

# Notch 信号对激光诱导的小鼠 CNV 生成过程中巨噬细胞极化表型及功能的调控

李娜 窦国睿 张萍 赵俊龙 晏贤春 燕洁静 李曼红 韩骅 王雨生

**【摘要】** **背景** 巨噬细胞在脉络膜新生血管(CNV)中的作用尚存在争议,与其在不同微环境中的功能异质性有关,Notch 信号通路参与眼内新生血管生长的调控,但其对 CNV 中巨噬细胞功能的调控作用尚未证实。**目的** 探讨巨噬细胞在 CNV 生成中极化表型的变化与 Notch 信号通路对巨噬细胞极化表型的调控。**方法** 在体实验选择 58 只成年雄性 C57BL 小鼠,以随机数字表法按照造模后取材时间的不同随机分为光凝后 3 d 组和 7 d 组。每组选 23 只小鼠用视网膜光凝法诱导小鼠 CNV 模型,分别于光凝后 3 d 和 7 d 制备脉络膜铺片,采用免疫荧光染色法观察 CNV 面积和巨噬细胞阳性染色面积,血管内皮生长因子(VEGF)及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的分泌情况;光凝后 3 d 和 7 d 对眼杯冰冻切片行免疫荧光染色,观察 CNV 中巨噬细胞的极化表型及其分泌 VEGF、TNF- $\alpha$  的情况,评估巨噬细胞上 Notch 信号胞内段(NICD)相应分子标志物的表达情况。每组设定 6 只小鼠的左眼为正常对照眼,其右眼以激光光凝法建立 CNV 模型,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测眼杯组织中 VEGF、TNF- $\alpha$  和巨噬细胞极化相关因子的表达情况。体外分离和培养 C57BL 小鼠的骨髓单核前体细胞,用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱导其分化为巨噬细胞,加入 Notch 信号通路抑制剂 $\gamma$ -分泌酶抑制剂(GSI)和极化诱导因子,24 h 后收集细胞及培养液上清,通过 qRT-PCR 及 ELISA 法检测 M1 型、M2 型巨噬细胞分子表面标志物的表达水平。**结果** 与光凝后第 3 天比较,光凝后第 7 天 CNV 面积明显增大,但巨噬细胞浸润面积缩小,差异均有统计学意义( $t=8.138, 5.272$ , 均  $P=0.000$ )。光凝后第 3 天,巨噬细胞在 CNV 周边和中央均有分布,第 7 天时局限于 CNV 中央部。光凝后第 3 天,色素上皮-脉络膜-巩膜复合体中精氨酸酶 1(Arg1)、甘露糖受体(MR)及白细胞介素-6(IL-6)mRNA 的相对表达量明显高于第 7 天,而诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 的相对表达量无明显改变。免疫荧光结果显示,光凝后第 3 天 F4/80<sup>+</sup>Arg1<sup>+</sup>细胞(M2 型巨噬细胞)数量明显多于 F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>细胞(M1 型巨噬细胞),光凝后第 7 天 F4/80<sup>+</sup>Arg1<sup>+</sup>细胞数量明显减少,差异均有统计学意义( $t=7.348, P=0.000; t=5.562, P<0.001$ ),但仍多于 F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>细胞,二者间差异有统计学意义( $t=4.568, P<0.01$ )。在光凝后 3 d 时巨噬细胞分泌的 VEGF 和 TNF- $\alpha$  明显多于光凝后 7 d,差异均有统计学意义( $t=5.143, 4.519$ , 均  $P<0.01$ )。巨噬细胞中 Notch 信号下游分子在光凝后 3 d 时未见表达,7 d 时表达量明显增加,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。体外实验表明,阻断 Notch 信号后,M1 型巨噬细胞分子标志物表达量明显下降,而 M2 型巨噬细胞分子标志物的表达量明显增加,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 巨噬细胞的极化表型在 CNV 模型的不同阶段发生变化,而巨噬细胞中 Notch 信号的激活状态调控巨噬细胞的极化表型改变和功能。

**【关键词】** 脉络膜新生血管; 巨噬细胞/功能; 细胞间肽类和蛋白类/代谢; Notch 信号; 近交系 C57BL 小鼠

**Regulating effect of Notch signaling on macrophage polarization and function in laser-induced CNV** Li Na, Dou Guorui, Zhang Ping, Zhao Junlong, Yan Xianchun, Yan Jiejing, Li Manhong, Han Hua, Wang Yusheng. Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital, The Fourth Military University, Xi' an 710032, China

Corresponding author: Dou Guorui, Email: fierywang@126.com; Wang Yusheng, Email: wangys003@126.com

**【Abstract】** **Background** The role of macrophages (M $\phi$ ) in choroidal neovascularization (CNV) is still

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.005

基金项目:国家自然科学基金项目(81200707);国家重点基础研究发展计划项目(2011CB510200);高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金项目(201481);陕西省社会发展攻关项目(2011K12-46);西京医院学科助推项目(XJZT3J03)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所(李娜、窦国睿、燕洁静、李曼红、王雨生);710032 西安,第四军医大学基础医学部 遗传与发育生物学教研室 肿瘤生物学国家重点实验室(张萍、赵俊龙、晏贤春、韩骅)

通信作者:窦国睿,Email:fierywang@126.com;王雨生,Email:wangys003@126.com

controversial due to the heterogeneity of M $\phi$  in different microenvironments. Notch signaling is involved in a variety of ocular neovascularization including CNV. However, whether or how Notch signaling regulates the polarity convention and function of M $\phi$  during CNV is below understood. **Objective** This study aimed to investigate the alteration of M $\phi$  polarization and the regulation mediated by Notch signaling in CNV. **Methods** In an *in vivo* experiment, 58 adult male C57B6 mice were grouped to post-photocoagulative 3 day group and 7 day group randomly based on the sampling time. CNV was induced by photocoagulation of retinas by 532 nm frequency doubling laser in 23 mice in each group. The CNV area, M $\phi$  infiltrated area, secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by choroidal flat mounts and immunofluorescence staining. The polarization of M $\phi$ , the secretion of VEGF and TNF- $\alpha$  and the expression of activated Notch intracellular domain (NICD) were detected by immunofluorescence in frozen sections. The CNV was induced in the remained 6 mice in each group, with 14 laser spots in the right eyes and the left eyes as controls. Quantity real-time PCR (qRT-PCR) was performed to detect the polarization of M $\phi$  and the expression of angiogenesis related factors. In an *in vitro* experiment, bone marrow derived macrophage (BMDM) was isolated and induced with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) to differentiate into M $\phi$ . The  $\gamma$ -secretion inhibitor (GSI) was added to BMDM culture environment with the polarization stimulus. The cells and the culture supernatant were collected to detect the molecule markers of M1 and M2 polarization by qRT-PCR and ELISA 24 hours later. **Results** The CNV area was significantly increased and the M $\phi$  infiltrated area was decreased in the post-photocoagulative 7 day group compared with the 3 day group ( $t = 8.138, 5.272$ , both at  $P = 0.000$ ). M $\phi$  distributed in both the peripheral and central of CNV in the 3 day group and accumulated in the central of CNV in 7 day group. qRT-PCR assay showed that the relative expressions of arginase 1 (Arg1) mRNA, mannose receptor (MR) mRNA and interleukin 6 (IL-6) mRNA in the CNV were significantly upregulated in post-photocoagulative 3 days and downregulated in 7 days (all at  $P < 0.05$ ). However, no significant shift was found in the expression of iNOS mRNA at the same duration. Immunofluorescence results displayed that there were more F4/80<sup>+</sup> Arg1<sup>+</sup> cells (M2-liked M $\phi$ ) than F4/80<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup> cells (M1-liked M $\phi$ ) in 3 days and 7 days ( $t = 7.348, 4.568$ , both at  $P < 0.01$ ), and the mount of F4/80<sup>+</sup> Arg1<sup>+</sup> cells was significantly reduced in 7 days compared with in 3 days ( $t = 5.562, P < 0.001$ ). The choroidal flat mounts, qRT-PCR and immunofluorescence results demonstrated that VEGF had a visible expression in CNV in 3 days after photocoagulation, and it was dramatically upregulated in 7 days ( $t = 5.776, P < 0.01$ ), but the secreted VEGF level by M $\phi$  was higher in the third day than that in the seventh day ( $t = 5.143, P < 0.001$ ). Similarly, the secretion level of TNF- $\alpha$  by M $\phi$  was declined in the seventh day compared with the third day ( $t = 4.519, P < 0.01$ ). In addition, qRT-PCR and immunofluorescence results indicated that the expression of downstream molecule of Notch signaling in M $\phi$  was not found in 3 days, but these molecules were expressed and activated in 7 days after photocoagulation ( $P < 0.05$ ). *In vitro*, the BMDMs converted to M2 after blockage of Notch signaling, and the decrease of M1 markers and increase of M2 markers were seen (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** M $\phi$  polarization phenotypes alter upon the development of CNV. The activation of Notch signaling pathway participates in the modulation of M $\phi$  polarization and functional diversity.

