

Toll 样受体 4 对氧诱导视网膜新生血管发生的促进作用及其机制

徐文芹 尹婕 王雨生

710032 西安,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

通信作者:王雨生,Email:wangys003@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.007

【摘要】 背景 研究发现,Toll 样受体 (TLRs) 在视网膜新生血管的形成中发挥重要作用,但其作用机制尚不清楚。目的 探讨 TLR4 对小鼠氧诱导视网膜病变 (OIR) 中新生血管生成的作用及其机制。方法 将 18 只 7 日龄新生 C57BL/6J 小鼠以随机数字表法按小鼠窝别分为常氧组、OIR 组及 OIR+脂多糖 (LPS)-EB 组,常氧组小鼠在正常氧环境中饲养,OIR 组及 OIR+LPS-EB 组小鼠于生后第 7 天 (P7) 与母鼠置于体积分数 (75±2)% 高氧氧箱中饲养 5 d 以诱导 OIR 模型,于 P12 在正常氧环境中饲养,OIR+LPS-EB 组 P12 小鼠腹腔内注射 LPS-EB,剂量为 1 mg/kg,OIR 组同法注射 PBS。各组摘取 P17 小鼠眼球于质量分数 4% 多聚甲醛中固定并行视网膜铺片和 Lectin 染色,计算视网膜无血管区和新生血管区面积占全视网膜的百分比。各组制备 P17 小鼠眼后节组织冰冻切片并行免疫荧光检测,计数小鼠 5 mm 视网膜全长活化小胶质细胞数目;采用 CD11b 和 TLR4 免疫荧光双标记法检测各组小鼠视网膜小胶质细胞中 CD11b、TLR4 的表达及其分泌血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素 1β (IL-1β) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的水平。结果 常氧组 P17 小鼠视网膜血管分布和形态正常,OIR 组和 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠视网膜中央均出现无血管区和新生血管簇,OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜无血管区面积比为 (18.47±1.32)%,新生血管面积比为 (3.29±0.85)%,分别大于 OIR 组的 (15.78±1.44)% 和 (1.77±0.19)%,差异均有统计学意义 ($t=3.36, P=0.01; t=4.22, P=0.00$)。免疫荧光结果显示,常氧组 P17 小鼠视网膜中活化小胶质细胞数量极少,OIR 组和 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠视网膜中活化小胶质细胞荧光强度增强,活化小胶质细胞数量增加,其中 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中小胶质细胞数目明显多于 OIR 组,差异有统计学意义 [(95.50±4.77)/5 mm 与 (74.83±4.17)/5 mm, $t=8.00, P<0.01$]。常氧组小鼠视网膜中 TLR4 阳性小胶质细胞数量极少,OIR 组和 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中 TLR4 荧光增强,TLR4 阳性小胶质细胞数量明显增加,OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中 TLR4 阳性小胶质细胞数目明显多于 OIR 组,差异有统计学意义 [(49.50±6.38)/5 mm 与 (28.17±6.24)/5 mm, $t=5.86, P<0.01$]。常氧组 P17 小鼠视网膜中 CD11b 和 VEGF/IL-1β/TNF-α 共表达的小胶质细胞数量分别为 (1.17±0.75)/5 mm, 0 和 0,而 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中共表达 CD11b 和 VEGF/IL-1β/TNF-α 的小胶质细胞数量多于 OIR 组,差异有统计学意义 [(44.50±8.78)/5 mm 与 (28.50±5.61)/5 mm, $F=44.07, P<0.01$; (24.10±6.49)/5 mm 与 (16.00±3.46)/5 mm, $F=11.31, P<0.01$; (33.83±14.82)/5 mm 与 (23.00±2.83)/5 mm, $t=19.92, P<0.01$]。结论 TLR4 可促进 OIR 小鼠视网膜新生血管的生成,其作用机制可能与 TLR4 激活视网膜小胶质细胞中相关的下游信号通路,促进血管生长因子及炎症因子的释放有关。

【关键词】 Toll 样受体 4; 视网膜新生血管; 血管生成; 缺血/病理; 神经胶质细胞/代谢; 动物模型; 近交系 C57BL 小鼠; 炎症介质/代谢; 信号转导

基金项目:国家自然科学基金项目 (81271014、81470655、81570856)

Promoting effect of Toll like receptor 4 on oxygen-induced retinal neovascularization and its mechanism Xu Wenqin, Yin Jie, Wang Yusheng

Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese People's Liberation Army, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Wang Yusheng, Email: wangys003@126.com

