

# RIG-I 在糖尿病视网膜病变中的表达及其与炎症反应的相关性研究

李慧 贺鹤平

南昌职业大学, 中国·江西 南昌 330500

**摘要:** 本研究探讨了 RIG-I 在糖尿病视网膜病变 (DR) 中的表达及其与炎症反应的相关性。研究发现, RIG-I 在增生性糖尿病性视网膜病变 (PDR) 患者的玻璃体中表达增加, 并且在糖尿病大鼠模型中, 随着糖尿病病程的延长, RIG-I 在视网膜组织中的表达也显著增加。这些结果表明 RIG-I 与 DR 有明显的相关性。研究还推测 RIG-I 可能在 Müller 细胞中表达增加, 并作为 NF- $\kappa$ B 信号的正调节剂参与糖尿病视网膜病变中的炎症反应。本研究为理解 RIG-I 在糖尿病视网膜病变中的作用提供了新的视角, 并为未来的治疗策略提供了潜在的靶点。

**关键词:** 糖尿病视网膜病变; RIG-I; 炎症反应; Müller 细胞; NF- $\kappa$ B 信号通路

## The Expression of RIG-I in diabetes Retinopathy and Its Correlation with Inflammatory Response

Hui Li Heping He

Nanchang Vocational University, Nanchang, Jiangxi, 330500, China

**Abstract:** This study investigated the expression of RIG-I in diabetes retinopathy (DR) and its correlation with inflammatory reaction. The study found that the expression of RIG-I increased in the vitreous of patients with proliferative diabetes retinopathy (PDR), and in the diabetes rat model, with the prolongation of the course of diabetes, the expression of RIG-I in retinal tissue also increased significantly. These results indicate a significant correlation between RIG-I and DR. The study also speculated that RIG-I may increase its expression in Müller cells and participate in the inflammatory reaction in diabetes retinopathy as a positive regulator of NF -  $\kappa$  B signal. This study provides a new perspective for understanding the role of RIG-I in diabetes retinopathy, and provides a potential target for future treatment strategies.

**Keywords:** diabetes retinopathy; RIG-I; inflammatory response; Müller cells; NF- $\kappa$ B signaling pathway

### 1 研究背景

糖尿病视网膜病变 (Diabetic Retinopathy, DR) 是劳动人口视力受损的主要原因<sup>[1]</sup>。全世界所有 40 岁及以上糖尿病患者的 DR 患病率估计为 34.6% (9300 万人)<sup>[2]</sup>。阿尔茨海默病在世界范围内造成巨大的公共卫生负担, 这凸显了继续寻求超越糖尿病治疗新标准的新方法的重要性。根据视网膜病变的严重程度, DR 在临床上可分为非增生性糖尿病性视网膜病变 (非增生性 DR, NPDR) 和增生性糖尿病性视网膜病变 (增生性 DR, PDR)。

炎症是对损伤或压力的非特异性反应, 涉及多种功能和分子介质。当病原体入侵时, 模式识别受体, 如 Toll (TLR) 受体和高级糖基化终产物受体<sup>[3]</sup>。与这些受体结合的病原体分子称为病原体结合分子模型<sup>[4]</sup>。TLR 的激活或在没有病原体的情况下的组织应激会导致核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的抑制作用, 后者进入细胞核并刺激促炎性细胞因子, 急性期蛋白和核转录因子的转录。趋化因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和趋化因子 monocytochrome-1 (MCP-1)。所有这些促炎趋化因子在单核细胞和白细胞的募集和激活以及随后的炎症反应中起着重要作用。炎症通常通过协调程序迅速解决, 其中

包括分解素、脂氧化合物和保护素<sup>[5]</sup>。如果不及及时解决, 炎症的典型有益影响就会消失, 随之而来的是损伤的后果。

炎症, 特别是调节失调的先天免疫激活在 DR 的发病机制中起着重要作用。在 DR 的早期阶段, 当 BRB 完整时, 视网膜固有免疫系统, 即小胶质细胞和补体系统, 在低水平上被激活, 以响应来自视网膜内代谢中间产物的有害伤害。

