

眼表外胚层与表面外胚层转录组差异分析

孙露^{1,2}, 张灿伟^{1,3}, 宋玉雯^{1,2}, 李建新¹, 段练¹, 高阳¹, 谢月美⁴, 王露萍⁵, 党光福¹

引用: 孙露, 张灿伟, 宋玉雯, 等. 眼表外胚层与表面外胚层转录组差异分析. 国际眼科杂志, 2024, 24(5): 677-685.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82000853); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2022MH154)

作者单位: ¹(250013) 中国山东省济南市, 山东第一医科大学第一附属医院眼科; ²(250117) 中国山东省济南市, 山东第一医科大学; ³(510000) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心; ⁴(255499) 中国山东省淄博市市立医院眼科; ⁵(100050) 中国北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院眼科

作者简介: 孙露, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障及角膜疾病。

通讯作者: 张灿伟, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜疾病. yankezcw@163.com; 党光福, 本科, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障. danguangfu@qq.com

收稿日期: 2023-11-13 修回日期: 2024-03-29

摘要

目的: 通过 RNA-seq 分析眼表外胚层 (OSE) 与表面外胚层 (SE) 转录组表达差异, 揭示 OSE 转录组景观及转录调控网络。

方法: 人类胚胎干细胞 (hES) 被分化成 OSE 细胞和 SE 细胞, 利用 RNA-seq 分析了 OSE 与 SE 之间差异表达的基因 (DEGs)。基于这些差异表达基因, 进行基因本体论 (GO)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集以及蛋白质-蛋白质交互作用 (PPI) 网络分析, 并筛选出了关键的转录因子 (TFs) 和枢纽基因。使用 NetworkAnalyst 平台构建了 TF-基因和 TF-miRNA 调控网络。

结果: OSE 与 SE 共筛选出 4 182 个差异基因, OSE 细胞中上调基因 2 771 个, 下调基因 1 411 个。GO-BP 富集分析显示 OSE 上调基因主要集中在离子跨膜转运的调节、轴突发育、调节化学突触传递等相关生物学进程, 下调基因主要富集在核分裂、染色体分离、细胞周期相变的调控等生物学进程; KEGG 富集分析显示 OSE 上调基因主要富集在可卡因成瘾、轴突导向、苯丙胺成瘾等通路, 下调基因主要富集于癌症中的蛋白聚糖、ECM-受体相互作用、蛋白质消化和吸收、细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路。与 SE 相比, OSE 细胞中有 204 个 TFs (FOS, EGR1, POU5F1, SOX2 和 PAX6 等) 上调, 80 个 TFs (HAND2, HOXB6, HOXB5, HOXA5 和 HOXB8 等) 下调。在 OSE 细胞中发现了 6 个上调和 9 个下调枢纽基因, 并根据这些枢纽基因构建了 TF-基因和 TF-miRNA 调控网络。

结论: RNA-seq 分析阐明了 OSE 和 SE 细胞的转录组特征, 这些数据可为 OSE 及角膜上皮发育调控及体外定向诱导等研究提供指导。

关键词: 眼表外胚层; 表面外胚层; 转录组; 差异基因; 信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.5.04

Transcriptional differential analysis of ocular surface ectoderm and surface ectoderm

Sun Lu^{1,2}, Zhang Canwei^{1,3}, Song Yuwen^{1,2}, Li Jianxin¹, Duan Lian¹, Gao Yang¹, Xie Yuemei⁴, Wang Luping⁵, Dang Guangfu¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 82000853); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2022MH154)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250013, Shandong Province, China; ²Shandong First Medical University, Jinan 250117, Shandong Province, China; ³Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, Zibo Municipal Hospital, Zibo 255499, Shandong Province, China; ⁵Department of Ophthalmology, Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Zhang Canwei. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250013, Shandong Province, China; Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China. yankezcw@163.com; Dang Guangfu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250013, Shandong Province, China. danguangfu@qq.com

Received: 2023-11-13 Accepted: 2024-03-29

Abstract

• **AIM:** To identify transcriptional differences between the ocular surface ectoderm (OSE) and surface ectoderm (SE) using RNA-seq, and elucidate the OSE transcriptome landscape and the regulatory networks involved in its development.

• **METHODS:** OSE and SE cells were differentiated from human embryonic stem (hES) cells. Differentially expressed genes (DEGs) between OSE and SE were analyzed using RNA-seq. Based on the DEGs, we performed gene ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and protein-protein interaction (PPI) network analysis. Transcription factors (TFs) and hub genes were screened. Subsequently, TF-gene and TF-miRNA regulatory networks were constructed using the NetworkAnalyst platform.

• **RESULTS:** A total of 4 182 DEGs were detected between

OSE and SE cells, with 2 771 up-regulated and 1 411 down-regulated genes in OSE cells. GO-BP analysis revealed that up-regulated genes in OSE were enriched in the regulation of ion transmembrane transport, axon development, and modulation of chemical synaptic transmission. Down-regulated genes were primarily involved in nuclear division, chromosome segregation, and regulation of cell cycle phase transition. KEGG analysis indicated that up-regulated genes in OSE cells were enriched in signaling pathways such as cocaine addiction, axon guidance, and amphetamine addiction, while down-regulated genes were enriched in proteoglycans in cancer, ECM-receptor interaction, protein digestion and absorption, and cytokine-cytokine receptor interaction. Additionally, compared with SE, 204 TFs (including FOS, EGR1, POU5F1, SOX2, and PAX6) were up-regulated, and 80 TFs (including HAND2, HOXB6, HOXB5, HOXA5, and HOXB8) were down-regulated in OSE cells. Furthermore, we identified 6 up-regulated and 9 down-regulated hub genes in OSE cells, and constructed TF-gene and TF-miRNA regulatory networks based on these hub genes.

• **CONCLUSIONS:** The transcriptome characteristics of OSE and SE cells were elucidated through RNA-seq analysis. These findings may provide a novel insight for studies on the development and *in vitro* directed induction of OSE and corneal epithelial cells.

• **KEYWORDS:** ocular surface ectoderm; surface ectoderm; transcriptome; differential expressed genes; signaling pathways

Citation: Sun L, Zhang CW, Song YW, et al. Transcriptional differential analysis of ocular surface ectoderm and surface ectoderm. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(5):677-685.