【Abstract】 **Background** Studies showed that Toll like receptors (TLRs) play an important role in the development of retinal angiogenesis. However, the effect and mechanism of TLR4 affecting angiogenesis in oxygen induced retinopathy (OIR) had not been clarified yet. **Objective** This study aimed to investigate the mechanism of TLR4 in oxygen induced retinal neovascularization in mice. **Methods** Eighteen 7-day-old (P7) C57BL/6J mice were randomly divided into normoxic group, OIR model group and OIR + lipopolysaccharide (LPS)-EB group. OIR models were established by exposing the mice with maternal mouse to 75% oxygen environment for 5 days, then 1 mg/kg LPS-EBO and PBS were intraperitoneally injected in P12 mice in the OIR+LPS-EB group and OIR model

group, respectively. Whole retinal flatmounts of P17 mice were prepared and Lectin staining was performed to calculate the ratio of avascular and neovascular area to retina area. The frozen sections of the posterior ocular segment were prepared, and the number of activated microglial cell was detected by immunofluorescence technique, and the expressions of CD11b and TLR4 in the microglial cells as well as the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were assayed by fluorescence double labeling method. The use and care of the experimental animals complied with ARVO Statement. **Results** The distribution and morphology of retinal vessels were normal in P17 mice of the normoxic group, and avascular and new blood vessels cluster were found in the mice of the OIR group and OIR+LPS-EB group. The ratio of avascular area was (18.47 \pm 1.32)% and that of the new blood vessel area was (3.29 \pm 0.85)% in the OIR+LPS-EB group, which were increased in comparison with (15.78 \pm 1.44)% and (1.77 \pm 0.19)% of the OIR group ($t=3.36, P=0.01; t=4.22, P=0.00$). Immunofluorescence results displayed a few Iba1⁺ microglia cells in the normoxic group, the cells number were significantly higher in the OIR+LPS-EB group than that in the OIR group ([95.50 \pm 4.77]/5 mm versus [74.83 \pm 4.17]/5 mm; $t=8.00, P<0.01$). TLR4⁺ microglia cells were few in the normoxic group, and the cells number were evidently higher in the OIR+LPS-EB group than that in the OIR group ([49.50 \pm 6.38]/5 mm versus [28.17 \pm 6.24]/5 mm, $t=5.86, P<0.01$). The number of microglia cells coexpressing CD11b with VEGF/IL-1 β /TNF- α were (1.17 \pm 0.75)/5 mm, 0 and 0 in P17 mice of the normoxic group, respectively, and the cells number in the OIR+LPS-EB group was more than that in the OIR group ([44.50 \pm 8.78]/5 mm versus [28.50 \pm 5.61]/5 mm, $F=44.01, P<0.01; [24.10\pm 6.49]/5 mm$ versus [16.00 \pm 3.46]/5 mm, $F=11.31, P<0.01; [33.83\pm 14.82]/5 mm$ versus [23.00 \pm 2.83]/5 mm, $t=19.92, P<0.01$). **Conclusions** TLR4 promotes retinal neovascularization probably by activating specific signaling pathways downstream of microglia cells and accelerating the release of vascular growth factors and inflammatory factors.

[Key words] Toll like receptor 4; Retinal neovascularization; angiogenesis; Ischemia/pathology; Neuroglia/metabolism; Disease models, animal; Mice, inbred C57BL; Inflammation mediators/metabolism; Signal transduction

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271014, 81470655, 81570856)

视网膜新生血管性疾病主要包括视网膜静脉阻塞、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 和早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 等, 严重危害患者的视力和生活质量^[1]。近年研究发现, Toll 样受体家族 (Toll like receptors, TLRs) 介导的炎症反应在视网膜新生血管的发生中发挥一定作用^[2]。本研究组前期的研究证实, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 加重大鼠氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 的程度^[3]。LPS 是 TLR4 的激动剂, 而 TLR4 是视网膜小胶质细胞表面一类重要的识别受体。既往研究证实, OIR 模型视网膜新生血管阶段活化的小胶质细胞增多^[4], 但目前尚不清楚小胶质细胞中的 TLR4 是否参与新生血管生成的调节。本研究中观察小鼠视网膜血管形态学变化、小胶质细胞的激活及其相关分子的表达情况, 间接探讨 TLR4 在视网膜新生血管发生中的作用和机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 18 只, 饲养温度为 (25 \pm 1) $^{\circ}$ C, 湿度为 59% ~ 61%, 每日光照与黑暗时间各 12 h, 由专人管理。本研究经第四军医大学实验动物伦理委员会批准, 实验动物的饲养及使用均遵照 ARVO 规范。

1.1.2 主要试剂及仪器 LPS-EB (美国 Invivogen 公司); 罗丹明 (TRITC) 标记的蓖麻子凝集素 (Lectin) (美国 Vector 公司); 兔抗小鼠 Iba1 一抗 (019-19741) (日本 Wako 公司); 兔抗小鼠 TLR4 (ab13556)、CD11b (ab1211)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) (ab46154)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (ab6671)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) (ab9722) 一抗 (英国 Abcam 公司); Alex488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (A0423)、Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (C2306)、DAPI 试剂盒 (BD5010)、Triton X-100、牛血清蛋白 (西安国安生物科技有限公司); 氧气、氮气 (第四军医大学西京医院器材科)。FSX100 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); ECLIPSE Ti 型激光扫描共焦显微镜 (日本 Nikon 公司); CM1900 型冰冻切片机 (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及 OIR 模型的建立 新生小鼠 3 窝, 每窝任意取 6 只, 共 18 只, 按照随机数字表法分为常氧组、OIR 组和 OIR+LPS-EB 组。OIR 组和 OIR+LPS-EB 组小鼠于出生后第 7 天 (P7) 至 P12 与母鼠共同置于体积分数 (75 \pm 2)% 高氧氧箱中饲养以建立 OIR 模型, 于 P12 返回正常空气中饲养^[5], OIR+LPS-EB 组和 OIR 组小鼠分别腹腔内注射 LPS-EB (1 mg/kg) 和等量

