

# HMGB1在类青光眼引流阀植入术后瘢痕化中的作用机制

刘思远, 曹凡, 丁晶晶, 王传喜, 丁碧青, 梁坤, 蒋正轩, 鲍宁

引用: 刘思远, 曹凡, 丁晶晶, 等. HMGB1在类青光眼引流阀植入术后瘢痕化中的作用机制. 国际眼科杂志, 2024, 24(1): 18-23.

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (No. 202004j07020029); 安徽医科大学校科研基金项目 (No. 2021xkj161, 2022xkj026)

作者单位: (230601) 中国安徽省合肥市, 安徽医科大学第二附属医院眼科

作者简介: 刘思远, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病、青光眼。

通讯作者: 鲍宁, 毕业于安徽医科大学, 博士, 主任医师, 副教授, 眼科病区主任, 研究方向: 眼底病、青光眼. [baoningleon@163.com](mailto:baoningleon@163.com)

收稿日期: 2023-06-07 修回日期: 2023-11-27

## 摘要

**目的:** 探究高迁移率族蛋白1 (HMGB1) 在类青光眼引流阀植入术后瘢痕组织中的动态表达, 揭示 HMGB1 在青光眼术后瘢痕化中的作用及其可能的作用机制。

**方法:** 将 60 只新西兰大白兔随机分为空白对照组 ( $n=20$ )、模型组 ( $n=20$ , 结膜囊下硅胶植入)、模型给药组 ( $n=20$ , 硅胶植入联合 5-氟尿嘧啶注射)。分别于术后 4、8 wk 取球结膜组织, 采用 HE 染色和 Masson 染色检测结膜组织中成纤维细胞和胶原纤维增生及分布情况; 免疫组织化学染色检测结膜组织中 HMGB1、转化生长因子 (TGF)- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的分布及变化情况; RT-PCR 和 Western blot 检测结膜组织中 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白的表达。

**结果:** HE 染色和 Masson 染色结果显示, 4、8 wk 模型组较空白对照组结膜组织中炎症细胞、成纤维细胞及胶原纤维增生明显, 而 4、8 wk 模型给药组结膜组织中成纤维细胞及胶原纤维增生相对于同时期模型组明显减少。免疫组织化学染色结果显示, 4、8 wk 模型组结膜组织中可见 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达, 呈棕褐色染色, 8 wk 模型组染色更深, 而 4、8 wk 模型给药组较同时期模型组阳性染色程度下降。4、8 wk 模型组结膜组织中 HE 染色成纤维细胞数与免疫组织化学染色 HMGB1 的表达水平均呈正相关 ( $r=0.602, 0.703$ , 均  $P<0.05$ )。RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 4、8 wk 模型组结膜组织中 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达量显著高于空白对照组 (均  $P<0.05$ ), 4、8 wk 模型给药组结膜组织中 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达量显著低于同时期模型组 (均  $P<0.05$ )。模型组和模型给药组中 HMGB1 与 TGF- $\beta$ 1、Smad3 的 mRNA 表达水平具有正相关性 (均  $P<0.05$ )。

**结论:** 类青光眼引流阀植入术后随时间延长 HMGB1 表达升高, HMGB1 在青光眼术后具有致瘢痕形成的作用, 并可

能通过 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路参与瘢痕化的发生发展。

**关键词:** 高迁移率族蛋白1 (HMGB1); 青光眼引流阀植入术; 瘢痕化; 5-氟尿嘧啶; TGF- $\beta$ /Smad 信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.1.04

## Mechanism of HMGB1 in scarring after glaucoma drainage valve implantation

Liu Siyuan, Cao Fan, Ding Jingjing, Wang Chuanxi, Ding Biqing, Liang Kun, Jiang Zhengxuan, Bao Ning

**Foundation items:** Key Research and Development Program of Anhui Province (No.202004j07020029); Research Fund of Anhui Medical University (No.2021xkj161, 2022xkj026)

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China

**Correspondence to:** Bao Ning. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, Anhui Province, China. [baoningleon@163.com](mailto:baoningleon@163.com)

Received: 2023-06-07 Accepted: 2023-11-27

## Abstract

• **AIM:** To explore the dynamic expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in scar tissues after glaucoma drainage valve implantation, and to further reveal the role and possible mechanism of HMGB1 in scarring after glaucoma surgery.

• **METHODS:** A total of 60 New Zealand white rabbits were randomly divided into control group ( $n=20$ ), model group ( $n=20$ , silicone implantation under conjunctival sac) and model with drug administration group ( $n=20$ , silicone implantation under conjunctival sac combined with 5-fluorouracil injection). The conjunctival tissues were collected at 4 and 8 wk after surgery. HE staining and Masson staining were used to detect the proliferation and distribution of fibroblasts and collagen fibers in conjunctival tissues. Immunohistochemistry was utilized to detect the distribution and changes of HMGB1, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, Smad3 and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) in conjunctival tissues. RT-PCR and Western blot were adopted to detect the mRNA and protein expression of HMGB1, TGF- $\beta$ 1, Smad3 and  $\alpha$ -SMA in conjunctival tissues.

