA-seq 已被广泛应用于眼科领域,对视网膜及脉络膜疾病的研究日新月异,为深入探索 DR 的病理机制、疾病进展提供新思路^[3]。

1 scRNA-seq 的概述

与传统的大量样本测序不同,scRNA-seq 的流程通常包括单细胞分离与捕获、文库制备与测序、数据分析与可视化三个方面。

从样本中分离并捕获高质量的单细胞是 scRNA-seq 的第一步。传统的细胞分离方法包括梯度稀释法、显微操作法、荧光激活细胞分选法(fluorescent activated cell sorting, FACS)和激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)^[4]。随着高通量测序平台的创建,磁激活细胞分选技术(magnetic activated cell sorting, MACS)和微流体的细胞分选平台的应用极大地提高了单细胞分离的效率、规模和精度^[5-6]。

单细胞文库制备与测序是 scRNA-seq 的核心,单个哺乳动物细胞的 RNA 总量约为 10 pg,只有 1%-5%是转录组 RNA,与单细胞转录组文库构建的最低标准相距甚远^[7],因此研究者需要根据研究目的进行单细胞文库的制备。

第三步数据分析包括预处理和下游分析,预处理包括质量控制、批次效应校正和数据归一化^[8]。scRNA-seq 受细胞破碎、死亡或细胞混合污染的影响,产生部分低质量数据。质量控制(quality control, QC)是可将偏差的原始序列数据进行预处理,以减轻其对下游分析结果的影响^[9],帮助改善分批培养或捕获细胞时出现的误差^[10]。另外,数据归一化通常可以校正由捕获效率、测序深度、转录组缺失和其他技术因素引起的意外偏差,以便可以在样本内或样本间比较,对下游分析有着重要作用^[11]。下游数据分析包括细胞聚类、细胞轨迹分析、拟时序分析、差异基因表达、基因集合富集分析和基因调控网络推断等,可根据具体研究方向制定。作为一种新兴技术,scRNA-seq 在现已广泛应用于眼科学、肿瘤病学、胚胎发育等研究中。

2 scRNA-seq 在正常视网膜研究上的应用

scRNA-seq 是揭示视网膜复杂性的有力工具,对视网膜细胞深入探索帮助我们进一步了解疾病的本质。既往研究利用 Drop-seq 技术分析了 44 808 个小鼠的视网膜细胞,鉴定出 39 个细胞亚群,创建了视网膜细胞基因表达的分子图谱^[12]。同时研究者们利用 scRNA-seq 对小鼠视网膜上的无长突细胞^[13]、双极细胞^[14]、视网膜神经节细胞^[15]的细胞亚型、基因表达进行分析,将细胞的基因表达与其功能和形态学特征联系起来,对单个细胞及其亚型有进一步的认识。Lukowski 等^[16]汇编了人类视网膜单细胞转录组图谱,共确定了 18 个转录不同的细胞群,Voigt 等^[17]指出 scRNA-seq 研究有助于确定视网膜疾病中的基因表达改变。除此以外,scRNA-seq 还运用于鉴别角膜细胞类型并进行基因差异表达分析^[18],用于对眼外伤

