



安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：综合生物信息学分析及实验验证糖尿病视网膜病变中血管新生相关基因的作用
作者：李鹏，梁坤，吴峰，李佳，刘伦，陶玉林
收稿日期：2026-02-06
网络首发日期：2026-03-16
引用格式：李鹏，梁坤，吴峰，李佳，刘伦，陶玉林. 综合生物信息学分析及实验验证糖尿病视网膜病变中血管新生相关基因的作用[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260314.1307.008>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

综合生物信息学分析及实验验证糖尿病视网膜病变中血管新生相关基因的作用

李鹏¹, 梁坤², 吴峰¹, 李佳³, 刘伦⁴, 陶玉林²

(安徽医科大学附属阜阳医院¹眼科、³神经外科, 阜阳 236000; ²安徽医科大学第二附属医院眼科, 合肥 230000; ⁴安徽医科大学第一附属医院眼科, 合肥 230000)

摘要 **目的** 探讨糖尿病视网膜病变(DR)发生发展过程中血管新生相关分子机制。**方法** 从Gencard网站获取血管新生相关基因, 并与DR数据集(GSE60436和GSE94019)的差异表达基因取交集, 随后通过功能富集、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络筛选候选基因并评估其诊断价值。基因集富集分析(GSEA)探讨候选基因潜在通路, 免疫浸润分析揭示候选基因与免疫细胞的相关性。细胞实验验证纤维连接蛋白1(FNI)在高糖处理下的人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)中的作用。**结果** 共筛选到237个血管新生相关差异基因, 富集于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路(PI3K-Akt)、肿瘤抑制蛋白53(P53)、肿瘤坏死因子(TNF)和Janus激酶/信号转导及转录激活因子信号通路(JAK-STAT)等通路。其中胶原蛋白I型 $\alpha 1$ 链(COL1A1)、COL1A2、FNI、肿瘤坏死因子(TNF)和肿瘤抑制蛋白53(TP53)为关键基因, 且具有较高诊断价值。GSEA提示这些基因参与P53等多条信号通路。CIBERSORTx分析发现其与多种免疫细胞浸润显著相关。高糖处理导致FNI表达升高。在高糖诱导的HRMEC中, 与对照si-NC组相比, si-FNI组HRMEC的增殖、迁移及管腔形成能力均显著下降, 同时P53蛋白表达升高。**结论** FNI在DR血管新生中具有重要作用, 可能成为潜在的诊断和治疗靶点。

关键词 糖尿病视网膜病变; 血管生成; FNI; P53信号通路; 管腔形成

中图分类号 R 77

文献标志码 A

Integrated bioinformatics analysis and experimental validation of angiogenesis-related genes in diabetic retinopathy

Li Peng¹, Liang Kun², Wu Feng¹, Li Jia³, Liu Lun⁴, Tao Yulin²

(¹Department of Ophthalmology, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University,

Fuyang 236000; ²Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical

2026-02-06 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号: 2508085QH303)

作者简介: 李鹏, 男, 硕士研究生, 主治医师;

陶玉林, 男, 博士, 通信作者, E-mail: yelinto@163.com;

刘伦, 男, 硕士研究生, 主任医师, 通信作者, E-mail: 13956956362@163.com

University, Hefei 230000; ³Department of Neurosurgery, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang 236000; ⁴Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230000)

Abstract *Objective* To investigate the molecular mechanisms related to angiogenesis during the development and progression of diabetic retinopathy (DR). *Methods* Angiogenesis-related genes were obtained from the Gencard website and intersected with differentially expressed genes from DR datasets (GSE60436 and GSE94019). Functional enrichment and protein-protein interaction (PPI) networks were then used to screen candidate genes and evaluate their diagnostic value. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to explore potential pathways underlying candidate genes, and immune infiltration analysis revealed associations between candidate genes and immune cells. Cellular experiments were conducted to validate the role of fibronectin 1 (FN1) in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) under high glucose (HG) conditions. *Results* A total of 237 differentially expressed genes related to angiogenesis were identified, enriched in pathways such as phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway (PI3K-Akt), tumor suppressor protein 53 (P53), tumor necrosis factor (TNF), and Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription signaling pathway (STAT). Among them, collagen type I alpha 1 chain (*COL1A1*), *COL1A2*, *FNI*, tumor necrosis factor (*TNF*), and tumor protein p53 (*TP53*) were key genes with high diagnostic value. GSEA indicated that these genes were involved in multiple signaling pathways, including P53. CIBERSORTx analysis revealed significant associations with the infiltration of multiple immune cells. HG treatment led to the upregulation of FN1. In HG-induced HRMECs, compared with the si-NC control group, si-FN1 significantly reduced cell proliferation, migration, and tube formation, while P53 protein expression was increased. *Conclusion* This study reveals the important role of *FNI* in angiogenesis in DR and suggests that it may be a potential diagnostic and therapeutic target.

Key words Diabetic retinopathy; Angiogenesis; *FNI*; P53 signaling pathway; Tube formation

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2508085QH303)

Corresponding author Liu Lun, E-mail: 13956956362@163.com

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一^[1]。持续的高血糖、高血压和高血脂, 以及吸烟和饮酒等生活方式可导致 DR 的发生和发展。目前, DR 的治疗方法主要包括视网膜激光光凝术、玻璃体内注射血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF) 抑制剂以及玻璃体切除术等。研究^[2]表明, 作为 VEGF 下游的功能分子, 纤维连接蛋白 1 (fibronectin 1, *FN1*) 在病理性视网膜新生血管形成中发挥重要作用, 能够促进内皮-间质转化并推动异常血管生成。*FN1* 还被鉴定为原发性开角型青光眼 (primary open-angle glaucoma, POAG) 的关键基因, 与免疫相关通路、氧化应激和内质网应激有关^[3]。除了血管和神经炎症机制外, 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的有关研究^[4]表明, *FN1* 在循环成纤维细胞和骨髓来源的巨噬细胞中表达显著上调, 并在视网膜下纤维化诱导后进一步升高。该研究旨在利用整合生物信息学和实验验证方法, 识别血管生成相关基因, 重点分析 *FN1* 在 DR 血管生成中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株来源

人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMEC) 来源于江苏海星生物科技有限公司 (货号: PAHX-C115)。在 HRMEC 完全培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养条件下维持培养。

1.1.2 抗体和试剂

HRMEC 完全培养基 (货号: CM-H130) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 葡萄糖 [D-(+)-Glucose, 货号: HY-B0389] 购自美国 MedChemExpress 有限责任公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒 (货号: ml095229) 和 TRIzol 试剂 (货号: ml095476) 购自上海酶联生物科技有限公司; Lipofectamine™ 3000 转染试剂 (货号: L3000008) 由 Thermo Fisher Scientific (美国) 提供; 胎牛血清 (FBS, 货号: 10099-141) 购自美国 Gibco 公司; PrimeScript™ RT reagent Kit 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自大连 Takara 公司; Transwell 小室 (8 μm 孔径, 货号: 3422) 购自美国 Corning 公司; Matrigel 基质胶 (货号: C0372-5 mL), 结晶紫色液 (货号: C0121-100 mL), RIPA 裂解液 (货号: P0013B), BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: P0010), ECL 化学发光检测试剂盒 (BeyoECL Plus, 货号: P0018S) 和 PVDF 膜 (货号: FFP33) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; FN1 抗体 (兔多克隆, 货号: 15613-1-AP, 1 : 2 000), P53 抗体 (兔多克隆, 货号: 10442-1-AP, 1 : 5 000), GAPDH 抗体 (兔多克隆, 货号: 10494-1-AP, 1 : 5 000) 以及 HRP-标记山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: SA00001-2, 1 : 5 000) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

