

HMGB-1 在 DR 患者房水及血浆中水平变化分析

李 达¹, 张小玲¹, 王新阳², 毕育学³

作者单位:¹(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院第一附属医院眼科;²(710061)中国陕西省西安市,环境与疾病相关基因教育部重点实验室;³(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院公共卫生系

作者简介:李达,男,在读硕士研究生,研究方向:眼底病(糖尿病视网膜病变)。

通讯作者:张小玲,女,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:糖尿病性视网膜病变。zhangxle@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期:2011-03-22 修回日期:2011-04-26

Investigation of HMGB-1 concentration in plasma and aqueous humor of patients with DR

Da Li¹, Xiao-Ling Zhang¹, Xin-Yang Wang², Yu-Xue Bi³

¹Department of Ophthalmology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Key Laboratory of Environment and Disease-Related Genes, Ministry of Education, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ³Department of Public Health, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Xiao-Ling Zhang. Department of Ophthalmology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. zhangxle@mail.xjtu.edu.cn

Received:2011-03-22 Accepted:2011-04-26

Abstract

• **AIM:** To observe the changes of high mobility group box-1 (HMGB-1) in plasma and aqueous humor of patients with diabetic retinopathy (DR) and its clinical significance.

• **METHODS:** Research objects were the patients with diabetic mellitus (DM) in the First Hospital of Xi'an Jiaotong University from August of 2010 to December of 2010. According to DR, the patients were divided into non-diabetic retinopathy (NDR) group and DR group. DR group was divided into background diabetic retinopathy (BDR) group, and proliferative diabetic retinopathy (PDR) group according to disease course. Normal control group was set, plasma group with 40 cases and aqueous humor group with 28 cases were collected, and they were analyzed by ABC-ELISA.

• **RESULTS:** The levels of aqueous humor HMGB-1 in patients with DM were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). Of patients with diabetes, according to DR course, HMGB-1 concentration had not the obvious difference ($P > 0.05$). HMGB-1 concentration

in plasma of patients with diabetes had no obvious difference compared with control group ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** HMGB-1 may play an important role in the occurrence of DR, but it has no obvious relation with DR pathological process.

• **KEYWORDS:** high mobility group box-1; diabetic retinopathy; aqueous humor; plasma

Li D, Zhang XL, Wang XY, et al. Investigation of HMGB-1 concentration in plasma and aqueous humor of patients with DR. *Guji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):976-978

摘要

目的:观察糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患者房水和血浆中高迁移率族蛋白-1(high-mobility group box-1, HMGB-1)的变化及其临床意义。

方法:以西安交通大学第一附属医院眼科 2010-08/12 住院糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者为研究对象,按有无 DR 分为糖尿病无视网膜病变(non-diabetic retinopathy, NDR)组及 DR 组。DR 组按病程分为单纯性糖尿病性视网膜病变(background diabetic retinopathy, BDR)组及增殖性糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)组。设正常对照组,对研究对象分别收集房水和血浆标本,共收集房水 28 例,血浆 40 例,均采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法进行 HMGB-1 定量 ELISA 测定。

结果:DM 患者房水中的 HMGB-1 浓度明显高于对照组($P < 0.05$),DM 患者按 DR 病程分组时, HMGB-1 浓度未见明显差异($P > 0.05$)。DM 患者血浆中 HMGB-1 浓度与对照组比较未见明显差异($P > 0.05$)。

结论:HMGB-1 在 DR 的发生中可能起到重要作用,但与 DR 的病理进程无明显关系。

关键词:高迁移率族蛋白-1;糖尿病性视网膜病变;房水;血浆

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.012

李达,张小玲,王新阳,等. HMGB-1 在 DR 患者房水及血浆中水平变化分析. 国际眼科杂志 2011;11(6):976-978

0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最严重的并发症之一,是全球性致盲的重要原因。根据 DR 的严重程度将 DR 分为:非增生期(background diabetic retinopathy, BDR)和增生期(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。目前,DR 发病机制尚未完全明了,研究认为:视网膜微循环障碍是 DR 的发病基础,早期毛细血管内皮细胞基底膜增厚,周细胞丧失,毛细血管自动调节功能失代偿,最终导致视网膜水肿和新生血管形成。近年来研究发现,细胞因子介导的低度慢性炎症性反应可能