[**Key words**] Choroidal neovascularization; Macrophage/physiology; Intercellular signaling peptides and proteins/metabolism; Notch signaling; Mice, inbred C57BL

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 可穿透 Bruch 膜于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 下或穿透视网膜在视网膜下腔生长, 造成局部组织生长渗出、出血及瘢痕形成<sup>[1]</sup>。多种类型的细胞、生长因子和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的共同作用为 CNV 的形成和发展提供局部微环境, 这些因素可通过多种信号通路之间的交互作用对 CNV 的生成发挥调控作用<sup>[2-3]</sup>。巨噬细胞是 CNV 微环境中重要的细胞之一, 其参与和引起的慢性炎症和异常免疫是 CNV 生成的中心环节<sup>[4]</sup>。CNV 局部浸润巨噬细胞的主要来源是外周迁移的巨噬细胞<sup>[5]</sup>, 但目前对外周迁移巨噬细胞在 CNV 中究竟如何发挥作用的认知尚存争议。研究发现, 清除巨噬细胞后 CNV 面积缩小<sup>[6-7]</sup>, 增加巨噬细胞募集可抑制

CNV<sup>[8]</sup>, 推测巨噬细胞在 CNV 中可能发挥双重作用, 但其为何发挥不同作用及调控其作用的分子机制尚不明确。本研究建立激光诱导的 CNV 模型, 观察不同时间点巨噬细胞在 CNV 中的极化表型及因子分泌情况, 同时在体外诱导分化骨髓源性巨噬细胞, 研究 Notch 信号对于巨噬细胞极化反应和功能的调控, 探讨在 CNV 生成中巨噬细胞的极化和功能变化及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

罗丹明标记的蓖麻子凝集素 (lectin, 1:400)、14-4801 大鼠抗小鼠 F4/80 抗体 (1:400) (美国 Ebioscience 公司; 山羊抗小鼠精氨酸合酶 1 (arginase 1, Arg 1) 一抗 (ab60176)、小鼠抗小鼠诱导型一氧化氮合酶

(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体 (ab49999)、兔抗小鼠血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体 (ab46154, 1:200)、兔抗小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , 1:200) 抗体 (ab6671)、兔抗小鼠 Notch1-ICD 多克隆抗体 (ab8925) (英国 Abcam 公司); 山羊抗小鼠 IgG FITC 二抗 (F9006, 1:400)、羊抗兔 IgG-CY3 抗体二抗 (C2306, 1:400)、PBS、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (美国 Sigma 公司); 山羊抗大鼠 TRITC 二抗 (CW-0167, 1:400)、马抗山羊 IgG-Biotin (BA-9500, 1:400)、Streptavidin FITC 二抗 (SA-5488, 1:400) (日本 Vector 公司); 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、Trizol reagent (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 Prime Script RT Master Mix、实时定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq (日本 TaKaRa 公司); ELISA 试剂盒 (北京欣博盛公司);  $\alpha$ -MEM 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶干粉 (美国 Gibco 公司);  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4) (美国 Peprotech 公司);  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 ( $\gamma$ -secretion inhibitor, GSI)、二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO)、Ack 红细胞裂解液 (江苏碧云天生物技术研究所); 锥虫蓝 (北京鼎国公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (日本参天制药株式会社)。532 nm 倍频掺钕钇石榴石激光器 (美国 IRIS 公司); 7500 型实时定量 PCR (美国 AB 公司); Fluoview 300 型激光扫描共焦显微镜 (日本 Olympus 公司); CM1900 型冰冻切片机 (德国 Leica 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠 CNV 模型的建立** 选取 SPF 级 8 周龄雄性健康 C57BL 小鼠, 体质量为 20 ~ 25 g (第四军医大学实验动物中心提供)。实验动物的使用和喂养均遵循 ARVO 声明。用质量分数 0.6% 戊巴比妥钠行小鼠腹腔内注射进行麻醉, 剂量为 30 mg/kg。行脉络膜铺片和冰冻切片检测者用复方托吡卡胺滴眼液点双眼扩瞳, 眼前放置三面镜, 用倍频 532 nm 激光机在裂隙灯显微镜下围绕视盘在血管之间光凝 6 个点; 行眼杯组织的 qRT-PCR 检测者以左眼为空白对照, 右眼以同样的方法光凝 14 个点。光斑直径为 75  $\mu$ m, 曝光时间为 100 ms, 功率为 120 mW, 发射光聚焦于 Bruch 膜, 有气泡产生者提示 Bruch 膜被击破, 视为有效光斑, 若无气泡出现则视为无效光斑。

**1.2.2 脉络膜铺片的制备及染色** 用 0.6% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉小鼠, 经左心室先后灌注 50 ml

质量分数 1% PBS 及质量分数 4% 多聚甲醛, 小鼠全身痉挛、尾部翘起者为灌注成功。立即摘除眼球, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 h。去除角膜、晶状体和视网膜神经感觉层, 在视网膜色素上皮-脉络膜-巩膜复合体做 4 ~ 6 个放射状切口, 使之展平, 将铺片放入体积分数 0.2% TritonX-100 中 4  $^{\circ}$ C 封闭 24 h, 加入相应一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜 (>18 h)。PBST 洗 3 遍后加入相应二抗均 1:400 稀释) 室温孵育 2 h。需要敷三抗 (streptavidin FITC, 1:400) 者, 洗涤后室温孵育 40 min, 最后于 PBST 中洗涤 3 遍。将铺片在载玻片上展平, 体积分数 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的面积。

