

· 实验研究 ·

触珠蛋白调控视网膜血管屏障和炎症反应 对糖尿病性黄斑水肿的作用及机制

张越¹ 李佳鱼² 翟欣然² 姚瑶¹ 李丽艳¹ 肖哲¹ 陈晗¹ 庞午¹ 杨赞章¹ 张铭连¹¹河北省眼科医院 河北省眼科学重点实验室 河北省眼部疾病临床医学研究中心, 邢台 054001; ²河北医科大学眼科学教研室 河北省眼科医院 河北省眼科学重点实验室 河北省眼部疾病临床医学研究中心, 邢台 054001

通信作者: 张铭连, Email: zhmylk@163.com

【摘要】 目的 探讨触珠蛋白(HP)调控视网膜血管屏障和炎症反应对糖尿病性黄斑水肿(DME)的作用及机制。**方法** 收集7例非增殖性糖尿病视网膜病变(NPDR)和7例DME患者的房水样本,采用液相色谱-质谱联用技术进行蛋白质组学分析,筛选差异表达蛋白。通过STRING数据库进行蛋白-蛋白相互作用分析和生物学功能分析等筛选出目标蛋白。收集单纯白内障、NPDR和DME患者各23例的房水样本,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定HP表达水平。另选取8~10周龄健康雄性SD大鼠42只,采用随机数字表法将其随机分为对照组、糖尿病组、糖尿病+空载病毒组、糖尿病+HP慢病毒组,对照组注射柠檬酸钠缓冲液,其他各组注射链脲佐菌素构建糖尿病模型,建模8周后糖尿病+空载病毒组、糖尿病+HP慢病毒组分别给予玻璃体腔注射空载病毒和HP慢病毒。注药后1周进行视网膜血管渗漏实验,计算伊文思蓝和视网膜重量比值;采用定量PCR检测各组大鼠视网膜白细胞介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和高迁移率族蛋白B1(HMGB1)mRNA相对表达量;采用免疫荧光染色检测F4/80染色阳性细胞数量。**结果** 蛋白质组学分析鉴定出425个可定量蛋白,其中84个在DME和NPDR组间差异显著,HP是差异蛋白的枢纽蛋白,并具有与调控炎症反应更为相关的功能富集度。ELISA检测结果显示,单纯白内障组、NPDR组和DME组房水中HP表达水平分别为(5.878 $\pm$ 0.462)、(6.118 $\pm$ 0.215)、(6.769 $\pm$ 0.245) ng/ml,总体比较差异有统计学意义($F=36.47$, $P<0.001$),其中DME组HP表达水平明显高于单纯白内障组和NPDR组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。受试者工作特征曲线显示HP对DME的诊断具有较高准确性(曲线下面积=0.986, $P<0.001$),当患者房水中HP表达水平升高至6.5 ng/ml以上,提示NPDR患者可能发生DME。糖尿病组、糖尿病+HP慢病毒组大鼠视网膜血管渗漏比值较对照组明显升高,糖尿病+HP慢病毒组血管渗漏比值较糖尿病组明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。糖尿病组视网膜中IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 和HMGB1 mRNA相对表达量较对照组升高,糖尿病+HP慢病毒组IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 和HMGB1 mRNA相对表达量较糖尿病组、糖尿病+空载病毒组明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。视网膜免疫荧光染色结果显示糖尿病组F4/80染色阳性细胞数量较对照组明显升高,糖尿病+HP慢病毒组F4/80染色阳性细胞数量明显少于糖尿病组。**结论** HP在DME患者房水和糖尿病大鼠视网膜中显著高表达,可能通过调控HMGB1信号通路参与视网膜炎症反应和血管屏障功能破坏。下调HP可改善视网膜血管渗漏和炎症反应,提示HP可能是DME治疗的潜在靶点。

【关键词】 糖尿病性黄斑水肿;触珠蛋白;高迁移率族蛋白B1;蛋白质组学;视网膜血管屏障;炎症反应**基金项目:** 河北省医学科学研究课题计划(20250250)

DOI: 10.3760/ema.j.cn115989-20250521-00166

Effect and mechanism of haptoglobin regulating retinal vascular barrier and mediating inflammatory response in diabetic macular edema

Zhang Yue¹, Li Jiayu², Zhai Xinran¹, Yao Yao¹, Li Liyan¹, Xiao Zhe¹, Chen Han¹, Pang Wu¹, Yang Zanzhang¹, Zhang Minglian¹¹Hebei Eye Hospital, Hebei Key Laboratory of Ophthalmology, Hebei Clinical Research Center for Eye Diseases, Xingtai 054001, China; ²Department of Ophthalmology, Hebei Medical University, Hebei Eye Hospital, Hebei Key Laboratory of Ophthalmology, Hebei Clinical Research Center for Eye Diseases, Xingtai 054001, China

Corresponding author: Zhang Minglian, Email: zhmylk@163.com

[Abstract] Objective To investigate the role and mechanism of haptoglobin (HP) in regulating retinal vascular barrier function and inflammatory response in diabetic macular edema (DME). **Methods** Aqueous humor samples were collected from 7 patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) and 7 patients with DME. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for proteomic analysis to identify differentially expressed proteins. The target protein was screened out through protein-protein interaction analysis and biological function analysis using the STRING database. Aqueous humor samples were collected from patients with simple cataract ($n=23$), NPDR ($n=23$), and DME ($n=23$), and HP expression levels were determined by enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA). In addition, 42 healthy male SD rats aged 8–10 weeks were randomly divided into control, diabetes, diabetes+empty vector, and diabetes+HP lentivirus groups using the random number table method. Rats in the control group received citrate buffer, while those in the other groups received streptozotocin to establish diabetes mellitus model. At 8 weeks after modeling, the diabetes+empty vector group and diabetes+HP lentivirus group received intravitreal injections of empty vector and HP lentivirus, respectively. One week post-injection, retinal vascular leakage was assessed by calculating the Evans blue/retina weight ratio. Quantitative PCR was performed to detect the relative mRNA expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and high mobility group box 1 (HMGB1) in the rat retinas. Immunofluorescence staining was used to detect the number of F4/80-positive cells. Part of this study on human samples complied with the Declaration of Helsinki and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital of Hebei Eye Hospital (No. 2024LW30). All participants fully understood the study protocol and purpose and signed the informed consent form. The feeding and use of experimental animals adhered to the 3Rs alternatives, Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals and Laboratory Animal-Guideline for Ethical Review of Animal Welfare. The animal experimental study protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of Hebei Eye Hospital (No. 2024LW31). **Results** Proteomic analysis identified 425 quantifiable proteins, of which 84 showed significant differences between the DME and NPDR groups. HP was identified as a hub protein among the differentially expressed proteins, with a higher functional enrichment related to the regulation of inflammatory response. ELISA results showed that HP expression levels in the simple cataract, NPDR, and DME groups were (5.878 $\pm$ 0.462), (6.118 $\pm$ 0.215), and (6.769 $\pm$ 0.245)ng/ml, respectively, with a statistically significant overall difference ($F=36.47$, $P<0.0001$). The HP expression level in the DME group was significantly higher than that in the simple cataract and NPDR groups (both $P<0.05$). ROC curve analysis demonstrated that HP had high diagnostic accuracy for DME (AUC=0.986, $P<0.001$), with an HP level above 6.5 ng/ml in aqueous humor suggesting the possible development of DME in NPDR patients. The retinal vascular leakage ratios in the diabetes and diabetes+HP lentivirus groups were significantly higher than that in the control group, while the leakage ratio in the diabetes+HP lentivirus group was significantly lower than that in the diabetes group (all $P<0.05$). The mRNA expression levels of IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , and HMGB1 in the retina of the diabetes group were significantly higher than those in the control group, while those in the diabetes+HP lentivirus group were significantly lower than those in the diabetes and diabetes+empty vector groups (all $P<0.05$). Immunofluorescence staining showed that the number of F4/80-positive cells was significantly increased in the diabetes group compared with the control group, whereas it was markedly decreased in the diabetes+HP lentivirus group compared with the diabetes group. **Conclusions** HP is significantly upregulated in the aqueous humor of DME patients and the retinas of diabetic rats, potentially participating in retinal inflammatory response and vascular barrier dysfunction through the HMGB1 signaling pathway. Downregulation of HP ameliorates retinal vascular leakage and inflammatory response, suggesting that HP may be a potential therapeutic target for DME.