• **RESULTS:** HE staining and Masson staining showed that the proliferation of inflammatory cells, fibroblasts and collagen fibers in the model group was significantly higher than that in the control group at both 4 and 8 wk. Meanwhile, the proliferation of fibroblasts and collagen

fibers in the model with drug administration group was significantly lower than that in the model group. Immunohistochemical staining showed that the expression of HMGB1, TGF- $\beta$ 1, Smad3 and  $\alpha$ -SMA protein was observed in the conjunctival tissues of the model group both 4 and 8 wk, with brown and significantly deeper staining of the model group at 8 wk. Meanwhile, the positive staining in the model with drug administration group at both 4 and 8 wk was significantly lower than that in the model group. There was positive correlations between the number of fibroblasts stained with HE and the expression of HMGB1 in the conjunctival tissue of the model group at both 4 and 8 wk ( $r=0.602, 0.703$ , all  $P<0.05$ ). RT-PCR and Western blot revealed that the mRNA and protein expression levels of HMGB1, TGF- $\beta$ 1, Smad3 and  $\alpha$ -SMA in the model group were significantly higher than those in the control group at both 4 and 8 wk (all  $P<0.05$ ). Meanwhile, the mRNA and protein expression levels of HMGB1, TGF- $\beta$ 1, Smad3 and  $\alpha$ -SMA in the model with drug administration group were significantly lower than those in the model group (all  $P<0.05$ ). There was positive correlations between mRNA expressions of HMGB1 and TGF- $\beta$ 1, Smad3 in the model group and the model with drug administration group (all  $P<0.05$ ).

• **CONCLUSION:** The expression of HMGB1 increased at a time - dependent manner after glaucoma valve implantation. HMGB1 acts an indispensable role in the initiation and progression of scar formation after glaucoma surgery, which may be involved in the regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

• **KEYWORDS:** high - mobility group box1 (HMGB1); glaucoma drainage valve implantation; scarring; 5 - fluorouracil; TGF- $\beta$ /Smad pathway

**Citation:** Liu SY, Cao F, Ding JJ, et al. Mechanism of HMGB1 in scarring after glaucoma drainage valve implantation. *Guoji Yanke Zazhi* (Int Eye Sci), 2024,24(1):18-23.

## 0 引言

青光眼是以视盘损伤及视野缺失为特征的一种眼病, 现已成为世界范围内首位不可逆致盲性眼病<sup>[1]</sup>。引流物植入是目前临床上难治性青光眼的一线治疗手段<sup>[2]</sup>, 其中引流阀植入临床应用十分普遍<sup>[3-4]</sup>。人体自身的愈合机制往往使引流通道瘢痕化, 导致引流阀植入术远期成功率仅约 50%<sup>[5]</sup>。针对青光眼术后瘢痕化问题临床上主要采用抗代谢药物如丝裂霉素 C (MMC)、5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 等进行治疗<sup>[6-7]</sup>。研究表明, 术后炎症因子在组织损伤修复中发挥关键调节作用<sup>[8-9]</sup>。高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box1, HMGB1) 是一种广泛存在的晚期炎症因子, 可招募巨噬细胞参与多种组织修复过程, 包括组织的瘢痕修复<sup>[10-11]</sup>。研究报道转化生长因子 (TGF)- $\beta$ 1 是瘢痕化形成过程中的主要细胞因子, TGF- $\beta$ 1 通过 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路使大量上皮细胞转化为成纤维细胞<sup>[12]</sup>, 进而导致青光眼手术失败。目前晚期炎症因子在引流阀植入术后瘢痕形成过程中的作用研究较少, 本研究构建青光眼引流阀植入术后瘢痕化模型, 检测不同时间及

