·实验论著·

ABCA4 缺失促进干性年龄相关性黄斑变性氧化应激模型中 ARPE-19 细胞凋亡的机制研究

王 伟, 栗小丽, 李 娟, 赵朝霞

引用:王伟,栗小丽,李娟,等. ABCA4 缺失促进干性年龄相关性黄斑变性氧化应激模型中 ARPE-19 细胞凋亡的机制研究. 国际眼科杂志, 2026,26(2):208-215.

作者单位:(450000)中国河南省郑州市,河南大学附属爱尔眼科医院 郑州爱尔眼科医院
作者简介:王伟,男,硕士,副主任医师,研究方向:年龄相关性黄斑变性。
通讯作者:赵朝霞,女,硕士,主任医师,副院长,硕士研究生导师,研究方向:眼底疾病. zhaoxia0602@163.com
收稿日期: 2025-08-25 修回日期: 2025-12-22

摘要

目的:通过生物信息学和细胞实验研究 ABCA4 基因在干性 ARMD 中的作用机制。

方法:整合生物信息学与细胞实验,基于 GEO 数据集 GSE29801 筛选 ARMD 差异表达基因(DEGs),通过 PPI 网络分析(STRING 数据库)和拓扑参数筛选 Hub 基因。构建慢病毒介导的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)ABCA4 敲低稳转株(ABCA4-KD 组)与阴性对照,使用 $NaIO_3$ 建立氧化应激模型,分四组处理:NC 组(阴性对照慢病毒+PBS)、$NaIO_3$+NC 组(阴性对照慢病毒+氧化应激损伤)、ABCA4-KD 组(ABCA4 敲低慢病毒+PBS)、$NaIO_3$+ABCA4-KD 组(ABCA4 敲低慢病毒+氧化应激损伤),通过 Western blot 验证敲低效率,CCK-8 检测细胞活性,Hoechst 33342 与 Annexin V-FITC/PI 双染色检测细胞凋亡率。

结果:生信分析筛选出 5 069 个 DEGs(2 493 个上调/2 576 个下调),与 ARMD 疾病靶点取交集获 118 个关键基因;PPI 网络确定 Top5 Hub 基因(ABCA4、RPE65、PRPH2、RHO、PDE6B),其中 ABCA4 度中心性最高(Degree=58);ROC 曲线显示 ABCA4 对 ARMD 鉴别效能极佳(AUC=0.986)。进一步细胞实验发现,ABCA4-KD 组 ABCA4 蛋白表达显著低于 NC 组($P<0.05$);在氧化应激条件下,$NaIO_3$+ABCA4-KD 组细胞活性低于 $NaIO_3$+NC 组($P<0.01$),而细胞凋亡率显著升高(均 $P<0.01$),而在无氧化应激环境中,单纯敲低 ABCA4 未影响细胞存活($P>0.05$)。

结论:ABCA4 功能缺失通过加剧氧化应激诱导的 RPE 细胞凋亡参与 ARMD 病理进程,有望成为干性 ARMD 靶向治疗新靶点。

关键词:年龄相关性黄斑变性;ABCA4;氧化应激;凋亡
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2026.2.04

Mechanism of ABCA4 deficiency in promoting ARPE-19 cells apoptosis in an oxidative stress model of dry age-related macular degeneration

Wang Wei, Li Xiaoli, Li Juan, Zhao Zhaoxia

Aier Eye Hospital Affiliated to Henan University; Zhengzhou Aier Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China
Correspondence to: Zhao Zhaoxia. Aier Eye Hospital Affiliated to Henan University; Zhengzhou Aier Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. zhaoxia0602@163.com
Received: 2025-08-25 Accepted: 2025-12-22

Abstract

• AIM: To investigate the role of the ABCA4 gene in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration (ARMD) through bioinformatics and cellular experiments.

• METHODS: Integrating bioinformatics and cellular experiments, differential expression genes (DEGs) associated with ARMD were screened based on the GEO dataset GSE29801. Hub genes were identified through PPI network analysis (using the STRING database) and topological parameter screening. A lentivirus-mediated stable ABCA4 knockdown cell line in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19; ABCA4-KD group) and a negative control were constructed. An oxidative stress model was established using $NaIO_3$, and the cells were divided into four treatment groups: NC group (negative control lentivirus + PBS), $NaIO_3$ + NC group (negative control lentivirus + oxidative stress injury), ABCA4-KD group (ABCA4 knockdown lentivirus + PBS), $NaIO_3$ + ABCA4-KD group (ABCA4 knockdown lentivirus + oxidative stress injury). Knockdown efficiency was verified *via* Western blot, cell viability was assessed using the CCK-8 assay, and the apoptosis rate was measured by Hoechst 33342 and Annexin V-FITC/PI double staining.

• RESULTS: Bioinformatics analysis identified 5 069 DEGs (2 493 upregulated/2 576 downregulated), of which 118 key genes were obtained by intersecting with ARMD disease targets. PPI network analysis identified the top 5 hub genes (ABCA4, RPE65, PRPH2, RHO, PDE6B), with ABCA4 showing the highest degree centrality (Degree = 58). ROC curve analysis demonstrated that ABCA4 had excellent discriminative efficacy for ARMD (AUC = 0.986). Further cellular experiments revealed that ABCA4 protein

expression in the ABCA4-KD group was significantly lower than that in the NC group ($P<0.05$). Under oxidative stress conditions, the $NaIO_3$+ABCA4-KD group exhibited lower cell viability compared to the $NaIO_3$+NC group ($P<0.01$), while the apoptosis rate was significantly increased (all $P<0.01$). In the absence of oxidative stress, knockdown of ABCA4 alone did not affect cell survival ($P>0.05$).

• CONCLUSION: Loss of ABCA4 function contributes to the pathology of ARMD by exacerbating oxidative stress-induced RPE cell apoptosis, and is expected to serve as a novel therapeutic target for dry ARMD.

• KEYWORDS: age-related macular degeneration; ABCA4; oxidative stress; apoptosis

Citation: Wang W, Li XL, Li J, et al. Mechanism of ABCA4 deficiency in promoting ARPE-19 cells apoptosis in an oxidative stress model of dry age-related macular degeneration. Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci), 2026,26(2):208-215.

