

ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中的表达及相互作用

华 耘^{1,2}, 韩欢欢², 陈冬梅², 刘佳琳², 赵新荣¹(¹石河子大学第一附属医院眼科, 石河子 832003; ²石河子大学医学院, 石河子 832003)

摘要 目的 初步探究转录激活因子 3(ATF3)与 Smad 家族成员 4(Smad4)在翼状胬肉中的表达及其相互作用。方法 通过生物信息学方法来分析 NCBI 数据库中的两套数据集 GSE51995 和 GSE2513, 筛选出以正常结膜作为对照时, 翼状胬肉的关键差异表达基因 ATF3。并通过实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)进一步检测生物信息学分析找出的差异基因。最后结合文献查找并通过基因转录调控数据库(GTRD)预测是否存在可能与目标基因结合的靶基因 Smad4, RT-qPCR 验证 Smad4 在正常结膜与翼状胬肉组织中的表达情况, 并通过免疫共沉淀(Co-IP)探究 ATF3 与 Smad4 蛋白在翼状胬肉中是否存在相互作用。结果 生物信息学分析结果显示, 以正常结膜组织为对照, 翼状胬肉组织中存在有显著性差异的低表达基因 ATF3($P < 0.05$)。RT-qPCR 实验显示, 与正常结膜组织相比, ATF3 在翼状胬肉组织中低表达($P < 0.001$)。数据库(GTRD)中检索出 Smad4 基因与 ATF3 有两个结合位点, 提示可能与 ATF3 存在相互作用。与正常结膜相比, RT-qPCR 显示翼状胬肉组织中 Smad4 表达下调($P < 0.01$), Co-IP 结果显示, 在使用 ATF3 抗体进行免疫沉淀时, 翼状胬肉组织中 Smad4 结合量增加($P < 0.05$)。结论 ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中存在相互作用, 二者在翼状胬肉组织中的低表达及其相互作用可能与翼状胬肉的发病相关。

关键词 翼状胬肉; ATF3; Smad4; 相互作用; 初步探究

中图分类号 R 77

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1068-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.013

2025-04-26 接收

项目基金:国家自然科学基金(编号:82060171)

作者简介:华 耘,女,硕士研究生;

赵新荣,女,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: zxr_yk@163.com

翼状胬肉是一种主要侵犯角膜,以结膜纤维血管增生为特征性疾病。该病的主要临床表现是眼睛疲劳、刺激、干燥、流泪、异物感、视觉不适和视力下降,其发病机制与转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)/Smad 信号通路异常活化

and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly decreased, and the expression of miR-149-5p increased in the osteogenesis + si-H19 group ($P < 0.05$). Compared with the osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group, the ALP activity, the degree of cell mineralization and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN increased in the osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor group. The expression of miR-149-5p significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the osteogenic + si-H19 + pcDNA-NC group, the alkaline phosphatase activity, the degree of cell mineralization and the expression of BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly increased in the osteogenic + si-H19 + pcDNA-BMP2 group ($P < 0.05$). Compared with the sham-operation group and the model group, the alkaline phosphatase activity and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN decreased, and the expression of miR-149-5p increased ($P < 0.05$). Compared with the model + pcD-null group, the alkaline phosphatase activity and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly increased, and the expression of miR-149-5p decreased in the model + pcD-H19 group ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA H19 promotes osteogenic differentiation of BMSCs and bone regeneration in mice with foot fracture through miR-149-5p/BMP2 axis.

Key words lncRNA H19; osteogenic differentiation; foot fracture; mice; bone morphogenetic protein 2; alkaline phosphatase

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2023D01C318)

Corresponding author Zhang Huaigui, E-mail: pan096@sina.com

密切相关^[1-2]。Smad 家族成员 4 (Smad family member 4, *Smad4*) 作为 TGF- β 信号通路的中心介质,直接调控下游靶基因转录^[3]。而转录激活因子 3 (activating transcription factor 3, *ATF3*) 被发现可通过调控上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 参与纤维化进程^[4-5]。研究^[3] 表明, TGF- β 1 抗体可上调 *Smad4* 表达并抑制翼状胬肉成纤维细胞 (human pterygium fibroblasts, HPFs) 增殖。但在 TGF- β /Smad 通路之外是否存在协同调控因子仍不明确。