PBS。常氧组小鼠则始终置于正常空气中饲养。

1.2.2 小鼠视网膜组织铺片 3 个组小鼠均于 P17 腹腔内注射质量分数 1% 戊巴比妥钠行全身麻醉后,经左心室先后灌注 20 ml 质量分数 1% PBS 及质量分数 4% 多聚甲醛,小鼠全身僵硬、尾部翘起者为灌注成功。摘取右侧眼球,将眼球置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 2 h,去除角膜、晶状体和残留玻璃体,从角膜缘处将视网膜与外层巩膜、脉络膜分离,将视网膜置于质量分数 1% Triton X-100+质量分数 1% 牛血清白蛋白溶液中,4 °C 封闭 12 h。将视网膜置于 Lectin (1:100 溶于 PBS) 中,4 °C 避光孵育 12 h。PBS 洗 3 次,从 4 个径线剪开视网膜,以内层向上铺片,用体积分数 50% 甘油封片,于荧光显微镜下观察并拍片。采用 Photoshop CS3 软件对所拍摄的视网膜局部荧光图像进行融合和重建,得到完整的视网膜铺片图。参照文献[6]的方法统计每张完整视网膜铺片图的无血管区、新生血管区及全视网膜的像素值,参照文献[7]的方法计算无血管区和新生血管区占全视网膜面积的百分比。

1.2.3 小鼠视网膜组织冰冻切片的制作 按上述方法处死 P17 小鼠并摘除其左侧眼球,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h;去除角膜和晶状体,并将眼球后段组织依次置于质量分数 20% 和 30% 蔗糖溶液中进行梯度脱水。使用 OCT 包埋组织后制备 8 mm 冰冻切片,-20 °C 保存。

1.2.4 免疫荧光染色计数视网膜中小胶质细胞数量 取 1.2.3 制备的冰冻切片,室温下干燥 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 3% 牛血清白蛋白+1% Triton X-100 室温封闭 2 h;加入兔抗小鼠 Iba1 一抗(1:500)4 °C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入 Alex488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:200)室温孵育 2 h;PBS 洗 3 次,每次 5 min,DAPI 染色 5 min,50% 甘油封片,100 倍荧光显微镜下观察并拍照,计数 5 mm 视网膜全长阳性细胞数。

1.2.5 免疫荧光双染色法检测各组小鼠视网膜中 CD11b、TLR4、VEGF、IL-1 β 和 TNF- α 的表达 取 1.2.3 制备的冰冻切片,室温下干燥 1 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 3% 牛血清白蛋白+1% Triton X-100 室温封闭 2 h。分别滴加 CD11b(1:100)、TLR4(1:400)、VEGF(1:100)、TNF- α (1:100)、IL-1 β 一抗(1:100)4 °C 孵育过夜;然后滴加 Alex488 标记的山羊抗兔 IgG 和 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:200)室温孵育 2 h,PBS 洗涤后 DAPI(1:1000)室温下染色 10 min,洗涤后体积分数 50% 甘油封片。将铺片在载玻片上展

平,50% 甘油封片后激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量相同荧光强度范围内面积,并统计双阳性细胞数量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间方差经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组三水平实验设计,常氧组、OIR 组和 OIR+LPS-EB 组间小鼠视网膜小胶质细胞中 TLR4 平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)及 VEGF 阳性小胶质细胞数量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。OIR 组与 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜无血管区和新生血管区面积比、视网膜中活化小胶质细胞数目、TLR4⁺ 小胶质细胞数目及相关炎性因子阳性小胶质细胞数量的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜无血管区面积比和新生血管面积比

视网膜铺片 Lectin 染色显示,常氧组 P17 小鼠视网膜已完全血管化,血管发育良好,分布均匀;OIR 组及 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠视网膜后极部可见无血管区,其无血管区面积百分比分别为(15.78 \pm 1.44)%和(18.47 \pm 1.32)%,2 个组间比较差异有统计学意义($t=3.360, P=0.007$)。OIR 组和 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠可见视网膜血管迂曲,分布不均匀,其中以 OIR+LPS-EB 组更明显。OIR 组 P17 小鼠视网膜中周部可见视网膜新生血管簇,OIR 组和 OIR+LPS-EB 组新生血管面积百分比分别为(1.77 \pm 0.19)%和(3.29 \pm 0.85)%,2 个组间比较差异有统计学意义($t=4.220, P=0.002$)(图 1,表 1)。

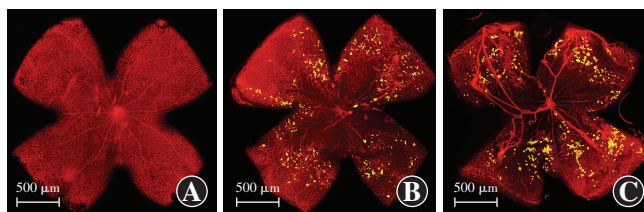


图 1 各组 P17 小鼠的视网膜铺片(TRITC $\times 100$, 标尺=500 μm)