**1.2.3 冰冻切片及免疫荧光染色测定表达相应目的基因的巨噬细胞数量** 小鼠麻醉及左心室灌注方法同 1.2.2, 眼球摘除后在 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h。去除角膜和晶状体, 将眼杯置于质量分数 30% 蔗糖溶液中脱水至沉底。制备 8  $\mu$ m 冰冻切片, 室温下干燥 2 h, PBST 洗 15 min, 用质量分数 5% 牛血清白蛋白和 1% TritonX-100 室温封闭 30 min。加入相应一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜 (>18 h), 洗涤后加入相应二抗室温孵育 2 h (需染三抗者洗涤后, streptavidin FITC、avidin Cy3 1:400, 室温孵育 40 min), 洗涤后 hoechst (1:5 000) 室温染色 15 min, 洗涤后 50% 甘油封片。激光扫描共焦显微镜下观察并拍照, 统计双阳性细胞的数量。

**1.2.4 骨髓单核前体细胞的分离与培养** 选取 8 周龄健康雄性小鼠, 颈椎脱臼法处死, 置于体积分数 75% 乙醇中浸泡消毒, 固定于超净台中的手术板上。在小鼠腹股沟处切开皮肤, 分离下肢肌肉, 暴露股骨和胫骨, 完整取出。去除长骨两侧骨垢端, 以 5 ml 注射器用 1 倍 PBS 冲出骨髓内的细胞, 于大皿中, 并用滴管反复轻柔吹打细胞, 以吹散较大的骨髓腔内组织块。用预先高压消毒的尼龙膜过滤细胞悬液, 收集滤过液于离心管中, 300 $\times$ g 离心 4 min。弃上清, 加入 2 ml 红细胞裂解液重悬, 室温裂解 5 ~ 8 min, 加入等容积培养液或 1 倍 PBS 以终止裂解。离心半径为 15 cm, 1 300 r/min 离心 4 min, 弃上清, 以细胞培养液重悬骨髓细胞后均匀种入 10 cm 培养皿中, 培养过夜 (16 h 为宜), 以除去贴壁速度较快的基质细胞, 如纤维细胞等。次日离心收集未贴壁细胞, 弃上清, 用细胞培养液重悬后均匀种植于培养皿或培养板中, 加入 GM-CSF, 使其终质量浓度为 40 ng/ml, 刺激前体细胞向单核巨噬细胞分化。于培养第 4 天换液, 并补充 GM-CSF。培养后 7 d 即可成功诱导成巨噬细胞。用 LPS (100 ng/ml) 联合 IFN- $\gamma$

(20 ng/ml)加入培养基,刺激巨噬细胞向 M1 型极化,用 20 ng/ml IL-4 加入培养基刺激巨噬细胞向 M2 型极化。骨髓来源的巨噬细胞培养成熟后,直接向细胞培养液中加入(75 nmol/L)和极化诱导因子,对照组以 DMSO 代替 GSI,培养 24 h 后收集细胞和上清,分别行 qRT-PCR 和 ELISA 检测。

**1.2.5 ELISA 法检测巨噬细胞中相应目的基因的表达** 收集巨噬细胞培养上清后,按 ELISA 试剂盒说明书推荐步骤检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 的含量 (pg/ml)。

**1.2.6 qRT-PCR 法测定眼杯组织中相应目的基因的表达** 按 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取眼杯组织或细胞总 RNA,逆转录成 cDNA。以 *Actin* 基因作为内参。应用目的基因 *Arg1*、*Hes-1*、*Hey-1*、*iNOS*、*IL-6*、*IL-10*、甘露糖受体 (mannose receptor, *MR*)、*TNF- $\alpha$* 、*VEGF* 引物 real-time PCR 法扩增对应基因。扩增结果与 *actin* 产物比较,并按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对值。引物由日本 TaKaRa 生物技术公司合成,引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

目的基因	引物序列
<i>Actin</i>	F:5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'
<i>Actin</i>	R:5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'
<i>Arg1</i>	F:5'-AGACAGCAGAGGAGGTGAAGAG-3'
<i>Arg1</i>	R:5'-CGAAGCAAGCCAAGGTTAAAGC-3'
<i>Hes-1</i>	F:5'-GCAGACATTCTGGAATGACTGTGA
<i>Hes-1</i>	R:5'-GAGTGCACCTCGGTGTTA-3'
<i>Hey-1</i>	F:5'-CATGAAGAGAGCTCACCCAGA-3'
<i>Hey-1</i>	R:5'-CGCCGAAGCTCAAGTTCC-3'
<i>iNOS</i>	F:5'-GCAGAGATTGGAGGCCTTGTG-3'
<i>iNOS</i>	R:5'-GGGTGTTGCTGAACTTCCAGTC-3'
<i>IL-6</i>	F:5'-CCACTTACAAGTCGGAGGCTTA-3'
<i>IL-6</i>	R:5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTCATAC-3'
<i>IL-10</i>	F:5'-CCCTTTGCTATGGTGTCTCT-3'
<i>IL-10</i>	R:5'-TGGTTTCTCTCCCAAGACC-3'
<i>MR</i>	F:5'-AAACACAGACTGACCCTTCCC-3'
<i>MR</i>	R:5'-GTTAGTGTACCGCACCTCC-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F:5'-CAGGAGGGAGAACAGAACTCCA-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	R:5'-CCTGGTTGGCTGCTTGCTT-3'
<i>VEGF</i>	F:5'-AGGAGCCGAGCTCATGGA-3'
<i>VEGF</i>	R:5'-CTCTCTTCTGCTGGGTG-3'

注: Arg: 精氨酸合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; IL: 白细胞介素; MR: 甘露糖受体; TNF: 肿瘤坏死因子; VEGF: 血管内皮生长因子

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用随机分组两水平或三水平实验设计,各指标的组间差异比较分

别采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析,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 CNV 建模早期巨噬细胞在脉络膜铺片中的变化**

CNV 建模早期巨噬细胞在脉络膜中的浸润达峰,随 CNV 进展,巨噬细胞浸润减少。脉络膜铺片及 lectin 染色显示,光凝后第 3 天 CNV 面积为  $[(32.57 \pm 3.28) \times 10^3] \mu\text{m}^2$ ,第 7 天为  $[(137.70 \pm 12.50) \times 10^3] \mu\text{m}^2$ ,随着时间的延长,脉络膜铺片中绿色荧光标记的 CNV 面积明显增大,差异有统计学意义 ( $t = 8.138, P = 0.000$ ); F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞呈现的红色荧光面积在光凝后第 3 天为  $[(45.74 \pm 5.93) \times 10^3] \mu\text{m}^2$ ,光凝后第 7 天为  $[(12.74 \pm 2.00) \times 10^3] \mu\text{m}^2$ ,差异有统计学意义 ( $t = 5.272, P = 0.000$ )。此外,光凝后第 3 天时 F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞主要分布于新生血管膜周边(巨噬细胞浸润超

