

血清补体 C3 糖基化修饰与糖尿病视网膜病变关系的研究

袁钟浩¹, 田洪涛¹, 赖治臻¹, 于伟泓², 周江³, 李智立¹

(1. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 北京 100005; 2. 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院眼科, 北京 100730; 3. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 也是造成全球工作年龄人群失明的主要原因。早期 DR 可通过控制血糖防止视力受损, 晚期 DR 会导致不可逆转的视力丧失。因此, 筛选早期 DR 诊断标志物对预防 DR 至关重要。前期研究发现, 血清补体 C3 与 DR 的发生发展密切相关。本研究以 C18 为补体 C3 完整糖肽的富集材料, 采用高性能质谱技术检测其糖肽, 结合生物学统计方法, 发现随着 DR 进展, 补体 C3 半乳糖修饰水平呈先升高后降低趋势。受试者工作特征分析 (receiver operating characteristic, ROC) 结果表明, 补体 C3 糖基化修饰具有良好的诊断效果, 其诊断精度 (area under curve, AUC) 可达 0.761。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 补体 C3; 糖基化修饰; 生物标志物

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0793-07

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0086

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0086

Study on Association of Serum Complement C3 Glycosylation with Diabetic Retinopathy

YUAN Zhong-hao¹, TIAN Hong-tao¹, LAI Zhi-zhen¹, YU Wei-hong², ZHOU Jiang³, LI Zhi-li¹

(1. Department of Biophysics and Structural Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China;

2. Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital,

Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China;

3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Diabetic retinopathy (DR), a common microvascular complication, is the leading cause of visual impairment among the working-age population. Late-stage DR can lead to irreversible vision loss, whereas vision impairment can be prevented by controlling blood sugar in a normal level in the early stage of DR. Notably, as early-stage DR is typically asymptomatic, the majority of DR patients are diagnosed at an advanced stage, which causes a great burden to the patients. Therefore, the development of accurate and efficient biomarkers for the early diagnosis of DR is essential for the prevention of DR. In recent decades, a large number of studies have found that serum complement C3 is closely associated with the development of DR. In this study, a method for the detection of

complement C3 by mass spectrometry was established by optimizing the enrichment conditions of glycopeptides using C18 materials. It was found that among volunteers with different stages of DR, the level of complement C3 galactose modification showed a tendency to rise first and then go down with the development of DR. The difference in complement C3 glycosylation was used for the diagnosis of different stages of DR, yielding an area under curve (AUC) of up to 0.761.

Key words: diabetic retinopathy (DR); complement C3; glycosylation; biomarker

截至 2021 年,全球糖尿病患者约有 5.36 亿人,预计到 2045 年,会增长到 7.38 亿人^[1]。2021 年统计数据显示,中国有 1.4 亿人患有糖尿病,是全世界糖尿病患者最多的国家^[2]。由此可见,糖尿病不仅在全世界有较高的患病率,而且在中国的防治形势也非常严峻。糖尿病的一般表现形式为长期的高血糖,会对患者组织或器官造成损伤,引起各种并发症,如糖尿病肾病、糖尿病足、心脑血管疾病以及糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)等,糖尿病并发症严重影响患者的生活甚至危害生命,大部分糖尿病患者死亡原因都与糖尿病并发症密切相关。

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的微血管病变,是由高血糖引起的视网膜损伤,全世界约有 1/3 的糖尿病患者有着不同程度的视网膜病变^[3]。全球范围内,DR 是导致工作人群视力损失的最大原因^[4-5]。在临床实践中,根据病情严重程度,可将 DR 分为增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)和非增殖性糖尿病视网膜病变(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)。根据发病阶段不同, NPDR 还可进一步分为轻型、中型以及重型。其中,轻型与中型 NPDR 为早期 DR,由于在临床实践中通常采取相似的应对策略,可以合称为背景 DR(background DR, BDR)^[6-7]。常见的 DR 诊断方式是眼底镜、眼底照相以及荧光素眼底血管造影等影像学技术^[8]。当患者被确诊为糖尿病后,会建议定期进行常规眼科检查以防止 DR 的发生发展。目前,激光和药物是治疗 DR 常用的方法,但它们都只能延缓疾病的发展,一旦 DR 恶化,不能逆转,因此 DR 的预防尤为关键。DR 的风险因素有高血压、高血糖、高血脂以及糖尿病病程等^[9-10]。临床实践中,仍缺乏有效的生物标志物对 DR 进行辅助诊断,主要依赖专业眼科医生的诊断和眼科检查仪器的精度。因此,发现准确度高并且快捷方便的生物标志物对 DR 患者