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)是全球老年人不可逆性视力丧失的首要原因,其中干性 ARMD 约占 90%,其特征性病理改变为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞进行性萎缩及光感受器凋亡[1-5]。ARMD 发病机制复杂,目前认为氧化应激是驱动 RPE 损伤的核心机制之一,长期光照诱导活性氧(ROS)爆发,导致线粒体功能障碍并最终触发细胞凋亡[6]。然而,调控这一过程的关键分子靶点尚未明确,致使干性 ARMD 缺乏有效干预策略。近年来,生物信息学为 ARMD 靶点挖掘提供了新视角。本研究通过分析 GEO 数据集(GSE29801)发现,ATP 结合盒转运体亚家族 A 成员 4(ATP-binding cassette subfamily a member 4,ABCA4)是 ARMD 的 Top Hub 基因(AUC=0.986)。ABCA4 是视循环中的关键转运蛋白,主要介导 N-亚视黄基-磷脂酰乙醇胺(N-ret-PE)从光感受器外节盘膜向 RPE 的转运[7]。ABCA4 通过调控视觉循环中的毒性物质清除,维护视网膜稳态,ABCA4 基因变异与 ARMD 密切相关[8-9]。ABCA4 的核心作用是作为“翻转酶”,将 N-ret-PE 从光感受器盘膜的腔面主动转运到胞质面[10]。近年来研究表明,ABCA4 也在人和小鼠的 RPE 细胞质膜上表达。在 RPE 中,ABCA4 可能在溶酶体或吞噬体中执行 ATP 依赖的 N-ret-PE 转运功能[11-12]。ABCA4 功能缺失导致 N-ret-PE 在光感受器外节盘腔内积累,并形成 A2E 前体(A2PE)。当 RPE 吞噬含有 A2PE 的光感受器外节后,在溶酶体内转化为 A2E。A2E 无法被降解,与其他脂质反应形成脂褐素沉积[13-14]。近期研究发现,ABCA4 基因敲除小鼠视网膜明显变性,并伴有氧化应激、脂褐素积累和 RPE 衰老等[15-16]。因此,本研究拟通过生信分析与细胞实验探索 ABCA4 在干性 ARMD 中的作用,旨在为干性 ARMD 靶向治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19(ATCC® CRL-2302™)培养于含 10%胎牛血清(Gibco)的 DMEM/F12 培养基(HyClone)中,置于 37 ℃、5% CO_2恒温培养箱。每 2-3 d 以 0.25%胰蛋白酶(Beyotime)消化传代,选择第 3-5 代细胞对数生长期细胞,CCK-8 鉴定细胞活性>90%,用于后期实验[17]。

1.1.2 主要试剂与仪器 Hoechst 33342 检测试剂盒(Beyotime);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(Beyotime);$NaIO_3$(Sigma-Aldrich);ABCA4 抗体(Abcam);β-actin 抗体(Affinity);CCK-8 试剂(Beyotime);流式细胞仪(BD FACSCalibur);荧光显微镜(Olympus);电泳仪(Bio-Rad Mini-PROTEAN 系统);酶标仪(BioTek)。

1.2 方法

1.2.1 生信分析

1.2.1.1 数据来源与差异表达分析 GEO(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)数据库下载 GSE29801 数据集,该数据集基于 GPL4133(Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F)平台,包括人类捐赠眼睛 68 眼(正常 31 眼,ARMD 26 眼,ARMD 临床前期 11 眼)。使用 R 语言 limma 包进行差异表达分析,筛选标准为:$|\log_2FC|>1$ 且 $P<0.05$。差异基因表达矩阵(diffGeneExp.txt)用于后续分析[18]。

1.2.1.2 功能富集分析 GO 富集分析:通过 clusterProfiler、org.Hs.eg.db 包对 DEGs 进行功能注释,enrichGO 函数分析生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF),使用 ggplot2 包绘制柱状图,enrichplot 绘制气泡图。KEGG 通路富集:使用 enrichKEGG 函数分析通路,pathview 包生成通路图,使用 ggplot2 包绘制柱状图,enrichplot 绘制气泡图,展示 Top30 通路[19-20]。

1.2.1.3 疾病靶点交集分析 疾病相关靶点获取通过 Genecards 数据库(www.genecards.org)实现,以“age-related macular degeneration”为关键词检索,筛选相关性评分>20 的基因形成疾病靶点列表 gene.txt[21]。利用 R 包 ggvenn 将差异基因列表 diff.txt 与疾病靶点列表 gene.txt 进行交集分析,绘制韦恩图展示共同靶点。

1.2.1.4 PPI 网络构建与 Hub 基因筛选 蛋白互作网络(PPI)构建在 STRING 数据库(http://www.string-db.org/)中完成,选择物种为“Homo sapiens”并采用默认参数(置信度阈值>0.4),导出 TSV 格式互作关系文件后导入 Cytoscape 软件(版本 3.9.1)进行网络拓扑分析。通过 NetworkAnalyzer 工具计算网络节点的中介中心性(Betweenness Centrality)、紧密中心性(Closeness Centrality)和度中心性(Degree Centrality),三者均大于等于中位值进行筛选,获得核心靶点(Hub 基因)信息[20]。

1.2.1.5 诊断价值评估 应用 R 包 pROC 对 Hub 基因进行诊断价值评估,基于表达量矩阵和样本分组标签构建 ROC 曲线,采用 Bootstrap 法重复抽样 1 000 次计算 AUC 值及其 95%置信区间[22]。

1.2.2 细胞实验

1.2.2.1 细胞慢病毒感染筛选及扩增 慢病毒由上海吉凯基因医学科技股份有限公司包装。将待处理细胞分为三组,对照组为不进行任何处理的 ARPE-19 细胞,空载体组为感染阴性对照病毒细胞,ABCA4-KD 慢病毒感染组为感染 ABCA4 敲低慢病毒细胞。ARPE-19 细胞接种 24 h 后,更换含 8 μg/mL 聚凝胺(Sigma)的培养基加入慢病毒

悬液(MOI=20),37 ℃孵育 12 h 后更换新鲜完全培养基,继续培养 48 h。加入 2 μg/mL 嘌呤霉素(InvivoGen)筛选 7 d 扩大培养阳性细胞群,WB 验证敲低效率,将鉴定结果正常的细胞冻存保种[23-24]。

1.2.2.2 氧化应激模型建立　ARPE-19 细胞以 2×10^5/孔密度接种于 6 孔板,待融合度达 80%时,更换含 1 250 μg/mL $NaIO_3$的无血清培养基,处理 24 h 建立氧化应激损伤模型[25]。对照组使用等体积 PBS 处理,分组情况见表 1。

