

实验性脉络膜新生血管形成过程中巨噬细胞及单核细胞趋化蛋白-1 的作用

张淑馄 谢平 袁冬青 刘庆淮

【摘要】 背景 脉络膜新生血管(CNV)是多种眼底疾病造成视力损害的主要原因之一。近年来的研究发现单核细胞来源的巨噬细胞(F4/80)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)在 CNV 的形成过程中发挥作用,但它们在新生血管发生早期的动态表达及机制仍不明确。目的 观察 CNV 模型小鼠在 CNV 发展早期局部组织中巨噬细胞和 MCP-1 表达的动态变化。方法 SPF 级 8 周龄雄性野生 C57BL/6 小鼠 105 只,用氩离子激光仪对小鼠的任意一侧眼在距视盘 2~3 倍视盘直径处的 3:00、6:00、9:00 和 12:00 方位进行激光光凝以建立 CNV 动物模型。按照随机数字表法将 CNV 小鼠模型随机分不同时间点组,分别于光凝后 6、12、24、48 和 72 h 各处死小鼠,摘取眼球组织后制备眼球壁组织切片、脉络膜铺片和视网膜色素上皮(RPE)-脉络膜复合体切片,采用苏木精-伊红染色,观察视网膜光凝后眼球壁各层的组织病理学改变和炎症反应情况;采用免疫荧光双标记技术测定小鼠视网膜-脉络膜组织中 F4/80 和 MCP-1 的表达和分布;采用免疫荧光技术检测小鼠脉络膜铺片中 F4/80 的表达和分布;采用实时荧光定量 PCR 技术检测小鼠 RPE-脉络膜组织中 F4/80 mRNA 的相对表达量;采用 ELISA 法定量检测小鼠 RPE-脉络膜组织中 MCP-1 质量分数。以光凝后 6 h 组小鼠非实验眼作为正常对照。结果 视网膜光凝后 6 h 光学显微镜下可见光凝区 Bruch 膜、RPE 层和脉络膜层均破裂,视网膜外核层连续性中断,随着光凝后时间的延长,可见局部炎症细胞浸润和组织水肿,光凝后 72 h 可见光凝区边缘出现血管内皮细胞增生。光凝后 6 h 可见光凝区 RPE 及脉络膜组织中 F4/80 表达,周围组织中可见 MCP-1 表达,随着光凝后时间延长 MCP-1 表达强度减弱,而 F4/80 表达仍增强。正常对照组及光凝后 6、12、24、48 和 72 h 组 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 蛋白的质量分数分别为(31.25±4.73)、(276.31±4.20)、(331.95±5.86)、(221.24±4.42)、(179.89±4.10)和(130.80±5.90)pg/mg,总体比较差异有统计学意义($F=1416.46, P=0.00$),光凝后 12 h 其质量分数达峰值,之后逐渐下降,但光凝后各时间组 MCP-1 蛋白的质量分数均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各组 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的相对表达量总体比较差异有统计学意义($F=762.72, P=0.00$),光凝后随着时间延长 F4/80 mRNA 的相对表达量逐渐升高,与正常对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。结论 实验性 CNV 形成早期伴随着明显的炎症反应,趋化因子 MCP-1 主要在 CNV 形成的起始阶段发挥作用,而巨噬细胞的聚积和活化在 CNV 形成和发展过程中起促进作用。

【关键词】 脉络膜新生血管化; 炎症; 单核细胞源性巨噬细胞; 单核细胞趋化蛋白-1; 近交系 C57BL 小鼠

Effects of macrophages and monocyte chemoattractant protein-1 during experimental choroidal neovascularization Zhang Shukun, Xie Ping, Yuan Dongqing, Liu Qinghuai. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Liu Qinghuai, Email: liuqh@njmu.edu.cn

[Abstract] **Background** Choroidal neovascularization (CNV) is one of the primary causes leading to visual damage in many fundus diseases. Many evidences indicate that macrophage activation and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play important roles in CNV. However, the dynamic expression of macrophage and MCP-1 in the initial stage of CNV is not clear. **Objective** This study was to investigate the dynamic changes of F4/80 and MCP-1 expressions in retina-choroid tissue with experimental CNV. **Methods** Laser-induced CNV models were monocularly established in 105 SPF 8-week-old male wild type C57BL/6 mice. The mice were sacrificed at 6, 12, 24,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.009