A: 常氧组小鼠视网膜血管呈现红色荧光,形态及走行正常,血管从后极部到周边部规则分布,均有血流灌注 B: OIR 组小鼠视网膜后极部视网膜存在大片无血管区,中周部可见大量视网膜新生血管簇(黄色标记) C: OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜无血管灌注区和新生血管簇的面积均大于 OIR 组

表 1 P17 小鼠视网膜无血管区和新生血管区所占面积百分比 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	无血管区面积比	新生血管区面积比
OIR 组	6	15.78±1.44	1.77±0.19
OIR+LPS-EB 组	6	18.47±1.32	3.29±0.85
<i>t</i>		3.36	4.22
<i>P</i>		0.01	0.00

注: OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖 (独立样本 *t* 检验)

2.2 各组小鼠视网膜中活化小胶质细胞数目

活化的小胶质细胞呈阿米巴样。常氧组 P17 小鼠视网膜中视网膜神经节细胞层仅见极少量活化状态的小胶质细胞; OIR 组视网膜神经节细胞层和内丛状层可见大量活化的小胶质细胞, 内核层和外丛状层也可见少量活化的小胶质细胞, OIR 组和 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中活化状态的小胶质细胞数目明显增多, 分别为 (74.83±4.17)/5 mm 和 (95.50±4.77)/5 mm, 2 个组间比较差异有统计学意义 ($t=8.00, P<0.01$) (图 2)。

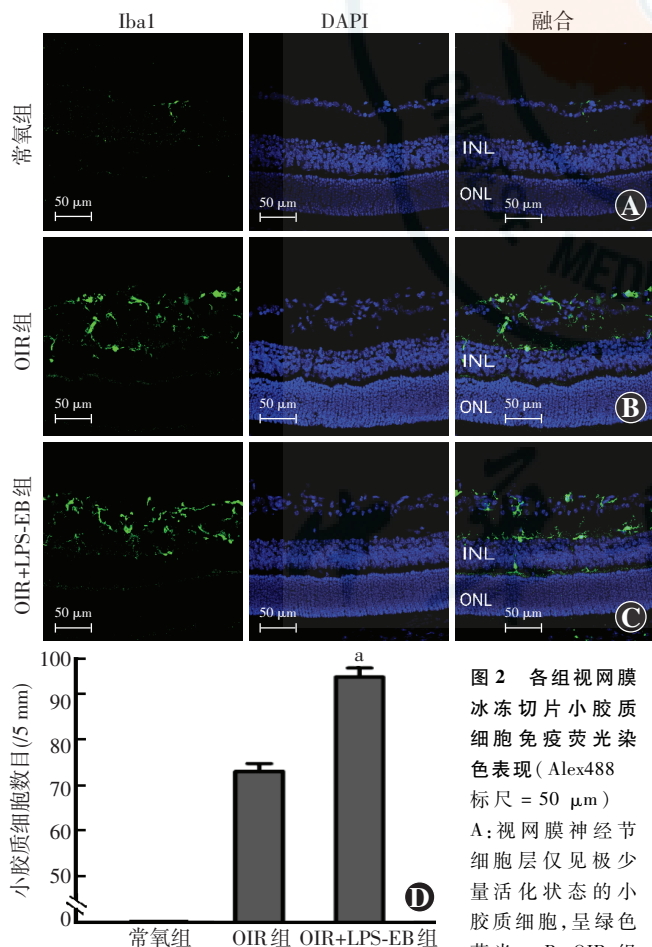


图 2 各组视网膜冰冻切片小胶质细胞免疫荧光染色表现 (Alex488 标尺 = 50 μm)
 A: 视网膜神经节细胞层仅见极少量活化状态的小胶质细胞, 呈绿色荧光 B: OIR 组可见大量活化的小胶质细胞 C: OIR+LPS-EB 组活化状态的小胶质细胞数明显多于 OIR 组 D: 各组视网膜小胶质细胞数量的量化比较 与 OIR 组比较, $^a P<0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n=6$) OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖; INL: 内丛状层; ONL: 外丛状层

2.3 各组小鼠视网膜小胶质细胞中 TLR4 的表达

小胶质细胞标志物 CD11b 与 TLR4 进行免疫荧光双标记染色显示, 常氧组、OIR 组和 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠视网膜小胶质细胞中 TLR4 的 MFI 分别为 12.01±2.49、35.43±6.00 和 49.11±13.44, 总体比较差异有统计学意义 ($F=28.63, P<0.01$), OIR 组和 OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜小胶质细胞中 TLR4 的表达量较常氧组增加, OIR+LPS-EB 组 TLR4 表达量高于 OIR 组, 差异有统计学意义 ($t=2.28, P<0.05$)。常氧组未见 TLR4 阳性小胶质细胞, OIR+LPS-EB 组和 OIR 组 TLR4 阳性小胶质细胞数分别为 (49.50±6.38)/5 mm 和 (28.17±6.24)/5 mm, 2 个组比较差异有统计学意义 ($t=5.86, P<0.01$) (图 3)。