0 引言

眼表外胚层 (ocular surface ectoderm, OSE) 属于表面外胚层 (surface ectoderm, SE), 是眼表上皮 (即角膜和结膜上皮) 在胚胎时期的前体细胞^[1], 其对眼表正常发育及出生后正常视觉功能的维持至关重要。在胚胎发育过程中, 前神经板发育而来的视网膜前体细胞向覆盖在其表面的表面外胚层延伸, 然后该区域的表面外胚层增厚并产生假定的角结膜上皮^[2]。因此, 眼表外胚层在发育过程中受到表面外胚层以及来自视网膜前体细胞等神经外胚层的双重信号调控。目前表面外胚层细胞发育调控机制已较明确^[3], 分析眼表外胚层与表面外胚层细胞基因表达差异, 有助于阐明眼表外胚层发育调控机制。基于此, 本研究通过对人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hES) 来源的眼表外胚层和表面外胚层进行转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 分析, 筛选出眼表外胚层与表面外胚层的差异表达基因 (differential expressed genes, DEGs)、转录因子 (transcription factor, TF) 及 Hub 基因, 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析、京都基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes, KEGG) 分析及蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 还针对 Hub 基因构建了 TF-gene 调控网络和

TF-miRNA 调控网络, 在转录组水平揭示了二者表型及信号调控的差异, 可为眼表外胚层转录组特征及发育调控机制研究提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究中所用到的人胚胎干细胞均购自美国康宁公司, 且相关实验工作均已获得山东第一医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准, 并按照相关规定进行。

1.2 方法

1.2.1 人胚胎干细胞培养及诱导分化 人胚胎干细胞 H1 细胞株接种于 1% 浓度的 matrigel 包被的培养板, 采用 mTeSRTM 1 或 mTeSRTM plus 培养基 (StemCell Technologies) 培养。每 5-6 d 按 1:10 的比例传代一次。眼表外胚层细胞诱导参照以往文献报道的方法^[4-5]。首先, 将 hES 细胞接种于 LN511 包被的培养皿, mTeSRTM 1 或 mTeSRTM plus 培养基培养 4-7 d, 然后将培养基改为分化培养基, 成分见表 1。培养 3 wk 后, 在诱导的细胞中即可同时形成神经外胚层、眼表外胚层和其他表面外胚层细胞, 在显微镜下手动刮除神经外胚层和其他表面外胚层后即可获取眼表外胚层细胞。表面外胚层细胞诱导: 每平方米 6.2×10^3 个人胚胎干细胞接种于 1% 浓度的 matrigel 包被的培养板上。第 2 d, 将培养基改为含 $1 \mu\text{mol/L}$ RA (Sigma) 和 5 ng/mL 重组人 BMP-4 (R&D Systems) 的 E6 培养基培养, 2 d 换液 1 次, 培养 7 d。

1.2.2 免疫荧光染色 4% 多聚甲醛固定细胞后, 用 PBS 缓冲液冲洗。然后山羊血清孵育 30 min, 一抗在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS 缓冲液冲洗后加入二抗在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。PBS 缓冲液冲洗后 DAPI 染色, PBS 缓冲液冲洗后在荧光显微镜下采集细胞免疫荧光图像。

1.2.3 定量实时逆转录酶 PCR 使用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 提取人胚胎干细胞及人胚胎干细胞诱导的眼表外胚层、表面外胚层细胞的总 RNA。随后使用 PrimeScript Real-Time Master Mix Kit (Takara) 合成 cDNA 后进行定量实时逆转录酶 PCR (qRT-PCR)。PCR 程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 3 min, 然后进入热循环程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s 和 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火和延伸 30 s, 重复 40 个循环。

1.2.4 转录组测序及 RNA-Seq 数据分析 提取的眼表外胚层和表面外胚层细胞的总 RNA, 检测质量合格后, 使用 TruSeq Stranded mRNA Library Prep kit 试剂盒构建文库。随后总 RNA 使用 NextSeq 500 (Illumina) 进行转录组测序。差异基因及 GO、KEGG 分析: 使用 R4.1.2 版进行基因表达分析, 并应用 DESeq2 分析眼表外胚层、表面外胚层细胞中基因水平的差异表达, 筛选出 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和 $\text{Padj} < 0.05$ 的 DEGs, 使用 R 软件进行火山图谱绘制。随后, 利用 GO 分析和 KEGG 分析对 DEGs 进行功能富集分析, 以确定 DEGs 的主要生物学功能和相关的信号通路。转录因子分析: 通过 hTFtarget database 数据库 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/hTFtarget>) 获取人类转录因子基因集, 将差异基因与转录因子进行比较、筛选和校正。用 R 软件筛选 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和 $\text{Padj} < 0.05$ 的转录因子, 并绘制热图。

1.2.5 PPI 网络搭建及模块分析 为了进一步探讨 DEGs 之间的相互作用, 我们使用 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 设置相关系数绝对值大于 0.4 ^[6-7]。使用 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络。另外, 使用

Cytoscape 插件 Cytoscape MCODE 筛选关键功能基因模块。
1.2.6 Hub 基因的筛选 应用 Cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件筛选 Hub 基因。然后,我们选择 7 种算法 (MCC、MNC、Degree、EPC、Closeness、Radiality、Stress) 的交集,最终得到 Hub 基因。最后,通过 GeneMANIA10 (<http://www.genemania.org/>) 构建了 Hub 基因的共表达网络^[6]。

1.2.7 TF-gene 调控网络和 TF-miRNA 调控网络的构建
 通过 NetworkAnalyst 数据库 (<https://www.networkanalyst.ca/>) 构建了 TF-gene 和 TF-miRNA 调控网络。随后通过 Cytoscape 软件可视化。

统计学分析: 使用 GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) 软件进行统计分析。所有实验数据均以均数±标准差表示。采用单因素方差分析对各组间数据进行统计学检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人胚胎干细胞诱导分化及相关标记物的鉴定 人胚胎干细胞在分化培养基中被诱导,逐渐形成了 3 个同心细胞团(神经外胚层、眼表外胚层和其他表面外胚层细胞),见图 1A,定向分化成表面外胚层细胞,见图 1C。诱导的

眼表外胚层细胞高表达 PAX6、p63、K18、K8,而在神经外胚层细胞高表达 PAX6,表面外胚层细胞高表达 p63、K18、K8(图 1B、D)。相对定量的 qRT-PCR 结果显示与免疫荧光染色的结果相一致(图 1E)。选取一些眼表外胚层标记物,包括 KRT8、KRT18、KRT19、PAX6、TP63、CDH1、TFAP2A、FOXC1,绘制成热图,见图 1F。

2.2 DEGs 分析 对眼表外胚层与表面外胚层之间的 RNA-Seq 数据进行了差异基因表达分析。相对于表面外胚层,眼表外胚层共有 4 182 个基因发生差异性表达,包含 2 771 个上调基因和 1 411 个下调基因(图 2A),*P*_{adj} 值<0.05。按 log₂(fold change) 值大小排序,前 100 位差异基因见图 2B。

