

富组氨酸糖蛋白在大鼠糖尿病视网膜病变新生血管形成中的作用

冉启艳¹, 何俊豪¹, 吴杰¹, 叶萌¹, 吴煜豪¹, 谭薇¹, 陈强²

引用:冉启艳,何俊豪,吴杰,等.富组氨酸糖蛋白在大鼠糖尿病视网膜病变新生血管形成中的作用.国际眼科杂志,2024,24(12):1873-1881.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82160200);贵州省科技计划项目{No.黔科合基础-ZK[2024]重点086};遵义市科技计划项目{No.遵市科合HZ(2022)58号};遵义医科大学研究生科研基金立项课题(No.ZYK147)

作者单位:¹(563000)中国贵州省遵义市,遵义医科大学第三附属医院遵义市眼科临床医学中心;²(563006)中国贵州省遵义市,遵义医科大学

作者简介:冉启艳,女,硕士,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:谭薇,女,毕业于中国人民解放军第三军医大学,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:青光眼、视网膜疾病。tanwei950118@sina.com

收稿日期:2024-04-12 修回日期:2024-11-01

摘要

目的:探讨富组氨酸糖蛋白(HRG)在大鼠糖尿病视网膜病变新生血管形成中的作用。

方法:建立链脉佐菌素(STZ)诱导的SD大鼠糖尿病模型,蛋白免疫印迹法(WB)检测正常(WT)组、糖尿病(DM)组视网膜中HRG、血管生成因子(VEGF)的蛋白表达情况。转染HRG小干扰RNA低表达序列,WB验证在高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(hRMECs)中HRG的蛋白表达情况,选择最佳si-HRG#298序列用于后续实验。动物实验通过腺相关病毒载体沉默HRG,玻璃体腔注射HRG空载体对照组(AAV2-sh-NC)及HRG基因沉默组(AAV2-sh-HRG#298),WB验证HRG的蛋白表达情况后,通过HE染色观察各组视网膜结构变化,PAS染色观察各组视网膜新生血管变化情况,WB检测各组HRG及VEGF的蛋白表达情况。

结果:HE染色发现DM组大鼠视网膜结构出现紊乱,神经节细胞层细胞数量减少,内核层和外核层细胞数量减少,视网膜总厚度也减少($P<0.05$);PAS染色观察DM组大鼠视网膜中无细胞毛细血管明显增多($P<0.05$);DM组大鼠视网膜中HRG及血管生成因子VEGF的蛋白表达上调($P<0.05$);高糖诱导的hRMECs中转染HRG后其蛋白表达明显下调($P<0.05$);HRG基因沉默可以抑制糖尿病视网膜病变的新生血管形成,下调VEGF的蛋白表达($P<0.05$)。

结论:HRG促进糖尿病大鼠视网膜的新生血管形成,HRG基因沉默可以抑制其新生血管形成。

关键词:糖尿病视网膜病变;富组氨酸糖蛋白;新生血管形成;基因沉默

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.12.03

Role of histidine-rich glycoproteins in the neovascularization of diabetic retinopathy in rats

Ran Qiyang¹, He Junhao¹, Wu Jie¹, Ye Meng¹, Wu Yuhao¹, Tan Wei¹, Chen Qiang²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.82160200); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project {No.Guizhou Kehe Foundation-ZK[2024] Key 086}; Zunyi Science and Technology Plan Project Contract {No.Zunshi Kehe HZ (2022) 58}; Zunyi Medical University Graduate Research Fund (No.ZYK147)

¹The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; Zunyi City Ophthalmology Clinical Medicine Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou Province, China

Correspondence to: Tan Wei. The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; Zunyi City Ophthalmology Clinical Medicine Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. tanwei950118@sina.com

Received:2024-04-12 Accepted:2024-11-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the role of histidine-rich glycoprotein (HRG) in the neovascularization of diabetic retinopathy in rats.

• **METHODS:** Streptozocin (STZ)-induced diabetic Sprague-Dawley (SD) rats were utilized as an experimental model, the protein expression of HRG and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinas of normal (Wild type, WT) and diabetic (diabetic mellitus, DM) groups was detected using Western blot (WB). The protein expression of HRG in high-glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells (hRMECs) was verified by WB after transfection with HRG small interfering RNA (siRNA) low-expression sequences. The optimal si-HRG # 298 sequence was selected for further experiments. In the animal experiment, HRG gene silencing was achieved using an adeno-associated virus (AAV) vector, with AAV2-sh-NC and AAV2-sh-HRG#298 serving as the HRG gene silencing group and the HRG empty vector control group, respectively. The protein expression of HRG and VEGF in each group was then detected by WB following the verification of HRG protein expression. Retinal structural changes were observed by HE staining, and

neovascularization changes were observed by PAS staining.

• **RESULTS:** HE staining found that the retinal structure in the DM group was disordered, the number of cells in the ganglion cell layer decreased, the number of cells in the inner and outer nuclear layers decreased, and the total retinal thickness also decreased ($P < 0.05$); cellular capillaries were significantly increased in DM rats observed by PAS staining ($P < 0.05$); the protein expression of HRG and angiogenesis factor VEGF was up-regulated in the retina of DM group ($P < 0.05$); the protein expression of HRG was significantly downregulated in high glucose-induced hRMECs ($P < 0.05$); the inhibition of neovascularization in diabetic retinas and the downregulation of VEGF protein expression were achieved through HRG gene silencing ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** HRG promotes neovascularization in the retinas of diabetic rats, and HRG gene silencing can inhibit neovascularization.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; histidine - rich glycoprotein; neovascularization; gene silencing

Citation: Ran QY, He JH, Wu J, et al. Role of histidine-rich glycoproteins in the neovascularization of diabetic retinopathy in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(12):1873-1881.

0 引言

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是以高血糖为特征的慢性代谢性疾病,长期持续性高血糖对微血管和大血管造成严重性的损害,特别发生在眼、肾、心脏等器官^[1]。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是 DM 微血管并发症中最严重的一种,是导致工作年龄人群视力损害和失明的主要原因^[2]。根据最新国际糖尿病联合会估计,2030年将有 6.43 亿成年人患有 DM,2045 年将有 7.83 亿成年人患有 DM,预计至 2045 年约有 1.6 亿人会受到 DR 的影响^[3]。DR 患者早期通常无症状,随着病情的进展视力进一步下降。近年来 DR 按发展阶段和严重程度的不同,临床分为非增殖型糖尿病视网膜病变 (non-proliferative diabetes retinopathy, NPDR) 和增殖型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetes retinopathy, PDR)^[4]。其中,视网膜新生血管形成是 PDR 主要的病理改变,例如出现糖尿病性黄斑水肿、玻璃体积血、牵拉性视网膜脱离等,进而导致严重的视功能损害^[5]。DR 患者早期治疗主要依赖血糖水平的控制,血管病变严重则需要行视网膜激光光凝术,药物治疗及手术治疗,其中药物治疗抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 类药物可有效改善视网膜屏障功能、促进新生血管的消退,但是,目前抗 VEGF 治疗仍然面临着困难,如视力改善效果不显著,需要多次抗 VEGF 治疗,治疗后可能发生视野缩小及视力下降^[6]。因此,探究 DR 的发病机制及寻求新的治疗方法的意義非常重要。