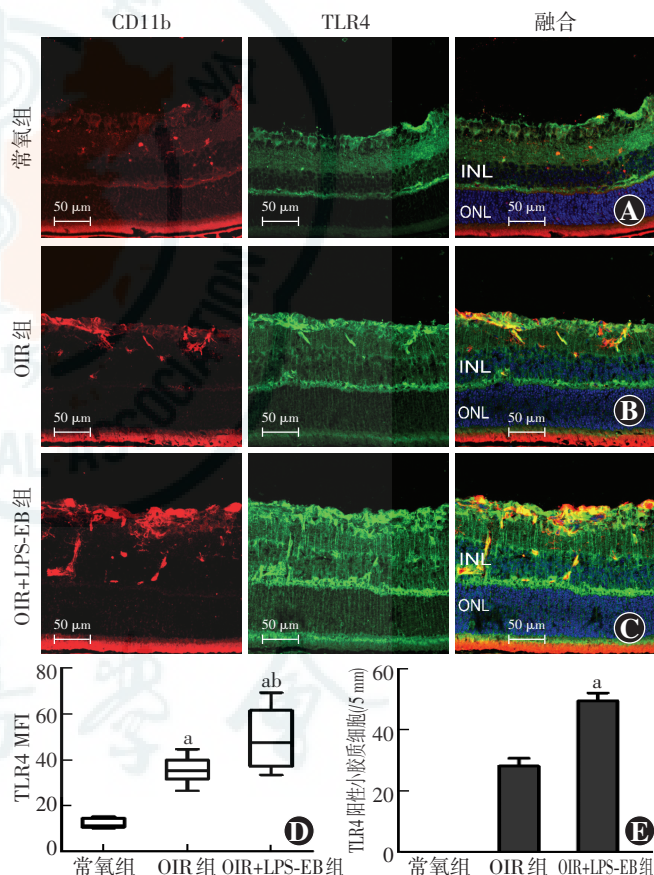


图 3 各组 P17 小鼠视网膜 CD11b 和 TLR4 的免疫荧光双标记染色以及 TLR4 表达比较 (Alex488, Cy3 标尺 = 50 μm)
 CD11b 标记小胶质细胞, 呈红色荧光, TLR4 呈绿色荧光, 双阳性细胞为融合图的黄色荧光, 为 TLR4 阳性小胶质细胞 A: 常氧组小胶质细胞数量极少 B: OIR 组可见小胶质细胞增多, 部分小胶质细胞表达 TLR4 C: OIR+LPS-EB 组有较多活化小胶质细胞, TLR4 阳性小胶质细胞数量增多 D: 各组 P17 小鼠视网膜 TLR4 MFI 的量化比较 $F=28.63, P<0.01$; 与常氧组比较, $^a P<0.01$; 与 OIR 组比较, $^b P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) E: OIR 组与 OIR+LPS-EB 组 P17 小鼠视网膜中 TLR4 阳性小胶质细胞数的量化比较 与 OIR 组比较, $^a P<0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n=6$) TLR: Toll 样受体; INL: 内丛状层; ONL: 外丛状层; MFI: 平均荧光强度; OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖

2.4 各组 P17 小鼠视网膜小胶质细胞中相关细胞因子的表达

免疫荧光双标记法结果显示,常氧组 P17 小鼠视网膜中 CD11b 和 VEGF/IL-1 β /TNF- α 共表达的细胞极少, OIR 组和 OIR+LPS-EB 组均有较多呈黄色荧光的标记阳性细胞, OIR+LPS-EB 组 CD11b 和 VEGF、IL-1 β 和 TNF- α 共表达的小胶质细胞数量增加(图 4~6)。各组小鼠视网膜中分泌 VEGF、IL-1 β 和 TNF- α 的小胶质细胞数比较差异均有统计学意义($F = 44.07, P < 0.01; t = 11.31, P < 0.01; t = 19.92, P < 0.01$)(表 2)。

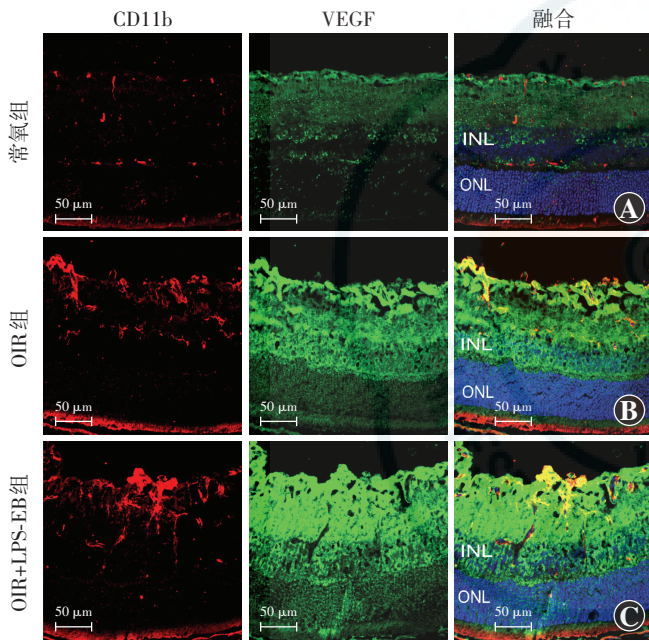


图 4 各组 P17 小鼠视网膜 CD11b 和 VEGF 免疫荧光双标记染色 (Alex488, Cy3 标尺 = 50 μm) CD11b 阳性标记呈红色荧光, VEGF 呈绿色荧光, 蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核, 双标记阳性细胞为融合图的黄色荧光 A: 常氧组小鼠视网膜中 CD11b 阳性小胶质细胞数量少, VEGF 表达量少, 分泌 VEGF 的小胶质细胞数量极少 B: OIR 组小鼠视网膜可见较多 CD11b 阳性小胶质细胞, VEGF 荧光强度高和数量增加, 可见分泌 VEGF 的小胶质细胞 C: OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜可见较多 CD11b 阳性小胶质细胞, 分泌 VEGF 的小胶质细胞数量增多 VEGF: 血管内皮生长因子; OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖; INL: 内丛状层; ONL: 外丛状层