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院眼科

通信作者:刘庆淮, Email:liuqh@njmu.edu.cn

48 and 72 hours after photocoagulation, respectively, and the retina-choroid tissue sections and choroidal flatmounts were prepared. The histopathological examination was carried out to observe the changes of morphology and structure as well as inflammatory response in CNV. The expression and distribution of F4/80 and MCP-1 protein in retina-choroid were detected by double immunofluorescence technique. The expression and distribution of F4/80 in choroid were examined by immunofluorescence. The relative expression levels of F4/80 mRNA and the content of MCP-1 protein in RPE-choroid complex were assayed using real-time quantitative PCR and ELISA, respectively. The use and care of the mice complied with the Regulation for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by Ethic Committee of Experimental Animals of Nanjing Medical University. **Results** The rupture of Bruch membrane, RPE, outer nuclear layer and choroid was exhibited under the optical microscope 6 hours after photocoagulation. Infiltration of inflammatory cells and tissue edema were seen as the lapse of photocoagulation time, and proliferation of vascular endothelial cells was found 72 hours after photocoagulation. F4/80 was expressed in photocoagulation area 6 hours later, and MCP-1 was expressed around the area. With the lapse of photocoagulation time, the expression intensity of MCP-1 weakened and that of F4/80 enhanced. The contents of MCP-1 protein in RPE-choroid complex were (31.25 ± 4.73) , (276.31 ± 4.20) , (331.95 ± 5.86) , (221.24 ± 4.42) , (179.89 ± 4.10) and (130.80 ± 5.90) pg/mg in the normal control group, photocoagulation 6-, 12-, 24-, 48- and 72-hour groups, respectively, with a significant difference among the groups ($F = 1416.46, P < 0.01$). The contents of MCP-1 protein peaked at 12 hours after photocoagulation and then gradually declined. The expression levels of MCP-1 protein in different time groups were higher than those in the normal control group (all at $P < 0.01$). A significant difference in F4/80 mRNA expression in RPE-choroid complex was also found among the groups ($F = 762.72, P < 0.01$, and a gradually raising tendency was seen over time, showing evidently increase in comparison with the normal control group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Inflammatory response occurs in the early stage of experimental CNV. MCP-1 responds to the CNV at early stage, and the accumulation and activation of macrophage play an important role in the development of CNV.

[**Key words**] Choroidal neovascularization; Inflammation; Monocyte-derived macrophages; Monocyte chemoattractant protein-1; Mice, inbred C57BL

湿性年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的病理基础是脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成, 而 CNV 是造成进行性视力损失的主要原因之一^[1]。CNV 的发病机制尚未完全阐明, 但近年来的研究发现慢性炎症和补体活化等免疫机制在其发病中发挥重要作用, 其中单核细胞来源的巨噬细胞和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 参与 CNV 的发生^[2-4]。F4/80 蛋白作为巨噬细胞的特异性标志物, 其表达变化在一定程度上反映了巨噬细胞的表达情况。CNV 的形成是一个动态过程, 而巨噬细胞和 MCP-1 在 CNV 形成早期的表达与 CNV 形成的关系仍不完全明确。本研究中观察 CNV 的早期形成过程中巨噬细胞和 MCP-1 的表达时相变化, 探讨巨噬细胞及 MCP-1 与早期 CNV 发生的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 兔抗小鼠巨噬细胞单克隆抗体 F4/80 (1:500) (抗体编号: BM40075) (德国 Acris 公司); 兔抗小鼠 MCP-1 抗体 (1:50) (抗体编号:

sc-1784) (美国 Santa Cruz 公司); Alexa 546 (抗体编号: A20183) 和 Alexa 488 (抗体编号: A20181) 标记山羊抗兔二抗、SuperScriptTM III 第一链合成系统 RT-PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 小鼠 MCP-1 蛋白 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司); RNA 提取试剂盒 (美国 Qiagen 公司)。实时定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); Novua 2000 型氦激光仪 (美国 Coherent 公司); OMS 300 型眼科手术显微镜 (日本拓普康株式会社); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司); 分光光度计 (美国 Bio-Rad 公司); ND-2000C 紫外可见分光光度计 (美国 NanoDrop 公司); 激光扫描共焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

1.1.2 实验动物 SPF 级 8 周龄雄性野生型 C57BL/6 小鼠 105 只 (购自南京医科大学动物实验中心), 体质量 22 ~ 24 g, 实验设计均按照南京医科大学动物伦理委员会许可规定执行 (许可证号: 22-005029)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 模型的建立及分组 小鼠腹腔内注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 进行麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 将透明质酸钠涂于角膜表面以免造成角膜损伤。每只小鼠任意选取 1 只眼作为实验眼, 将手持型

前置镜置于实验眼前,采用氩离子激光仪进行视网膜光凝以制作 CNV 模型。激光参数设置:激光波长为 532 nm,功率为 120 mW,爆破时间为 120 ms,光斑直径为 100 μm 。于距视盘 2~3 倍视盘直径处、分别在视神经周围 3:00、6:00、9:00 和 12:00 方位各做 1 个激光斑,光凝后视网膜下色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层产生气泡者表明 Bruch 膜破裂,显示为视网膜下灰白色的激光斑,视为模型建立成功。排除激光光凝后有视网膜、脉络膜或玻璃体出血者,并及时补充相应数量的实验动物。造模后以随机数字表法将小鼠实验眼分为光凝后 6 h 组、光凝后 12 h 组、光凝后 24 h 组、光凝后 48 h 组和光凝后 72 h 组,以光凝后 6 h 组小鼠非实验眼作为正常对照组。

