

本文引用:梁晓洁,刘向玲,李晓鹏.高迁移率族蛋白1和Toll样受体9在氧诱导视网膜病变小鼠视网膜中的表达及作用[J].新乡医学院学报,2022,39(1):1-5. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.01.001.

### 【基础研究】

# 高迁移率族蛋白 1 和 Toll 样受体 9 在氧诱导视网膜病变小鼠视网膜中的表达及作用

梁晓洁<sup>1</sup>, 刘向玲<sup>2</sup>, 李晓鹏<sup>2</sup>

(1. 新乡医学院第三临床学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第三附属医院眼科, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 目的 探讨高迁移率族蛋白1(HMGB1)和Toll样受体9(TLR9)在氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠视网膜中的表达及其在OIR发病中的作用。方法 将30只7日龄C57BL/6J小鼠按随机数字表法分为OIR组和对照组,每组15只。对照组小鼠于正常空气中饲养;OIR组小鼠置于含体积分数(75±2)%氧气的高浓度氧箱中饲养5 d,然后再放回正常空气中饲养5 d制备OIR模型。2组小鼠均于出生第17天处死,取眼球,采用视网膜铺片法观察视网膜新生血管形成情况,验证造模是否成功。采用免疫荧光染色和Western blot法检测小鼠视网膜中HMGB1和TLR9蛋白的表达。结果 对照组小鼠视网膜完全血管化,自视盘中心向四周放射状均匀分布,血管形态及走行正常。OIR组小鼠视网膜中央处可见血管闭塞区,闭塞区周边可见大量新生血管簇,视网膜血管走行迂曲。免疫荧光染色显示,对照组小鼠视网膜各层间结构整齐,HMGB1蛋白呈红色,主要表达于神经节细胞层,在内核层及外核层可见少量表达;OIR组小鼠视网膜增厚,各层间结构紊乱,组织紧密度降低,HMGB1蛋白在神经节细胞层、内核层、外核层表达。对照组小鼠视网膜中TLR9蛋白(红色)主要表达于神经节细胞层、内核层;OIR组小鼠视网膜中TLR9蛋白在神经节细胞层及内核层的阳性表达增加。免疫荧光染色结果显示,OIR组小鼠视网膜中HMGB1、TLR9蛋白表达显著高于对照组( $P<0.05$ )。Western blot结果显示,HMGB1蛋白印迹条带表达于相对分子质量约25 000区域,OIR组小鼠视网膜中HMGB1蛋白相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ );TLR9蛋白印迹条带表达于相对分子质量约125 000区域,OIR组小鼠视网膜中TLR9蛋白相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。结论 HMGB1和TLR9蛋白在OIR小鼠视网膜中表达显著增加,二者可能相互作用共同参与视网膜新生血管形成,促进OIR的发生和发展。

**关键词:** 氧诱导视网膜病变;高迁移率族蛋白 1;Toll 样受体 9;新生血管形成

中图分类号: R774.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2022)01-0001-05

## Expression and role of high mobility group box 1 and toll-like receptor 9 in retina of mice with oxygen-induced retinopathy

LIANG Xiaojie<sup>1</sup>, LIU Xiangling<sup>2</sup>, LI Xiaopeng<sup>2</sup>

(1. The Third Clinical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of high mobility group box 1 (HMGB1) and toll like receptor 9 (TLR9) in the retina of mice with oxygen-induced retinopathy (OIR) and their role in the pathogenesis of OIR. **Methods** A total of 30 C57BL/6J newborn mice were randomly divided into OIR group and control group, with 15 mice in each group. The mice in the control group were always fed in normal air. The mice in the OIR group were fed in a high concentration oxygen box containing volume fraction ( $75 \pm 2$ )% of oxygen for 5 days, and then put back into the normal air for 5 days to establish the OIR model. The mice in the both groups were killed on the 17<sup>th</sup> day of life and the eyeballs were taken. The retinal neovascularization was observed by retinal spread method to verify the success of OIR model. The expressions of HMGB1 and TLR9 protein in the retina were detected by using immunofluorescence staining and Western blot. **Results** In the control group, the retina was completely vascularized, evenly distributed radially from the center of the optic disc, and the morphology and shape of blood vessels were normal. In the OIR group, vascular occlusion area could be seen in the center of retina, a large number of neovascular clusters could be seen around the occlusion area, and the retinal vessels were tortuous. Immunofluorescence

