

# $\gamma$ -分泌酶抑制剂对视网膜新生血管形成的抑制作用及 Notch1 信号通路调控机制

程志兴 谢洁 孟倩丽

广东省人民医院眼科 广东省医学科学院, 广州 510080

通信作者:程志兴, Email:chengdragon2004@126.com

**【摘要】** 目的 研究 Notch1 信号通路抑制剂  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 (DAPT) 对氧诱导视网膜病变 (OIR) 小鼠视网膜新生血管形成的抑制作用及其可能机制。方法 将 SPF 级出生后第 7 天 (P7) 的幼鼠与 C57BL/6J 小鼠共同饲养于含 75% 氧气的氧箱中 5 d, 然后放回正常氧气环境下饲养, 以制备 OIR 模型。采用随机数表法将 54 只 OIR 小鼠分为 OIR 组、OIR+DMSO 组和 OIR+DAPT 组, 每组 18 只, 所有小鼠右眼作为实验眼。OIR+DAPT 组和 OIR+DMSO 组在 P14 小鼠玻璃体腔内分别注射 10 mmol/L DAPT 和 DMSO 溶液 1  $\mu$ l, OIR 组不予注射。P17 时处死各组小鼠, 摘出眼球后分离视网膜, 采用 Western blot 法测定 Notch1 信号通路蛋白及其下游 Hes1 蛋白、视网膜小胶质细胞 M1 型标志物诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 M2 型标志物精氨酸酶-1 (Arg-1) 蛋白的相对表达量; 制备视网膜铺片, 采用同工凝集素 (IB4) 染色视网膜血管, 计算小鼠视网膜新生血管相对面积, 定义为新生血管面积/视网膜总面积 $\times$ 100%; 采用苏木素-伊红染色法观察突破视网膜内界膜的血管内皮细胞数量。结果 OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠视网膜中 Notch1 蛋白相对表达量分别为  $0.68\pm 0.06$ 、 $1.00\pm 0.00$  和  $1.03\pm 0.08$ , Hes1 蛋白相对表达量分别为  $0.70\pm 0.08$ 、 $1.00\pm 0.00$  和  $1.02\pm 0.07$ , 组间总体比较差异有统计学意义 ( $F=70.62, 53.65$ , 均  $P<0.01$ )。OIR+DAPT 组小鼠视网膜中 Notch1 和 Hes1 蛋白相对表达量均明显低于 OIR 组和 OIR+DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠视网膜中 Arg-1 蛋白相对表达量分别为  $1.49\pm 0.12$ 、 $1.00\pm 0.00$  和  $0.94\pm 0.07$ , iNOS 蛋白相对表达量分别为  $0.74\pm 0.07$ 、 $1.00\pm 0.00$  和  $1.04\pm 0.10$ , 组间总体比较差异均有统计学意义 ( $F=89.32, 31.63$ , 均  $P<0.01$ ), 与 OIR 组和 OIR+DMSO 组比较, OIR+DAPT 组小鼠视网膜中 Arg-1 蛋白相对表达量明显升高, iNOS 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠视网膜新生血管相对面积分别为  $(8.82\pm 2.71)\%$ 、 $(22.32\pm 5.34)\%$  和  $(20.27\pm 3.36)\%$ , 突破内界膜的血管内皮细胞数分别为  $38.17\pm 3.29$ 、 $60.83\pm 5.11$  和  $58.67\pm 4.75$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F=33.72, 39.44$ , 均  $P<0.01$ )。与 OIR 组和 OIR+DMSO 组比较, OIR+DAPT 组小鼠视网膜新生血管相对面积缩小, 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞数较少, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。结论 玻璃体腔注射 DAPT 可抑制 OIR 小鼠视网膜新生血管形成, 其作用主要是通过抑制 Notch1 信号通路活化, 进而促使 M1 型视网膜小胶质细胞向 M2 型转化来实现。

**【关键词】** 小胶质细胞; 视网膜新生血管;  $\gamma$ -分泌酶抑制剂; Notch1 信号通路; 氧诱导视网膜病变; 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82171072); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515010921)

DOI: 10.3760/ema.j.cn115989-20220820-00384

## Inhibitory effect of gamma-secretase inhibitor on retinal neovascularization and regulative mechanism of Notch1 signal pathway