[Key words] Diabetic macular edema; Haptoglobin; High mobility group box 1; Proteomics; Retinal vascular barrier; Inflammatory response

Fund program: Hebei Province Medical Science Research Project Plan (20250250)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250521-00166

全球糖尿病患者约4.2亿,患病率持续上升,糖尿病及其并发症已成为重大公共卫生问题。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者的主要并发症之一,发生率约35%,是导致视功能受损甚至盲的主要原因^[1-2]。DR视力下降的机制复杂,涉及玻璃体积血、视网膜脱离、糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)等,其中DME因可致中心视力丧失,是DR患者视力下降的关键因素。我国糖尿病及DME发病率持续攀升^[3-4],2型糖尿病患者中DR和DME的5年发病率分别为46.89%和19.71%^[5],严重影响患者视功能和生活质量,给社会带来沉重负担。

目前DME的临床治疗主要包括全视网膜激光光凝、玻璃体腔注药及玻璃体切割手术^[6-8]。尽管玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物疗效显著,但仍有超过30%

的患者对单一抗VEGF治疗反应不佳^[9]。深入研究DME发病机制、开发个体化治疗方案及探索早期干预靶点仍是当前研究重点。

DME发病机制涉及多种生长因子异常表达,VEGF作为特异性促血管生成因子,在血管内皮细胞增殖和新生血管形成中起关键作用^[10-11],其抑制剂可通过保护血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)促进新生血管和黄斑水肿消退。此外,胰岛素样生长因子1、血管生成素、基质衍生因子1等多种因子在房水和玻璃体液中的表达谱呈特征性改变,协同参与DME病理过程。蛋白质组学技术为深入解析DME分子机制提供了新手段,有助于阐明疾病机制并发现治疗靶点^[12-14]。

触珠蛋白(haptoglobin, HP)是一种急性期反应糖蛋白,由肝细胞及其他细胞分泌,结构由 α 链和 β 链组

成,人类HP基因存在HP1-1、HP2-1和HP2-2共3种常见表型。HP通过调控巨噬细胞吞噬功能发挥免疫调节和炎症调节作用^[15],抑制细胞外基质明胶酶活性,并在银屑病中促进血管生成^[16]。本课题组前期研究发现非增殖性DR(non-proliferative DR,NPDR)和DME患者房水差异蛋白主要涉及细胞增殖、粘附、炎症反应等,HP在DME组房水中呈高表达^[17]。目前HP在DME发生和发展中的作用及机制尚未完全阐明。本研究旨在通过分析DME患者房水蛋白质组差异,靶向鉴定关键蛋白HP,探讨其调控血管屏障功能和炎症反应的可能机制,为DME的治疗提供新的候选靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者样本和实验动物来源 (1)患者样本来源 纳入2020年8月至2021年8月就诊于河北省眼科医院的白内障合并NPDR及白内障合并DME受试者各7例,收集其房水样本进行蛋白质组学检测。另纳入单纯性白内障患者、白内障合并NPDR患者及白内障合并DME患者各23例,收集其房水样本进行酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证。单纯性白内障组纳入标准:(1)年龄 ≥ 45 岁;(2)临床确诊为年龄相关性白内障,拟行常规白内障超声乳化摘除联合人工晶状体植入术;(3)术眼最佳矫正视力 < 0.3 (或logMAR视力 ≥ 0.5),且视力下降明确归因于晶状体混浊;(4)眼压正常,为10~21 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa);(5)术前角膜内皮细胞计数 $\geq 1\,500$ 个/ mm^2 ;(6)自愿参与本研究。NPDR组纳入标准:(1)年龄 ≥ 45 岁;(2)符合Emery分级的白内障核硬度 ≥ 3 级;(3)符合2型糖尿病和NPDR 2期诊断标准;(4)空腹血糖 < 8.3 mmol/L;(5)自愿参与本研究。DME组纳入标准:除需满足NPDR组纳入标准外,还需符合DME诊断标准。排除标准:(1)合并青光眼、年龄相关性黄斑变性、眼内炎、视网膜脱离等眼部疾病者;(2)既往有相关眼科手术史者;(3)肾功能不全者(血清肌酐 ≥ 120 $\mu\text{mol/L}$);(4)有控制不佳的严重全身性疾病者;(5)妊娠期或哺乳期女性;(6)3个月内有心肌梗死、脑梗死等病史者,凝血功能异常、无法接受手术者;(7)合并葡萄膜炎等其他可能干扰研究评估或治疗的疾病、全身或眼部应用药物治疗可能影响房水蛋白检测可靠性者;(8)发生与研究相关的严重不良事件者。NPDR组与DME组患者性别构成比、年龄、体重指数、空腹血糖、糖化血红蛋白比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表1)。单纯白内障组、NPDR组

和DME组患者性别构成比、年龄比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),体重指数、空腹血糖、糖化血红蛋白比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表2)。所有入组患者均接受超声乳化白内障吸除和人工晶状体植入术。术中侧切口制作完成后,经前房穿刺收集房水样本100 μl 。对于DME组患者,在每次玻璃体腔注药操作时额外采集房水100 μl 。所有采集的房水样本均于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冻存储存。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,研究方案经河北省眼科医院伦理委员会批准(批文号:2024LW30),所有参与者均充分了解研究方案及目的,并签署知情同意书。(2)实验动物来源 选取8~10周龄健康雄性SD大鼠42只,购自北京斯贝福生物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2024-0001],体重200~250 g,饲养于恒温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、恒湿(50 ± 10)%环境中,12 h光照/黑暗循环,自由摄食饮水。实验动物的喂养和使用遵循3R原则、《实验动物管理条例》和《实验动物福利伦理审查指南》,研究方案经河北省眼科医院动物实验伦理委员会批准(批文号:2024LW31)。

1.1.2 主要试剂及仪器 BCA法蛋白定量试剂盒(pc0020)、柠檬酸钠缓冲液(RC62702,北京索莱宝科技有限公司);HP人定量检测ELISA试剂盒(MBS2880564,美国MyBioSource公司);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(572201)、伊文思蓝(E2129,美国Sigma-Aldrich公司);TRIzol试剂(15596026,美国Invitrogen公司);F4/80抗体(ab300421,英国Abcam公司)。10 kDa超滤管(Amicon Ultra-0.5 ml,德国Merck Millipore公司);分光光度计(NanoDrop One,美国Thermo Fisher Scientific公司);ekspert nanoLC 415系统(ekspert nanoLC 415,美国Eksigent/AB SCIEX公司);TripleTOF[®] 6600质谱仪(美国AB SCIEX公司);共聚焦荧光显微镜(LSM 880,德国Carl Zeiss公司)。

1.2 方法

1.2.1 受试者房水样本相关试验

1.2.1.1 蛋白质组学检测 (1)样本制备与肽段处理 样本经含8 mol/L尿素、50 mmol/L NH_4HCO_3 及1 $\times$ Roche蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液室温处理5 min,冰浴超声破碎后4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 $\times g$ 离心10 min获取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度,取100 μg 等量蛋白进行还原(10 mmol/L二硫苏糖醇,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h)和烷基化(40 mmol/L碘乙酰胺,室温避光1 h)反应。处理后的蛋白溶液转移至经50 mmol/L NH_4HCO_3 预平衡的10 kD超滤管中离心除盐并清洗。更换收集管后,加入胰蛋白酶3 μg 于37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解12~16 h。酶解产物离心20 min收集,超纯水清洗,甲酸终止反应后真空干燥。干燥肽段用含

表1 用于蛋白质组学检测的NPDR和DME患者基线资料比较

Table 1 Comparison of baseline data between patients with NPDR and DME for proteomics analysis