**DOI:**10.7683/xyxyxb.2022.01.001

收稿日期:2021-04-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31471122)。

作者简介:梁晓洁(1992-),女,河南南阳人,硕士研究生在读,住院医师,研究方向:眼科疾病基础与临床。

通信作者:刘向玲(1965-),女,河南新乡人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼科疾病基础与临床;E-mail:13782512332@163.com。李骁鹏(1971-),男,河南巩义人,学士,主任医师,研究方向:白内障;E-mail:lxp3029631@126.com。

staining showed that the interlayer structure of the retina of mice in the control group was neat, HMGB1 protein was red, mainly expressed in the ganglion cell layer, and a small amount of expression was observed in the inner and outer nuclear layers; in OIR group, the retina was thickened, the interlayer structure was disordered, the tissue tightness was reduced, and HMGB1 protein was expressed in ganglion cell layer, inner nuclear layer and outer nuclear layer. In the control group, TLR9 protein was mainly expressed in ganglion cell layer and nuclear layer; in the OIR group, the positive expression of TLR9 protein in ganglion cell layer and nuclear layer increased. Immunofluorescence staining results showed that the expression of HMGB1 and TLR9 protein in the retina of mice in the OIR group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that the imprinted bands of HMGB1 protein were expressed in the region with relative molecular weight of about 25 000, and the relative expression of HMGB1 protein in the retina of mice in the OIR group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ); imprinted bands of TLR9 protein were expressed in the region with relative molecular weight of about 125 000, and the relative expression of TLR9 protein in the retina of mice in the OIR group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expressions of HMGB1 and TLR9 protein in retina of mice with OIR increased significantly, which may interact to participate in retinal neovascularization, promote the occurrence and development of OIR.

**Key words:** oxygen-induced retinopathy; high mobility group box 1; toll like receptor 9; angiogenesis

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是指由低胎龄、低体质量、缺氧、炎症和感染等因素引起的视网膜血管发育异常的可致盲眼底疾病, 其病理机制尚未阐明<sup>[1]</sup>。近年来, 炎症与 ROP 新生血管形成之间的关系备受关注。新生血管形成涉及多种因子和信号通路, 除了熟知的血管内皮生长因子、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、成纤维生长因子和胎盘生长因子等, 深入了解和探索视网膜新生血管形成的其他致病因子对于开发 ROP 的治疗药物至关重要。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 作为一种高度保守的核 DNA 结合蛋白, 是炎症反应中重要的炎症介质或促炎细胞因子。HMGB1 作为在缺氧期间典型的损伤相关模式分子 (damage associated molecular patterns, DAMP) 或警报蛋白, 可被迅速释放到细胞外, 在炎症、脓毒血症、肿瘤、自身免疫性疾病及血管病变中起到非常重要的作用<sup>[2]</sup>。Toll 样受体 (toll like receptor, TLR) 9 可特异性识别存在于细菌和病毒中的核酸序列, 且其是识别细菌 DNA 中胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (cytidine-phosphate-guanosine, CpG) 模体的主要受体。TLR9 可与特异性配体 CpG 相结合, 激活先天免疫系统, 参与缺血引发的炎症反应<sup>[3-4]</sup>。既往关于心肌梗死后组织修复的研究发现, HMGB1 可通过其受体 TLR9 参与伤口愈合和缺血后的血管生成<sup>[5]</sup>。基于此, 本研究观察 HMGB1 和 TLR9 在氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠视网膜组织中的表达变化, 探讨其在 OIR 发病机制中的作用及相关机制, 旨在为 ROP 临床药物的开发提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、试剂及仪器