应用 5-Fu 后 HMGB1 的表达水平, 观察 HMGB1 的动态变化及与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的相关性, 揭示 HMGB1 对青光眼引流阀植入术后瘢痕化的影响, 探究 HMGB1 导致瘢痕化的可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年新西兰大白兔 60 只, 体质量 2.0-2.5 kg, 清洁级别, 不分雌雄, 无眼部疾病, 由安徽医科大学动物实验中心提供。主要试剂: 5-Fu、硅胶块由安徽医科大学第二附属医院提供, Anti-HMGB1 抗体、Anti- $\beta$ -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), Anti- $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 抗体、Anti-TGF- $\beta$ 1 抗体、Anti-Smad3 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔以及山羊抗鼠二抗 (北京 Bioass), 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥公司), RNA 提取试剂盒 (艾科瑞生物 AG21027)、逆转录试剂 (艾科瑞生物 AG11706)、实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 试剂盒 (艾科瑞生物 AG11701)。主要仪器: 石蜡切片仪、天能 EP300 型电泳仪、Tanon-4200SF 凝胶成像分析系统 (上海天能科技有限公司), 玻片扫描仪 (奥林巴斯 VS200), RT-PCR 仪 (罗氏 LC96)。本研究经安徽医科大学生物医学伦理委员会审批通过。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及造模** 将新西兰大白兔随机分为空白对照组 (20 只)、模型组 (20 只)、模型给药组 (20 只), 选择左眼作为实验眼, 空白对照组不进行处理, 模型组行单纯硅胶垫植入, 模型给药组行硅胶垫植入联合 5-Fu 结膜下注射, 随机将模型组和模型给药组分别分为 4 wk 模型组 (10 只)、8 wk 模型组 (10 只) 和 4 wk 模型给药组 (10 只)、8 wk 模型给药组 (10 只)。所有手术均由同一位操作熟练的眼科医师完成, 术前行全身麻醉 (经耳缘静脉注射 1.5% 戊巴比妥 2 mL/kg), 常规眼部消毒, 开睑器固定眼睑, 球结膜下植入约 5 mm $\times$ 5 mm 硅胶块, 丝线缝合结膜。模型给药组同时行结膜下注射 5-Fu 约 0.2 mL。模型组和模型给药组实验眼结膜囊内涂抹左氧氟沙星眼膏。

**1.2.2 取材** 实验动物分别于术后 4、8 wk 过量麻醉致死, 清除术眼缝线及硅胶块, 取硅胶块周围约 3 mm 范围结膜组织, 生理盐水清洗后, 置于无酶 EP 管中, -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 部分组织经多聚甲醛固定后行石蜡包埋, 以结膜与硅胶块接触面为最大切面制备切片。

**1.2.3 苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 三色染色** 取石蜡切片脱蜡, 采用 HE 染色法和 Masson 三色染色法染色, 再行脱水处理后, 二甲苯透明, 树脂封片。玻片扫描仪扫描照片后, 计数成纤维细胞数。

**1.2.4 免疫组织化学染色** 取石蜡切片脱蜡, 高压抗原修复, 加一抗 (Anti-HMGB1、Anti- $\alpha$ -SMA、Anti-TGF- $\beta$ 1、Anti-Smad3, 浓度为 1:100), HRP 标记的山羊抗兔/山羊抗鼠二抗 (1:1000), DAB 显色液试剂盒显色, 脱水处理后, 二甲苯透明, 中性树脂封片。玻片扫描仪扫描照片, 通过 ImageProPlus6.0 图像分析系统采集、分析处理图像, 计数平均吸光度 (A) 值, 测定 3 个视野, 取平均值。

**1.2.5 RT-PCR 检测** 使用 RNA 提取试剂盒提取组织 RNA, 取 500 ng 总 RNA 行逆转录。转录后的 cDNA 采用 SYBR green PCR 试剂配制反应体系, 实时定量 PCR 仪扩增, 反应完成后收集数据, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量, 实验进行 3 次独立重复。RT-PCR 引物由南京擎科生物科技有限公司合成。内参 GAPDH 上游引物:

AGACACGATGCTGAAGGTCC,下游引物: TGATGGCGACA ACATCCACT; HMGB1 上游引物: AGCCGAGAGGCAAAA TGTCA,下游引物: AGTTGACGGAAGCATCTGGG; TGF- $\beta$ 1 上游引物: CTGGAACGGGCTCAACATCT, 下游引物: CAGGTCCTTGC GGAAGTCAA; Smad3 上游引物: TCTGGC GGATTTTCACTGCT, 下游引物: AACTCGTACCCTCTCC TGCT;  $\alpha$ -SMA 上游引物: GTCAGGAATCCCCTGAAGCA, 下游引物: ACAGCTCTTGAGCATCGTC。

**1.2.6 Western blot 检测** 称取组织 30 mg, RIPA 裂解液裂解, 提取总蛋白, BCA 法蛋白定量。加样后经 SDS-PAGE 电泳分离不同蛋白, 恒流模式转膜, 5% BSA 室温封闭, 一抗 (Anti-HMGB1、Anti- $\alpha$ -SMA、Anti-TGF- $\beta$ 1、Anti-Smad3、Anti- $\beta$ -actin, 1:1000) 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 缓冲液洗膜, HRP 标记的山羊抗兔/山羊抗鼠二抗 (1:10000) 室温孵育, 再次洗膜, 滴加显影液, 化学发光检测仪曝光检测。通过 Image J 分析软件对蛋白条带进行灰度值分析。目的条带和内参条带的灰度值比值表示目的蛋白相对表达水平。

**统计学分析:** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.5 软件作图。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析法。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HE 染色观察结膜组织形态** 空白对照组结膜组织疏松, 炎症细胞浸润少; 4 wk 模型组结膜组织有大量炎症细胞浸润, 同时可见成纤维细胞; 8 wk 模型组相较于 4 wk 模型组结膜组织炎症细胞浸润加重, 成纤维细胞增生更多, 同时可见部分胶原纤维围绕新生毛细血管呈年轮样排布; 4、8 wk 模型给药组与同时期模型组相比结膜组织炎症细胞、成纤维细胞均减少, 见图 1。

