

引文格式: 罗丹, 李凯, 高卫萍. 转录组学在干眼研究中的应用[J]. 眼科新进展, 2024, 44(4): 329-332. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2024.0064

【文献综述】

转录组学在干眼研究中的应用[△]

罗 丹 李 凯 高卫萍

作者简介: 罗丹 (ORCID: 0009-0009-4541-7997), 女, 1990 年 9 月出生, 江西上饶人, 在读博士研究生。研究方向: 中医眼科学。E-mail: 461297404@qq.com

通信作者:高卫萍 (ORCID: 0000-0003-0370-6503), 女, 1963 年 3 月出生, 江苏盐城人, 教授, 主任中医师, 博士研究生导师。研究方向: 中医眼科学。E-mail: 260790@njucm.edu.cn

收稿日期:2023-03-25

修回日期:2023-10-05

本文编辑:董建军

[△]基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82074526);江苏省中医药科技发展计划重点项目(编号:ZD202102)

中关键基因的调控规律,为干眼发病的复杂分子机制研究提供新方向。

2.1.1 lncRNA

lncRNA 是长度大于 200 个核苷酸且无法翻译成蛋白质的功能性 RNA 分子,起到调控基因表达的作用,lncRNA 通常直接或间接参与各种生物过程和信号通路,其强大的多功能调节网络可能与干眼的发生相关^[16]。研究证明,lncRNA MIAT 是 Caspase-1 依赖性细胞焦亡及凋亡的关键介质,对细胞活力和细胞增殖呈负调控作用,参与高渗应激诱导下干眼患者角膜上皮细胞的炎症反应^[17]。Yang 等^[18]利用全转录组测序技术分析了干眼小鼠 lncRNA 表达谱,发现了 3353 个差异表达的 lncRNA,其中 Chrnb2 和 Gabarap12 变化最显著;该研究结果还表明神经活性配体-受体相互作用信号通路是干眼发病中最重要的通路,证实此信号通路是通过分泌神经递质参与干眼的炎症损伤过程。Tang 等^[19]通过微阵列技术检测并分析了干眼小鼠角膜上皮细胞中 lncRNA 及 mRNA 的表达情况,构建了 lncRNA-miRNA-mRNA 网络,得到差异基因的表达谱;他们推测 NON-MMUT047964.2 可能通过调控 miR-671-5p/Egr-1 轴在干眼眼表炎症损伤过程中发挥重要作用。

2.1.2 circRNA

circRNA 是一类具有多种生物学功能的新型 ncRNA,可招募其他类型 RNA,并通过与 miRNA 的结合,影响特定 mRNA 转录及翻译^[20]。它们能直接调节基因表达及表观遗传修饰,circRNA 表达失调可导致眼部疾病的发生^[21]。有研究采用 RNA-seq 技术发现,circRNA (hsa-circRNA-001264、hsa-circRNA-104121 和 hsa-circRNA-045355)可能通过与下游 miRNA 结合,在原发性干燥综合征的发病中发挥潜在作用^[22]。Liu 等^[23]通过高通量转录组测序及生物信息学综合技术对水通道蛋白 5 敲除干眼小鼠泪腺组织进行分析,发现了差异表达的 30 个 circRNA 和 515 个 mRNA;在对其中的 circRNA 进行 GO 分析和 KEGG 分析后,又发现上调 circRNA 主要参与 RNA 磷酸二酯酶及核糖核酸酶活性调节,下调 circRNA 主要参与高压门控钙通道活性的正调节等。这些证据表明,水通道蛋白 5 的缺乏可能导致 circRNA 的差异表达,进而调控与吞噬体相关的 circRNA-miRNA-mRNA 网络,导致干眼发生。

2.1.3 miRNA

miRNA 是目前研究最广泛的一类内源性 ncRNA,可调节多种生物基因组的表达。近年来,已有研究证实,miRNA 通过与其靶基因 mRNA 的 3' 非编码区碱基互补配对阻断 mRNA 翻译,从而抑制蛋白质的合成^[24]。Pucker 等^[25]对人体泪液中的细胞外囊泡进行 RNA 测序后,明确了这些囊泡中含有与炎症相关的差异性表达 miRNA,其中 9 种在干眼患者泪液中表达上调,这提示细胞外囊泡内的 miRNA

可能是促进干眼炎症反应分子机制中的重要环节。Kim 等^[26]同样也证明了 miRNA 在干燥综合征患者泪液中存在差异性表达,并阐明 miRNA 可能通过调节免疫细胞的发育及分化参与干燥综合征的发病。这些发现有望对干眼的病理机制作出解释。