CO₂培养箱（型号：Heracell Vios 160i CR，美国 Thermo Scientific 公司）；倒置显微镜（型号：IXplore™ IX85，日本 Olympus 公司）；酶标仪（型号：Bio-Rad iMark 美国 Microplate Absorbance Reader 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（ABI 7500 Real-Time PCR System，美国 Applied Biosystems 公司）；电泳及转膜系统（型号：Bio-Rad Mini-PROTEAN 美国 Tetra Cell 公司）；凝胶成像系统（型号：Gel Doc XR+ Gel Documentation System，美国 Bio-Rad 公司）。

1.2 方法

1.2.1 DR 数据库的分析和差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs）的鉴定

从基因表达综合数据库（gene expression omnibus, GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）下载 2 个与 DR 相关数据集，分别是 GSE60436（6 个 DR 样本，3 个对照样本）和 GSE94019（9 个 DR 样本，4 个对照样本）。利用 R 语言（版本号 4.3.2）的“limma”包对两个数据集进行 DEGs 分析。其中，GSE60436 数据集的筛选标准为 $|FC| \geq 1.3$ ，GSE94019 的筛选标准为 $|FC| \geq 1.5$ ，且都满足 $P < 0.05$ ，结果均通过“ggplot”包进行可视化。

1.2.2 DR 相关基因的功能富集分析以及蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络构建

在 Genecard 网站（<https://www.genecards.org>）检索了 5 928 个“血管新生相关基因”，基于相关性评分 > 1 的标准筛选得到 1 861 个候选基因。使用在线工具对 1 861 个血管新生相关基因以及 GSE60436 和 GSE94019 中上调表达基因和下调表达基因进行交集分析。随后 DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/>）对得到的交集基因进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）和基因本体论（gene ontology, GO）富集分析。随后，基于 STRING 数据库（<https://string-db.org/>）（highest confidence=0.900）构建 PPI 网络，并使用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件（Degree 算法）筛选前 5 个关键基因。最后对 5 个候选基因之间进行皮尔森相关性分析，通过 R 语言的 lggcorrplot 包可视化。

1.2.3 DR 中候选基因的验证和功能鉴定

为了进一步验证枢纽基因的诊断价值并探索其潜在功能，使用 Sangerbox 在线平台（版本 3.0, <http://sangerbox.com/>）进行了受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线分析，计算曲线下面积（area under the curve, AUC）和 95% 置信区间（confidence interval, CI），以评估 GSE60436 和 GSE94019 数据集中候选基因（COL1A1、COL1A2、FNI、TNF、

TP53) 的诊断性能。在 GSE94019 数据集中, 按照候选基因中位表达水平将样本分成 2 组 (高、低表达组)。基于 MSigDB 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>) 中的 KEGG 基因集进行基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA), 以识别候选基因显著富集的信号通路。最后, 比较两个数据集中 DR 组和对照组中候选基因的表达水平, 并使用箱线图对结果进行可视化。

1.2.4 DR 中候选基因的免疫浸润分析

将 GSE94019 数据集样本上传至 CIBERSORTx 平台 (<https://cibersortx.stanford.edu/>), 以 LM22 基因集作为参考, 分析每个样本中 22 种免疫细胞的浸润比例。随后评估 5 个血管新生相关候选基因 (COL1A1、COL1A2、FNI、TNF、TP53) 与免疫细胞浸润水平之间的 Pearson 相关性。

1.2.5 细胞处理和转染

在培养基中加入 30 mmol/L 葡萄糖处理 HRMEC 细胞 24 h, 以建立 DR 细胞模型。按照说明书说明, 采用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号: L3000008) 将 siRNA 对照 (si-NC) 或靶向 FNI 的 siRNA (si-FNI, 购自上海 GenePharma 公司) 转染至 HRMEC 细胞, 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.2.6 qRT-PCR

采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 在 ABI 7500 Real-Time PCR System 上进行, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 进行扩增。GAPDH 作为内参基因, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>FNI</i>	AAAGACCCCTTTCGTCACCC	TCTTGTCTACATTTCGGCGG
<i>GAPDH</i>	CTAGCTGGCCCGATTCTCC	ATGGAATTTGCCATGGGTGG

1.2.7 Western blot 实验

采用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 并使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜。随后在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 并加入 FN1、P53 和 GAPDH 一抗, 于 4 °C 条件下孵育过夜。次日加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 使用 ECL 发光试剂进行显色, 条带信号通过 Bio-Rad 凝胶成像系统检测。

1.2.8 细胞增殖实验

转染处理后的 HRMEC 细胞接种于 96 孔板 (2×10^3 个/孔), 在 0、24、48、72、96 h 检测细胞增殖情况。每个时间点加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 继续孵育 2 h 后, 于 450 nm 波长下使用酶标仪测定吸光度 (absorbance, A) 值。

1.2.9 细胞迁移实验

将 5×10^4 个细胞悬液 ($200 \mu\text{L}$, 无血清) 加入 Transwell 上室, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% FBS 培养基作为趋化因子。37 °C 孵育 24 h 后, 棉签擦去未迁移细胞, 甲醇固定 15 min 并用 0.1% 结晶紫染色 30 min。随机选取 5 个视野, 显微镜拍照并计数迁移细胞数。

1.2.10 管腔形成实验

在 96 孔板中预铺 Matrigel 基质胶, 于 37 °C 孵育 30 min 凝胶化。将 2×10^4 个处理后的 HRMEC 细胞接种于孔内, 37 °C 孵育 6 h 后拍照。采用倒置显微镜观察, 并用 ImageJ 软件分析管腔分支数与总长度。

1.3 统计学处理

所有实验均至少重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 Student's t 检验 (两组比较) 或单因素方差分析 (one-way ANOVA) (多组比较), 并进行 Tukey 事后检验。数据分析在 GraphPad Prism 9.0 软件 (美国 GraphPad Software) 上完成。相关性分析采用 Pearson 相关系数。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DR 相关基因的富集分析

从 GSE60436 数据集中共筛选到 2 550 个上调基因和 2 007 个下调基因 (图 1A); 在 GSE94019 数据集中则筛选到 4 029 个上调基因和 2 502 个下调基因 (图 1B)。将这些 DEGs 与血管新生相关基因取交集后, 共得到 237 个重叠基因 (其中 227 个上调, 10 个下调) (图 2)。GO 富集分析结果显示, 这些基因主要富集在生物过程 (biological process, BP), 分子功能 (molecular function, MF), 细胞组分 (cellular component, CC) 中的条目包括血管生成 (angiogenesis)、炎症反应 (inflammatory response)、以及蛋白结合 (protein binding) 等 (图 3A—3C)。在 KEGG 通路分析中, 这些基因富集于 PI3K-Akt、p53 及 JAK-STAT 等经典信号通路 (图 3D)。

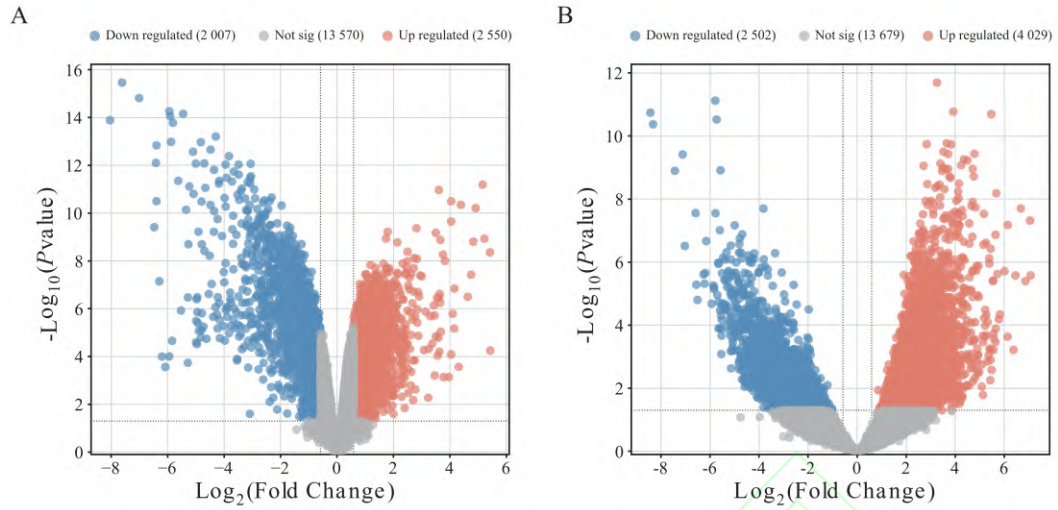


图 1 DR 相关数据集中差异表达基因的鉴定

Fig.1 Identification of differentially expressed genes in DR-related datasets

注：A: Volcano plot of DEGs in the GSE60436 dataset; B: Volcano plot of DEGs in the GSE94019 dataset.