**2.2 Masson 染色观察结膜组织中胶原纤维形态** 空白对照组结膜组织中胶原纤维呈丝状且排列疏松; 4、8 wk 模型组结膜组织中可见大量胶原纤维增生, 呈条索状分布, 且与 4 wk 模型组相比, 8 wk 模型组胶原纤维增生更为明

显, 排列更为致密; 4、8 wk 模型给药组较同时期模型组结膜组织中胶原纤维增生减少, 排列疏松, 见图 2。

**2.3 免疫组织化学染色检测结膜组织中相关蛋白表达及分布** 4、8 wk 模型组结膜组织中均可见 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA 表达, 呈棕褐色染色, 阳性染色主要分布在成纤维细胞胞质中, 相比于空白对照组, HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA 在 4、8 wk 模型组结膜组织中表达明显, 且 8 wk 模型组相对于 4 wk 模型组阳性染色程度更深; 4、8 wk 模型给药组与同时期模型组相比, 可见染色程度减轻, 与空白对照组染色程度基本相近, 见图 3。

**2.4 HMGB1 表达水平与成纤维细胞数的相关性** Pearson 相关分析结果显示, 4、8 wk 模型组结膜组织中 HE 染色高倍镜下 (400 $\times$ ) 单位面积成纤维细胞数与免疫组织化学染色 HMGB1 的表达水平均呈正相关 ( $r=0.602, 0.703, P=0.018, 0.003$ ), 见图 4。

**2.5 RT-PCR 检测结膜组织中相关基因的相对表达水平**

各组结膜组织中 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $F=11.450, 19.070, 11.680, 7.151$ , 均  $P<0.05$ ), 其中 4、8 wk 模型组结膜组织中各基因相对表达量均较空白对照组升高, 且 8 wk 模型组结膜组织中各基因相对表达量升高最为显著, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 4、8 wk 模型给药组结膜组织中各基因相对表达量与同时期模型组相比均显著减少, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见图 5。Pearson 相关性分析结果显示, 4wk 模型组、4 wk 模型给药组、8 wk 模型组、8 wk 模型给药组结膜组织中 HMGB1 与 TGF- $\beta$ 1、Smad3 mRNA 相对表达量均具有正相关性 ( $P<0.05$ ), 见表 1。

**2.6 Western blot 检测结膜组织中相关蛋白的相对表达水平** 各组结膜组织中 HMGB1、TGF- $\beta$ 1、Smad3、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $F=4.742, 4.702, 5.728, 4.870, P=0.0454, 0.0474, 0.0155, 0.0395$ ), 其中 4、8 wk 模型组结膜组织中各蛋白相对表达量均较空白对照组升高, 且 8 wk 模型组结膜组织中各蛋白相对表达量升高最为显著, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 4、8 wk 模型给药组结膜组织中各蛋白相对表达量与同时期模型

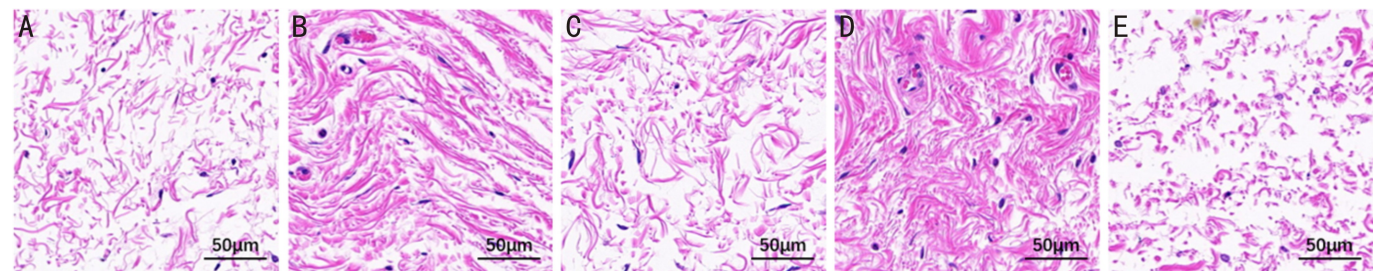


图 1 HE 染色观察结膜组织形态 A: 空白对照组; B: 4 wk 模型组; C: 4 wk 模型给药组; D: 8 wk 模型组; E: 8 wk 模型给药组。