表 1 细胞分化培养基成分表

成分名称	浓度	公司
血清替代物	10%	Life Technologies
丙酮酸钠	1 mmol/L	Life Technologies
非必需氨基酸	0.1 mmol/L	Life Technologies
L-谷氨酰胺	2 mmol/L	Life Technologies
青霉素-链霉素溶液	1%	Life Technologies
β-巯基乙醇	55 μmol/L	Life Technologies

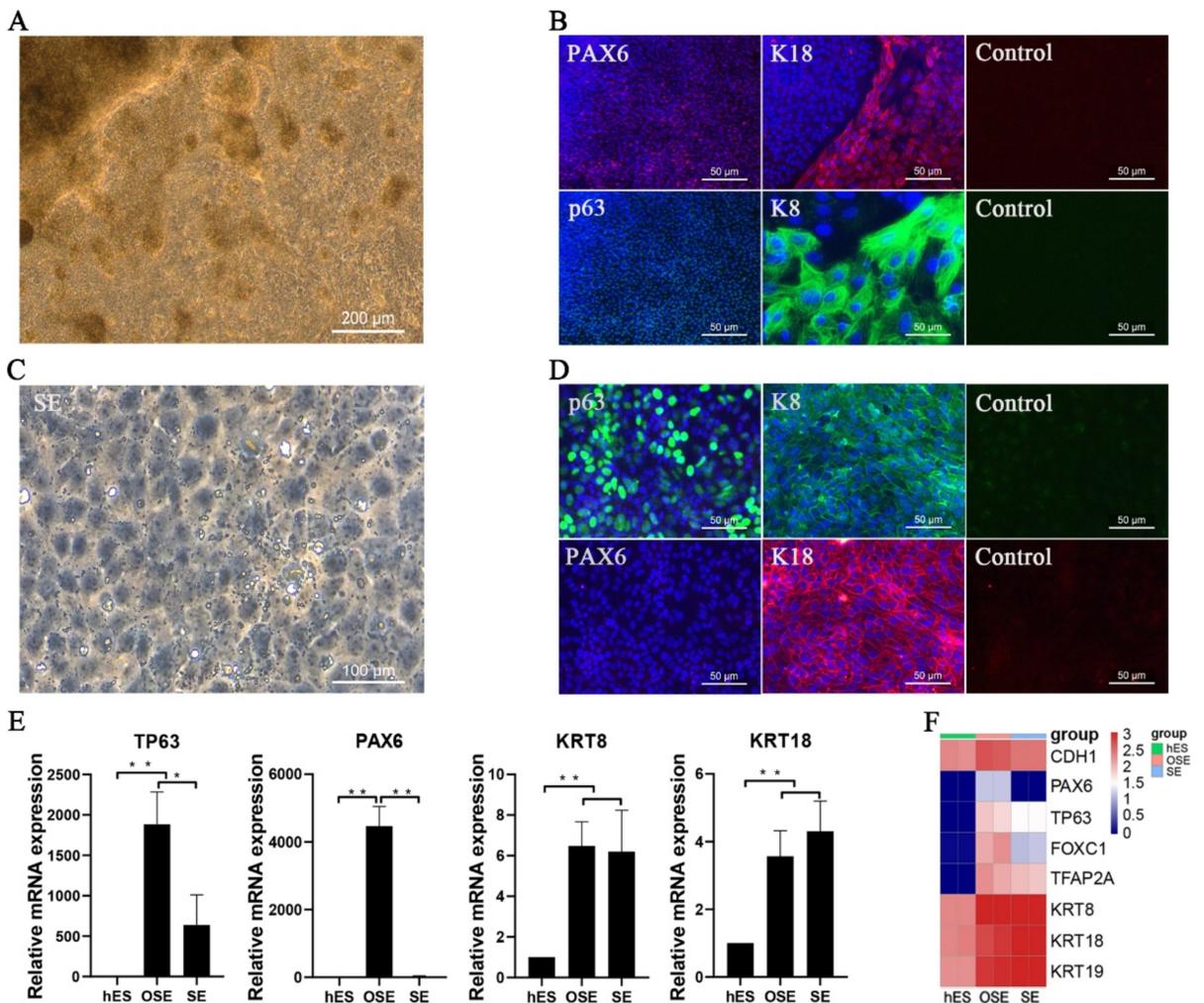


图 1 hES 细胞诱导分化及特异性标记物鉴定图 A: hES 细胞在角膜分化培养基分化后显微镜下照相; B: 对分化的多胚层细胞团进行神经细胞标志物 PAX6(红色)和角膜上皮发育相关标志物 p63(绿色)、K18(红色)和 K8(绿色)的免疫荧光染色结果。细胞核蓝色; C: 显微镜观察定向分化的 SE 细胞; D: 对 SE 细胞进行神经细胞标志物 PAX6(红色)和角膜上皮发育相关标志物 p63(绿色)、K18(红色)和 K8(绿色)的免疫荧光染色; E: 以 hES 为对照组, OSE 和 SE 细胞中 TP63、PAX6、KRT8、KRT18 基因的表达情况; F: 常见眼表外胚层标记物基因热图。