1.2.2.3 Western blot 检测 ABCA4 表达　RIPA 裂解液(含 1%蛋白酶抑制剂)冰上裂解细胞 30 min,提取总蛋白后通过 BCA 法定量,确保上样一致性。取 30 μg 蛋白样品经 10% SDS-PAGE 电泳分离,湿转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h。随后膜与 ABCA4 一抗(1∶1000, Abcam)4 ℃孵育过夜,β-actin(1∶5000, Affinity)作为内参,HRP 标记二抗(1∶5000)室温孵育 1 h 后 ECL 显影。Image J 分析条带灰度值,计算 ABCA4 与内参比值。

1.2.2.4 CCK-8 检测细胞活性　细胞接种 96 孔板(5×10^3/孔),根据各分组干预措施处理后更换培养基,每孔加入10 μL CCK-8 试剂(Beyotime),37 ℃避光孵育 2 h,酶标仪(BioTek, USA)检测 450 nm 吸光度(OD 值)。细胞活性(%)=[(OD 实验组-OD 空白)/(OD 对照组-OD 空白)]×100。

1.2.2.5 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡　细胞经分组干预(如 $NaIO_3$氧化损伤)后,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤去除固定剂,加入 0.5 mL Hoechst 33342 染料(10 μg/mL)避光孵育 10 min,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜(Olympus)下观察,正常细胞核呈均匀淡蓝色,凋亡细胞因染色质浓缩呈现亮蓝色颗粒或核碎裂。每样本随机选取 3 个视野计数阳性细胞比例,计算凋亡率。

1.2.2.6 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡　收集胰酶消化后的细胞(不含 EDTA),重悬于 Binding Buffer,加入 195 μL Binding Buffer+5 μL Annexin V-FITC+10 μL PI 染料,避光孵育 15 min。Annexin V 结合凋亡早期外翻的磷脂酰丝氨酸(PS),PI 标记膜破损细胞。使用流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测:FITC 通道:Annexin V^+(凋亡细胞),PI 通道:PI^+(坏死细胞)。流式细胞仪检测中,FITC+PI-为早期凋亡,FITC+PI+为晚期凋亡,总凋亡率为二者之和。

统计学分析:每组实验独立重复 3 次,采用 GraphPad Prism 10 进行统计分析和作图。两组比较采用独立样本 t 检验,三组或三组以上数据采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生信分析

2.1.1 差异表达基因可视化　基于 GEO 数据集 GSE29801 共筛选出 5 069 个差异基因(DEGs),其中 2 493 个上调基因和 2 576 个下调基因,如图 1A 火山图所示。并用热图展示前 100 个 DEGs 表达情况,见图 1B。

2.1.2 GO 与 KEGG 富集分析　通过 enrichGO 函数对 DEGs 进行富集分析,发现个 2 674 个 GO 条目,其中 2 173 个与生物过程(BP)有关,主要富集在 positive regulation of cell adhesion(细胞黏附的正向调控),visual perception(视觉感知),sensory perception of light stimulus(光刺激的感官知觉),sensory system development(感觉系统发育),visual system development(视觉系统发育),eye development(眼睛发育),cell-substrate adhesion(细胞-基质黏附),axonogenesis(轴突发生),leukocyte cell-cell adhesion(白细胞细胞间黏附),camera-type eye development(相机型眼发育)等信号通路;230 个与细胞组成(CC)有关,271 个与分子功能(MF)有关,选择 BP、CC 和 MF 的前 10 个 GO 通路进行绘制柱状图和气泡图,见图 2A,B。KEGG 通路富集分析共得到 144 条与药物治疗疾病相关通路,按 P 值选取 30 条通路,根据 count 和 Gene Ratio 生成柱状图和气泡图,见图 2C,D。

表 1　实验分组干预措施

分组	处理方式
NC 组	感染阴性对照病毒细胞+PBS 处理 24 h
$NaIO_3$+NC 组	感染阴性对照病毒细胞+1 250 μg/mL $NaIO_3$处理 24 h
ABCA4-KD 组	感染 ABCA4 敲低慢病毒细胞+PBS 处理 24 h
$NaIO_3$+ABCA4-KD 组	感染 ABCA4 敲低慢病毒细胞+1 250 μg/mL $NaIO_3$处理 24 h

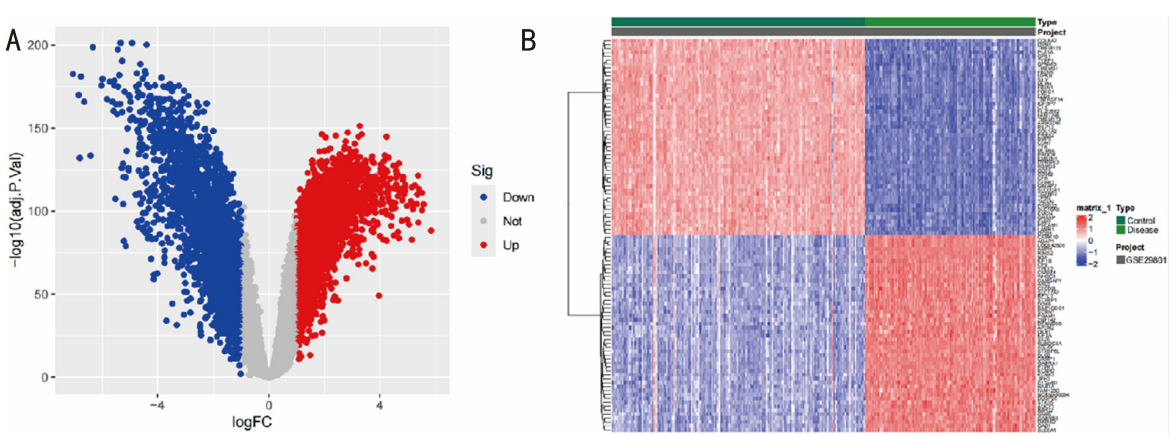

图 1　差异表达基因筛选　A:火山图显示差异基因,蓝色圆点代表表达下调基因,红色圆点代表上调基因;B:热图展示前 100 个 DEGs 表达情况,蓝色区域为表达下调,红色区域为表达上调。