在 DR 发生中起了重要作用^[1],高迁移率族蛋白-1 (high-mobility group box-1, HMGB-1) 为炎症反应的一种晚期重要介质^[2]。本研究的目的是探讨 HMGB-1 在 DR 发病机制中的作用,为 DR 的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选自西安交通大学第一附属医院眼科 2010-08/12 住院患者。糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 均经我院内分泌科确诊,DR 按 1984 年我国眼底病学组制定的《糖尿病视网膜病变分期标准》行裂隙灯、眼底镜检查,经眼底荧光血管造影检查确诊,分期。DM 患者按照分期标准分为糖尿病无视网膜病变 (non-diabetic retinopathy, NDR) 组及 DR 组,DR 组按病程分 BDR 组及 PDR 组。对照组为体检排除 DM、冠心病等慢性疾病,经检查无其他眼疾的白内障患者。收集研究对象的房水和血浆,房水共 28 例,正常组 7 例,男 2 例女 5 例,平均年龄 74.71 ± 4.54 岁;DM 组共 21 例,男 11 例女 10 例,平均年龄 66.05 ± 15.04 岁,其中 NDR 组、BDR 组、PDR 组各 7 例。血浆共 40 例,正常组 8 例,男 4 例女 4 例,平均年龄 72.25 ± 9.38 岁;DM 组共 32 例,男 16 例女 16 例,平均年龄 63.94 ± 9.89 岁,其中 NDR 组 13 例,BDR 组 8 例,PDR 组 11 例。在房水标本患者收集 1 例 1 型糖尿病患者,其余均为 2 型糖尿病。手术前空腹血糖均 < 8.0mmol/L。

1.2 方法 收集研究对象的房水和血浆标本。房水收集:研究对象行白内障手术时,以 0.45mm 针头接 1mL 针管刺入前房,缓慢抽取房水 0.1 ~ 0.2mL,注入 0.5mL 无菌 Eppendorf 管中,储存于 -80℃ 冰箱备用。血浆收集:研究对象于入院第 2d 清晨,抽取空腹静脉血 2mL,注入含 32g/L 柠檬酸钠 10mL 的无菌离心试管中,混匀,1500r/min 离心 5min,分离血浆,缓慢抽取血浆 0.5mL 置 0.5mL 无菌 Eppendorf 管中,储存于 -80℃ 冰箱备用。人 HMGB-1 定量测定采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。人 HMGB-1 ELISA 试剂盒,购自上海西唐生物科技有限公司 (进口分装美国 R&D 公司产品),灵敏度 0.3ng/mL。测定前血浆以 1:10 稀释,房水标本做 2000r/min 离心 2min,抽取上清液。严格按照说明书操作,终止反应后,立即应用美国 Bio-Rad Model 550 酶标仪在 450nm 处测 OD 值, HMGB-1 浓度与 OD 值成正比,通过绘制标准曲线求出标本中 HMGB-1 浓度。血浆样品按实际样品的 1:10 稀释液,故由标准曲线上查出的人 HMGB-1 浓度值乘以 10,即得到血浆中人 HMGB-1 的真实浓度值。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行数据处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,用方差齐性 Levene 检验,对方差不齐着用校正 *t'* 检验。采用 Pearson 相关做相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DM 组与对照组房水及血浆中 HMGB-1 浓度的变化 在房水中, $t' = -2.515, P < 0.05$, 可认为房水中 HMGB-1 浓度在对照组及 DM 组有显著差异。在血浆中, $t = 0.585, P > 0.05$, 认为血浆中 HMGB-1 浓度在对照组及 DM 组无显著差异 (表 1)。

2.2 NDR 组与 DR 组房水及血浆中 HMGB-1 浓度的变化 在房水中, $t' = 0.138, P \geq 0.05$, 认为房水中 HMGB-1 浓

表 1 DM 患者与对照组房水及血浆中 HMGB-1 (μg/L) 的变化

分组	房水 HMGB-1		血浆 HMGB-1	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
对照组	7	2.756 ± 0.719	8	0.818 ± 0.237
糖尿病组	21	4.762 ± 3.456 ^a	32	0.770 ± 0.198

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表 2 NDR 与 DR 房水及血浆中 HMGB-1 (μg/L) 的变化

分组	房水 HMGB-1		血浆 HMGB-1	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
NDR 组	7	4.960 ± 5.497	13	0.766 ± 0.203
DR 组	14	4.762 ± 3.455	19	0.773 ± 0.199

表 3 BDR 与 PDR 房水及血浆中 HMGB-1 (μg/L) 的变化

分组	房水 HMGB-1		血浆 HMGB-1	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
BDR 组	7	4.283 ± 1.830	8	0.745 ± 0.106
PDR 组	7	5.043 ± 2.414	11	0.793 ± 0.250

度在 NDR 组与 DR 组无显著差异。在血浆中, $t = -0.090, P > 0.05$, 认为血浆中 HMGB-1 浓度在 NDR 组与 DR 组无显著差异 (表 2)。