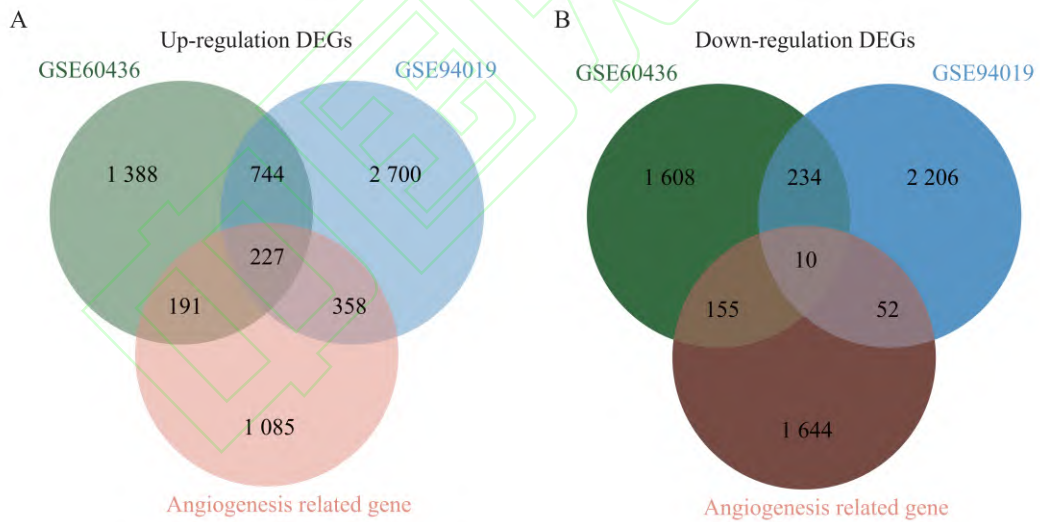


图 2 GSE60436、GSE94019 与血管新生相关基因的鉴定

Fig.2 Identification of GSE60436, GSE94019, and angiogenesis-related genes

注：A: Venn diagram of upregulated genes; B: Venn diagram of downregulated genes.

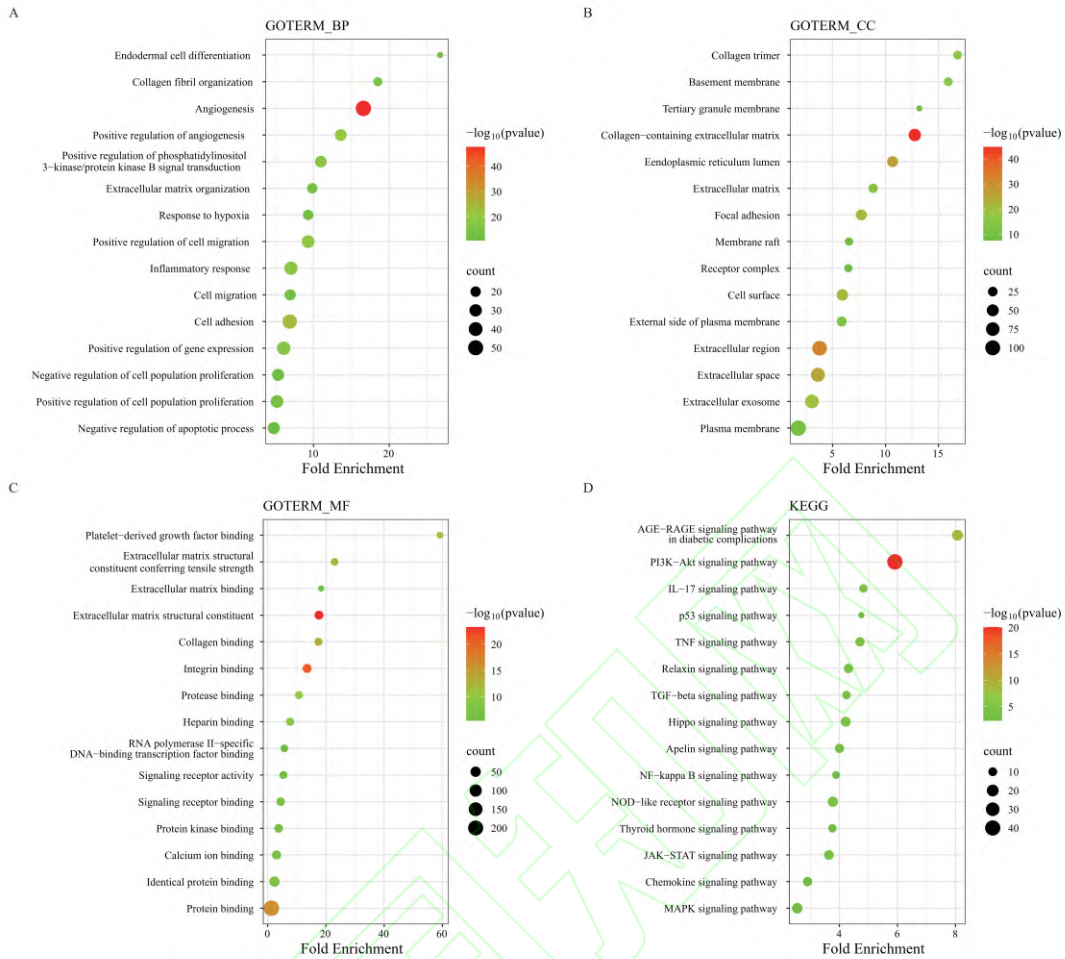


图 3 糖尿病视网膜病变中血管新生相关基因的功能富集分析

Fig.3 Functional enrichment analysis of angiogenesis-related genes in diabetic retinopathy

注: A: GO BP analysis indicated enrichment in angiogenesis, inflammatory response, cell adhesion, and hypoxia response; B: GO CC analysis revealed enrichment in extracellular matrix, basement membrane, and collagen-containing extracellular matrix; C: GO MF analysis showed enrichment in protein binding, collagen binding, and integrin binding; D: KEGG pathway enrichment indicated significant pathways including PI3K-Akt, p53, TNF, TGF- β , JAK-STAT, and AGE-RAGE signaling pathways.

