

### 【实验研究】

## 姜双 陈晓隆

**1.1.1 实验动物和分组** Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只, 体质量为 180 ~ 220 g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。适应性喂养 1 周后, 随机分为 4 组: 正常对照组、糖尿病 4 周组、糖尿病 8 周组和糖尿病 12 周组。糖尿病各组造模前禁食 12 h, 采用  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 配制成  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的链脲佐菌素溶液, 大鼠一次性腹腔注射  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量, 注药后 4 h 恢复进食。72 h 后

鼠尾静脉测随机血糖,血糖高于  $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  者为造模成功。血糖未达到标准者重复注射链脲佐菌素溶液一次,有 2 只仍未达标准者弃去,另有 2 只鼠意外死亡,最终每组各 9 只大鼠。

**1.1.2 材料和试剂** 链脲佐菌素 (Sigma 公司), HMGB1 兔多克隆抗体和 TLR9 小鼠单克隆抗体均购于 Abcam 公司,免疫组织化学 SP 通用试剂盒 (迈新),DAB 显色 (中杉金桥)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HE 染色** 各组糖尿病大鼠于相应时间点麻醉取双眼眼球 (正常对照组于喂养 12 周时取眼球),  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛固定 24 h,梯度酒精脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,沿平行眼轴方向进行切片,厚  $5 \mu\text{m}$ ,脱蜡、HE 染色、脱水、透明并封片。

**1.2.2 免疫组织化学染色** 取出石蜡切片后,常规脱蜡至水,微波修复,用体积分数 3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶,室温下山羊血清封闭 20 min,分别加 HMGB1 抗体 (1 : 200)、TLR9 抗体 (1 : 100),

$4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。过夜后切片恢复至室温,加生物素标记的羊抗兔或兔抗小鼠二抗,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,滴加链霉亲和素-过氧化物酶 SP,室温孵育 10 min, DAB 显色,苏木素复染,盐酸酒精分化 10 s,返蓝,梯度酒精常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,倒置显微镜下观察。用 Image-pro plus 6.0 软件进行平均光密度值的分析。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 20.0 统计分析软件进行单因素方差分析检验,数据资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HE 染色结果** HE 染色结果显示,与糖尿病组相比,正常对照组大鼠视网膜各层细胞排列整齐规则,密度均匀;而糖尿病组大鼠从第 4 周开始出现视网膜各层细胞排列紊乱,细胞密度降低,可见微血管病变,血管扩张,12 周时视网膜神经纤维层水肿明显,并且出现视网膜神经节细胞的变少 (图 1)。

图 1 正常对照组和糖尿病组不同时间 HE 染色结果 ( $\times 400$ )。A:正常对照组;B:糖尿病 4 周组;C:糖尿病 8 周组;D:糖尿病 12 周组

## 2.2 免疫组织化学检测结果

### 2.2.1 免疫组织化学法检测 HMGB1 表达

HMGB1 在正常对照组大鼠视网膜中少量表达,主要表达在神经节细胞层和内核层,主要位于细胞核中;糖尿病大鼠视网膜中 HMGB1 表达明显增加,主要表

达在神经节细胞层、内核层、外核层,细胞核和细胞浆中均有表达。糖尿病各组视网膜中 HMGB1 的表达与正常对照组相比差异均具有显著统计学意义,且随着病程的延长 HMGB1 的表达呈逐渐增加趋势 (均为  $P < 0.01$ ;见图 2、表 1)。

图 2 正常对照组和糖尿病不同时间组 HMGB1 免疫组织化学染色结果 ( $\times 400$ )。A:正常对照组;B:糖尿病 4 周组;C:糖尿病 8 周组;D:糖尿病 12 周组

**2.2.2 免疫组织化学法检测 TLR9 表达** TLR9 在正常对照组大鼠视网膜中表达很少,主要表达在神经节细胞层和内核层;在糖尿病大鼠视网膜中表达明显增加,主要表达在神经节细胞层、内核层、外核

层。糖尿病各组视网膜中 TLR9 的表达与正常对照组相比差异均具有显著统计学意义,且随着病程的延长呈逐渐增加趋势(均为  $P < 0.01$ ;见图 3、表 1)。

