

SUN Simin, FENG Jundong, FU Hao, HE Chengyu, TIAN Liuxin, BO Hongyu. Compared Analysis of Retinal Protein Expression Induced by Neutron Radiation and Microgravity (in Chinese). *Chinese Journal of Space Science*, 2025, 45(5): 1330–1341. CSTR:32142.14.cjss.2024-0133. DOI:10.11728/cjss2025.05.2024-0133

模拟空间辐射与微重力环境对鼠视网膜 蛋白表达的影响对比*

孙思敏 丰俊东 付 豪
何承宇 田刘欣 薄宏宇

(南京航空航天大学材料科学与技术学院 南京 211106)

摘 要 研究通过生物信息学方法对比中子辐射与微重力对鼠视网膜蛋白表达的影响, 旨在理解空间环境对视网膜的损伤机制提供生物学基础. 基于差异蛋白数据, 结合基因本体论 (GO)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 分析及蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建发现: 中子辐射 GO 分析显著富集于应对外源性刺激, 肌动蛋白丝, 相同蛋白结合, 微重力则主要富集于相机型眼晶状体发育, 线粒体和晶状体结构成分. 中子辐射组 KEGG 富集于运动蛋白通路, 黏附斑通路和肌动蛋白细胞骨架调控等通路; 微重力组富集于运动蛋白和心肌收缩通路. PPI 网络核心模块显示, 中子辐射刺激最显著的生物过程为肌肉收缩, 微重力组最显著的生物过程为相机型眼发育. 在中子辐射和微重力刺激下, 蛋白 PMEL, PTN, TPM1, RAB27A 表达变化趋势一致, PDPN (Podoplanin) 出现相反的变化趋势. 结论揭示视网膜蛋白对中子辐射和微重力刺激的响应存在差异.

关键词 中子辐射, 微重力, 视网膜, 差异蛋白

中图分类号 Q291

Compared Analysis of Retinal Protein Expression Induced by Neutron Radiation and Microgravity

SUN Simin FENG Jundong FU Hao
HE Chengyu TIAN Liuxin BO Hongyu

(College of Materials Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106)

Abstract This study employs bioinformatics methods to analyze and compare the effects of neutron radiation and microgravity environments on retinal protein expression in mice, providing a biological basis for understanding the mechanisms of retinal damage induced by space environments. Furthermore, it offers insights for risk assessment and protective measures related to space environments. We obtained differential expression data of retinal proteins in mice exposed to neutron radiation and microgravity en-

* 中国载人航天工程空间医学实验项目 (HYZHXM02004) 和国家自然科学基金项目 (U2267220) 共同资助

2024-10-22 收到原稿, 2025-05-21 收到修定稿

©The Author(s) 2025. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

vironments. Various bioinformatics methods, including GO and KEGG enrichment analyses, PPI network construction and module analysis, and Hub protein screening and analysis, were employed to compare the effects of neutron radiation and microgravity on retinal protein differential expression. The results show that there were differences in the most significantly enriched functions. Neutron radiation inducement primarily enriched in functions such as “response to xenobiotic stimulus”, “actin filament”, and “identical protein binding”. Microgravity inducement enriched in functions such as “lens development in camera-type eye”, “mitochondrion”, and “structural constituent of eye lens”. The KEGG analysis showed that the changes in the “Motor proteins” pathway were consistent under both neutron radiation and microgravity inducement. In addition, neutron radiation inducement also enriched in the “Focal adhesion” and “Regulation of actin cytoskeleton” pathways, while microgravity inducement also enriched in the “Cardiac muscle contraction” pathway. The Hub proteins and Biological Process (BP) of the most significant modules were different. The most significant BP under neutron radiation inducement was “muscle contraction”, while under microgravity inducement, “camera-type eye development” was the most significant. Under different inducement, the expression trends of proteins PMEL, PTN, TPM1, and RAB27A were consistent. However, PDPN showed an opposite change. The results suggest that retinal proteins respond differently to neutron radiation and microgravity stimuli. These findings have the potential to elucidate the mechanisms of retinal damage caused by space radiation or microgravity and provide a reference for developing targeted protective measures.

Key words Neutron radiation, Microgravity, Retina, Differentially expressed protein

0 引言

随着人类空间探索的深入, 航天员健康和执行任务的安全性一直是研究的热点. 在空间复杂的环境中, 空间辐射和微重力是对生命活动影响最为重要的两个空间环境因素.

眼睛经常暴露在辐射、大气氧和环境化学物质中, 还有可能受到物理擦伤等^[1]. 在这些环境的刺激下, 眼内视网膜中的活性氧可能增加, 并且视网膜的某些区域富含脂质过氧化底物, 例如脊椎动物的光感受器细胞膜富含多元不饱和脂肪酸, 更易受到氧化损伤^[2]. 针对空间环境对眼部的影响, 美国国家航空航天局 (NASA) 定义了航天相关神经眼综合征 (SANS)^[3], 微重力对眼球形态、眼压、屈光状态及视功能产生影响^[4], 导致视网膜的血管密度下降^[5], 影响血液-视网膜屏障 (BRB) 的完整性并存在发展为晚期视网膜变性的潜在风险^[6]等. 空间辐射对眼部影响的研究相对较少, 但电离辐射对眼部的影响是不可忽视的, 暴露于低剂量电离辐射 (例如 γ 射线、质子、氧离子) 可诱导视网膜氧化损伤和细胞凋亡, 即便在 0.1 Gy 的剂量下, 视网膜内皮细胞也会发生显著变化^[1].

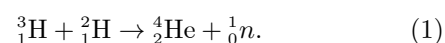
当前, 大部分研究关注辐射或微重力单一因素或复合因素对视网膜的影响. 但对两个因素作用机制的

对比研究十分必要, 厘清作用机制的不同将更利于理解辐射与微重力对视网膜的影响及原理, 以及有效且针对性地提出防护手段. 本研究对比分析模拟空间辐射 (中子) 和微重力环境下视网膜蛋白组学数据, 初步探索这两种刺激对视网膜蛋白表达影响的差异, 为针对性地制定辐射或微重力防护措施提供参考, 以期更好地保护航天员的健康和保证航天任务顺利完成.

1 材料与方法

1.1 动物实验数据获取

中子辐射作用下视网膜蛋白差异表达数据, 来源于课题组模拟空间辐射开展的低剂量率中子辐射实验. 中子辐照组随机分对照组、辐照组, 每组 6 只: 采用中子管照射大鼠 3 天, 每天不超过 10 h. 辐照实验使用中子发生器为东北大学自主研发, 工作原理为离子源放电产生氦离子, 加速后打到靶上, 与氘发生下列反应:



中子能量为 14 MeV, 大鼠头部距点源 6 cm, 剂量率为 $0.0131 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$, 辐射组小鼠累积接受 0.36 Gy 中子辐射; 其对照组同步开展实验 (不予辐射, 其他环

境相同). 剥离视网膜, 开展蛋白组学研究^[7].