2.1.3 关键靶点交集和 PPI 网络构建与 Hub 基因筛选

应用 genecards 数据库以“age-related macular degeneration”为关键词搜索相关靶点，合并去重得到 255 个疾病靶点。与 5 069 个 DEGs 取交集后，获得 118 个交集靶点基因，见图 3A。将以上基因通过 cytoscape 构建 PPI 网络图，网络中的每一个节点代表一个单独的基因，点的大小按照 Degree 评分进行排列，见图 3B。将 Degree≥50 的前 5 个基因（ABCA4、RPE65、PRPH2、RHO、PDE6B）作为 Hub 基因，其中 ABCA4 基因的度中心性最高（Degree=58）。

2.1.4 Hub 基因诊断 ARMD 的预测价值 进一步对 Hub 基因的诊断效能进行评估，通过 ROC 曲线分析发现 Hub 基因均显示出色的诊断效能（图 4），AUC 值分别为：ABCA4=0.986（0.965，0.997）、RPE65=0.966（0.935，0.985）、PRPH2=0.996（0.985，1.000）、RHO=0.993（0.978，1.000）、PDE6B=0.996（0.984，1.000），提示以上 5 个基因均对 ARMD 具有十分显著的区分能力。

2.2 细胞实验

2.2.1 ABCA4 慢病毒敲低效果 通过慢病毒转染效率检测，慢病毒成功转染 ARPE-19 细胞，荧光显微镜观察显示绿色荧光蛋白表达明显，细胞形态良好，见图 5A。转染效率定量分析表明，ABCA4-KD 慢病毒感染组和空载体组的转染效率均高于 70%，见图 5B。Western blot 结果见图 5C，D。空载体组 ABCA4 蛋白表达与对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$），ABCA4-KD 慢病毒感染组的 ABCA4 蛋白表达相较空载体组显著降低（$P<0.05$），表明成功构建 ABCA4 稳定敲低细胞模型。

