

【实验研究】

1.1.3 实验分组 共进行两组动物实验,分别为:
(1)为了研究 Netrin-1 基因沉默对糖尿病视网膜损

伤的影响,使用 si-NC 和 si-Netrin-1 大鼠进行实验,将大鼠分为 4 组:A 组(si-NC 大鼠)、B 组(si-Netrin-1 大鼠)、C 组(si-NC 大鼠 + DR 造模)、D 组(si-Netrin-1 大鼠 + DR 造模)。(2)为了研究外源性 Netrin-1 对糖尿病视网膜损伤的影响,使用 WT 大鼠进行实验,分为 3 组:对照组、DR 组、Netrin-1 组,Netrin-1 组在 DR 造模成功后 1 个月时玻璃体内注射 Netrin-1 溶液($500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $5\text{ }\mu\text{L}$)^[9]。上述实验动物每组均 6 只,并且均在造模成功后 3 个月时取视网膜组织进行检测。本研究遵循《实验动物管理条例》(2017 修订版)的规定。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色检测视网膜组织各层的厚度 常规制作视网膜组织冰冻切片,PBS 洗涤后使用苏木精染色,盐酸酒精分化,再使用酚红染色和二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察和拍照,使用 Image J 软件测量视网膜组织各层厚度,包括内丛状层(inner plexiform layer, IPL)、内核层(inner nuclear layer, INL)、外丛状层(outer plexiform layer, OPL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)。

1.2.2 免疫荧光染色检测视网膜组织中 Iba1 表达情况 常规制作视网膜组织冰冻切片,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,用固定液固定 10 min,然后使用体积分数 0.1% 的 Triton X-100 浸泡 20 min,滴加山羊血清封闭液封闭 30 min,滴加抗 Iba1 抗体(1:100),于 4℃ 过夜孵育。PBS 漂洗 3 次,滴加 FITC 标记的山羊抗兔二抗室温孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次,滴加含 DAPI 的封片剂,封片后置于荧光显微镜下观察和拍照。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测炎症因子表达情况 采用 Trizol 法提取视网膜组织中的 mRNA,逆转录为 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达,以 GAPDH 为内参基因。引物序列合成于苏州金唯智生物科技有限公司,具体序列为:白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)上游引物:5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3',下游引物:5'-TGGAT-

GCTCTCATCAGGACAG-3';白细胞介素-6(IL-6)上游引物:5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3',下游引物:5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3';白细胞介素-12(IL-12)上游引物:5'-CAATCACGCTACCTCCTCTTTT-3',下游引物:5'-CAGCAGTGCAGGAATAATGTTTC-3';肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)上游引物:5'-CAGCGGTGCTATGTCTC-3',下游引物:5'-CGATCACCCCGAAGTTTCAGTAG-3'。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对结果进行分析,将对照组或 si-NC 组目的基因的相对表达量作为 1。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件进行统计处理,所有计量数据以均数 ± 标准差表示,计量数据两组间的比较使用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 *LSD-t* 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Netrin-1 基因沉默对视网膜组织中 IPL、INL、OPL、ONL 厚度的影响 HE 染色结果显示,C 组和 D 组视网膜组织中 IPL、INL、OPL、ONL 厚度均薄于 A 组和 B 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);而且,D 组 INL、ONL 厚度薄于 C 组,差异有统计学意义(均为 $P < 0.05$),见表 1 和图 1。

2.2 Netrin-1 基因沉默对视网膜组织中 Iba1 表达的影响 免疫荧光染色结果显示,C 组和 D 组视网

表 1 各组大鼠视网膜各层组织厚度的比较

组别	IPL 厚度/ μm	INL 厚度/ μm	OPL 厚度/ μm	ONL 厚度/ μm
A 组	32.38 ± 1.65	29.71 ± 1.15	9.77 ± 0.67	42.57 ± 1.35
B 组	32.14 ± 2.58	29.25 ± 1.66	9.25 ± 0.79	41.75 ± 2.03
C 组	24.73 ± 1.10 ^{ab}	22.57 ± 0.63 ^{ab}	6.36 ± 0.51 ^{ab}	39.38 ± 1.65 ^{ab}
D 组	23.85 ± 1.29 ^{ab}	21.14 ± 1.03 ^{abc}	6.03 ± 0.82 ^{ab}	36.62 ± 1.21 ^{abc}
<i>F</i> 值	41.740	85.650	44.590	16.940
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与 A 组相比,^a $P < 0.05$;与 B 组相比,^b $P < 0.05$;与 C 组相比,^c $P < 0.05$