高糖环境下出现视网膜缺血、缺氧、视网膜血管通透性增加和血视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 破坏,这些过程导致视网膜微血管内皮细胞 (retinal microvascular endothelial cells, RMECs) 不受控制的增殖、

迁移及毛细血管的形成,最终导致视网膜新生血管形成^[7-8]。PDR 是 DR 的晚期,其特征是出现视网膜中新生血管形成可导致出血、黄斑水肿^[9]。PDR 的发病机制与晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 的积聚密切相关,AGEs 可激活 AGEs 受体,促进 PDR 的进展^[10]。这种激活会触发内皮细胞增殖、血管生成和促血管生成基因表达的增加,包括 VEGF、血管内皮细胞生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、血管生成素 1 和 2、血小板衍生生长因子和成纤维细胞生长因子^[11]。长期高血糖状态,毛细血管灌注受损,导致视网膜缺血、缺氧,促血管生成因子 VEGF 上调与抗血管生成因子平衡失调^[12-13],VEGF 上调主要通过激活内皮细胞表达的 VEGF-2 来协调血管生成^[14]。

富组氨酸糖蛋白 (histidine-rich glycoprotein, HRG) 是一种由肝细胞合成的 75 kDa 糖蛋白质,在血浆中以相对较高的浓度 (100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在^[15],HRG 也称为富含组氨酸脯氨酸的糖蛋白 (histidine-proline-rich glycoprotein, HPRG) 是一种在许多脊椎动物的血浆中发现的蛋白质,包括在人、牛、鸡、兔子和小鼠^[16]。HRG 分子量为 67 000 的单链糖蛋白,由 507 个氨基酸残基组成,其属于胱抑素超家族的蛋白,如胎球蛋白和激肽原。HRG 是一种多结构域多肽,由 N 末端的两个胱抑素样区域、一个富含组氨酸的区域和两个富含脯氨酸的区域和一个 C 末端结构域组成。HRG 具有多结构域结构与肝素、磷脂、纤溶酶原、纤维蛋白原、免疫球蛋白 G、C1q、血红素和 Zn^{2+} 配体相互作用^[17],同时,HRG 可以作为接头分子发挥作用并调节许多重要的生物过程,例如病原体清除、细胞黏附、血管生成、凝血和纤维蛋白溶解^[18-19]。据报道,在第二次发生视网膜静脉阻塞中发现 HRG 表达增高,提示 HRG 可能是眼部血管并发症的一个危险因素^[20],也研究表明 microRNA-23a 调控的乳腺组织中 HRG 在乳腺癌中表达促进血管生成^[21]。VEGF 是 DR 血管生成的关键因子,因此,推测 HRG 是否通过 VEGF 促进 DR 新生血管形成的作用,目前尚不清楚。

综上所述,我们进一步在 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜组织中检测 HRG 的蛋白表达情况,发现在糖尿病大鼠视网膜组织中 HRG 的蛋白表达升高。基于以上实验结果及分析,我们提出科学假说:推测 HRG 可能在 DR 的发病机制中扮演着重要角色。因此,本研究通过体内实验初步探讨 HRG 在 DR 新生血管形成的作用,为探讨 DR 发生发展的分子机制提供一定的参考意义,为 DR 治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **细胞** 人视网膜微血管内皮细胞 (hRMECs) 购买于北京北纳生物公司 (编号:BNCC363743)。

1.1.2 **动物** 8 周龄的雄性 SD 大鼠 (体质量约 240-300 g) 购自于遵义医科大学动物实验中心,实验动物的生产许可证号:SCXK (黔) 2021-0002,实验动物使用许可证号:SCXK (黔) 2021-0004。实验动物均遵守 ARVO 眼科和视觉研究中心动物使用说明。遵义医科大学第三附属医院动物实验伦理委员会意见:研究内容和实验方案遵循动物

福利和伦理原则,符合伦理规范要求[编号:伦申(2023)-2-175号]。

1.1.3 主要试剂与仪器 HRG 干扰片段、HRG 腺相关病毒购自吉玛基因,HRG、VEGF 多克隆抗体购自中国武汉三鹰公司,Gibco DMEM 培养基购自 Gibco 公司,BI 胎牛血清购自以色列 Biological industries 公司,胰酶-EDTA 消化液(0.25%胰酶,含酚红)购自南京生航生物技术有限公司,改进型柠檬酸钠抗原修复液(50×)、抗荧光淬灭剂购自碧云天公司,链脲佐菌素、胰蛋白酶 1:250、糖原 PAS 染色液购自北京 Solarbio 公司,双色预染蛋白 Marker 10-250 kD、Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒、PAGE 凝胶制备试剂盒(升级版)购自上海雅酶生物医药科技有限公司,33 G 微量注射器购自美国 Hamilton 公司,显微镜购自日本 Olympus 公司,凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 根据制造商的方案进行培养 hRMECs,所有细胞均在含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基在温度为 37 °C、5% CO₂、湿度 95 培养箱中培养。显微镜下观察细胞数量达到 80%可进行传代,HBSS 洗涤后使用 0.05%胰酶将内皮细胞从培养瓶中消化,并重悬于 DMEM 培养基中,细胞传至 3 到 6 代后进行细胞实验。

1.2.2 细胞转染

1.2.2.1 siRNA 构建与合成 HRG 小干扰 RNA 序列由上海吉玛基因生物公司设计并合成(表 1)。

1.2.2.2 HRG-siRNA 转染 hRMECs 以 3×10^5 /L 接种于 6 孔板中,孵育 24 h 后进行转染。正常糖浓度对照(normal glucose, NG)组只用 5 mmol/L 的糖浓度处理、高糖浓度对照(high glucose, HG)组加入 Lipo2000 试剂 24 h 后用 30 mmol/L 的糖浓度处理、沉默对照组(HG+si-NC):加入 HRG 沉默对照序列和 Lipo2000 复合物 24 h 后用 30 mmol/L 的糖浓度处理、HRG 基因沉默序列 117 组(HG+si-HRG#117):加入 si-HRG#117 序列和 Lipo2000 复合物 24 h 后用 30 mmol/L 的糖浓度处理、HRG 基因沉默序列 298 组(HG+si-HRG#298)加入 si-HRG#298 序列和 Lipo2000 复合物 24 h 后用 30 mmol/L 的糖浓度处理、HRG 基因沉默序列 440 组(HG+si-HRG#440)加入 si-HRG#440 序列和 Lipo2000 复合物 24 h 后用 30 mmol/L 的糖浓度处理。