微重力作用下视网膜蛋白差异表达数据, 来源于在国际空间站 NASA 啮齿动物栖息地 (RH) 生活 35 天的 C57 BL/6 雄性小鼠, 其对照组小鼠在地面同步开展实验. 地面对照小鼠和空间飞行小鼠每组 6 只, 飞行任务组小鼠在返回地面评估健康状态, 与地面对照小鼠同时剥离视网膜, 开展蛋白组学研究^[8]. 这些数据来源于基因表达汇编 (GEO) 存储库, 接入标识符为 GSE131954^{*}.

1.2 GO 及 KEGG 富集分析

使用 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)^{**} (version: DAVID 2021) 在线生物信息库提取生物信息, 利用京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 以及基因本体论 (GO) 分析差异表达蛋白 (DEPs) 的生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 以及生物富集途径.

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络的构建及

网络模块分析

使用在线数据库 STRING^{***} 获得差异表达蛋白编码的蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI network). 参数 0.4 分以上的数据, 被认为具有统计学意义. 为可视化和分析分子相互作用网络, 将得到的蛋白互作数据导入 Cytoscape (version: 3.10.0) 中^[9], 并利用 Cytoscape 的插件 MCODE (Molecular Complex Detection) (version: 2.0.3) 对给定网络进行聚类, 以确定 PPI 网络中最密集和重要的模块^[10], 其默认标准如下: DEPree cut-off = 2, node score cut-off = 0.2, Max depth = 100 和 K-score = 2. 基于 adj $p < 0.05$ 的超几何分布和功能丰富阈值, 使用 BiNGO (version: 3.0.5)^[11] 对 GO 进行了注释.

1.4 枢纽蛋白的选择与分析

对生物网络的研究显示, 多数 PPI 服从 Scale-free 属性, 这意味着少数的节点在网络有大量连接, 而大部分节点都只有很少的连接, 这些少数节点是网络中心节点^[12]. 采用 Cytoscape 的 cytoHubba 插件 (version: 0.1), 基于递减原理筛选出中心基因^[13], 利用交互网络节点和蛋白质网络中 Scale-free 的特性,

分析统计节点及其分布, 找到网络中心的枢纽 (Hub) 蛋白.

1.5 中子辐射与微重力诱导视网膜蛋白差异表达对比

在上述研究的基础上, 对比分析中子辐射、微重力诱导视网膜差异表达蛋白的 GO 和 KEGG 富集通路, PPI 网络最显著模块、Hub 蛋白, 以及差异表达趋势一致的蛋白或趋势相反的蛋白.

1.6 统计学方法

各组数据采用平均数 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, 使用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 采用双尾、双样本异方差假设进行 T 检验来对比两组之间的差异. $p < 0.05$ 视为统计学上有显著性差异.

2 结果

2.1 中子辐射对鼠视网膜蛋白表达的影响

2.1.1 中子辐射诱导视网膜 DEPs 的功能及富集通路分析

实验共鉴定得到 110 种 DEPs, 其中辐照组样品较对照组样品上调表达蛋白 84 个, 下调表达蛋白 26 个^[7]. 在所有的 DEPs 中, BP, CC, MF 分别最显著富集在应对外源性刺激, 肌动蛋白丝和相同蛋白结合, GO 富集通路结果如图 1 所示. KEGG 通路分析显示, DEPs 主要富集在黏附斑, 肌动蛋白细胞骨架调控和运动蛋白等相关通路, 具体 KEGG 富集通路结果如图 2 所示.

2.1.2 中子辐射诱导视网膜 DEPs 枢纽蛋白的筛选和显著模块分析

使用 STRING 在线搜索并获得了 110 个差异蛋白的 PPI 网络, 该网络由通过 70 条边连接的 31 个节点组成, 如图 3 所示 (图中颜色越深, 表明节点度越高). 节点度的统计分析表明, 最高的节点是蛋白 VCL (节点度为 14), 表明该蛋白在 PPI 网络中起重要作用, 枢纽蛋白的节点度见表 1. 最重要的模块 (Score: 8.000) 所涉及蛋白的节点度均不低于其他蛋白, 该模块的部分功能见表 2 和表 3. 其中这个模块中最显著的生物过程为肌肉收缩, 包括枢纽蛋白 CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL,

* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44696-0>

** <https://david.ncifcrf.gov>

*** <https://cn.string-db.org>

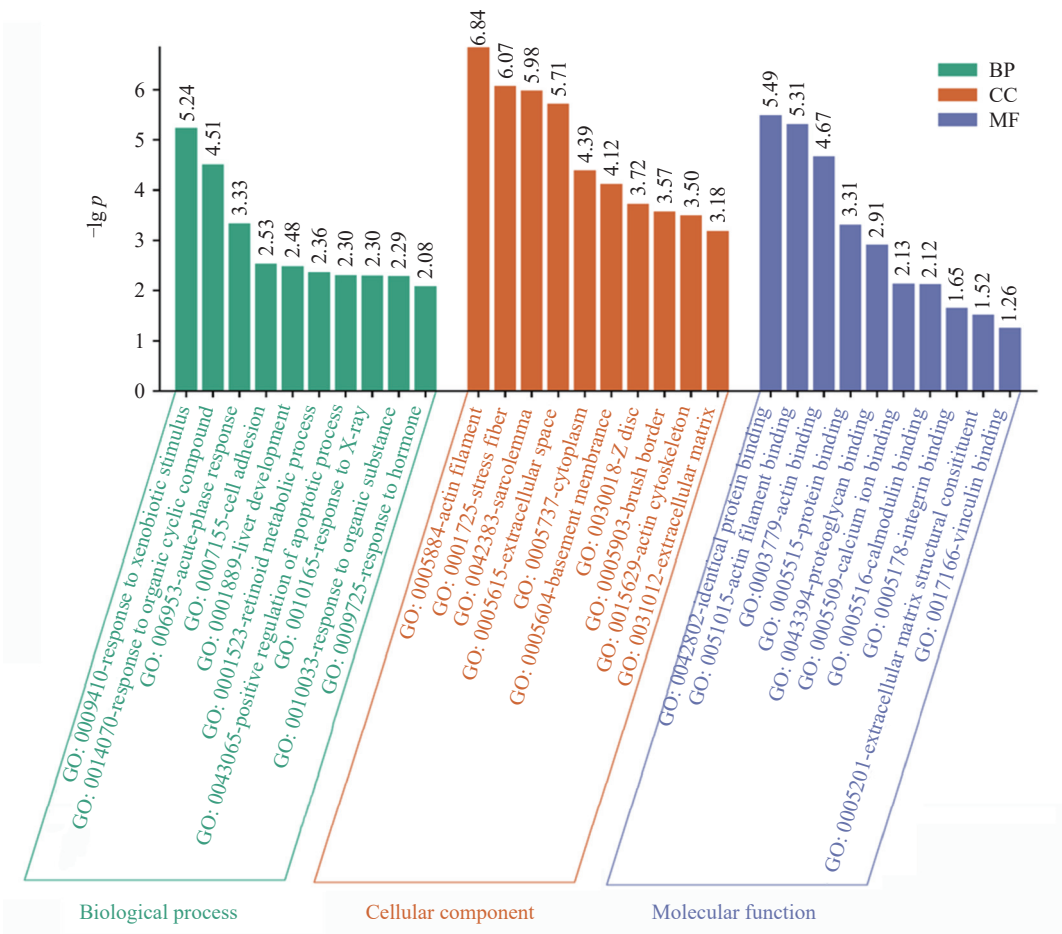


图 1 中子辐射诱导视网膜差异表达蛋白生物学过程、细胞组分、分子功能的 GO 分析
Fig. 1 GO analysis of BP, CC, and MF of DEPs induced by neutron radiation in retina

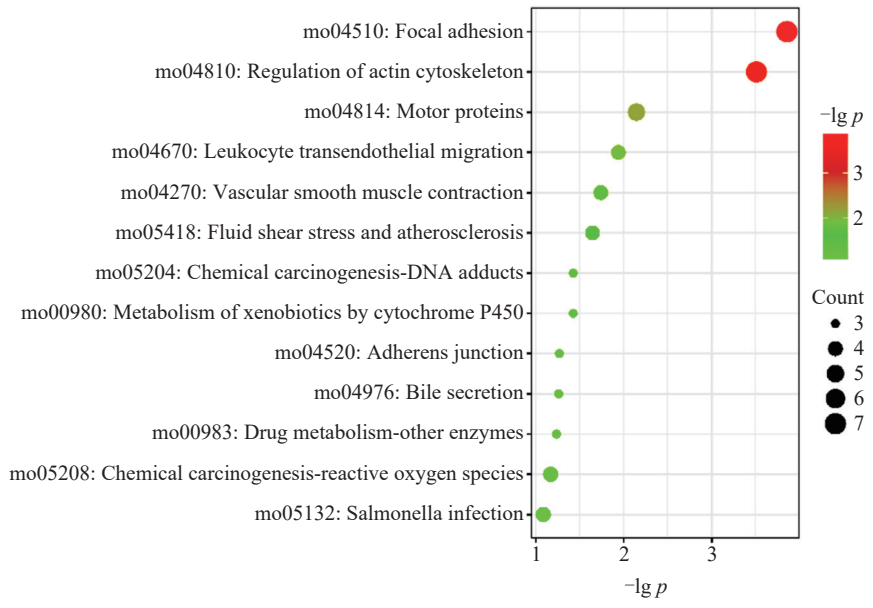


图 2 中子辐射诱导视网膜差异表达蛋白 KEGG 通路分析气泡
Fig. 2 Bubble chart of KEGG pathway analysis of DEPs induced by neutron radiation in retina

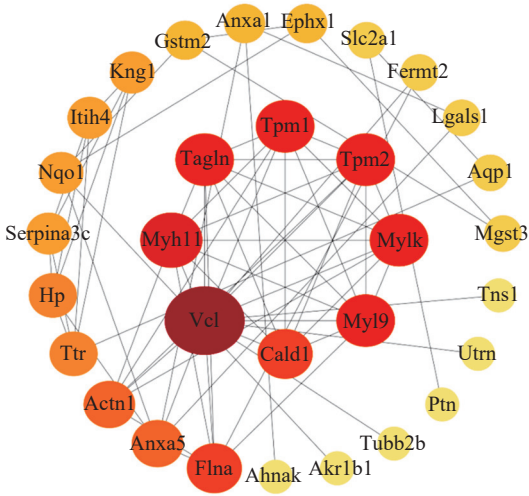


图 3 中子辐射诱导视网膜差异表达蛋白的 PPI, 中间的同心圆网络为最重要的模块

Fig. 3 PPI network of DEPs induced by neutron radiation in retina, with the innermost concentric circles representing the most important modules

表 1 中子辐射诱导视网膜蛋白差异表达枢纽蛋白的节点度 (前 10 个)

Table 1 Node degree of differentially expressed Hub proteins in the retina induced by neutron radiation (top 10)

Rank	Name	Score
1	VCL	14
2	MYH11	9
3	MYL9	8
3	TAGLN	8
3	MYLK	8
3	TPM2	8
3	TPM1	8
8	CALD1	7
8	FLNA	7
10	ANXA5	6

MYLK; 其次为肌肉系统过程, 包括枢纽蛋白 CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL, MYLK; 以及系统过程.

2.2 微重力环境对鼠视网膜蛋白表达的影响

2.2.1 微重力环境诱导视网膜 DEPs 的功能及富集通路分析

实验共鉴定得到 224 种 DEPs, 其中飞行任务组

表 2 最重要模块的蛋白组成 (中子辐射)

Table 2 Protein composition of the most important module (neutron radiation)

Name	Log2FC	p-value
VCL	0.315672606	0.003270326
TAGLN	1.306693581	0.000112783
MYLK	0.842655794	0.001317789
MYL9	1.258456494	0.000221689
TPM1	0.792268363	0.000407139
TPM2	1.284591944	0.000206282
CALD1	0.509000461	0.000924537
MYH11	1.468484826	5.69×10^{-5}

样品较对照组样品上调表达蛋白 126 个, 下调表达蛋白 98 个^[8]. 在所有的 DEPs 中, BP, CC 和 MF 分别最显著富集在相机型眼晶状体的发育, 线粒体和晶状体结构成分, GO 富集通路结果如图 4 所示. KEGG 通路分析显示, DEPs 主要富集在运动蛋白, 心肌收缩等通路, 具体 KEGG 富集通路结果如图 5 所示.