表 2 各组 P17 小鼠视网膜中各细胞因子阳性小胶质细胞数量的比较 ($\bar{x} \pm s, /5 \text{ mm}$)

组别	样本量	VEGF 阳性细胞数 ^a	IL-1 β 阳性细胞数 ^b	TNF- α 阳性细胞数 ^b
常氧组	6	1.17 \pm 0.75	0	0
OIR 组	6	28.50 \pm 5.61	16.00 \pm 3.46	23.00 \pm 2.83
OIR+LPS-EB 组	6	44.50 \pm 8.78	24.10 \pm 6.49	33.83 \pm 14.82
<i>t/F</i>		44.07	11.31	19.92
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

注: VEGF: 血管内皮生长因子; IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子; OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖 (a: 单因素方差分析; b: 独立样本 *t* 检验)

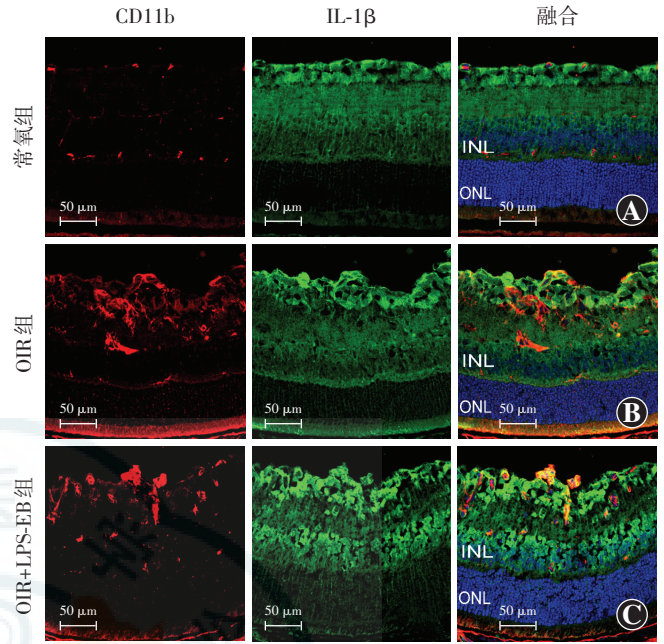


图 5 各组 P17 小鼠视网膜 CD11b 和 IL-1 β 免疫荧光双标记染色 (Alex488, Cy3 标尺 = 50 μm) A: 常氧组小鼠视网膜 IL-1 β 表达量较少, 未见 IL-1 β 阳性小胶质细胞 B: OIR 组小鼠视网膜 IL-1 β 表达增强, 部分小胶质细胞呈 IL-1 β 和 CD11b 双阳性 C: OIR+LPS-EB 组分泌 IL-1 β 的小胶质细胞数量增多 IL: 白细胞介素; OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖; INL: 内丛状层; ONL: 外丛状层

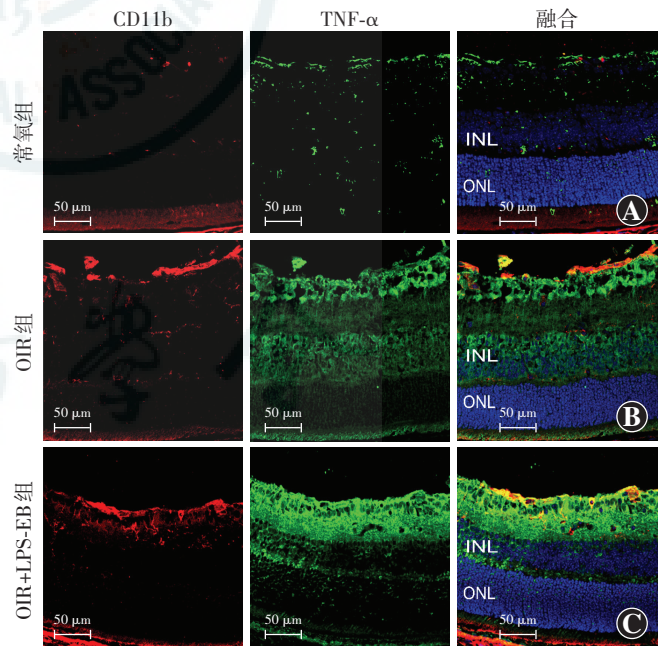


图 6 各组 P17 小鼠视网膜 CD11b 和 TNF- α 免疫荧光双标记染色 (Alex488, Cy3 标尺 = 50 μm) 小鼠视网膜中 TNF- α 表达呈绿色荧光 A: 常氧组小鼠视网膜中 TNF- α 荧光强度较低, 未见 TNF- α 阳性小胶质细胞 B: OIR 组小鼠视网膜中 TNF- α 表达强度增强, 部分小胶质细胞 TNF- α 表达阳性 C: OIR+LPS-EB 组小鼠视网膜中分泌 TNF- α 的小胶质细胞数量增多 TNF: 肿瘤坏死因子; OIR: 氧诱导视网膜病变; LPS: 脂多糖; INL: 内丛状层; ONL: 外丛状层