2.2 DR 中血管新生相关的关键基因的筛选和临床诊断价值分析

STRING 数据库构建了 DR 中 237 个血管新生相关基因的 PPI 网络, 结果显示 162 个基因之间存在紧密的相互作用关系 (图 4A)。进一步通过 CytoHubba 插件分析, 筛选出前 5 个血管新生相关的关键基因 (*COL1A1*、*COL1A2*、*FNI*、*TNF*、*TP53*) (图 4B)。相关性分析显示, 这 5 个关键基因之间呈显著的正相关关系 (图 3C)。为评估关键基因的诊断价值, 利用 GSE60436 和 GSE94019 两个独立数据集绘制 ROC 曲线。结果显示, 在 GSE60436

数据集中, *COL1A1*、*COL1A2*、*FNI*、*TNF* 和 *TP53* 的 AUC 值均为 1.000 (图 5A—5E)。在 GSE94019 数据集中, *COL1A1*、*COL1A2*、*FNI*、*TNF* 和 *TP53* 的 AUC 分别为 1.000、0.889、0.917、0.806 和 0.889, 进一步验证了这些基因在 DR 中具有较高的诊断价值 (图 5F—5J)。

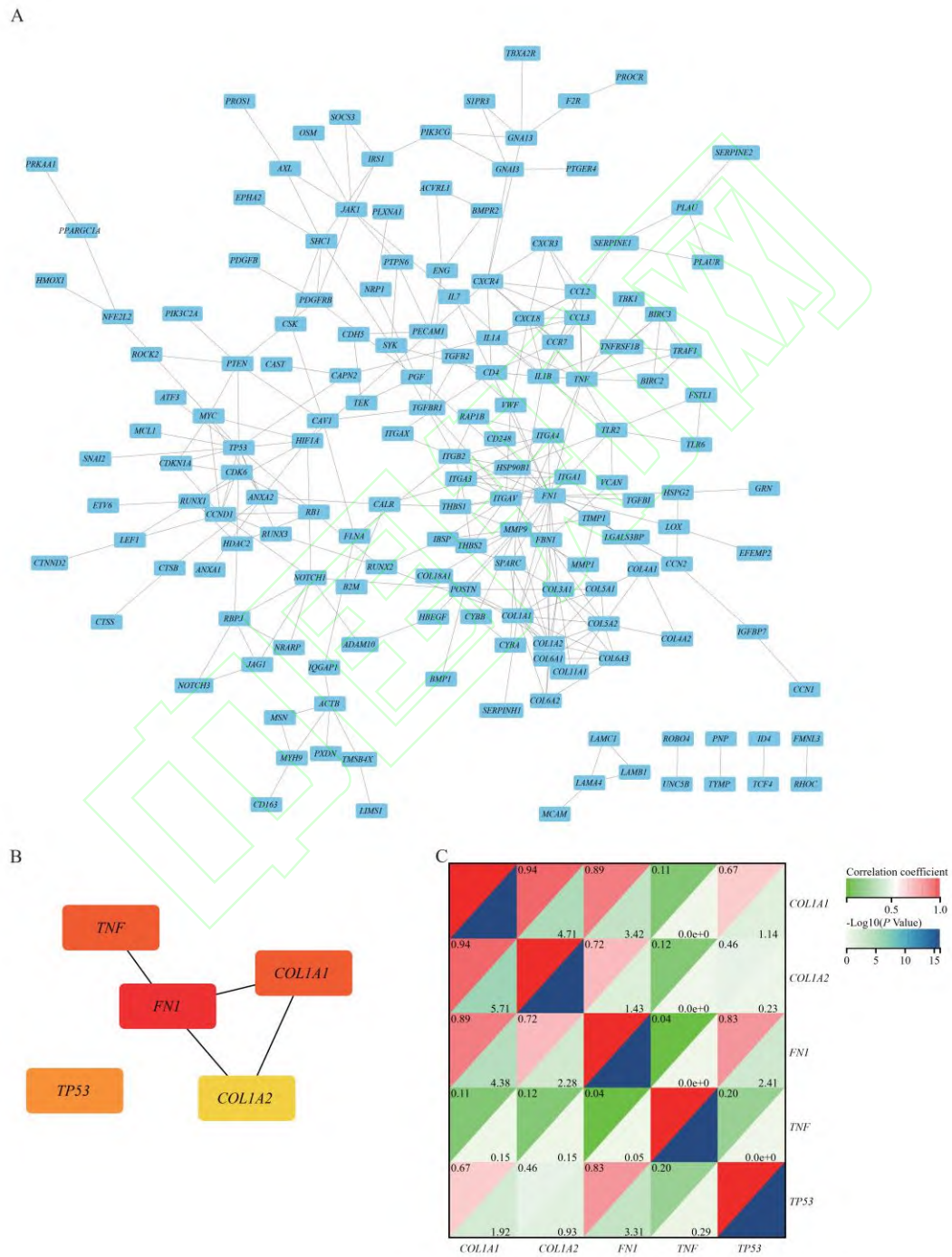


图 4 PPI 网络及候选基因相关性分析

Fig.4 PPI network and correlation analysis of candidate genes

注: A: PPI network of angiogenesis-related genes in DR, consisting of 162 nodes and 298 edges;
 B: The Degree algorithm identified five candidate genes (*COL1A1*, *COL1A2*, *FNI*, *TNF*, and *TP53*); C: Heat map showed the Pearson correlation between the five candidate genes.

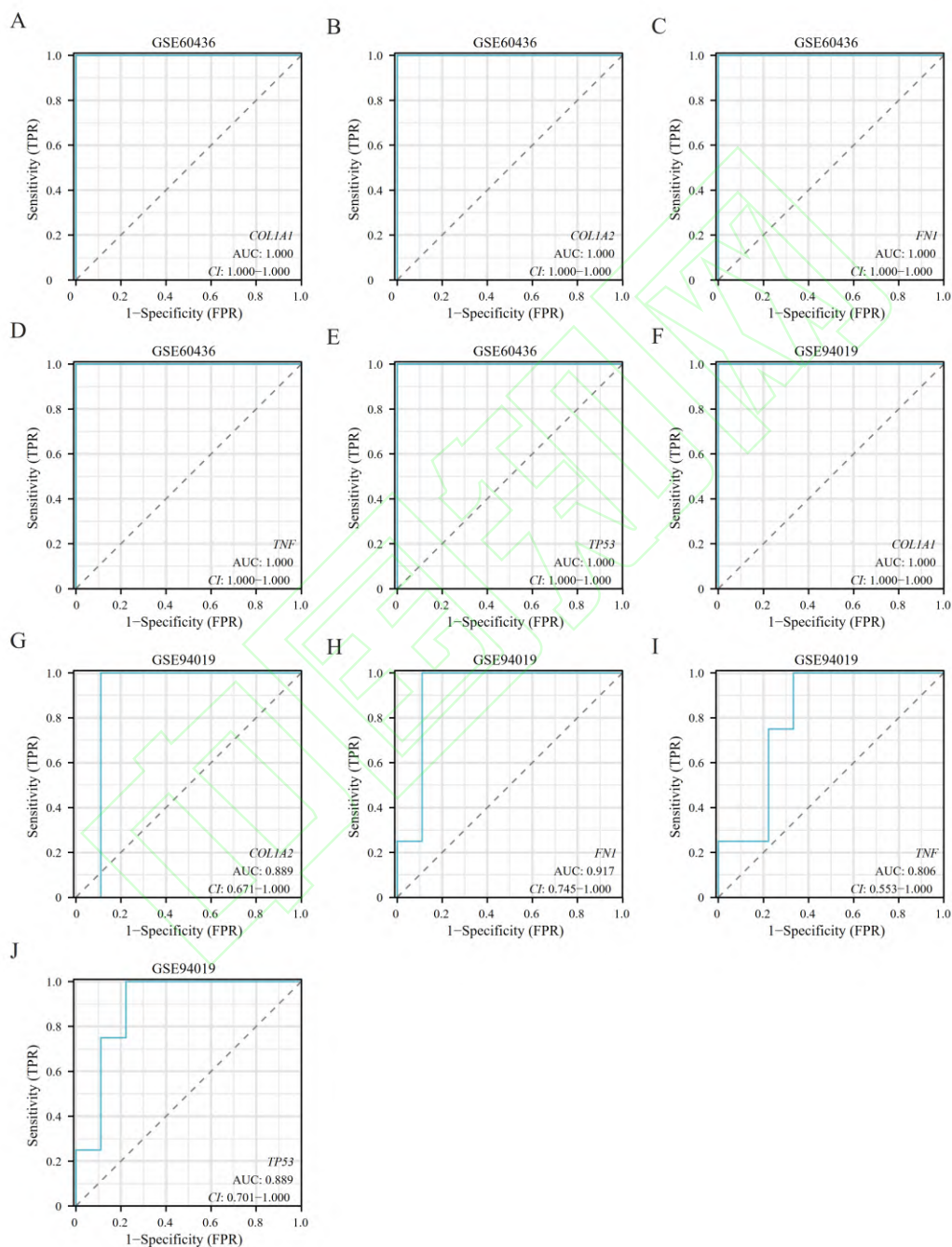


图 5 GSE60436 和 GSE94019 数据集中 5 个基因的 ROC 曲线分析

Fig.5 ROC curve analysis of five genes in the GSE60436 and GSE94019 datasets

注: A-E: ROC curves for *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI*, *TNF*, and *TP53* in the GSE60436 dataset; F-J:

ROC curves for *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI*, *TNF*, and *TP53* in the GSE94019 dataset.