具有重要意义。

血清补体 C3 主要参与天然免疫过程^[11],其中 C3a 在 DR 患者血清中表达水平显著升高^[12]。研究发现^[13], I 型糖尿病与 C3 带有多甘露糖残基的未加工聚糖关系密切,可作为 I 型糖尿病诊断的标志物。

本研究拟以 C18 作为糖肽富集材料,结合高性能质谱技术,对早期 DR 患者与未患 DR 志愿者间补体 C3 糖基化修饰进行检测。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

7T SolariX XR 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪:美国布鲁克公司产品,配有 SmartBeam-II 激光系统和 DataAnalysis 4.4 数据分析系统。

30%丙烯酰胺溶液、二硫苏糖醇(DTT,分析纯):北京索莱宝科技有限公司产品;六水合氯化镁、甘油、苯胺:均为分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司产品;乙腈(ACN,质谱级):美国 Thermo Fisher 公司产品;三羟甲基氨基甲烷(Tris,分析纯)、甘氨酸(生物技术级)、十二烷基硫酸钠(SDS,生物技术级)、过硫酸铵(APS,分析纯)、二甲苯青 FF(分析纯)及四甲基乙二胺(TEMED,分析纯):美国 Amresco 公司产品;测序级胰酶:美国 Promega 公司产品;碘乙酰胺(IAA,分析纯)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA,色谱级):美国 Sigma-Aldrich 公司产品;三氟乙酸(TFA,色谱级)、25%氨水溶液(色谱级):美国 Aladdin 公司产品;3M Empore disk C18 固相萃取膜片:北京豫维科技有限公司产品;蛋白质电泳快速染色液:北京聚德安泰科技有限公司产品;碳酸氢铵(分析纯):美国 Sigma-Fluka 公司产品。

1.2 实验条件

1.2.1 血清样本收集 本研究共纳入 133 名志愿者,并获得知情同意。志愿者纳入标准为:1) 18 岁以上;2) 根据空腹血糖或糖化血红蛋白指标确

诊为Ⅱ型糖尿病^[14];3)根据影像学以及临床指南确定是否患有NPDR^[15]。排除标准为:1)具有Ⅰ型糖尿病史;2)怀孕或哺乳期的妇女;3)具有感染性疾病、癌症或自身免疫病史。志愿者分为3组:44名未患DR组(Non-DR)、44名早期DR患者组(BDR)以及45名晚期DR患者组(severe NPDR)。2021年6月~2022年6月,在北京市北京协和医院收集志愿者血清,所有参与者均采集晨起空腹外周静脉血,血液常规检查后于-80℃冰箱保存。在整个研究过程中,血清样本的收集与处理均按照《赫尔辛基宣言》相关标准进行,由中国医学科学院北京协和医院伦理审查委员会批准(No. ZS-979)。

1.2.2 二维凝胶电泳分离条件 参考相关文献^[16],非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-polyacrylamide gel electrophoresis, native-PAGE)与十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)联用可分离血清中的补体C3,具体方法如下:将10μL血清样本与等体积上样缓冲液混合均匀后,转移至4%~10% native-PAGE 梯度凝胶样品槽中电泳。每块 native-PAGE 凝胶以10 mA 恒定电流电泳1.5 h,然后改为25 mA 恒定电流分离3 h,电泳期间使用循环冷凝水维持10℃凝胶温度。native-PAGE 完成后,将凝胶置于染色液中过夜染色至蛋白条带清晰,染色完成后,使用纯净水浸泡至背景为无色。将补体C3所在的蛋白条带切下,使用DTT溶液于37℃反应45 min,然后使用纯净水冲洗残余DTT,加入IAA溶液于37℃避光反应30 min。将反应后的胶条置于配制好的12%SDS-PAGE凝胶胶板上,加入5% SDS-PAGE 浓缩胶,浓缩胶凝固后,以60 V 恒定电压电泳45 min,然后改为120 V 恒定电压分离1.5 h。SDS-PAGE 完成后,将凝胶置于染色液中染色至蛋白条带清晰,然后使用纯净水浸泡至背景为无色。切下补体C3对应的蛋白条带,备用。