2.2 转录组学在干眼诊断中的应用

干眼相关差异性表达基因的转录组学研究,有望发现潜在的分子生物标志物,作为诊断干眼的重要辅助手段,为干眼的进一步研究和临床诊断提供科学依据。

2.2.1 干眼差异性表达基因

同一生物体的细胞具有几乎相同的基因型,但大量的证据表明细胞间存在差异表达的基因^[27],转录组学技术可分析并筛选出与干眼相关的差异性表达基因。Kessal 等^[28]通过对东莨菪碱诱导干眼小鼠模型(EDE-1)及泪腺切除干眼小鼠模型(EDE-2)进行转录组学分析,发现两组模型鼠在角膜(13 个)及结膜(6 个)中只有少数共同表达的基因,而 EDE-1(角膜 55 个,结膜 37 个)和 EDE-2(角膜 51 个,结膜 65 个)存在多个差异性表达基因。另一项研究^[29]利用 RNA-seq 技术分析老年(2 岁)和年轻(3 个月)C57BL/6 小鼠睑板腺转录组中的差异性表达基因,发现 77 个基因在年轻小鼠中高表达,418 个基因在老年小鼠中高表达。这些差异表明不同的细胞信号信息都有其特定的基因调节。

2.2.2 干眼分子生物标志物

目前在干眼临床诊断及监测中,患者主观症状及客观检查是评估干眼最主要的指标,然而这些指标缺乏特异性、灵敏性及明显的相关性,常导致诊疗的延误。随着转录组学技术的快速发展以及对干眼研究的不断深入,干眼差异表达产物中越来越多的分子生物标志物被发现,可作为诊断干眼的重要辅助方法,指导干眼治疗。

我国的一项研究采用微阵列基因芯片技术初步分析了干眼患者泪液中 miRNA 的表达谱,发现健康人和干眼患者间存在 32 个差异性表达的 miRNA,其中 4 个上调,28 个下调,最终明确了泪液中的 3 个 miRNA(miR-450b-5p、miR-1283 和 miR-3671)表达水平与干眼的严重程度显著相关,其结果进一步表明,通过检测泪液中的 miRNA 表达可作为诊断干眼的分子生物标志物,对干眼的无创性鉴别诊断具有潜在意义,并对评估角膜损伤风险具有重要价值^[30]。Corrales 等^[31]第一个提出将膜相关黏蛋白 MUC1 作为干眼诊断标志物;在该研究中,中度至重度干眼患者结膜上皮中 MUC1、MUC2、MUC4 和 MUC5AC 的表达水平均较健康受试者群体显著降低,其中,MUC1 在所有测试的基因中表现出最大的灵敏度(83.3%)和特异度(87.5%),将 MUC1 作为干眼诊断标志物不仅提高了诊断的准确性,而且有助于开发治疗干眼的有效药物。

2.3 转录组学在干眼治疗中的应用

目前临床上主要应用人工泪液暂时缓解干眼患者的眼表不适症状,无法有效根治干眼,转录组学技术有望为干眼的临床治疗提供新思路及新靶点。Dauil 等^[32]通过对环孢霉素 A 治疗的干眼小鼠进行转录组学分析,发现环孢霉素 A 可显著调节干眼相关基因表达谱,并可通过调节炎症反应有效减轻干眼小鼠角膜上皮病变。有趣的是,该团队发现在干眼的过程中,角膜、结膜和泪腺存在不同的炎症基因表达,说明干眼对角膜、结膜和泪腺的转录组学特征有不同的影响。Wang 等^[33]采用 GO 和 RNA-seq 对人角膜上皮细胞及小鼠角膜进行分析,发现褪黑素对血红素氧合酶-1 具有显著的调节作用,可以通过减少过量活性氧的产生维持线粒体功能,保护角膜上皮细胞免受氧化损伤,并可减轻炎症反应。最近的一项研究表明,miR-328 的过度表达可通过抑制角膜细胞增殖促进其凋亡,最终导致干眼的发生,而抗 miR-328 寡核苷酸可促进实验动物角膜再上皮化,减少角膜上皮细胞及基质细胞的凋亡,并可有效防止睑板腺的阻塞,该团队推测抗 miR-328 寡核苷酸可能是干眼的一种新的治疗方法^[34]。