1.2.3 SD 大鼠糖尿病造模 (1)选择雄性约 8 周龄的 SD 大鼠 30 只(体质量约 240-300 g),SD 大鼠饲养在 12 h 光照/黑暗循环下,温度为 23 ± 2 °C,湿度为 $50\% \pm 5\%$,建模前随机将 SD 大鼠分为正常对照(WT)组 6 只和糖尿病(DM)组 24 只。WT 组普通饲料喂养,DM 组高脂、高糖饲料喂养,4 wk 后禁食、不禁水 12 h,正常对照组行腹腔内注射等量的 STZ 的溶剂柠檬酸钠缓冲液,DM 组按照 STZ 40 mg/kg 溶解于 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中(pH 4.5)单次行腹腔内注射可诱发 2 型糖尿病,注射后 72 h 开始从大鼠尾静脉取血检测血糖以及称量体质量,每周检测 1 次,连续 4 wk 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,提示造模成功。(2)造模结束时,剔除造模组血糖低于 16.7 mmol/L 及血糖恢复的共有 2 只,死亡的 4 只,剩余 18 只造模成功。实验分组:分为四个组每组 6 只:WT 组、DM 组、DM+HRG 空载体对照组、DM+HRG 基因沉默组。

表 1 siRNA 干扰序列

siRNA 片段名称	HRG 引物序列(5'-3')
si-HRG#117	S: CUCUAGACCUGAUCAAUAATT AS: UUAUUGAUCAGGUCUAGAGTT
si-HRG#298	S: CAGACGUCCAUCUGAAAUAATT AS: UAUUUCAGAUGGACGUCUGTT
si-HRG#440	S: CCGGUCCUCAUAGAUUUCUTT AS: AGAAAUCUAUGAGGACCGGTT

1.2.4 玻璃体腔注射 HRG 腺相关病毒载体 根据细胞实验筛选出最佳 si-HRG#298 序列用于后续实验,通过吉玛基因公司构建腺相关病毒载体沉默 si-HRG#298 序列,得到空载体对照 AAV2-GP-1-NC(以下简称 AAV2-sh-NC)及 HRG-homo-298 载体(以下简称 AAV2-sh-HRG#298)。糖尿病大鼠通过玻璃体腔注射病毒,分为 DM+AAV2-sh-NC 组和 DM+AAV2-sh-HRG#298 组。按照体质量 30 mg/kg 注射氯胺酮进行全身麻醉,眼表用盐酸丙美卡因滴眼液局部麻醉,复方托吡卡胺滴眼液散瞳,准备好之后开始注射 HRG 腺相关病毒,选择 Hamilton 微量注射器(33 G)于糖尿病大鼠眼球角巩膜缘后进针,针头进入玻璃体后,左眼注射体积为 0.5 μ L、滴度为 1.16×10^{12} V.G/mL AAV2-sh-NC 空载体对照,右眼注射体积为 0.5 μ L、滴度为 1.90×10^{12} V.G/mL AAV2-sh-HRG#298 载体。4 wk 后提取视网膜组织,通过 WB 验证 HRG 基因沉默的转染效率,8 wk 后通过 HE 染色观察各组视网膜结构变化,PAS 染色观察各组视网膜新生血管变化情况,WB 检测各组 HRG 及血管生成因子 VEGF 的蛋白表达情况。

1.2.5 视网膜组织石蜡切片 HE 染色 将切片好的视网膜组织首先进行脱蜡二甲苯 I,4 min→二甲苯 II,2 min→二甲苯 III,2 min→100%无水乙醇 I,3 min→100%无水乙醇 II,3 min→70%无水乙醇 2 min→流动水 5 min;再进行 HE 染色苏木素 5 min→流动水 2 min→分化液 0.74 min→流动水 1 min→返蓝液 1 min→流动水 1 min→80%无水乙醇 1 min→伊红 1 min→95%无水乙醇 2 min→100%无水乙醇 I,2 min→100%无水乙醇 II,2 min→二甲苯 I,2 min→二甲苯 II,2 min→二甲苯 III,2 min,最后中性树脂封片显微镜下观察。

1.2.6 石蜡切片免疫荧光 将切片好的视网膜组织进行脱蜡后,配制 1×柠檬酸抗原修复液于 99 °C 中预热 20 min,将组织玻片放入预热的抗原修复液在 99 °C 水浴锅煮 20 min,取出后自然冷却用 PBS 在摇床上清洗 3 次,每次 5 min 后,再放入配制好的 0.5% Triton,通透 10 min 后用 PBS 在摇床上清洗 3 次,每次 5 min;再免疫组化笔在组织周围画圈用 3% BSA 室温封闭 1 h,弃掉 BSA 后滴加一抗于组织表面,放置于 4 °C 冰箱过夜;再回收一抗后用 PBS 在摇床上清洗 3 次,每次 5 min 后;避光滴加二抗于组织表面,在 37 °C 水浴锅中孵育 1h,弃掉二抗后避光用 PBS 在摇床上清洗 3 次,每次 5 min;最后滴加含荧光淬灭剂 DAPI 后封片在荧光显微镜下观察。

1.2.7 视网膜胰蛋白酶消化和 PAS 染色 SD 大鼠行过量麻醉药安乐死后摘除眼球,标本放置于 10%中性福尔马林中,并固定 24 h 以上后用 PBS 缓冲液冲洗眼球 3 次,放置于 PBS 缓冲液的培养皿中,在显微镜下剪出角膜、虹膜、晶状体等组织,慢慢分离出视网膜组织。再将分离好

的视网膜组织放于12孔板中,加入800 μL的水,每30 min换水一次,至少4次后水中过夜后吸出水,加入3%胰蛋白酶溶液消化视网膜,在温度为37℃下轻轻摇动。观察到视网膜组织开始出现崩解现象时结束消化,吸出胰蛋白酶溶液,从视网膜组织中将血管分离出来置于载玻片,晾干后氧化剂处理10 min,流动水冲洗5 min,吸出载玻片上多余的水,滴加Schiff染色液染色15 min,再流动水冲洗5 min后,常规完成脱水,二甲苯透明,最后用中性树脂封片,显微镜下观察。

统计学分析:使用Image J 1.8.0软件分析实验图片资料,GraphPad Prism 8软件进行数据统计分析及作图。满足正态分布的计量资料用均数±标准($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),若数据不满足正态性,则采用秩和检验(mann-whitney), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立 STZ 诱导的 SD 大鼠糖尿病模型 本实验选择

雄性约8周龄的SD大鼠,WT组普通饲料喂养,DM组高脂、高糖饲料喂养,4 wk后禁食、不禁水12 h,WT组行腹腔注射等量的STZ的溶剂柠檬酸钠缓冲液,与WT组大鼠相比,腹腔注射STZ后SD大鼠体质量下降,血糖升高 ≥ 16.7 mmol/L,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表2,图1A、B。观察SD大鼠造模期间饮水饮食及尿量均有增加,结果提示2型糖尿病大鼠造模成功。通过HE染色观察视网膜组织结构,WT组大鼠视网膜各层结构清楚,排列规整,神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)排列有序,内核层(inner nuclear layer, INL)和外核层(outer nuclear layer, ONL)细胞紧密有序;DM组中视网膜结构出现紊乱,GCL细胞数量减少,INL和ONL细胞数量减少,视网膜总厚度也减少(图1C-E),通过PAS染色观察DM组大鼠视网膜中无细胞毛细血管与WT组相比明显增多(图1F、G),说明糖尿病大鼠中有视网膜新生血管形成,以上结果提示STZ诱导SD大鼠符合2型糖尿病大鼠DR病理变化。