近年来,有研究表明,在许多纤维化疾病中,对 *ATF3* 的调控会影响 TGF- β /Smad 信号通路的表达^[6-7],而 *ATF3* 的表达可能也依赖于 TGF- β 信号通路^[8]。提示 *ATF3* 可能通过 Smad 信号网络影响纤维化进程。*ATF3* 在翼状胬肉中的表达特征及其与 Smad 信号通路的关联机制少有报道。该研究首次采用生物信息学预测与分子互作研究,系统分析 *ATF3* 与 *Smad4* 基因在翼状胬肉中的生物学作用,旨在揭示新的纤维化调控机制,为翼状胬肉靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 TRIzol、反转录试剂盒、DNase/RNase-Free water、Pierce™ IP 裂解缓冲液购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;SYBR GREEN 聚合酶链式反应试剂盒购自北京天根生物化学公司;三氯化铁替代物购于赛维尔武汉生化技术有限公司;无水乙醇、异丙醇购于东营市富宇化工公司;实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 引物购于上海生工生物工程有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、脱脂奶粉、ECL 显影液购于上海碧云天公司;山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 抗体购于北京中衫金桥有限公司;PBS 溶液购于美国 Gibco 公司;*ATF3* 抗体、*Smad4* 抗体购于美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 本研究拟在 NCBI 数据库中采集 GSE51995、GSE2513 两套数据信息,通过生物信息学方法,筛选出与翼状胬肉相关的差异基因。将两个数据库中的上调基因和下调基因分别各自取交集找到共同靶点,共同的上调靶点与下调靶点分别做蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络的构建,使用 STRING

数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 识别蛋白之间可能的连接,使用 Cytoscape 3.9.1 对 STRING 数据库导出的数据进行可视化处理。

1.2.2 实验取材 收集 2023 年 5—12 月在石河子大学第一附属医院行原发性翼状胬肉切除术 + 自体结膜移植术的手术标本 21 例,年龄 49 ~ 76 (58.95 $\pm$ 8.00) 岁,男性 8 例,女性 13 例。作为对照的正常结膜样本采集自 10 例行原发性翼状胬肉切除术 + 自体结膜移植术患者的远端正常结膜组织,年龄 43 ~ 66 (56.70 $\pm$ 5.83) 岁,男性 7 例,女性 3 例。本实验符合《赫尔辛基宣言》,经石河子大学第一附属医院伦理委员会批准 (No. KJ2023-354-01)。所有患者均知情并签署知情同意书。

1.2.3 RT-qPCR 将收集的正常结膜组织与翼状胬肉组织用组织研磨仪研磨成浆液状,采用 TRIzol 试剂从正常结膜组织和翼状胬肉组织中提取总 RNA,使用 NanoDrop 1000 UV 分光光度计测定 RNA 浓度和 260 nm 与 280 nm 吸光度 (Absorbance, A) 比率 (A_{260}/A_{280}),每个反转录反应约使用 1 μ g RNA,根据反转录试剂盒的说明,将 RNA 反转录成 cDNA,后续根据 SYBRGREEN PCR master mix 试剂盒的说明进行实时荧光定量 PCR。使用 SYBR Green 法进行扩增,以 β -actin 为内参。以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 *ATF3* 与 *Smad4* 在正常结膜组织和翼状胬肉组织中的相对水平。RT-qPCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
Homo- <i>ATF3</i>	F: CCTCTGCGCTGGAATCACTC R: TTCTTTCTCGCTCGCTCTTTT
Homo- <i>Smad4</i>	F: CCACCAAGTAATCGTGCATCG R: TGGTAGCATTAGACTCAGATGGG
Homo- β actin	F: AACCGCGAGAAGATGACCCA R: GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA

1.2.4 基因转录调控数据库 (The Gene Transcription Regulation Database, GTRD) 中 *ATF3* 基因转录调控网络的构建 通过 GTRD (<http://gtrd.biouml.org>) 网站,将 TF binding site location 设置成 [-1 000, +100], Organism 设置成 Human (Homo sapiens), Transcription factor 选择 *ATF3* P18847,得到转录因子 *ATF3* 的可能结合因子。并结合阅读相关文献,筛选出 *ATF3* 可能结合的靶基因 *Smad4*。