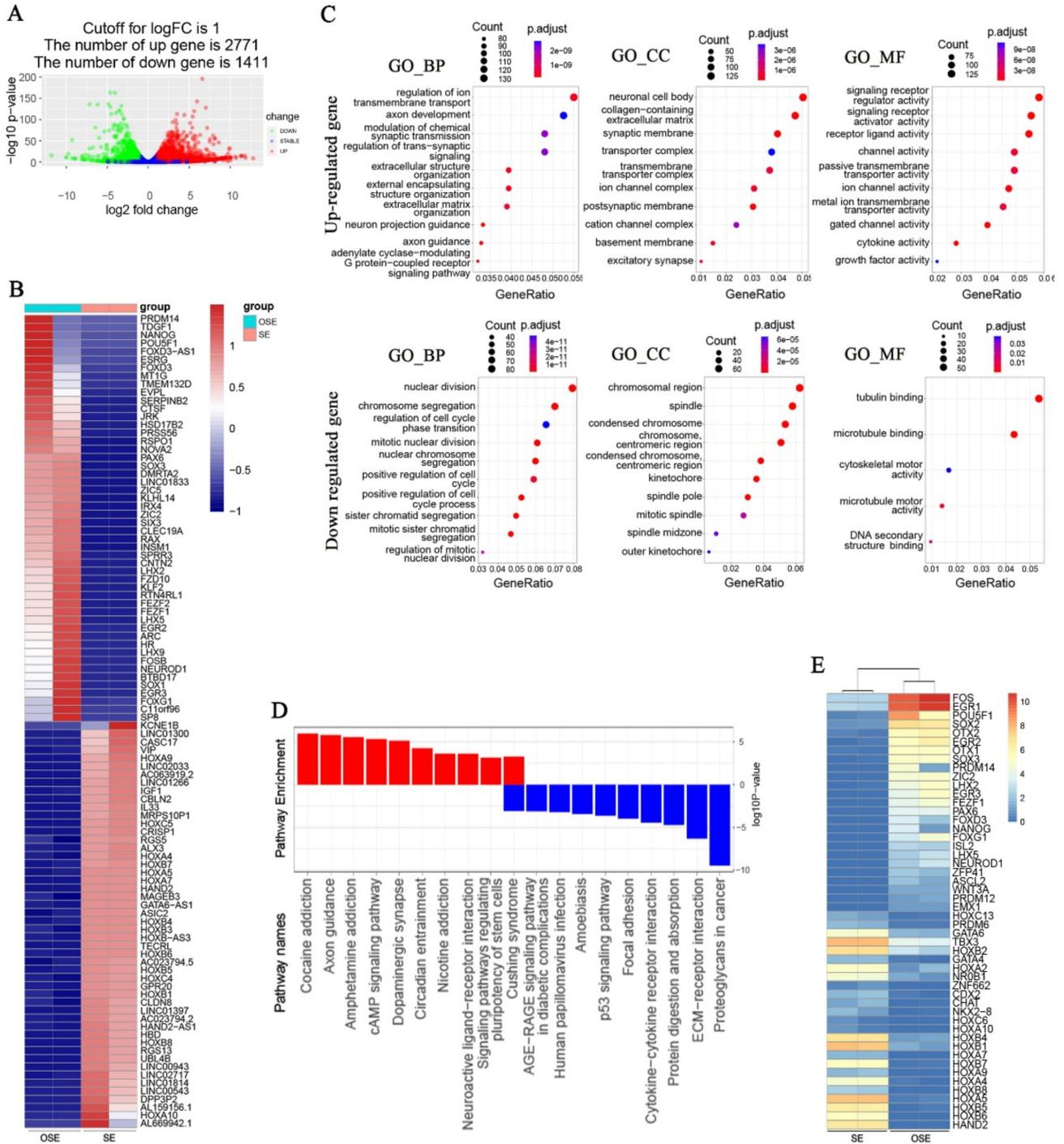


图2 RNA-Seq 数据分析图 A:OSE 与 SE 的 DEGs 火山图。红色点代表上调,绿色点代表下调;B:OSE 与 SE 的前 100 个差异基因热图;C:OSE 与 SE 差异基因的 GO 功能富集的气泡图;D:OSE 与 SE 差异基因的 KEGG Pathway 分析;E:OSE 与 SE 差异基因的转录因子分析热图。

2.3 GO 和 KEGG 富集分析 利用基因本体进行了 GO 分析。GO 富集分析包括 3 个分支,即生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。在 GO-BP 分析中,眼表外胚层上调的 DEGs 主要富集在离子跨膜转运的调节 (regulation of ion transmembrane transport)、轴突发育 (axon development)、调节化学突触传递 (modulation of chemical synaptic transmission) 等相关生物学过程,下调的 DEGs 主要富集在核分裂 (nuclear division)、染色体分离 (chromosome segregation)、细胞周期相变的调控 (regulation of cell cycle phase transition) 等生物学过程。在 GO-CC 分析中,眼表外胚层细胞上调的 DEGs 多定位在神经元细胞

体 (neuronal cell body)、含胶原蛋白的细胞外基质 (collagen-containing extracellular matrix)、突触膜 (synaptic membrane) 等细胞结构中,下调 DEGs 主要定位在染色质区域 (chromosomal region)、转轴 (spindle)、浓缩染色质 (condensed chromosome) 等细胞结构中。在 GO-MF 分析中,眼表外胚层细胞上调的 DEGs 富集于信号受体调节活动 (signaling receptor regulator activity)、信号受体激活剂活性 (signaling receptor activator activity)、受体配体活性 (receptor ligand activity) 等分子功能,而下调的 DEGs 则更多地富集于微管蛋白结合 (tubulin binding)、微管结合 (microtubule binding)、细胞骨架运动活性 (cytoskeletal motor activity) 等分子功能 (图 2C)。在 KEGG 分析中,我

们筛选了 DEGs 富集的 20 条通路(上调 10 条、下调 10 条),其中可卡因成瘾(cocaine addiction)、轴突导向(axon guidance)、苯丙胺成瘾(amphetamine addiction)、cAMP 信号(cAMP signaling pathway)等信号通路显著上调,癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、ECM-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)等信号通路显著下调(图 2D)。

2.4 转录因子分析 转录因子通过调控其他基因的表达在细胞表型决定及生物学功能中发挥关键调控作用。因此进一步分析了眼表外胚层和表面外胚层的差异转录因子,共筛选了 284 个转录因子。FOS、EGR1、POU5F1、SOX2 以及 PAX6 等 204 核心转录因子在眼表外胚层中高表达,HAND2、HOXB6、HOXB5、HOXA5 以及 HOXB8 等 80 个核心转录因子在表面外胚层中高表达。在眼表外胚层高表达转录因子中,FOS 表达差异最大。图 2E 展示了眼表外胚层细胞相对于表面外胚层细胞表达上调及下调的前 25 位转录因子。

2.5 PPI 网络构建和模块分析 将 $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 的 DEGs 输入 STRING 数据库以获取蛋白互作信息,并进

一步利用 Cytoscape 软件进行可视化分析,分别筛选出前 6 个 Degree 值最大的 DEGs 蛋白,见图 3A。利用 Cytoscape Mcode 插件筛选 DEGs 相关功能模块基因(包含 33 个上调功能模块基因、13 个下调功能模块基因),见图 3B。发现上调功能模块基因在趋化作用(chemotaxis、taxis)、MAPK 级联的正向调节(positive regulation of MAPK cascade)等生物过程中显著富集(图 3C),富集于 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus)、炎症性肠病(inflammatory bowel disease)等信号通路(图 3D)。

2.6 Hub 基因的选择与分析 通过插件 cytoHubba 的 7 种算法,在眼表外胚层细胞上调和下调差异基因中分别计算出了排名前 30 的 Hub 基因(表 2、3)。用 venny 进行交集后,我们发现了 6 个常见的上调 Hub 基因,包括 FOS、IL1B、SOX2、IL6、JUN、MMP9,以及 9 个常见的下调 Hub 基因,包括 COL1A1、POSTN、LUM、PDGFRA、VCAM1、IGF1、FGF10、ENG、BDNF。基于 GeneMANIA 数据库,我们分析了这些基因的共表达网络和相关功能,其中上调 Hub 基因物理相互作用为 48.20%、共表达为 26.40%、预测为 23.35%、共定位为 1.20%、途径为 0.85%,下调 Hub 基因共表达为 86.58%、共定位为 9.19%、途径为 2.31%、共享蛋白质结构域为 1.92%,但未富集到已知的生物学功能(图 4A)。