组别	例数	性别(男/女, n) ^a	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) ^b	体重指数($\bar{x} \pm s$) ^b	空腹血糖($\bar{x} \pm s$, mmol/L) ^b	糖化血红蛋白($\bar{x} \pm s$, g/L) ^b
NPDR组	7	4/3	68.00±6.58	25.62±3.83	8.49±1.50	6.79±3.17
DME组	7	3/4	66.57±8.99	28.02±5.63	7.23±2.07	7.83±1.24
χ^2/t 值		8.858	0.339	0.760	1.090	0.809
P 值		0.847	0.740	0.462	0.308	0.434

注:(a: χ^2 检验; b: 独立样本 t 检验) NPDR: 非增殖性糖尿病视网膜病变; DME: 糖尿病性黄斑水肿Note: (a: χ^2 test; b: Independent samples t -test) NPDR: non-proliferative diabetic retinopathy; DME: diabetic macular edema

表2 用于ELISA验证的单纯白内障组、NPDR组和DME组患者基线资料比较

Table 2 Comparison of baseline data among the simple cataract, NPDR, and DME groups for ELISA validation

组别	例数	性别(男/女, n) ^a	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) ^b	体重指数($\bar{x} \pm s$) ^b	空腹血糖($\bar{x} \pm s$, mmol/L) ^b	糖化血红蛋白($\bar{x} \pm s$, g/L) ^b
单纯白内障组	23	10/13	62.04±5.64	24.08±1.37	6.04±0.76	6.08±0.94
NPDR组	23	12/11	63.00±3.91	27.08±3.13	9.34±1.46	8.78±1.44
DME组	23	13/10	62.39±4.75	28.56±2.86	8.95±1.39	9.04±1.66
χ^2/F 值		0.695	0.232	18.070	47.980	32.100
P 值		0.208	0.793	<0.001	0.005	0.037

注:(a: χ^2 检验; b: 单因素方差分析) ELISA: 酶联免疫吸附试验; NPDR: 非增殖性糖尿病视网膜病变; DME: 糖尿病性黄斑水肿Note: (a: χ^2 test; b: One-way ANOVA) ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; NPDR: non-proliferative diabetic retinopathy; DME: diabetic macular edema

0.1% 甲酸的水溶液复溶, 分光光度计定量后, 取 10 μ g 混合成样本池 S。部分样本池 S 肽段 (10 μ g) 直接用于数据依赖性采集 (data-dependent acquisition, DDA) 分析, 剩余部分经自制高 pH 反相分馏柱 (耐高 pH C18 填料) 分级, 依次经乙腈和 0.1% 甲酸溶液清洗、上样后, 采用递增浓度洗脱缓冲液收集多个馏分, 各取 4 μ g 进行 DDA 分析。(2) 液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 分析 酶解肽段首先在捕获柱 (C18, 5 μ m, 10×0.3 mm) 上以 10 μ l/min 流速富集 (流动相 A: 0.1% 甲酸, 2% 乙腈, 97.9% 水)。随后转移至分析柱 (C18, 3 μ m, 150×0.3 mm), 以 5 μ l/min 流速进行梯度洗脱 (流动相 B: 0.1% 甲酸, 97.9% 乙腈, 2% 水; 梯度程序: 0~1 min, 5%~6% B; 1~40 min, 6%~22% B; 40~52 min, 22%~80% B; 52~55 min, 维持 80% B; 55~56 min, 80%~5% B; 56~60 min, 维持 5% B)。洗脱肽段经电喷雾离子化后检测。DDA 模式参数: 一级质谱扫描范围质量电荷比为 300~1 500, 累积时间 0.25 s; 筛选电荷 +2~+5、质量偏差 <50 ppm 的前体离子, 每循环最多碎裂 60 个离子 (隔离时间 15 s, 动态碎裂能量); 二级质谱累积时间 0.035 s, 高灵敏度扫描。DIA 模式参数: 一级质谱扫描累积时间 0.25 s; 二级质谱采用 100 个可变窗口 (由 SWATH Variable Window Calculator_V1.1 计算), 每窗口累积时间 33 ms, 扫描范围质量电荷比为 100~1 500, 高灵敏度扫描模式。

1.2.1.2 蛋白质组学数据分析 使用 Spectronaut 软件 (v15) 对 DDA 模式采集的原始数据进行数据库搜索,

酶切方式为胰蛋白酶, 数据库为 Uniprot 人数据库 (2020.11 版, 含 20 368 个已注释蛋白)。对原始定量值进行 log2 转换以满足正态分布, 并使用 R 语言 preprocessCore 包的 normalize.median 函数对 log2 转换后的数据进行归一化。去除无基因名称的蛋白后, 利用 limma 包进行差异分析, 筛选 $P < 0.05$ 且变化倍数 (fold change, FC) >1.5 或 <0.67 的蛋白作为差异蛋白。进一步使用 corrpilot 包进行 Pearson 相关性分析, stats 包的 pcomp 函数进行主成分分析 (校正后 $P < 0.05$), 并通过 R 语言 (clusterProfiler 包) 进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 显著性阈值设定为 $P < 0.05$ 。此外, 利用 STRING 数据库 (v11.0) 对差异蛋白进行蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析。PPI 网络分析在 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 中进行: 进入平台后, 选择“Multiple proteins”功能模块; 输入目标蛋白质名称 (每行仅限输入 1 个蛋白质标识符), 或通过“Browse”按钮上传包含所需蛋白列表的 Excel 格式文件; 在“Organism”选项处, 需明确指定研究对象所属物种 (例如: 人类、大鼠、小鼠), 亦可启用“auto-detect”功能进行物种自动识别; 完成上述设置后, 点击“search”按钮执行分析; 生成的可视化相互作用网络图在结果页面下方进行个性化参数调整, 保存图像。

1.2.1.3 ELISA 法检测 HP 表达量 采用 ELISA 试剂盒对 HP 进行定量检测, 所有检测均设置双复孔。使



用包被缓冲液将捕获抗原稀释至适宜浓度(每孔包被量 20~200 μg),每孔加入 100 μl 稀释抗原溶液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后移除孔内液体;随后加入封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭反应 40 min,完成后使用洗涤缓冲液清洗酶标板 3 次。待测房水样本按 1:400 比例稀释后加入反应孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,再次洗涤 3 次。向各孔加入酶标记抗体工作液 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~60 min,充分洗涤后,每孔加入 100 μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺-过氧化氢尿素底物溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下显色 5 min;每孔添加 50 μl 终止液终止显色反应;终止后 20 min 内,于 492 nm 波长处测定各孔吸光度值,以空白孔归一化校正后进行数据分析。

1.2.1.4 基于 GEO 数据库的数据分析与验证 从美国国家生物技术信息中心的 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获取 DR 相关数据集 GSE60436。该数据集包含以下样本:3 例健康对照者的视网膜组织、3 例 PDR 患者的活性新生血管(active neovascularization, ANV)相关纤维血管膜(fibrovascular membrane, FVM)以及 3 例 PDR 患者的非活性新生血管(inactive neovascularization, nANV)相关 FVM。完成基因名称标准化处理后,对所有样本进行全转录组表达谱分析。随后,针对目标基因 HP 提取 3 个组(共 9 个样本)的每百万碱基片段数表达值。对提取数据进行统计学检验并生成可视化结果。

1.2.2 动物实验

1.2.2.1 DR 大鼠模型构建和治疗 将 STZ 溶解于预冷的柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.5),配制成 2% 溶液。采用随机数字表法方法将大鼠随机分为对照组、糖尿病组、糖尿病+空载病毒组、糖尿病+HP 慢病毒组,其中糖尿病+空载病毒组 6 只,其余 3 个组各 12 只。大鼠禁食 12 h 后,除对照组外,其他各组大鼠腹腔注射 STZ 溶液 50 mg/kg,连续 5 d;对照组注射等体积柠檬酸钠缓冲液。注射 STZ 后第 7 天,尾静脉采血测定空腹血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型建模成功。每周测体重和空腹血糖,成模 8 周后,糖尿病+空载病毒组、糖尿病+HP 慢病毒组大鼠玻璃体腔分别注射空载病毒和 HP 慢病毒,注射 1 周后取材行后续实验。