2.2.2 微重力环境诱导视网膜 DEPs 枢纽蛋白的筛选和显著模块分析

使用 STRING 在线搜索 224 个差异表达蛋白的 PPI, 获得了蛋白相互作用网络, 该网络由通过 189 条边连接的 105 个节点组成, 节点度排名前 13 的枢纽蛋白如图 6 所示 (由于该网络节点较多, 显示不全, 仅显示排名前 13 的蛋白, 颜色越深, 表明节点度越高). 这些枢纽蛋白的节点度见表 4. 最重要的模块 (Score: 6.333) 涉及上述枢纽蛋白的一部分, 该模块部分功能见表 5 和表 6, 其中相机型眼发育是这个模块中最显著的生物过程, 包括枢纽蛋白 CRYGB, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB; 其次为眼发育和感觉器官发育. Mu 等^[14]通过对大鼠进行了为期 8 周的尾吊实验, 对视网膜进行蛋白组学检测发现相机型眼发育, 晶状体结构成分, 眼形态发生等成分出现显著变化, 与本文的微重力组别类似. 且研究发现小鼠在微重力环境下视网膜出现细胞凋亡成分, Mu 等^[14]也发现视网膜外核层可见大量凋亡细胞且发现促凋亡分子 Bax 和 Caspase 3 的表达水平升高, 验证了空间飞行微重力组实验数据的可靠性.

2.3 中子辐射与微重力诱导视网膜蛋白差异表达对比分析

将这两种组别 (中子辐照组与微重力组) 进行对

表 3 最重要模块的部分功能 (中子辐射)
Table 3 Partial functions of the most important module (neutron radiation)

GO-ID	p-value	Description	Genes in test set
6936	3.12×10^{-15}	Muscle contraction	CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL, MYLK
3012	8.59×10^{-15}	Muscle system process	CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL, MYLK
3008	9.35×10^{-6}	System process	CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL, MYLK
43462	2.13×10^{-6}	Regulation of ATPase activity	TPM2, TPM1
32501	6.22×10^{-5}	Multicellular organismal process	TAGLN, CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL, MYLK
30811	1.99×10^{-3}	Regulation of nucleotide catabolic process	TPM2, TPM1
33121	1.99×10^{-3}	Regulation of purine nucleotide catabolic process	TPM2, TPM1
48251	2.24×10^{-3}	Elastic fiber assembly	MYH11
43297	2.80×10^{-3}	Apical junction assembly	VCL
7517	2.90×10^{-3}	Muscle organ development	TAGLN, MYH11

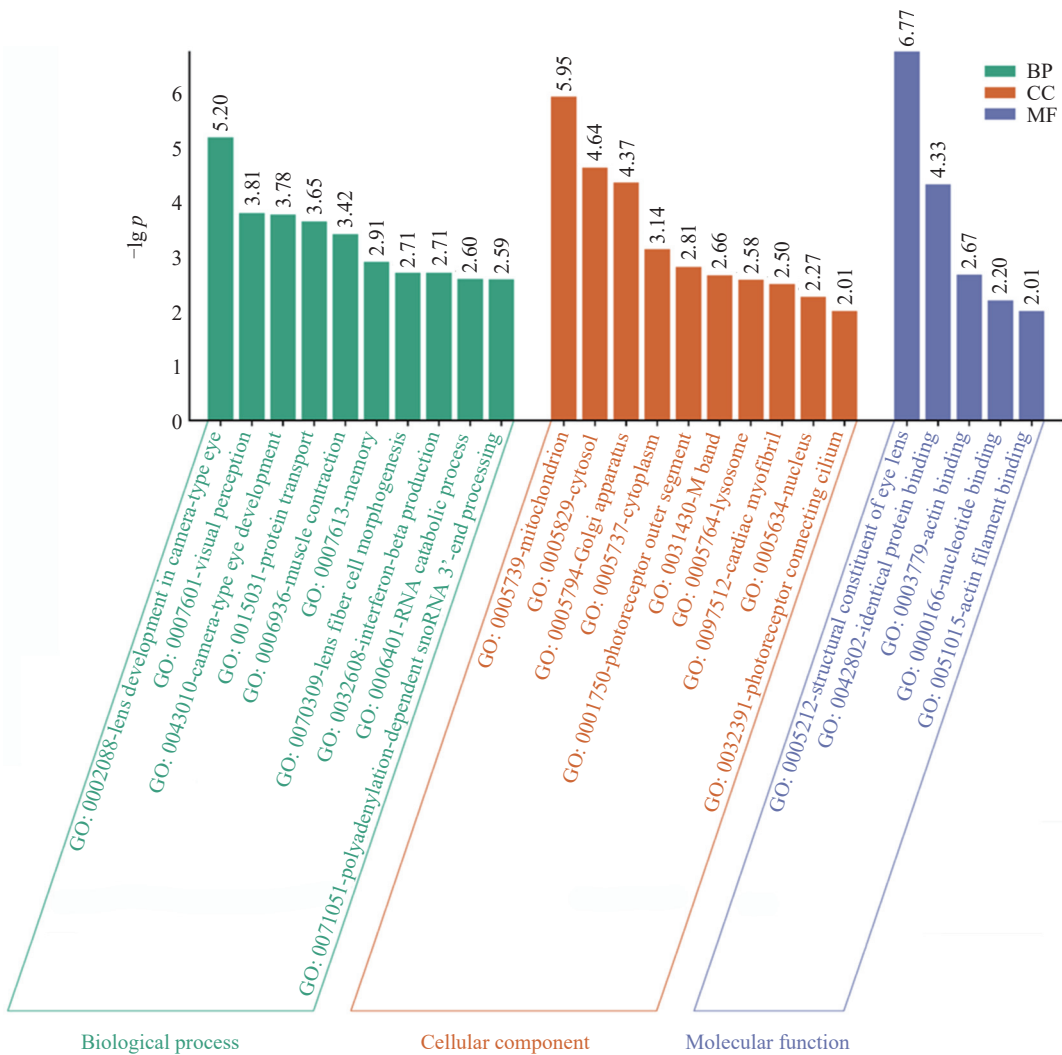


图 4 微重力环境诱导视网膜差异表达蛋白 BP, CC, MF 的 GO 分析

Fig. 4 GO analysis of DEPs in the retina induced by microgravity environment in terms of BP, CC, and MF