Cheng Zhixing, Xie Jie, Meng Qianli

Department of Ophthalmology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Cheng Zhixing, Email: chengdragon2004@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the inhibitory effect and underlying mechanism of gamma-secretase inhibitor blocking Notch1 signaling on retinal neovascularization caused by oxygen-induced retinopathy (OIR) in mice. **Methods** To establish the OIR model, 7-day-old pups of C57BL/6J mice were exposed to 75% oxygen

together with their mother until postnatal day (P) 12. On P12, the mice were transferred to room air. All the mice were randomly divided into three groups, OIR group as control group, OIR+DAPT group and OIR+DMSO group receiving 1  $\mu$ l intravitreal injection of gamma-secretase inhibitor (DAPT, 10 mmol/L) and 1:20 DMSO dilution respectively. The right eye was taken as experimental eye. The mice were euthanized on P17 and the eyes were harvested to obtain retinas for further investigation. The total proteins were extracted from the retinas. The relative expression levels of Notch1 signal pathway and its downstream Hes1, the markers of M1 phenotype inducible nitric oxide synthase (iNOS) and M2 phenotype arginase-1 (Arg-1) microglia were measured by western blot. Retinal flat mounts were made and the retinal vessels were stained with isolectin B4 (IB4) to investigate the relative retinal neovascularization areas which was calculated as the ratio of neovascularization area/retinal area. The number of the neovascular endothelium cells beyond the inner limiting membrane was observed by hematoxylin-eosin staining. The use and care of animals complied with ARVO statement. This study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Guangdong Provincial People's Hospital (No. KY-Z-2021-2015-01).

**Results** The relative protein expression levels of Notch1 and Hes1 in OIR+DAPT group, OIR group, and OIR+DMSO group were  $0.68 \pm 0.06$  and  $0.70 \pm 0.08$ ,  $1.00 \pm 0.00$  and  $1.00 \pm 0.00$ ,  $1.03 \pm 0.08$  and  $1.02 \pm 0.07$ , respectively, with statistically significant differences among them ( $F = 70.62, 53.65$ ; both at  $P < 0.01$ ). Compared with the OIR group and OIR+DMSO group, the expressions of Notch1 and Hes1 were significantly reduced in OIR+DAPT group (all at  $P < 0.01$ ). The relative protein expression levels of iNOS and Arg-1 in OIR+DAPT group, OIR group, and OIR+DMSO group were  $0.74 \pm 0.07$  and  $1.49 \pm 0.12$ ,  $1.00 \pm 0.00$  and  $1.00 \pm 0.00$ ,  $1.04 \pm 0.10$  and  $0.94 \pm 0.07$ , respectively, showing statistically significant differences ( $F = 31.63, 89.32$ ; both at  $P < 0.01$ ). Compared with OIR group and OIR+DMSO group, the expression of iNOS in OIR+DAPT group was significantly reduced, and the expression of Arg-1 was significantly increased (all at  $P < 0.01$ ). The relative neovascularization area and the number of neovascular endothelium cells beyond the inner limiting membrane in OIR+DAPT group, OIR group, and OIR+DMSO group were  $(8.82 \pm 2.71)\%$  and  $38.17 \pm 3.29$ ,  $(22.32 \pm 5.34)\%$  and  $60.83 \pm 5.11$ ,  $(20.27 \pm 3.36)\%$  and  $58.67 \pm 4.75$ , respectively, showing statistically significant differences ( $F = 33.72, 39.44$ ; both at  $P < 0.01$ ). The relative neovascularization area and the number of neovascular endothelium cells in OIR+DAPT group were significantly reduced in comparison with OIR group and OIR+DMSO group (all at  $P < 0.01$ ).

**Conclusions** Intravitreal injection of DAPT can inhibit the retinal neovascularization in OIR mice through blocking Notch1 signaling activation and promoting retinal microglia polarization from M1 to M2 phenotype.

**[Key words]** Microglia; Retinal neovascularization; Gamma-secretase inhibitor; Notch1 signaling; Oxygen-induced retinopathy; Mice

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82171072); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2021A1515010921)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220820-00384

视网膜新生血管形成是多种视网膜疾病的并发症,如早产儿视网膜病变、缺血性视网膜静脉阻塞、增生性糖尿病视网膜病变等,可引起视网膜出血、玻璃体积血、黄斑水肿及牵拉性视网膜脱离等,导致严重的视力损害甚至盲<sup>[1-2]</sup>,目前的主要疗法是抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物玻璃体腔注射<sup>[3]</sup>。但是,抗 VEGF 药物玻璃体腔注射治疗视网膜新生血管性疾病的主要问题是药物作用持续时间短、新生血管容易复发等,需要反复多次眼内注射,增加了患者的经济负担及眼内感染的风险。此外,还有部分患者对抗 VEGF 药物治疗应答不良甚至无反应<sup>[3-4]</sup>,其原因仍不明确。因此,寻找新的治疗靶点和策略对视网膜新生血管形成的防控有着重要的临床意义。视网膜新生血管的形成过程和调控机制十分复