**图 3** 正常对照组和糖尿病组不同时间 TLR9 免疫组织化学染色结果(×400)。A:正常对照组;B:糖尿病 4 周组;C:糖尿病 8 周组;D:糖尿病 12 周组

**表 1 HMGB1 和 TLR9 在各组大鼠视网膜中光密度值的比较**

指标	正常对照组	糖尿病 4 周组	糖尿病 8 周组	糖尿病 12 周组
HMGB1	0.103 7±0.001 1	0.132 3±0.000 5 *	0.145 0±0.002 0 *	0.155 7±0.001 5 *
TLR9	0.084 3±0.004 7	0.116 4±0.009 4 *	0.132 1±0.000 1 *	0.139 0±0.004 2 *

注:与正常对照组相比,\* $P < 0.01$

3 讨论

HMGB1 是一种染色质结合蛋白,广泛分布于淋巴组织、脑、肝、肺、心、脾、肾、眼等组织中,其结构高度保守,在几乎所有类型的细胞中都有表达<sup>[6]</sup>。在细胞内,HMGB1 参与稳定核小体结构及 DNA 的复制、重组、转录和翻译<sup>[7-9]</sup>。HMGB1 可以由受损或坏死的细胞被动分泌,或由有免疫能力的细胞主动分泌<sup>[10-11]</sup>。

本研究结果表明,在糖尿病大鼠视网膜中,HMGB1 表达明显增多,且随病程的延长逐渐增加,表达部位也由细胞核逐渐过渡于细胞浆中。另有研究表明<sup>[12]</sup>,在高糖处理的视网膜色素上皮细胞中,HMGB1 的表达随高糖处理时间的延长呈逐渐增加的趋势,且由细胞核内逐渐向细胞浆中转移,这与本研究在实验动物中的结果相似。

除本研究外,尚有多项研究表明,HMGB1 在 DR 中发挥了重要作用,其研究多集中于 HMGB1 与其受体 RAGE、TLR2、TLR4 的结合。MUDALIAR 等<sup>[12]</sup>对在正常葡萄糖浓度、高糖浓度、中等升高葡萄糖浓度和葡萄糖波动不同组处理后的血管内皮细胞研究中发现,TLR2 和 TLR4 在高糖组和葡萄糖波动组均有升高,但 TLR4 的升高具有统计学意义,说明 TLR2 和 TLR4 作为 HMGB1 的受体,TLR4 可能在糖尿病微血管病变中发挥了更重要的作用。CHEN 等<sup>[13]</sup>研究发现,高糖处理的视网膜色素上皮细胞其 HMGB1、TLR2、TLR4 表达明显高于正常对照组,且呈时间依

赖性。另有研究表明,在 DR 中,视网膜周细胞和内皮细胞的损伤和死亡可能是由 HMGB1 诱导的神经胶质细胞的细胞毒性作用及 HMGB1 直接对内皮细胞的细胞毒性作用导致的;同时该项研究还认为 HMGB1 在视网膜和脉络膜新生血管生成中没有明显的促进作用<sup>[14]</sup>。

近期有学者研究发现,坏死或者组织损伤可以使细胞释放 HMGB1,它与含有 CpG-A 的 DNA 形成 HMGB1-CpG-A 复合物,之后通过 TLR9 和髓样分化蛋白(myeloid differentiation protein, MyD88)的相互作用引发一系列免疫反应<sup>[15]</sup>。HMGB1 在胞质内的部分可以作为核酸的传感器,在某些自身免疫性疾病中参与先天性免疫的活化<sup>[16]</sup>。大量的受体可以识别核酸,特别是 TLR9。

因此,本研究同时检测了 TLR9 的表达,TLR9 是 TLRs 家族的重要一员。TLRs 属于模式识别受体,能特异性地识别病原相关分子模式和损伤相关分子模式,广泛表达于固有免疫系统和获得性免疫系统,能够识别内、外源致病菌,启动宿主的防卫反应,参与 B 细胞的增殖、成熟。TLR9 是一种位于细胞内的 TLRs。

人们发现 TLR9 能够感知非自身的非甲基化的 CpG DNA、引起 MyD88 依赖性的核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的激活<sup>[17]</sup>,后来人们发现 TLR9 在抗病毒免疫中也发挥了重要的作用<sup>[18-20]</sup>,主要是通过 MyD88 和白细胞介素 1 受体相关激酶 1(interleukin-1 receptor associated kinase 1, IRAK1)、IRAK4 形成的复合物来介导 I 型干扰素的产生<sup>[21-23]</sup>。另有研究证实,缺氧可以诱导 HMGB1 和线粒体 DNA 的相互作用,通过激活 TLR9 途径,在体内和体外促进肝细胞癌的发生发展<sup>[24]</sup>。本研究发现,TLR9 的表达随糖尿病病程的延长呈逐渐增多的趋势,与