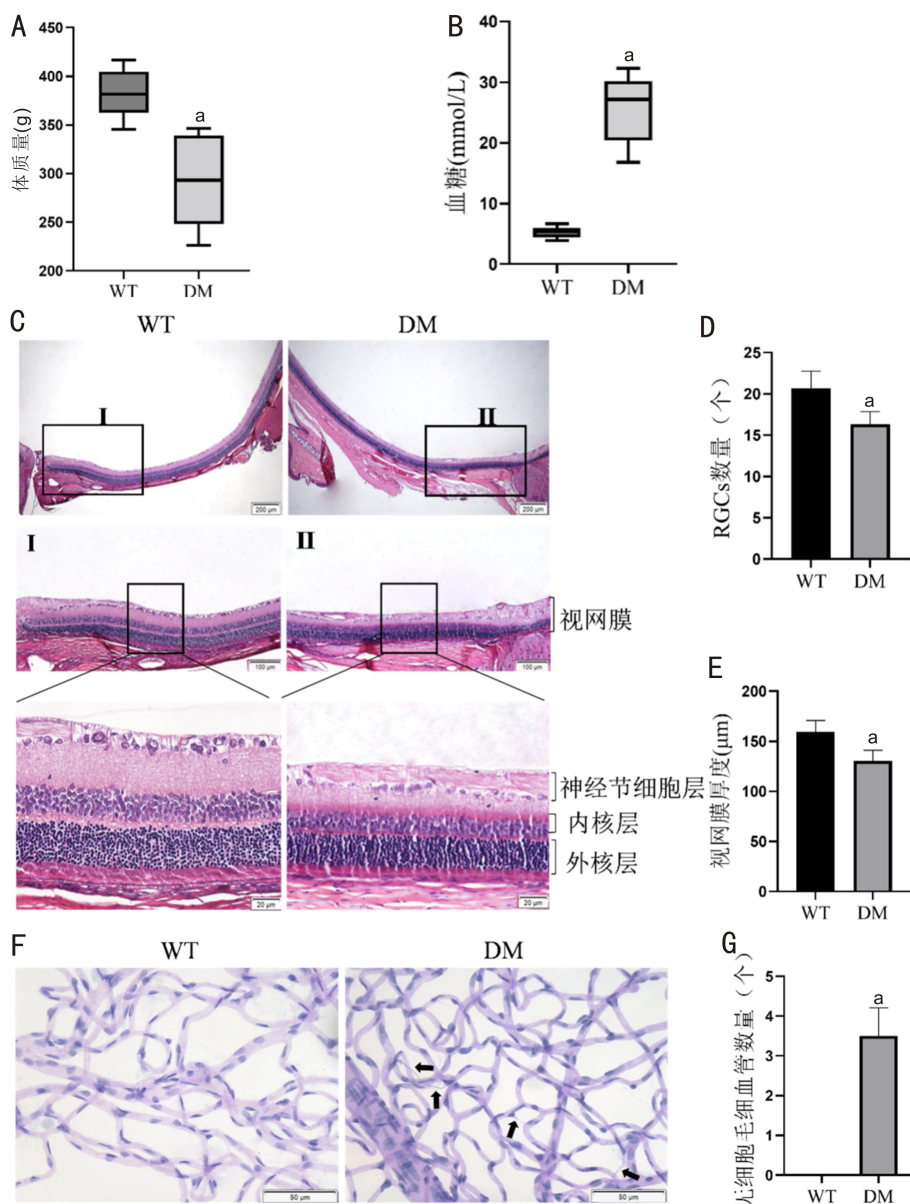


图1 建立STZ诱导的SD大鼠糖尿病模型 A:各组大鼠体质量比较($n=6$);B:各组大鼠血糖比较($n=6$);C:HE染色检测各组大鼠视网膜组织结构($n=3$);D:各组大鼠视网膜中RGCs数量统计; $^a P < 0.05$ vs WT组($n=3$);E:各组大鼠视网膜总厚度统计; $^a P < 0.05$ vs WT组($n=3$);F:PAS染色观察各组大鼠视网膜中无细胞毛细血管数量(黑色箭头所指示)($n=3$);G:各组大鼠视网膜中无细胞毛细血管的数量统计; $^a P < 0.05$ vs WT组($n=3$);WT:正常对照组;DM:糖尿病组。

2.2 糖尿病大鼠视网膜组织中 HRG 及 VEGF 的蛋白表达情况 为验证 HRG 在体内动物实验糖尿病大鼠视网膜中表达情况,通过 WB 检测 HRG、VEGF 的蛋白表达情况,与 WT 组相比,DM 组 HRG、VEGF 的蛋白呈高表达(图 2A-C);采用 IF 检测 HRG 在视网膜中的表达情况,与 WT 组相比,DM 组中 HRG 表达增高(图 2D、E)。结果提示糖尿病大鼠视网膜组织中 HRG 及 VEGF 的蛋白表达上调。

2.3 糖尿病大鼠通过腺相关病毒载体沉默 HRG 情况 上述体内实验结果提示 HRG 在糖尿病大鼠中呈高表达,为了进一步明确 HRG 的蛋白表达水平与 DR 新生血管形成的关系,我们构建了低表达 HRG 的细胞系。在 hRMECs 中转染三组 HRG 小干扰 RNA 片段(si-HRG#117、si-HRG#298、si-HRG#440) 24 h 后,用 30 mmol/L 的糖浓度处理 hRMECs 48 h,通过 WB 检测其干扰效率,与 HG+si-NC 组相比,发现 HRG 基因沉默后蛋白表达明显下调(图 3A、B),结果提示我们成功设计 HRG 小干扰片段低表达。因此,我们选择其中一对 HRG 干扰序列 298 (si-HRG#298)用于构建腺相关病毒载体沉默 HRG。

我们通过腺相关病毒载体沉默 HRG 在糖尿病大鼠中右眼注射 AAV2-sh-HRG#298,左眼注射 AAV2-sh-NC 空载体作为对照。4 wk 后提取视网膜组织,通过 WB 检测 HRG 的蛋白表达效果,与 DM+AAV-sh-NC 相比,我们通

表 2 两组大鼠体质量及血糖比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体质量(g)	血糖(mmol/L)
WT 组	382.5±24.9	5.1±1.0
DM 组	292.04±50.7	25.8±5.6
<i>t</i>	3.923	8.784
<i>P</i>	<0.05	<0.05

注:WT 组为 SD 大鼠普通饲料喂养后腹腔内注射等量的 STZ 的溶剂柠檬酸钠缓冲液。

过腺相关病毒载体沉默 HRG 后蛋白表达明显降低(图 3C、D),我们也采用 IF 检测视网膜组织中的 HRG 与 DM+AAV2-sh-NC 相比,腺相关病毒载体沉默 HRG 后表达明显降低(图 3E、F)。以上结果提示我们成功构建腺相关病毒载体沉默 HRG,可用于后续实验。