杂,各种促进与抑制新生血管生成的细胞因子在新生血管形成的不同阶段发挥协调和平衡作用,精密调控着血管内皮细胞迁移、增生及管腔形成过程<sup>[5]</sup>。小胶质细胞是视网膜内的固有免疫细胞,在视网膜内微环境稳定及血管结构完整性的维持中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。研究表明,视网膜小胶质细胞参与生理性和病理性视网膜新生血管的形成过程,大量活化的视网膜小胶质细胞在氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)小鼠的视网膜缺血区和新生血管周围呈簇状聚集并呈现明显的增生活性<sup>[7]</sup>。敲除视网膜小胶质细胞中转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )受体的 OIR 小鼠视网膜新生血管形成明显增加且消退延迟<sup>[8]</sup>。对 OIR 小鼠视网膜新生血管自然病程的研究中发现,小鼠出生后第 12 天

(P12)至 P17 时视网膜新生血管周围聚集大量的活化小胶质细胞,主要为 M1 型,P17 之后主要为 M2 型,视网膜新生血管可逐渐自发消退<sup>[9]</sup>,提示 M1 型小胶质细胞可能有促进视网膜新生血管形成的作用,而 M2 型小胶质细胞可能在新生血管的消退中发挥重要作用,但其机制有待进一步研究。小胶质细胞在不同刺激下可迅速活化并表现为不同的极化表型。本课题组前期研究发现,抑制 Notch1 信号通路可促使活化的 M1 型视网膜小胶质细胞向 M2 型转化并可减少炎症因子的释放<sup>[10]</sup>。目前,OIR 小鼠模型广泛用于视网膜新生血管的研究,但是鲜见关于调控小胶质细胞极化在 OIR 小鼠视网膜新生血管形成中的作用的研究。本研究拟探讨  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 3,5-二氟苯乙酰基-L-丙氨酸基-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯[(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-l-2-phenylglycine tert-butyl ester,DAPT]对 OIR 小鼠视网膜新生血管形成的抑制作用及其抑制 Notch1 信号通路后调控视网膜小胶质细胞的极化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 C57BL/6J 小鼠购自广东省医学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2018-002],母鼠和乳鼠同笼饲养于室温 18~25℃、相对湿度为 55%~70%条件下,12 h 光照/12 h 黑暗循环。实验动物的使用与饲养遵循美国眼科与视觉科学协会制定的科研动物使用规范,本研究方案经广东省人民医院动物实验伦理委员会审核批准(批文号:KY-Z-2021-2015-01)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DAPT、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma-Aldrich 公司);全蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);蛋白浓度测定试剂盒(Pierce™ BCA Protein Assay Kit,美国 Thermo Scientific 公司);显影液(美国 Millipore 公司);微量注射器(5  $\mu$ l,瑞士 Hamilton 公司);兔抗小鼠 Notch1 单克隆抗体(3608)、兔抗小鼠 Hes1 单克隆抗体(11988)、兔抗小鼠精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1)单克隆抗体(93668)和兔抗小鼠  $\beta$ -tubulin 单克隆抗体(5666,美国 CST 公司)、兔抗小鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)多克隆抗体(PA1-036,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);驴抗兔二抗(ab6802,美国 Abcam 公司);同工凝集素(isolectin B4, IB4)(上海 Invitrogen 公司)。电泳仪、ChemiDoc Touch Imaging

System(美国 Bio-Rad 公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);免疫荧光显微镜(DM4000,德国 Leica 公司);手术显微镜(德国 Zeiss 公司);氧箱(Oxy Cyclor system,美国 BioSpherix 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 OIR 小鼠模型的构建** OIR 小鼠模型的构建参考 Smith 等<sup>[11]</sup>的方法。P7 幼鼠和母鼠一同放置于含 75%氧气的氧箱中饲养至 P12,然后放回正常氧气环境下饲养。

**1.2.2 实验分组及给药** 采用随机数表法将 54 只 OIR 小鼠分为 OIR 组、OIR+DMSO 组、OIR+DAPT 组,每组 18 只。均取右眼为实验眼。OIR+DMSO 组 P14 玻璃体腔注射稀释 20 倍的溶剂 DMSO 1  $\mu$ l;OIR+DAPT 组 P14 玻璃体腔注射 10 mmol/L DAPT 溶液 1  $\mu$ l。每组任意选取 6 只 P17 小鼠,采用质量分数 0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后颈椎脱臼处死,快速收集眼球进行进一步实验。

**1.2.3 玻璃体腔药物注射** 0.5%戊巴比妥钠 0.1 ml/10 g 腹腔注射麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳;盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,手术显微镜下分开眼睑,轻加压使眼球突出,暴露巩膜,用微量注射器于角巩膜缘后 0.5 mm 处穿刺进入玻璃体腔,分别注射 DMSO 或 DAPT 1  $\mu$ l。术毕结膜囊内涂氧氟沙星眼用凝胶。