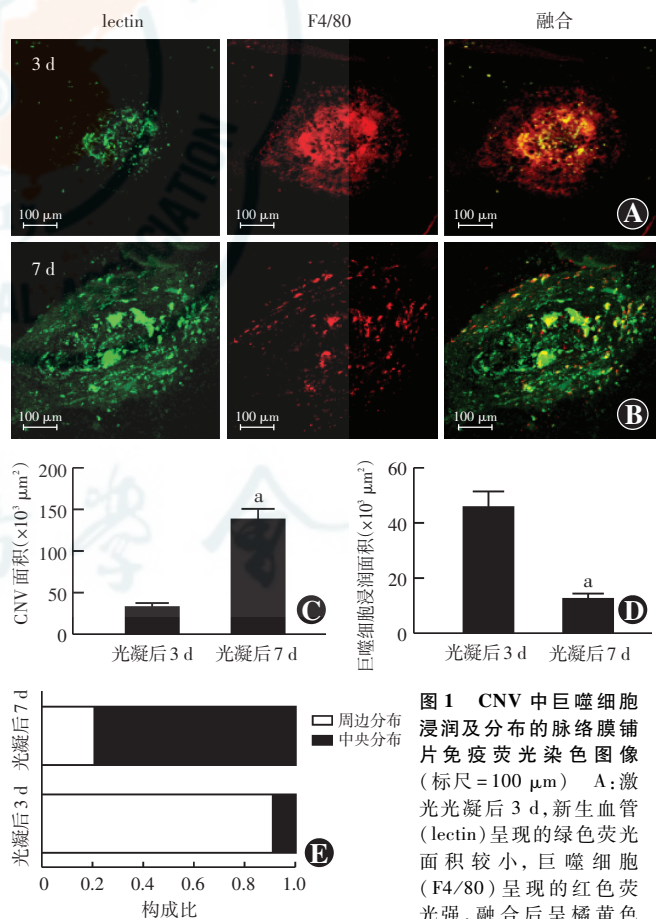


图 1 CNV 中巨噬细胞浸润及分布的脉络膜铺片免疫荧光染色图像 (标尺=100 μm) A: 激光光凝后 3 d, 新生血管 (lectin) 呈现的绿色荧光面积较小, 巨噬细胞 (F4/80) 呈现的红色荧光强, 融合后呈橘黄色荧光 B: 激光光凝后 7 d, 新生血管呈现的绿色荧光面积增大, 巨噬细胞呈现的红色荧光弱于光凝后 3 d, 融合后呈黄绿色荧光 C: 激光光凝后不同时间点 CNV 面积的量化比较 与 CNV 3 d 比较, \* $P = 0.000$  (独立样本 *t* 检验,  $n = 36$ ) CNV: 脉络膜新生血管 D: 激光光凝后不同时间点巨噬细胞浸润面积的量化比较 与 CNV 3 d 比较, \* $P = 0.000$  (独立样本 *t* 检验,  $n = 36$ ) E: 光凝后不同时间点巨噬细胞在 CNV 中分布的构成比

出 CNV 边界) 和中央(巨噬细胞在 CNV 边界内浸润), 至光凝后第 7 天, F4/80<sup>+</sup> 巨噬细胞多局限于 CNV 中央部(图 1)。

### 2.2 CNV 中巨噬细胞的极化及数量变化

光凝后第 3 天和第 7 天, F4/80<sup>+</sup> Arg1<sup>+</sup> M2 型巨噬细胞的数量均明显多于 F4/80<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup> M1 型巨噬细胞, 差异均有统计学意义 ( $t = 7.348, P = 0.000; t = 4.568, P < 0.01$ ); 光凝后第 7 天 M2 型巨噬细胞数量较光凝后第 3 天明显减少, 差异有统计学意义 ( $t = 5.562, P < 0.001$ ), 而 M1 型巨噬细胞无明显变化(图 2)。

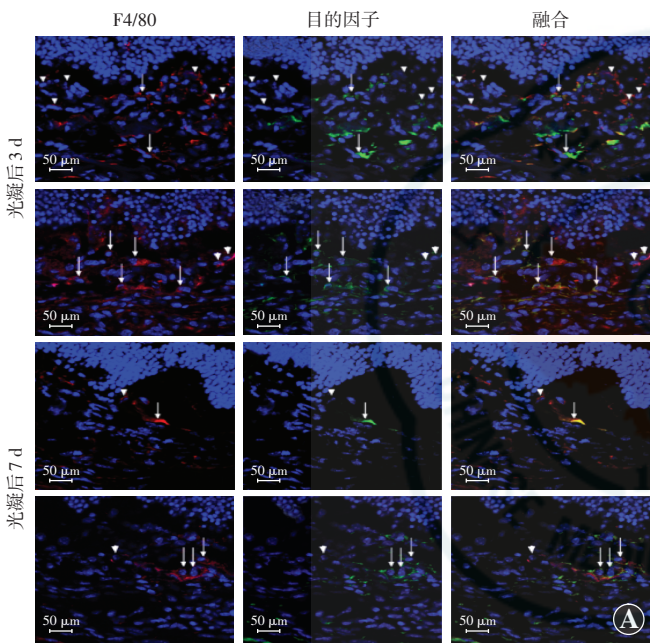


图 2 光凝后眼球冰冻切片免疫荧光染色 A: Hoechst 染色的蓝色荧光为细胞核; F4/80 标记的红色荧光为巨噬细胞; 绿色荧光分别标记 M1 型和 M2 型巨噬细胞表面特异性分子 iNOS 和 Arg1; 白色箭头

指示双阳性细胞, 白色三角形指示 F4/80 单阳性细胞(标尺 = 50 μm) iNOS: 诱导型一氧化氮合酶 B: 光凝后不同时间点 M1 型 (F4/80+iNOS+ 细胞) 和 M2 型 (F4/80+Arg1+ 细胞) 巨噬细胞数量的比较 与各自的 M1 型细胞数比较, <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; 与光凝后 3 d M2 型细胞数比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 5$ ) CNV: 脉络膜新生血管

眼杯组织 qRT-PCR 检测显示, 光凝后第 3 天 Arg1 mRNA 及 MR mRNA 在 CNV 损伤部位的相对表达量显著升高, 分别上调约 30 倍和 15 倍, 与正常对照组比较差异均有统计学意义 ( $t = 4.079, P < 0.05; t = 7.128, P < 0.001$ ); 光凝后第 7 天, CNV 损伤部位 Arg1 mRNA 及 MR mRNA 的相对表达量显著下降, 明显低于光凝

后第 3 天, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.218, P < 0.05; t = 6.273, P < 0.01$ ) (图 3A, B)。与正常对照组相比, 光凝后第 3 天及第 7 天时 CNV 损伤部位 iNOS mRNA 的相对表达量均无明显改变(图 3C)。IL-6 的相对表达量在光凝后第 3 天显著高于正常对照组, 至第 7 天表达量下降, 但仍高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.326, P < 0.05; t = 5.041, P < 0.05$ ) (图 3D)。

### 2.3 光凝后早期巨噬细胞分泌 VEGF、TNF-α 的情况

在脉络膜铺片中, 光凝后第 3 天即可观察到 VEGF 的表达, 第 7 天时 VEGF 信号明显增强, 差异有统计学意义 ( $t = 5.776, P < 0.01$ ) (图 4A, B, 表 2); VEGF mRNA 在眼杯组织中的表达水平随时间的延长而逐渐升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 7.804, P < 0.05; t = 5.516, P < 0.05$ ) (表 2); 进一步免疫荧光双标 F4/80 及 VEGF 提示, 表达 VEGF 信号的巨噬细胞在光凝后第 7 天较光凝后第 3 天明显减少, 差异有统计学意义 ( $t = 5.143, P < 0.001$ ) (图 4C, D, 表 2)。

激光光凝后第 3 天, 在脉络膜铺片中呈红色荧光的 TNF-α 的 MFI 值明显高于光凝后第 7 天, 差异有统计学意义 ( $t = 4.519, P < 0.01$ ) (图 5A, B, 表 3); 眼杯组织 qRT-PCR 结果同样显示, 与正常对照组相比, 光凝后第 3 天时 TNF-α mRNA 显著升高, 至第 7 天时明显下降, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.889, P < 0.05; t = 3.889, P < 0.05$ ) (表 3); 进一步免疫荧光双标 F4/80 及 TNF-α 显示, 光凝后第 7 天表达 TNF-α 信号的巨噬细胞数较第 3 天明显减少, 差异有统计学意义 ( $t = 7.333, P = 0.000$ ) (图 5C, D, 表 3)。