接下来为验证腺相关病毒载体沉默 HRG 是否会影响正常视网膜组织结构,在大鼠中右眼注射 AAV2-sh-HRG #298,左眼注射 AAV2-sh-NC 空载体作为对照。4 wk 后提取视网膜组织,通过 HE 染色观察视网膜结构,WT+AAV2-sh-NC 组与 WT+AAV2-sh-HRG#298 两组中大鼠视网膜各层结构清楚,GCL、INL 和 ONL 细胞排列有序,两组间视网膜无明显差异(图 3G-I)。结果提示在大鼠中注射腺相关病毒载体沉默 HRG 对正常视网膜结构没有影响。

2.4 HRG 基因沉默抑制糖尿病大鼠视网膜的新生血管形成情况 为探讨 HRG 在体内对糖尿病大鼠视网膜新生血管形成的影响,我们在糖尿病大鼠中右眼注射 AAV2-sh-HRG#298,左眼注射 AAV2-sh-NC 空载体作为对照。8 wk 后通过 HE 染色观察视网膜组织结构,与 DM+AAV2-sh-NC 组相比,DM+AAV2-sh-HRG#298 组中 GCL、INL 和 ONL 细胞排列有序、视网膜层未见明显萎缩(图 4A-C)。通过 PAS 染色观察 HRG 基因沉默对糖尿病大鼠视网膜新生血管形成的影响,与 DM+AAV2-sh-NC 组相比,HRG 基因沉默后糖尿病大鼠视网膜无细胞毛细血管明显减少(图 4D、E)。以上结果提示 HRG 基因沉默可以保护视网膜组织,防止其发生萎缩,并抑制糖尿病大鼠视网膜新生血管的形成。

2.5 HRG 基因沉默下调糖尿病大鼠视网膜中血管生成因子 VEGF 的蛋白表达情况 为进一步探讨 HRG 在体内糖尿病大鼠中对血管生成因子 VEGF 的影响,我们在糖尿病

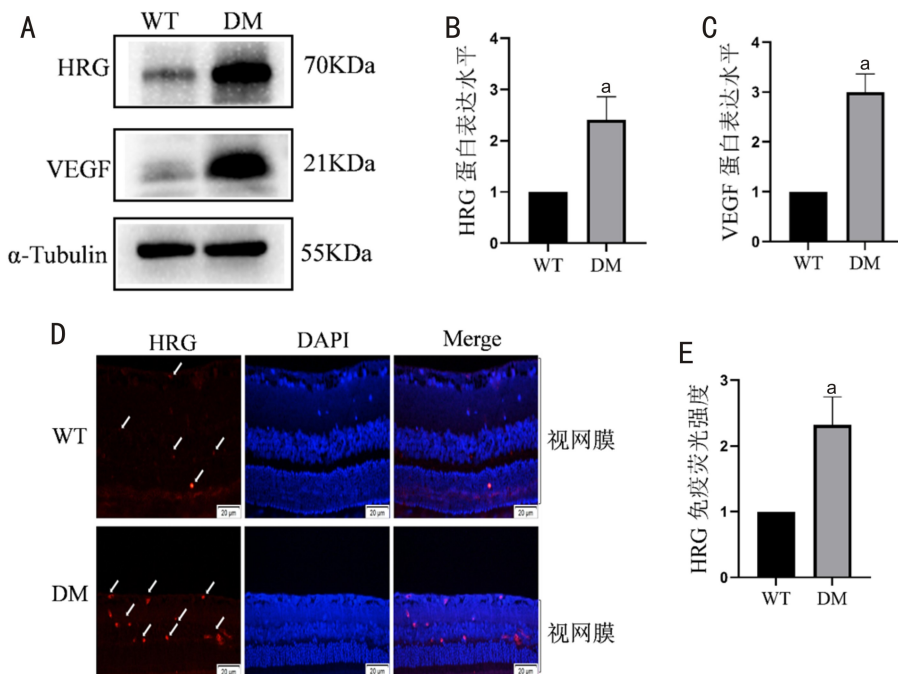


图 2 糖尿病大鼠视网膜组织中 HRG 及 VEGF 的蛋白表达情况 A:WB 检测各组大鼠 HRG 和 VEGF 的蛋白表达情况;B:HRG 的蛋白灰度值统计;^a*P*<0.05 vs WT 组 (*n*=3);C:VEGF 的蛋白灰度值统计;^a*P*<0.05 vs WT 组 (*n*=3);D:IF 检测 HRG 在视网膜组织表达情况;E:HRG 免疫荧光强度统计;^a*P*<0.05 vs WT 组 (*n*=3);WT:正常对照组;DM:糖尿病组。