**1.2.4 Western blot 法测定视网膜中 Notch1、Hes1、iNOS 和 Arg-1 蛋白表达** 采用 Western blot 法分别测定 Notch1 信号通路及其下游 Hes1 蛋白和视网膜小胶质细胞 M1 型标志物 iNOS 及 M2 型标志物 Arg-1 蛋白的表达。每组收集 6 个小鼠眼球,冰上分离并收集视网膜,加入蛋白裂解液,冰浴中超声粉碎匀浆,4℃条件下 13 000 r/min 离心 10 min,抽取上清液,用 BCA 法测定样品的蛋白浓度。每组样本各取 40  $\mu$ g 总蛋白,以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白充分分离后,以 250 mA 电压下转膜 2 h 至 PVDF 膜上,在 5%牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液中室温封闭 1 h,分别滴加 Notch1(1:1 000)、Hes1(1:1 000)、iNOS(1:800)和 Arg-1 一抗(1:1 000)4℃孵育过夜, TBST 液清洗,分别滴加相应二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,用 ChemiDoc Touch Imaging System 显影, ImageJ 软件计算各条带的平均灰度值。以  $\beta$ -tubulin 为内参,目的蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/内参蛋白灰度值,蛋白表达水平以 OIR 组为 1 计算相对比值。



**1.2.5 视网膜铺片法计算新生血管面积** 将 OIR 小鼠眼球置于体积分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min, 完整分离取出视网膜, 用 IB4 (1:50) 室温孵化 1 h。PBS 冲洗, 将视网膜切成 4 个象限铺于载玻片上。Leica DM4000 免疫荧光显微镜下观察并拍照, 观察视网膜血管情况, 采用 Adobe Photoshop 2015 CC software (Adobe Systems, San Jose, CA) 分析视网膜新生血管面积, 计算新生血管面积与视网膜面积的比值。

**1.2.6 苏木精伊红染色法观察突破内界膜的血管内皮细胞数** 每组收集 6 个小鼠眼球, 石蜡包埋, 5 μm 厚切片。视网膜切片用二甲苯脱蜡, 以体积分数 100%、95%、75% 梯度乙醇清洗至水化, 室温下苏木素染色 10 min, 流水清洗, 分化, 返蓝, 流水冲洗后以 1% 醇溶性伊红液染色 15 s, 加入二甲苯 2 次透明 20 min, 中性树脂封片。Leica DM4000 显微镜下观察并拍照, 观察突破每个切面视网膜内界膜的血管内皮细胞数量, 取平均值。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 23.0 (美国 IBM 公司) 统计学软件对所得数据进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据经 Levene 检验证实方差齐。采用随机分组单因素干预多组研究设计, OIR 组、OIR+DMSO 组和 OIR+DAPT 组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。采用双侧检验法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组小鼠视网膜中 Notch1 和 Hes1 蛋白表达量比较**

OIR 组和 OIR + DMSO 组 Notch1 和 Hes1 蛋白表达条带均明显强于 OIR+DAPT 组 (图 1A)。OIR+DAPT 组视网膜中 Notch1 及 Hes1 蛋白相对表达量分别为  $0.68 \pm 0.06$  和  $0.70 \pm 0.08$ , OIR 组分别为  $1.00 \pm 0.00$  和  $1.00 \pm 0.00$ , OIR+DMSO 组分别为  $1.03 \pm 0.08$  和  $1.02 \pm 0.007$ , 各组间 Notch1 和 Hes1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 70.62, 53.65$ , 均  $P < 0.01$ )。OIR + DMSO 组与 OIR 组间 Notch1 和 Hes1 蛋白相对表达量

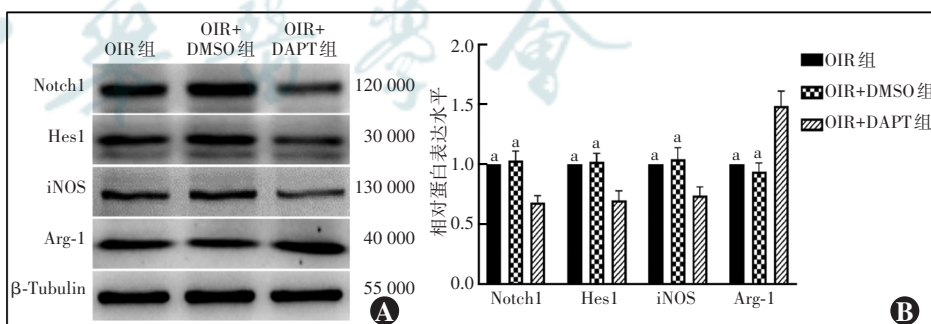
比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 1B)。