1.2.2.2 视网膜血管渗漏实验 将伊文思蓝溶解于生理盐水,配制成 1% 溶液,过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;对照组、糖尿病组、糖尿病+HP 慢病毒组各取 3 只大鼠,麻醉后尾静脉

注射伊文思蓝溶液 45 mg/kg,2 h 后麻醉动物并开胸暴露心脏,从左心室插入灌注针头,剪开右心房,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)灌注至流出液无色以清除未结合染料;摘取眼球后置于 4% 多聚甲醛中固定 10 min,解剖显微镜下分离视网膜,将视网膜组织加入 1 ml PBS 中匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\times$ g 离心 20 min 后取上清,加入等体积甲酰胺,60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18 h,以提取伊文思蓝;荧光显微镜观察视网膜平铺片,定量分析血管渗漏区域,使用分光光度计在 620 nm(激发波长)和 680 nm(发射波长)处测定吸光度,根据标准曲线计算伊文思蓝含量及其与视网膜重量比值。

1.2.2.3 定量 PCR 检测目的基因 mRNA 相对表达量 每组取 6 只大鼠,采用 TRIzol 试剂从大鼠视网膜组织中分离总 RNA。使用逆转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系包含 5 $\times$ 逆转录缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、逆转录酶、RNA 酶抑制剂以及随机引物。反应程序设定为:25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。使用 SYBR Green 预混液进行定量 PCR 扩增。引物序列见表 3,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。每个反应体系 20 μl ,包括 SYBR Green 预混液 10 μl ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.8 μl ,反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.8 μl ,cDNA 模板 2 μl ,无核酸酶水补充至 20 μl 。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 60 s,35 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.2.2.4 视网膜切片免疫荧光染色检测 F4/80 的表达和分布 对照组、糖尿病组、糖尿病+HP 慢病毒组各取 3 只大鼠,过量麻醉处死大鼠,摘取眼球,4% 多聚甲醛固定 48 h,OCT 试剂包埋眼球并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$,制作视网膜冰冻切片,4% 多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 洗 1 次,滴加封闭液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,更换为抗 F4/80 抗体继续孵育过夜,PBS 洗 3 次,滴加荧光二抗孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,滴加含 DAPI 封片剂,使用共聚焦荧光显微镜观察并成像。

表 3 PCR 引物序列
Table 3 PCR primer sequence

基因	正向引物	反向引物
<i>IL-1β</i>	5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3'	5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
<i>IL-2</i>	5'-GCGGCATGTTCTGGATTGACTC-3'	5'-CCACCACAGTTGCTGACTCATC-3'
<i>IL-6</i>	5'-AGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	5'-TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG-3'
<i>TNF-α</i>	5'-CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG-3'	5'-ATGGGCTACAGCCTTGCTCACTC-3'
<i>HMGB1</i>	5'-CCAAGAAGTGCTCAGAGAGGTG-3'	5'-GTCCTTGAACCTCTTTTGGTCTC-3'
<i>β-actin</i>	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'	5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

注:IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;HMGB:高迁移率族蛋白 B

Note: IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; HMGB: high mobility group box B

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件和 SPSS 18.0 软件进行统计分析和作图。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组各指标比较采用独立样本 *t* 检验;3 个组及以上各指标总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。计数资料以频数表示,各组性别构成比比较采用 χ^2 检验。在 HP 房水水平对 DME 的预测价值评估中,绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC) 曲线,计算曲线下面积(area under curve, AUC)、95% 置信区间(confidence interval, CI)及显著性水平,以评估 HP 作为潜在生物标志物的诊断性能。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPDR 和 DME 患者房水样本蛋白质组学检测结果分析

NPDR 和 DME 患者房水样本中共检测到 425 个可定量蛋白(图 1A),其中表达水平存在统计学差异的蛋白共 84 个,包括表达水平上调蛋白 58 个,表达水平下调蛋白 26 个(图 1B)。GO 富集分析结果显示,差异蛋白所富集的生物学过程主要包括血浆脂蛋白氧化的负调节、调节肠道胆固醇吸收、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 产生的阳性调节、经典 Wnt 信号通路的负调节、细胞增殖调节、细

胞黏附调节、炎症反应调控等过程(图 1C)。分子学功能主要富集于高密度脂蛋白颗粒受体结合、胰岛素样生长因子结合、抗氧化应激活性、纤维连接蛋白结合和铁离子转运等(图 1D)。重要的细胞组分包括免疫球蛋白复合物、微纤维、细胞外基质、粘附连接和粘附小凹等(图 1E)。

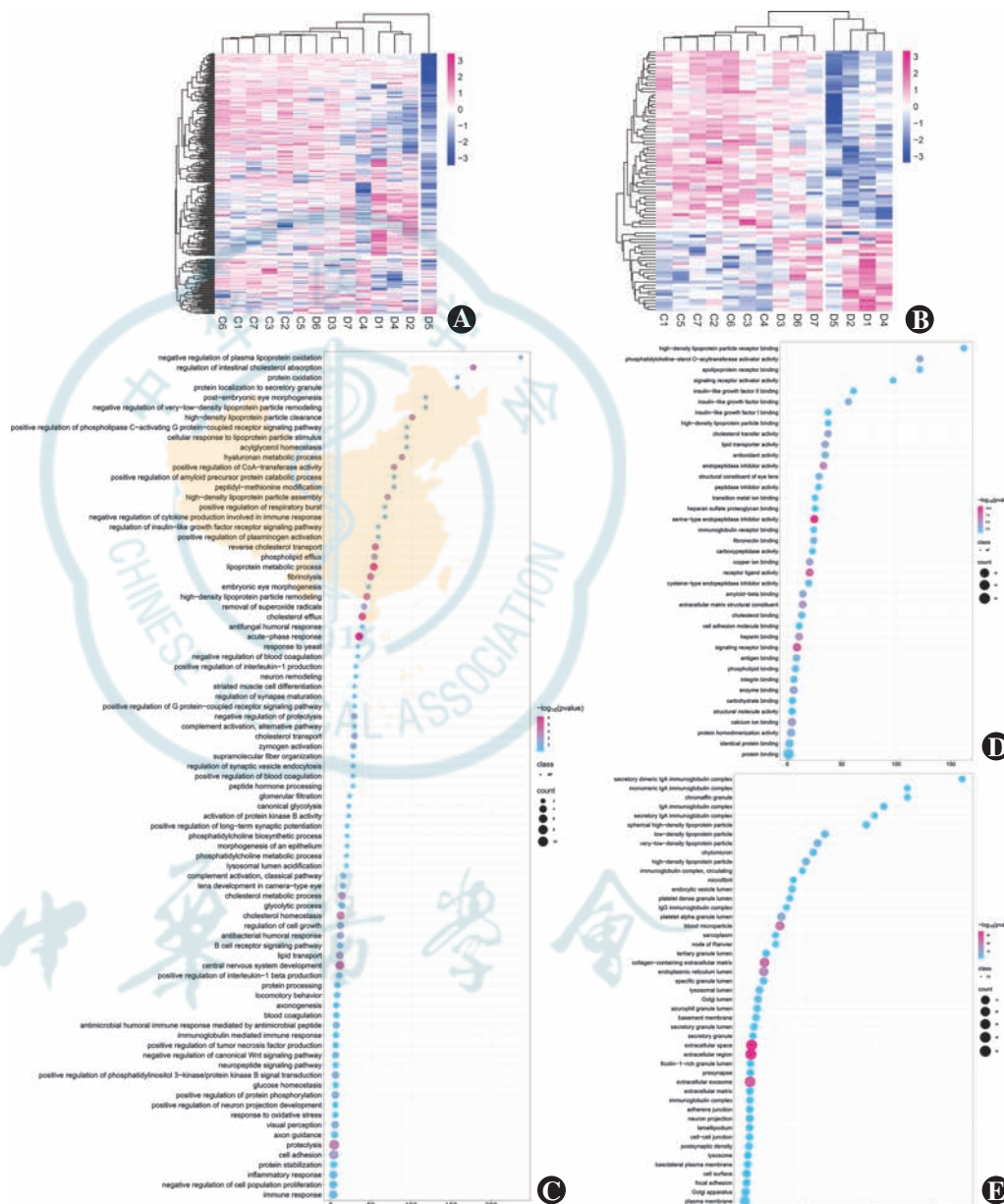


图1 NPDR和DME患者房水样本定量蛋白质组学分析结果 A:总定量蛋白热图 C代表NPDR组,D代表DME组 B:表达水平差异具有统计学意义的差异蛋白热图 A和B源自PMID:37981180^[17] C:差异蛋白的生物学过程富集分析结果 D:差异蛋白的分子学功能富集分析结果 E:差异蛋白的细胞组分富集分析结果 NPDR:非增殖性糖尿病视网膜病变;DME:糖尿病性黄斑水肿