2.3 GSEA 结果揭示关键通路

基于 GSE94019 数据集，对 5 个候选基因的高低表达组进行了 GSEA 分析。结果表明，*COL1A1* 显著富集于 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 信号通路，细胞黏附分子 (cell adhesion molecules, CAMs) 等通路 (图 6A)；*COL1A2* 与甘油脂代谢 (glycerolipid metabolism, GLM) 显著关联 (图 6B)；*FNI* 富集于细胞周期、凋亡及 ECM 受体相互作用等通路 (图 6C)；*TNF* 与 JAK-STAT、NOD-like receptor 及 TLR 信号通路密切相关 (图 6D)；而 *TP53* 则富集于神经营养因子及 P53 信号通路等中 (图 6E)。这些结果提示这 5 个基因可能通过多条信号通路参与 DR 的发生发展。

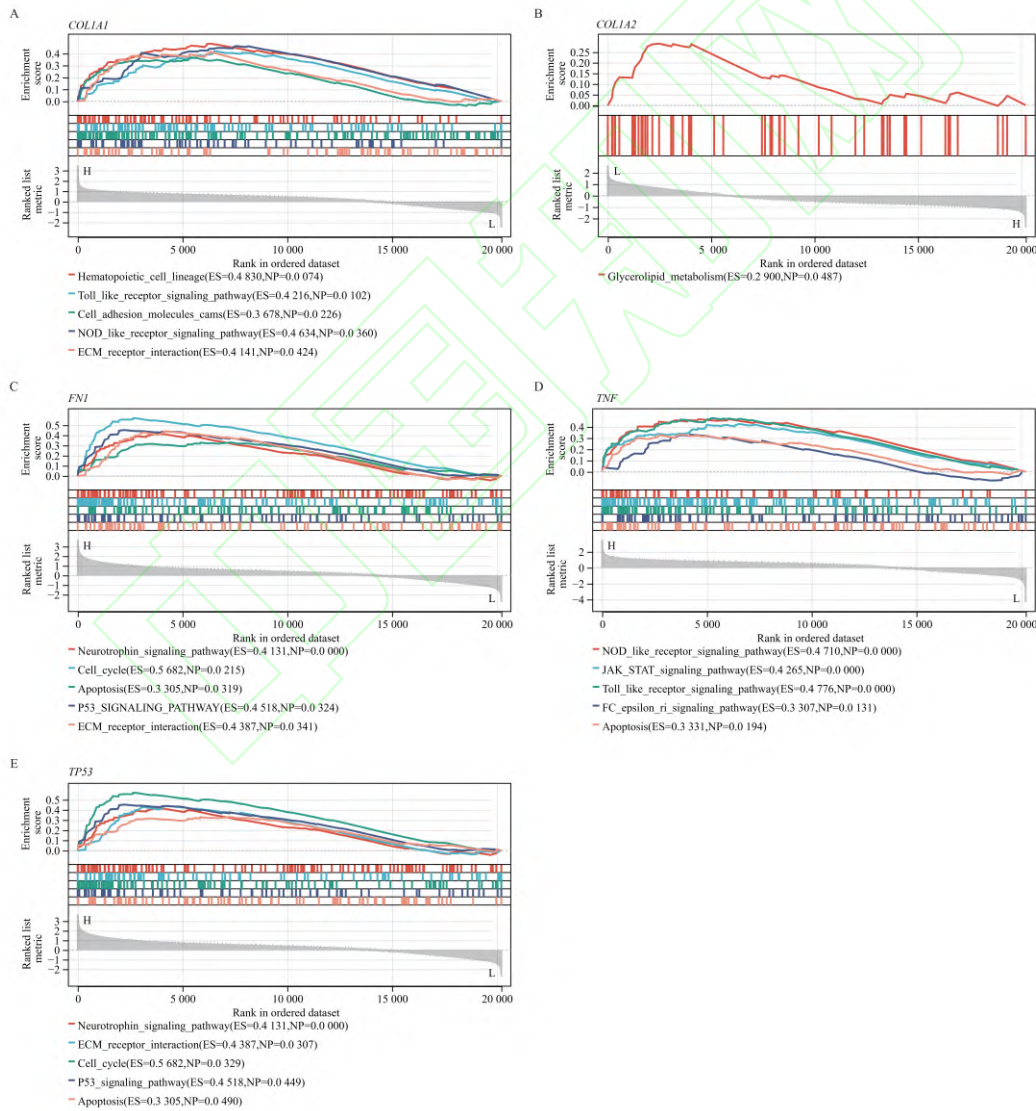


图 6 基于 GSE94019 数据集的候选基因的 GSEA

Fig.6 GSEA of candidate genes based on the GSE94019 dataset

注：A-E: GSEA plots showed the enriched KEGG pathways associated with *COL1A1*, *COL1A2*, *FNI*, *TNF*, and *TP53* expression in the GSE94019 dataset; The x-axis represents the rank of genes in the ordered dataset, while the y-axis indicates the enrichment score (ES); The normalized enrichment score (NES) and nominal *P* values are displayed in each panel. ES represents the enrichment score, and NP represents the nominal *P* value.

2.4.5 个血管新生相关基因在 DR 中高表达

在独立数据集 GSE60436 和 GSE94019 中，对 5 个候选基因的表达水平进行验证。结果显示，这些基因在 GSE60436 数据集的 DR 组中较对照组显著上调（图 7A—7E, $P < 0.05$ ）。在 GSE94019 数据集中，*COL1A1*、*COL1A2*、*FNI* 和 *TP53* 也在 DR 样本中表达显著上调（图 7F—7H、7J, $P < 0.05$ ），而 *TNF* 的差异无统计学意义（图 7I）。