**2.2 各组小鼠视网膜中 iNOS 和 Arg-1 蛋白表达量比较**

OIR 组和 OIR+DMSO 组视网膜中 iNOS 蛋白表达条带均明显强于 OIR+DAPT 组, Arg-1 蛋白表达条带均弱于 OIR+DAPT 组 (图 1A)。OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠视网膜中 iNOS 蛋白相对表达量分别为  $0.74 \pm 0.07$ 、 $1.00 \pm 0.00$  和  $1.04 \pm 0.10$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 31.63, P < 0.01$ ), 其中 OIR+DAPT 组视网膜中 iNOS 蛋白相对表达量明显低于 OIR 组和 OIR+DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组视网膜中 Arg-1 蛋白相对表达量分别为  $1.49 \pm 0.12$ 、 $1.00 \pm 0.00$  和  $0.94 \pm 0.07$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 89.32, P < 0.001$ ), 其中 OIR+DAPT 组视网膜中 Arg-1 蛋白相对表达量明显高于 OIR 组和 OIR+DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), OIR+DMSO 组与 OIR 组视网膜中 iNOS 和 Arg-1 蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 1B)。

**2.3 各组小鼠视网膜新生血管面积比较**

视网膜铺片中新生血管呈团簇状, OIR 组和 OIR+DMSO 组视网膜新生血管面积较 OIR + DAPT 组大 (图 2A)。OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠视网膜新生血管相对面积分别为  $(8.82 \pm 2.71)\%$ 、 $(22.32 \pm 5.34)\%$  和  $(20.27 \pm 3.36)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 33.72, P < 0.01$ ), 其中 OIR +



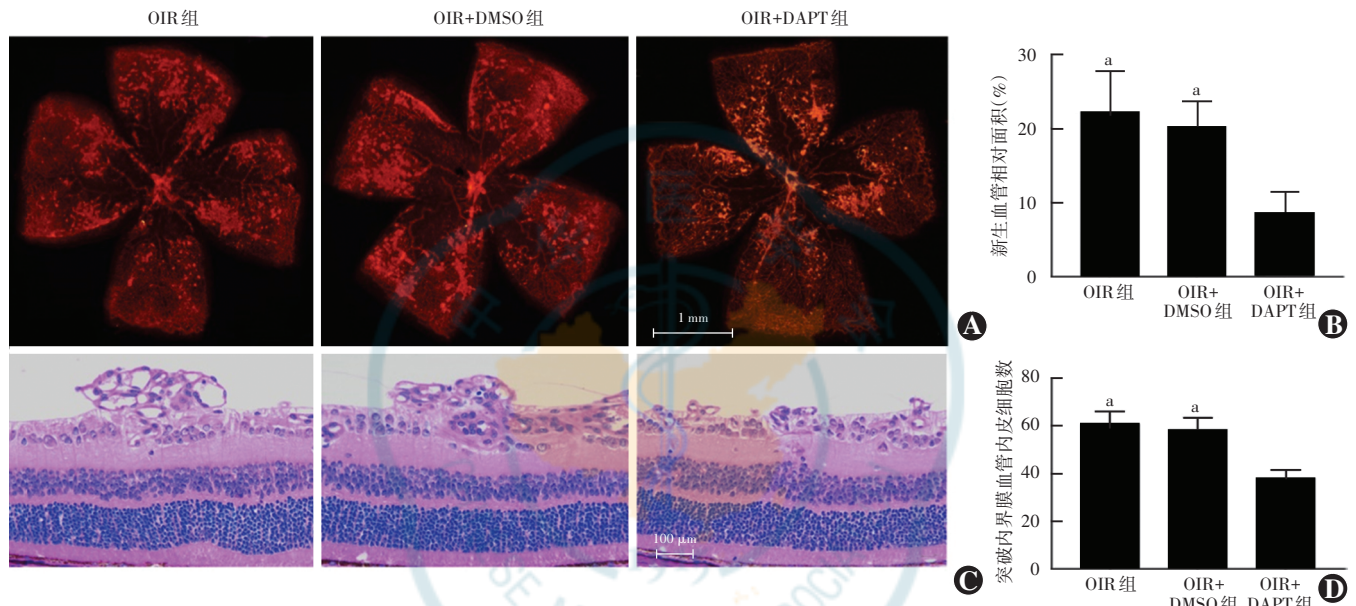
**图 1 各组小鼠视网膜中 Notch1 信号通路相关蛋白及小胶质细胞极化标志物蛋白表达比较** A: 蛋白电泳图 B: 各组小鼠视网膜 Notch1 信号通路相关蛋白及小胶质细胞极化标志物蛋白表达量比较 与 OIR+DAPT 组比较,  $^*P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) OIR: 氧诱导视网膜病变; DMSO: 二甲亚砜; DAPT:  $\gamma$ -分泌酶抑制剂; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; Arg-1: 精氨酸酶-1  
**Figure 1 Expressions of Notch1 signaling and microglia-associated proteins in OIR mice retina** A: Electrophoretogram of expression of Notch1 signaling and microglia-associated proteins B: Comparison of relative expression levels of Notch1 signaling and microglia-associated proteins among three groups Compared with OIR+DAPT group,  $^*P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 6$ ) OIR: oxygen-induced retinopathy; DMSO: dimethyl sulfoxide; DAPT: gamma-secretase inhibitor; iNOS: inducible nitric oxide synthase; Arg-1: arginase-1