1.2.3 胶内酶解 将上述SDS-PAGE凝胶条带碎成粒径约1 mm的胶粒,加入脱色液浸泡胶粒直至无色,使用乙腈除去胶粒内水分,吸去乙腈,将胶粒置于真空离心浓缩仪中除去残余的乙腈。真空干燥后加入10 μL 12.5 mg/L 胰酶溶液,于4℃放置1 h,加入100 μL 25 mmol/L 碳酸氢

铵溶液,振荡后置于37℃反应16 h。反应完成后,吸出上清液,真空干燥,备用。

1.2.4 糖肽富集条件优化 使用C18材料对补体C3糖肽进行富集,将C18材料切成边长约2 mm的正方形,置于20%乙腈中浸泡活化,在不同上样条件与洗脱条件下优化补体C3糖肽富集,将上样液(纯净水、10%乙腈或20%乙腈)加入上述真空干燥后的酶解液中,轻微振荡2 h,除去上清液。使用0.1%TFA冲洗C18富集材料后,加入洗脱液(20%乙腈-0.1%TFA或80%乙腈-0.1%TFA)洗脱2 h,吸取上清液,置于真空离心浓缩仪中真空干燥后进行质谱检测。

1.2.5 质谱检测 向真空干燥后的富集样本中加入5 μL 纯净水重溶,取0.5 μL 重溶样本点于MTP AnchorChip™ 400/384 T F靶上,将等体积10 g/L CHCA溶液与样本吹吸混合,室温自然干燥后,使用7T SolariX XR FTICR MS进行质谱检测。正离子模式检测,激光能量50%,*m/z* 400分辨率160 000。通过自动采集方式进行质谱数据采集,质量采集范围*m/z* 2 000~4 000。

1.2.6 数据分析 利用DataAnalysis 4.4软件处理质谱数据,将信噪比大于3.0的糖肽峰的*m/z*值和信号强度导入Microsoft Excel表中进行分析。Mann-Whitney *U*检验、Kruskal-Wallis检验和卡方检验用于检验组间样本信息的差异。使用二元逻辑回归将有差异糖肽比整合为1组,受试者工作特征分析(receiver operating characteristic, ROC)用于检验糖肽比组合在训练组与验证组中DR的诊断能力,曲线下面积(area under the curve, AUC)用于量化诊断能力优劣,诊断灵敏度和特异度由最大约登指数确定。使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,*p*<0.05视为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 志愿者临床特征

志愿者临床特征列于表1。志愿者年龄性别无统计学差异,高血压状况无明显区别,3组志愿者临床背景相似。此外,晚期DR组志愿者糖尿病病程明显长于其他2组,但空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)在3组志愿者中无统计学差异,表明作为DR的风险因素,FPG不能用于预测个体是否患有DR。

表1 参与者临床特征

Table 1 Clinical characteristics of participants

特征 Feature	未患DR组 Non-DR(<i>n</i> =44)	早期DR组 BDR(<i>n</i> =44)	晚期DR组 Severe NPDR(<i>n</i> =45)	<i>p</i> 值 <i>p</i> Value
年龄/岁 ^a	63.50(59.25~65.00)	64.50(56.00~70.00)	64.0(55.00~67.00)	0.968
性别(男/女) ^b	21/23	20/24	24/21	0.746
糖尿病病程/年 ^a	10.00(7.00~10.00)	10.50(3.75~20.00)	15.00(10.00~20.00)	0.004
高血压人数(占比/%) ^b	26(59.10)	26(59.10)	24(53.3)	0.818
空腹血糖/(mmol/L) ^a	7.450(6.725~9.450)	8.400(7.200~10.400)	8.800(7.000~11.550)	0.110