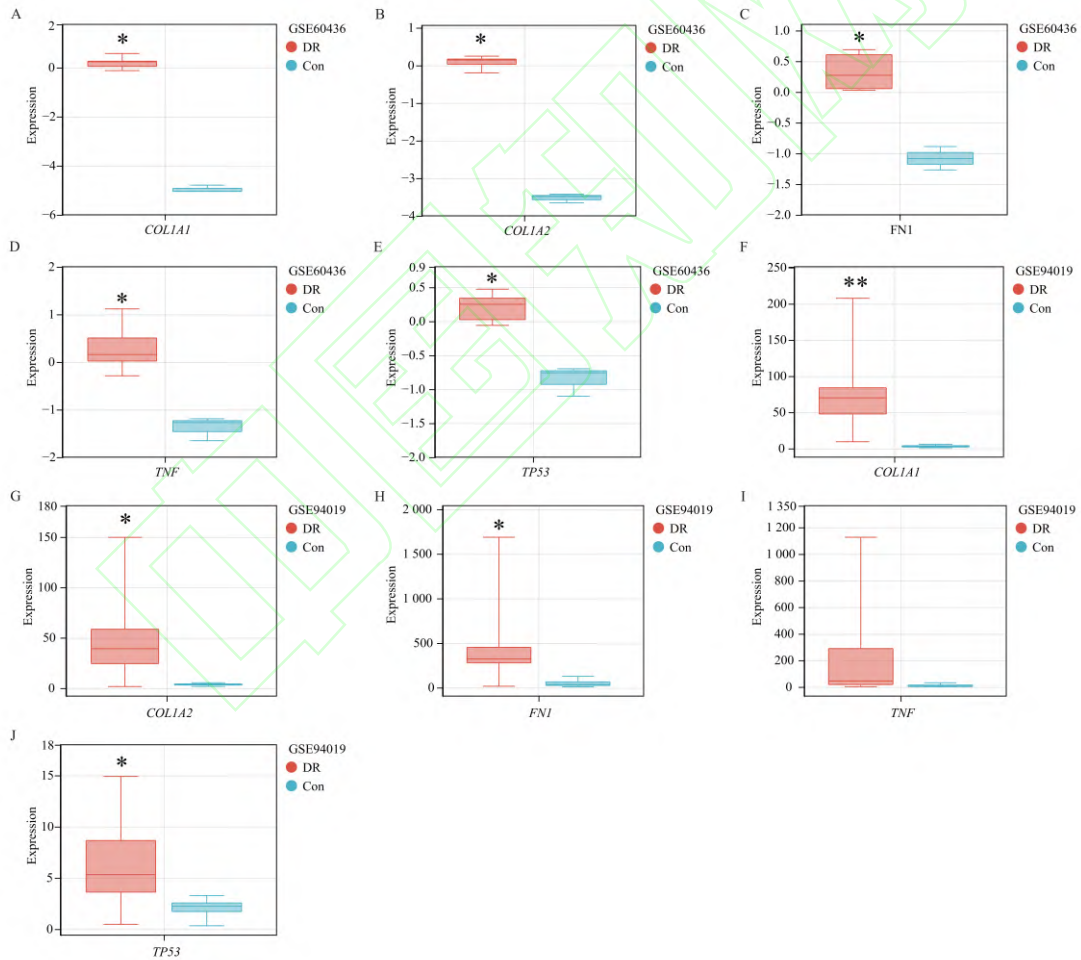


图 7 糖尿病视网膜病变中 5 个候选基因的表达水平验证

Fig.7 Validation of the expression levels of five candidate genes in diabetic retinopathy

注：A-J: Boxplots showed the expression levels of *COL1A1* (A, F), *COL1A2* (B, G), *FNI* (C, H), *TNF* (D, I), and *TP53* (E, J) in DR samples and controls from the GSE60436 and GSE94019

datasets; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con group.

2.5 血管新生相关基因的免疫浸润分析

使用 CIBERSORTx 算法评估了 GSE94019 数据集样本中 22 种免疫细胞的浸润比例。结果显示，免疫细胞在不同样本中的分布差异明显（图 8A）。随后对 5 个血管新生相关关键基因（*COL1A1*、*COL1A2*、*FNI*、*TNF*、*TP53*）与免疫细胞浸润水平进行 Pearson 相关性分析。结果表明，这些基因与多种免疫细胞显著相关，其中 *COL1A1*、*COL1A2* 与浆细胞，初始型 CD4 T 细胞，调节性 T 细胞（T cell regulatory, Tregs）等呈正相关；*FNI* 和 *TP53* 与浆细胞，初始型 CD4 T 细胞显著正相关；而 *TNF* 与活化型自然杀伤（natural killer, NK）细胞、活化型肥大细胞呈正相关。结果提示这些基因可能通过免疫细胞浸润参与 DR 的发生发展（图 8B）。

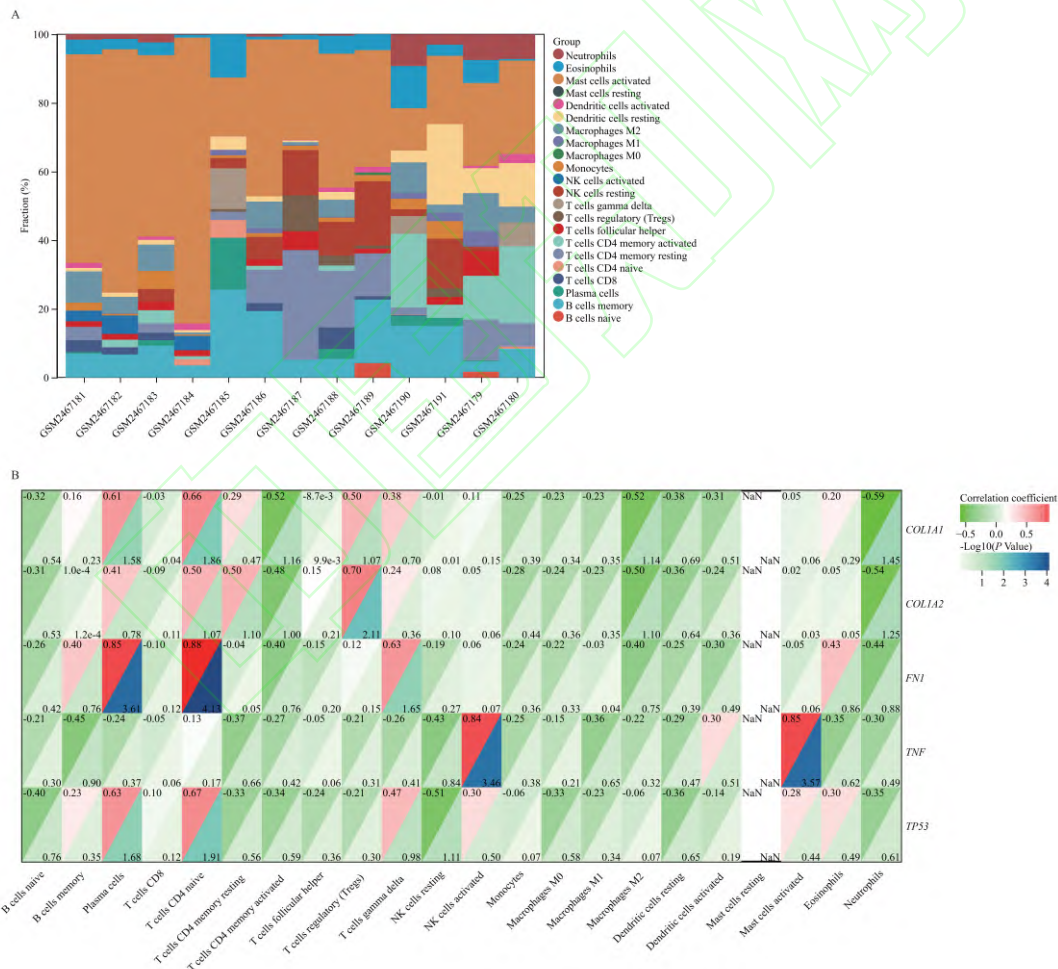


图 8 GSE94019 数据集中的免疫浸润分析

Fig.8 Immune infiltration analysis in the GSE94019 dataset

注：A: Stacked barplot showed the fraction of 22 immune cell subsets in each sample, estimated by CIBERSORTx using the LM22 signature matrix; The x-axis lists the GSM sample IDs, and the

y-axis indicates the proportion of each immune cell type; B: Heatmap of Pearson correlations between the expression of five genes (*COL1A1*, *COL1A2*, *FN1*, *TNF*, *TP53*) and the infiltration levels of the 22 immune cell types.