1.2.2 小鼠视网膜和脉络膜组织的组织病理学检查

各组任意选取 3 只小鼠,过量麻醉法处死后摘取完整眼球, OCT 包埋后置入液氮快速冷冻 1~2 min,然后采用冰冻切片机通过激光光凝斑中心进行连续切片,切片厚度为 10 μm 。将切片置入冷丙酮中固定 10 min,取出晾干,自来水冲洗 30 s,苏木精染色 2 min,水洗,体积分数 70% 盐酸乙醇分化 2~3 s,水洗,饱和碳酸锂蓝化 10 s,伊红染色 1 min,体积分数 75%~100% 梯度乙醇脱水各 1 min,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察小鼠光凝斑处视网膜和脉络膜组织结构改变及 CNV 形成情况。

1.2.3 免疫荧光双标记法检测小鼠视网膜光凝斑组织中 F4/80 和 MCP-1 的表达及分布 按照 1.2.2 的方法制备小鼠眼球冰冻切片,质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗;滴加 MCP-1 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 漂洗,然后滴加羊抗兔 IgG 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 漂洗;山羊血清封闭 30 min;滴加 F4/80 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 漂洗,滴加相应二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 漂洗;滴加 DAPI (1:1 000) 复染细胞核, PBS 漂洗;缓冲甘油封片;用激光扫描共焦显微镜观察小鼠视网膜光凝斑组织中 F4/80 和 MCP-1 的表达。

1.2.4 免疫荧光染色法检测小鼠脉络膜铺片中 F4/80 的表达与分布 各组任意取 3 只小鼠,处死后摘取眼球于 4% 多聚甲醛中固定 1 h,去除眼内容物及视网膜,制作成眼杯,置于 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 8 h,以质量分数 30% 蔗糖溶液脱水 6 h;用质量分数 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h;滴加 F4/80 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, PBS 漂洗;滴加相应二抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 漂洗;滴加 DAPI (1:1 000) 复染细胞核, PBS 漂洗;缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 ELISA 法定量检测小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 蛋白的质量分数 各组任意选取 6 只小鼠,处死后摘取眼球并分离 RPE-脉络膜复合体,提取总蛋白。参照 ELISA 试剂盒说明书包被抗体,每孔加入抗原 0.10 ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液漂洗 3 次;加 2 倍稀释的总蛋白 0.10 ml 于上述包被反应孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,然后 20 倍稀释的洗涤缓冲液洗涤。各反应孔中分别加入新鲜 5 倍稀释的酶标抗体 0.10 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 20 倍洗涤缓冲液洗涤。再于反应孔中加入新鲜配制的 TMB 底物溶液 0.10 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 2 mol/L 硫酸 0.05 ml 终止反应。应用分光光度计于 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值,根据标准曲线计算 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 蛋白质量分数。

1.2.6 荧光定量 PCR 法检测小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的表达量 RPE-脉络膜复合体的分离和制备方法同 1.2.4, Trizol 法提取总 RNA, ND-2000C 紫外可见光分光光度计检测总 RNA 浓度和纯度。将 RNA 逆转录为 cDNA,并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。F4/80 基因的上游引物序列为 5'-CCCCAGTGTCCTTACAGAGTG-3',下游引物为 5'-GTGCCAGAGTGGATGTCT-3', GAPDH 的上游引物为 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游引物为 5'-GAGCTTCACAAAGTTGTCATTGAG-3'。配制反应体系:PCR 总体积 20.0 μl , SYBR Green I Master 10.0 μl , cDNA 模板 1.0 μl , 上下游引物各 0.5 μl , DEPC 水 8.0 μl 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 20 s,循环 50 次。以 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 F4/80 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (美国 SPSS 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,正常对照组、光凝后 6 h 组、光凝后 12 h 组、光凝后 24 h 组、光凝后 48 h 组和光凝后 72 h 组间小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 相对表达量和 MCP-1 质量分数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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜和脉络膜组织形态学改变

光凝后 6 h 光学显微镜下检查光凝斑,可见正常

对照眼视网膜各层结构正常,模型组实验眼 Bruch 膜、RPE 层和脉络膜层均破裂,视网膜外核层结构不连续;光凝后 12 h,纤维样无细胞组织长入光凝区,其周围脉络膜层增厚;光凝后 24 h,光凝区外核层略增厚,可见团块状新生物长入,周围脉络膜厚度进一步增加;光凝后 48 h,光凝区脉络膜、RPE 层及外核层均可见大量炎性细胞浸润,组织水肿,光凝区边界模糊;光凝后 72 h,光凝区外核层至 RPE 细胞层隆起,Bruch 膜及视网膜之间呈现腔隙,而光凝区边缘出现血管内皮细胞增生,并逐渐伸入光凝区(图 1)。

RPE 和脉络膜组织中 F4/80 呈阳性表达,光凝区边缘 MCP-1 呈阳性表达;光凝后 12 h,视网膜和脉络膜组织中 MCP-1 的红色荧光较光凝后 6 h 增强,主要分布在脉络膜层,内、外核层也有少量表达;光凝后 24 h,视网膜和脉络膜组织中 MCP-1 的红色荧光强度开始降低,而 F4/80 的绿色荧光较光凝后 6 h 和 12 h 明显增强,主要分布在脉络膜及 RPE 层,散在分布于神经纤维层及内、外丛状层;光凝后 48 h 和 72 h,小鼠视网膜和脉络膜组织中 MCP-1 红色荧光强度逐渐减弱,而 F4/80 绿色荧光强度持续增加,主要分布在脉络膜层(图 2)。