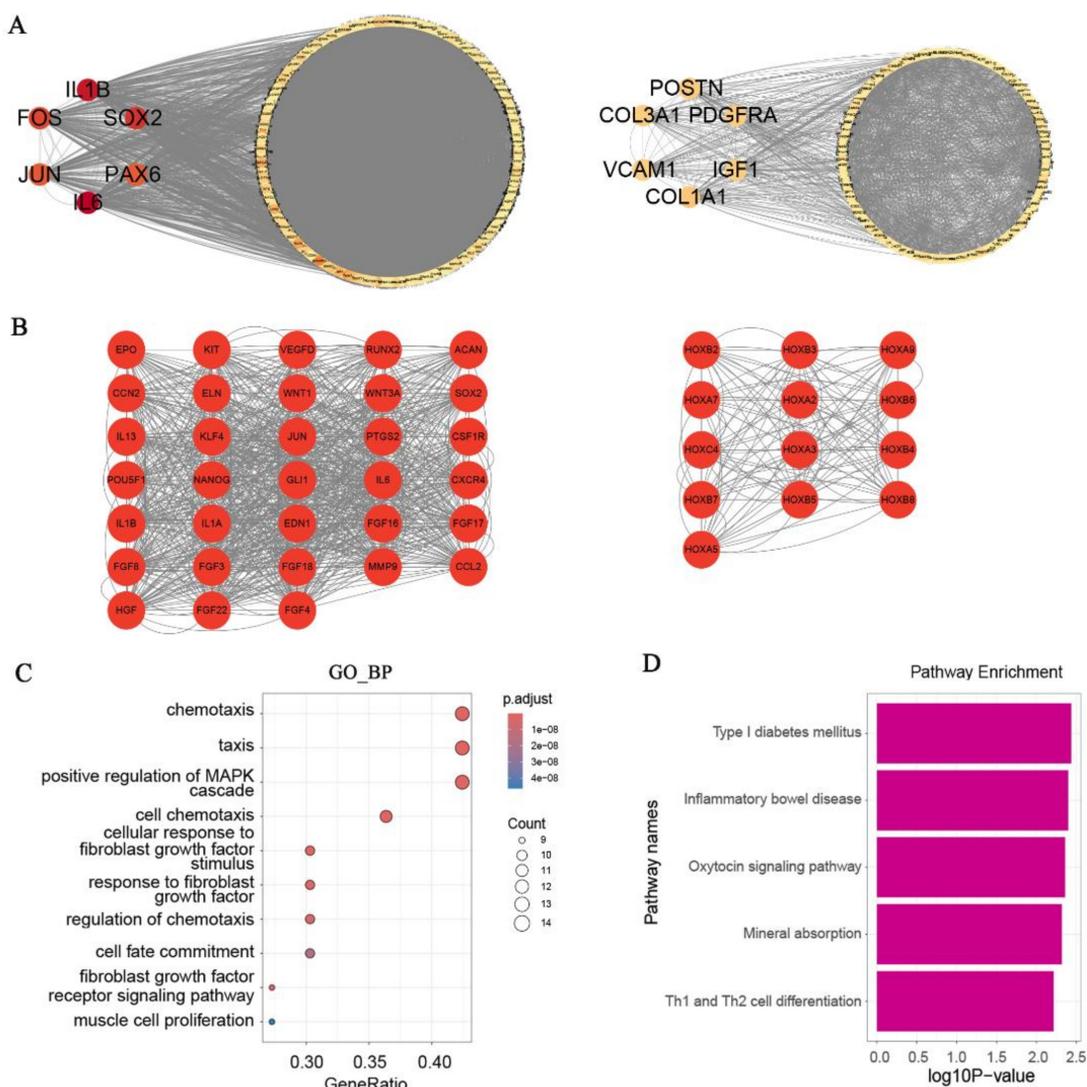


图 3 PPI 分析及功能模块分析图 A;PPI 网络图(差异表达基因之间的蛋白相互作用网络,左为上调,右为下调);B;功能基因模块(左为上调,右为下调);C;上调功能模块基因 GO-BP 功能富集的气泡图(前十位);D;上调功能模块基因 KEGG Pathway 分析图(前五位)。

表2 cytoHubba 中上调 DEGs 前 30 个 Hub 基因排名

MCC	MNC	Degree	EPC	Closeness	Radiality	Stress
IL6	IL6	IL6	IL6	IL6	IL1B	IL6
IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL6	IL1B
SOX2	SOX2	SOX2	SOX2	SOX2	SOX2	SOX2
FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS	FOS
JUN	JUN	JUN	JUN	JUN	JUN	FAM71F1
MMP9	PAX6	PAX6	PAX6	PAX6	SYP	SYP
KIT	POU5F1	POU5F1	FGF8	POU5F1	PAX6	JUN
CXCR4	FGF8	FGF8	MMP9	SYP	SST	ADGRL3
FGF8	MMP9	MMP9	CXCR4	SST	POU5F1	CFAP52
CCL2	CCL2	CCL2	GAD2	MMP9	CXCR4	PAX6
RUNX2	OTX2	OTX2	SST	CXCR4	GAD1	CALB1
PTGS2	CXCR4	CXCR4	GRIN2B	GAD1	GRIN2B	NME8
NANOG	GAD2	GAD2	NANOG	GRIN2B	MMP9	RRAD
IL1A	SST	SST	PTGS2	KIT	KIT	RADIL
FGF3	GRIN2B	GRIN2B	GRIA2	GAD2	GAD2	GRIN2B
EDN1	GAD1	GAD1	DRD2	FGF8	CALB1	CCDC187
FGF4	NANOG	NANOG	FGF4	CALB1	CCK	GAD1
FGF17	SLC17A7	SLC17A7	POU5F1	SLC17A7	RBFOX3	SLC6A1
IL13	KIT	PTGS2	CCL2	CCL2	SLC17A7	SST
FGF18	PTGS2	KIT	CALB1	PTGS2	CCL2	SOX10
FGF16	GRIA1	GRIA1	KLF4	CCK	FGF3	GRIA2
CSF1R	IL1A	IL1A	IL1A	NANOG	FGF8	MMP9
HGF	GRIA2	GRIA2	OTX2	FGF3	PTGS2	FAM81B
FGF22	SLC32A1	CALB1	NPY	RBFOX3	TAC1	PNPO
CCN2	CALB1	SLC32A1	SLC17A6	OTX2	NPY	EGR2
POU5F1	NEUROD1	NEUROD1	SLC17A7	TAC1	NANOG	SLC17A7
KLF4	KLF4	SYP	GAD1	SLC32A1	SLC17A6	CACNA1A
WNT3A	SYP	KLF4	NEUROD1	NPY	SOX10	GRIA1
GLI1	SLC17A6	SLC17A6	TAC1	SLC17A6	SLC32A1	PAX2
ELN	FGF3	FGF3	FOXG1	GRIA1	OTX2	POU5F1