DAPT 组小鼠视网膜新生血管相对面积明显小于 OIR 组和 OIR+DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), OIR 组与 OIR+DMSO 组间小鼠新生血管相对面积比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2B)。

#### 2.4 各组小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞数比较

OIR+DAPT 组、OIR 组和 OIR+DMSO 组小鼠突破

视网膜内界膜的血管内皮细胞数分别为  $38.17 \pm 3.60$ 、 $60.83 \pm 5.60$  和  $58.67 \pm 5.20$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 39.44, P < 0.001$ ); 其中 OIR+DAPT 组小鼠视网膜中突破内界膜血管内皮细胞数明显少于 OIR 组和 OIR+DMSO 组, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), OIR+DMSO 组与 OIR 组小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2C、D)。



**图 2** 视网膜铺片显示视网膜新生血管 (IB4, 标尺 = 1 mm) 和视网膜病理组织学计算突破内界膜的血管内皮细胞数 (HE ×400, 标尺 = 100 μm) A: IB4 染色视网膜血管 (红色), 视网膜新生血管呈团簇状, OIR+DAPT 组小鼠视网膜新生血管面积较 OIR 和 OIR+DMSO 组明显缩小 B: 各组小鼠视网膜新生血管相对面积量化比较 与 OIR+DAPT 组比较,  $^*P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) C: 各组小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞 OIR 组和 OIR+DMSO 组新生血管突破内界膜呈团簇状, 可见大量蓝染的内皮细胞核, OIR+DAPT 组突破内界膜的血管内皮细胞数明显低于 OIR 组和 OIR+DMSO 组 D: 各组小鼠突破内界膜的血管内皮细胞数比较 与 OIR+DAPT 组比较,  $^*P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) OIR: 氧诱导视网膜病变; DMSO: 二甲亚砜; DAPT:  $\gamma$ -分泌酶抑制剂

**Figure 2 Retinal flat mounts of OIR mice showing neovascularization (IB4, bar = 1 mm) and histopathology of retinas showing the number of endothelial cells beyond internal limiting membrane (HE ×400, bar = 100 μm)** A: The retinal vessels stained with IB4 (red) and retinal neovascular tufts. The neovascularization area was reduced in OIR+DAPT group compared with OIR group and OIR+DMSO group B: Comparison of neovascularization area among three groups Compared with OIR+DAPT group,  $^*P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 6$ ) C: Vascular endothelial cells beyond the internal limiting membrane The neovascularization had cluster appearance and many nuclei were stained blue in OIR group and OIR+DMSO group. The number of endothelial cells beyond the internal limiting membrane in OIR+DAPT group was significantly reduced compared with OIR group and OIR+DMSO group D: Comparison of the number of endothelial cells beyond the ILM among three groups Compared with OIR+DAPT group,  $^*P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 6$ ) OIR: oxygen-induced retinopathy; DMSO: dimethyl sulfoxide; DAPT: gamma-secretase inhibitor

### 3 讨论

Notch 信号通路进化上高度保守, 广泛存在于动物体内, 是调节细胞、组织、器官分化、增生和发育的重要信号通路, 在维持组织内环境稳态中发挥关键作用<sup>[12-14]</sup>。研究表明, Notch 信号通路参与了脑部小胶质细胞的极化调控<sup>[15-18]</sup>。本课题组前期研究表明, Notch1 信号通路可调控视网膜小胶质细胞的极化表型<sup>[10]</sup>。本研究证实了玻璃体腔注射 DAPT 后可有效

抑制 Notch1 信号通路的活化, 促使 OIR 小鼠活化的视网膜小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转化, 进而抑制视网膜新生血管的形成。研究表明, Notch1 信号通路在生理性和病理性新生血管形成和血管分化中起重要作用<sup>[19]</sup>。Sun 等<sup>[20]</sup>对 OIR 大鼠的研究发现, 抑制 Notch1 信号通路后可降低血清和视网膜中 VEGF-A、VEGFR1 和 VEGFR2 的表达并可改善视网膜血管发育, Lobov 等<sup>[19]</sup>对 OIR 小鼠的研究发现, 抑制 Notch1 信号通路可减少高氧诱导的视网膜血管闭塞、视网膜



毛细血管消退及视网膜无灌注区。上述研究均表明抑制 Notch1 信号通路可改善 OIR 鼠的视网膜血管发育, 与本研究结果相一致。但是, 上述研究均未关注 Notch1 信号通路抑制与视网膜小胶质细胞极化的关系。