修复的分子机制研究^[19],眼部肿瘤等疾病的生物靶点和标记物^[20],为疾病诊断、精准治疗和预后评估带来新思路。

3 scRNA-seq 在 DR 中不同类型细胞作用机制的研究

3.1 小胶质细胞

慢性炎症在 DR 的发展中起着重要作用,小胶质细胞(microglia, MG)作为中枢神经系统的主要免疫细胞,参与了 DR 的炎症反应,也参与血-视网膜屏障破坏、微血管病变及神经损伤过程。Boeck 构建了 DR 的小鼠模型,并利用 scRNA-seq 对健康小鼠以及模型小鼠的视网膜样本进行分析,结果显示 MG 是构成视网膜缺血和新血管形成的主要髓样细胞群,实验组小鼠视网膜中激活的 MG 还显示出特征基因 Tmem119 和 Hexb 的下调。另外在 MG 中与细胞分裂相关基因显著上调,同时与趋化因子信号通路相关的聚类因子,如 Ccl2、Ccl3、Ccl4、Ccl7、Nes 和 Cxcl14 均呈上调趋势,证明这些因子参与小胶质细胞的活化和迁移,导致缺血性新生血管眼病的发生^[21]。Lv 等^[22]进行了一项针对 DR 炎症反应的研究,发现激活的 MG 是促炎因子的主要来源,IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子表达得明显增多,能有效促进血管生成。Hu 等^[23]利用 DR 患者的视网膜纤维血管增殖膜(vitreous fibrovascular membranes, FVMs)鉴定出八种不同的细胞类型,其中 MG 作为主要的细胞群体可进一步四种亚型,根据功能分析显示 MG(1)亚型具有促纤维化以及成纤维化特性,且 MG(1)亚型的激活与 FVMs 的形成密切相关。此外,激活的 MG 还表达 SPP1 基因,SPP1 可作用于 FVMs 中的其他细胞类型,参与组织重塑和细胞基质交互应答过程。还有研究利用 scRNA-seq 揭示健康视网膜和糖尿病视网膜上每种细胞类型的主要调控基因,通过比较健康视网膜和糖尿病视网膜上可变的转录起始位点(transcription start site, TSS)的表达发现 Müller 细胞和 MG 中凋亡信号升高。鉴于 DR 中多种血管和神经细胞的持续凋亡,Müller 细胞和 MG 的凋亡信号可能被认为是 DR 的早期迹象^[24]。

多项研究均提示利用 scRNA-seq 对 MG 有了新的认识,进一步证实 MG 参与了 DR 的炎症反应,并与新生血管的形成、视网膜细胞的凋亡有密切联系。

3.2 Müller 细胞

Müller 细胞是视网膜上特异性的神经胶质细胞,为视网膜提供结构支持。在正常情况下,Müller 细胞通过分泌细胞因子来维持血-视网膜屏障的完整性,参与神经和血管的形成和调节。利用 scRNA-seq,学者分析了 DR 模型小鼠的视网膜细胞,验证了 Müller 细胞在血-视网膜屏障上的重要作用,并在细胞水平上将 Müller 细胞分为 Ctxn3+Müller 细胞和 Ctxn3-Müller 细胞两个亚群,Ctxn3+Müller 细胞特异性表达了许多与血-视网膜屏障清除代谢废物相关的基因,如水通道蛋白 AQP4 和 GABA 转运蛋白;同时也上调分化抑制因子 Id1-4 和转录因子 Hes1、Sox9 的表达,均提示 Ctxn3+Müller 细胞在促进内皮损伤和血管生成中发挥潜在作用^[25]。Becker 等^[26]采用 scRNA-seq 分析了 43 名 DR 遗体捐赠者的 80 份视网膜样本,发现视网膜神经节细胞的特异性基因在 DR 的进程中持续下调,这暗示着视网膜神经节细胞在 DR 中存在普遍的丢失,并指出 Müller 细胞与组氨酸和 β -丙氨酸的代谢有关。Zhang 等^[27]进一步验证了这一观点,DR 与

双极细胞、Müller细胞、视网膜色素上皮细胞和视锥细胞数量显著减少有关,同时也与周细胞、视杆细胞、间变性细胞和MG数量显著增加有关,且利用KEGG途径富集分析发现Müller细胞参与囊泡循环、IL-17信号传导、Toll样受体信号传导和溶酶体途径等炎症反应相关途径,与DR的进展密切相关。

2023年Niu等^[28]利用scRNA-seq将视网膜细胞分为17个转录簇,结果表明Müller细胞(簇6),以及所有视杆细胞、双极细胞、视锥细胞和血管内皮细胞,均与增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)密切相关且在疾病的进展中发挥巨大作用。另外基于全基因组关联研究的富集分析确定视网膜醛结合蛋白1(retinaldehyde-binding protein 1, RLBP1)是一种有研究前景的DR治疗靶点,糖尿病患者视网膜RLBP1表达降低,研究表明Müller细胞过表达RLBP1基因可减轻DR相关的神经血管变性。