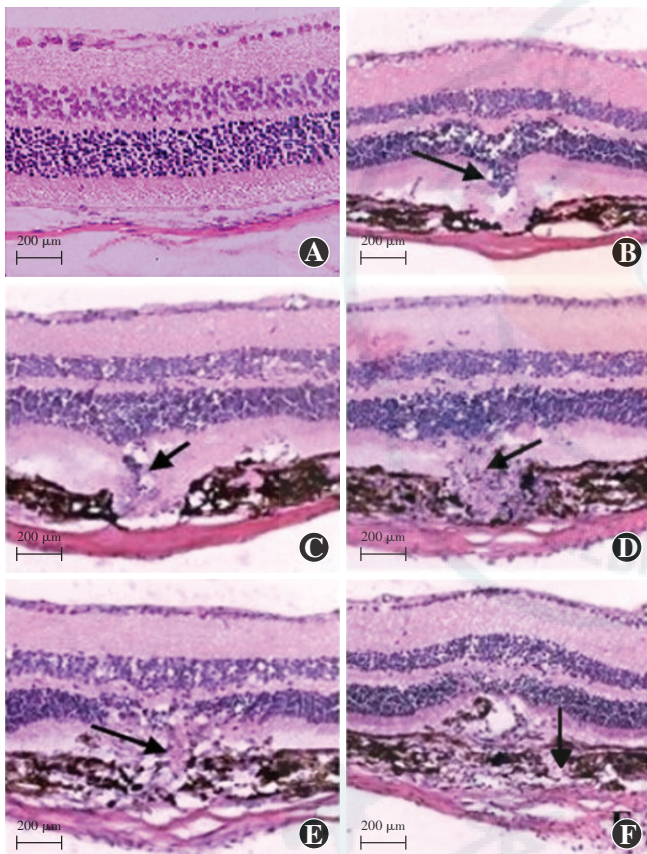


图 1 各组小鼠视网膜和脉络膜组织形态学检查(HE 标尺 = 200 μm) A:正常对照组小鼠视网膜可见 RPE 层和脉络膜层结构正常 B:光凝后 6 h 组可见 RPE 层、脉络膜层和视网膜外核层结构不连续(箭头) C:光凝后 12 h 组可见纤维样无细胞结构组织长入光凝区(箭头) D:光凝后 24 h 组可见局部有管块状新生组织生长(箭头) E:光凝后 48 h 组可见光凝区脉络膜、RPE 层及外核层大量炎性细胞浸润,组织结构排列紊乱(箭头) F:光凝后 72 h 组可见光凝区血管内皮细胞增生(箭头)

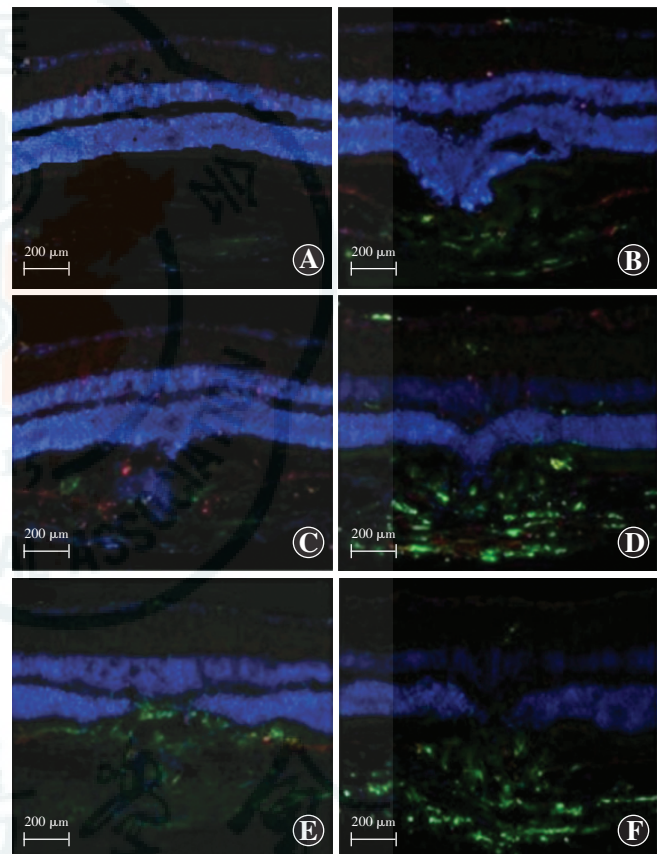


图 2 各组小鼠光凝区视网膜脉络膜组织中 F4/80 和 MCP-1 表达的双重免疫荧光染色(Alexa 546, Alexa 488 标尺 = 200 μm) 可见细胞核呈蓝色荧光, F4/80 表达呈绿色荧光, MCP-1 表达呈红色荧光 A:正常对照组小鼠视网膜中未检测到 F4/80 和 MCP-1 的表达 B:光凝后 6 h 组光凝区 RPE 及脉络膜组织中可见 F4/80 表达,周围组织中可见 MCP-1 表达 C:光凝后 12 h 组 MCP-1 表达稍增强 D:光凝后 24 h 组可见 F4/80 表达明显增强 E:光凝后 48 h 组 MCP-1 表达减弱 F:光凝后 72 h 组 MCP-1 表达减弱,但 F4/80 表达仍较强