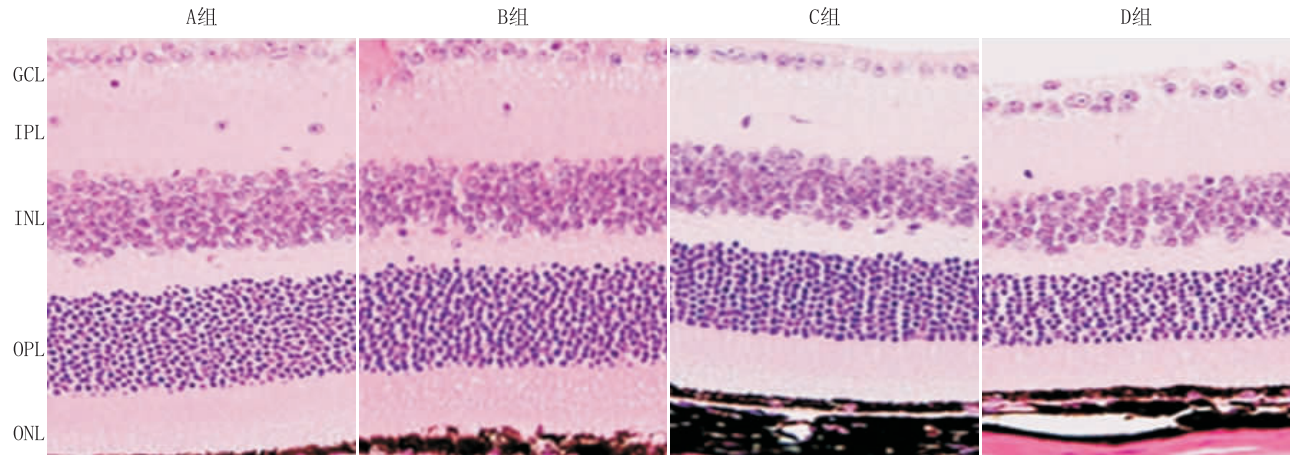


图 1 HE 染色检测视网膜组织的形态结构(×400)

膜组织中 Iba1 表达呈现的荧光强度明显高于 A 组和 B 组,而且 D 组高于 C 组。见图 2。

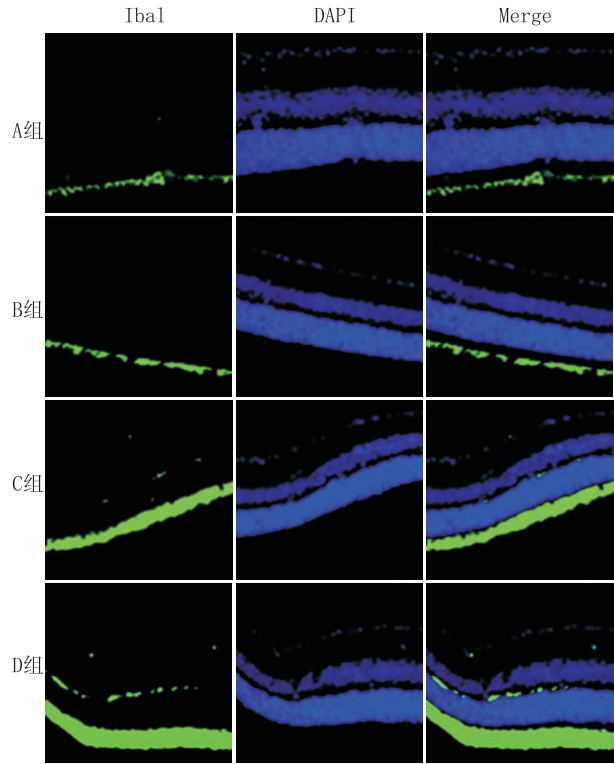


图2 免疫荧光染色检测视网膜组织中 Iba1 的表达

2.3 Netrin-1 基因沉默对视网膜组织中炎症因子表达的影响 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,C 组和 D 组视网膜组织中 IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA 表达水平均高于 A 组和 B 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);D 组各炎症因子表达均高于 C 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠视网膜组织中炎症因子的表达水平				
组别	IL-1β	IL-6	IL-12	TNF-α
A 组	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13
B 组	1.09 ± 0.23	1.04 ± 0.14	0.95 ± 0.11	1.06 ± 0.18
C 组	5.37 ± 0.52 ^{ab}	4.02 ± 0.59 ^{ab}	3.90 ± 0.36 ^{ab}	4.02 ± 0.50 ^{ab}
D 组	6.80 ± 0.61 ^{abc}	4.88 ± 0.55 ^{abc}	4.77 ± 0.48 ^{abc}	6.83 ± 0.59 ^{abc}
F 值	290.500	138.900	236.600	287.500
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组相比,^a $P < 0.05$;与 B 组相比,^b $P < 0.05$;与 C 组相比,^c $P < 0.05$

2.4 外源性 Netrin-1 对视网膜组织中 IPL、INL、OPL、ONL 厚度的影响 HE 染色结果显示,DR 组和 Netrin-1 组视网膜组织中 IPL、INL、OPL、ONL 厚度均低于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);而且,Netrin-1 组 INL、ONL 厚度高于 DR 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

2.5 外源性 Netrin-1 对视网膜组织中 Iba1 表达的影响 免疫荧光染色结果显示,Netrin-1 组视网膜组织中 Iba1 表达呈现的荧光强度明显低于 DR 组。见图 4。