上述研究均表明,利用scRNA-seq揭示Müller细胞能够特异性地上调或下降DR病情进展中的相关基因,对维持血-视网膜屏障的稳定具有重要意义,也进一步反映了疾病的病理变化,为临床诊疗提供新的治疗策略。

3.3 巨噬细胞 巨噬细胞主要来源于血液中的单核细胞,机体在受到炎症刺激时,单核细胞进入损伤部位活化为巨噬细胞,同时分泌大量炎症因子。巨噬细胞参与血管生成,是调节组织再生、修复和纤维化的关键细胞^[29]。Van Hove等^[30]研究表明DR小鼠视网膜上免疫细胞显著增加,收集到的219个免疫细胞可进一步分为单核细胞、巨噬细胞和小胶质三个细胞群,研究发现小胶质细胞、巨噬细胞、白细胞和淋巴细胞活化,以及单核细胞和白细胞分化均促进DR的进展。Meng等^[31]在基于scRNA-seq对DR的研究中发现,患者的视网膜纤维血管膜中T细胞、M1型巨噬细胞、M2型巨噬细胞的含量显著增多,结合差异表达和共表达的综合分析发现COL5A2, CALD1, COL6A3, CORO1C和CALU是PDR中M2型巨噬细胞相关的生物标志物。2022年Wen等^[32]利用scRNA-seq发现糖尿病小鼠视网膜中Kdm6a的表达增加,视网膜上小胶质细胞/巨噬细胞中的Kdm6a具有激活靶基因的作用,通过促进Lcn2的表达和糖酵解进程而加剧了DR。这些发现均表明,scRNA-seq揭示巨噬细胞在DR研究中起着重要作用,为了解疾病进展,基因表达以及靶向治疗DR提供新思路 and 依据。

3.4 内皮细胞 Boneva等^[33]收集患者玻璃体切割术后视网膜新生血管膜(retinal neovascular membranes, RNV)进行scRNA-seq,发现RNV主要是由于内皮细胞、巨噬细胞、肌成纤维细胞、以及大量分泌的细胞外基质蛋白和几种类型的胶原蛋白组成。其中内皮细胞还可细分为抗原呈递内皮细胞(antigen-presenting endothelial cells, APEC)、 α -平滑肌肌动蛋白阳性内皮细胞(α -smooth muscle actin positive endothelial cells, α -SMA⁺EC)、增殖内皮细胞(proliferating endothelial cells, prol. EC)。Sun等^[34]利用链脉佐菌素诱导模型小鼠的视网膜进行scRNA-seq研究将内皮细胞分成I、II、III三个不同的亚组,III亚组仅存在于DR中是糖尿病视网膜病变特异性内皮细胞(diabetic retina ECs, DRECs)。为探索DRECs在

视网膜中的定位,研究者进一步分析DRECs的标记基因表达,发现该内皮细胞高度表达毛细血管标记基因Cxc12和Spock2,但不表达动脉和静脉标记基因,由此推测DRECs主要局限于毛细血管中。另外DRECs还激活了IL-17A信号通路等多条炎症通路,在DR的进展以及炎症的促进中发挥重要作用,此研究结果为DR病理学提供了新的见解,并为DR的潜在治疗靶标提供了新的线索^[34]。

3.5 单核细胞 scRNA-seq可利用不同来源的组织样本在单细胞水平上的差异表达,来分析细胞转录的异质性,人和动物的视网膜局部样本已广泛应用于研究中。Ma等^[35]收集DR患者外周血样本用以分析患者外周免疫细胞的表型和功能。研究者将所有免疫细胞分为五个主要的免疫细胞谱系,包括单核细胞、T细胞、NK细胞、B细胞、树突状细胞。在研究中发现单核细胞显示出独特的差异和高度特异性的功能,学者进一步将单核细胞分为五个亚群,其中促炎性CD14⁺单核细胞上调了炎症细胞因子和趋化因子的基因表达,同时I-kappaB激酶/NF-kappaB信号通路、Toll样受体信号通路以及肿瘤坏死因子介导的信号通路被激活,证明促炎性CD14⁺单核细胞在糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)的发病机制中占主导地位,精确的了解炎症免疫机制,表明针对这种促炎单核细胞亚群的抗炎治疗对DME患者有所帮助。