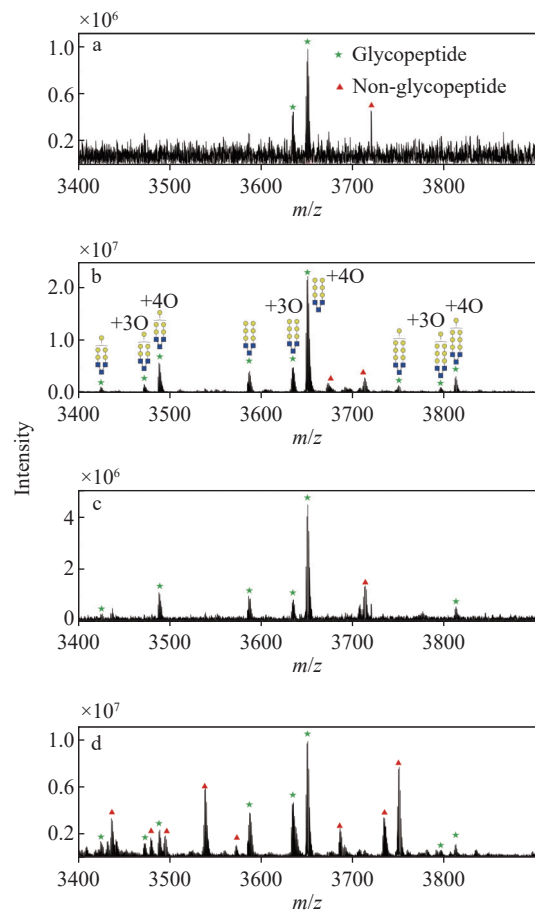
注: 连续变量采用中位数与上下四分位数表示; a. Mann-Whitney *U* 检验; b. 卡方检验

2.2 补体 C3 O-糖肽富集条件优化

参考文献报道^[16], C18 材料可用于富集补体蛋白 C3 的 O-糖肽, 流程如下: 20%乙腈溶液可实现糖肽的特异性吸附, 用 0.1%TFA 洗涤材料 1 次后, 20%乙腈-0.1%TFA 可将糖肽从材料上洗脱。因此, 在前期研究基础上, 探索降低上样环境的极性对糖肽富集的影响, 通过降低上样液中乙腈的比例, 考察了纯净水、10%乙腈或 20%乙腈 3 种上样条件, 结果示于图 1。可见, 10%乙腈的富集效果最好, 富集的糖肽信噪比高, 非糖肽信号较少, 示于图 1b。此外, 本研究还探索了 20%乙腈-0.1%TFA 及 80%乙腈-0.1%TFA 的洗脱效果。其中, 80%乙腈-0.1%TFA 的极性相对较弱, 能够将 C18 富集材料吸附的多肽同时洗脱, 质谱图非常复杂, 不适合补体 C3 的糖肽富集, 示于图 1d; 而用极性较强的 20%乙腈-0.1%TFA 可以得到更好的洗脱效果, 示于图 1c。综上所述, 本研究采用 10%乙腈上样, 20%乙腈-0.1%TFA 洗脱, 采用该优化的糖肽富集条件, 共检测 Thr582 位点 (SGQSEDRQVPGQMT⁵⁸²LK) 的 9 种补体 C3 O-糖肽, 列于表 2。

2.3 补体 C3 糖基化修饰变化与 DR 诊断

用 Kruskal-Wallis 检验验证 3 组患者补体 C3 糖肽比值的差异, 结果示于图 2, 共有 7 种糖肽比值在 3 组患者间存在统计学差异, 分别为 Thr582 位点的(N3G7+3O)/(N3G5+4O)、(N3G7+3O)/N3G6、(N3G7+3O)/(N3G6+3O)、N3G7/(N3G5+4O)、N3G7/N3G6、N3G7/(N3G6+3O)以及 N3G7/(N3G6+4O)。在 3 组患者中, 上述糖肽比值的变化趋势基本一致, 均为先升高后降低, 表明补体 C3 的半乳糖基化修饰在糖网发病早期逐渐升高, 糖网晚期的半乳糖基化修饰水平逐渐降低。将上述糖肽比值



注: a. 纯净水上样, 20%乙腈-0.1%TFA 洗脱; b. 10%乙腈上样, 20%乙腈-0.1%TFA 洗脱; c. 20%乙腈上样, 20%乙腈-0.1%TFA 洗脱; d. 20%乙腈上样, 80%乙腈-0.1%TFA 洗脱

图1 不同富集条件的补体 C3 糖肽的代表性质谱图
Fig. 1 Representative mass spectra of complement C3 glycopeptide under different enrichment conditions