1.2.5 Western blot 将新鲜正常结膜及翼状胬肉组织在冰上剪碎并使用组织研磨仪研磨,利用 RIPA

溶解液进行蛋白质的提取,在 12 000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min,取上清液,用 BCA 试剂盒测定蛋白质的浓度,并以定量结果为依据,添加上样缓冲液。95 ℃ 加热 8 min,通过电泳将不同分子量的蛋白质转移到醋酸纤维素膜上,用 5 % 脱脂奶粉封闭后孵育 ATF3、Smad4 抗体(1 : 500),4 ℃ 孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 3 次,使用对应种属二抗抗体进行孵育,在室温下摇床孵育 2 h,TBST 冲洗 3 次,显影曝光。

1.2.6 免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 本实验依据 Pierce® Co-IP 试剂盒说明书操作。收取正常结膜以及翼状胬肉组织,PBS 洗 3 遍,使用组织研磨仪将组织研磨成微小颗粒,加预冷裂解液,冰上裂解 5 min,期间混匀几次。调整离心机为 13 000 r/min,4 ℃ 下离心 10 min。加入特定抗体(ATF3、Smad4)及同源的对照抗体,置入旋转仪,慢速,4 ℃ 过夜,然后向其中加入 25 μL Pierce 蛋白 A/G 的磁珠,混匀后置于室温下 1 h,采集磁珠,去除游离的样品,保存样本以备后续分析。将 500 μL 的免疫沉淀裂解/漂洗缓冲液加到离心管中,轻轻混合均匀。收集磁珠,丢弃上清液。再次清洗 2 遍,加 500 μL 的超纯水到管中,轻轻混合均匀。使用磁力架将磁珠收集起来,丢弃上清液;然后将 100 μL 的电泳上样缓冲液(5 倍稀释)加入到离心管中,在 96 ~ 100 ℃ 条件下加热 10 min,用磁力架将磁珠分离,留下目的抗原上清液;将上清液转到新的 EP 管内,按照 1.2.5 项进行 Western blot 实验,检测总细胞蛋白液(input)样本(即翼状胬肉组织样本和正常结膜组织样本)和免疫沉淀(IP)处理后(即使用 ATF3 抗体捕获靶蛋白)洗脱液中 Smad4 蛋白的表达量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 10 软件进行统计学处理并作图。数据采用均数 ± 标准差表示。在正态分布及方差齐的条件下,采用 *t* 检验进行两组独立样本均数之间的比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利用生物信息学分析预测、筛选得到差异基因 ATF3 使用 limma 软件包,对各个样本进行了内部归一化处理,并从中提取出了 ATF3 基因的相关信息。在数据库 GSE2513 和 GSE51995 中经过筛选分别得到有意义的差异基因 420 个(上调基因 246 个,下调基因 174 个)和 1 395 个(上调基因 829 个,下调基因 566 个),采用 centered pearson correlation 分

析方法,对两个数据库中的差异基因进行双向层次聚类分析,由热图与火山图可知,样本在两个方向上均有较强的聚集(图 1A ~ D)。选取两个数据库中的下调基因,取其交集基因,得到较为显著的差异基因 ATF3(图 1E ~ G)。因此,从基因水平上看,正常结膜组织与翼状胬肉组织中 ATF3 的表达存在差异(*P* < 0.05)。

2.2 翼状胬肉组织中 ATF3 表达水平 RT-qPCR 结果分析提示,ATF3 在翼状胬肉组织中的表达低于正常结膜组织,差异有统计学意义(*t* = 13.39, *P* < 0.001)。见图 2A。

2.3 利用 GTRD 数据库筛选 ATF3 的可能转录结合位点 Smad4,并验证其在翼状胬肉组织中的表达 通过 GTRD,找到 ATF3 与 Smad4 存在两个潜在结合位点(表 2)。RT-qPCR 结果显示,与正常结膜组织相比,Smad4 在翼状胬肉组织中呈低表达趋势,差异有统计学意义(*t* = 4.93, *P* < 0.01)。见图 2B。

表 2 ATF3 与 Smad4 结合位点信息
Tab.2 ATF3 and Smad4 Binding site information

Site number	Chromosome location	Binding region
BS1	Chr18:48,567,232	Smad4 promoter region(-352)
BS2	Chr18:48,567,589	Smad4 promoter region(+89)