7 日龄清洁级

C57BL/6J 小鼠 30 只, 体质量 2.0 ~ 3.0 g, 购自维通利华北京总公司。兔多克隆抗体 HMGB1、 $\beta$ -actin 购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG、兔多克隆抗体 TLR9 (A14642) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, 兔多克隆抗体 TLR9 (GB11266)、荧光二抗 CY3 标记山羊抗兔 (GB21303)、自发荧光淬灭剂 (G0002) 及眼球固定液购自武汉塞维尔生物科技有限公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, 凝集素 B4 (isolectin B4, IB4)-594 (Alexa Fluor 594-I21413) 购自美国赛默飞世尔科技公司。智能控氧仪购自杭州艾普仪器设备有限公司, 包埋机购自武汉俊杰电子有限公司, 正置荧光显微镜购自日本尼康公司, 共聚焦显微镜购自上海仁科生物有限公司, 发光仪购自上海天能科技有限公司, TECAN 多功能酶标仪由新乡医学院神经精神研究院提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 OIR 模型建立** 将 30 只 7 日龄清洁级 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为 OIR 组和对照组, 每组 15 只。OIR 组小鼠和哺乳母鼠放入含体积分数 (75  $\pm$  2) % 氧气的氧箱中饲养 5 d, 每 24 h 更换一次哺乳母鼠, 防止哺乳母鼠氧中毒死亡, 5 d 后将哺乳母鼠及小鼠重新放回正常空气环境中饲养。对照组小鼠和哺乳母鼠于正常空气环境下饲养。

**1.2.2 视网膜铺片法观察小鼠视网膜血管分布及形态** 参考 HE 等<sup>[6]</sup>的方法进行视网膜铺片和染色。具体操作方法: 每组小鼠于 17 日龄时随机取 3 只, 断头处死, 取 6 只眼球置于 40 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 多聚甲醛溶液中固定 30 min, 刺破角膜再固定 20 min, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗数次; 用

有齿镊夹住角膜穿刺口,沿穿刺口剪开角膜(剪至锯齿缘时,注意只剪外层巩膜及色素膜);一直延伸至视神经处,用有齿镊夹住两侧巩膜,轻轻向两边撕开(注意不要撕烂视网膜),小心去除晶状体及玻璃体,留下视网膜,无齿镊小心夹住锯齿缘,以视盘为中心将视网膜剪为四叶草形状。按说明书配制 IB4-594 溶液:500 g IB4 粉末和 500  $\mu\text{L}$  氯化钙( $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )制成重组凝集素,然后再加入 49 mL 氯化钙( $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 500 mL 叠氮化钠( $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),将剪裁好的视网膜放入 500 mL 配制好的 IB4-594 溶液中避光  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下过夜染色,PBS 清洗数次后将视网膜内层朝上平铺于载玻片,吸水纸吸去水分,甘油明胶封片;共聚焦显微镜下观察血管分布及形态变化。

**1.2.3 免疫荧光染色检测小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达** 每组小鼠于 17 日龄时随机取 4 只,断头处死,取 8 只眼球置于  $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛固定,石蜡包埋,自视神经处连续切片,每间隔 6 张取 1 张,切片厚度  $5\text{ }\mu\text{m}$ 。将切片脱蜡,置于盛满 pH 6.0 的柠檬酸抗原修复缓冲液的修复盒中,于微波炉内进行抗原修复。切片稍甩干后,使用组织化学笔在组织周围画圈并在圈内加入自发荧光淬灭剂 5 min,流水冲洗 10 min,牛血清白蛋白孵育 30 min;滴加抗 HMGB1 一抗(滴度为  $1:800$ )、TLR9 一抗(GB11266)(滴度为  $1:100$ ), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,然后使用 PBS 洗涤 3 次,滴加山羊抗兔荧光二抗( $1:300$ ),室温下避光孵育 50 min;再使用 PBS 洗涤 3 次,滴加二胺基苯基吡啶染液,室温避光孵育 10 min;PBS 洗涤 3 次,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并采集图像,使用 Image J 软件计算荧光强度。