2.7 TF-gene 相互作用和 TF-miRNA 共同调控网络 基于 NetworkAnalyst 数据库预测可与 Hub 基因相互作用的转录因子,设置最小网络数,然后使用 Cytoscape 对结果进行可视化(图 4B)。上调网络包括 150 个节点和 164 个边,其中受转录因子调节最多的基因是 JUN,共有 73 个转录因子参与调控转录过程。随后,我们利用 Venny 将眼表外胚层高表达 TF 与上调 Hub 基因互作 TF 取交集,筛选出 23 个共表达 TF(图 4C),并制成热图见图 4D。下调网络包括 69 个节点和 72 个边,其中受转录因子调节最多的基因是 COL1A1,共有 21 个转录因子参与调控转录过程。此外,我们还使用 NetworkAnalyst 构建了 TF-miRNA 共调控网络,该网络预测了 miRNA、TF 和 Hub 基因之间的相互作用,设置最小网络数,最终筛选出由 11 个节点和 24 个边组成的上调网络图及由 24 个节点和 40 个边组成的下调网络图(图 4E)。

3 讨论

眼表外胚层属于表面外胚层,其发育过程中受到表面外胚层发育调控信号和来自神经外胚层调控信号的双重调控。研究发现,眼表外胚层除了表达表面外胚层重要转录因子 TP63 外,还高表达神经外胚层核心转录因子 PAX6^[4],而角结膜上皮也与表面外胚层来源的皮肤表现

出不同的表型^[8]。近年来已有研究阐明了表面外胚层发育调控机制,而眼表外胚层和角结膜上皮发育调控机制仍不明确^[3,5]。

随着干细胞及眼发育领域研究的深入,人胚胎干细胞和诱导的多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)已被广泛应用于眼部器官发育的研究,其在眼部发育调控机制及遗传性眼病治疗方案的开发中发挥重要作用^[9-11]。转录组测序是一种高通量测序技术,能够全面、快速地筛选差异表达基因,研究特定组织的基因表达情况,目前已成为疾病及胚胎发育机理研究不可或缺的技术手段。本研究通过对眼表外胚层和表面外胚层转录组数据进行分析,共筛选出 4 182 个 DEGs,包含 2 771 个上调基因和 1 411 个下调基因。从转录组水平阐明了眼表外胚层的转录组特征,明确了眼表外胚层细胞高表达的基因及信号通路。转录因子在决定细胞表型及命运中发挥关键用。既往研究发现神经细胞核心转录因子 PAX6 通过促进角膜上皮标记物 K3、K12 等基因的表达决定角膜上皮细胞命运^[12]。此外, FOS 家族的成员(cFos、Fra-1、Fra-2 及 FosB)与 JUN 家族(c-Jun、JunB 和 JunD)可以结合形成异二聚体 AP1 因子,参与调节角膜上皮细胞的分化及维持细胞稳态^[13-14],在差异基因分析中,

表3 cytoHubba 中下调 DEGs 前 30 个 Hub 基因排名

MCC	MNC	Degree	EPC	Closeness	Radiality	Stress
HOXA5	COL1A1	COL1A1	COL1A1	IGF1	IL1B	VCAM1
HOXB4	PDGFRA	PDGFRA	POSTN	PDGFRA	IL6	ADCY10
HOXB8	POSTN	POSTN	PDGFRA	FGF10	SOX2	SLC18A3
HOXB5	COL3A1	COL3A1	FGF10	VCAM1	FOS	TFPI
HOXC4	FGF10	IGF1	IGF1	COL1A1	JUN	TLR4
HOXB6	GATA4	VCAM1	GATA4	GATA4	SYP	ISL1
HOXB3	VCAM1	TLR4	COL3A1	TLR4	PAX6	KCNQ5
HOXA3	IGF1	FGF10	LUM	POSTN	SST	ACTA2
HOXA9	ISL1	GATA4	VCAM1	FGF7	POU5F1	APOB
HOXB2	LUM	ISL1	FGF7	COL3A1	CXCR4	PDGFRA
HOXB7	FGF7	LUM	ISL1	ISL1	GAD1	S100A6
HOXA7	TLR4	FGF7	TLR4	BDNF	GRIN2B	CDKN2A
COL1A1	CDKN2A	CDKN2A	TWIST1	LUM	MMP9	IGF1
POSTN	BDNF	BDNF	COL14A1	ENG	KIT	BDNF
COL3A1	TWIST1	APOB	HAND2	APOB	GAD2	RPL17-C18orf32
LUM	COL11A1	TWIST1	COL11A1	CDKN2A	CALB1	GATA4
COL14A1	APOB	COL11A1	CDKN2A	TWIST1	CCK	FGF10
PDGFRA	HOXA5	ENG	ENG	PLAT	RBFOX3	IVL
VCAM1	COL14A1	HOXA5	TBX3	ACTA2	SLC17A7	CSRPI
IGF1	ENG	COL14A1	ACTA2	GATA6	CCL2	SH3BP5
COL11A1	GATA6	GATA6	GATA6	ANGPT1	FGF3	ENG
LAMA4	HOXC4	HAND2	BDNF	HAND2	FGF8	LCP1
HOXA2	TBX3	ACTA2	PRRX1	COL14A1	PTGS2	COL1A1
FGF7	HAND2	HOXA9	LAMA4	TBX3	TAC1	POSTN
FGF10	HOXB4	HOXC4	ANGPT1	IL33	NPY	CDKN3
PCOLCE	HOXB8	TBX3	GATA2	CDX2	NANOG	RAC2
DDR2	LAMA4	HOXB4	PLAT	GATA2	SLC17A6	UBL4B
ENG	PRRX1	LAMA4	HOXA5	PRRX1	SOX10	PLAT
ANGPT1	PLAT	ANGPT1	HOXA9	LAMA4	SLC32A1	LUM
BDNF	CDX2	GATA2	MSX1	SLC18A3	OTX2	PDE11A