HMGB1 的表达一致。提示在 DR 的发生发展过程中, HMGB1 可与 TLR9 结合, 通过下游的信号通路促进 DR 的发生发展。

本研究通过免疫组织化学法检测正常大鼠和糖尿病不同时间大鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 的表达, 结果表明两者的光密度值在组间有显著性差异。以上结果表明, HMGB1 与 TLR9 的表达与 DR 的发生发展有关, 但具体存在怎样的关系, 其具体调节过程怎样, 涉及哪些信号通路的变化等均不十分明确, 这也是我们在今后的研究工作中需要解决的问题。

## 参考文献

- [1] TORRES PF, KJLSTRA A. The role of cytokines in corneal immunopathology[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2001, 9(1): 9-24.
- [2] XING Z, LIU F, YUAN J. Research advance in immunological mechanism after corneal alkali burns[J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2010, 28(8): 796-800.
- [3] SIMS GP, ROWE DC, RTDIJK ST, HERBST R, COYLE AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28(4): 367-388.
- [4] ANDERSSON U, TRACEY KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection[J]. *Rev Immunol*, 2010, 29(4): 139-162.
- [5] HUANG W, TANG Y, LI L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis[J]. *Cytokine*, 2010, 51(2): 119-126.
- [6] YANG H, ANTOINE DJ, ANDERSSON U, TRACEY KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis[J]. *Leukoc Biol*, 2013, 93(6): 865-873.
- [7] THOMAS JO, STOTT K. H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(2): 341-346.
- [8] THOMAS JO, TRAVERS AA. HMGB1 and 2, and related architectural DNA-binding proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 167-174.
- [9] STROS M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1-2): 101-113.
- [10] SCAFFIDI P, MISTELI T, BIANCHI ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.
- [11] TANG D, KANG R, XIAO W, JIANG L, LIU M, SHI Y, et al. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release[J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7376-7384.
- [12] MUDALIAR H, POLLOCK C, MA J. The role of TLR2 and 4-

- mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108844.
- [13] CHEN XL, ZHANG XD, LI YY, CHEN XM, TANG DR, RAN RJ. Involvement of HMGB1 mediated signalling pathway in diabetic retinopathy: evidence from type 2 diabetic rats and ARPE-19 cells under diabetic condition[J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97(12): 1598-1603.
- [14] SANTOS AR, DVORIANCHIKOVA G, LI Y. Cellular mechanisms of high mobility group 1 protein action in the diabetic retinopathy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87574.
- [15] TIAN J, ANA MR, AVALO S, MAO SY, CHEN B, LI M, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(5): 487-496.
- [16] YANAI H, BAN T, WANG Z, CHOI MK, KAWAMURA T, NEGISHI H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses[J]. *Nature*, 2009, 462(7269): 99-103.
- [17] HEMM IH, TAKEUCH IO, KAWAI T, KAISHO T, SATO S, SANJO H. A Toll like receptor recognizes bacterial DNA[J]. *Nature*, 2000, 408(6813): 740-745.
- [18] LUND J, SATO A, AKIRA S, MEDZHITOV R, IWASAK IA. Toll like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(3): 513-520.
- [19] DELALE T, PAQUIN A, ASSELIN-PATUREL C, DALOD M, BRIZARD G. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- $\alpha$  release and in initiation of immune responses *in vivo*[J]. *J Immunol*, 2005, 175(10): 6723-6732.
- [20] TABETA K, GEORGEL P, JANSSEN E, DU X, HOEBE K, CROZAT K. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(10): 3516-3521.
- [21] KAWAI T, SATO S, ISHII KJ, COBAN C, HEMM IH, YAMAMOTO M. Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10): 1061-1068.
- [22] HONDA K, YANAI H, MIZUTANI T, NEGISHI H, SHIMADA N, SU ZUKI N. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signalling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(43): 15416-15421.
- [23] UEMATSU S, SATO S, YAMAMOTO M, HIROTAN IT, KATO H, TAKESHITA F. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR) 7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(6): 915-923.
- [24] LIU Y, YAN W, TOHME S, CHEN M, FU Y, TIAN D, et al. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 114-121.