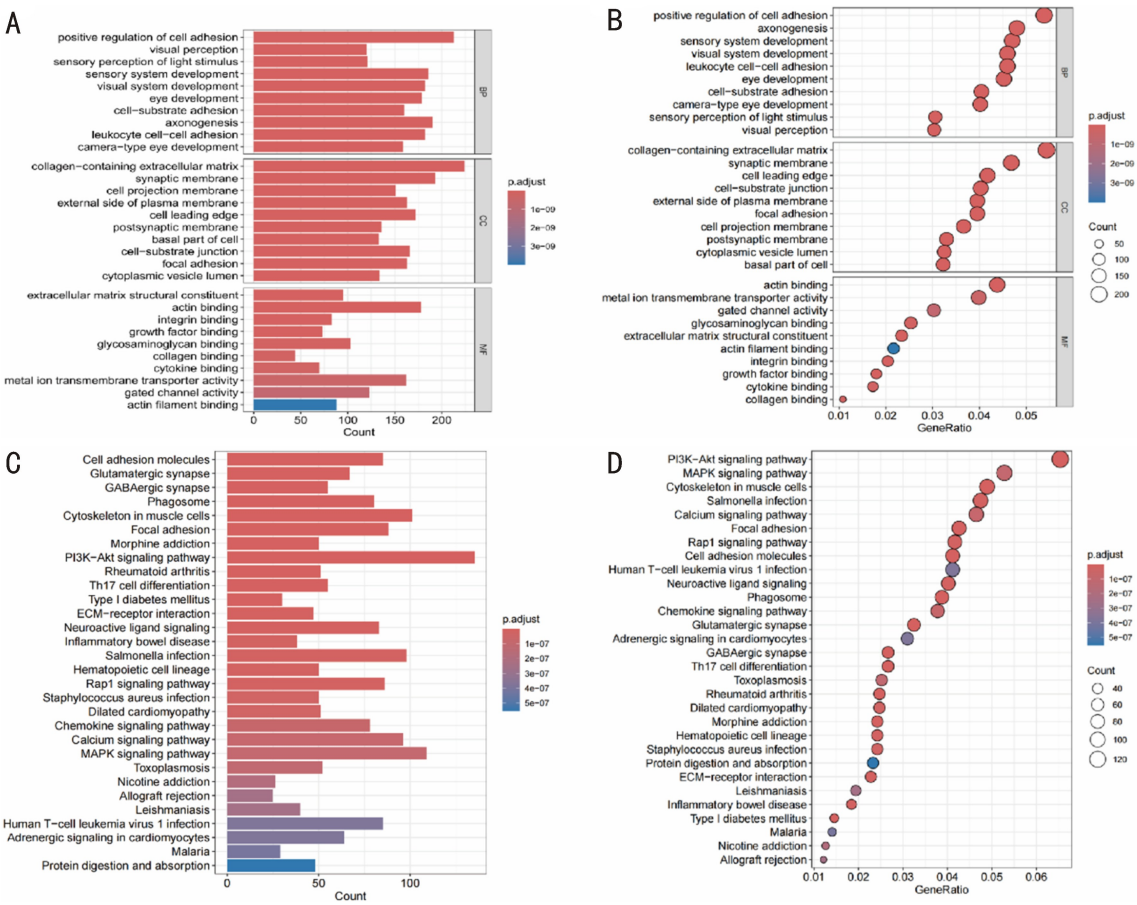

图 2 GO 与 KEGG 富集分析 A：GO 富集分析柱状图；B：GO 富集分析气泡图；C：KEGG 通路富集分析柱状图；D：KEGG 通路富集分析气泡图。

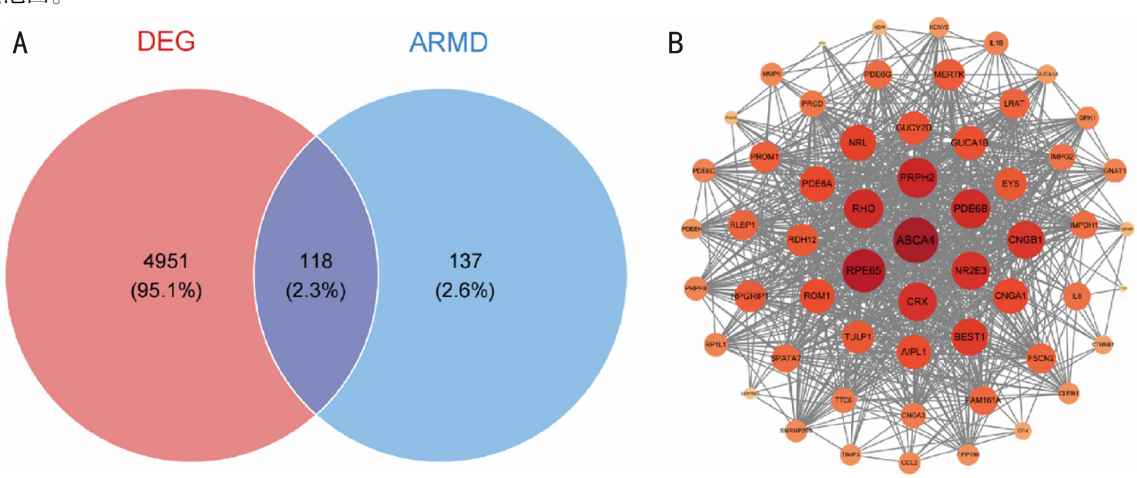

图 3 关键靶点交集基因筛选 A：Venn 图显示 118 个交集靶点基因；B：PPI 网络及 Hub 基因展示。

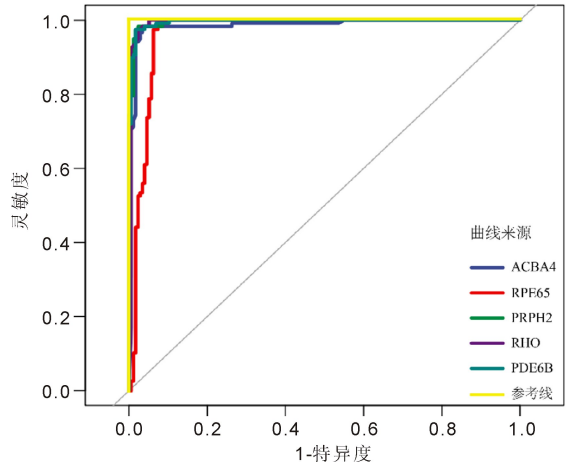

图 4　Hub 基因诊断 ARMD 的预测 ROC 曲线。

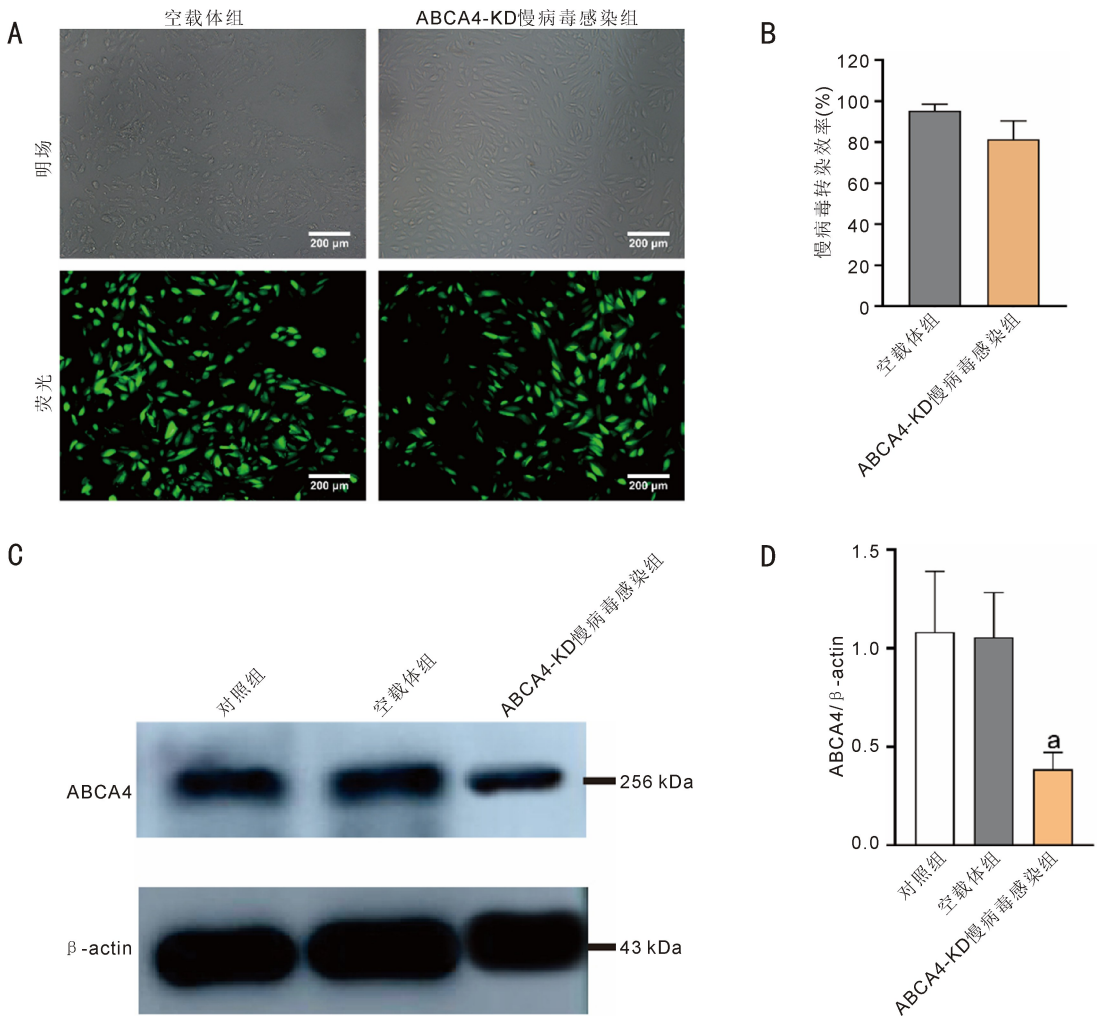

图 5　慢病毒转染效率及 ABCA4 敲低效果检测　A:慢病毒转染效果图;B:慢病毒转染效率;C:Western blot 检测 ABCA4 蛋白表达;D:ABCA4 蛋白定量分析。$n=3$;$^aP<0.05$ *vs* 空载体组。

2.2.2 ABCA4 敲低加重 $NaIO_3$ 诱导的细胞活性损伤　CCK-8 检测结果表明,单纯 ABCA4 敲低(ABCA4-KD 组)对细胞活性无显著影响,与 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$);在 $NaIO_3$ 诱导损伤下细胞活性降低,且 $NaIO_3$+ABCA4-KD 组细胞活性显著低于 $NaIO_3$+NC 组(均 $P<0.01$),表明敲低 ABCA4 加重 $NaIO_3$ 诱导的细胞活性损伤,见图 6。