小胶质细胞是视网膜内固有的免疫细胞, 在维持视网膜内微环境稳定及血管结构完整性中发挥重要作用<sup>[6,21-22]</sup>。M1 型活化的小胶质细胞释放促炎因子, 如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-1 $\beta$ , 诱发组织的炎症反应。M2 型活化的小胶质细胞分泌抑炎因子, 主要包括转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、IL-10 和 IL-23 等, 具有抑制炎症、神经营养及促进组织修复的作用。研究表明, IL-10 具有促进血管正常化、保护血管内皮细胞完整性和抑制血管平滑肌细胞纤维化的作用<sup>[23]</sup>。TGF- $\beta$  在视网膜中具有多种重要作用, 如维持视网膜神经元的分化及存活、稳定血管内皮细胞、消退新生血管、维持视网膜血管的发育和结构的完整性等<sup>[2,24]</sup>。Li 等<sup>[9]</sup>对 OIR 小鼠的研究表明, P12 至 P17 的小鼠视网膜新生血管周围聚集的大量活化小胶质细胞主要为 M1 型。本研究在缺氧诱导视网膜新生血管的关键阶段通过抑制 Notch1 信号通路以调控小胶质细胞的极化, 促使活化的小胶质细胞向 M2 型转化, 可有效减少 M1 型小胶质细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等炎症因子, 增加血管内皮细胞的保护因子。此外, 活化的小胶质细胞与血管内皮细胞间的紧密连接及黏着连接的破坏密切相关<sup>[25-26]</sup>。因此, 减少 M1 型活化的小胶质细胞对视网膜血管发育有一定保护作用。Usui-Ouchi 等<sup>[8]</sup>研究表明, 小胶质细胞中 TGF- $\beta$  受体的缺失可明显加重视网膜新生血管并可延长新生血管消退的时间, 进一步证实 TGF- $\beta$  在维持视网膜血管发育和结构完整性中起重要作用。因此, 在缺氧诱导视网膜新生血管的关键阶段通过调控小胶质细胞向 M2 型转化可有效抑制视网膜新生血管的形成。

综上所述, Notch1 信号通路抑制剂 DAPT 玻璃体腔注射可有效缩小 OIR 小鼠视网膜新生血管面积, 减少突破内界膜的血管内皮细胞数量, 维持 OIR 小鼠视网膜血管正常发育, 这些作用主要是通过抑制 Notch1 信号通路活化, 进而调控小胶质细胞的极化表型来实现的。本研究结果为视网膜新生血管性病变提供了新的治疗靶点和治疗策略。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 程志兴: 参与选题、研究设计、主要数据的核实和分析、

论文智力性内容的修改和定稿; 谢洁、孟倩丽: 参与研究设计、实施研究、数据收集和分析、论文撰写和修改

## 参考文献

- [1] Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 67-81. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- [2] Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22(6): 721-748. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2003.08.001.
- [3] Mettu PS, Allingham MJ, Cousins SW. Incomplete response to anti-VEGF therapy in neovascular AMD: exploring disease mechanisms and therapeutic opportunities [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 82: 100906 [2022-06-16]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33022379>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100906.
- [4] Mehanna CJ, Abdul Fattah M, Haddad S, et al. Anti-VEGF therapy for persistent neovascularization after complete panretinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmol Retina*, 2019, 3(6): 473-477. DOI: 10.1016/j.oret.2019.02.001.
- [5] Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 63: 1-19. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.11.001.
- [6] Graeber MB. Changing face of microglia [J]. *Science*, 2010, 330(6005): 783-788. DOI: 10.1126/science.1190929.
- [7] Boeck M, Thien A, Wolf J, et al. Temporospatial distribution and transcriptional profile of retinal microglia in the oxygen-induced retinopathy mouse model [J]. *Glia*, 2020, 68(9): 1859-1873. DOI: 10.1002/glia.23810.
- [8] Usui-Ouchi A, Eade K, Giles S, et al. Deletion of Tgfb signal in activated microglia prolongs hypoxia-induced retinal neovascularization enhancing Igf1 expression and retinal leukostasis [J]. *Glia*, 2022, 70(9): 1762-1776. DOI: 10.1002/glia.24218.
- [9] Li J, Yu S, Lu X, et al. The phase changes of M1/M2 phenotype of microglia/macrophage following oxygen-induced retinopathy in mice [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(2): 183-192. DOI: 10.1007/s00011-020-01427-w.
- [10] Cheng Z, Yang Y, Duan F, et al. Inhibition of Notch1 signaling alleviates endotoxin-induced inflammation through modulating retinal microglia polarization [J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 389 [2022-06-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30930891>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00389.
- [11] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.
- [12] Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 14-27. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.01.004.
- [13] Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6): 427-437. DOI: 10.1038/nri3445.
- [14] Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4): 1235-1294. DOI: 10.1152/physrev.00005.2017.
- [15] Yao L, Kan EM, Kaur C, et al. Notch-1 signaling regulates microglia activation via NF- $\kappa$ B pathway after hypoxic exposure *in vivo* and *in vitro* [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78439 [2022-06-29]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24223152>. DOI: 10.1371/journal.pone.0078439.
- [16] Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, et al. Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 621-623. DOI: 10.1038/nm1403.
- [17] Grandbarbe L, Michelucci A, Heurtaux T, et al. Notch signaling modulates the activation of microglial cells [J]. *Glia*, 2007, 55(15): 1519-1530. DOI: 10.1002/glia.20553.
- [18] Yuan Y, Rangarajan P, Kan EM, et al. Scutellarin regulates the Notch pathway and affects the migration and morphological transformation of activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in rats and in activated BV-2 microglia [J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2015,