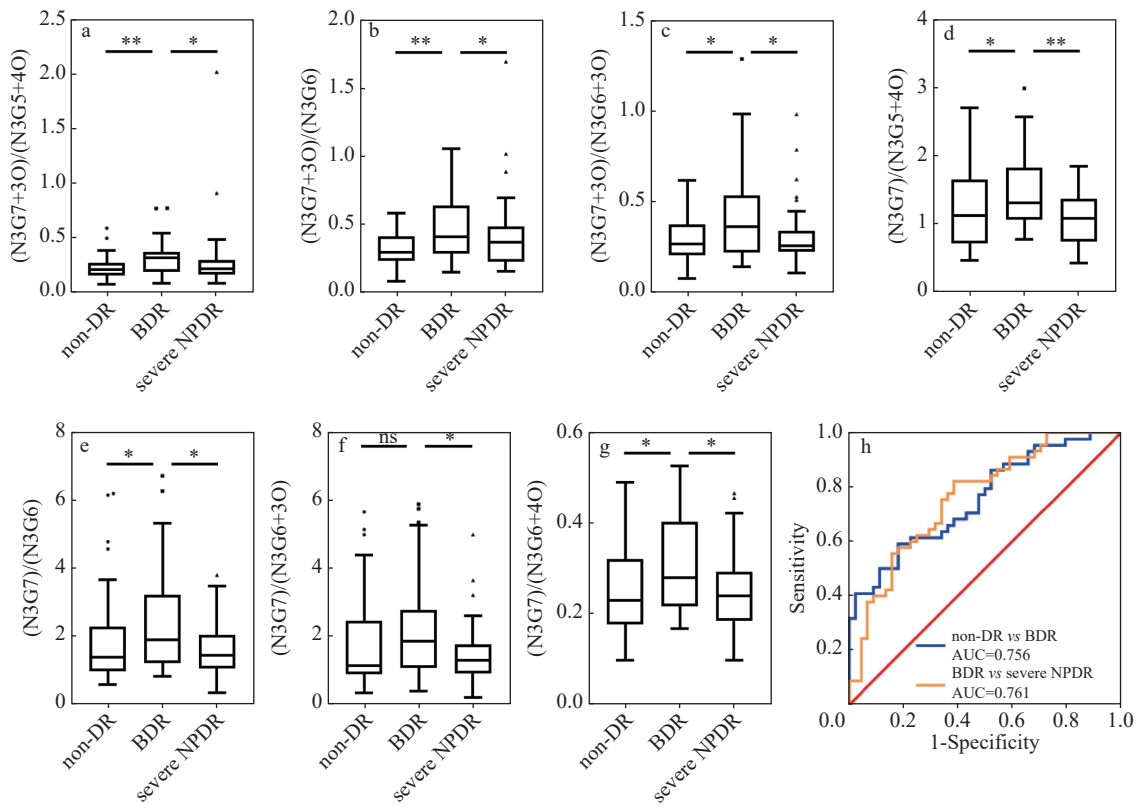
进行二元逻辑回归分析, 由(N3G7+3O)/(N3G5+4O)、(N3G7+3O)/N3G6、(N3G7+3O)/(N3G6+3O)、N3G7/(N3G5+4O)和 N3G7/(N3G6+4O)组合进行 ROC 分析, 可以有效区分非糖网患者与 BDR 患

表 2 补体 C3 糖肽结构

Table 2 Detected glycopeptides of complement C3

糖链异质体 Glycoform	潜在聚糖结构 Potential glycan structure	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Experimental value (m/z)	$\Delta m/m/u$
N3G5		3423.4303	3423.4837	53.4
N3G5+3O		3471.4300	3471.4685	38.5
N3G5+4O		3487.4240	3487.4634	39.4
N3G6		3585.4593	3585.5365	77.3
N3G6+3O		3633.4557	3633.5213	65.5
N3G6+4O		3649.4537	3649.5162	62.5
N3G7		3747.5043	3747.5894	85.1
N3G7+3O		3795.5061	3795.5741	68.1
N3G7+4O		3811.5052	3811.5690	63.9

注：蓝色正方形代表N-乙酰葡萄糖胺(N)残基；黄色圆圈代表半乳糖(G)残基；O表示氧原子



注：a. $(N3G7+3O)/(N3G5+4O)$; b. $(N3G7+3O)/N3G6$; c. $(N3G7+3O)/(N3G6+3O)$; d. $N3G7/(N3G5+4O)$;
e. $N3G7/N3G6$; f. $N3G7/(N3G6+3O)$; g. $N3G7/(N3G6+4O)$; h. 糖肽比值组合的 ROC 分析