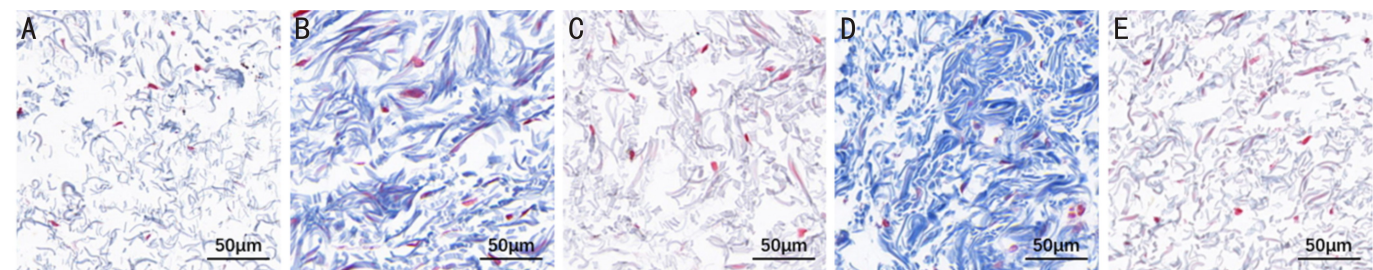


图 2 Masson 染色观察结膜组织中胶原纤维形态 A: 空白对照组; B: 4 wk 模型组; C: 4 wk 模型给药组; D: 8 wk 模型组; E: 8 wk 模型给药组。

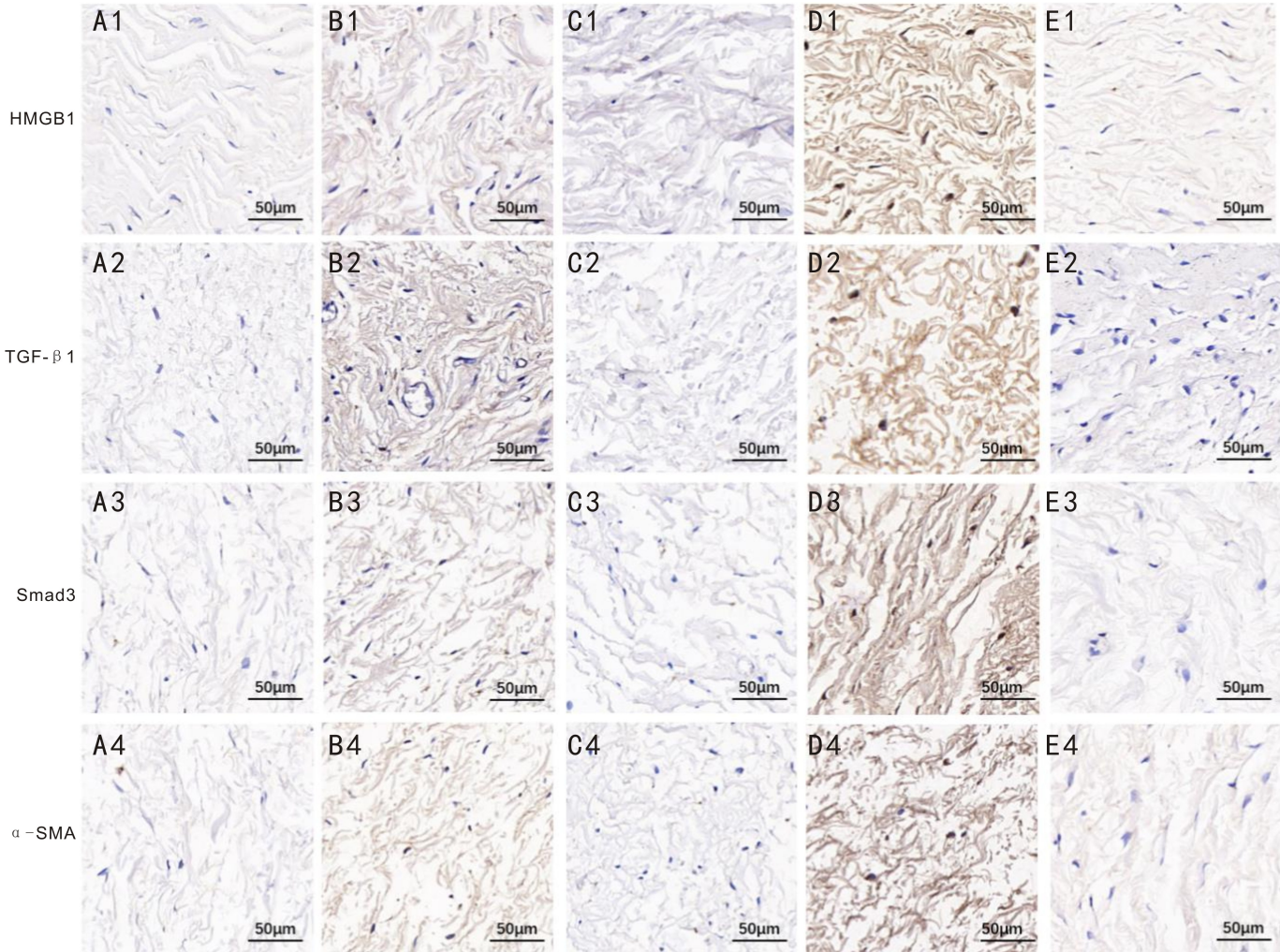


图3 免疫组织化学染色检测结膜组织中相关蛋白表达及分布 A:空白对照组;B:4 wk 模型组;C:4 wk 模型给药组;D:8 wk 模型组;E:8 wk 模型给药组。