3 讨论

TLRs 属于天然免疫模式识别的重要组成部分,可以识别多种病原微生物和自身组织损伤后释放的分子。TLRs 在识别相关配体后,启动细胞内一系列级联信号通路,激活下游相关炎症细胞因子的基因表达,发挥抗感染及促进炎症反应的作用^[8]。近年来肿瘤相关的研究发现,TLRs 介导的炎症反应能够通过调节相关细胞因子,如 VEGF、表皮生长因子和 IL 等的水平,影响病理性新生血管生成^[9-12]。氧诱导视网膜新生血管亦属于病理性新生血管,研究发现视网膜中 TLR3 的表达增加,应用 TLR3 激动剂或抗体能相应地增加或减少视网膜新生血管的生成^[13]。此外还发现,OIR 的视网膜中 TLR4 和高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 呈高表达,敲除 *TLR4* 基因后新生血管明显减少,应用 HMGB1 激活 TLR4 能够增加病理性新生血管的数量^[2]。我们先前的研究也发现,TLR4 激动剂 LPS 能促进 OIR 大鼠模型视网膜中新生血管的生成^[3],然而其在氧诱导视网膜新生血管形成中的具体作用和机制尚不明确。

本研究证实,OIR 小鼠腹腔内注射 TLR4 激动剂后视网膜新生血管面积比显著增加。此外,P17 小鼠视网膜中存在大量活化的小胶质细胞,且应用 TLR4 激动剂 LPS-EB 后活化的小胶质细胞数量明显增加。有文献报道,OIR 模型中小胶质细胞能够在新生血管簇处聚集^[4]。作为视网膜的天然免疫细胞,小胶质细胞分为静息态和激活态,其形态分别呈分枝状和阿米巴样^[14]。既往的研究认为,小胶质细胞主要发挥免疫监视作用,能够通过细胞表面或细胞内的天然免疫模式识别受体识别相关病原并激活下游信号通路,进而迁移、活化并分泌大量的炎症因子,发挥抗感染作用^[15]。近年来的研究还发现,小胶质细胞除有调控炎症反应的免疫活性的作用外,还可在中枢神经系统血管发育以及病理状态下血管新生和重塑中发挥重要作用。小胶质细胞在血管形成前已移行进入中枢神经系统及视网膜神经上皮层,并在血管的吻合过程中发挥重要的细胞伴侣作用。采用玻璃体腔注入氯磷酸钠脂质体能清除视网膜小胶质细胞而不减少循环中的单核细胞,视网膜小胶质细胞数量减少后视网膜血管的密度降低^[16]。此外,敲除视网膜小胶质细胞集落刺激因子-1 基因的小鼠血管丛分支明显减少^[17]。这些结果均证实了小胶质细胞在血管生成和发育中的作用。本研究中发现 OIR 小鼠视网膜中 LPS-EB 可激活更多的小胶质细胞,并使其聚集在新生血管簇处,这可能是促

进新生血管生成的重要原因之一。

TLRs 属于小胶质细胞表面识别受体的一类,在视网膜的相关研究中发现,小胶质细胞能够表达多种 TLRs,而 TLR4 是其中重要的一种,那么在 OIR 模型中是否出现了小胶质细胞中 TLR4 及下游信号分子的激活呢? 本研究中发现,OIR 小鼠视网膜中有大量的小胶质细胞表达 TLR4,TLR4 激动剂能够活化更多的小胶质细胞并表达 TLR4,提示在小胶质细胞中可能出现了 TLR4 信号通路的激活。本研究中还发现,OIR 小鼠视网膜小胶质细胞能够分泌 VEGF、IL-1 β 和 TNF- α ,TLR4 激动剂能促进更多的小胶质细胞分泌上述细胞因子。众所周知,VEGF 是促进新生血管生成的一个重要因子,相关的抗 VEGF 抗体也已用于治疗多种视网膜新生血管性疾病^[18-20]。研究表明,IL-1 β 在大鼠 OIR 的表达增加,且能促进视网膜神经节细胞分泌臂板蛋白,参与无血管区的形成和新生血管的生长^[21]。研究证实,TNF- α 也促进新生血管的生成,用特异性敲除 *TNF- α* 基因建立的小鼠 OIR 模型中视网膜无血管区及新生血管区面积减小^[22],并且 IL-1 β 和 TNF- α 属于小胶质细胞分泌的重要的炎症因子^[23],因此,TLR4 调节小胶质细胞分泌的上述细胞因子可能参与新生血管的生成。