4 讨论与展望

本文对scRNA-seq进行概述并介绍了scRNA-seq在正常视网膜上的应用,该技术允许对单个细胞类型进行分析,促进了我们对视网膜细胞生物学和疾病病理生理学的理解,是临床上探索细胞类型、功能以及细胞间相互作用的有力工具。近年来,随着scRNA-seq的精度及分辨率的增加,许多学者将目光着眼于与DR相关的其他糖尿病并发症,利用scRNA-seq能够区分各种器官中复杂的细胞类型并特异性识别细胞的分子特征,探索细胞间信号通路,揭示疾病之间的潜在关联^[36]。

但目前scRNA-seq在临床研究的使用中存在一些局限:(1)人体组织学标本的获得存在困难,研究人员常利用动物标本来替代。动物模型虽具有易获得、样本量易控制的优势,但以动物模型模拟人类疾病存在着一定的局限性,任何一种动物模型都不能全部复制人类的疾病,只能提供一种间接性的展示,片面反映人类疾病。(2)scRNA-seq能反映成千上万个单类型细胞的基因组信息,面对大量的数据分析以及数据背后临床意义的解读往往需要依靠临床医生、生物学家以及计算机学家等跨学科合作。另外,scRNA-seq花费昂贵、耗时长也限制了学者的研究进展。

DR是工作年龄人群第一位的致盲性眼病,随着糖尿病患者病程的延长,DR的患病率逐年增加,致盲率也逐年升高,利用scRNA-seq大大提高了我们对DR机制、细胞间通路的了解,明确与疾病相关的基因调控,促进DR的临床研究、寻找潜在的治疗靶点,为今后疾病的早期诊断、精准治疗提供新思路。

参考文献

[1] Yang QH, Zhang Y, Zhang XM, et al. Prevalence of diabetic retinopathy, proliferative diabetic retinopathy and non-proliferative diabetic retinopathy in Asian T2DM patients: a systematic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol*, 2019,12(2):302-311.