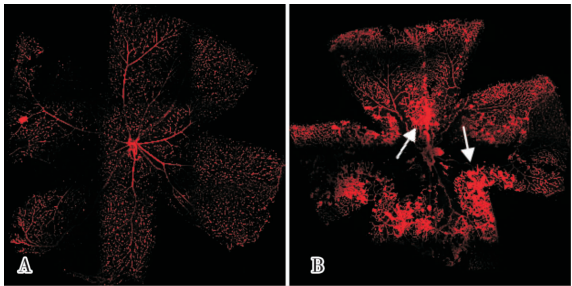
**1.2.4 Western blot 法检测小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达** 小鼠于 17 日龄时每组随机取 3 只,断头处死,摘取眼球,同“1.2.2”项方法完整分离视网膜,使用放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)冰上充分裂解组织, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 提取总蛋白,BCA 法测总蛋白浓度,蛋白定量后加入上样缓冲液煮沸;胶板灌注质量分数 10% 分离胶和质量分数 5% 浓缩胶,30 min 后移入电泳槽,加电泳缓冲液,加样孔加样并电泳,电压  $80\text{ V}$ ,待蛋白样品通过浓缩胶进入分离胶界面时,调至恒压  $120\text{ V}$ ;冰盒内进行转膜,恒流  $300\text{ mA}$ ,时间 90 min,结束后在聚偏二氯乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上做标记,将 PVDF 膜放入脱脂牛奶中封闭 2 h;滴加 HMGB1 一抗(滴度  $1:10\text{ }000$ )、TLR9 一抗

(A14642)(滴度  $1:1\text{ }000$ )和内参  $\beta\text{-actin}$ (滴度  $1:5\text{ }000$ ), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,使用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;滴加 HRP 山羊抗兔 IgG 二抗(滴度  $1:5\text{ }000$ ),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; $1:1$  配制发光液,混匀后用锡箔纸包好避光,均匀滴在 PVDF 膜上,使用发光仪进行发光并采集图像,Image J 软件进行灰度值分析,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 及 GraphPad prism 8.0.2 软件进行统计学分析,计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2 组小鼠视网膜血管形态变化** 结果见图 1。对照组小鼠视网膜完全血管化,自视盘中心向四周放射状均匀分布,血管形态及走行正常。OIR 组小鼠视网膜中央处可见血管闭塞区,闭塞区周边可见大量新生血管簇,视网膜血管走行迂曲。

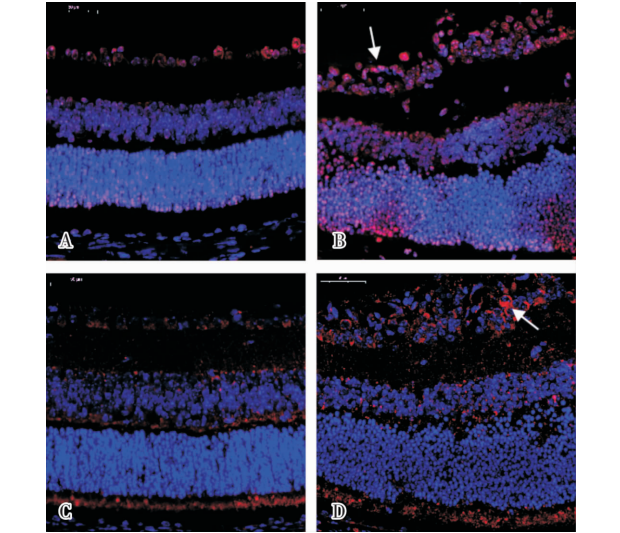


A:对照组;B:OIR 组;白色箭头所指为新生血管簇。

图 1 2 组小鼠视网膜血管形态 (IB4 染色,  $\times 400$ )

Fig.1 Morphology of retinal vascular of mice in the two groups (IB4 staining,  $\times 400$ )