2.2 各组小鼠视网膜和脉络膜组织中 F4/80 和 MCP-1 的表达分布

光凝后,双重免疫荧光染色标记显示激光损伤斑及其边缘视网膜脉络膜组织中 F4/80 呈绿色荧光, MCP-1 呈红色荧光。正常对照组小鼠组织中未见 F4/80 和 MCP-1 表达;光凝后 6 h 可见光凝区及其周围的

2.3 各组小鼠光凝区脉络膜铺片中 F4/80 蛋白的表达分布

光凝斑脉络膜铺片的荧光染色显示 F4/80 的表达呈红色荧光,其在光凝后随着时间的延长呈动态变化。光凝后 6 h, F4/80 主要表达分布在光凝斑周围,形成一个明显的荧光环;光凝后 12 h, F4/80 表达增强,光

凝斑周围的红色荧光环增强,光凝斑中心开始出现少许的红色荧光;光凝后 24 h、48 h 和 72 h, F4/80 的红色荧光环逐渐增强,光凝中心的荧光强度逐渐增加(图 3)。

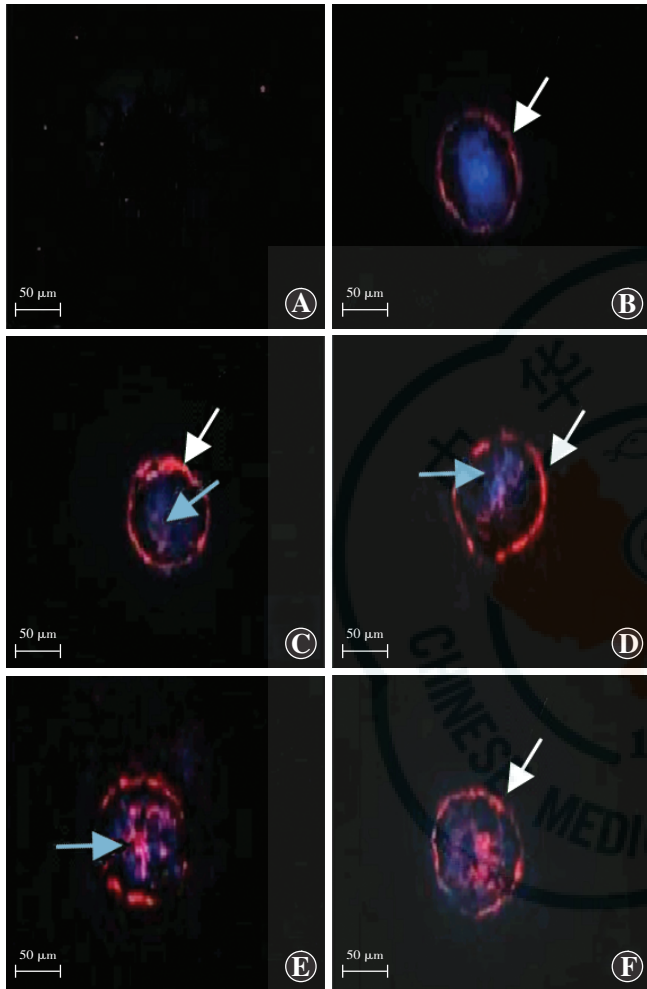


图 3 光凝后光凝区脉络膜铺片 F4/80 免疫荧光染色 (Alexa 488 标尺 = 50 μm) A: 正常对照组 RPE-脉络膜铺片未见明显 F4/80 表达 B: 光凝后 6 h 可见 RPE-脉络膜铺片中 F4/80 呈弱表达,在光凝斑周围形成弱红色荧光环(箭头) C: 光凝后 12 h F4/80 表达的荧光环增强(白箭头),光凝斑中央出现弱荧光(蓝箭头) D: 光凝后 24 h F4/80 的红色荧光环(白箭头)及中央荧光(蓝箭头)均增强 E: 光凝后 48 h,光凝斑中央的 F4/80 的红色荧光增强(蓝箭头) F: 光凝后 72 h, F4/80 表达增强,光凝区呈红色荧光团(白箭头)

2.4 各组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 蛋白的质量分数变化

正常对照组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 的质量分数较低,光凝后 6 h 组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 的质量分数较正常对照组明显增加,光凝后 12 h 组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 的质量分数达到峰值,之后逐渐下降,光凝后 72 h 组小鼠 RPE-脉络膜复合体中, MCP-1 的质量分数明显下降,但仍明显高于正常对照组。各组间 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 质量分数的总体比较差异有统计学意义 ($F =$

1 416. 46, $P = 0. 00$), 其中光凝后 6、12、24、48 和 72 h 组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 质量分数均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 ($t = 67. 11、69. 16、50. 86、41. 16、22. 81$, 均 $P < 0. 01$) (表 1)。