- 12:11 [2022-06-29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600517>. DOI:10.1186/s12974-014-0226-z.
- [19] Lobov IB, Cheung E, Wudali R, et al. The Dll4/Notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow [J]. *Blood*, 2011, 117 (24): 6728-6737. DOI:10.1182/blood-2010-08-302067.
- [20] Sun W, Li J, Li Y, et al. Gamma-secretase inhibitor, DAPT, prevents the development of retinopathy of prematurity in a rat model by regulating the delta-like ligand 4/notch homolog-1 (DLL4/Notch-1) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 492-499. DOI: 10.12659/MSM.913828.
- [21] Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina [J]. *Glia*, 2020, 68(4): 768-796. DOI:10.1002/glia.23727.
- [22] Rathnasamy G, Foulds WS, Ling EA, et al. Retinal microglia-a key player in healthy and diseased retina [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 173: 18-40. DOI:10.1016/j.pneurobio.2018.05.006.
- [23] Ouyang W, O'Garra A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation [J]. *Immunity*, 2019, 50 (4): 871-891. DOI:10.1016/j.immuni.2019.03.020.
- [24] Braunger BM, Leimbeck SV, Schlecht A, et al. Deletion of ocular transforming growth factor  $\beta$  signaling mimics essential characteristics of diabetic retinopathy [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185 (6): 1749-1768. DOI:10.1016/j.ajpath.2015.02.007.
- [25] Yun JH, Park SW, Kim KJ, et al. Endothelial STAT3 activation increases vascular leakage through downregulating tight junction proteins: implications for diabetic retinopathy [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5): 1123-1134. DOI:10.1002/jcp.25575.
- [26] Mehrabadi AR, Korolainen MA, Odero G, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 regulates microglia mediated decrease of endothelial tight junction integrity [J]. *Neurochem Int*, 2017, 108: 266-271. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.04.014.

(收稿日期:2022-08-20 修回日期:2022-10-15)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

## 眼科常用英文缩略语名词解释

- |   |  |
|---|--|
| AMD:年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration)                 | MTT:四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium)                        |
| ANOVA:单因素方差分析(analysis of variance)                             | NF:核转录因子(nuclear factor)   |
| BUT:泪膜破裂时间(breakup time of tear film)                           | OCT:光相干断层扫描(optical coherence tomography)                        |
| DR:糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy)                               | OR:优势比(odds ratio)   |
| EAU:实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis)               | PACG:原发性闭角型青光眼(primary angle-closure glaucoma)                   |
| EGF:表皮生长因子(epidermal growth factor)                             | PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)                           |
| ELISA:酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay)               | RGCs:视网膜节细胞(retinal ganglion cells)                              |
| ERG:视网膜电图(electroretinogram)                                    | POAG:原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma)                      |
| FFA:荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography)                   | RB:视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)                                       |
| FGF:成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor)                         | RPE:视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium)                          |
| GFP:绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)                           | RNV:视网膜新生血管(retinal neovascularization)                          |
| IFN- $\gamma$ : $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ )             | RP:视网膜色素变性(retinitis pigmentosa)                                 |
| IL:白细胞介素(interleukin)   | S I t:基础泪液分泌试验(Schirmer I test)                                  |
| IOL:人工晶状体(intraocular lens)                                     | shRNA:短发夹RNA(short hairpin RNA)                                  |
| IRBP:光间受体视黄类物质结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein) | siRNA:小干扰RNA(small interfering RNA)                              |
| LASIK:准分子激光角膜原位磨镶术(laser in situ keratomileusis)                | $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin) |
| ICGA:吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography)                    | TAO:甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy)                   |
| LECs:晶状体上皮细胞(lens epithelial cells)                             | TGF:转化生长因子(transforming growth factor)                           |
| miRNA:微小RNA(microRNA)   | TNF:肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)                                |
| MMP:基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase)                           | UBM:超声生物显微镜(ultrasound biomicroscope)                            |
| mTOR:哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin)                | VEGF:血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)                |
|   | VEP:视觉诱发电位(visual evoked potential)                              |

## 欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,月刊,96面,每月10日出版,每期定价26元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局订阅或直接与本刊编辑部联系订购。联系电话:0371-87160872。

(本刊编辑部)