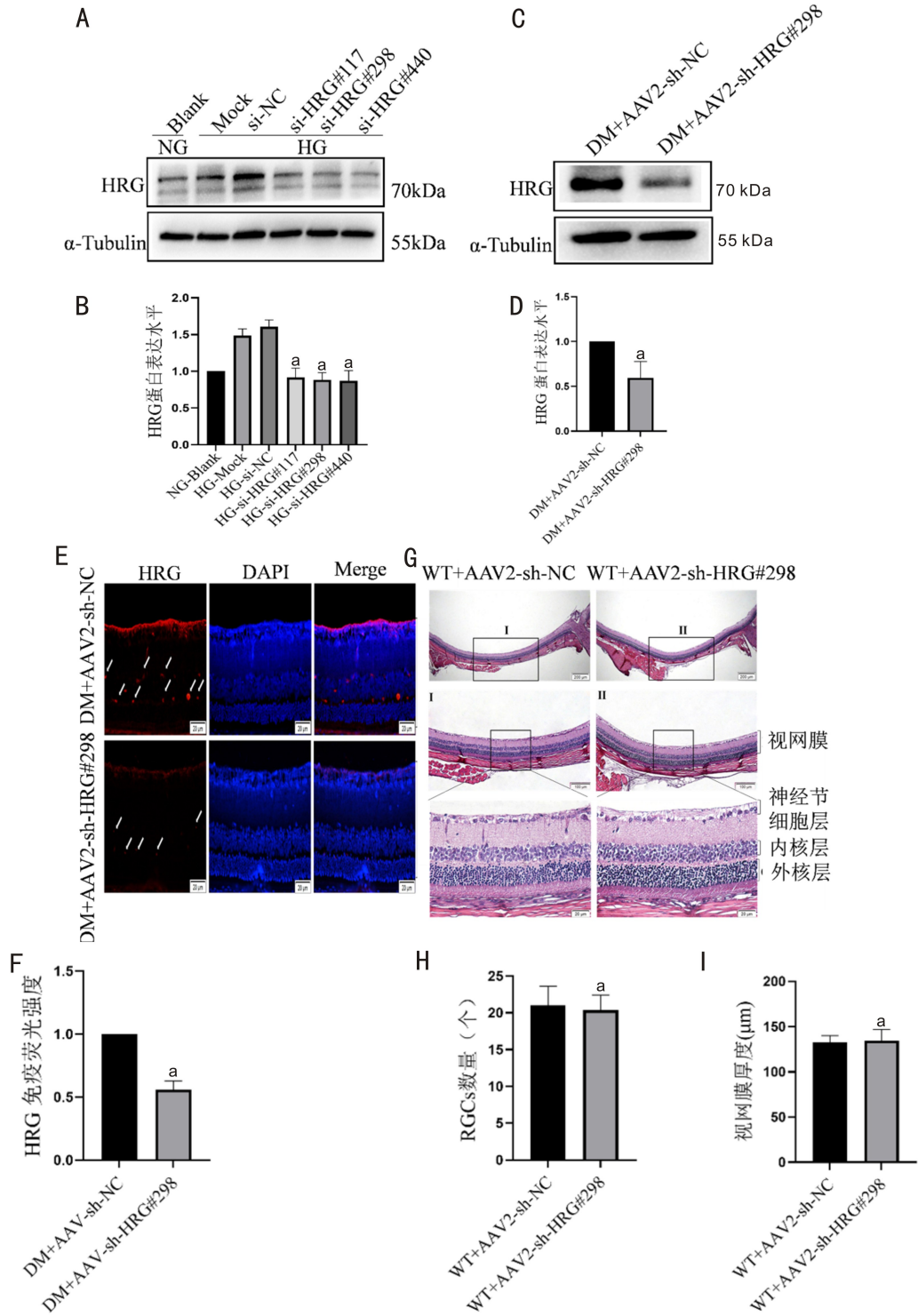


图3 糖尿病大鼠通过腺相关病毒载体沉默 HRG 情况 A:高糖诱导的 hRMECs 中 HRG 基因沉默后通过 WB 验证 HRG 的转染效率;B:HRG 蛋白灰度值统计;NG-Blank:空白对照组,HG+Mock:转染试剂对照组,HG+si-NC:沉默对照组,HG+si-HRG#117:HRG 基因沉默序列 117 组,HG+si-HRG#298:HRG 基因沉默序列 298 组,HG+si-HRG#440:HRG 基因沉默序列 440 组;^a*P*<0.05 vs HG+si-NC 组(*n*=3);C:WB 检测腺相关病毒载体沉默 HRG 的蛋白表达效果;D:HRG 蛋白灰度值统计;^a*P*<0.05 vs DM+AAV2-sh-NC 组;**E**:IF 检测 HRG 在视网膜组织表达情况;**F**:HRG 免疫荧光强度统计;^a*P*<0.05 vs DM+AAV2-sh-NC 组(*n*=3);DM+AAV2-sh-NC:HRG 空载体对照组;DM+AAV2-sh-HRG#298:HRG 基因沉默组;**G**:HE 染色观察大鼠视网膜组织结构;**H**:各组大鼠视网膜中 RGCs 数量统计;^a*P*<0.05 vs WT+AAV2-sh-NC 组(*n*=3);**I**:各组大鼠视网膜总厚度统计;^a*P*<0.05 vs WT+AAV2-sh-NC 组(*n*=3);WT+AAV2-sh-NC:HRG 空载体对照组;WT+AAV2-sh-HRG#298:HRG 基因沉默组。

大鼠中右眼注射 AAV2-sh-HRG#298,左眼注射 AAV2-sh-NC空载体作为对照,通过 WB 检测血管生成因子 VEGF 的蛋白表达情况,与 WT 组相比,DM 中 HRG 和 VEGF 的蛋白表达增加,与 DM+AAV2-sh-NC 组相比,HRG 基因沉默后血管生成因子 VEGF 的蛋白表达下调(图 5A-C)。

结果提示 HRG 基因沉默下调糖尿病大鼠视网膜中血管生成因子 VEGF 的蛋白表达低表达。

3 讨论

DR 是 DM 的主要眼部微血管并发症,大约 30%-40% 发生在 DM 患者^[22]。视网膜新生血管的形成是影响视网

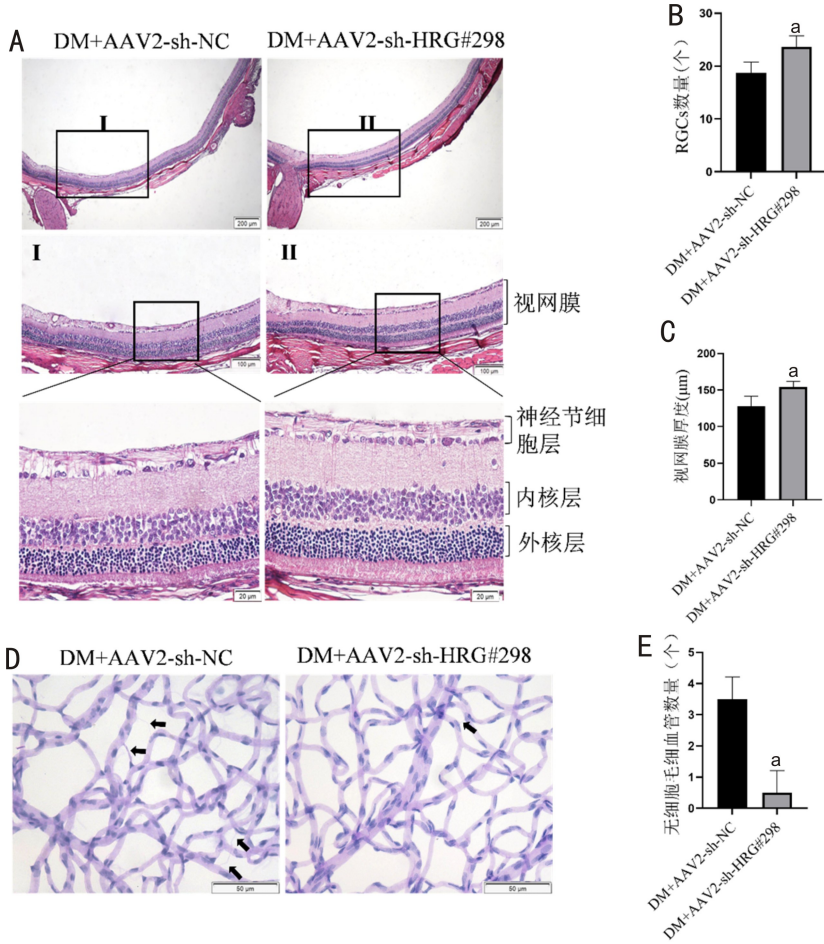


图4 HRG基因沉默抑制糖尿病大鼠视网膜的新生血管形成情况 A:HE染色观察各组糖尿病大鼠视网膜结构变化;B:各组糖尿病大鼠视网膜中RGCs数量统计;^a $P < 0.05$ vs DM+AAV2-sh-NC组($n=3$);C:各组糖尿病大鼠视网膜厚度统计;^a $P < 0.05$ vs DM+AAV2-sh-NC组($n=3$);D:PAS染色观察各组糖尿病大鼠视网膜中无细胞毛细血管数量(黑色箭头所指);E:各组糖尿病大鼠视网膜中无细胞毛细血管的数量统计;^a $P < 0.05$ vs DM+AAV2-sh-NC组($n=3$);DM+AAV2-sh-NC:HRG空载体对照组;DM+AAV2-sh-HRG#298:HRG基因沉默组。