2.6 *FN1* 沉默抑制高糖 (high glucose, HG) 诱导的 HRMEC 的增殖

通过综合生物信息学分析筛选出 5 个潜在关键基因。综合差异表达分析、PPI 网络结果及诊断效能曲线后, *FN1* 表现出最高的连接度与诊断价值。qRT-PCR 和 Western blot 结果表明, *FN1* 在 HG 处理的 HRMEC 细胞中显著上调(图 9A-9C)。进一步通过 siRNA 敲低 *FN1* 发现, 其 mRNA 和蛋白水平均明显下降, 验证了转染效率(图 9D-9F)。此外, CCK-8 检测显示, *FN1* 沉默显著抑制了高糖处理后 HRMEC 的增殖能力(图 9G)。

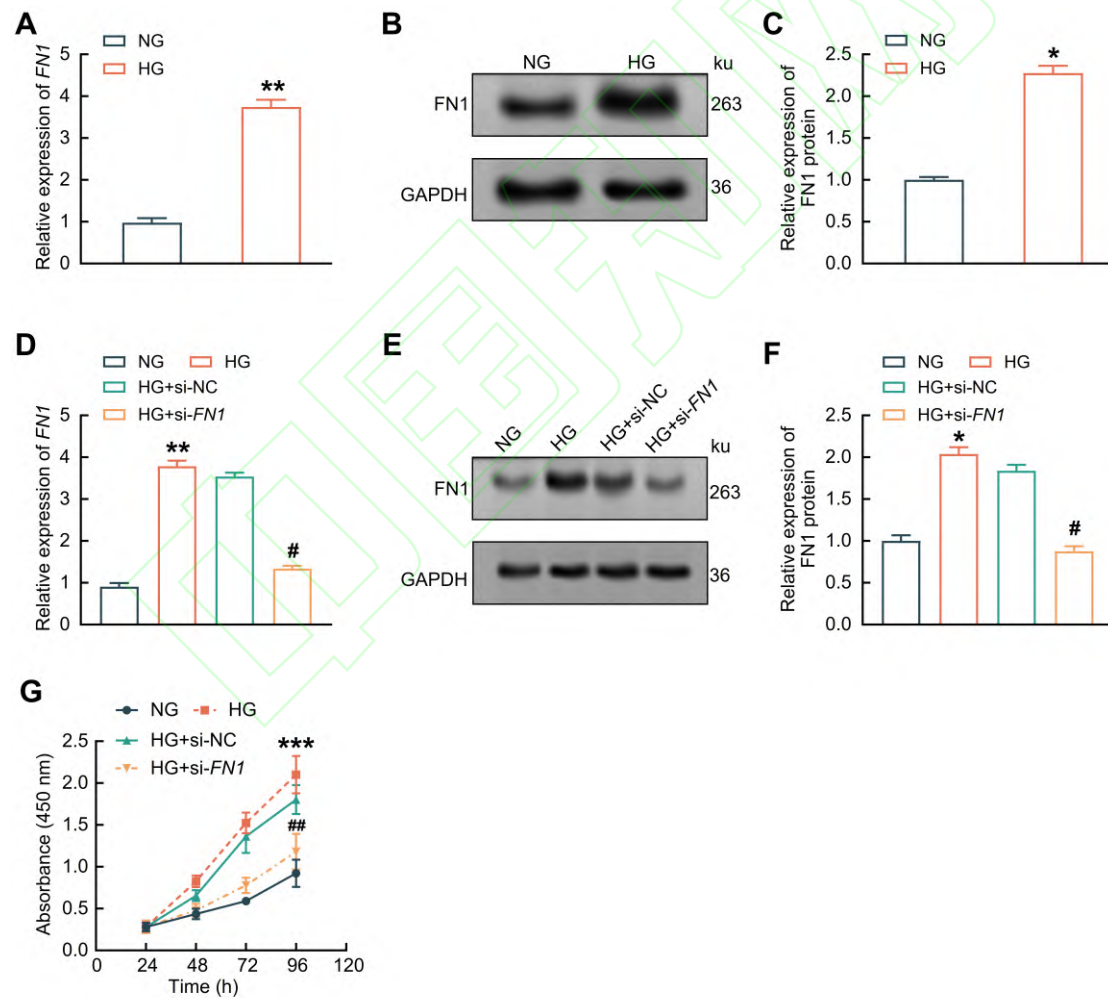


图 9 24 h 高糖刺激下 *FN1* 敲低对 HRMEC 增殖的影响

Fig.9 The effects of *FN1* knockdown on HRMEC proliferation under high glucose

stimulation

注: A: Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of FN1 mRNA expression levels; B-C: Western blot analysis of FN1 protein expression levels; D: qRT-PCR analysis of FN1 knockdown efficiency in the DR cell model; E-F: Western blot analysis of FN1 knockdown efficiency in the DR cell model; G: After FN1 knockdown in the DR cell model, CCK-8 assay was used to detect the proliferation of HRMECs at 0, 24, 48, 72, and 96 h in different treatment groups; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HG+si-NC group.

2.7 FN1 沉默抑制 HG 诱导的 HRMEC 的迁移和管形成并激活 P53 信号通路

Transwell 实验结果显示, 高糖处理促进了 HRMEC 迁移, 而 FN1 沉默显著减弱了这种效应(图 10A、10B)。管腔形成实验进一步证实, 高糖诱导的血管生成能力显著增强, 而 FN1 敲低显著抑制了管腔数量和分支长度(图 10C—10E)。Western blot 结果显示, 高糖处理下 P53 蛋白水平显著下调, 而沉默 FN1 后 P53 表达部分恢复(图 10F、10G)。提示 FN1 可能通过调控 P53 信号通路参与 DR 疾病发展。

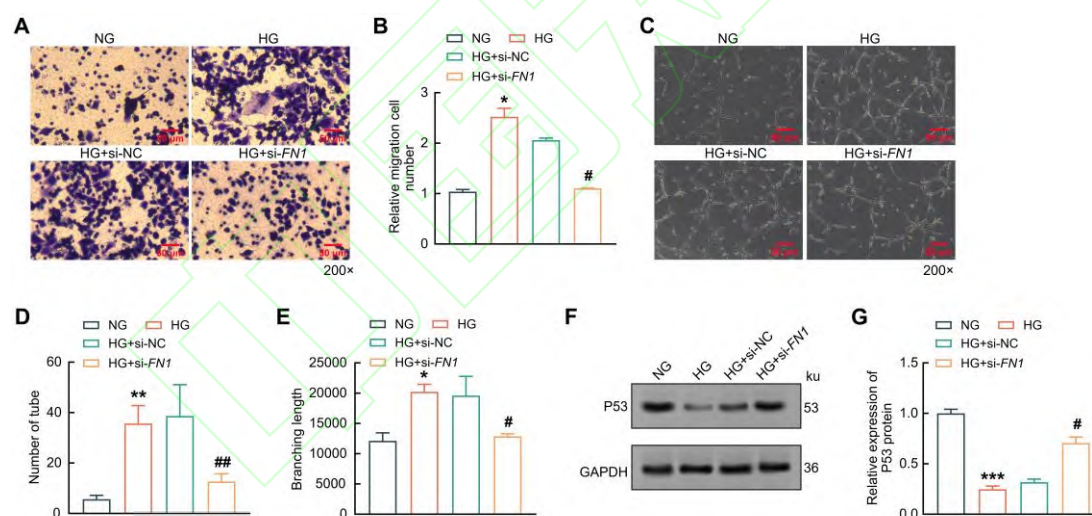


图 10 FN1 敲低对 HRMEC 迁移、血管生成和 P53 表达的影响

Fig.10 The effects of FN1 Knockdown on HRMEC migration, angiogenesis, and P53

expression

注: A-B: Transwell assays showed the migration of HRMECs under NG, HG, HG + si-NC, or HG + si-FN1 treatment. Migrated cells were stained with crystal violet and quantified $\times 200$; C-E: Tube formation assays on Matrigel, including representative images (C), the number of tubes formed (D), and quantification of branch length (E) $\times 200$; F-G: Representative Western blot

images of tumor suppressor protein p53 (P53) expression (F) and quantification normalized to GAPDH (G); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HG + si-NC group.