RIG-I 是一种高度重要的胞质模式识别受体 (PRR), 参与感知病毒感染和诱导干扰素 (IFN) 的产生。该基因在全反式维 A 酸诱导急性早幼粒细胞白血病 (APL) 细胞分化过程中首次被发现。在过去的几十年里, RIG-I 在先天抗病毒免疫中的结构、抗病毒信号通路和功能已被很好地记录下来<sup>[6-10]</sup>。然而, 由于关于 RIG-I 在其他细胞活动中的生物学功能的新发现, 长期持有的作为 PRR 的 RIG-I 范式已经得到了扩展<sup>[11-14]</sup>。例如, 除了识别外源病毒 RNA, RIG-I 在某些情况下还与各种内源性 RNA 密切相关, 如 microRNAs、snRNAs 和内源性逆转录病毒 (ERV), 它们参与了许多重要的细胞活动, 如癌细胞的治疗耐药和扩张, 以及 T 细胞非依赖性 B 细胞的激活<sup>[13-15]</sup>。RIG-I 还在急性髓系白血病 (AML) 和肝细胞癌 (HCC) 中发挥肿瘤抑制因

子的作用<sup>[15]</sup>。这些观察表明, RIG-I 是一种多功能蛋白质, 其功能远远超过 PRR, 而且 RIG-I 的生物学功能比人们之前认为的要复杂得多。

最近的数据也显示, RIG-I 与各种慢性炎症疾病有关<sup>[1-5]</sup>; 有研究表明 RIG-I 是促炎机制的组成部分<sup>[6-10]</sup>。但 RIG-I 在糖尿病视网膜病变尚未见研究报道。

## 2 材料与方法

### 2.1 研究对象

收集 2023 年 1 月至 2024 年 10 月于安义县人民医院眼科就诊的 PDR 患者共 9 例, 黄斑前膜及孔源性视网膜脱离 4 例。

根据纳入和排除标准筛选后研究人群为 PDR 患者 9 例, 前膜及孔源性视网膜脱离 4 例。

#### 2.1.1 观察组

糖尿病性视网膜病变的诊断标准: ①符合糖尿病的诊断标准。糖尿病视网膜病变的诊断由同一位眼科医生根据 1984 年糖尿病视网膜病变的国家临床试验标准确定。②完善了 PDR 玻璃体切割术的外科治疗指征。

排除标准: ①并发动静脉视网膜阻塞, 老年性黄斑变性 (AMD), 脉络膜血管疾病, 例如息肉, 葡萄膜炎, 青光眼和其他眼部疾病和炎性疾病; ②患有严重的心脏病, 肝或肾功能衰竭, 肿瘤等严重器质性损害。

剔除标准: ①因病情变化引起的治疗方案的变化; ②所抽玻璃体因样本含量太少, 检测结果欠准确。

#### 2.1.2 对照组

纳入标准: 因黄斑前膜、孔源性视网膜脱离需行玻璃体切割手术治疗。

排除标准: ①同观察组排除标准; ②糖尿病或血糖异常。

剔除标准: ①因病情变化, 改变治疗方案; ②所抽玻璃体因样本含量太少, 检测结果欠准确。

为进一步论证可靠性, 本研究在课题组前期糖尿病大鼠视网膜组织切片上免疫荧光检测 RIG-I 表达。

### 2.2 实验方法

PDR 和用于控制收集透明的方法: PDR 被引入三通艳冷酰胺的组合, 透明操作之后, 方法操作切入透明, JieZhuangTi 平晶提取 0.3 毫升, 无菌注射管 EP, 80℃之前

储存在冰箱

ropes-i 检测: 严格按照 ropes-i ELISA 试剂盒 (III-rx15145-96t) 的说明, 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法检测硫酸盐中 ropes-i 蛋白的表达水平。