图 2 补体 C3 O-糖肽比值的 DR 诊断潜力

Fig. 2 Diagnostic potential of complement C3 O-glycopeptide ratios for DR

者, AUC 值为 0.756(95%CI, 0.657~0.855), 灵敏度为 59.1%, 特异度为 81.8%, 具有对糖尿病患者较好的 DR 早期诊断潜力, 示于图 2h。目前, 在临床实践中, 对于早期 DR 患者通常不需要采取手术等干预方式, 患者只需控制血糖, 定期眼科检查, 即可避免 DR 的恶化, 防止视力损伤。一般的手术干预节点通常在晚期 NPDR, 此阶段会对患者产生较大影响, 需要尽快进行手术以及药物治疗, 防止疾病进一步恶化。因此, 晚期 NPDR 的诊断对于确定患者是否需要手术治疗意义重大^[17]。(N3G7+3O)/(N3G6+3O)、N3G7/(N3G5+4O)、N3G7/N3G6、N3G7/(N3G6+3O)以及 N3G7/(N3G6+4O)组合后, 可较好地地区分 BDR 患者与晚期 NPDR 患者, 其诊断能力(AUC)为 0.761(95%CI, 0.662~0.859, 灵敏度为 82.2%, 特异度为 61.4%), 示于图 2h。

2.4 讨论

目前, DR 的致病机理尚未完全明确, 前期研究表明^[18], 长期高血糖可导致体内活性氧水平升高, 引起视网膜损伤。体内过量的活性氧不仅会引起器官损伤, 还会与蛋白质、核酸等生物大分子反应, 引起氧化应激^[19]。肝脏是体内糖代谢与蛋白质合成的中心器官, 补体 C3 的合成以及活性氧的产生均发生在肝细胞。因此, DR 患者体内可能会有大量氧化的补体 C3, 这可能是补体 C3 糖肽中含有多个氧原子的原因。糖肽二级质谱数据表明^[16], 氧原子连接在聚糖链上, 说明补体 C3 的聚糖链可能被氧化, 导致多个糖肽质谱峰相差 16 u 的倍数。

补体 C3 是人体重要的免疫蛋白, 主要参与先天免疫过程。大样本人群($n=95\ 202$)研究发现^[20], 补体 C3 是糖尿病微血管并发症的潜在风险因素, 其中在 DR 患病人群中的风险因素最高(比值比=1.87)。此外, 在增殖性糖尿病视网膜病变患者体内, 补体系统活性明显提高, 补体 C3 及其激活状态 C3 β '活性显著升高^[21]。在糖尿病肾病大鼠模型中, 补体 C3a 及其受体、IL-6 以及 TGF- β 信号通路相关蛋白的含量出现明显升高, 且在阻断补体 C3a 受体后, 糖尿病肾病大鼠模型的肾脏状态和视网膜病变程度出现了明显改善, 表明补体系统, 尤其是补体 C3 在糖尿病并发症发生过程起到了关键作用, 并且可以作为糖尿病并发症的治疗靶点^[22]。综上所述, 补体 C3 与糖尿病及

其并发症的发生发展密切相关, 可以作为糖尿病并发症的治疗靶点, 具有很高的 DR 诊断潜力和治疗价值。

3 结论

作为 DR 常见的风险因素, FPG 指标在不同 DR 阶段患者中未表现出统计学差异, 表明 FPG 指标不能精确快速地反映 DR 的发生发展, 需要开发更加高效且精准的指标。本研究通过比较早期 DR 患者与未患 DR 志愿者血清补体 C3 糖基化修饰的不同, 发现了可用于 DR 早期筛查的标志物, 具有较好的 DR 早期诊断能力(AUC=0.756)。通过对比早期 DR 与晚期 DR 患者血清补体 C3 糖基化修饰的不同, 可以有效诊断晚期 DR 患者(AUC=0.761), 以确定 DR 患者是否需要临床干预。

参考文献:

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, PINKEPANK M, OGURTSOVA K, DUNCAN B B, STEIN C, BASIT A, CHAN J C N, MBANYA J C, PAVKOV M E, RAMACHANDARAN A, WILD S H, JAMES S, HERMAN W H, ZHANG P, BOMMER C, KUO S, BOYKO E J, MAGLIANO D J. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109-119.
- [2] MA R C W. Epidemiology of diabetes and diabetic complications in China[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(6): 1 249-1 260.
- [3] SAADDINE J B, HONEYCUTT A A, VENKAT NARAYAN K M, ZHANG X, KLEIN R, BOYLE J P. Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus: United States, 2005-2050[J]. *Archives of Ophthalmology*, 2008, 126(12): 1 740-1 747.
- [4] CONGDON N G, FRIEDMAN D S, LIETMAN T. Important causes of visual impairment in the world today[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2003, 290(15): 2 057-2 060.
- [5] FONG D S, AIELLO L, GARDNER T W, KING G L, BLANKENSHIP G, CAVALLERANO J D, FERRIS F L, KLEIN R. Diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(Suppl 1): S99-S102.
- [6] WILKINSON C P, FERRIS F L, KLEIN R E, LEE P P,