2.3 BDR 组与 PDR 组房水及血浆中 HMGB-1 浓度的变化 在房水中, $t = -0.664, P \geq 0.05$, 认为房水中 HMGB-1 浓度在 BDR 组与 PDR 组无显著差异。在血浆中, $t = -0.504, P > 0.05$, 认为血浆中 HMGB-1 浓度在 BDR 组与 PDR 组无显著差异 (表 3)。

2.4 房水及血浆 HMGB-1 浓度与其它因素的相关性分析 采用 Pearson 相关做相关性分析,在房水中:HMGB-1 浓度和患者年龄、血糖、DM 病程的相关性分析分别为 $r = -0.294 (P > 0.05), r = 0.182 (P > 0.05), r = 0.13 (P > 0.05)$ 。在血浆中:HMGB-1 浓度和患者年龄、血糖、DM 病程的相关性分析分别为 $r = -0.183 (P > 0.05), r = -0.33 (P > 0.05), r = -0.163 (P > 0.05)$ 。在房水及血浆中, HMGB-1 浓度和患者的年龄、血糖高低及患病时间均无相关性,故可认为上述因素不会影响 HMGB-1 的浓度。

3 讨论

DR 的发病机制至今尚不完全清楚,目前多认为是视网膜血管的损伤,尤其是微血管系统。其病理改变主要为视网膜微血管周细胞消失、微血管瘤形成、微血管基底膜增厚,病变继续发展造成血-视网膜屏障破裂、毛细血管闭塞、形成视网膜无灌注区、新生血管增殖,最后造成视功能损害^[3]。现有研究证实,炎症机制参与了 DR 的发生、发展过程^[1]。研究发现肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF-α) 和白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 随着 DR 程度的加重逐渐增高^[4,5]。Vincent 等^[6]对 DR 小鼠注射白介素-1β 拮抗剂后发现,其能够抑制 DR 小鼠视网膜微血管的退化。研究发现 DR 中 TNF-α 表达明显增加^[7],可介导视网膜炎症反应,增加白细胞黏附功能、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和黏附因子的表达。我们的前期研究也发现,DR 的细胞间黏附因子 ICAM-1 蛋白通过 VEGF/PKC/NO 信号通路表达升高。眼内的 VEGF 及 ICAM-1 与 DR 的病程呈正相关^[8,9], ICAM-1 可增加血管内白细胞与内皮细胞的滚动、黏附,加重血-视

网膜屏障破坏,诱导细胞凋亡和视网膜新生血管的形成。

HMGB-1 是一种含量丰富的高度保守的非组核蛋白,在胞外为一种重要的炎症介质和致炎细胞因子^[2],与相应胞膜受体如晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE), Toll 样受体 2 (toll like receptor 2, TLR2), Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 等结合,通过胞内信号转导而发挥生物学效应^[10]。HMGB-1 激活巨噬细胞、外周血单核细胞、内皮细胞、肝细胞等表达和释放 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α 和 MIP-1 等炎症介质或致炎细胞因子,进而触发炎症免疫反应^[10]。

目前,关于 HMGB-1 在 DR 作用机制方面的研究在国内外少有报道,为了探讨 HMGB-1 与 DR 的关系,我们以 DR 各个分期的 DM 患者为实验组,以排除 DM 及其它慢性病的患者为对照组,测量其房水及血浆中 HMGB-1 的浓度。前房液是一种包含多种生长因子的复合生物活性液体,前房内聚集了眼内组织产生的各种生长因子,故眼内组织生长因子的浓度在一定程度可通过测量其在前房液中的浓度反应。结果发现 DM 组中房水 HMGB-1 值($4.762 \pm 3.456 \mu\text{g/L}$)明显高于对照组 ($2.756 \pm 0.719 \mu\text{g/L}$), $P < 0.05$,表明 DM 患者眼内 HMGB-1 浓度高于正常人,提示 HMGB-1 参与了 DR 病理改变。而在 DM 组内, HMGB-1 值分别为 NDR 组 $4.960 \pm 5.497 \mu\text{g/L}$, BDR 组 $4.283 \pm 1.830 \mu\text{g/L}$, PDR 组 $5.043 \pm 2.414 \mu\text{g/L}$ 。按病变的程度进行两两比较后发现, P 值均 > 0.05 ,说明 HMGB-1 在 DR 病变的发展过程中无明显的增高。在我们所测得结果中,房水 NDR 组中有 1 例患者 HMGB-1 浓度为 $16 \mu\text{g/L}$,明显高于其它测量值,由于未发现类似的检测结果,我们不知道是否由于实验误差所导致。但假设删掉此值,我们得到房水中的 HMGB-1 均值在 NDR 组为 $3.120 \pm 2.797 \mu\text{g/L}$ 。由此数据我们可以发现,在房水中 HMGB-1 随病程的变化有升高的趋势,但仍没有统计学意义。如果加大样本量,是否可得到 HMGB-1 浓度在房水中随病程的发展逐渐增高的结论,仍需进一步验证。但为了追寻原始数据的真实性,我们在统计过程中并未删除此数据。在房水的收集过程中,我们收集 1 例 PDR 期的 1 型糖尿病,测得其 HMGB-1 浓度为 $1.920 \mu\text{g/L}$,远低于该组的均值 $5.043 \mu\text{g/L}$ 。HMGB-1 是否在 1 型和 2 型糖尿病的病理机制中作用不同,也值得探究。