免疫荧光: ①将保存的大鼠视网膜组织石蜡切片于 37℃ 烤箱烘干 30 分钟, 65℃ 烤箱烘干 1 小时, 将切片冷却至室温。②脱蜡至水。二甲苯脱蜡 2 次, 8min · 次<sup>-1</sup>。80%~100% 梯度乙醇复水 4 步, 各 1min。PBS 水洗 3 次, 5min · 次<sup>-1</sup>。③抗原修复: 37℃ 3% 过氧化酶处理 10min, pH 9.0 TE 微波加热 1 分 30 秒观察切片表面起泡, 如无明显起泡, 继续微波加热 50 秒, 冷却至室温, PBS 洗 3 次, 各 5min。④免疫反应: 滴加 PBS 稀释的 5% 山羊血清封闭 60min, 之后甩去封闭液滴加 RIG-I 一抗工作液 (RIG-I 和 1%BSA 配比为 1 : 75), 4℃ 孵育至少 16 小时。⑤显色 (避光操作): PBS 洗 3 次, 各 5min, 甩干多余液体, 滴加二抗工作液 (1%BSA 稀释成 1 : 200), 室温静置 1 小时, 甩去二抗工作液, PBS 洗 3 次, 各 5min; 甩干多余液体, 滴加抗荧光素衰减封片剂, 盖上盖玻片, 用镊子钝端轻轻敲击盖玻片, 去除气泡使封片完全, 再沿盖玻片边缘涂一层指甲油封闭边缘以免封片剂泄露, 静置 20min 待指甲油凝固, 最后进行激光共聚焦显微镜下观察拍片。

使用统计软件 SPSS 23.0 对本研究的数据进行统计分析, 并且本研究的所有测量数据均以正态分布, 以标准差的均值表示, 并使用 t 检验比较两者之间的差异。

## 3 结果

### 3.1 两组患者一般资料比较

在 PDR 组和对照组之间比较心率, BMI、FPG 和 HbA1c 水平没有统计学上的显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3.2 两组 ELISA 结果比较

ELISA 检测结果表明, 对照组中敷料蛋白的表达为  $(40.63 \pm 3.55) \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ , 而在 PDR 组中观察到显著增加。对照组中 FGF2 蛋白的表达为  $(51.49 \pm 7.96) \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ 。两组之间的差异具有统计学意义 ( $t=2.257, P < 0.05$ )。