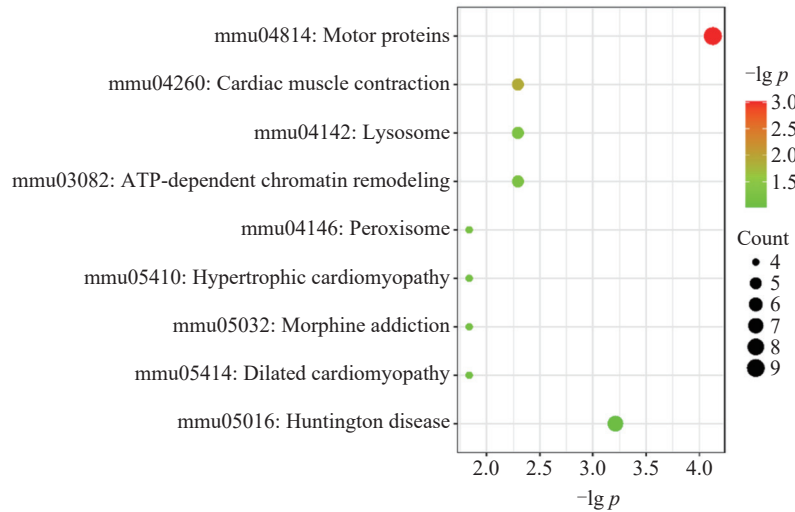


图 5 微重力环境诱导视网膜差异表达蛋白 KEGG 通路分析气泡

Fig. 5 Bubble chart of KEGG pathway analysis for differentially expressed proteins in the retina induced by microgravity environment

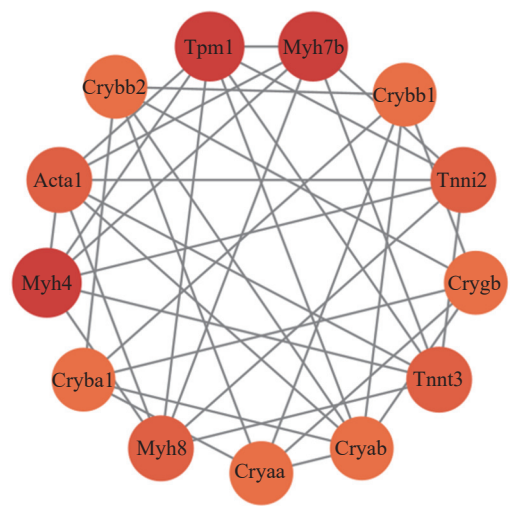


图 6 微重力环境诱导视网膜差异表达蛋白的 PPI

Fig. 6 PPI of DEPs in the retina induced by microgravity environment

表 4 微重力环境诱导视网膜蛋白差异表达枢纽蛋白的节点度 (前 10 个)

Table 4 Node degree of hub proteins differentially expressed in the retina induced by microgravity environment (top 10)

Name	Rank	Score
ACTA1	1	13
CRYAB	2	12
TPM1	3	11
TNNT3	4	9
TNNI2	4	9
MYH4	6	8
MYH8	6	8
CSRP3	6	8
CRYBB1	9	7
PXN	9	7

比研究以分析中子辐射与微重力对视网膜的影响. 对比了两组别所有的差异表达蛋白, 发现在这些差异表达蛋白中, PMEL, PTN, TPM1, RAB27A 在中子辐射或微重力作用下均出现了表达上调. PDPN (Podoplanin) 在中子辐射视网膜中表达下调, 而在微重力环境下表达上调, 见表 7 和表 8.

通过 DAVID 数据库对生物学过程、细胞组分、分子功能进行 GO 分析以及 KEGG 通路进行分析. 两种刺激下的 BP, CC, MF 均未重叠, 提示这可能是

中子辐射与微重力的作用机制不同所导致的. KEGG 通路分析结果显示, 中子辐射诱导的 DEPs 主要富集在黏附斑, 肌动蛋白细胞骨架调控和运动蛋白等通路, 主要调节细胞黏附、迁移、运动和细胞骨架、形态塑造等. 受试大鼠出现眼底玻璃体后脱离, 进一步佐证上述视网膜通路受到了中子辐射的影响^[7]. 空间站微重力环境诱导的 DEPs 主要富集在运动蛋白, 心肌收缩通路. KEGG 通路分析结果显示,

表 5 最重要模块的蛋白组成 (微重力环境)
Table 5 Protein composition of the most important module (microgravity environment)

Name	Log2FC	FDR adjusted
MYH8	-2.680179586	0.008307896
CRYBA1	-4.504364715	0.048282442
MYH4	-3.854188267	0.03172948
ACTA1	-4.332887144	0.03201434
CRYBB2	-3.667393599	0.047707924
TPM1	4.416731705	0.00830411
MYH7 B	-1.197124303	0.020782533
CRYBB1	-4.618506708	0.048847149
TNNI2	-3.456403098	0.047905536
CRYGB	-4.481399359	0.048586694
TNNT3	-4.306619987	0.031979082
CRYAB	-3.475877689	0.048783752
CRYAA	-3.132446621	0.048329001

表 6 最重要模块的部分功能 (微重力环境)
Table 6 Partial functions of the most important module (microgravity environment)

GO-ID	p-value	Description	Genes in test set
43010	9.94×10^{-10}	Camera-type eye development	CRYGB, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB
1654	2.54×10^{-9}	Eye development	CRYGB, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB
7423	3.05×10^{-8}	Sensory organ development	CRYGB, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB
2088	3.15×10^{-7}	Lens development in camera-type eye	CRYGB, CRYAA, CRYAB
60561	3.93×10^{-7}	Apoptosis involved in morphogenesis	CRYAA, CRYAB
70307	3.93×10^{-7}	Lens fiber cell development	CRYGB, CRYAA
70309	3.93×10^{-7}	Lens fiber cell morphogenesis	CRYGB, CRYAA
48513	5.86×10^{-7}	Organ development	ACTA1, CRYGB, TPM1, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB
7021	7.87×10^{-7}	Tubulin complex assembly	CRYAA, CRYAB
48731	3.12×10^{-6}	System development	ACTA1, CRYGB, TPM1, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB

两种刺激均可对视网膜运动蛋白通路产生影响, 但其他通路并不重合, 进一步提示中子辐射和微重力环境影响视网膜功能的机制存在差异.