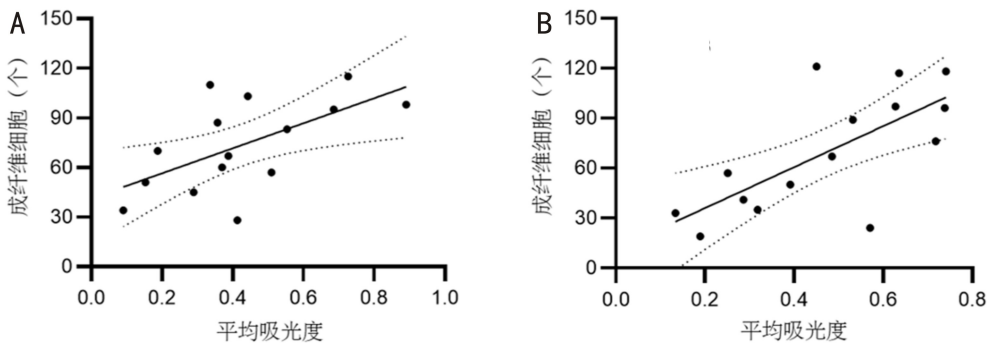


图4 HMGB1 表达水平与成纤维细胞数的相关性分析 A:4 wk 模型组;B:8 wk 模型组。

表1 HMGB1 与 TGF-β1 和 Smad3 mRNA 表达量的相关性分析

统计值	4 wk 模型组		4 wk 模型给药组		8 wk 模型组		8 wk 模型给药组	
	TGF-β1	Smad3	TGF-β1	Smad3	TGF-β1	Smad3	TGF-β1	Smad3
<i>r</i>	0.908	0.825	0.824	0.835	0.895	0.827	0.818	0.847
<i>P</i>	0.012	0.043	0.044	0.039	0.016	0.042	0.047	0.034

组相比均显著减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且4、8 wk 模型给药组结膜组织中  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量较空白对照组有所增加,差异有统计学意义( $P = 0.0175$ 、 $0.0137$ ),见图6。

### 3 讨论

青光眼是一类以病理性眼压升高为主要特征的疾病,

视力损害为不可逆性损害,控制眼内压是其主要的治疗手段<sup>[13]</sup>。引流阀植入为难治性青光眼公认的首选治疗方式<sup>[3,14]</sup>,但此类手术经长期观察发现滤过通道或滤过盘周围瘢痕化明显<sup>[15]</sup>,使远期成功率往往只能达到约50%。

HMGB1 与多种炎症性疾病有关,参与多种疾病的病理过程,可激活细胞释放多种促炎因子及趋化因子,引发

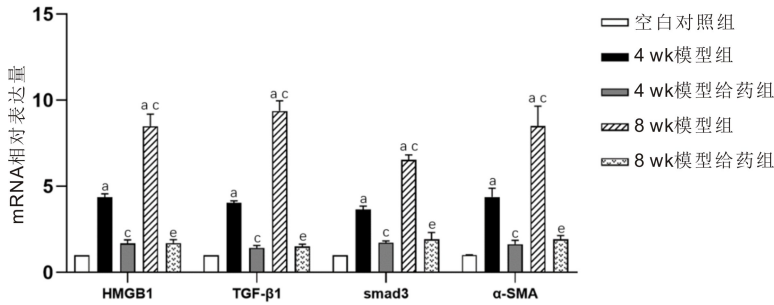


图5 RT-PCR 检测结膜组织中相关基因的相对表达水平 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 4 wk 模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 8 wk 模型组。