血浆标本中 HMGB-1 值在 DM 组 ($0.770 \pm 0.198 \mu\text{g/L}$) 和对照组 ($0.818 \pm 0.237 \mu\text{g/L}$) 未见明显差异 ($P > 0.05$)。在 DM 组内, HMGB-1 值分别为 NDR 组 $0.766 \pm 0.203 \mu\text{g/L}$, BDR 组 $0.745 \pm 0.106 \mu\text{g/L}$, PDR 组 $0.793 \pm 0.250 \mu\text{g/L}$ 。按病变的程度进行两两比较后发现 $P > 0.05$,提示血液中 HMGB-1 浓度在 DR 病变的发生、发展过程中未见明显的增高。有学者发现冠心病合并 2 型糖尿病时,血清中 HMGB-1 较单纯冠心病组并无统计学意义^[11,12]。HMGB-1 在 DR 的血液中无增高,是否由于实验误差导致,仍需加大样本进一步验证。本实验中,采用 Pearson 相关做

HMGB-1 浓度和其它因素的相关性分析,发现在房水及血浆中, HMGB-1 均不会随患者的年龄、DM 的病程及血糖增高。

综上所述, HMGB-1 作为一种晚期炎症因子,在 DR 的发生中起着重要的作用。越来越多的研究结果表明,胞外 HMGB-1 在炎症性疾病中发挥重要的病理作用^[13],在 HMGB-1 刺激下,人微血管内皮细胞能增加早期炎症细胞因子的释放并有黏附因子的上调^[14],中性粒细胞聚集、黏附和活化在 DR 的发病过程中起重要作用。HMGB-1/RAGE 信号途径在慢性炎症疾病中的作用受到越来越多的关注,探讨该信号途径在 DR 发生发展中的作用,将为 DR 的预防和治疗提供新的思路。HMGB-1 表达水平的下调及其拮抗剂的使用,有望成为 DR 预防及治疗新的途径。当然,本研究结果仍需进一步扩大样本进行验证,其具体作用机制仍需进一步研究证实。

参考文献

- 1 哈文静,严宏. 炎症在糖尿病视网膜病变发病机制中的作用. 国际眼科杂志 2005;5(4):745-749
- 2 Wang H, Bloom O, Zhang M, *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285(5425):248-251
- 3 Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97(6):512-523
- 4 李玉霞,钱芳,孙秀梅,等. IL-1 和 TNF- α 与糖尿病性视网膜病变的相关研究. 中国现代医生 2009;47(15):179-190
- 5 Demircan N, Safran BG, Soylu M, *et al.* Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2006;20(12):1366-1369
- 6 Vincent JA, Mohr S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1 beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 2007;56(1):224-230
- 7 Jousen AM, Doehmen S, Le ML, *et al.* TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis* 2009;15:1418-1428
- 8 Zhang XL, Wen L, Chen YJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin Med* 2009;122(3):338-343
- 9 张小玲,孙文涛. 糖尿病性视网膜病变患者房水中 VEGF 与 IGF-1 的定量测定及分析. 国际眼科杂志 2008;8(5):951-953
- 10 Chen G, Ward MF, Sama AE, *et al.* Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(6):329-333
- 11 白起君,夏豪,黄春燕,等. CHD 合并 DM2 患者血清 HMGB1 与 hs-CRP 水平及临床意义. 放射免疫学杂志 2010;23(3):327-329
- 12 Yan XX, Lu L, Peng WH, *et al.* Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2009;205(2):544-548
- 13 杨岚,李蕾,陈国千. 炎症介质高迁移率族蛋白 B1 的研究进展. 中华临床医师杂志 2010;4(4):463-466
- 14 Fiuza C, Bustin M, Talwar S, *et al.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003;101(7):2652-2660