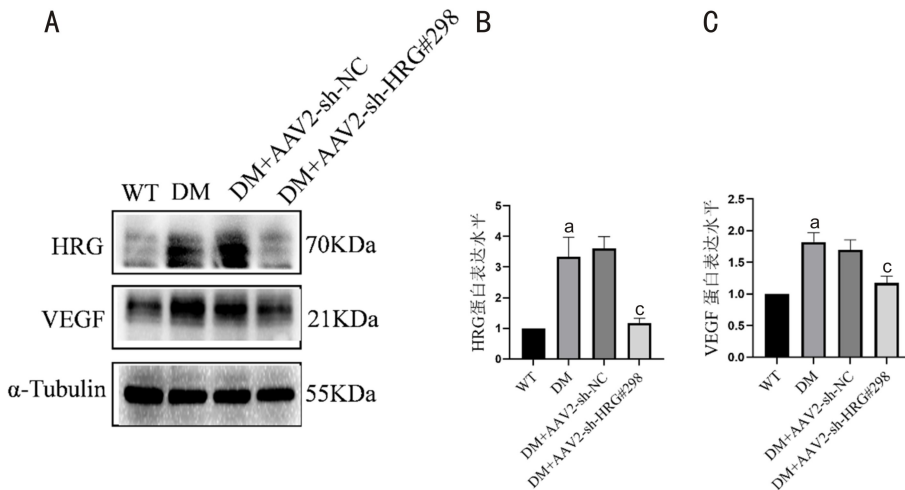


图5 HRG基因沉默后WB检测糖尿病大鼠视网膜中VEGF的蛋白表达情况 A:WB检测各组大鼠视网膜中HRG和VEGF的蛋白表达情况;B:HRG的蛋白灰度值统计;^a $P < 0.05$ vs WT组;^c $P < 0.05$ vs DM+AAV2-sh-NC组($n=3$);C:VEGF的蛋白灰度值统计;^a $P < 0.05$ vs WT组;^c $P < 0.05$ vs DM+AAV2-sh-NC组($n=3$);WT:正常对照组;DM:糖尿病组;DM+AAV2-sh-NC:HRG空载体对照组;DM+AAV2-sh-HRG#298:HRG基因沉默组。

膜血管性疾病进展以及视力损害的重要原因之一^[23],其中就包括DR、湿性年龄相关性黄斑病变、早产儿视网膜病变和新生血管性青光眼等^[24]。HRG可调节许多重要的生物过程,例如血管生成、病原体清除、细胞黏附、凝血和纤

维蛋白溶解。以往研究中HRG还为多种疾病治疗提供了新的靶点。在本研究中,研究了HRG对糖尿病大鼠视网膜新生血管形成的影响,实验结果表明HRG在DR中充当新生血管形成因子,我们通过HRG基因沉默可以抑制

其新生血管的形成。此外,我们的结果表明,这种反应可能受血管生成因子 VEGF 的影响。

据报道,HRG 可以在不同的疾病中充当血管生成和抑制血管生成的双重作用,例如,在纤维肉瘤、胰腺癌中 HRG 遗传缺陷可以通过加剧免疫逃逸和血管异常来增强肿瘤的生长和转移,这种现象主要与 HRG 富含组氨酸/脯氨酸的中央结构域的肽会抑制肿瘤血管生成,从而导致血管化减少抑制肿瘤模型的生长^[25],另一项研究表明 microRNA-23a 调控的乳腺组织中 HRG 在乳腺癌中表达促进血管生成^[21]。然而,HRG 在 DR 视网膜新生血管形成的影响很少被研究。

为了探讨这个问题,本研究主要通过 STZ 诱导 SD 大鼠建立糖尿病模型是一种经典的实验模型,用于研究糖尿病及其并发症和胰岛素抵抗等疾病,STZ 能够破坏胰岛 β 细胞,导致胰岛素分泌减少,从而诱发糖尿病^[26],在以往研究已明确 STZ 诱导糖尿病大鼠发生 DR 病变已用于实验模型研究^[27]。因此,我们通过 WB 检测 HRG 在糖尿病大鼠中呈高表达,同时,视网膜组织免疫荧光结果也提示 HRG 表达增高,这一结果表明 HRG 是 DR 视网膜新生血管形成的关键因子。值得注意的是,我们通过小干扰 RNA 片段干扰 HRG 可以在高糖诱导的 hRMECs 中抑制基因表达,为后续实验腺相关病毒载体沉默 HRG 提供可靠序列,我们通过腺相关病毒载体成功构建低表达 HRG。为探讨 HRG 对糖尿病大鼠视网膜组织结构的影响,我们的结果提示 HRG 基因沉默可以保护视网膜组织结构,防止其发生萎缩,减轻视网膜新生血管的形成,这有可能为治疗 DR 提供新的靶点,仍需要更多的证据。

DR 的发病机制中主要涉及视网膜的氧化应激、炎症及血管功能障碍^[28]。在正常生理情况下,血管之间保持稳态作用,即由血管生成因子 VEGF 和抗血管生成因子 TSP-1/TSP-2 之间形成的平衡状态,高糖环境下,VEGF 表达增加诱导血管内皮细胞增殖和迁移,增加血管通透性来促进血管的形成^[29],研究表明 VEGF 是 DR 及其并发症的主要致病因素,可导致玻璃体积血和牵拉性视网膜脱离^[30]。据报道,在某些肿瘤环境中,HRG 通过抑制 TSP-1 和 TSP-2 的抗血管生成作用,从而促进血管生成^[31],同时,HRG 可以与纤溶酶原/纤溶酶和细胞表面结合,促进内皮细胞迁移和运动,从而促进血管生成。在另外一项研究 HRG 关于代谢功能障碍相关脂肪性肝炎相关疾病进展和肝癌的发生中观察到 HRG 可以促进 VEGF-A 的表达,说明了 HRG 严重影响了代谢功能障碍相关的脂肪性肝炎相关肝细胞癌中几种促血管生成标志物的产生^[32]。血管生成因子 VEGF 是 PDR 形成的关键因子,我们的结果提示 HRG 是 DR 的血管生成因子,为探讨之间的关系,我们的实验结果提示 HRG 基因沉默可以抑制糖尿病大鼠视网膜中血管生成因子 VEGF 的蛋白表达,我们的实验结果说明了 HRG 可能通过 VEGF 促进 DR 中视网膜新生血管的形成,但其具体调控机制有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 HRG 参与 DR 视网膜新生血管形成,HRG 基因沉默可以减轻视网膜新生血管形成作用,这种现象可能是 HRG 通过促进 VEGF 表达增加 DR 视网膜新生血管的形成,但需要进一步实验验证。我