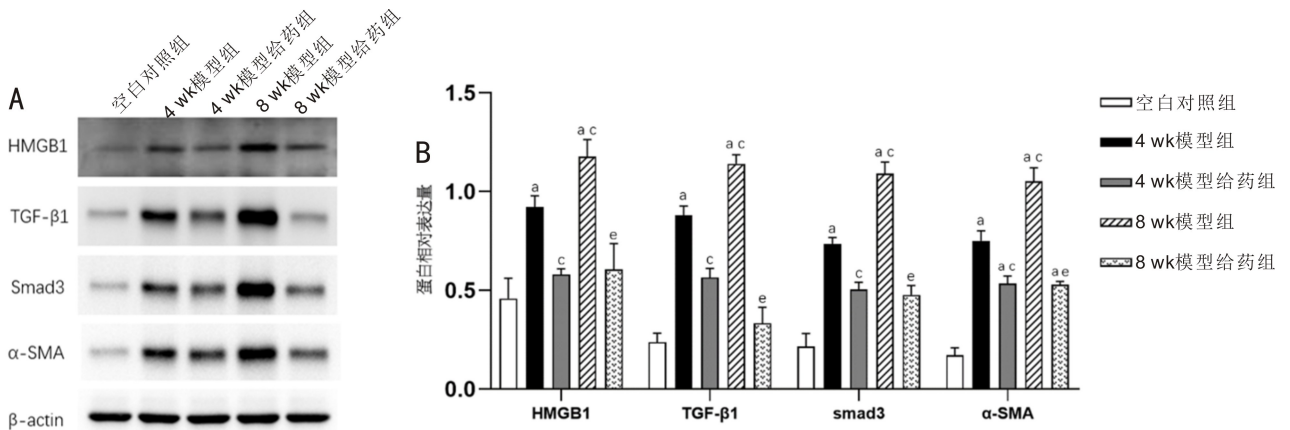


图6 Western blot 检测结膜组织中相关蛋白的相对表达水平 A: Western blot 检测结果; B: 各组相关蛋白表达水平比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 4 wk 模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 8 wk 模型组。

炎症反应<sup>[16]</sup>,特别是 HMGB1 的释放还参与多种组织修复过程<sup>[10-11]</sup>。本研究中 HE 和 Masson 染色结果显示模型组相比空白对照组均发生明显瘢痕化,模型给药组较同时期模型组瘢痕化程度明显减轻,结果证明结膜下植入硅胶块后导致瘢痕化,造模效果明显,术后应用 5-Fu 起到了明显的抗瘢痕化作用,4、8 wk 模型组结膜组织中 HMGB1 mRNA 及蛋白表达水平均上升,且 8 wk 模型组瘢痕化程度和结膜组织中 HMGB1 表达水平明显高于 4 wk 模型组。本研究进一步进行 Pearson 相关性分析发现,4、8 wk 模型组结膜组织中 HMGB1 的表达水平与成纤维细胞的增生数量呈正相关,推测 HMGB1 的表达与术后瘢痕化密切相关。

瘢痕化可视为细胞层面上的纤维化,α-SMA 作为肌成纤维细胞的标志蛋白,可准确反映组织瘢痕化的程度<sup>[17]</sup>。TGF-β/Smad 信号通路在纤维化过程中起到关键调控作用<sup>[18-19]</sup>,TGF-β 作为纤维化相关因子,可诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,进一步导致瘢痕形成,在细胞增殖和伤口愈合过程中具有调节作用<sup>[20]</sup>。研究表明,炎症因子 TGF-β 是导致滤过通道阻塞从而严重影响手术成功率的主要因素,且 TGF-β 还与术后眼压水平密切相关<sup>[21-22]</sup>。本研究结果显示,模型组结膜组织中 TGF-β1、Smad3、α-SMA mRNA 及蛋白表达水平显著高于空白对照组,同时瘢痕化程度亦明显加重,4、8wk 模型给药组与同时期模型组相比瘢痕化程度减轻,结膜组织中 TGF-β1、Smad3、α-SMA 的表达水平也同样下降,提示 TGF-β/Smad 信号通路在青光眼引流阀植入术后瘢痕化中起到重要作用。

近年研究表明, HMGB1 可能通过 TGF-β/Smad 信号

通路参与肺纤维化的发生发展<sup>[23]</sup>,还可能通过 HMGB1/TLR4/Smad 信号通路参与 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝脏纤维化的发生发展<sup>[24]</sup>,这些病理过程与引流阀植入术后的瘢痕化过程相似。本研究发现, HMGB1 mRNA 表达水平出现上升或下降时,同时期 TGF-β1、Smad3 的表达水平也随之呈现相同的变化,进一步进行 Pearson 相关性分析显示, HMGB1 与 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达水平具有相关性,初步证明 HMGB1 可能通过 TGF-β/Smad 这一经典信号通路参与青光眼术后瘢痕化的发展。而应用抗代谢药物 5-Fu 后, HMGB1 mRNA 和蛋白表达均下降, TGF-β1、Smad3 亦存在此种现象,进一步推测 5-Fu 在术后一段时间内可能通过影响 HMGB1 的表达干预 TGF-β/Smad 通路的表达。然而,本研究尚存在不足之处:(1) 样本量不足及造模时间短,未能延长造模时间以达到更远期的瘢痕化效果;(2) 本研究中所造模型是对青光眼引流阀植入术后结膜囊组织生理状态的初步模拟,未考虑引流阀的房水引流冲刷对组织的影响,后续将建立更为精细的引流阀模型,进一步探究瘢痕化的机制;(3) 未能在体外实验中对 HMGB1 进行过表达或敲低实验,明确 HMGB1 对 TGF-β/Smad 通路的具体影响机制。

综上所述,本研究表明, HMGB1、TGF-β1、Smad3、α-SMA 的表达水平在模型组结膜组织中随时间延长明显升高,且 HMGB1 的表达与成纤维细胞增生呈正相关性。5-Fu 应用后组织瘢痕化明显下降,模型给药组结膜组织中 HMGB1、TGF-β1、Smad3、α-SMA 的表达亦明显下降,模型组和模型给药组结膜组织中 HMGB1 的表达与 TGF-β1、Smad3 的表达存在相关性。以上结果提示,在青

光眼引流阀植入术后使用 5-Fu 可起到抗瘢痕化作用; HMGB1 在引流阀植入术后具有致瘢痕化的作用; 初步证实 HMGB1 通过 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路参与瘢痕化的发展。考虑到使用 5-Fu 等抗代谢药物的诸多临床副作用, 抑制 HMGB1 的表达可能成为青光眼引流阀植入术后抗瘢痕化治疗的新思路。

#### 参考文献

[1] Kyari F, Entekume G, Rabi M, et al. A Population-based survey of the prevalence and types of glaucoma in Nigeria: results from the Nigeria National Blindness and Visual Impairment Survey. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15:176.