Figure 1 Quantitative proteomic results of aqueous humor samples from patients with NPDR and DME A: Heatmap of total quantified proteins C represented the NPDR group and D represented the DME group B: Heatmap of differentially expressed proteins with statistically significant differences Images A and B were adapted from PMID: 37981180^[17] C: Gene Ontology biological process enrichment analysis of differentially expressed proteins D: Molecular function enrichment analysis of differentially expressed proteins E: Cellular component enrichment analysis of differentially expressed proteins NPDR: non-proliferative diabetic retinopathy; DME: diabetic macular edema

2.2 NPDR和DME患者房水样本差异表达蛋白PPI分析及靶点蛋白筛选

STRING数据库检索结果显示84个差异蛋白中有73个蛋白具有相互作用的相关性,与急性炎症反应、炎症反应、抗氧化应激活性和刺激反应性生物学功能密切相关的蛋白是HP、ITIH4、APOA2、F2、PARK7和F12,其中HP是这些差异蛋白的枢纽蛋白,并具有与调控炎症反应更为相关的功能富集度(图2A)。此外,将蛋白质组学检测所得到的差异蛋白进行cluster聚类分析,发现包括HP、F2、APOA1、APOA2、FGG等在内的蛋白均富集于炎症反应相关信号通路,并且HP仍处于核心枢纽地位(图2B)。基于此,本研究选定HP作为靶点蛋白,进行后续的验证和功能探究。

2.3 各组HP表达水平比较

单纯白内障组、NPDR组和DME组房水中HP表达水平分别为 (5.878 ± 0.462) 、 (6.118 ± 0.215) 、 (6.769 ± 0.245) ng/ml,总体比较差异有统计学意义($F=36.47$, $P<0.001$),其中DME组HP表达水平明显高于单纯白内障组和NPDR组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);单纯白内障组和NPDR组HP表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)(图3A)。ROC曲线显示,当患者房水中HP表达水平升高至6.5 ng/ml以上,提示NPDR患者可能发生DME;房水HP水平无法用于区分患者是否发生NPDR(图3B)。健康对照组、ANV-FVM组、nANV-FVM组HP表达水平分别为 -0.193 ± 0.152 、 0.054 ± 0.059 、 0.128 ± 0.110 ,总体比较差异有统计学意义($F=5.26$, $P<0.05$),其中ANV-FVM组、nANV-FVM组HP表达水平均高于健康对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图3C)。

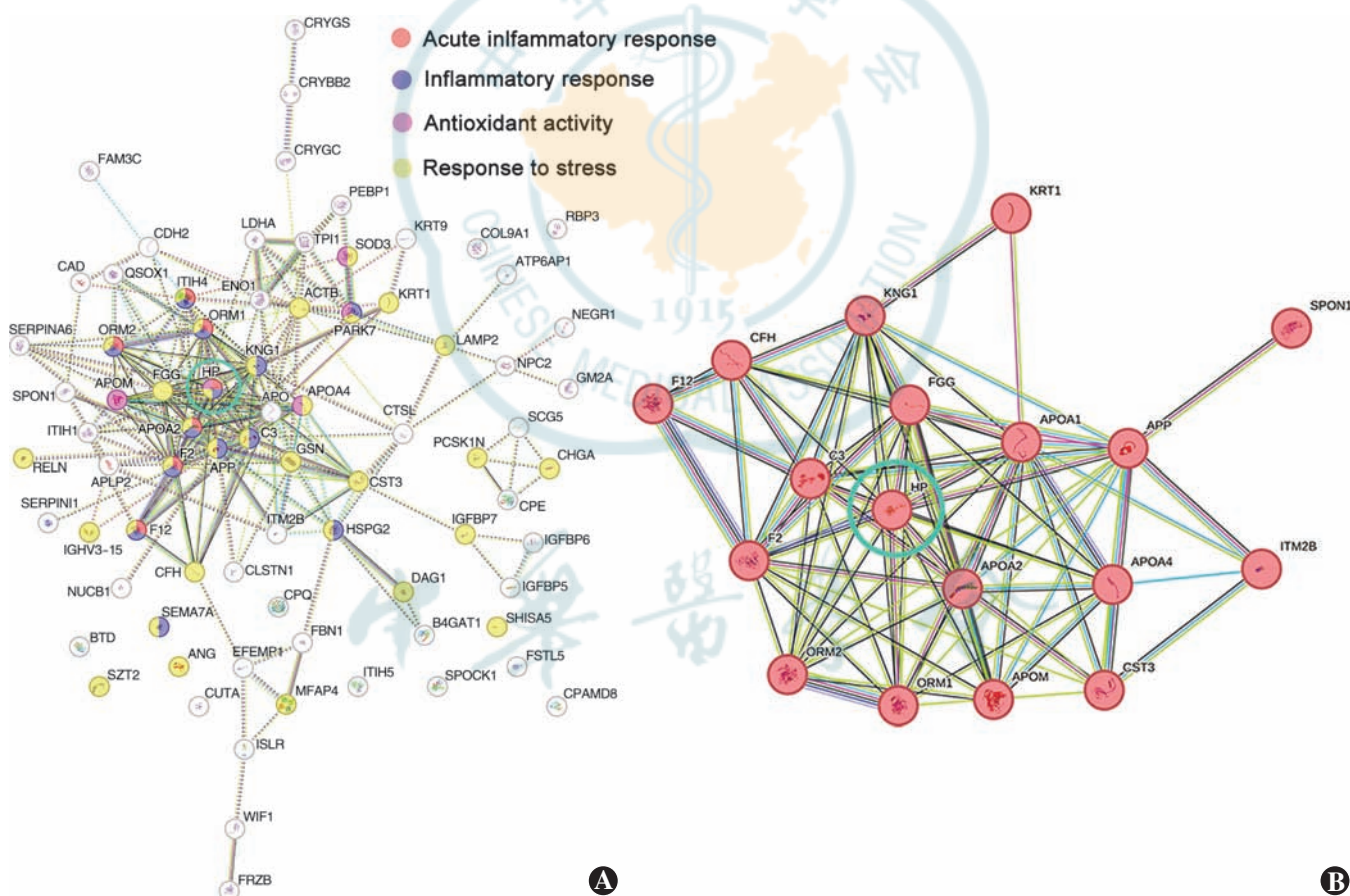


图2 基于STRING数据库的NPDR和DME患者房水样本差异表达蛋白的蛋白-蛋白相互作用分析 A:差异蛋白的相互作用分析 圆圈代表差异蛋白,连线代表2个蛋白之间存在潜在的相互作用,不同颜色分别代表该蛋白所富集的分子学功能,包括急性炎症反应、炎症反应、抗氧化应激活性和刺激反应性 B:富集于炎症反应的差异蛋白相关性分析 绿色圆圈框选出的为枢纽蛋白即靶点蛋白 NPDR:非增殖性糖尿病视网膜病变;DME:糖尿病性黄斑水肿

Figure 2 Protein-protein interaction analysis of differentially expressed proteins in aqueous humor samples from NPDR and DME patients based on STRING database A: Interaction network of differentially expressed proteins Each circle represented a differentially expressed protein, and the connecting lines indicated potential interactions between two proteins. Different colors represented the molecular functions enriched for each protein, including acute inflammatory response, inflammatory response, antioxidant activity, and stimulus response B: Correlation analysis of differentially expressed proteins enriched in inflammatory response The proteins circled in green represented the hub proteins (target proteins) NPDR: non-proliferative diabetic retinopathy; DME: diabetic macular edema