**2.2 2 组小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达免疫荧光染色结果比较** 结果见图 2 和表 1。对照组小鼠视网膜各层间结构整齐,HMGB1 蛋白呈红色,主要表达于神经节细胞层,在内核层及外核层可见少量表达(图 2A);OIR 组小鼠视网膜增厚,各层间结构紊乱,组织紧密度降低,HMGB1 蛋白呈红色,在神经节细胞层、内核层、外核层表达明显增多(图 2B)。对照组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白(红色)主要表达于神经节细胞层、内核层(图 2C);OIR 组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白(红色)在神经节细胞层及内核层的阳性表达增加(图 2D)。OIR 组小鼠视网膜中 HMGB1、TLR9 蛋白荧光强度值显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:对照组小鼠视网膜中 HMGB1 蛋白表达;B:OIR 组小鼠视网膜中 HMGB1 蛋白表达;C:对照组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白表达;D:OIR 组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白表达。

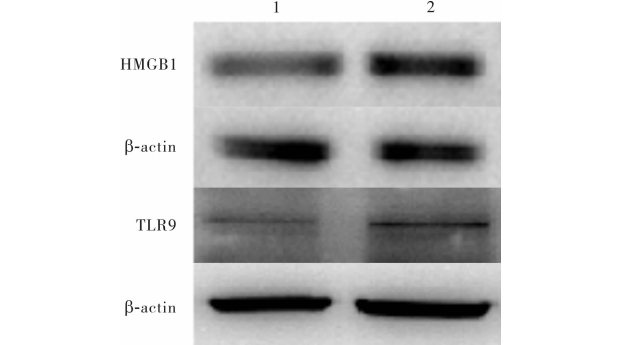
图 2 2 组小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达(免疫荧光染色,×400)

Fig.2 Expression of HMGB1 and TLR9 protein in retina of mice in the two groups(immunofluorescence staining,×400)

表 1 2 组小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达比较  
Tab.1 Comparison of the expression of HMGB1 and TLR9 protein in retina of mice between the two groups

( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	<i>n</i>	HMGB1 蛋白表达(荧光强度值)	TLR9 蛋白表达(荧光强度值)
对照组	4	91.229±1.087	81.161±3.193
OIR 组	4	107.366±2.464	113.917±2.323
<i>t</i>		-10.380	-14.370
<i>P</i>		<0.05	<0.05

**2.3 2 组小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白表达 Western blot 检测结果比较** 结果见图 3 和表 2。HMGB1 法蛋白印迹条带表达于相对分子质量约 25 000 区域,OIR 组小鼠视网膜中 HMGB1 蛋白相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TLR9 蛋白印迹条带表达于相对分子质量约 125 000 区域,OIR 组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



1:对照组;2:OIR 组。

图 3 2 组小鼠视网膜中 HMGB1、TLR9 蛋白表达(Western blot)

Fig.3 Expression of HMGB1 and TLR9 protein in retina of mice in the two groups (Western blot)

表 2 2 组小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of HMGB1 and TLR9 protein in retina of mice between the two groups

( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	<i>n</i>	HMGB1 蛋白	TLR9 蛋白
对照组	3	0.907±0.437	0.836±0.064
OIR 组	3	1.259±0.047	1.153±0.124
<i>t</i>		9.515	-2.993
<i>P</i>		<0.05	<0.05

### 3 讨论

OIR 小鼠模型是目前研究 ROP 应用最广泛的模型。STAHL 等<sup>[7]</sup>研究表明,出生第 7 天的 小鼠放入含体积分数(75±2)%氧的高浓度氧箱中 5 d 后,小鼠的视网膜血管收缩,视网膜中央不成熟的毛细血管发生退行改变并导致中央区域血管闭塞,再次回归室内空气时,中央区开始缺氧,炎症因子、促进血管增生因子上调,诱导病理性新生血管簇形成,而新生血管形成是 OIR 模型制备成功的主要标志。本研究采用 SMITH 等<sup>[8]</sup>设计的方法建立 OIR 模型,结果显示,对照组小鼠视网膜完全血管化,自视盘中心向四周放射状均匀分布,血管形态及走形正常;OIR 组小鼠视网膜中央处可见血管闭塞区,闭塞区周边可见大量新生血管簇,视网膜血管走形迂曲,说明 OIR 模型制备成功。