我们发现 PAX6 和 FOS 高表达于眼表外胚层细胞。据此,我们推测 PAX6、FOS 可能参与眼表外胚层发育调控,但其具体作用及机制仍需进一步研究。以往研究还发现神经细胞及干细胞标志物及重要转录因子 SOX2 在角膜上皮前体细胞中与 p63 共表达,参与角膜上皮细胞分化调控^[15]。在本研究中,我们发现眼表外胚层细胞 SOX2 表达明显高于表面外胚层,这与以往研究结果相一致。另外,在眼表外胚层相对于表面外胚层高表达 DEGs 中,PRDM14 表达量最大,以往研究发现 PRDM14 能够维持干细胞干性和多能性^[16],但其在眼表外胚层中的作用尚未见报道,仍待进一步研究。

本研究还筛选了决定眼表外胚层和表面外胚层差异的 Hub 基因,共筛选出了 6 个上调的 Hub 基因,包括 FOS、IL1B、SOX2、IL6、JUN、MMP9,9 个下调 Hub 基因,包括 COL1A1、POSTN、LUM、PDGFRA、VCAM1、IGF1、FGF10、ENG、BDNF。除 FOS、JUN、SOX2 外,上调 Hub 基因 IL1B、IL6、MMP9 在外伤、炎症方面的研究较为深入,既往文献中提到它们参与角膜上皮损伤愈合过程,而其在角膜上皮发育中的作用尚未见报道^[17-19]。此外,以往研究发现下调 Hub 基因多参与上皮细胞-间充质转化过程,在癌症转移和多种纤维化疾病中发挥了重要作用^[20-21]。

GO 分析结果显示,眼表外胚层细胞上调基因主要与神经发育、神经信号转导相关,下调的 DEGs 主要与细胞增殖过程相关。在 KEGG 分析中,我们发现眼表外胚层上调 DEGs 富集在轴突导向(axon guidance)、神经活性配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)、cAMP 信号(cAMP signaling pathway)通路等。有学者研究发现小鼠 Gpr48 基因缺失通过 cAMP 信号通路导致角膜上皮细胞增殖和分化不良^[22],表明 cAMP 信号通路在角膜上皮发育中发挥调控作用。眼表外胚层下调差异基因主要富集在癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、ECM-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)等信号通路。既往研究表明,下调通路参与调节上皮细胞-间充质转化过程,与下调 Hub 基因功能基本相符,但它们在眼表外胚层发育中的调控机制尚未得到研究^[21, 23]。

miRNA 是基因表达的关键调节因子,具有通过抑制信使 RNA(mRNA)翻译或促进 mRNA 降解的作用,在转录后水平调节基因表达。本研究中我们利用 Hub 基因构建了 TF-miRNA 共同调控网络,在上调网络中筛选出 1 个高相关 miRNA,即 has-miR-21。Kalaimani 等^[24]已在角膜缘干细胞中发现 has-miR-21-5p 高表达,该 miRNA 可能在

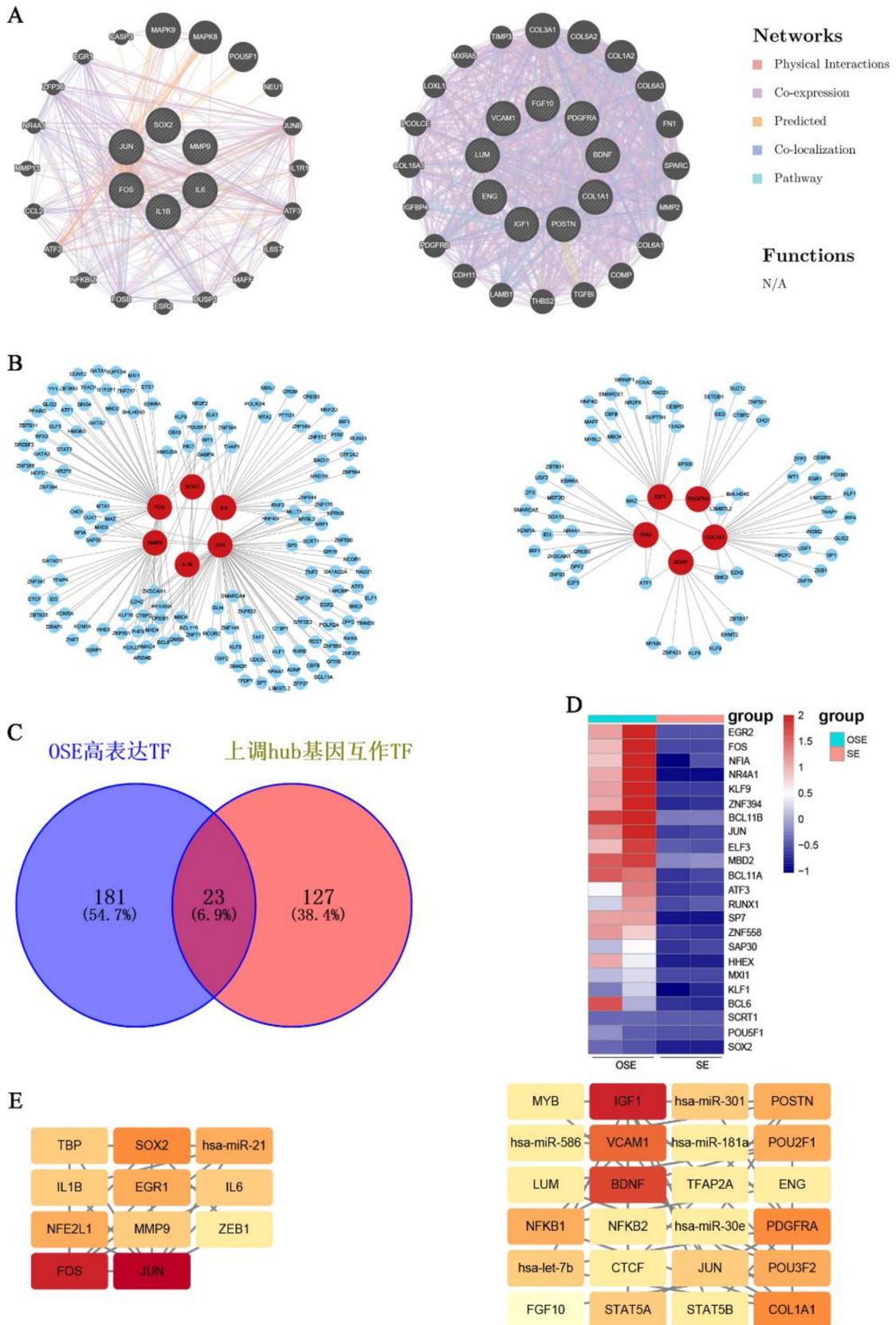


图4 Hub基因鉴定及TF-gene、TF-miRNA信号调控网络图 A:通过GeneMANIA分析Hub基因及其共表达基因图;B:TF-gene相互作用和TF-miRNA共同调控网络(左侧为上调基因,右侧为下调基因)。红色节点代表Hub基因,蓝色节点代表TF;C:Venny图(OSE高表达TF与上调Hub基因互作TF取交集,筛选共表达TF);D:共表达TF热图;E:TF-miRNA共同调控网络(左侧为上调,右侧为下调)。