2.2.3 ABCA4 敲低加重 $NaIO_3$ 诱导的细胞凋亡　Hoechst 33342 核染色显示,正常对照(NC)组和 ABCA4 敲低(ABCA4-KD)组细胞核呈均匀淡蓝色,形态规则,极少数细胞出现核浓缩,见图 7A。两组阳性细胞率无显著统计学差异($P>0.05$),见图 7B;在 $NaIO_3$ 诱导损伤下,部分细胞出现细胞核浓缩碎裂,见图 7A,ABCA4 敲低($NaIO_3$+ABCA4-KD)组阳性细胞率显著高于阴性对照($NaIO_3$+NC)组($P<0.05$)。Annexin V-FITC/PI 染色表明,正常对照(NC)组和 ABCA4 敲低(ABCA4-KD)组细胞总凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);在 $NaIO_3$ 诱导损伤下,ABCA4 敲低($NaIO_3$+ABCA4-KD)组总凋亡率显著高于阴

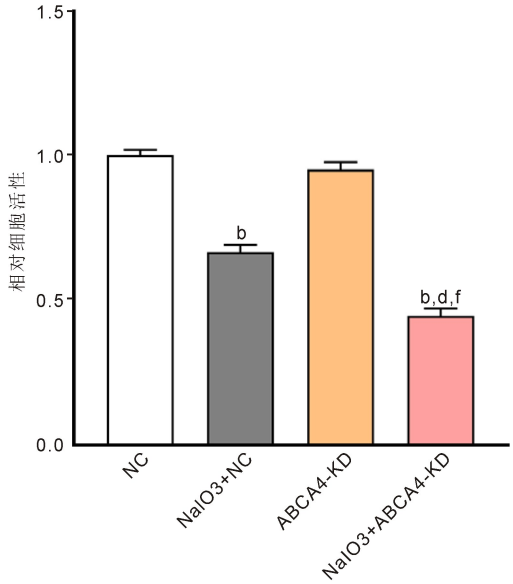

图 6 CCK-8 检测各组细胞活性 $n=3$；[b]$P<0.01$ *vs* NC 组；[d]$P<0.01$ *vs* $NaIO_3$+NC 组；[f]$P<0.01$ *vs* ABCA4-KD 组。

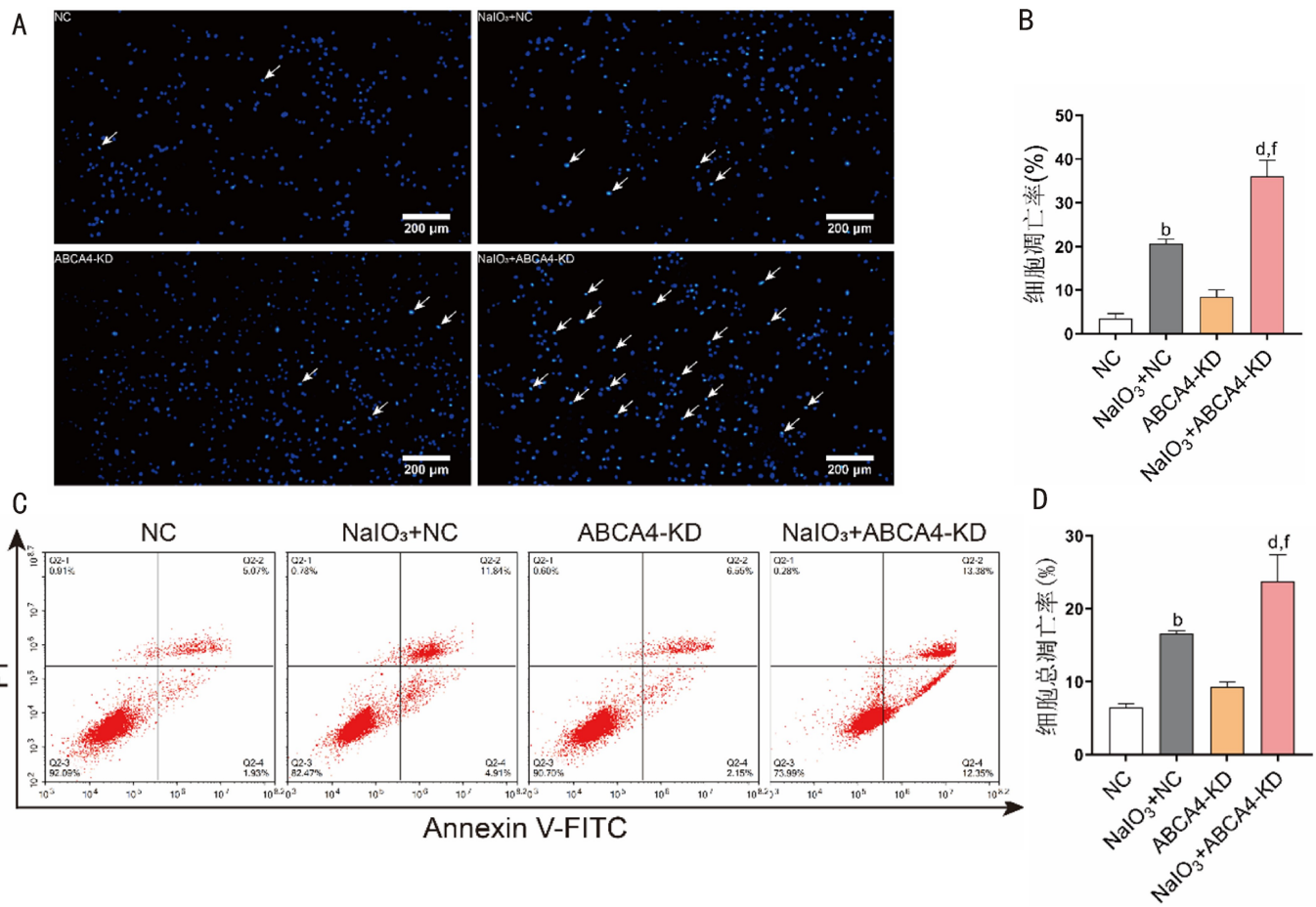

图 7 细胞凋亡检测 A：Hochest 33342 染色，白色箭头指示阳性细胞；B：凋亡率定量分析；C：Annexin V-FITC/PI 染色（每个象限标注为细胞百分比，Q2-2 代表晚期凋亡，Q2-4 代表早期凋亡，Q2-2+Q2-4 代表总凋亡）；D：基于 C 的总凋亡率定量分析。$n=3$；[b]$P<0.01$ *vs* NC 组；[d]$P<0.01$ *vs* $NaIO_3$+NC 组；[f]$P<0.01$ *vs* ABCA4-KD 组。