近年来研究发现,炎症与 ROP 病理性血管形成关系密切,炎症与血管新生是 2 个相互联系、共同发展的病理过程,持续的炎症会损害组织的完整性<sup>[9]</sup>。炎症诱导的血管生成不仅是急性感染或慢性炎症性疾病中病原体防御的关键组成部分,还在修复机制中起着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。HMGB1 是一种高度保守的核染色质结合蛋白,被认为是重要的晚期炎症因子,也是先天性和适应性免疫系统的早期预警信号,参与多种非感染性炎症疾病(癌症<sup>[11]</sup>、创伤<sup>[5]</sup>、自身免疫<sup>[12]</sup>等)的发病机制。本研究免疫荧光检测结果显示,OIR 组小鼠视网膜增厚,各层间结构紊乱,组织紧密度较正常视网膜减低,HMGB1 蛋白在神经节细胞层、内核层、外核层表达较对照组显著增多;且 Western blot 检测结果也显示 HMGB1 蛋白表达较对照组显著增高。HMGB1 主要通过死亡细胞的被动释放和免疫活性细胞的主动分泌进入细胞外<sup>[2]</sup>。缺血、缺氧可导致视网膜细胞损伤和死亡,被动释放 HMGB1 蛋白,死亡细胞引起炎症刺激,激活免疫细胞主动分泌 HMGB1 蛋白,释放到细胞外的 HMGB1 可能以髓样分化蛋白 2 依赖的方式与糖基化终末产物受体或 TLR4 结合,通过刺激内皮祖细胞向内皮细胞分化直接参与血管生成,或者通过促使巨噬细胞和内皮细胞释放促血管生成因子,间接调节内皮细胞的增殖、迁移、萌芽<sup>[2,13]</sup>。已有研究报道,HMGB1



除了可与 RAGE、TLR4 等结合调节血管生成,还可能通过 TLR9 发挥调节血管生成的作用<sup>[5]</sup>。

TLR 是病原体识别受体家族,参与机体的固有免疫。TLR 家族有 11 个成员,其中 TLR9 多表达于内质网、溶酶体、多囊泡体,主要结合细菌和病毒 DNA 中的非甲基化 CpG DNA 基序,对于预防自身免疫和不适当的免疫反应非常重要<sup>[14]</sup>。TLR9 与不同配体结合后调控血管生成的作用也不同<sup>[5]</sup>。本研究中免疫荧光检测结果显示,OIR 组小鼠视网膜中 TLR9 蛋白表达荧光强度值高于对照组,TLR9 主要分布在神经节细胞层、内核层;且 Western blot 检测结果也显示,小鼠视网膜中 TLR9 蛋白相对表达量高于对照组。据此推测,OIR 小鼠视网膜缺血缺氧、细胞受损死亡等引起炎症反应,使 TLR9 表达增高,激活单核/巨噬细胞系统,上调核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)、促血管生成因子的表达,进而引起 TNF- $\alpha$  及白细胞介素 (interleukin, IL) 类 (如 IL-6) 表达增高,产生信号级联反应,从而参与视网膜新生血管形成<sup>[5,14-15]</sup>。

视网膜新生血管形成是众多疾病如 ROP、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 等发生的共同病理改变,这种血管与正常血管不同,其管壁薄弱,容易造成渗出、出血、增生等一系列病变,最终导致视力丧失。DR 和 ROP 有着共同的致病基础:缺氧和炎症。在关于 DR 的研究中发现,慢性炎症是 DR 的重要病理机制,TLR9 和 HMGB1 蛋白在视网膜神经节细胞层、内核层、外核层中均表达增加,认为其参与 DR 的发生、发展<sup>[16]</sup>。这与本研究中 OIR 小鼠视网膜中 HMGB1、TLR9 的表达变化类似。LIU 等<sup>[5]</sup>研究显示,心肌梗死和扩张型心肌病小鼠心脏组织中 TLR9 表达增高,TLR9 与 HMGB1 相互作用,促进心肌细胞的存活、创伤愈合及心肌梗死后血管生成;心肌梗死模型中 TLR9 基因敲除小鼠病死率明显增高,TLR9 缺乏可消除 HMGB1 在心肌梗死后的保护作用。因此,认为 HMGB1 和 TLR9 可单独也可相互作用参与免疫应答、创伤愈合及调节血管生成,促进 OIR 的发生、发展。