角膜上皮细胞再生中发挥作用,但其在角膜上皮发育及再生中的具体通路尚未阐明。在下调网络中,我们筛选出4个高相关miRNA,即has-miR-586、has-miR-301、has-

miR-181a、has-miR-30e。目前,下调网络中miRNA的研究多见于肿瘤细胞中,它们通过促进细胞增殖和转移来发挥致癌基因的作用,但在眼表外胚层及表面外胚层发育中

的作用仍尚不清楚^[25-27]。

综上所述,本研究通过转录组测序分析了人胚胎干细胞来源的眼表外胚层和表面外胚层转录组表达差异,筛选了眼表外胚层和表面外胚层差异基因富集的 GO terms 及信号通路,并筛选了决定这种表型差异的 Hub 基因以及相关的信号调控网络。这可为眼表外胚层及角膜上皮发育调控机制研究及角膜上皮相关遗传性疾病的防治提供理论参考。我们将在以后的研究中进一步探索二者的差异基因及相关信号通路在眼表外胚层和表面外胚层发育调控中的作用,力争阐明眼表外胚层发育调控信号网络。

参考文献

- [1] Swamynathan SK, Swamynathan S. Corneal epithelial development and homeostasis. *Differentiation*, 2023,132:4-14.
- [2] Fujimura N. WNT/ β -catenin signaling in vertebrate eye development. *Front Cell Dev Biol*, 2016,4:138.
- [3] Huang HX, Liu JF, Li MS, et al. Cis-regulatory chromatin loops analysis identifies GRHL3 as a master regulator of surface epithelium commitment. *Sci Adv*, 2022,8(28):eabo5668.
- [4] Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature*, 2016,531(7594):376-380.
- [5] Pattison JM, Melo SP, Piekos SN, et al. Retinoic acid and BMP4 cooperate with p63 to alter chromatin dynamics during surface epithelial commitment. *Nat Genet*, 2018,50(12):1658-1665.
- [6] Gao Y, Wang YX, Li MW, et al. Bioinformatics analysis of potential common pathogenic mechanisms for systemic lupus erythematosus and acute myocardial infarction. *Lupus*, 2023,32(11):1296-1309.
- [7] Shi W, Zhang XL, Xu CL, et al. Identification of hub genes and pathways associated with oxidative stress of cartilage in osteonecrosis of femoral head using bioinformatics analysis. *Cartilage*, 2022,13(1):19476035221074000.
- [8] Ouyang H, Xue YC, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature*, 2014,511(7509):358-361.
- [9] Theerakittayakorn K, Thi Nguyen H, Musika J, et al. Differentiation induction of human stem cells for corneal epithelial regeneration. *Int J Mol Sci*, 2020,21(21):7834.
- [10] 丛林,张碧凝,谢立信.眼表及角膜疾病基因治疗的研究进展. *中华眼科杂志*, 2023,59(8):666-672.
- [11] 林铁柱.持续性角膜上皮缺损的发病机制和诊疗新进展. *国际眼科杂志*, 2022,22(6):955-959.
- [12] Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, et al. Direct reprogramming into corneal epithelial cells using a transcriptional network comprising

- PAX6, OVOL2, and KLF4. *Cornea*, 2019,38(Suppl 1):S34-S41.
- [13] Okada Y, Saika S, Shirai K, et al. Expression of AP-1 (c-fos/c-Jun) in developing mouse corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2003,241(4):330-333.
- [14] Katikireddy KR, Dana R, Jurkunas UV. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells*, 2014,32(3):717-729.
- [15] Bhattacharya S, Serror L, Nir E, et al. SOX2 regulates P63 and stem/progenitor cell state in the corneal epithelium. *Stem Cells*, 2019,37(3):417-429.
- [16] Nakaki F, Saitou M. PRDM14: a unique regulator for pluripotency and epigenetic reprogramming. *Trends Biochem Sci*, 2014,39(6):289-298.
- [17] 涂园园,朱曼辉. IL-6 在眼部炎症性疾病中的作用. *国际眼科杂志*, 2023,9(5):774-777.
- [18] Liu LR, Chen D, Sheng ST, et al. Research progress on animal models of corneal epithelial-stromal injury. *Int J Ophthalmol*, 2023,16(11):1890-1898.
- [19] Guo ZH, Liu PP, Wang H, et al. Inhibitory effects of luteolin on TLR3-mediated inflammation caused by TAK/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling in human corneal fibroblasts. *Int J Ophthalmol*, 2022,15(3):371-379.
- [20] Li LF, Chu PH, Hung CY, et al. Lumican regulates ventilation-induced epithelial-mesenchymal transition through extracellular signal-regulated kinase pathway. *Chest*, 2013,143(5):1252-1260.
- [21] He L, Wang GP, Guo JY, et al. Epithelial-mesenchymal transition participates in the formation of vestibular flat epithelium. *Front Mol Neurosci*, 2021,14:809878.
- [22] Nakamura M, Nishida T. Potentiation by cyclic AMP of the stimulatory effect of epidermal growth factor on corneal epithelial migration. *Cornea*, 2003,22(4):355-358.
- [23] Sampath S, Subramani S, Janardhanam S, et al. Bioactive compound 1, 8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies. *Phytomedicine*, 2018,46:57-68.
- [24] Kalaimani L, Devarajan B, Subramanian U, et al. MicroRNA Profiling of Highly Enriched Human Corneal Epithelial Stem Cells by Small RNA Sequencing. *Sci Rep*, 2020,10(1):7418.
- [25] Zhang D, Liu XF, Li Y, et al. LINC01189-miR-586-ZEB1 feedback loop regulates breast cancer progression through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021,25:455-467.
- [26] Chitsazzadeh V, Nguyen TN, de Mingo Pulido A, et al. MiR-181a promotes multiple protumorigenic functions by targeting TGF β 3. *J Invest Dermatol*, 2022,142(7):1956-1965.e2.
- [27] Han LL, Huang C, Wang XF, et al. The RNA-binding protein GRSF1 promotes hepatocarcinogenesis via competitively binding to YY1 mRNA with miR-30e-5p. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022,41(1):17.