2.4 ATF3 与 Smad4 蛋白在翼状胬肉中相互作用情况 Co-IP 结果表明(图 3),在 input 组:与正常结膜组相对比,翼状胬肉中总 Smad4 蛋白与总 ATF3 蛋白表达降低。IP 组结果显示:在翼状胬肉组,使用 ATF3 抗体作用作为捕获抗体时,可成功免疫沉淀结合 Smad4 蛋白;而在正常结膜组,使用 ATF3 抗体作用作为捕获抗体时,未见明显的 Smad4 蛋白结合。以上结果表明在翼状胬肉组织中 ATF3 与 Smad4 存在明显的相互作用(*P* < 0.05)。

3 讨论

翼状胬肉的发生被认为与角膜缘干细胞异常增殖及纤维化进程密切相关^[9]。尽管手术仍是当前临床治疗的主要手段,但由于术后复发风险较高^[10],其病理机制仍需深入解析。近年研究发现,TGF-β1 及其下游 TGF-β/Smad 信号通路在调控纤维化事件中发挥核心作用^[11-12]。研究表明,TGF-β1 处理可导致 HPFs 和原代结膜成纤维细胞纤维化表型增强,并显著提升细胞的增殖、迁移和侵袭活性^[13]。以上内容提示,要深入了解翼状胬肉发病的机制,需要系统解析其纤维化病理进程中的动态调