综上所述,OIR 小鼠视网膜中 HMGB1 和 TLR9 表达显著增高,其可能相互作用共同参与视网膜新生血管形成,促进 OIR 的发生、发展。但二者具体存在怎样的关系,通过哪些信号通路的变化促进新生血管形成等机制仍不清楚,需要后续进一步深入研究。

参考文献:

[1] 杜森,陈婷婷,苏毅华,等. 早产儿视网膜病变危险因素研究新进展[J]. 眼科学报,2020,35(4):249-254.  
DU M, CHEN T T, SU Y H, et al. Research progress on the risk factors of retinopathy of prematurity[J]. *Eye Sci*, 2020, 35(4):

249-254.  
[2] YANG S, XU L, YANG T, et al. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(4):563-574.  
[3] 杨丹,孙慧林,胡喆,等. 线粒体 DNA-Toll 样受体 9 通路介导的炎症反应[J]. 医学综述,2019,25(21):4201-4206.  
YANG D, SUN H L, HU Z, et al. Mitochondrial DNA-Toll-like receptor 9 pathway mediates inflammatory responses[J]. *Med Recapit*, 2019, 25(21):4201-4206.  
[4] BLIKSØEN M, MARIERO L H, TORP M K, et al. Extracellular mtDNA activates NF-kappaB via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes[J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, 111(4):42.  
[5] LIU F Y, FAN D, YANG Z, et al. TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):480.  
[6] HE X, CHENG R, BENYAJATI S, et al. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(11):805-823.  
[7] STAHL A, CONNOR K M, SAPIEHA P, et al. The mouse retina as an angiogenesis model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(6):2813-2826.  
[8] SMITH L E, WESOŁOWSKI E, MCLELLAN A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1):101-111.  
[9] RIVERA J C, DABOUZ R, NOUEIHED B, et al. Ischemic retinopathies: oxidative stress and inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:3940241.  
[10] WU J, CUI H, DICK A D, et al. TLR9 agonist regulates angiogenesis and inhibits corneal neovascularization[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(6):1900-1910.  
[11] LEE Y M, KIM J, JO K, et al. Ethyl pyruvate inhibits retinal pathogenic neovascularization by downregulating HMGB1 expression[J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013:245271.  
[12] KIM W K, KWON Y, PARK M, et al. Identification of specifically activated angiogenic molecules in HMGB1-induced angiogenesis[J]. *BMB Reports*, 2017, 50(11):590-595.  
[13] 万志荔,赖史胜. 高迁移率族 B1 (HMGB-1) 蛋白在鼠视网膜新生血管形成中的调控作用[J]. 眼科新进展, 2014, 34(12):1128-1131.  
WAN Z L, LAI S S. Mediation effects of high mobility group B1 protein on retinal neovascularization in mice[J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2014, 34(12):1128-1131.  
[14] 鲍文朵娜. Toll 样受体 9 的功能及其致病机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(5):456-460.  
BAO W D N. Functions of toll-like receptor 9 and underlying mechanism[J]. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant*, 2016, 25(5):456-460.  
[15] ZHANG Q, RAOOF M, CHEN Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury[J]. *Nature*, 2010, 464(7285):104-107.  
[16] 姜双,陈晓隆. HMGB1 和 TOLL 样受体 9 在糖尿病大鼠视网膜组织中的表达[J]. 眼科新进展, 2016, 36(2):101-104.  
JIANG S, CHEN X L. Expression of HMGB1 and TLR9 in retina of diabetic rats[J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2016, 36(2):101-104.

( 本文编辑:周二强 )