表 2 光凝后不同时间点 VEGF 表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	VEGF MFI	VEGF mRNA	分泌 VEGF 的巨噬细胞数(个)
光凝后 3 d 组	6	96.17 ± 10.75	38.83 ± 21.41	6.40 ± 0.678
光凝后 7 d 组	6	176.20 ± 8.74	63.63 ± 49.64	1.80 ± 0.583
$t$		5.776	19.550	5.143
$P$		0.005	0.002	0.001

注: VEGF: 血管内皮生长因子; MFI: 平均荧光强度(独立样本  $t$  检验)

表 3 光凝后不同时间点 TNF-α 表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	TNF-α MFI	TNF-α mRNA	分泌 TNF-α 的巨噬细胞数(个)
光凝后 3 d 组	6	116.30 ± 15.99	3.25 ± 2.55	5.40 ± 0.51
光凝后 7 d 组	6	42.38 ± 3.39	0.45 ± 0.11	1.00 ± 0.32
$t$		4.519	13.160	7.333
$P$		0.004	0.002	0.000

注: TNF-α: 肿瘤坏死因子 α; MFI: 平均荧光强度(独立样本  $t$  检验)

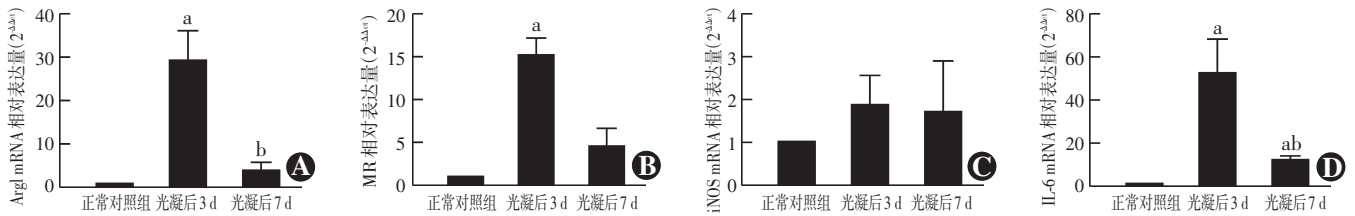


图3 光凝后不同时间点 CNV 中巨噬细胞相关因子 mRNA 相对表达量的比较 A: 光凝后不同时间点 Arg1 mRNA 的相对表达量  $F=14.120, P=0.002$ . 与正常对照组比较,  $^aP<0.05$ ; 与光凝后 3 d 值比较,  $^bP<0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=6$ ) B: 光凝后不同时间点 MR mRNA 的相对表达量  $F=18.41, P=0.001$ . 与正常对照组比较,  $^aP<0.001$ ; 与光凝后 3 d 值比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=6$ ) MR: 甘露糖受体 C: 光凝后不同时间点 iNOS mRNA 的相对表达量  $F=0.327, P=0.729$  (单因素方差分析,  $n=6$ ) iNOS: 诱导型一氧化氮合酶 D: 光凝后不同时间点 IL-6 mRNA 的相对表达量  $F=9.040, P=0.007$ . 与正常对照组比较,  $^aP<0.001$ ; 与光凝后 3 d 值比较,  $^bP<0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=6$ ) IL: 白细胞介素

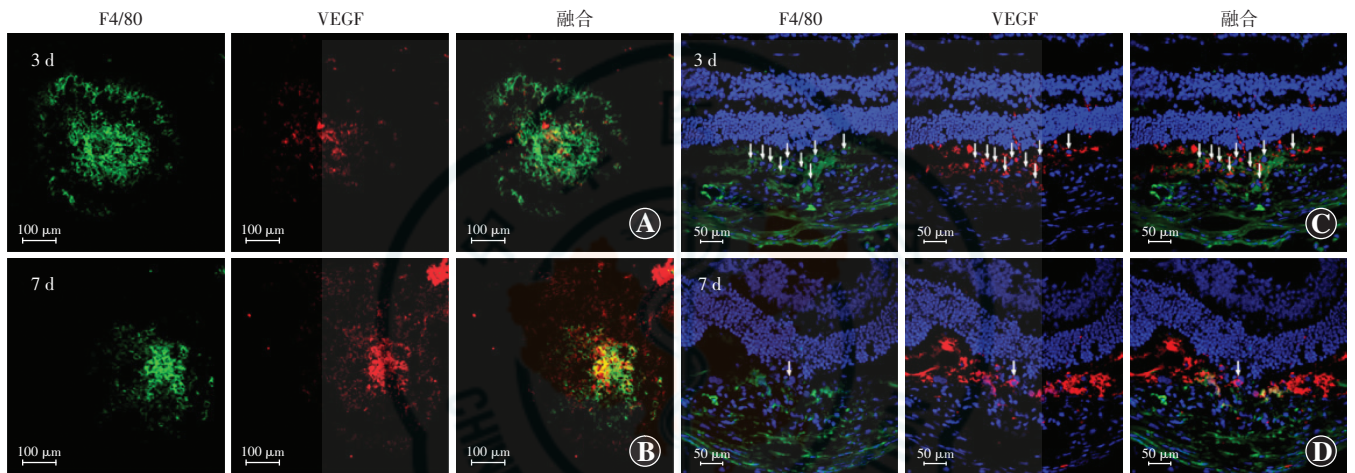


图4 脉络膜铺片及冰冻切片中巨噬细胞分泌 VEGF 的免疫荧光染色 巨噬细胞呈绿色荧光 (F4/80), VEGF 表达呈红色荧光 A、B: 激光光凝后脉络膜铺片免疫荧光染色结果 光凝后 3 d 巨噬细胞的绿色荧光较强, 可见少量 VEGF 表达的红色荧光; 光凝后 7 d VEGF 的红色荧光表达增强 (标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) C、D: 激光光凝后冰冻切片免疫荧光染色结果 光凝后 3 d 可见大量表达 VEGF 的 F4/80<sup>+</sup> 细胞, 光凝后 7 d 表达 VEGF 的 F4/80<sup>+</sup> 细胞减少 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) VEGF: 血管内皮生长因子