2.5 各组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的相对表达量变化

正常对照组小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的相对表达量较低,随着视网膜光凝后时间的延长, F4/80 mRNA 的相对表达量逐渐增加,各组间小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 762. 72, P = 0. 00$), 其中光凝后 6、12、24、48 和 72 h 小鼠 RPE-脉络膜复合体中 F4/80 mRNA 的相对表达量均明显高于正常对照组 ($t = 12. 59、21. 70、41. 88、66. 80、33. 45$, 均 $P < 0. 01$), 至损伤后 72 h, F4/80 mRNA 的相对表达量最高(表 1)。

表 1 光凝后 RPE-脉络膜复合体中 MCP-1 蛋白和 F4/80 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	MCP-1 表达 (pg/mg)	F4/80 mRNA 相对表达量
正常对照组	6	31. 25 ± 4. 73	1. 08 ± 0. 03
造模后 6 h 组	6	276. 31 ± 4. 20 ^a	1. 51 ± 0. 06 ^a
造模后 12 h 组	6	331. 95 ± 5. 86 ^a	2. 74 ± 0. 13 ^a
造模后 24 h 组	6	221. 24 ± 4. 42 ^a	3. 74 ± 0. 11 ^a
造模后 48 h 组	6	179. 89 ± 4. 10 ^a	6. 24 ± 0. 13 ^a
造模后 72 h 组	6	130. 80 ± 5. 90 ^a	6. 32 ± 0. 27 ^a
<i>F</i>		1 416. 46	762. 72
<i>P</i>		0. 00	0. 00

注:与各自的正常对照组比较, ^a $P < 0. 01$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验) RPE:视网膜色素上皮; MCP:单核细胞趋化蛋白

3 讨论

CNV 的生成是一个复杂的过程, Bruch 膜的损伤、RPE 细胞的细胞外基质的代谢紊乱或内源性血管生成因子抑制剂的功能失调是 CNV 生成的重要条件, 其中巨噬细胞在 CNV 的发生和发展中发挥重要的作用^[5]。当局部组织缺血或缺氧时, 巨噬细胞被激活, 并分泌趋化因子等物质, 募集巨噬细胞以及其他炎症细胞, 并通过分泌多种细胞因子来调控新生血管的生成过程^[6]。为了研究炎症与 CNV 形成的关系, 本研究中构建了小鼠 CNV 激光诱导模型, 并通过组织病理学方法、荧光标记技术和实时荧光定量 PCR、ELISA 等方法综合观察 CNV 形成过程中炎症趋化因子 MCP-1 和 F4/80 的动态表达, 发现视网膜光凝后光凝区可发生炎症变化, 组织病理学研究证实局部有炎症细胞浸润和组织水肿, 同时荧光标记技术、脉络膜铺片、实时荧光定量 PCR、ELISA 等方法均发现炎症发生期间 F4/80

和 MCP-1 在巨噬细胞、RPE 细胞和血管内皮细胞中表达,随着激光光凝后损伤时间的延长,F4/80 的表达逐渐增加,表明巨噬细胞逐渐聚集活化,参与 CNV 的形成。而 MCP-1 的表达随着激光光凝后损伤时间的延长而逐渐增加,至光凝后 12 h 时达到峰值水平,其后随着时间延长其表达逐渐下降,表明 MCP-1 在损伤刺激早期迅速分泌和活化,诱导炎症细胞聚集,导致 Bruch 膜破裂和 CNV 形成;但当新生血管逐渐进入脉络膜组织,MCP-1 表达则逐渐减少。

巨噬细胞及其所介导的炎症反应在 AMD 发病中扮演重要的角色,由巨噬细胞活化后所分泌的巨噬细胞源性细胞因子是新生血管生成病理表现的始动因素^[7]。F4/80 蛋白作为巨噬细胞的特异性标志物,其表达变化在一定程度上直接反映了巨噬细胞的表达情况。通过高能激光破坏 Bruch 膜,利用氩激光的热效应、机械损伤效应和光化学效应共同作用于带有色素的 Bruch 膜-RPE-脉络膜毛细血管复合体,使 Bruch 膜和 RPE 层急性破裂,从而促进巨噬细胞活化聚集。有研究表明,巨噬细胞活化后可分泌细胞因子和生长因子,如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8)、碱性成纤维母细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等,分别作用于内皮细胞和周细胞,促进新生血管形成^[8-9]。研究发现,在玻璃膜疣、CNV 及 Bruch 膜破裂损伤处,均可发现巨噬细胞^[10]。Eter 等^[11]观察了采用激光光凝诱导 *CX3CR1* 缺陷小鼠黄斑部视网膜损伤,发现光凝后 1 h,巨噬细胞、树突状细胞、小胶质细胞被激活并快速向损伤部位迁移,最终聚集在光斑周围,其后树突状细胞很快从视网膜消失,而在光凝后 35 d,脉络膜中仍然可见巨噬细胞浸润现象。近年来研究发现,这种局部的慢性炎症可进一步导致较大区域的视网膜萎缩,巨噬细胞产生和释放的巨噬细胞源性细胞因子,如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等,能促发 CNV,并成为湿性 AMD 的病理生理基础^[12-13]。