PPI 网络分析结果显示, 视网膜在中子、微重力刺激下, 两者最重要模块及 Hub 蛋白均没有重合. 中子辐射刺激下, 最重要模块的最显著生物过程为肌肉收缩, 该过程包含枢纽蛋白 CALD1, TPM2, TPM1, MYH11, MYL9, VCL 和 MYLK. 包括新发现的 MYL9 在内的蛋白在细胞骨架、细胞活力、细胞黏

附、细胞外相互作用和平滑肌收缩等功能中发挥重要作用^[7], 以上蛋白为中子辐射诱导视网膜蛋白差异表达的关键蛋白. 而微重力作用下, 最重要模块的最显著生物过程是相机型眼发育, 该过程包含枢纽蛋白 CRYGB, CRYBA1, CRYBB2, CRYAA, CRYAB, 以上蛋白为微重力诱导视网膜蛋白差异表达的关键蛋白. CRYAA (Alpha-crystallin A chain) 和 CRYAB (Alpha-crystallin B chain) 被认为是重要的分子伴侣蛋白, 在氧化应激或其他细胞应激反应中防止蛋白质

表 7 中子辐射诱导视网膜 PMEL, PTN, TPM1, RAB27A, PDPN 差异表达情况
Table 7 Differential expression of PMEL, PTN, TPM1, RAB27A, and PDPN in the retina induced by neutron radiation

Name	Log2FC	p-value	Expression
PMEL	1.517216215	0.004936262	Up
PTN	0.538650012	0.015295976	Up
TPM1	0.792268363	0.000407139	Up
RAB27A	0.559708733	0.01240258	Up
PDPN	-0.390614025	0.015486769	Down

表 8 微重力环境诱导视网膜 PMEL, PTN, TPM1, RAB27A, PDPN 差异表达情况
Table 8 Differential expression of PMEL, PTN, TPM1, RAB27A, and PDPN in the retina induced by microgravity environment

Name	Log2FC	FDR adjusted	Expression
PMEL	5.279723053	0.00832942	Up
PTN	5.278221595	0.008310423	Up
TPM1	4.416731705	0.00830411	Up
RAB27A	2.720412802	0.031670154	Up
PDPN	2.148468927	0.048066344	Up

聚集^[15,16], 具有刺激视觉发育功能、促进眼部病理性新生血管形成等作用^[17,18], Alpha-crystallin 基因敲除的动物模型中表现出视网膜神经节细胞 (RGCs) 死亡率增加^[19]. CRYBA1 (Beta-crystallin A1) 定位于星形胶质细胞和视网膜色素上皮 (RPE) 的溶酶体, 参与视网膜血管的重塑, 特别是在 RPE 中, 其缺失会导致 v-atp 酶活性和 PAT4 功能失调, 导致溶酶体 pH 升高和细胞质氨基酸水平升高^[20-22]. CRYBB2 (Beta-crystallin B2) 在体外被认为与视网膜的再生功能相关, 有研究发现其在 RGCs 及轴突的丝状突起中表达, 具有显著的神经突起促进作^[23,24]. 有研究显示, CRYGB (Gamma-crystallin B) 具有潜在的神经保护作用, 当 RGCs 损失增加时, CRYGB 的丰度会随年龄的增长而下降^[25].

对比全部中子辐射和微重力诱导视网膜差异表达蛋白数据, 发现 PMEL, PTN, TPM1, RAB27A 在中子辐射或微重力作用下均出现了表达上调, 提示两种刺激对视网膜蛋白表达存在一定程度的一致性. PMEL (Melanocyte Protein PMEL) 在黑素小体的生物发生中起核心作用, 能在健康的眼睛中形成功能性淀粉样蛋白, 起支持黑色素沉积的作用, 而黑色素

对于保护视网膜免受光损伤和维持正常视觉功能至关重要. 因此, PMEL 表达上调可能与 SANS 中的视觉障碍症状有关, 其表达异常可能导致黑色素沉积不当^[26]. PTN (Pleiotrophin) 参与血管生成、纤维化和神经退行性疾病, 糖尿病视网膜病变患者视网膜前膜中有表达^[27]. 研究表明, PTN 能够降低 VEGFR2 上 Tyr1175 位点的磷酸化水平, VEGFR2 是血管内皮生长因子 (VEGF) 的主要受体之一, 在视网膜血管发育过程中起着至关重要的作用^[28], 本研究提示中子辐射和微重力可能通过上调 PTN 的表达进而影响视网膜血管生成. TPM1 (Tropomyosin-1) 的主要作用是维持细胞骨架的完整性, 在肌肉细胞收缩、细胞运动、促进细胞凋亡中发挥重要作用^[15]. 此外, 研究发现 TPM1 是一种新的全身性促衰老因子, 与衰老视网膜的功能缺陷相关, TPM1 通过磷酸化 PKA 介导下游的炎症通路导致视觉功能下降^[29,30], 提示中子辐射和微重力可能通过调控 TPM1 表达诱导鼠视网膜损伤. 与既往辐射研究一致, Iacono 等^[31]使用 Co60 射线低剂量全身照射哺乳动物发现 TPM1 表达升高. RAB27A (Ras-related protein Rab-27 A) 在 RPE 的黑素小体运动中起作用, 可以通过对离子通道的调

节,降低 RPE 的电流密度和减少 VEGF-A(血管内皮生长因子,调节血管生成)的分泌^[32,33]. Ouchi 等^[34]研究发现月球重力条件下小鼠唾液腺 Rab27 mRNA 表达上调.提示中子辐射和微重力可能通过调控 RAB27A 表达诱导鼠视网膜损伤.此外,PDPN 在中子辐射视网膜中表达下调,而在微重力环境下表达上调,提示该蛋白对中子辐射和微重力刺激的响应是不同的.相关研究显示,PDPN 是一种糖蛋白,可以通过其不同的伴侣介导对细胞迁移和黏附的影响^[35].同时,PDPN 被认为是一种特异性淋巴标志物^[36],在高血糖的诱导下,在大鼠视网膜微血管内皮细胞中显著上调表达^[37].Bonente 等^[38]发现 PDPN 通过调节影响 ERM 形成的多个细胞过程(例如增殖、迁移和细胞外基质重塑)来影响增殖性玻璃体视网膜病变(ERM).PDPN 在辐射和微重力两种环境下响应不同的具体机制有待进一步探究.

3 讨论

在空间环境中,空间辐射和微重力是两个不可忽视的环境要素,对生命活动的影响最为重要.蛋白作为生物体内最基本的分子组成部分之一,参与了几乎所有生物体内的生化过程和功能,是生物体内许多结构的基础并在生物体内担任着各种功能性角色,以蛋白为研究对象对于理解生命的基本原理、疾病或损伤的发生机制至关重要.本文重点关注空间辐射、微重力对视网膜蛋白表达的作用,探索空间辐射和微重力对视网膜作用机制的差异,为开展具有针对性的高效的防护措施研究提供参考.