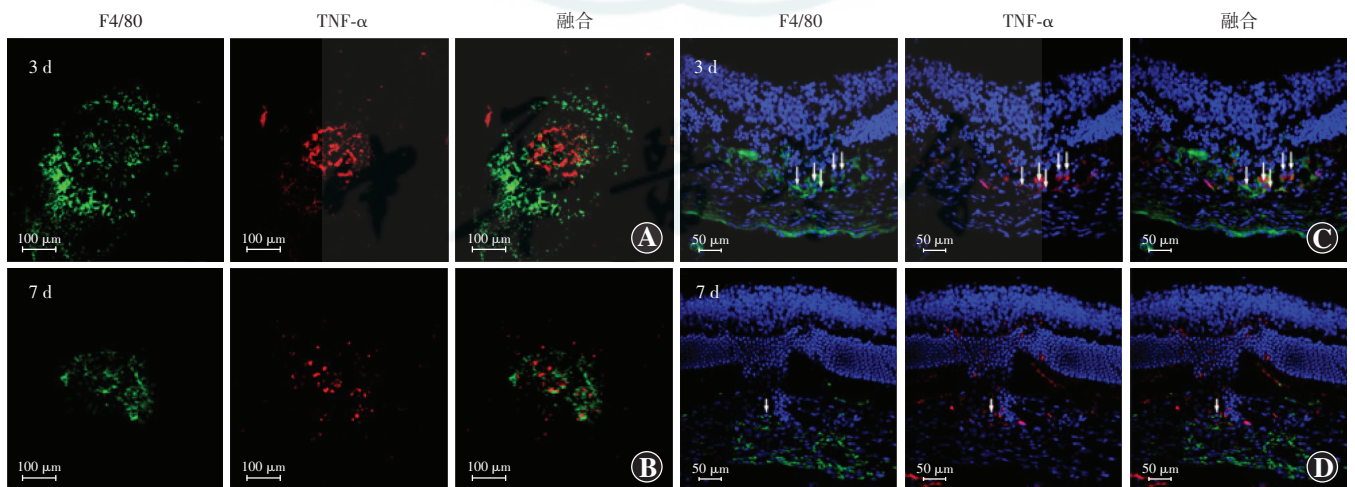


图5 脉络膜铺片中巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  的免疫荧光染色 巨噬细胞呈绿色荧光 (F4/80), TNF- $\alpha$  表达呈红色荧光 A、B: 光凝后 3 d 巨噬细胞的绿色荧光较强, 可见大量 TNF- $\alpha$  表达的红色荧光; 光凝后 7 d TNF- $\alpha$  的红色荧光减弱, 面积减小 (标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) C、D: 激光光凝后冰冻切片免疫荧光染色结果 光凝后 3 d 可见大量表达 TNF- $\alpha$  的 F4/80<sup>+</sup> 细胞, 光凝后 7 d 表达 TNF- $\alpha$  的 F4/80<sup>+</sup> 细胞减少 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子  $\alpha$

## 2.4 光凝后不同时间点巨噬细胞中 NICD 及下游分子标志物的表达

F4/80 及 Notch 胞内段 (Notch intracellular domain, NICD) 免疫荧光双标染色结果提示, 光凝后 3 d 未见

NICD 的阳性表达, 即 Notch 信号处于抑制状态; 光凝后 7 d 时 NICD 表达明显上调, 表达 NICD 的细胞既有 F4/80<sup>+</sup> 细胞, 也有 F4/80<sup>-</sup> 细胞, NICD 与 F4/80 共标的细胞数较光凝后 3 d 组明显增多, 差异有统计学意义

( $t = 7.333, P = 0.000$ ) (图 6A, B, 表 4)。眼杯组织 qRT-PCR 结果表明, Notch 信号下游分子 Hes1 mRNA、Hey1 mRNA 在光凝后 3 d 表达量下降, 与正常对照组比较差异均有统计学意义 ( $t = 8.660、6.047$ , 均  $P < 0.05$ ), 光凝后 7 d 表达上调, 与正常对照组比较差异均有统计学意义 ( $t = 6.614、4.520$ , 均  $P < 0.05$ ) (表 4), 即巨噬细胞中的 Notch 信号在第 7 天时被激活。

表 4 光凝后不同时间点 NICD 及其下游信号的相对表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	双阳性细胞数(个) <sup>a</sup> (n=5)	Hes-1 mRNA <sup>b</sup> (n=6)	Hey-1 mRNA <sup>b</sup> (n=6)
正常对照组	-	1	1
光凝后 3 d 组	0.400±0.245	0.250±0.124	0.533±0.380
光凝后 7 d 组	5.600±0.510	2.333±1.581	1.233±1.174
t/F	9.912	51.320	29.960
P	0.000	0.000	0.000

注: -, 未测; a: 独立样本 t 检验; b: 单因素方差分析 NICD: Notch 胞内段

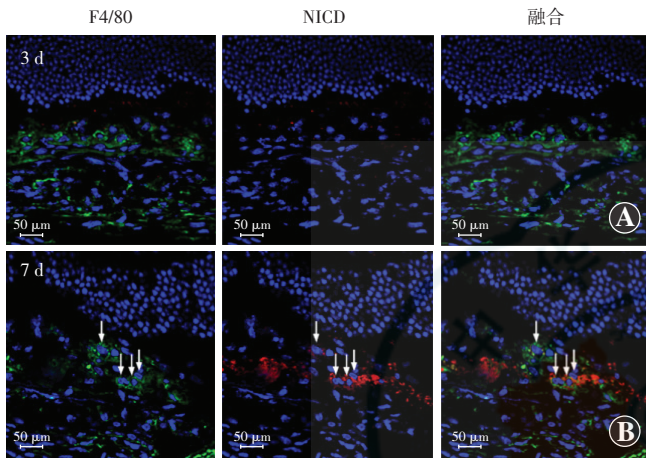


图 6 眼杯组织冰冻切片免疫荧光染色检测巨噬细胞中 Notch 信号的活化状态 巨噬细胞呈绿色荧光 (F4/80), NICD 呈红色荧光, 白色箭头指示的是表达 NICD 的 F4/80<sup>+</sup> 细胞 (标尺=50 μm) A: 光凝后 3 d 可见 CNV 损伤处有较多的巨噬细胞, 但几乎没有 NICD 表达 B: 光凝后 7 d 可见 CNV 损伤处有较多表达 NICD 的 F4/80<sup>+</sup> 细胞 NICD: Notch 胞内段

### 2.5 GSI 作用后巨噬细胞的极化改变

GSI 作用后巨噬细胞中 Notch 信号下游分子 Hes1、Hey1 表达量分别为  $0.472 \pm 0.184$  和  $0.503 \pm 0.128$ , 较对照组明显下降, 差异均有统计学意义 ( $t = 8.194、12.47$ , 均  $P < 0.01$ ) (图 7A)。GSI 作用组巨噬细胞 M1 型标志物 iNOS mRNA、TNF- $\alpha$  mRNA 表达较对照组明显下降, 差异均有统计学意义 ( $t = 4.549、4.773$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 GSI 作用组 M2 型标志物 Arg1 mRNA、MR mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量较对照组升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 35.97, P < 0.001; t = 7.903, P < 0.05; t = 5.124, P < 0.05$ ) (图 7B)。ELISA 检测巨噬细胞的培养上清也发现, GSI 作用后 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 蛋白的水平较对照组均明显下降, 差异均有统计学意义 ( $t = 8.013、10.06、5.565$ , 均  $P < 0.01$ ), 而 IL-10 蛋白的表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $t = 8.618, P < 0.001$ ) (图 7C)。