综上所述,TLR4 可能通过激活视网膜中小胶质细胞相关的下游信号通路而促进相关血管生长因子及炎症因子的释放,从而在氧诱导的视网膜新生血管的生成中发挥作用。

志谢 感谢高翔博士、李晓琴硕士和苏静波技师对本实验的技术支持(视网膜冰冻切片的制作);感谢德国洪堡基金会(Alexander von Humboldt Foundation)仪器设备捐赠基金(V-8151/02085)的资助

参考文献

- [1] Narayanan SP, Rojas M, Suwanpradit J, et al. Arginase in retinopathy[J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 36(9): 260-280. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.06.002.
- [2] He C, Sun Y, Ren X, et al. Angiogenesis mediated by toll-like receptor 4 in ischemic neural tissue[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 330-338. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300679.
- [3] 李晓琴, 张自峰, 王雨生, 等. 脂多糖诱导炎症对大鼠氧诱导视网膜病变的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(4): 301-304. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0081. Li XQ, Zhang ZF, Wang YS, et al. Effects of LPS-induced inflammation on oxygen-induced retinopathy in rats[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2015, 35(4): 301-304. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0081.
- [4] Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, et al. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(3): 1431-1438. DOI: 10.1167/iov.10-5798.
- [5] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy

- in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.
- [6] Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis [J]. Nat Protoc, 2009, 4(11): 1565-1573. DOI: 10.1038/nprot.2009.187.
- [7] 杨湘敏, 李蓉, 王雨生, 等. 早产对大鼠视网膜血管形态发育的影响[J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(8): 729-735. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.08.012.
Yang XM, Li R, Wang YS, et al. Effect of premature birth on retinal vascular development in the neonatal rat[J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(8): 729-735. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.08.012.
- [8] Akira S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Adv Immunol, 2001, 78: 1-56.
- [9] Fukata M, Chen A, Yamadevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors [J]. Gastroenterology, 2007, 133(6): 1869-1881.
- [10] Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy [J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57(9): 1271-1278. DOI: 10.1007/s00262-008-0459-8.
- [11] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(1): 57-63. DOI: 10.1038/nrc2541.
- [12] 陈雪梅. 眼底病变与 Toll 样受体的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(10): 988-991. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.018.
Chen XM. Current study of Toll-like receptor and fundus disease [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(10): 988-991. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.018.
- [13] Cai M, Zhang X, Li Y, et al. Toll-like receptor 3 activation drives the inflammatory response in oxygen-induced retinopathy in rats [J]. Br J Ophthalmol, 2015, 99(1): 125-132. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-305690.
- [14] Fischer F, Martin G, Agostini HT. Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy [J/OL]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 120 [2015-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190350/>. DOI: 10.1186/1742-2094-8-120.
- [15] Albin TA, Wang RC, Reiser B, et al. Microglial stability and repopulation in the retina [J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89(7): 901-903.
- [16] Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, et al. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(8): 3595-3602.
- [17] Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, et al. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. J Exp Med, 2009, 206(5): 1089-1102. DOI: 10.1084/jem.20081605.
- [18] Solomon SD, Lindsley KB, Krzystolik MG, et al. Intravitreal bevacizumab versus ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: findings from a cochrane systematic review [J]. Ophthalmology, 2016, 123(1): 70-77. DOI: 10.1016/j.optha.2015.09.002.
- [19] 朱丹, 新吉夫, 郭凯. VEGFR-1 和 VEGFR-2 在氧诱导视网膜病变小鼠视网膜中表达的变化 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(1): 42-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.009.
Zhu D, Xin JF, Guo K. Expressions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in mouse retinas with oxygen-induced retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(1): 42-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.009.
- [20] 付浴东, 周占宇, 王金娥, 等. Avastin 玻璃体腔注射对小鼠氧诱导视网膜病变新生血管的抑制作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(11): 988-992. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.11.008.
Fu YD, Zhou ZY, Wan JE, et al. The inhibitory effects of avastin on retinal angiogenesis in mice models after intravitreal injection [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(11): 988-992. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.11.008.
- [21] Joyal JS, Sitaras N, Binet F, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A [J]. Blood, 2011, 117(22): 6024-6035. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311589.
- [22] Stevenson L, Matesanz N, Colhoun L, et al. Reduced nitro-oxidative stress and neural cell death suggests a protective role for microglial cells in TNF alpha-/- mice in ischemic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6): 3291-3299. DOI: 10.1167/iovs.09-4344.
- [23] Zhou HF, Niu DB, Xue B, et al. Triptolide inhibits TNF-alpha, IL-1 beta and NO production in primary microglial cultures [J]. Neuroreport, 2003, 14(7): 1091-1095.

(收稿日期: 2016-02-22)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

广告目次

拓普康 OCT 系列 北京拓普康医疗器械有限公司……封二

同息通 (曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

普诺明 (高次非球面人工晶状体) 爱博诺德 (北京) 医疗科技有限公司……前插页

海露 (0.1% 玻璃酸钠滴眼液) 深圳市瑞霖医药有限公司……前插页

沃丽汀 (卵磷脂络合碘片) 武汉市威康药品有限责任公司……前插页

立宝舒 (卡波姆眼用凝胶) 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

见康 (拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

施图伦 (七叶洋地黄双苷滴眼液) 深圳市康哲药业有限公司……前插页

爱丽 (玻璃酸钠滴眼液) 参天制药 (中国) 有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底