MCP-1 是由内皮细胞、血管平滑肌细胞和单核巨噬细胞分泌的一种趋化因子,属于趋化因子超家族中的一员。MCP-1 促使单核巨噬细胞向血管内膜迁移,是多种急慢性炎症性疾病发生和发展过程中的关键发病机制。MCP-1 可以辅助局部巨噬细胞和未成熟树突细胞的更新,当 MCP-1 生成减少时,清除局部巨噬细胞和树突细胞的功能亦降低^[14]。本研究结果显示

MCP-1 的表达随着激光光凝后损伤时间的延长而逐渐增加,至光凝后 12 h 时达到峰值水平,其后随着时间延长其表达逐渐下降,推测 MCP-1 在损伤早期迅速分泌和活化,诱导炎症细胞聚集,导致 Bruch 膜破裂和 CNV 形成;但当新生血管逐渐长入脉络膜组织后,MCP-1 的表达则逐渐减少。而随着 MCP-1 的表达减少,巨噬细胞的清除能力下降,从而诱导更多炎症细胞的浸润。高小燕等^[15]的研究认为 MCP-1 的表达随 CNV 面积及荧光素渗漏量的增加而增强,其可能在 CNV 形成和发展过程中起重要作用,这与本研究中的结论基本一致。MCP-1 或 CC 趋化因子配体-2 (CC chemokine ligand 2, CCL-2) 基因缺陷的动物模型表现出脂褐质在 RPE 中沉积、RPE 细胞层下出现玻璃膜疣、光感受器细胞萎缩、CNV 形成等 AMD 特点^[16]。Luhmann 等^[17]研究发现, *CCL-2* 基因敲除小鼠激光损伤后巨噬细胞浸润和 CNV 的面积显著降低。Xie 等^[18]研究发现玻璃体腔注射趋化因子受体拮抗剂 INCB3344,可明显抑制巨噬细胞的浸润和 VEGF 的表达,阻止 CNV 的产生,并使已长出的 CNV 退缩。因此, MCP-1 可能作为一种新型细胞因子靶点,对临床 CNV 疾病的诊治发挥重要作用。

我们的研究表明,以巨噬细胞为主的炎症细胞介导的炎症反应在 CNV 的发病机制中起到重要作用,激光光凝损伤导致 Bruch 膜和 RPE 受损,从而刺激大量巨噬细胞活化聚集, MCP-1 表达异常增高,从而进一步趋化巨噬细胞和其他炎症细胞的局部聚集,分泌细胞生长因子,介导 CNV 的发生。CNV 的发病机制目前仍不完全明确,除了巨噬细胞介导的炎症反应外,还有氧化应激反应、免疫反应相关的细胞和因子也参与其中^[19]。

综上所述,进一步明确 CNV 的发病机制,了解巨噬细胞如何进行活化和聚集,从而抑制其活化和功能,可能为 CNV 的防治及新型治疗药物的开发提供新的线索和途径。

参考文献

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration[J]. *Lancet*, 2012, 379 (9827) : 1728 - 1738. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- [2] Nagai N, Kubota S, Tsubota K, et al. Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25 (11) : 1218 - 1225. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.05.015.
- [3] Kinoshita S, Noda K, Tagawa Y, et al. Genistein attenuates choroidal neovascularization[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25 (11) : 1177 - 1182. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.004.
- [4] Yuda K, Takahashi H, Inoue T, et al. Adrenomedullin inhibits choroidal neovascularization via CCL2 in the retinal pigment epithelium[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181 (4) : 1464 - 1472. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.028.
- [5] Buschini E, Piras A, Nuzzi R, et al. Age related macular degeneration and drusen; neuroinflammation in the retina[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 95 (1) : 14 - 25. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.05.011.

- [6] Kaneko H, Ye F, Ijima R, et al. Histamine H4 receptor as a new therapeutic target for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(15): 3754-3763. doi: 10.1111/bph.12737.
- [7] Dagtekin G, Schiffer R, Klein B, et al. Modulation of angiogenic functions in human macrophages by biomaterials[J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3395-3401.
- [8] Krause TA, Alex AF, Engel DR, et al. VEGF-production by CCR2-dependent macrophages contributes to laser-induced choroidal neovascularization[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e94313 [2015-07-29]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094313. doi:10.1371/journal.pone.0094313.
- [9] Grunin M, Hagbi-Levi S, Chowers I. The role of monocytes and macrophages in age-related macular degeneration[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 801: 199-205. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_26.
- [10] Camelo S. Potential sources and roles of adaptive immunity in age-related macular degeneration: shall we rename amd into autoimmune macular disease? [J/OL]. Autoimmune Dis, 2014, 2014: 532487 [2015-07-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022009/. doi:10.1155/2014/532487.
- [11] Eter N, Engel DR, Meyer L, et al. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3649-3658. doi:10.1167/iops.07-1322.
- [12] Chan CC, Ardeljan D. Molecular pathology of macrophages and interleukin-17 in age-related macular degeneration[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 801: 193-198. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_25.
- [13] Ozaki E, Campbell M, Kiang AS, et al. Inflammation in age-related macular degeneration[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 801: 229-235. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_30.
- [14] Guymer RH, Tao LW, Goh JK, et al. Identification of urinary biomarkers for age-related macular degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4639-4644. doi:10.1167/iops.10-7120.
- [15] 高小燕, 何守志, 张新秀. 单核细胞趋化蛋白-1 在大鼠脉络膜新生血管中的表达[J]. 眼科研究, 2010, 28(8): 707-711. doi:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.08.006.
- [16] Ambati J, Anand A, Fernandez S, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl2- or Ccr2-deficient mice[J]. Nat Med, 2003, 9(11): 1390-1397.
- [17] Luhmann UF, Robbie S, Munro PM, et al. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(12): 5934-5943. doi:10.1167/iops.09-3462.
- [18] Xie P, Kamei M, Suzuki M, et al. Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344 [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(12): e28933 [2015-08-15]. http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028933. doi:10.1371/journal.pone.0028933.
- [19] Nivison-Smith L, Milston R, Madigan M, et al. Age-related macular degeneration; linking clinical presentation to pathology[J]. Optom Vis Sci, 2014, 91(8): 832-848. doi:10.1097/OPX.0000000000000281.