性对照（$NaIO_3$+NC）组（$P<0.05$），见图 7C，D。以上结果表明，ABCA4 敲低对正常 ARPE-19 细胞存活无明显影响，但会严重影响氧化应激条件下的 ARPE-19 细胞存活。

3 讨论

ARMD 是全球 50 岁以上人群不可逆视力丧失的首要病因，其中干性 ARMD 占比高达 90%，预估 2040 年全球患者将突破 2.88 亿。其核心病理表现为 RPE 进行性萎缩，目前认为氧化应激诱导的 RPE 凋亡是核心机制[1-3,5]。然而，现有治疗手段如抗血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF），仅针对湿性 ARMD，而干性 ARMD 仍缺乏有效干预策略[26]，关键在于尚未明确调控氧化损伤的源头靶点。本研究通过整合生物信息学与细胞实验，首次聚焦 ABCA4 基因在 ARMD 中的作用，旨在揭示 ABCA4 缺失通过放大氧化应激促进 RPE 凋亡的

分子通路,为开发靶向抗氧化治疗提供新思路。若 ABCA4 的保护机制得以证实,将有望改变干性 ARMD“无药可医”的临床困境。

本研究通过多维度生信分析锁定 ABCA4 为 ARMD 核心枢纽。基于 GEO 数据集 GSE29801,以“$|\log_2FC|>1$ 且 $P<0.05$”为筛选标准,通过差异表达基因分析共筛选出 5 069 个差异基因(DEGs)。但需要注意的是,$P<0.05$ 虽为统计学显著性常规标准,但未进行多重检验校正(如 FDR 校正)可能增加假阳性风险。进一步通过 GO 富集分析发现,这些生物过程主要集中在视觉系统发育方面,发育异常的遗传因素可增加 ARMD 风险。进一步与 ARMD 疾病靶点交集验证差异表达基因的疾病相关性,获得 118 个交集靶点基因。将以上基因通过 cytoscape 构建 PPI 网络图,根据 Degree 评分进行排列,将 Degree≥50 的前 5 个基因(ABCA4、RPE65、PRPH2、RHO、PDE6B)作为 Hub 基因,其中 ABCA4 基因的度中心性最高(Degree = 58)。需要注意的是,干性 ARMD 的分子机制尚未完全明确,尤其 ABCA4 相关通路可能存在间接或弱关联的互作关系,尽管低置信度互作可能包含较多计算预测或弱证据关联,例如某些共表达关系未必代表直接物理相互作用,但较低的阈值可纳入更多潜在相互作用(如文献挖掘或共表达推断的关联),避免遗漏功能上重要但实验证据尚不充分的连接,我们选择“置信度阈值>0.4”为筛选参数。此外,ROC 曲线证实 ABCA4 对 ARMD 有极强的鉴别力(AUC = 0.986),这表明 ABCA4 具备较高的诊断价值。既往研究已明确 ABCA4 在视循环中清除毒性视黄醛衍生物的功能[10],但其在 ARMD 中的作用长期被忽视。本研究通过生信分析首次发现 ABCA4 在 ARMD 中的重要研究价值,为后续实验提供科学依据。

为进一步验证 ABCA4 在 ARMD 中的重要作用,我们进行了细胞实验。通过慢病毒构建 ABCA4 敲低稳转细胞模型。CCK-8 实验分析发现 ABCA4 缺失使 RPE 对 $NaIO_3$ 敏感性倍增——细胞活性抑制加剧。进一步检测细胞凋亡率,Hoechst 33342 核染色显示在 $NaIO_3$ 诱导损伤下,ABCA4 敲低($NaIO_3$+ABCA4-KD)组阳性细胞率显著高于阴性对照($NaIO_3$+NC)组($P<0.05$);Annexin V-FITC/PI 染色表明在 $NaIO_3$ 诱导损伤下,ABCA4 敲低($NaIO_3$+ABCA4-KD)组总凋亡率显著高于阴性对照($NaIO_3$+NC)组($P<0.05$)。以上结果表明,ABCA4 表达降低严重影响氧化应激条件下的 ARPE-19 细胞存活。既往研究表明,ABCA4 下调导致脂褐质堆积(视黄醛代谢障碍),经蓝光激发产生活性氧,最终激活 Caspase 通路[27-29]。我们推测这可能是通过以下通路实现:ABCA4 缺失→脂褐质积累→蓝光/氧化剂诱导 ROS 生成→氧化损伤线粒体膜电位→释放细胞色素 C→激活 Caspase 级联反应(如 Caspase-9/3)→最终导致 RPE 凋亡。这一机制解释了为何干性 ARMD 萎缩灶始于 RPE:ABCA4 表达降低使 RPE 更易受氧化攻击(如老龄相关的蓝光累积),而感光细胞因失去 RPE 支持继发死亡。

本研究首次通过整合生信筛选与细胞验证探索 ABCA4 作为干性 ARMD 治疗靶点的重要价值。既往 ABCA4 研究主要聚焦于 Stargardt 病等单基因疾病,强调其突变导致脂褐质积累和光感受器变性[7-9]。与本研究发现一致的是,Zernant 等[8]指出 ABCA4 hypomorphic 等位基因与 ARMD 风险相关,但缺乏直接实验验证。在机制上,既往研究多描述 ABCA4 在视循环中的转运功能[10-12]。而本研究通过生信分析首次将 ABCA4 确立为干性 ARMD 的 Hub 基因,拓展了其疾病关联范围,通过细胞实验证明 ABCA4 缺失直接增强氧化应激诱导的 RPE 凋亡,突出了其在 ARMD 病理中的核心作用,这与 Abdouh 等[29]报道的蓝光诱导 ROS-RPE 凋亡机制相呼应。然而,本研究存在一定局限性:首先,生信分析基于单一数据集 GSE29801,虽样本量较大,但未进行多重检验校正,可能增加假阳性风险,未来需整合多组学数据(如 RNA-seq)以验证稳健性。其次,细胞实验虽证实 ABCA4 缺失加剧凋亡,但下游机制如 ROS-自噬串扰、铁死亡等未深入探讨,后续拟通过动物模型(如 ABCA4 敲除小鼠)和信号通路抑制剂实验明确分子网络。此外,$NaIO_3$ 模型虽广泛使用,但不能完全模拟人类 ARMD 的慢性进程,结合光损伤或遗传模型可能更全面。