们的研究结果为 DR 视网膜新生血管的形成提供了参考意义,这有可能在未来为 DR 治疗提供新的靶标。

参考文献

- [1] Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*, 2020,16(7):377-390.
- [2] Liu K, Gao X, Hu CY, et al. Capsaicin ameliorates diabetic retinopathy by inhibiting poldip2-induced oxidative stress. *Redox Biol*, 2022,56:102460.
- [3] Hashemi H, Rezvan F, Pakzad R, et al. Global and regional prevalence of diabetic retinopathy; A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Semin Ophthalmol*, 2022,37(3):291-306.
- [4] Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 2016,51:156-186.
- [5] Qin YW, Zhang J, Babapoor-Farrokhran S, et al. PAI-1 is a vascular cell-specific HIF-2-dependent angiogenic factor that promotes retinal neovascularization in diabetic patients. *Sci Adv*, 2022,8(9):eabm1896.
- [6] 胡可可, 惠延年, 杜红俊. 抗 VEGF 时代激光光凝治疗糖尿病视网膜病变的应用进展. *国际眼科杂志*, 2023,23(8):1285-1289.
- [7] Wang Y, Lin WW, Ju JH. MicroRNA-409-5p promotes retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Cell Cycle*, 2020,19(11):1314-1325.
- [8] Wan WC, Long Y, Jin XM, et al. Protective role of microRNA-200a in diabetic retinopathy through downregulation of PDLIM1. *JInflamm Res*, 2021,14:2411-2424.
- [9] Hu A, Schmidt MHH, Heilig N. Microglia in retinal angiogenesis and diabetic retinopathy. *Angiogenesis*, 2024,27(3):311-331.
- [10] Xu J, Chen LJ, Yu J, et al. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem*, 2018,48(2):705-717.
- [11] Tao D, Ni NH, Zhang TS, et al. Accumulation of advanced glycation end products potentiate human retinal capillary endothelial cells mediated diabetic retinopathy. *Mol Med Rep*, 2019,20(4):3719-3727.
- [12] Araszkiewicz A, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Retinal neurodegeneration in the course of diabetes-pathogenesis and clinical perspective. *Curr Neuropharmacol*, 2016,14(8):805-809.
- [13] deMoraes G, Layton CJ. Therapeutic targeting of diabetic retinal neuropathy as a strategy in preventing diabetic retinopathy. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016,44(9):838-852.
- [14] Ola MS, Alhomida AS. Neurodegeneration in diabetic retina and its potential drug targets. *Curr Neuropharmacol*, 2014,12(4):380-386.
- [15] Hale JS, Li MZ, Sinyuk M, et al. Context dependent role of the CD36 - thrombospondin - histidine - rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth. *PLoS One*, 2012,7(7):e40033.
- [16] Sacchetto R, Sharova E, Patruno M, et al. Overexpression of histidine-rich calcium binding protein in equine ventricular myocardium. *Vet J*, 2012,193(1):157-161.
- [17] Matboli M, Eissa S, Said H. Evaluation of histidine-rich glycoprotein tissue RNA and serum protein as novel markers for breast cancer. *Med Oncol*, 2014,31(4):897.
- [18] Poon IK, Patel KK, Davis DS, et al. Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma. *Blood*, 2011,117(7):2093-2101.
- [19] Muko R, Sunouchi T, Urayama S, et al. Unique insertion/deletion polymorphisms within histidine-rich region of histidine-rich glycoprotein in Thoroughbred horses. *Sci Rep*, 2023,13(1):300.
- [20] Kuhli C, Scharrer I, Koch F, et al. Recurrent retinal vein

occlusion in a patient with increased plasma levels of histidine - rich glycoprotein. *Am J Ophthalmol*, 2003,135(2):232-234.

[21] Eissa S, Matboli M, Shehata HH. Breast tissue-based microRNA panel highlights microRNA - 23a and selected target genes as putative biomarkers for breast cancer. *Transl Res*, 2015,165(3):417-427.

[22] Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: looking forward to 2030. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:1077669.

[23] 袁琳慧, 刘新. 基于基因共表达网络分析氧诱导小鼠视网膜新生血管模型免疫相关靶基因. *国际眼科杂志*, 2024,24(6):857-863.

[24] Xie Z, Wu XJ, Cheng RW, et al. JP1, a polypeptide specifically targeting integrin $\alpha\beta3$, ameliorates choroidal neovascularization and diabetic retinopathy in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44 (4): 897-912.

[25] Tugues S, Honjo S, König C, et al. Genetic deficiency in plasma protein HRG enhances tumor growth and metastasis by exacerbating immune escape and vessel abnormalization. *Cancer Res*, 2012,72(8):1953-1963.

[26] Wang-Fischer Y, Garyantes T. Improving the reliability and utility of streptozotocin - induced rat diabetic model. *J Diabetes Res*, 2018, 2018:8054073.

[27] Ren CH, Wu H, Li DJ, et al. Remote ischemic conditioning

protects diabetic retinopathy in streptozotocin - induced diabetic rats *via* anti - inflammation and antioxidation. *Aging Dis*, 2018, 9 (6): 1122-1133.

[28] Ai XP, Yu PL, Luo LL, et al. Berberis dictyophylla F. inhibits angiogenesis and apoptosis of diabetic retinopathy *via* suppressing HIF - 1 α /VEGF/DLL - 4/Notch - 1 pathway. *J Ethnopharmacol*, 2022, 296:115453.

[29] Moon CH, Lee AJ, Jeon HY, et al. Therapeutic effect of ultra-long-lasting human C-peptide delivery against hyperglycemia-induced neovascularization in diabetic retinopathy. *Theranostics*, 2023, 13(8): 2424-2438.

[30] Arrigo A, Aragona E, Bandello F. VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Ann Med*, 2022,54(1):1089-1111.

[31] Pan YX, Deng L, Wang H, et al. Histidine - rich glycoprotein (HRGP): pleiotropic and paradoxical effects on macrophage, tumor microenvironment, angiogenesis, and other physiological and pathological processes. *Genes Dis*, 2022,9(2):381-392.

[32] Foglia B, Sutti S, Cannito S, et al. Histidine-rich glycoprotein in metabolic dysfunction - associated steatohepatitis - related disease progression and liver carcinogenesis. *Front Immunol*, 2024,15:1342404.

2023 年《中国科技期刊引证报告》核心版眼科期刊主要指标及排名 (以综合评价总分为序)

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2013	2	1.328	1	63.8	1
国际眼科杂志	2806	1	1.125	2	58.2	2
眼科新进展	1208	3	0.826	3	52.7	3
中国眼耳鼻喉科杂志	423	7	0.542	7	40.9	4
中华眼科医学杂志电子版	173	11	0.318	10	32.0	5
中华实验眼科杂志	924	4	0.614	5	30.2	6
中华眼底病杂志	684	6	0.549	6	29.1	7
临床眼科杂志	336	8	0.278	11	23.0	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	764	5	0.767	4	22.9	9
眼科	292	9	0.323	9	19.8	10
中国斜视与小儿眼科杂志	236	10	0.385	8	13.4	11

摘编自 2024 版《中国科技期刊引证报告》核心版