(收稿日期:2015-08-29)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

· 病例报告 ·

PDT 联合雷珠单抗玻璃体腔注射治疗息肉状脉络膜血管病变并发 RPE 撕裂 1 例

潘雪梅 王菲

患者,女,78岁,因右眼视力下降1周就诊。患者既往有高血压病史,服用降压药后血压为140/85 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。患者否认糖尿病、冠心病、肝病和结核等病史。体格检查:视力右眼为0.30,左眼为1.00;右眼和左眼眼压分别为15 mmHg和16 mmHg。裂隙灯显微镜下可见人工晶状体位正;间接检眼镜检查可见右眼眼底后极部大片状视网膜下出血及水肿,视盘颞侧见弧形出血(图1);左眼黄斑区视网膜可见玻璃膜疣。OCT检查显示右眼黄斑区视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)脱离,呈锯齿样向内隆起(图1B)。荧光素眼底血管造影(fundus fluorescence angiography, FFA)和吲哚菁绿造影(indocyanine green angiography, ICG)显示右眼视网膜后极部大片遮蔽荧光,黄斑区及后极部可见点状荧光素渗漏,颞侧上血管弓处可见一处瘤样扩张(图2A, B)。临床诊断:右眼息肉状脉络膜血管病变(polypoidal choroidal vasculopathy, PCV)。给予右眼光动力疗法(photodynamic therapy, PDT),避光48 h后联合2.5 mg雷珠单抗玻璃体腔注射。

治疗后3周复查右眼视力为0.08,视网膜下方可见新鲜大片状视网膜下出血。OCT显示右眼黄斑区RPE脱离,部分撕裂(图1D)。FFA显示黄斑区小片状无灌注区,视盘颞下方可见片状透见荧光(图2C)。治疗后2个月右眼视力0.08,视网膜下出血量较之前减少。OCT显示黄斑区RPE脱离,部分撕

裂,撕裂处视网膜神经上皮层呈半球状脱离(图3)。给予第2次雷珠单抗玻璃体腔注射,注射后4个月右眼视力0.12,视网膜下出血基本吸收。OCT显示黄斑区RPE脱离,以颞上方最为严重。FFA+ICG检查可见视网膜颞上方片状遮蔽荧光,晚期颞上方可见一片状荧光素蓄积及荧光素渗漏(图4)。给予PDT联合第3次雷珠单抗玻璃体腔注射,此次治疗后1个月右眼视力0.12, OTC显示黄斑区及颞上RPE脱离平复(图5);治疗后3个月右眼视力0.20, OCT显示黄斑区视网膜形态较之前好转,但颞上方RPE层再次隆起(图6)。给予第4次雷珠单抗玻璃体腔注射,注射后OCT显示颞上方RPE脱离程度好转,其后给予雷珠单抗玻璃体腔注射4次,视力逐渐改善。自初始治疗后18个月,患者右眼视力为0.60。

讨论:PCV是以异常扩张的分支状脉络膜毛细血管网扩张、血液滞留及其末端的息肉状脉络膜血管扩张灶为特征的一种疾病^[1],其病变位置多位于黄斑区及视盘周围,可引起视力不同程度的下降。目前临床上针对PCV的治疗手段包括激光光凝、PDT、抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物治疗、联合治疗等,其中PDT联合玻璃体腔注射抗VEGF药物,能更好地提高视力,降低复发率,减少并发症^[2-3]。本研究中应用PDT联合雷珠单抗玻璃体腔注射治疗1例PCV合并RPE撕裂患者,并对治疗过程中的经验和教训进行总结:(1)玻璃体腔注射雷珠单抗后色素上皮撕裂的原因。有研究表明,大范围的血管性RPE脱离是RPE撕裂的重要预测因子^[4-5]。如果血管性RPE脱离的高度>400 μm,玻

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.010

作者单位:250002 济南,山东中医药大学附属医院

通信作者:潘雪梅, Email:paneye@qq.com