3 讨论

随着 DR 病程进展, 视网膜缺血区域会分泌大量促血管生成因子, 从而诱导异常血管的生成^[5]。血管新生程度与 DR 严重程度和视力丧失高度相关。本次研究得到与 DR 相关的 237 个血管新生相关基因。这些基因与血管生成、PI3K-Akt、P53、TNF、TGF-beta 及 JAK-STAT 等通路相关。

本研究鉴定出 5 个关键基因 (*COL1A1*、*COL1A2*、*FNI*、*TNF* 和 *TP53*) 在 DR 样本中持续高表达, 并具有较高的临床诊断价值。高糖刺激通过激活 *TP53* 并促其核转位, 加速铁死亡与内皮损伤, 导致血视网膜屏障破坏^[6]。这五个基因在多个经典通路中富集, 包括 JAK-STAT 信号通路、Toll 样受体信号通路和 P53 通路。在糖尿病小鼠模型中, JAK/STAT 通路持续激活, 导致异常血管生成并促进 DR 进展^[7]。5'-(N-乙酰酰胺基)腺苷通过抑制树突状细胞中的 Toll 样受体信号通路减轻 DR 的严重程度^[8]。异槲皮素通过抑制 P53 信号通路减轻了糖尿病小鼠的视网膜损伤^[9]。综上所述, 5 个关键基因可能通过多种信号通路驱动疾病进展。然而, 未能进一步通过蛋白组数据进行交叉验证。

在 DR 进展过程中循环免疫细胞可浸润进入视网膜, 其中先天免疫细胞的异常激活和浸润会引发血管及神经退化^[10]。中性粒细胞、T 细胞、B 淋巴细胞以及单核/巨噬细胞等多类免疫细胞也在 DR 中表现出异常表达。此外, 在 DR 样本中, B 细胞、浆细胞、记忆性 CD4 T 细胞、Treg、M0 巨噬细胞、M1 巨噬细胞和中性粒细胞这 7 种类型的免疫细胞均显著过表达^[11]。本次研究通过免疫浸润分析发现样本间免疫细胞分布存在显著差异。并且, 血管新生相关关键基因与多种免疫细胞显著相关。这提示这些基因可能通过调控免疫细胞浸润参与 DR 的发生发展。

FNI 已证实能够促进内皮细胞活性和促血管生成因子的表达^[12]。我们发现高糖处理导致 *FNI* 表达上调。沉默 *FNI* 抑制 HRMEC 的增殖、迁移和管腔形成。研究发现 P53 可通过抑制 VEGF 信号转导发挥血管生成负调控因子的作用^[13]。在机制层面, P53 加剧了 DR 患者的视网膜内皮细胞凋亡^[14]。高血糖条件下 LINC00673 通过负调控 P53 发挥视网膜色素上皮细胞保护作用^[15]。在本次研究中, P53 在高糖诱导的 HRMEC 细胞中高表达, 而沉默 *FNI* 可部分逆转这一结果, 这表明 *FNI* 可能通过抑制 P53 信号传导来促进 DR 中的病理性血管

生成。值得注意的是，磷酸化 P53 在细胞内更为稳定，并同样能够促进细胞衰老及抑制增殖。未来研究应进一步探究 FN1 对磷酸化 P53 的调控及其在糖尿病视网膜病变血管新生中的具体机制，以完善 FN1-P53 信号轴的作用模型。

综上所述，本研究鉴定了 5 个血管生成相关基因（*COL1A1*、*COL1A2*、*FN1*、*TNF* 和 *TP53*），作为 DR 的潜在关键调控因子，它们表现出较高的诊断价值，在多条经典信号通路中富集，并与免疫细胞浸润密切相关。功能实验进一步证实，FN1 在高糖条件下促进 HRMEC 增殖、迁移和管腔形成，部分机制是通过调控 P53 信号通路实现的。总而言之，这些发现凸显了 *FN1* 作为 DR 病理性血管生成的关键介质的作用，并提示其可能成为疾病干预的有前景的生物标志物和治疗靶点。

参考文献

- [1] Ansari P, Tabasumma N, Snigdha N N, et al. Diabetic retinopathy: an overview on mechanisms, pathophysiology and pharmacotherapy[J]. *Diabetology*, 2022, 3(1): 159-75. doi:10.3390/diabetology3010011.
- [2] Liu D, Meng Z, Jin C, et al. Fibronectin mediates endothelial-to-mesenchymal transition in retina angiogenesis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2025, 66(3): 10. doi:10.1167/iovs.66.3.10.
- [3] Wu J, Lin C, Yang C, et al. Identification and validation of key biomarkers and potential therapeutic targets for primary open-angle glaucoma[J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(12): 2837-50. doi:10.1007/s11427-022-2344-5.
- [4] Yi C, Liu J, Deng W, et al. Old age promotes retinal fibrosis in choroidal neovascularization through circulating fibrocytes and profibrotic macrophages[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 45. doi:10.1186/s12974-023-02731-y.
- [5] 段梅, 曹凡, 桂衍超, 等. 塞来昔布下调 JAML 抑制糖尿病视网膜病变大鼠 VEGF 的表达及其机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(8): 1293-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.008.
- Duan M, Cao F, Gui Y C, et al. Mechanism of celecoxib inhibiting the expression of retinal VEGF in diabetic retinopathy rats via JAML[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(8): 1293-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.008.
- [6] Lu C, Lan Q, Song Q, et al. Identification and validation of ferroptosis-related genes for diabetic retinopathy[J]. *Cell Signal*, 2024, 113: 110955. doi:10.1016/j.cellsig.2023.110955.

- [7] Cho C H, Roh K H, Lim N Y, et al. Role of the JAK/STAT pathway in a streptozotocin-induced diabetic retinopathy mouse model[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2022, 260(11): 3553-63. doi:10.1007/s00417-022-05694-7.
- [8] Li L, Chen J, Wang Z, et al. NECA alleviates inflammatory responses in diabetic retinopathy through dendritic cell toll-like receptor signaling pathway[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1415004. doi:10.3389/fimmu.2024.1415004.
- [9] Cai Y, Peng S, Duan B, et al. Isoquercetin alleviates diabetic retinopathy *via* inhibiting p53-mediated ferroptosis[J]. *Cell Biol Int*, 2025, 49(7): 852-64. doi:10.1002/cbin.70027.
- [10] Zhao B, Zhao Y, Sun X. Mechanism and therapeutic targets of circulating immune cells in diabetic retinopathy[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 210: 107505. doi:10.1016/j.phrs.2024.107505.
- [11] 袁琳慧,张立军,刘 新,等.基于加权基因共表达网络识别糖尿病视网膜病变与免疫相关的关键基因[J].*国际眼科杂志*, 2023, 23(8): 1343-1351. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.20.
- Yuan L H, Zhang L J, Liu X, et al. Identification of key immune related genes in diabetes retinopathy based on weighted gene co-expression network [J]. *International Eye Science*, 2023: 1343-51. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.20.
- [12] Chen C, Wang F, Cheng C, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes with HOXD11 overexpression promote ovarian cancer cell angiogenesis *via* FN1[J]. *Reprod Sci*, 2025, 32(5): 1530-44. doi:10.1007/s43032-024-01716-3.
- [13] Zhang C, Liu J, Wang J, et al. The interplay between tumor suppressor p53 and hypoxia signaling pathways in cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 648808. doi:10.3389/fcell.2021.648808.
- [14] Cheng Y, Zhang M, Xu R, et al. p53 accelerates endothelial cell senescence in diabetic retinopathy by enhancing FoxO3a ubiquitylation and degradation *via* UBE2L6[J]. *Exp Gerontol*, 2024, 188: 112391. doi:10.1016/j.exger.2024.112391.
- [15] Cheng Y, Zhu Y, Ma L. LncRNA LINC00673 is downregulated in diabetic retinopathy and regulates the apoptosis of retinal pigment epithelial cells *via* negatively regulating p53[J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2021, 14: 4233-40. doi:10.2147/DMSO.S298185.