- AGARDH C D, DAVIS M, DILLS D, KAMPIK A, PARARAJASEGARAM R, VERDAGUER J T. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales[J]. *Ophthalmology*, 2003, 110(9): 1 677-1 682.
- [7] CHEUNG N, MITCHELL P, WONG T Y. Diabetic retinopathy[J]. *Lancet*, 2010, 376(9 735): 124-136.
- [8] 杨金奎, 鹿斌. 糖尿病视网膜病变防治专家共识[J]. *中华糖尿病杂志*, 2018(4): 241-247.
- YANG Jinkui, LU Bin. Expert consensus on prevention and treatment of diabetic retinopathy[J]. *Chin J Diabetes Mellitus*, 2018(4): 241-247(in Chinese).
- [9] WONG T Y, KLEIN R, AMIRUL ISLAM F M, COTCH M F, FOLSOM A R, KLEIN B E K, SHARRETT A R, SHEA S. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States[J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2006, 141(3): 446-455.
- [10] RAYMOND N T, VARADHAN L, REYNOLD D R, BUSH K, SANKARANARAYANAN S, BELLARY S, BARNETT A H, KUMAR S, O'HARE J P. Higher prevalence of retinopathy in diabetic patients of South Asian ethnicity compared with white Europeans in the community: a cross-sectional study[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(3): 410-415.
- [11] ZARANTONELLO A, REVEL M, GRUNENWALD A, ROUMENINA L T. C3-dependent effector functions of complement[J]. *Immunological Reviews*, 2023, 313(1): 120-138.
- [12] MANDAVA N, TIRADO-GONZALEZ V, GEIGER M D, PATNAIK J L, FRAZER-ABEL A, LYNCH A M, MANDAVA N, PALESTINE A G, HOLERS V M, WAGNER B D, SANCHEZ-SANTOS I, MEIZNER D, QUIROZ-MERCADO H, SMITH J M. Complement activation in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, 61(11): 39.
- [13] ŠOIĆ D, KESER T, ŠTAMBUK J, KIFER D, POCIOT F, LAUC G, MORAHAN G, NOVOKMET M, GORNIK O. High-throughput human complement C3 N-glycoproteomics identifies markers of early onset type 1 diabetes mellitus in children[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2022, 21(10): 100 407.
- [14] American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(Suppl 1): S13-S27.
- [15] WONG T Y, CHEUNG C M, LARSEN M, SHARMA S, SIMÓ R. Diabetic retinopathy[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16 012.
- [16] 刘育杰. 血清中疾病相关蛋白质复合物及唾液酸化糖肽富集方法研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [17] ANTONETTI D A, SILVA P S, STITT A W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2021, 17(4): 195-206.
- [18] DURAISAMY A J, MISHRA M, KOWLURU A, KOWLURU R A. Epigenetics and regulation of oxidative stress in diabetic retinopathy[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018, 59(12): 4 831-4 840.
- [19] ELIAS-MIRÓ M, JIMÉNEZ-CASTRO M B, RODÉS J, PERALTA C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion[J]. *Free Radical Research*, 2013, 47(8): 555-568.
- [20] RASMUSSEN K L, NORDESTGAARD B G, NIELSEN S F. Complement C3 and risk of diabetic microvascular disease: a cohort study of 95202 individuals from the general population[J]. *Clinical Chemistry*, 2018, 64(7): 1 113-1 124.
- [21] SHAHULHAMEED S, VISHWAKARMA S, CHH-ABLANI J, TYAGI M, PAPPURU R R, JAKATI S, CHAKRABARTI S, KAUR I. A systematic investigation on complement pathway activation in diabetic retinopathy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 154.
- [22] LI L, YIN Q, TANG X, BAI L, ZHANG J, GOU S, ZHU H, CHENG J, FU P, LIU F. C3a receptor antagonist ameliorates inflammatory and fibrotic signals in type 2 diabetic nephropathy by suppressing the activation of TGF- β /smad3 and IKB α pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113639.

(收稿日期: 2024-05-27; 修回日期: 2024-08-04)