本研究通过生信分析发现 ABCA4 作为 Hub 基因参与 ARMD 病理过程,细胞实验进一步证明抑制 ABCA4 表达可以加剧氧化应激诱导的 RPE 细胞凋亡,靶向 ABCA4 治疗有望突破干性 ARMD 治疗困境。后续拟构建 ABCA4 特异性基因敲除小鼠,进一步探索 ABCA4 在干性 ARMD 中的作用。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。
作者贡献声明:王伟论文选题与修改,初稿撰写;栗小丽、李娟文献检索,数据分析;赵朝霞选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Keenan TDL, Cukras CA, Chew EY. Age-related macular degeneration: epidemiology and clinical aspects. Adv Exp Med Biol, 2021,1256:1-31.
[2] 梁晓茜, 陈王灵, 陈运信. 基于自噬探讨玻璃体腔注射贝伐珠单抗对年龄相关性黄斑变性视网膜损伤的保护作用. 中国医院用药评价与分析, 2023,23(3):281-286.
[3] 智心禹. 褪黑激素通过调控 Nrf2 核易位抑制干性年龄相关性黄斑变性光感受器细胞铁死亡. 中国医科大学,2023.
[4] 徐湘粤, 贾诗雨, 刘雅琪, 等. 紫檀芪对视网膜色素上皮细胞的保护作用. 延边大学医学学报, 2022,45(3):162-165.
[5] 陈鑫, 莫亚欣, 刘新宇, 等. 年龄相关性黄斑变性体外细胞模型的研究进展. 国际眼科杂志, 2025,25(9):1460-1465.
[6] Sripunya A, Chittasupho C, Mangmool S, et al. Gallic acid-encapsulated PAMAM dendrimers as an antioxidant delivery system for controlled release and reduced cytotoxicity against ARPE-19 cells. Bioconjug Chem, 2024,35(12):1959-1969.
[7] Fujinami K, Waheed N, Laich Y, et al. Stargardt macular dystrophy and therapeutic approaches. Br J Ophthalmol, 2024,108(4):495-505.
[8] Zernant J, Lee W, Collison FT, et al. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of ABCA4 disease and distinguish it from age-related macular degeneration. J Med Genet, 2017,54(6):404-412.
[9] Rivera A, White K, Stöhr H, et al. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. Am J Hum Genet, 2000,67(4):800-813.
[10] Al-Khuzaei S, Broadgate S, Foster CR, et al. An overview of the genetics of ABCA4 retinopathies, an evolving story. Genes, 2021,12(8):1241.
[11] Farnoodian M, Bose D, Khristov V, et al. Cell-autonomous lipid-handling defects in Stargardt iPSC-derived retinal pigment epithelium

cells. Stem Cell Reports, 2022,17(11):2438-2450.
[12] Lenis TL, Hu J, Ng SY, et al. Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018,115(47): e11120-e11127.
[13] Boyer NP, Higbee D, Currin MB, et al. Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-*Cis*-retinal. J Biol Chem, 2012,287(26):22276-22286.
[14] Molday RS, Zhong M, Quazi F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. Biochim Biophys Acta, 2009,1791(7):573-583.
[15] Yang B, Yang KH, Xi RT, et al. Long-term senolytic therapy with Dasatinib and Quercetin alleviates lipofuscin-dependent retinal degeneration in mice. Redox Biol, 2025,85:103716.
[16] Cui Y, Poudel S, Xu N, et al. Sustained release of a novel non-fibrate PPARα agonist from microparticles for neuroprotection in murine models of age-related macular degeneration. J Control Release, 2025, 380:910-926.
[17] 李杨, 杨玲玲, 白彦丽, 等. 黄芪多糖对气阴两虚 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、转移及细胞周期的影响. 肿瘤防治研究, 2018, 45(3):131-137.
[18] 金叶安琪, 刘俊滨, 方翔, 等. 基于蛋白质组学和转录组学数据鉴定增生型糖尿病性视网膜病变的潜在生物标志物. 眼科新进展, 2025,45(8):622-628.
[19] 杨俭伟, 宋丽华, 王娟, 等. 眼睑基底细胞癌差异基因的筛选和分析. 眼科新进展, 2024,44(6):454-457.
[20] 杨卓妍, 张欣, 段雪娟, 等. 基于蛋白互作网络的白内障致病基因挖掘. 眼科新进展, 2024,44(10):790-795.
[21] 穆玉雪, 胡名状, 危冬昱, 等. 基于网络药理学及实验验证探讨枸杞子治疗干眼的作用机制. 国际眼科杂志, 2023,23(5): 738-746.
[22] 杨帆, 李二军, 许颖. 糖尿病视网膜病变患者血清三叶因子 1 和膜联蛋白 A2 表达及其诊断价值. 国际眼科杂志, 2025,25(8): 1347-1351.
[23] 徐卫星. CAMK2D 对碘酸钠诱导视网膜损伤、激光诱导 CNV 生成及 RPE 屏障功能的影响. 大连医科大学,2024.
[24] 邱在玲, 林诗晗, 曾建钗, 等. miR-146a-5p 对人牙髓干细胞成牙本质分化的影响. 实用口腔医学杂志, 2019,35(6):830-833.
[25] Xu WX, Cao L, Liu H. CAMK2D and complement factor I-involved calcium/calmodulin signaling modulates sodium iodate-induced mouse retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2025,66(1):63.
[26] Carleton M, Oesch NW. Bridging the gap of vision restoration. Front Cell Neurosci, 2024,18:1502473.
[27] Molday RS. Insights into the molecular properties of ABCA4 and its role in the visual cycle and stargardt disease. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015,134:415-431.
[28] Różanowska MB. Lipofuscin, its origin, properties, and contribution to retinal fluorescence as a potential biomarker of oxidative damage to the retina. Antioxidants (Basel), 2023,12(12):2111.
[29] Abdouh M, Chen YX, Goyeneche A, et al. Blue light-induced mitochondrial oxidative damage underlay retinal pigment epithelial cell apoptosis. Int J Mol Sci, 2024,25(23):12619.