2.4 各组大鼠视网膜渗漏情况比较

视网膜血管渗漏实验结果显示,对照组大鼠视网膜血管呈网状结构分布,无明显血管渗漏,糖尿病组大鼠视网膜血管出现明显渗漏,糖尿病+HP慢病毒组视网膜仍存在一定程度渗漏情况,但明显好于糖尿病组(图4A)。对照组、糖尿病组、糖尿病+HP慢病毒组血管渗漏比值分别为 1.045 ± 0.128 、 2.187 ± 0.311 、 1.528 ± 0.265 ,总体比较差异有统计学意义($F=30.56$, $P<0.05$),其中糖尿病组、糖尿病+HP慢病毒组血管渗漏比值较对照组明显升高,糖尿病+HP慢病毒组血管渗漏比值较糖尿病组明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图4B)。

2.5 各组大鼠视网膜炎症因子表达水平比较

各组大鼠视网膜IL-1 β 、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和高迁移率族蛋白B1(high mobility group box B1, HMGB1)mRNA相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=50.59$ 、 62.98 、 14.11 、 32.43 、 19.53 ,均 $P<0.01$),其中糖尿病组视网膜IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 和HMGB1 mRNA相对表达量较对照组均升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);糖尿病+HP慢病毒组IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 和HMGB1 mRNA相对表达量较糖尿病组、糖尿病+空载病毒组明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表4)。视网膜免疫荧光染色结果显示糖尿病组F4/80染色阳性细胞数量较对照组和糖尿病+HP慢病毒组明显升高(图5)。

3 讨论

黄斑水肿是DR、视网膜色素变性、脉络膜视网膜炎、葡萄膜炎、视网膜静脉阻塞及脉络膜炎症性疾病等多种眼底疾病导致视功能损害的共同病理机制之一^[18-20]。尽管视网膜激光光凝、玻璃体腔注射抗VEGF药物及玻璃体切割术等治疗手段可部分改善患者视功能并延缓疾病进展,但不同治疗方法均存在局限性且疗效差异显著,部分患者最终发展为难治性黄斑水肿^[18-20]。由于DME的病理改变主要累及眼后节,直接获取视网膜组织进行分子生物学分析在临床上难以实现,而房水作为眼内微环境的重要体液,其蛋白及细胞因子水平可间接反映视网膜病理状态^[12,21]。基于此,本研究采用房水样本作为研究对象,通过定量蛋白质组学技术解析DME患者的分子病理特征,这一方法学选择具有临床可操作性和科学合理性。

本研究采用LC-MS/MS定量蛋白质组学技术对NPDR和DME患者房水样本进行差异蛋白筛选。该平台具有高通量、高灵敏度和高分辨率的优势,能够在复杂体液样本中同时检测数千种蛋白质的表达水平。既往研究基于LC-MS/MS法在PDR患者房水中鉴定出10种与PDR相关的蛋白质,采用2D-DIGE和MALDI-TOF MS技术的研究亦发现DR患者房水中存在11种差异蛋白^[22-23]。与上述研究相比,本研究聚焦于NPDR向DME进展这一关键病理阶段,在疾病进程的早期干预层面具重要的临床意义。本研究所采用

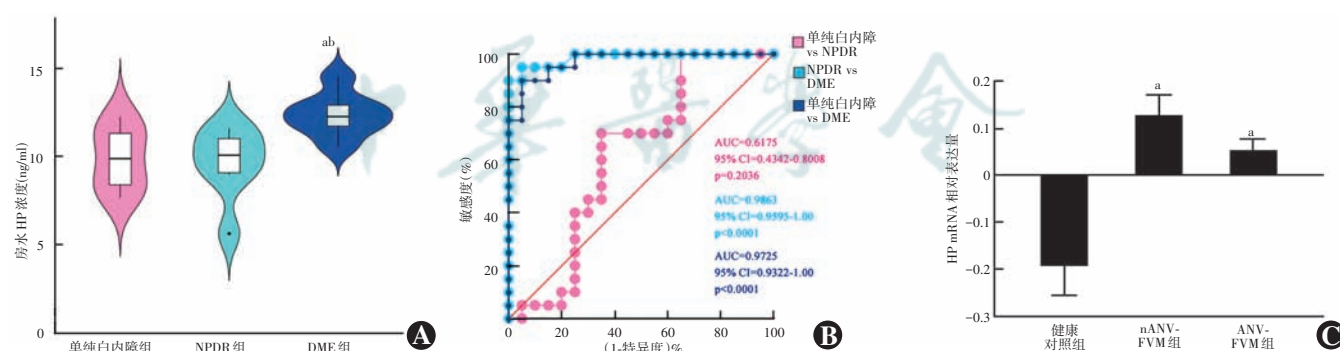


图3 各组HP表达水平比较 A:单纯白内障组、NPDR组和DME组房水中HP表达水平比较 $F=36.47$, $P<0.001$ 。与单纯白内障组比较,^a $P<0.05$;与NPDR组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验; $n=23$) B:单纯白内障组、NPDR组和DME组房水中HP分类能力的ROC曲线 C:健康对照组、nANV-FVM组、ANV-FVM组HP表达水平比较 $F=5.26$, $P<0.05$ 。与健康对照组比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验; $n=3$) HP:触珠蛋白;NPDR:非增殖性糖尿病视网膜病变;DME:糖尿病性黄斑水肿;ROC:受试者工作特征;AUC:曲线下面积;CI:置信区间;nANV:非活性新生血管;FVM:纤维血管膜;ANV:活性新生血管

Figure 3 Comparison of HP expression levels among groups A: Comparison of aqueous humor HP expression levels among the simple cataract, NPDR, and DME groups $F=36.47$, $P<0.001$. Compared with the simple cataract group, ^a $P<0.05$; compared with the NPDR group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=23$) B: ROC curves of aqueous humor HP for distinguishing the simple cataract, NPDR, and DME groups C: Comparison of HP expression levels among the healthy control, nANV-FVM, and ANV-FVM groups $F=5.26$, $P<0.05$. Compared with the healthy control group, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=3$) HP: haptoglobin; NPDR: non-proliferative diabetic retinopathy; DME: diabetic macular edema; ROC: receiver operating characteristic; AUC: area under the curve; CI: confidence interval; nANV: inactive neovascularization; FVM: fibrovascular membrane; ANV: active neovascularization

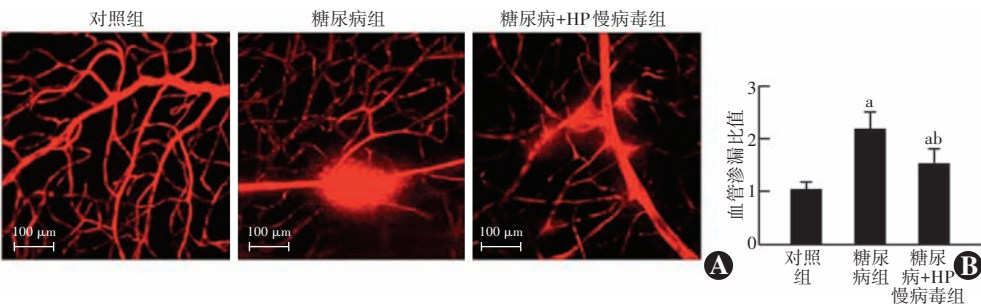


图4 各组大鼠视网膜渗漏情况比较 A:各组伊文思蓝染色图($\times 200$,标尺=100 μm) B:各组血管渗漏比值比较 $F=30.56$, $P<0.05$ 。与对照组比较, $^aP<0.05$;与糖尿病组比较, $^bP<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验; $n=3$) HP:触珠蛋白

Figure 4 Comparison of rats retinal leakage among different groups A: Representative images of Evans blue staining in each group ($\times 200$, scale bar=100 μm) B: Comparison of vascular leakage ratios among groups $F=30.56$, $P<0.05$. Compared with the control group, $^aP<0.05$; compared with the diabetes group, $^bP<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=3$) HP: haptoglobin