### 3.3 免疫荧光

如图 1, 在糖尿病造模成功 3 月的糖尿病大鼠视网膜组织切片中 RIG-I 染色明显强于正常同月龄大鼠及糖尿病造模成功 2 月的糖尿病大鼠视网膜组织切片。

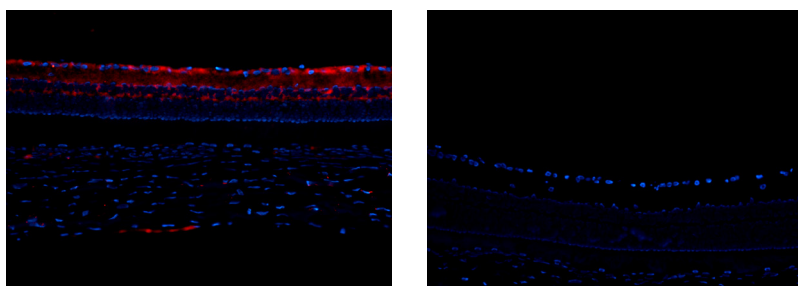


图 1 大鼠视网膜石蜡切片免疫荧光染色, 左图为糖尿病造模成功 3 月大鼠染色, 右图为正常同月龄大鼠染色

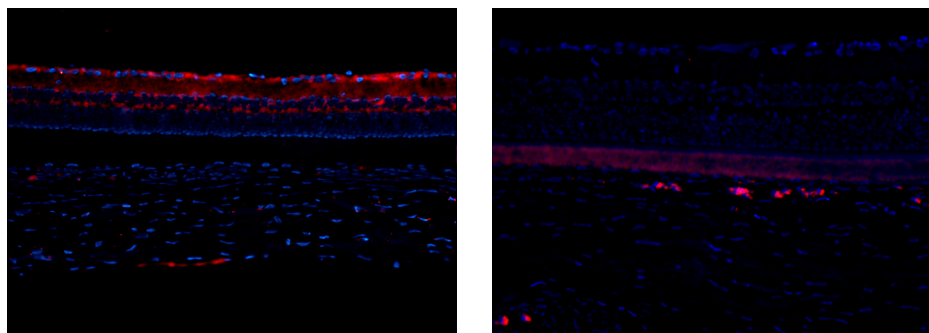


图 2 大鼠视网膜石蜡切片免疫荧光染色, 左图为糖尿病造模成功 3 月大鼠染色, 右图为糖尿病造模成功 2 月大鼠染色

## 4 讨论

在 PDR 患者玻璃体中检测到 RIG-I 表达增加, 同时在糖尿病大鼠造模成功后 3 月的糖尿病大鼠视网膜组织切片中亦发现表达增加, 因此推测 RIG-I 与糖尿病视网膜病变有明显的相关性。

Müller 细胞是视网膜的主要胶质细胞。他们是唯一的细胞跨越整个宽度的视网膜和有密切接触的视网膜血管和视网膜神经元, 结合图 1、图 2 推测 RIG-I 在 Müller 细胞中表达增加。

有文献表明 RIG-I 作为 NF- $\kappa$ B 信号的正调节剂<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B 被认为是天然免疫和炎症性疾病中普遍存在的转录因子<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 活化是启动下游炎症细胞因子和生长因子, 包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 释放的关键。最近的研究表明缺氧相关的刺激可以通过激活 RIG-I 引发神经系统炎症。因此, 推测在糖尿病视网膜病变情况下, 缺氧相关的刺激通过激活 RIG-I 上调 NF- $\kappa$ B 信号通路, 引起炎症因子的表达, 进而导致 Müller 细胞发生炎症。

## 5 结语

糖尿病视网膜病变是全世界最具视力威胁的眼病之一, 其发病率预计在不久的将来将大幅度增加。糖尿病视网膜病变的发病机制尚未完全阐明。

RIG-I 在糖尿病视网膜中相关机制仍需进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Klein B E. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy[J]. *Ophthalmic Epidemiol*,2007(14):179-183.
- [2] Zhang X, Saaddine J B, Chou C F, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States[J]. *JAMA*,2010(304):649-656.
- [3] Sun J K, Lin M M, Lammer J, et al. Disorganization of the retinal inner layers as a predictor of visual acuity in eyes with center-involved diabetic macular edema[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014(132):1309-1316.
- [4] Jialal I, Kaur H. The role of toll-like receptors in diabetes-induced inflammation: Implications for vascular complications[J]. *Curr Diabetes Rep*,2012(12):172-179.

- [5] Serhan C N, Brain S D, Buckley C D, et al. Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms[J]. *FASEB J*,2007(21):325-332.
- [6] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses[J]. *Nat Immunol*,2004,5(7):730-7.
- [7] Seth RB, Sun L, Ea CK, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3[J]. *Cell*,2005,122(5):669-82.
- [8] Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity[J]. *J Immunol*,2005,175(5):2851-8.
- [9] Saito T, Hirai R, Loo YM, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,104(2):582-7.
- [10] Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA[J]. *Cell*,2011,147(2):423-35.
- [11] Zhang NN, Shen SH, Jiang LJ, et al. RIG-I plays a critical role in negatively regulating granulocytic proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(30):10553-8.
- [12] Jiang LJ, Zhang NN, Ding F, et al. RA-inducible gene-I induction augments STAT1 activation to inhibit leukemia cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(5):1897-902.
- [13] Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. *Cell*,2014,159(3):499-513.
- [14] Hou J, Zhou Y, Zheng Y, et al. Hepatic RIG-I predicts survival and interferon- $\alpha$  therapeutic response in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2014,25(1):49-63.
- [15] Karlsen TA, Brinchmann JE. Liposome delivery of microRNA-145 to mesenchymal stem cells leads to immunological off-target effects mediated by RIG-I[J]. *Mol Ther*,2013,21(6):1169-81.

作者简介: 李慧 (1994-), 女, 中国江西南昌人, 本科, 助教、护师, 从事护理教育和老年护理研究。