空间辐射粒子十分复杂,主要包括中子、质子、重离子、电子等,以高传能线密度(LET)粒子为主.一些研究表明,中子对剂量当量率的贡献较大,占比为 14.4%~60.2%,这说明了中子对总剂量当量的重要贡献^[39].由于在人体构成中氢元素比例高,以及氢与中子更易发生反应的特性,中子对人体健康的影响在空间中不可忽视.课题组前期采用蛋白组学方法开展了中子对视网膜蛋白表达影响的研究.由于地面模拟微重力实验具有局限性,使用在国际空间站啮齿动物栖息地生活了 35 天的鼠的视网膜蛋白数据来研究微重力对生物体的影响,根据 NASA 公开的信息,该研究中所使用的硬件系统主要由透明聚碳酸酯和

不锈钢网构成,这些材料可以屏蔽质子并部分减缓中子速度.根据国际空间站辐射剂量监控报告(剂量当量率为 577~820 $\mu\text{Sv}\cdot\text{d}^{-1}$)^[40]估算,其 35 天平均累积剂量约 24 mSv,同时考虑到动物饲养区箱体材料的辐射屏蔽效果,其实际受照剂量更低,说明在这 35 天的飞行过程中小鼠主要受到微重力影响.此外,关于空间辐射与微重力对 DNA 修复的作用仍是一个有争议的话题.Pross 等^[41]用高达 140 Gy 的 X 射线照射酿酒酵母突变细胞并将其带到空间,分别允许或不允许其修复 DNA 双链断裂(DSB),在返回地球后与地面对照进行存活率差异比较后发现,微重力环境下 DSB 修复的效率降低,提示辐射与微重力对 DDR 可能具有协同作用.然而,Horneck 等^[42]对人成纤维细胞进行 10 Gy X 射线照射后,在空间培养并返回地球后进行 DSB 修复动力学分析,结果表明微重力对单链或双链断裂修复影响不显著,这说明细胞修复过程的紊乱可能无法简单归因于微重力与辐射的协同作用,提示微重力和辐射的联合作用效果还有待进一步研究.

由于空间站载荷有限,小鼠因体积小、代谢率低而更具实验可行性和资源利用优势,NASA 等机构的空间实验大多采用小鼠模型.课题组前期选择大鼠模型开展辐照实验,主要考虑到大鼠的视网膜结构相较于小鼠更接近人类.Strike^[43]发现接受 14 MeV 能量中子的 C57 BL 小鼠 LD₅₀/30 值为 4.32 Gy,SD 大鼠 LD₅₀/30 值为 4.94 Gy,从数值上来看,虽然 SD 大鼠的辐射耐受性略高,但这一差距并不显著,表明小鼠和大鼠在中子辐射耐受性上差别不大.且文献研究显示,根据小鼠的基因位置可以准确预测大鼠相应的基因位置^[44],小鼠与大鼠视网膜的蛋白种类绝大部分相同.本研究显示中子辐射、微重力刺激下,相关蛋白在大小鼠均表达,并且未重合的 Hub 蛋白在大小鼠也均有表达.基于以上考虑,采用空间站飞行 35 天小鼠实验数据与大鼠中子辐照实验数据进行对比以分析辐射与微重力对视网膜的影响.研究结果能够初步阐释中子、微重力对视网膜的不同作用机制.

4 结论

综上所述,中子辐射与微重力对视网膜蛋白表达的影响存在显著差异,提示二者可能通过不同的分子

机作用于视网膜功能与结构. 此外, 部分蛋白如 PMEL, PTN, TPM1, RAB27A 在两种刺激下呈一致性表达趋势, 而 PDPN 呈相反趋势, 提示两种刺激存在潜在的共同应答与差异性调控机制. 本研究初步揭示了空间环境中中子辐射和微重力对视网膜蛋白组的不同影响, 为探索空间飞行相关视觉损伤的发生机制提供了生物信息学基础. 但其具体调控机制仍需进一步深入研究与验证.

医学伦理 研究通过南京韩锐-赞科中德肿瘤研究所实验动物伦理委员会审查并符合 1964 年《赫尔辛基宣言》及之后的修订版或类似的伦理标准. 审查编号: SYXK(SU)2021-0086.

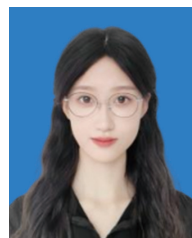
利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突.

参考文献

- MAO X W, BOERMA M, RODRIGUEZ D, *et al.* Acute effect of low-dose space radiation on mouse retina and retinal endothelial cells[J]. *Radiation Research*, 2018, **190**(1): 45-52
- VAN REYK D M, GILLIES M C, DAVIES M J. The retina: oxidative stress and diabetes[J]. *Redox Report*, 2003, **8**(4): 187-192
- LEE A G, MADER T H, GIBSON C R, *et al.* Spaceflight Associated Neuro-ocular Syndrome (SANS) and the neuro-ophthalmologic effects of microgravity: a review and an update[J]. *NPJ Microgravity*, 2020, **6**(1): 7
- MADER T H, GIBSON C R, PASS A F, *et al.* Optic disc edema, globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight[J]. *Ophthalmology*, 2011, **118**(10): 2058-2069
- VYAS R J, YOUNG M, MURRAY M C, *et al.* Decreased vascular patterning in the retinas of astronaut crew members as new measure of ocular damage in spaceflight-associated neuro-ocular syndrome[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, **61**(14): 34
- MAO X W, BYRUM S, NISHIYAMA N C, *et al.* Impact of spaceflight and artificial gravity on the mouse retina: biochemical and proteomic analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(9): 2546
- FENG J D, ZHAO X D, LUO Y Z, *et al.* Effects of neutron irradiation on ophthalmic fundus structure, visual function and the mechanisms underlying these effects in rats[J]. *Acta Astronautica*, 2021, **186**: 403-417
- MAO X W, NISHIYAMA N C, BYRUM S D, *et al.* Characterization of mouse ocular response to a 35-day spaceflight mission: evidence of blood-retinal barrier disruption and ocular adaptations[J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 8215
- SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, **13**(11): 2498-2504
- BADER G D, HOGUE C W V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks[J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, **4**(1): 2
- MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks[J]. *Bioinformatics*, 2005, **21**(16): 3448-3449
- JEONG H, TOMBOR B, ALBERT R, *et al.* The large-scale organization of metabolic networks[J]. *Nature*, 2000, **407**(6804): 651-654
- CHIN C H, CHEN S H, WU H H, *et al.* cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Systems Biology*, 2014, **8**(4): S11
- MU Y X, ZHANG N, WEI D Y, *et al.* Müller cells are activated in response to retinal outer nuclear layer degeneration in rats subjected to simulated weightlessness conditions[J]. *Neural Regeneration Research*, 2025, **20**(7): 2116-2128
- MIYARA N, SHINZATO M, YAMASHIRO Y, *et al.* Proteomic analysis of rat retina in a steroid-induced ocular hypertension model: potential vulnerability to oxidative stress[J]. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 2008, **52**(2): 84-90
- ASHBY R S, MEGAW P L, MORGAN I G. Changes in retinal α B-crystallin (cryab) RNA transcript levels during periods of altered ocular growth in chickens[J]. *Experimental Eye Research*, 2010, **90**(2): 238-243
- ZHANG S B, LIU C P, WANG Q, *et al.* CRYAA and GJA8 promote visual development after whisker tactile deprivation[J]. *Heliyon*, 2023, **9**(3): e13897
- XU Q, BAI Y J, HUANG L Z, *et al.* Knockout of α A-crystallin inhibits ocular neovascularization[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2015, **56**(2): 816-826
- FORT P E, LAMPI K J. New focus on alpha-crystallins in retinal neurodegenerative diseases[J]. *Experimental Eye Research*, 2011, **92**(2): 98-103
- BOYA P, KAARNIRANTA K, HANDA J T, *et al.* Lysosomes in retinal health and disease[J]. *Trends in Neurosciences*, 2023, **46**(12): 1067-1082
- VALAPALA M, EDWARDS M, HOSE S, *et al.* β A3/A1-crystallin is a critical mediator of STAT3 signaling in optic nerve astrocytes[J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**(1): 8755
- ZIGLER JR J S, SINHA D. β A3/A1-crystallin: more than a lens protein[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2015, **44**: 62-85
- BÖHM M R R, PFROMMER S, CHIWITT C, *et al.* Crystallin- β -b2-overexpressing NPCs support the survival of injured retinal ganglion cells and photoreceptors in rats[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012,