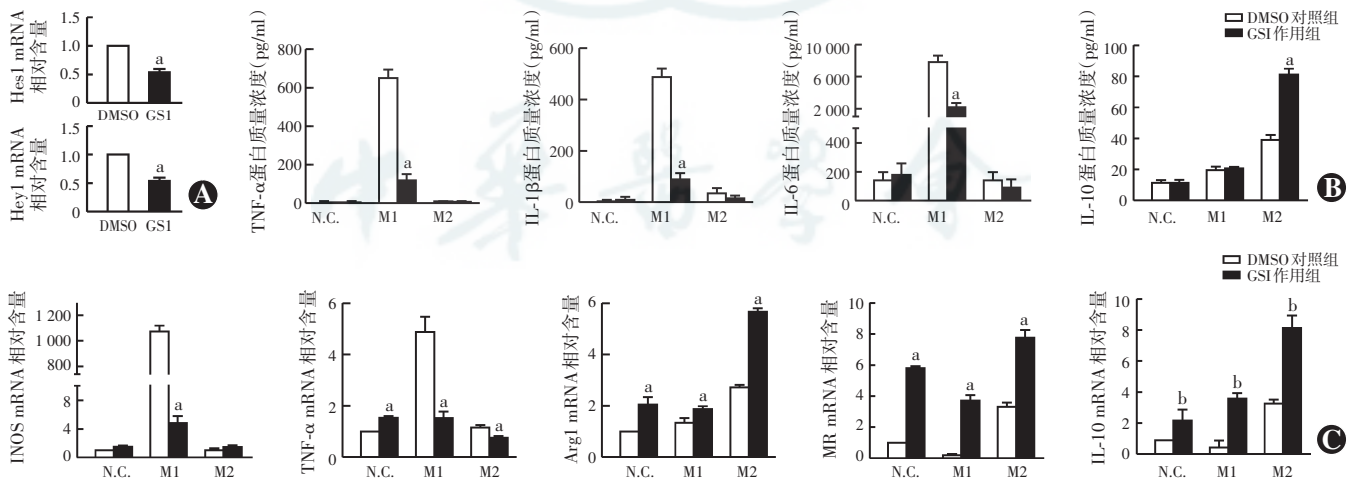


图 7 体外阻断 Notch 信号后巨噬细胞的极化改变 A: 各组 Notch 信号下游分子 Hes mRNA 和 Hey1 mRNA 相对表达量 B、C: 加极化因子 LPS (100 ng/ml) 和 IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) 诱导 M1 型极化, IL-4 (20 ng/ml) 诱导 M2 型极化, 同时加入 GSI (DMSO 为其对照) 阻断 Notch 信号通路后, ELISA 检测相关因子蛋白质量浓度 (B), qRT-PCR 检测相关因子 mRNA 相对表达量 (C) 与 DMSO 作用组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  (独立样本 t 检验,  $n = 6$ ) DMSO: 二甲亚砜; GSI:  $\gamma$ -分泌酶抑制剂; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; Arg1: 精氨酸合酶-1; MR: 甘露糖受体; IL: 白细胞介素; N. C.: 未加极化刺激因子

### 3 讨论

巨噬细胞作为 CNV 微环境中重要的炎性细胞, 对

CNV 的发生和发展有重要的调控作用。巨噬细胞具有可塑性和多能性, 在体内外不同微环境诱导下可极化为功能截然不同的细胞亚型, 根据活化状态和功能

的不同,分为经典激活型(M1型极化)和替代激活型(M2型极化)巨噬细胞<sup>[9]</sup>。其中,M1型巨噬细胞具有促炎症反应特性,能大量诱导 iNOS 表达,增加 NO 释放,并可分泌 IL-12、IL-23、IL-15 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子,诱导 Th-1 型反应,又称 iNOS<sup>+</sup>巨噬细胞<sup>[10]</sup>。M2 型巨噬细胞介导抗炎反应,细胞内表达 Arg1,并分泌 IL-10、TGF- $\beta$  等炎症拮抗因子,还可产生 VEGF 等促进伤口愈合,又称 Arg1<sup>+</sup>巨噬细胞<sup>[11-13]</sup>。Cao 等<sup>[14]</sup>研究发现,正常老龄眼中 M2 型巨噬细胞占主要比例,但在 AMD 患者脉络膜中巨噬细胞的 M1/M2 比值升高,提示在 AMD 病变过程中巨噬细胞表型发生改变。研究发现,老龄小鼠巨噬细胞可高表达 miR-33,后者抑制 ABCA1 转录,调控巨噬细胞中胆固醇转运,促进巨噬细胞向 M2 型极化,促进血管新生,加重 AMD<sup>[15-16]</sup>。由此推测,大量募集浸润的巨噬细胞群体可能因其所处状态的不同而发生极化表型的改变,进而在 CNV 的发生和发展中发挥促炎性或促新生血管生成的作用。对激光诱导的 CNV 模型研究发现,募集至 CNV 的巨噬细胞主要为 Arg1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>的 M2 型样巨噬细胞,可诱发 RPE 细胞及成纤维细胞活化,促进新生血管纤维膜的生长<sup>[17]</sup>。然而,在 CNV 生成的不同阶段,这个巨噬细胞群体是否保持均质性及功能呢?本研究中激光诱导的小鼠 CNV 进行研究发现,CNV 建模 3 d 时巨噬细胞浸润数量达峰,且在 CNV 中央和周边均有分布,7 d 时巨噬细胞多局限于 CNV 中央;CNV 建模 3 d 时,Arg1<sup>+</sup>巨噬细胞占主导地位,而在第 7 天,Arg1<sup>+</sup>巨噬细胞减少。提示巨噬细胞在 CNV 不同阶段产生不同影响。

CNV 生成过程中,是什么促使巨噬细胞发生这些变化呢?既往研究发现,老龄小鼠激光诱导的 CNV 较年轻小鼠重,且浸润的巨噬细胞高表达 IL-10<sup>[18]</sup>。研究发现,老龄小鼠巨噬细胞的这种极化改变是由 miR-33 高表达引起的<sup>[15-16]</sup>。除 miR-33 外,Notch 信号通路也参与对巨噬细胞极化功能的调控。Wang 等<sup>[19]</sup>研究表明,Notch 信号的活化对于巨噬细胞的 M1 型极化是必须的,阻断 Notch 信号后巨噬细胞呈现 M2 型应答。近年来,Notch 信号通路对巨噬细胞调控眼内新生血管的作用已得到证实<sup>[20]</sup>。为证实 Notch 信号的变化是否为造成 CNV 生成中巨噬细胞异质性的诱因,我们在 CNV 建模后 3 d 和 7 d 检测了巨噬细胞中 Notch 信号的激活情况,发现在 3 d 时活化的 NICD 低表达,而在 7 d 时表达增加,表明巨噬细胞中 Notch 信号的活化状态在 CNV 的不同阶段发生变化。Ahmad 等<sup>[21]</sup>在激光诱导的大鼠 CNV 中发现 Notch 信号的下游分子表达下调,从而诱导新生血管的萌芽,而本实验中同样发现

CNV 早期 Notch 信号的低活化状态,且这种低活化状态不仅存在于内皮细胞中,在巨噬细胞中同样存在。有研究认为,巨噬细胞中 Notch 信号的低表达可抑制巨噬细胞在正常血管网构建中的募集和定位,并影响正常血管网的构建<sup>[22]</sup>,故推测 CNV 早期巨噬细胞中 Notch 信号的低活化为病理性新生血管的发生提供了可能性。Notch1 在巨噬细胞上表达并参与调控巨噬细胞的极化反应,其表达的下调导致巨噬细胞向 M2 型极化<sup>[23]</sup>。因而,本研究体内研究发现的 CNV 早期大量 M2 型巨噬细胞的浸润可能正是由于 Notch 信号的低活化所致,大量 M2 型巨噬细胞在 CNV 局部浸润发挥促血管生成作用,而在 CNV 进入中晚期时,随着 Notch 信号活性的增强,M2 型巨噬细胞逐渐失去主导作用。为了进一步验证这种不同激活状态的 Notch 信号是调控 CNV 局部巨噬细胞发生极化改变的原因,本研究在体外实验中分离并培养 C57BL 小鼠的骨髓单核前体细胞,用 Notch 信号通路的阻断剂和极化诱导因子观察巨噬细胞极化表型的改变,发现阻断 Notch 信号后 M1 型巨噬细胞的促炎性特征明显降低,而 M2 型巨噬细胞的抗炎性特征明显增强。