- [2] Andrysyk Z, Donovan MG. RNA visualization and single-cell transcriptomics: methods and applications. *Transcription*, 2023, 14(3-5):89-91.
- [3] 安宁, 张福燕, 秦波. 单细胞转录组测序在年龄相关性黄斑变性研究中的应用. *国际眼科杂志*, 2022, 22(6):964-968.
- [4] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8):16897-16919.
- [5] Streets AM, Zhang XN, Cao C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(19):7048-7053.
- [6] Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for single-cell collection and analysis. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):807.
- [7] Liu N, Liu L, Pan XH. Single-cell analysis of the transcriptome and its application in the characterization of stem cells and early embryos. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(14):2707-2715.
- [8] Li LY, Xiong F, Wang YM, et al. What are the applications of single-cell RNA sequencing in cancer research: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):163.
- [9] McCarthy DJ, Campbell KR, Lun AT, et al. Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics*, 2017, 33(8):1179-1186.
- [10] Hicks SC, Townes FW, Teng MX, et al. Missing data and technical variability in single-cell RNA-sequencing experiments. *Biostatistics*, 2018, 19(4):562-578.
- [11] Lu JR, Sheng YQ, Qian WH, et al. scRNA-seq data analysis method to improve analysis performance. *IET Nanobiotechnol*, 2023, 17(3):246-256.
- [12] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161(5):1202-1214.
- [13] Yan WJ, Laboulaye MA, Tran NM, et al. Mouse retinal cell atlas: molecular identification of over sixty amacrine cell types. *J Neurosci*, 2020, 40(27):5177-5195.
- [14] Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, et al. Comprehensive classification of retinal bipolar neurons by single-cell transcriptomics. *Cell*, 2016, 166(5):1308-1323.
- [15] Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, et al. Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes. *Neuron*, 2019, 104(6):1039-1055.
- [16] Lukowski SW, Lo CY, Sharov AA, et al. A single-cell transcriptome atlas of the adult human retina. *EMBO J*, 2019, 38(18):e100811.
- [17] Voigt AP, Mullin NK, Stone EM, et al. Single-cell RNA sequencing in vision research: Insights into human retinal health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83:100934.
- [18] Kaplan N, Wang JY, Wray B, et al. Single-cell RNA transcriptome helps define the limbal/corneal epithelial stem/early transit amplifying cells and how autophagy affects this population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(10):3570-3583.
- [19] Struebing FL, King R, Li Y, et al. Transcriptional changes in the mouse retina after ocular blast injury: a role for the immune system. *J Neurotrauma*, 2018, 35(1):118-129.
- [20] Ying PX, Huang C, Wang Y, et al. Single-cell RNA sequencing of retina: new looks for gene marker and old diseases. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:699906.
- [21] Boeck M, Thien A, Wolf J, et al. Temporospatial distribution and transcriptional profile of retinal microglia in the oxygen-induced retinopathy mouse model. *Glia*, 2020, 68(9):1859-1873.
- [22] Lv KJ, Ying H, Hu GY, et al. Integrated multi-omics reveals the activated retinal microglia with intracellular metabolic reprogramming contributes to inflammation in STZ-induced early diabetic retinopathy. *Front Immunol*, 2022, 13:942768.
- [23] Hu ZZ, Mao XY, Chen MK, et al. Single-cell transcriptomics reveals novel role of microglia in fibrovascular membrane of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2022, 71(4):762-773.
- [24] Mao PY, Shen YC, Mao XY, et al. The single-cell landscape of alternative transcription start sites of diabetic retina. *Exp Eye Res*, 2023, 233:109520.
- [25] Wang Y, Yang XY, Li QM, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the Müller subtypes and inner blood-retinal barrier regulatory network in early diabetic retinopathy. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15:1048634.
- [26] Becker K, Klein H, Simon E, et al. In-depth transcriptomic analysis of human retina reveals molecular mechanisms underlying diabetic retinopathy. *Sci Rep*, 2021, 11(1):10494.
- [27] Zhang R, Huang CY, Chen YX, et al. Single-cell transcriptomic analysis revealing changes in retinal cell subpopulation levels and the pathways involved in diabetic retinopathy. *Ann Transl Med*, 2022, 10(10):562.
- [28] Niu T, Fang JW, Shi X, et al. Pathogenesis study based on high-throughput single-cell sequencing analysis reveals novel transcriptional landscape and heterogeneity of retinal cells in type 2 diabetic mice. *Diabetes*, 2021, 70(5):1185-1197.
- [29] 范小娥, 田芳, 李筱荣. 巨噬细胞在糖尿病视网膜病变中的作用. *国际眼科纵览*, 2010, 34(2):107-110.
- [30] van Hove I, De Groef L, Boeckx B, et al. Single-cell transcriptome analysis of the Akimba mouse retina reveals cell-type-specific insights into the pathobiology of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2020, 63(10):2235-2248.
- [31] Meng ZS, Chen YZ, Wu WY, et al. Exploring the immune infiltration landscape and M2 macrophage-related biomarkers of proliferative diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*, 2022, 13:841813.
- [32] Wen YJ, Chen X, Feng HZ, et al. Kdm6a deficiency in microglia/macrophages epigenetically silences Lcn2 expression and reduces photoreceptor dysfunction in diabetic retinopathy. *Metabolism*, 2022, 136:155293.
- [33] Boneva SK, Wolf J, Hajdú RI, et al. In-depth molecular characterization of neovascular membranes suggests a role for hyalocyte-to-myofibroblast transdifferentiation in proliferative diabetic retinopathy. *Front Immunol*, 2021, 12:757607.
- [34] Sun LC, Wang RN, Hu GY, et al. Single cell RNA sequencing (scRNA-Seq) deciphering pathological alterations in streptozotocin-induced diabetic retinas. *Exp Eye Res*, 2021, 210:108718.
- [35] Ma PJ, Zhang P, Chen SX, et al. Immune cell landscape of patients with diabetic macular edema by single-cell RNA analysis. *Front Pharmacol*, 2021, 12:754933.
- [36] Xu Y, Xiang ZD, Weigao WG, et al. Single-cell transcriptomes reveal a molecular link between diabetic kidney and retinal lesions. *Commun Biol*, 2023, 6(1):912.