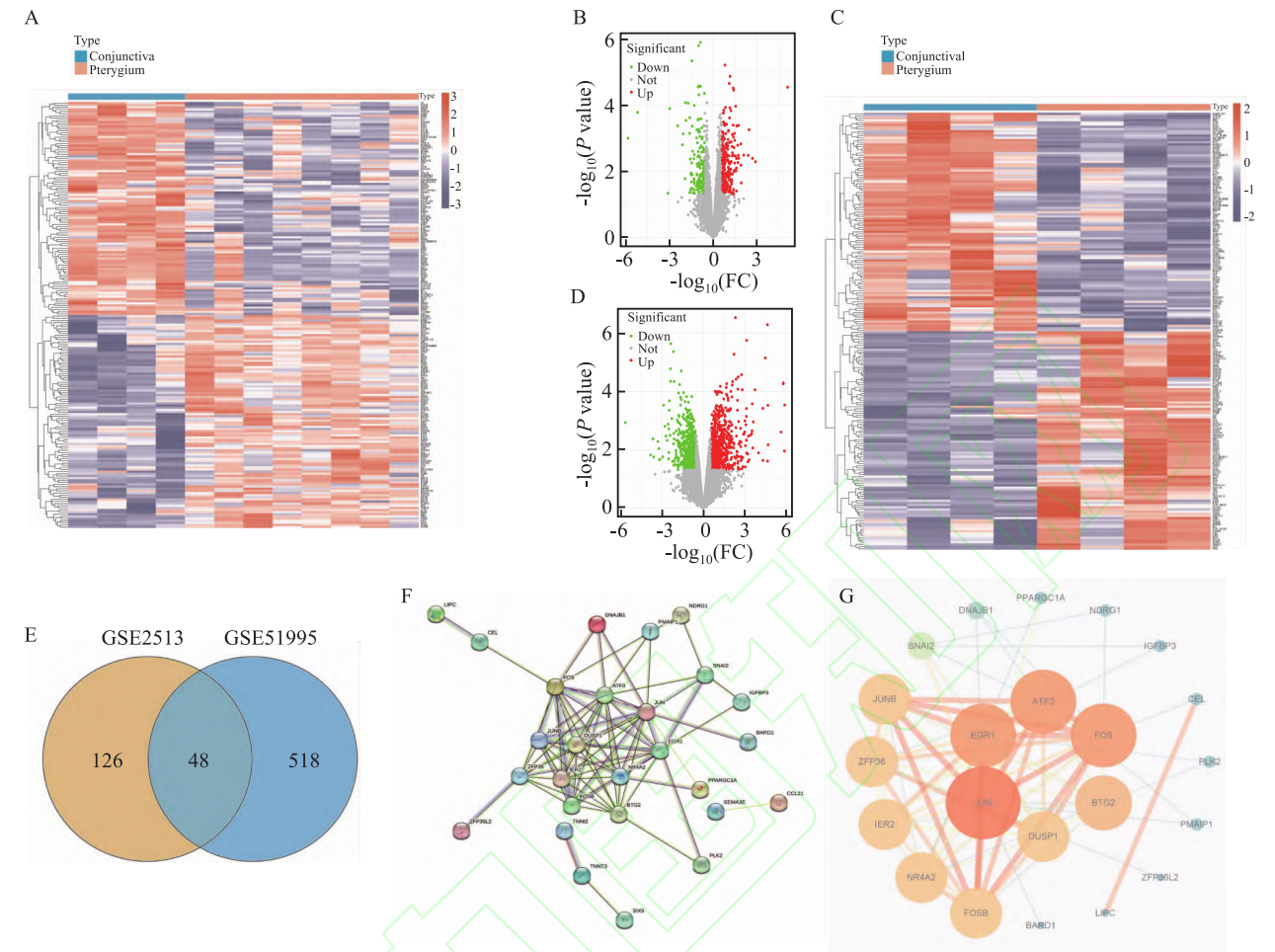


图 1 ATF3 的生物信息学分析
Fig.1 Bioinformatics analysis of ATF3

A: Heat maps of significant differential genes in the database GSE2513; B: Volcano map of significant differentially identified genes in database GSE2513; C: Heat maps of significant differential genes in the database GSE51995; D: Volcano map of significant differential genes in database GSE51995; E: The down-regulated genes in the two databases were found to have 48 common intersection genes through the venn diagram; F: PPI protein interaction network of co-down-regulated gene in two databases; G: After visual analysis of the common intersection genes in the two databases through cytoscape, hub genes were screened out according to the degree value.

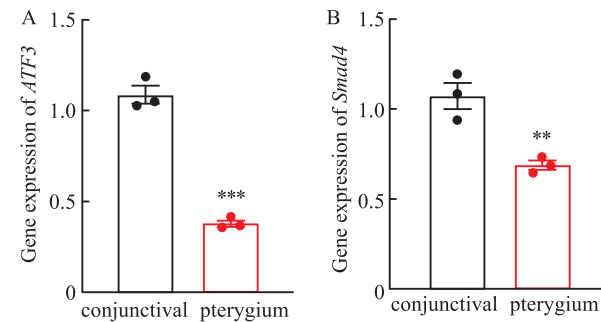


图 2 翼状胬肉与正常结膜组织中 ATF3 及 Smad4 的表达
Fig.2 The expression of ATF3 and Smad4 in pterygium and normal conjunctival tissue

A: Comparative analysis of ATF3 expression levels between pterygium and normal conjunctival tissues by RT-qPCR; B: Comparative analysis of Smad4 expression levels between pterygium and normal conjunctival tissues by RT-qPCR; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs conjunctival tissue.

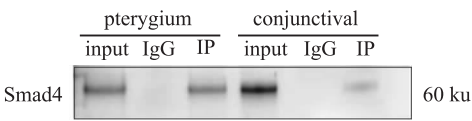


图 3 Co-IP 检测正常结膜组织与翼状胬肉组织中 ATF3 与 Smad4 蛋白的相互作用
Fig.3 The interaction between ATF3 and Smad4 protein in normal conjunctival tissue and pterygium tissue detected by Co-IP
input: The antibody used in Western blot was Smad4; IgG: Negative control; IP: The antibody attached to the magnetic bead was ATF3 antibody.

控模块。

ATF3 在不同疾病的纤维化中的功能差异可能与不同的细胞类型和纤维化机制有关^[14-16],适当的 ATF3 表达对正常的细胞生理功能也是至关重要

的^[17]。鉴于翼状胬肉具有与其他纤维化疾病类似的增殖和侵袭能力,故本文提出假设:ATF3 是翼状胬肉发生发展中的关键调控因子。Smad 是 TGF- β 家族的主要信号转导因子,TGF- β /Smad 信号通路的失调是导致组织纤维化的重要致病机制^[18]。越来越多的研究表明 ATF3 与 Smad4 之间存在相互关联。Rohini et al^[19] 在乳腺癌细胞的研究中发现,Smad4 是通过 TGF- β 1 在人乳腺癌细胞中提供 ATF3 稳定性的先决条件,在 ATF3 和 Smad4 之间形成的稳定复合物可能负责参与激活 TGF- β 1 介导的乳腺癌进展的基因。Zuo et al^[20] 在神经肿瘤的研究中发现,Smad4 通过与 ATF3 结合,促进 ATF3 的核易位,激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路,诱导神经细胞凋亡,抑制肿瘤生长。故推测,在翼状胬肉中 ATF3 与 Smad4 之间可能存在相互作用,参与对 TGF- β /Smad 信号通路的调节。