[2] 中华医学会眼科学分会青光眼学组. 中国青光眼引流阀植入手术操作专家共识(2019年2版). *中华眼科杂志*, 2019, 55(2):93-97.

[3] Soebijantoro I, Noor NA. Tube length adjustment and tube trimming technique in refractory glaucoma. *Case Rep Ophthalmol Med*, 2020, 2020:8889448.

[4] 谢瞻, 刘庆淮, 杨勤. 改良的 Ahmed 青光眼引流阀植入术治疗难治性青光眼的疗效. *国际眼科杂志*, 2019, 19(9):1590-1593.

[5] Ong SC, Aquino MC, Chew P, et al. Surgical outcomes of a second Ahmed glaucoma valve implantation in Asian eyes with refractory glaucoma. *J Ophthalmol*, 2020, 2020:8741301.

[6] Bayoumi NH. Mitomycin C in filtering surgery for primary congenital glaucoma: a comparison of exposure durations. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2018, 55(3):164-170.

[7] Yamanaka O, Kitano-Izutani A, Tomoyose K, et al. Pathobiology of wound healing after glaucoma filtration surgery. *BMC Ophthalmol*, 2015, 15(Suppl 1):157.

[8] 张康玉, 蒋正轩, 陶黎明, 等. IL-10 在青光眼引流物材料植入术后瘢痕组织中的动态表达. *国际眼科杂志*, 2022, 22(4):549-553.

[9] Ye L, Gao L, Cheng HW. Inflammatory profiles of the interleukin family and network in cerebral hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(7):1321-1333.

[10] Lee G, Espirito Santo AI, Zwingerberger S, et al. Fully reduced HMGB1 accelerates the regeneration of multiple tissues by transitioning stem cells to  $G_{Alet}$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(19):E4463-E4472.

[11] Tirone M, Tran NL, Ceriotti C, et al. High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *J Exp Med*, 2018, 215(1):303-318.

[12] Wang J, Harris A, Prendes MA, et al. Targeting transforming growth factor- $\beta$  signaling in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma*, 2017, 26(4):390-395.

[13] Riva I, Roberti G, Oddone F, et al. Ahmed glaucoma valve implant: surgical technique and complications. *Clin Ophthalmol*, 2017, 11:357-367.

[14] Gessesse GW. The Ahmed glaucoma valve in refractory glaucoma: experiences in southwest Ethiopia. *Ethiop J Health Sci*, 2015, 25(3):267-272.

[15] Choo JQH, Chen ZD, Koh V, et al. Outcomes and complications of Ahmed tube implantation in Asian eyes. *J Glaucoma*, 2018, 27(8):733-738.

[16] Wang SM, Zhang Y. HMGB1 in inflammation and cancer. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):116.

[17] Muchaneta-Kubara EC, el Nahas AM. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant*, 1997, 12(5):904-915.

[18] Arslan S, Aydemir O, Güler M, et al. Modulation of postoperative scarring with tacrolimus and octreotide in experimental glaucoma filtration surgery. *Curr Eye Res*, 2012, 37(3):228-233.

[19] David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF $\beta$  action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(7):419-435.

[20] Nettesheim A, Shim MS, Hirt J, et al. Transcriptome analysis reveals autophagy as regulator of TGF $\beta$ /Smad-induced fibrogenesis in trabecular meshwork cells. *Sci Rep*, 2019, 9(1):16092.

[21] Cheng WS, Chen CL, Chen JT, et al. AR12286 alleviates TGF- $\beta$ -related myofibroblast transdifferentiation and reduces fibrosis after glaucoma filtration surgery. *Molecules*, 2020, 25(19):4422.

[22] 马严, 晏维玲, 杨卫华, 等. 双眼慢性原发性闭角型青光眼术前房水中炎症因子的表达及其对预后的影响. *国际眼科杂志*, 2023, 23(4):630-633.

[23] Li LC, Li DL, Xu L, et al. High-mobility group box 1 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis involving transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 354(3):302-309.

[24] Wan CH, Gu TY, Ling JY, et al. Perfluorooctane sulfonate aggravates  $CCl_4$ -induced hepatic fibrosis via HMGB1/TLR4/smad signaling. *Environ Toxicol*, 2022, 37(5):983-994.