- 53**(13): 8265-8279
- [24] LIEDTKE T, SCHWAMBORN J C, SCHRÖER U, *et al.* Elongation of axons during regeneration involves retinal crystallin β b2 (crybb2)[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, **6**(5): 895-907
- [25] LIU H H, BELL K, HERRMANN A, *et al.* Crystallins play a crucial role in glaucoma and promote neuronal cell survival in an in vitro model through modulating Müller cell secretion[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2022, **63**(8): 3
- [26] HODGES E D, CHRYSTAL P W, FOOTZ T, *et al.* Disrupting the repeat domain of premelanosome protein (PMEL) produces dysamyloidosis and dystrophic ocular pigment reflective of pigmentary glaucoma[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(19): 14423
- [27] ZHU X, BAI Y, YU W, *et al.* The effects of pleiotrophin in proliferative diabetic retinopathy[J]. *PloS One*, 2015, **10**(1): e0115523
- [28] LAMPROU M, KASTANA P, KOFINA F, *et al.* Pleiotrophin selectively binds to vascular endothelial growth factor receptor 2 and inhibits or stimulates cell migration depending on $\alpha_v \beta_3$ integrin expression[J]. *Angiogenesis*, 2020, **23**(4): 621-636
- [29] LI R, LIANG Y X, LIN B. Accumulation of systematic TPM1 mediates inflammation and neuronal remodeling by phosphorylating PKA and regulating the FABP5/NF- κ B signaling pathway in the retina of aged mice[J]. *Aging Cell*, 2022, **21**(3): e13566
- [30] RONG L, JING Z, MENG C, *et al.* TPM1 mediates inflammation by regulating PKA/CREB signaling pathway [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2022, **63**(7): 4125-F0362
- [31] IACONO D, HATCH K, MURPHY E K, *et al.* Proteomic changes in the hippocampus of large mammals after total-body low dose radiation[J]. *PloS One*, 2024, **19**(3): e0296903
- [32] KLUMP A E, TEOFILO K, LEGACKI E, *et al.* Analysis of the linkage of MYRIP and MYO7A to melanosomes by RAB27A in retinal pigment epithelial cells[J]. *Cell Motility*, 2007, **64**(6): 474-487
- [33] REICHHART N, MARKOWSKI M, ISHIYAMA S, *et al.* Rab27a GTPase modulates L-type Ca^{2+} channel function via interaction with the II-III linker of $\text{Ca}_v1.3$ subunit[J]. *Cellular Signalling*, 2015, **27**(11): 2231-2240
- [34] OUCHI T, KONO K, SATOU R, *et al.* Upregulation of *Amyl* in the salivary glands of mice exposed to a lunar gravity environment using the multiple artificial gravity research system[J]. *Frontiers in Physiology*, 2024, **15**: 1417719
- [35] RETZBACH E P, SHEEHAN S A, KRISHNAN H, *et al.* Independent effects of Src kinase and podoplanin on anchorage independent cell growth and migration[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2022, **61**(7): 677-689
- [36] RUSU M C, NICOLESCU M I, VRAPCIU A D. Evidence of lymphatics in the rat eye retina[J]. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2022, **244**: 151987
- [37] ESHAQ R, WARAR R, HARRIS N. Upregulation of Prox-1, podoplanin and LYVE-1 in retinal endothelial cells under hyperglycemic conditions[J]. *The FASEB Journal*, 2020, **34**(S1): 1
- [38] BONENTE D, BIANCHI L, DE SALVO R, *et al.* Co-Expression of podoplanin and CD44 in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(11): 9728
- [39] BADHWAR G D, KEITH J E, CLEGHORN T F. Neutron measurements onboard the space shuttle[J]. *Radiation Measurements*, 2001, **33**(3): 235-241
- [40] ZEITLIN C, CASTRO A J, BEARD K B, *et al.* Results from the radiation assessment detector on the international space station: Part 1, the charged particle detector[J]. *Life Sciences in Space Research*, 2023, **39**: 67-75
- [41] PROSS H D, KOST M, KIEFER J. Repair of radiation induced genetic damage under microgravity[J]. *Advances in Space Research*, 1994, **14**(10): 125-130
- [42] HORNECK G, RETTBERG P, KOZUBEK S, *et al.* The influence of microgravity on repair of radiation-induced DNA damage in bacteria and human fibroblasts[J]. *Radiation Research*, 1997, **147**(3): 376-384
- [43] STRIKE T A. Acute mortality of mice and rats exposed to 14 MeV neutrons[J]. *Radiation Research*, 1970, **43**(3): 679-690
- [44] NILSSON S, HELOU K, VALENTINSSON A, *et al.* Rat-mouse and rat-human comparative maps based on gene homology and high-resolution zoo-FISH[J]. *Genomics*, 2001, **74**(3): 287-298

作者简介



孙思敏 女, 2002年1月出生于河北省邯郸市, 现为南京航空航天大学能源动力专业研究生, 主要研究方向为辐射生物效应与辐射风险评估等。
E-mail: sunsimin@nuaa.edu.cn



丰俊东 (通信作者) 女, 1978年12月出生于黑龙江省哈尔滨市, 现为南京航空航天大学核科学与技术系副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为辐射风险评估与防护技术研究等。
E-mail: jundongfeng@nuaa.edu.cn