泪腺导管类器官及生物工程替代物的发现有望指导干眼的治疗。Bannier 等^[35]通过建立来源于小鼠及人类组织的泪腺导管类器官,并对其单细胞测序,揭示了泪腺上皮(LGE)细胞的异质性,并表明泪腺导管类器官中的神经递质暴露后会产生水液分泌,提示泪腺导管类器官可以用作干眼泪液诱导剂的筛选平台。Hirayama 等^[36]同时对小鼠和人的泪腺组织进行微阵列分析,确定了 LGE 细胞的基因表达谱,发现其中富集的 3 种特异性转录因子(PAX6、FOXC1 和 SIX1)过表达可促进人胚胎干细胞分化为 LGE 样细胞;这是首次从人类细胞中诱导出 LGE 样细胞,这项研究提示了从人类多能干细胞再生 LGE 细胞的可能性。这些发现是未来干眼功能性生物工程器官替代治疗的第一步,将为人类干眼提供一种可能的治疗策略。在此之前,该团队还证实了生物工程泪腺替代物可以恢复泪腺的生理功能,通过将生物工程泪腺体胚芽原位植入成人眼眶外的导管,可产生足够量的泪液保护眼表^[37]。

3 结束语

干眼的致病机制复杂,治疗棘手,转录组学技术可对干眼差异表达基因进行筛选分析,鉴定相关特异性生物标志物,从分子层面阐明干眼的发生发展机制,为干眼的早期诊断及精准治疗提供全新的思路。虽然转录组学在干眼研究领域的应用前景广阔,但目前仍面临诸多挑战。首先,转录组学分析主要应用于干眼的基础研究,尚未在临床中推广,研究仍处于起步阶段,如何将其发展完善并广泛应用于临床实践是目前亟待解决的难题之一。其次,单一

的转录组学方法难以全面阐述干眼致病机制,有必要联合代谢组学、蛋白组学等多组学进行整合分析,加深对干眼关键功能基因表达及调控规律的了解,实现干眼的精准诊疗。相信转录组学技术的广泛应用将极大地推动干眼研究领域的进步。

参考文献

- [1] JONES L, DOWNIE L E, KORB D, BENITEZ-DEL-CASTILLO J M, DANA R, DENG S X, *et al.* TFOS DEWS II management and therapy report[J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 575-628.
- [2] ZEMANOVA M. Dry eye disease. a review[J]. *Cesk Slov Oftalmol*, 2021, 77(3): 107-119.
- [3] O'NEIL E C, HENDERSON M, MASSARO-GIORDANO M, BUNYA V Y. Advances in dry eye disease treatment[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2019, 30(3): 166-178.
- [4] AMADOR C, SHAH R, GHAM S, KRAMEROV A A, LJUBIMOV A V. Gene therapy in the anterior eye segment[J]. *Curr Gene Ther*, 2022, 22(2): 104-131.
- [5] JACQUIER A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(12): 833-844.
- [6] VELCULESCU V E, ZHANG L, ZHOU W, VOGELSTEIN J, BASRAI M A, BASSETT D E, *et al.* Characterization of the yeast transcriptome[J]. *Cell*, 1997, 88(2): 243-251.
- [7] COSTA V, ANGELINI C, FEIS I D, CICCOCICOLA A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-seq[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 853916.
- [8] BYRON S A, VAN KEUREN-JENSEN K R, ENGELTHALER D M, CARPTEN J D, CRAIG D W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(5): 257-271.
- [9] CASAMASSIMA A, FEDERICO A, RIENZO M, ESPOSITO S, CICCOCICOLA A. Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1652.
- [10] DONG Z, CHEN Y. Transcriptomics: advances and approaches[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10): 960-967.
- [11] SCHADT E E, TURNER S, KASARSKIS A. A window into third-generation sequencing[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R2): R227-R240.
- [12] RAO Z, CAO L, WU H, QIU X, LIU G, HAN R. Comparative transcriptome analysis of *Thitarodes armoricus* in response to the entomopathogenic fungi *Paecilomyces hepiali* and *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Insects*, 2019, 11(1): 4.
- [13] PAPALEXI E, SATLJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(1): 35-45.
- [14] WU L, CHENG Q, WEN Z, SONG Y, ZHU Y, WANG L. IRF1 as a potential biomarker in *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2021, 25(15): 7270-7279.
- [15] LIU Z, MA H, LAI Z. Revealing the potential mechanism of *Astragalus membranaceus* improving prognosis of hepatocellular carcinoma by combining transcriptomics and network pharmacology[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 263.
- [16] LI G, JIANG H, ZHENG C, ZHU G, XU Y, SHENG X, *et al.* Long noncoding RNA MRAK009713 is a novel regulator of neuropathic pain in rats[J]. *Pain*, 2017, 158(10): 2042-2052.
- [17] LI J, YANG K, PAN X, PENG H, HOU C, XIAO J, *et al.* Long noncoding RNA MIAT regulates hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell injury via inhibiting the caspase-1-dependent pyroptosis and apoptosis in dry eye disease[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 3269-3283.
- [18] YANG Y, CHEN M, ZHAI Z, DAI Y, GU H, ZHOU X, *et al.* Long non-coding RNAs Gabarapl2 and Chrb2 positively regulate inflammatory signaling in a mouse model of dry eye[J]. *Front Med*, 2021, 8: 808940.
- [19] TANG Z, ZHANG Y, WU H, LIU C, LIAN Y, LING H, *et al.* Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in mixed dry eye disease[J]. *Contrast Media Mol Imaging*,