表4 各组大鼠视网膜炎症因子mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of the mRNA expression level of inflammatory factors in rats retina among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	IL-1 β	IL-2	IL-6	TNF- α	HMGB1
对照组	6	1.04 $\pm$ 0.10	1.03 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.22	1.07 $\pm$ 0.14	1.05 $\pm$ 0.12
糖尿病组	6	2.05 $\pm$ 0.13 ^a	2.05 $\pm$ 0.16 ^a	2.27 $\pm$ 0.46 ^a	1.84 $\pm$ 0.19 ^a	3.24 $\pm$ 0.75 ^a
糖尿病+空载病毒组	6	2.03 $\pm$ 0.09	2.01 $\pm$ 0.18	2.28 $\pm$ 0.48	1.92 $\pm$ 0.07	3.14 $\pm$ 0.58
糖尿病+HP慢病毒组	6	1.45 $\pm$ 0.28 ^{bc}	1.75 $\pm$ 0.12 ^{bc}	1.74 $\pm$ 0.17 ^{bc}	1.54 $\pm$ 0.18 ^{bc}	2.12 $\pm$ 0.39 ^{bc}
F值		50.59	62.98	14.11	32.43	19.53
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001

注:与对照组比较, $^aP<0.05$;与糖尿病组比较, $^bP<0.05$;与糖尿病+空载病毒组比较, $^cP<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验) IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;HMGB:高迁移率族蛋白B;HP:触珠蛋白

Note: Compared with the control group, $^aP<0.05$; compared with the diabetes group, $^bP<0.05$; compared with the diabetes+empty vector group, $^cP<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; HMGB: high mobility group box B; HP: haptoglobin

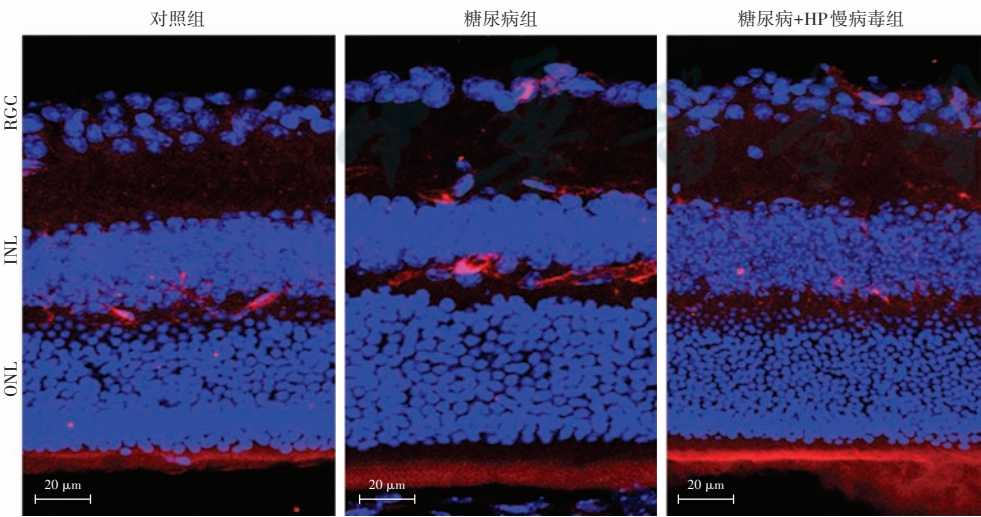


图5 对照组、糖尿病组和糖尿病+HP慢病毒组视网膜F4/80免疫荧光染色图(DAPI $\times 200$,标尺=20 μm) 糖尿病组F4/80染色阳性细胞数量较对照组明显升高,糖尿病+HP慢病毒组F4/80染色阳性细胞数量明显少于糖尿病组 HP:触珠蛋白;RGC:视网膜神经节细胞;INL:内核层;ONL:外核层

Figure 5 F4/80 immunofluorescence staining results of retina in control group, diabetes group and diabetes+HP lentivirus group (DAPI $\times 200$; scale bar=20 μm) The number of F4/80-positive cells was significantly increased in the diabetes group compared with the control group, whereas it was markedly decreased in the diabetes+HP lentivirus group compared with the diabetes group HP: haptoglobin; RGL: retinal ganglion cell; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer

的FASP方法结合10 kD超滤管进行酶解前处理,可有效去除十二烷基硫酸钠等表面活性剂对质谱检测的干扰。但该方法亦存在一定局限:超滤过程可能导致部分疏水性蛋白或高分子量蛋白的非特异性吸附损失。此外,本研究样本量相对有限,结果的外推性有待扩大样本量后进一步验证。

DME的发生和发展与BRB破坏密切相关,BRB由内屏障和外屏障组成,其正常功能的维持依赖于多种因素的相互作用^[24]。在糖尿病状态下,视网膜血管内皮细胞损伤、周细胞丢失及基底膜增厚等病理改变逐渐累积,最终导致BRB功能紊乱^[25]。白细胞与血管内皮的异常黏附在糖尿病早期即已存在,通过细胞间黏附分子-1介导的白细胞停滞与内皮细胞凋亡、血管阻塞及血管通透性增加密切相关^[26-27];阻断细胞间黏附分子-1或抑制其上游信号通路可减轻白细胞黏附并维持BRB功能^[28]。上述研究提示,DME的发生机制主要围绕内皮细胞功能障碍和视网膜局部炎症反应两大核心环节。本研究的蛋白质组学富集分析显示,DME患者房水中的差异蛋白主要富集于炎症反应、氧化应激、细胞外基质重塑及细胞黏附功能等生物学过程,这与DME公认的核心病理机制高度吻合,从蛋白组学层面验证了本研究方法的可靠性。其中,HP作为本研究发现的

核心差异蛋白之一,其在DME房水中的高表达以及富集于炎症相关通路的结果,进一步支持了HP可能通过调控视网膜局部炎症反应参与BRB破坏的假说。

基于遗传多态性,HP 3种主要表型中HP 2-2抗氧化和血红蛋白结合能力最弱,该表型的糖尿病患者更易出现DR等并发症^[29-30]。本研究发现HP在DME患者房水和PDR患者纤维增殖膜中均呈现高表达,且经鉴定所检测到的HP为HP2-2表型,是链蛋白裂解形成的前体^[31]。本研究进一步通过体内实验证实,在STZ诱导的糖尿病大鼠模型中下调HP2-2表达后,伊文思蓝渗漏比值显著降低,F4/80阳性细胞数量明显减少,提示HP2-2在DME病理过程中可能发挥促炎和促血管渗漏作用。但本研究动物模型为STZ诱导的1型糖尿病模型,与临床2型糖尿病并发DME患者存在一定差异;此外,观察周期为4周,尚不能完全模拟DME的慢性进展特征,后续需采用更合适的动物模型和更长观察时间窗加以验证。

HMGB1是一种高度保守的核蛋白,在细胞外作为DAMP分子可激活核因子 κ B和丝裂原活化蛋白激酶信号通路,促进TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等炎症因子释放^[32-33]。在DR中,HMGB1参与BRB破坏和病变进展^[34-35]。本研究结果显示,糖尿病大鼠视网膜中HMGB1及炎症因子表达水平均显著升高,而HP2-2敲低后上述指标均明显回落,提示HP2-2可能位于HMGB1-炎症通路上游。后续研究需通过Co-IP、双荧光素酶报告基因实验等手段,进一步明确HP2-2调控HMGB1的具体分子机制,并使用特异性抑制剂验证该通路的因果层级关系。

综上所述,本研究基于蛋白质组学分析揭示了DME发生和发展过程中多个关键分子和信号通路的参与,强调局部炎症反应、氧化应激、细胞外基质重塑及BRB功能紊乱在病理机制中的核心地位。特别地,HP在房水和纤维增殖膜中的高表达,以及其与链蛋白和HMGB1的功能关联,提示其在调控BRB破坏及炎症反应中的重要作用;HMGB1作为炎症介质,其表达与HP呈正相关,可能通过激活炎症通路进一步加重视网膜损伤。本研究提出了HP-HMGB1轴在DME中的潜在致病机制,并证实其调控可缓解视网膜炎症和血管屏障功能障碍。该发现为揭示难治性DME的分子机制提供了新视角,也为靶向该信号通路开发个体化治疗策略提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张越:酝酿和设计实验、实施研究、文章撰写及修改;李佳鱼、翟欣然:动物实验;姚瑶:实施研究、采集数据、分析数据;李丽艳:

统计学分析;肖哲、陈晗、庞午:实施研究、文章修改;杨赞章:审阅文章、临床样本收集及蛋白预处理;张铭连:设计实验、审阅文章及定稿

参考文献

- [1] Faghihi S, Faghihi H, Faiez MA, et al. Persistent diabetic macular edema: a comprehensive review of current treatments and emerging therapeutic options[J]. J Curr Ophthalmol, 2024, 36(3): 229-241. DOI: 10.4103/joco.joco_133_24.
- [2] Chen L, Chen M, Huang W. Comparative efficacy and safety of anti-VEGF agents with and without laser therapy for diabetic macular edema: a network meta-analysis[J]. Eur J Ophthalmol, 2025, 35(6): 2347-2360. DOI: 10.1177/11206721251350017.
- [3] Shahriari MH, Sabbaghi H, Asadi F, et al. Artificial intelligence in screening, diagnosis, and classification of diabetic macular edema: a systematic review[J]. Surv Ophthalmol, 2023, 68(1): 42-53. DOI: 10.1016/j.survophthal.2022.08.004.
- [4] Heng LZ, Comyn O, Peto T, et al. Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments[J]. Diabet Med, 2013, 30(6): 640-650. DOI: 10.1111/dme.12089.
- [5] 金佩瑶, 彭金娟, 邹海东, 等. 上海市新泾社区2型糖尿病患者5年随访的前瞻性调查研究1. 糖尿病视网膜病变和糖尿病黄斑水肿的发病率及危险因素[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(4): 363-367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.016.
- [6] Jin PY, Peng JJ, Zou HD, et al. A 5-year prospective study of type 2 diabetes patients in Shanghai Xinjing Community 1. The incidence and risk factors of diabetic retinopathy and diabetic macular edema in Chinese type 2 diabetes residents[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(4): 363-367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.016.
- [7] Zhao X, Lin Z, Long T, et al. Early combined conbercept and dexamethasone implant therapy for diabetic macular edema[J]. Int Ophthalmol, 2025, 45(1): 267. DOI: 10.1007/s10792-025-03646-8.
- [8] Heng LZ, Sivaprasad S, Crosby-Nwaobi R, et al. A prospective randomised controlled clinical trial comparing a combination of repeated intravitreal Ozurdex and macular laser therapy versus macular laser only in centre-involving diabetic macular oedema (OZLASE study) [J]. Br J Ophthalmol, 2016, 100(6): 802-807. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307136.
- [9] Nakajima T, Roggia MF, Noda Y, et al. Effect of internal limiting membrane peeling during vitrectomy for diabetic macular edema: systematic review and meta-analysis[J]. Retina, 2015, 35(9): 1719-1725. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000622.
- [10] Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE[J]. Ophthalmology, 2012, 119(4): 789-801. DOI: 10.1016/j.opht.2011.12.039.
- [11] Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, et al. Anti-vascular endothelial growth factor for proliferative diabetic retinopathy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 2014(11): CD008721. DOI: 10.1002/14651858.CD008721.pub2.
- [12] Pakzad-Vaezi K, Albani DA, Kirker AW, et al. A randomized study comparing the efficacy of bevacizumab and ranibizumab as pre-treatment for pars plana vitrectomy in proliferative diabetic retinopathy[J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina, 2014, 45(6): 521-524. DOI: 10.3928/23258160-20141118-06.
- [13] Qu SC, Xu D, Li TT, et al. iTRAQ-based proteomics analysis of aqueous humor in patients with dry age-related macular degeneration[J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(11): 1758-1766. DOI: 10.18240/ijo.2019.11.15.
- [14] Santos FM, Gaspar LM, Ciordia S, et al. iTRAQ quantitative proteomic



- analysis of vitreous from patients with retinal detachment[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1157. DOI: 10.3390/ijms19041157.
- [14] Yang Q, Lu H, Song X, et al. iTRAQ-based proteomics investigation of aqueous humor from patients with Coats' disease[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158611[2025-10-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416065>. DOI: 10.1371/journal.pone.0158611.
- [15] Krzyszczyk P, Kang HJ, Kumar S, et al. Anti-inflammatory effects of haptoglobin on LPS-stimulated macrophages: role of HMGB1 signaling and implications in chronic wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2020, 28(4): 493-505. DOI: 10.1111/wrr.12814.
- [16] Maresca B, Cigliano L, Corsaro MM, et al. Quantitative determination of haptoglobin glycoform variants in psoriasis[J]. *Biol Chem*, 2010, 391(12): 1429-1439. DOI: 10.1515/BC.2010.146.
- [17] Zhang Y, Xu M, He H, et al. Proteomic analysis of aqueous humor reveals novel regulators of diabetic macular edema[J]. *Exp Eye Res*, 2024, 239: 109724. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109724.
- [18] Tomkins-Netzer O, Ismetova F, Bar A, et al. Functional outcome of macular edema in different retinal disorders[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 48: 119-136. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.05.002.
- [19] Noma H, Funatsu H, Mimura T, et al. Functional-morphologic correlates in patients with branch retinal vein occlusion and macular edema[J]. *Retina*, 2011, 31(10): 2102-2108. DOI: 10.1097/IAE.0b013e318212e24d.
- [20] Tranos PG, Wickremasinghe SS, Stangos NT, et al. Macular edema[J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49(5): 470-490. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.06.002.
- [21] Pollreis A, Funk M, Breitwieser FP, et al. Quantitative proteomics of aqueous and vitreous fluid from patients with idiopathic epiretinal membranes[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 108: 48-58. DOI: 10.1016/j.exer.2012.11.010.
- [22] Balaiya S, Zhou Z, Chalam KV. Characterization of vitreous and aqueous proteome in humans with proliferative diabetic retinopathy and its clinical correlation[J]. *Proteomics Insights*, 2017, 8: 1178641816686078. DOI: 10.1177/1178641816686078.
- [23] Chiang SY, Tsai ML, Wang CY, et al. Proteomic analysis and identification of aqueous humor proteins with a pathophysiological role in diabetic retinopathy[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(10): 2950-2959. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.12.006.
- [24] Do Carmo A, Ramos P, Reis A, et al. Breakdown of the inner and outer blood retinal barrier in streptozotocin-induced diabetes[J]. *Exp Eye Res*, 1998, 67(5): 569-575. DOI: 10.1006/exer.1998.0546.
- [25] Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, et al. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(1): 147-152. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63952-1.
- [26] Joussen AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *FASEB J*, 2004, 18(12): 1450-1452. DOI: 10.1096/fj.03-1476fje.
- [27] Kaji Y, Usui T, Ishida S, et al. Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(2): 858-865. DOI: 10.1167/iov.06-0495.
- [28] Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(19): 10836-10841. DOI: 10.1073/pnas.96.19.10836.
- [29] Bertaggia E, Scabia G, Dalise S, et al. Haptoglobin is required to prevent oxidative stress and muscle atrophy[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100745[2025-10-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959824>. DOI: 10.1371/journal.pone.0100745.
- [30] Mogarekar MR, Hampe MH. Haptoglobin2-2 phenotype is an additional risk factor of retinopathy in type 2 diabetes mellitus[J]. *Indian J Hum Genet*, 2013, 19(2): 154-158. DOI: 10.4103/0971-6866.116111.
- [31] Vanuytsel T, Vermeire S, Cleynen I. The role of Haptoglobin and its related protein, zonulin, in inflammatory bowel disease[J/OL]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(5): e27321[2025-10-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868498>. DOI: 10.4161/tisb.27321.
- [32] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4): 331-342. DOI: 10.1038/nri1594.
- [33] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101323.
- [34] Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 367-388. DOI: 10.1146/annurev-immunol.021908.132603.
- [35] El-Asrar AM, Nawaz MI, Kangave D, et al. High-mobility group box-1 and biomarkers of inflammation in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1829-1838.

(收稿日期: 2025-11-16 修回日期: 2026-07-04)

(本文编辑: 施晓萌 骆世平)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿: 登录中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)

中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究