那么,Notch 信号调控巨噬细胞在 CNV 中如何发挥作用?既往在对伤口愈合的研究中发现,Notch 信号的缺失导致巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 等炎症因子的量降低及伤口愈合的延迟,提示 Notch 信号在伤口愈合的炎性应答中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。我们的体外研究也证实了这一结果。然而,任何创伤修复过程中炎症反应和抗炎反应必然是同时存在而相互抗衡的。虽然我们发现 M2 型巨噬细胞在 CNV 早期的浸润居多,但也发现 CNV 局部 TNF- $\alpha$  的表达在第 3 天显著升高后逐渐下降,提示在激光诱导的 CNV 早期,巨噬细胞的促炎性作用同样不容忽视,但在 CNV 的进展期,巨噬细胞的炎性作用可能已不占主导地位。我们的体外实验也发现,经典的抗炎性因子 IL-10 的表达在阻断 Notch 信号后上调。有研究发现 IL-10 眼内注射可加剧新生血管的生成<sup>[25]</sup>,提示 Notch 信号可通过调控巨噬细胞中的 IL-10 参与 CNV 的生成。然而,在 CNV 早期,M2 型巨噬细胞是否通过分泌 IL-10 与 TNF- $\alpha$  拮抗,还需要更深入的研究加以验证。近期的研究报道 Notch 在 CNV 中对 EC 和巨噬细胞发挥着截然相反的作用<sup>[26]</sup>。本研究发现,激活 Notch 信号可增加巨噬细胞中 VEGF 的表达,而阻断 Notch 信号则减少巨噬细胞中 VEGF 的表达。然而,表达 VEGF 的巨噬细胞并不是 CNV 局部 VEGF 的主要来源,研究提示 VEGF<sup>+</sup>巨噬细胞的主要作用是在 CNV 早期激活 RPE、



成纤维细胞等,使 PRE 细胞分泌 VEGF<sup>[5,17]</sup>,这也许是 CNV 7 d 时 VEGF 总体表达升高的原因,但是 VEGF<sup>+</sup>巨噬细胞的数量并未呈现相同的上升趋势,特异性清除 RPE 或巨噬细胞中表达的 VEGF 均不能抑制 CNV 的生长,提示 VEGF 并不是促进 CNV 生成的唯一因子<sup>[17]</sup>。由此推测,CNV 早期 Arg1<sup>+</sup>巨噬细胞为 CNV 浸润的主要炎性细胞,可通过分泌 VEGF、IL-10 等促进 CNV 的进展,而随着 CNV 的进展,Arg1<sup>+</sup>巨噬细胞细胞不再作为主要细胞,促新生血管能力逐渐减弱,CNV 趋向稳定并逐渐瘢痕化。

本研究结果表明,在 CNV 的不同阶段,巨噬细胞的浸润、极化表型以及分泌的细胞因子均发生变化,且 Notch 信号通路参与这一过程的调控。这一发现提示我们,今后有望通过调控 Notch 信号水平影响巨噬细胞极化方向及功能来干预 CNV 的生成。

## 参考文献

- [1] Espinosa-Heidmann DG, Reinoso MA, Pina Y, et al. Quantitative enumeration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells derived from bone marrow precursors in experimental choroidal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(3): 369–378. doi: 10.1016/j.exer.2004.10.005.
- [2] Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2004, 242(1): 91–101. doi: 10.1007/s00417-003-0828-0.
- [3] Witmera AN, Vrensen GF, Noordens CJ, et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22(1): 1–29. doi: 10.1016/S1350-9462(02)00043-5.
- [4] Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, et al. The critical role of ocular-infiltrating macrophage in the development of choroidal neovascularization[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 74(1): 25–32. doi: 10.1189/jlb.0902436.
- [5] Liu J, Copland DA, Horie S, et al. Myeloid cells expressing VEGF and arginase-1 following uptake of damaged retinal pigment epithelium suggests potential mechanism that drives the onset of choroidal angiogenesis in mice[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72935 [2014–06–07]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072935>. doi: 10.1371/journal.pone.0072935.
- [6] Shi YY, Wang YS, Zhang ZX, et al. Monocyte/macrophage promote vasculofenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(11): 1667–1679. doi: 10.1007/s00417-011-1699-4.
- [7] Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, et al. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(8): 3586–3592. doi: 10.1167/iovs.03-0038.
- [8] Apte RS, Richter J, Herndon J, et al. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration[J/OL]. *PLoS Med*, 2006, 3(8): e310 [2014–05–06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539093/>. doi: 10.1371/journal.pmed.0030310.
- [9] Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011, 51: 267–288. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812.
- [10] Labonte AC, Tosello-Trampont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(4): 275–285. doi: 10.14348/molcells.2014.2374.
- [11] O'Carroll C, Fagan A, Shanahan F, et al. Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 427–436. doi: 10.4049/jimmunol.1301722.
- [12] Wang Y, Fu Y, Xue S, et al. The M2 polarization of macrophage induced by fractalkine in the endometriotic milieu enhances invasiveness of endometrial stromal cells[J]. *Int Clin Exp Pathol*, 2013, 7(1): 194–203.
- [13] Hu S, Fu X, Fu A, et al. The regulatory peptide pidotimod facilitates M2 macrophage polarization and its function[J]. *Amino acids*, 2014, 46(5): 1177–1185. doi: 10.1007/s00726-014-1676-4.
- [14] Cao X, Shen D, Patel MM, et al. Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: a pilot study[J]. *Pathol Int*, 2011, 61(9): 528–535. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02695.
- [15] Sene A, Khan AA, Cox D, et al. Impaired cholesterol efflux in senescent macrophages promotes age-related macular degeneration[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(4): 549–561. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.009.
- [16] Chen J, Smith LE. Altered cholesterol homeostasis in aged macrophages linked to neovascular macular degeneration[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(4): 471–472. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.010.
- [17] He L, Marneros AG. Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(6): 2407–2417. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.032.
- [18] Kelly J, Ali Khan A, Yin J, et al. Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3421–3426. doi: 10.1172/JCI32430.
- [19] Wang YC, He F, Feng F, et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(12): 4840–4849. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0269.
- [20] Dou GR, Wang L, Wang YS, et al. Notch signaling in ocular vasculature development and diseases[J]. *Mol Med*, 2012, 18(1): 47–55. doi: 10.2119/molmed.2011.00256.
- [21] Ahmad I, Balasubramanian S, Debbio CB, et al. Regulation of ocular angiogenesis by Notch signaling: implications in neovascular age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 2868–2878. doi: 10.1167/iovs.10-6608.
- [22] Outtz HH, Tattersall IW, Kofler NM, et al. Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice[J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3436–3439. doi: 10.1182/blood-2010-12-327015.
- [23] Singla RD, Wang J, Singla DK. Regulation of Notch1 signaling in THP-1 cells enhances M2 macrophage differentiation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(11): H1634–1642. doi: 10.1152/ajpheart.00896.2013.
- [24] Outtz HH, Wu JK, Wang X, et al. Notch1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages[J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 4363–4373. doi: 10.4049/jimmunol.1000720.
- [25] Apte RS, Richter J, Herndon J, et al. Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration[J/OL]. *PLoS Med*, 2006, 3(8): e310 [2014–04–28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539093/>. doi: 10.1371/journal.pmed.0030310.
- [26] Camelo S, Raoul W, Lavalette S, et al. Delta-like 4 inhibits choroidal neovascularization despite opposing effects on vascular endothelium and macrophages[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(4): 609–622. doi: 10.1007/s10456-012-9290-0.

(收稿日期:2014-12-17)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)