- 2022,2022;1534142.
- [20] PATOP I L, WÜST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs[J]. *EMBO J*, 2019, 38(16):e100836.
- [21] ZHANG C, HU J, YU Y. CircRNA is a rising star in researches of ocular diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:850.
- [22] SU L C, XU W D, LIU X Y, FU L, HUANG A F. Altered expression of circular RNA in primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(12):3425-3433.
- [23] LIU Y, DI G, HU S, ZHAO T, XU X, WANG X, *et al*. Expression profiles of CircRNA and mRNA in lacrimal glands of AQP5-/- mice with primary dry eye[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:1010.
- [24] HUSSAIN M U. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2):405-413.
- [25] PUCKER A D, NGO W, POSTNIKOFF C K, FORTINBERRY H, NICHOLS J J. Tear film miRNAs and their association with human dry eye disease[J]. *Curr Eye Res*, 2022, 47(11):1479-1487.
- [26] KIM Y J, YEON Y, LEE W J, SHIN Y U, CHO H, SUNG Y K, *et al*. Comparison of microRNA expression in tears of normal subjects and Sjögren syndrome patients[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(14):4889-4895.
- [27] HWANG B, LEE J H, BANG D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8):1-14.
- [28] KESSAL K, DAULL P, CIMBOLINI N, FERAILLE L, GRILLO S, DOCQUIER M, *et al*. Comparison of two experimental mouse dry eye models through inflammatory gene set enrichment analysis based on a multiplexed transcriptomic approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10770.
- [29] PARFITT G J, BROWN D J, JESTER J V. Transcriptome analysis of aging mouse meibomian glands[J]. *Mol Vis*, 2016, 22:518-527.
- [30] WANG Q, XIE X, LI H, HAO S. Discovery of microRNA expression profiles involved in regulating TGF- β 2 expression in the tears of dry eye patients[J]. *Ann Clin Biochem*, 2020, 57(6):420-428.
- [31] CORRALES R M, NARAYANAN S, FERNÁNDEZ I, MAYO A, GALARRETA D J, FUENTES-PÁEZ G, *et al*. Ocular mucin gene expression levels as biomarkers for the diagnosis of dry eye syndrome[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(11):8363-8369.
- [32] DAULL P, NAGANO T, GROS E, FERAILLE L, BARABINO S, GARRIGUE J S. Ocular surface response of two preservative-free cyclosporine A emulsion eye drops in a mouse model of dry eye[J]. *Curr Eye Res*, 2021, 46(8):1096-1104.
- [33] WANG B, ZUO X, PENG L, WANG X, ZENG H, ZHONG J, *et al*. Melatonin ameliorates oxidative stress-mediated injuries through induction of HO-1 and restores autophagic flux in dry eye[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 205:108491.
- [34] LIAO C H, TSENG C L, LIN S L, LIANG C L, JUO S H H. microRNA therapy for dry eye disease[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2022, 38(2):125-132.
- [35] BANNIER-HÉLAOUËT M, POST Y, KORVING J, TRANI BUS-TOS M, GEHART H, BEGTHEL H, *et al*. Exploring the human lacrimal gland using organoids and single-cell sequencing[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(7):1221-1232. e7.
- [36] HIRAYAMA M, KO S B H, KAWAKITA T, AKIYAMA T, GOPARAJU S K, SOMA A, *et al*. Identification of transcription factors that promote the differentiation of human pluripotent stem cells into lacrimal gland epithelium-like cells[J]. *NPJ Aging Mech Dis*, 2017, 3:1.
- [37] HIRAYAMA M, OGAWA M, OSHIMA M, SEKINE Y, ISHIDA K, YAMASHITA K, *et al*. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ[J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2497.

Application of transcriptomics in dry eye research

LUO Dan, LI Kai, GAO Weiping

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Corresponding author: GAO Weiping, E-mail: 260790@njucm.edu.cn

[Abstract] Dry eye is a common chronic ocular surface disease in ophthalmology. Its pathogenesis is still not fully clarified, and there has been no effective prevention and treatment strategy. In recent years, with the booming development of molecular biology technologies such as gene chip technology and transcriptome sequencing technology, transcriptomic research on the dry eye has made some progress. In this article, we review the application of transcriptomics in dry eye research and explore the pathogenesis of dry eye with a view to providing new ideas for the clinical treatment of dry eye and potential targets for the development of new drugs for dry eye.

[Key words] dry eye; transcriptomics; sequencing technology