该研究选取了正常结膜组织和翼状胬肉组织作为研究对象,观察 ATF3 与 Smad4 在两种组织中的表达情况。RT-qPCR 结果显示,ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉组织中的表达量均低于正常结膜组织。提示 ATF3 与 Smad4 的低表达可能与翼状胬肉的发病过程相关。Co-IP 实验结果显示,当 ATF3 作为捕获抗体时,与正常结膜组相比,翼状胬肉组免疫沉淀结合的 Smad4 蛋白明显增多,以上结果说明,ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中存在相互作用,而在正常结膜中不存在这种相互作用。综上,ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中的低表达与相互作用,可能与该疾病的发生发展密切相关,然而,其具体的作用机制还需要进一步更深入研究。

参考文献

- [1] Ding P, Wang R, He Y. Risk factors for pterygium: latest research progress on major pathogenesis[J]. Exp Eye Res, 2024, 243: 109900. doi: 10.1016/j.exer.2024.109900.
- [2] 王宇珊,郑晓汾.原发性翼状胬肉发病机制的研究进展[J]. 眼科学报, 2024, 39(1): 53-62. doi: 10.12419/24010302.
- Wnag Y S, Zheng X F. Research progress on the pathogenesis of primary pterygium[J]. Eye Science, 2024, 39(1): 53-62. doi: 10.12419/24010302.
- [3] 石蕊,杨乐,薛雨顺,等.转化生长因子- β 1 抗体对人翼状胬肉成纤维细胞增殖及 TGF- β 1-Smad4 信号转导通路的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(1): 98-101. doi: 10.7652/jdyxb201501018.
- Shi R, Yang L, Xue Y S, et al. Effects of TGF- β 1 antibody on human pterygium fibroblasts proliferation and TGF- β 1-Smad4 signaling pathway[J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2015, 36(1): 98-101. doi: 10.7652/jdyxb201501018.
- [4] Liu S, Li Z, Lan S, et al. The dual roles of activating transcription factor 3 (ATF3) in inflammation, apoptosis, ferroptosis, and pathogen infection responses[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(2): 824. doi: 10.3390/ijms25020824.
- [5] Zheng W, Xiang D, Wen D, et al. Identification of key modules and candidate genes associated with endometriosis based on transcriptome data via bioinformatics analysis[J]. Pathol Res Pract, 2023, 244: 154404. doi: 10.1016/j.prp.2023.154404.
- [6] Wang B, Tan Y, Zhang Y, et al. Loss of KDM5B ameliorates pathological cardiac fibrosis and dysfunction by epigenetically enhancing ATF3 expression[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(12): 2175-87. doi: 10.1038/s12276-022-00904-y.
- [7] Hwang S, Park S, Yaseen U, et al. KLF10 inhibits TGF- β -mediated activation of hepatic stellate cells via suppression of ATF3 expression[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16): 12602. doi: 10.3390/ijms241612602.
- [8] Shi Z, Zhang K, Chen T, et al. Transcriptional factor ATF3 promotes liver fibrosis via activating hepatic stellate cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12): 1066. doi: 10.1038/s41419-020-03271-6.
- [9] Domdey M, Kluth M A, MaBlo C, et al. Consecutive dosing of UVB irradiation induces loss of ABCB5 expression and activation of EMT and fibrosis proteins in limbal epithelial cells similar to pterygium epithelium[J]. Stem Cell Res, 2022, 64: 102936. doi: 10.1016/j.scr.2022.102936.
- [10] He S, Wu Z. Biomarkers in the occurrence and development of pterygium[J]. Ophthalmic Res, 2022, 65(5): 481-92. doi: 10.1159/000523878.
- [11] Zhang C, Wang H, Chen D Y, et al. Differential expression of TGF- β 1 receptors ALK1/ALK5 in pterygium and normal conjunctiva tissues[J]. Int Eye Sci, 2021, 21(11): 1962-7. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.26.
- [12] 陈茹茹,韩璐,何海兰,等. BRD4 通过 HMGB1/TGF- β 1/Smad 通路参与调控肺泡上皮细胞间质转化[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(2): 247-54. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.009.
- Chen R R, Han L, He H L, et al. BRD4 regulates alveolar epithelial-mesenchymal transition through HMGB1/TGF- β 1/Smad pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2025, 60(2): 247-54. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.009.
- [13] He Q, Cai Y, Huang J, et al. Impairment of autophagy promotes human conjunctival fibrosis and pterygium occurrence via enhancing the SQSTM1-NF- κ B signaling pathway[J]. J Mol Cell Biol, 2023, 15(1): mjad009. doi: 10.1093/jmcb/mjad009.
- [14] Zhang J, Wang H, Chen H, et al. ATF3-activated accelerating effect of LINC00941/lncIAPF on fibroblast-to-myofibroblast differentiation by blocking autophagy depending on ELAVL1/HuR in pulmonary fibrosis[J]. Autophagy, 2022, 18(11): 2636-55. doi: 10.1080/15548627.2022.2046448.
- [15] Zhang Y, Wu H, Luo H, et al. Activating transcription factor 3 inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte viability and fibrosis

- by activating the transcription of cysteine-rich angiogenic protein 61[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(5): 336. doi: 10.3892/mmr.2022.12852.
- [16] He X, Deng L, Zou K, et al. ATF3 modulates the proliferation, migration, and apoptosis of synovial fibroblasts after arthroscopy by promoting RGS1 transcription[J]. *Curr Mol Med*, 2023, 23(9): 981–90. doi: 10.2174/1566524023666230417084150.
- [17] Wang B, Yang X, Sun X, et al. ATF3 in atherosclerosis: a controversial transcription factor[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2022, 100(11): 1557–68. doi: 10.1007/s00109–022–02263–7.
- [18] Ghafouri-Fard S, Askari A, Shoorei H, et al. Antioxidant therapy against TGF- β /SMAD pathway involved in organ fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(2): e18052. doi: 10.1111/jcmm.18052.
- [19] Rohini M, Arumugam B, Vairamani M, et al. Stimulation of ATF3 interaction with Smad4 via TGF- β 1 for matrix metalloproteinase 13 gene activation in human breast cancer cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 134: 954–61. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.062.
- [20] Zuo Y, Bai J, Bai H, et al. Transmembrane serine protease 6, a novel target for inhibition of neuronal tumor growth[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(1): 49. doi: 10.1038/s41419–024–06442–x.

The expression and interaction of *ATF3* and *Smad4* in pterygium

Hua Yun^{1,2}, Han Huanhuan², Chen Dongmei², Liu Jialin², Zhao Xinrong¹

(¹*Dept of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832003;*

²*Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832003)*

Abstract Objective To investigate the expression and interaction of activating transcription factor 3 (*ATF3*) and smad family member 4 (*Smad4*) in pterygium. **Methods** In this study, two sets of data GSE51995 and GSE2513 in NCBI database were analyzed by bioinformatics methods to screen out the key difference-expressed gene *ATF3* in pterygium when normal conjunctiva was used as the control. The differential genes identified by bioinformatics analysis were further detected by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Finally, the literatures were searched and The Gene Transcription Regulation Database (GTRD) was used to predict whether there was a target gene *Smad4* that might bind to the target gene. The expression of *Smad4* in normal conjunctival and pterygium tissues was verified by RT-qPCR, and the interaction between the target protein ATF3 and Smad4 in the pterygium was investigated through Co-Immunoprecipitation (Co-IP). **Results** The results of bioinformatics analysis showed that compared with normal conjunctival tissue, there was significantly different expression of *ATF3* gene in pterygium tissue ($P < 0.05$). RT-qPCR confirmed that *ATF3* was less expressed in pterygium tissue than normal conjunctival tissue ($P < 0.001$). Genomic data from the GTRD database revealed that *Smad4* contains two *ATF3* binding motifs, suggesting functional interaction potential. Compared with normal conjunctiva, RT-qPCR revealed *Smad4* downregulation in pterygium tissues ($P < 0.01$); Co-IP demonstrated enhanced interaction between *Smad4* and *ATF3* in pterygium tissues following immunoprecipitation with anti-ATF3 antibodies ($P < 0.05$). **Conclusion** *ATF3* interacts with *Smad4* in pterygium, and the low expression of both in pterygium tissues and their interaction may be associated with the pathogenesis of pterygium.

Key words pterygium; *ATF3*; *Smad4*; interaction; preliminary investigation

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82060171)

Corresponding author Zhao Xinrong, E-mail: zxr_yk@163.com