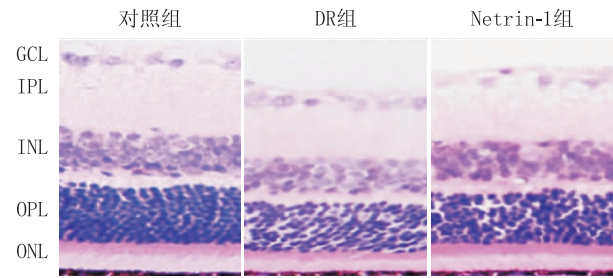


图3 HE 染色检测视网膜组织的形态结构(×400)

表 3 各组大鼠视网膜各层组织厚度的比较

组别	IPL 厚度/μm	INL 厚度/μm	OPL 厚度/μm	ONL 厚度/μm
对照组	32.51 ± 0.81	29.18 ± 0.67	9.85 ± 0.44	43.21 ± 1.07
DR 组	24.43 ± 1.16 ^a	23.63 ± 0.78 ^a	6.56 ± 0.86 ^a	38.50 ± 1.26 ^a
Netrin-1 组	25.19 ± 1.07 ^a	25.51 ± 1.04 ^{ab}	7.03 ± 0.92 ^a	40.28 ± 1.83 ^{ab}
F 值	113.900	67.050	32.030	16.740
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 DR 组相比,^b $P < 0.05$

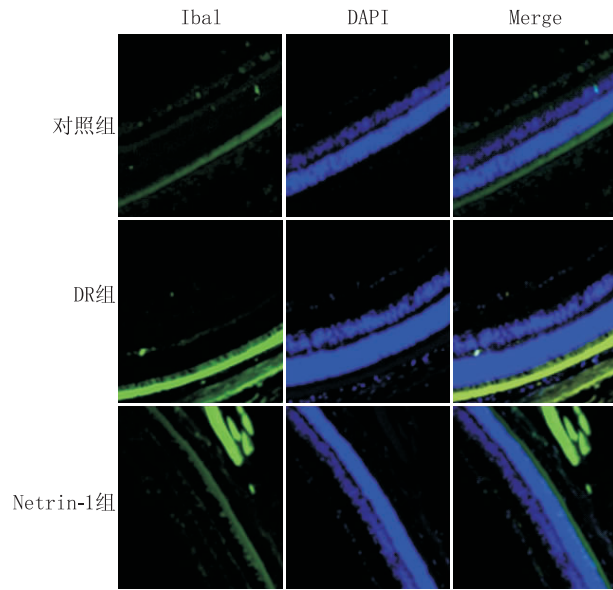


图4 免疫荧光染色检测视网膜组织中 Iba1 的表达

2.6 外源性 Netrin-1 对视网膜组织中炎症因子表达的影响 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,Netrin-1 组视网膜组织中 IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α mRNA 表达水平均低于 DR 组,高于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组视网膜组织中炎症因子的表达水平				
组别	IL-1β	IL-6	IL-12	TNF-α
对照组	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.19
DR 组	5.28 ± 0.53 ^a	3.88 ± 0.41 ^a	4.36 ± 0.35 ^a	6.24 ± 0.64 ^a
Netrin-1 组	2.66 ± 0.49 ^{ab}	2.71 ± 0.44 ^{ab}	2.80 ± 0.40 ^{ab}	4.35 ± 0.50 ^{ab}
F 值	153.300	99.740	165.200	182.200
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 DR 组相比,^b $P < 0.05$

3 讨论

近年来研究发现,炎症在DR的发生发展中发挥重要的作用,使用抗炎药物可阻止其发生发展;IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子在DR患者的外周血、玻璃体中的表达量明显升高^[15]。炎症可促进内皮细胞高表达细胞间黏附分子-1、P选择素等,诱导白细胞在血管内皮的黏附和迁移,大量释放各种炎症因子,破坏内皮细胞间的连接与屏障功能^[16]。Netrin-1是一种新型的抗炎因子,在各种疾病中发挥抗炎作用,如Mirakaj等^[17]发现急性肺损伤可导致肺组织Netrin-1表达显著降低,给予外源性Netrin-1可抑制中性粒细胞迁移和炎症因子释放。我们推测Netrin-1可能通过抗炎机制在糖尿病视网膜损伤中发挥保护作用。

为了检测内源性Netrin-1在DR进展中的作用,本研究使用RNA干扰技术沉默Netrin-1表达,造模3个月对视网膜组织进行HE染色,结果显示D组INL、ONL厚度薄于C组,表明Netrin-1基因沉默可进一步加重视网膜损伤。对视网膜组织中各炎症因子的表达量进行实时荧光定量PCR检测发现,Netrin-1基因沉默可导致炎症因子表达进一步升高。上述结果表明,内源性的Netrin-1表达在DR中发挥保护作用,但是RNA干扰技术仍然存在抑制效率不高等不足,未来仍需要使用Netrin-1基因敲除动物验证该结论。此外,在DR造模后1个月通过玻璃体内注射Netrin-1,结果显示外源性Netrin-1可以缓解DR导致的INL、ONL厚度降低,抑制各炎症因子表达,具有潜在的临床应用价值。

小胶质细胞是视网膜中的免疫细胞,在生理状态下一般处于静息状态,具有吞噬细胞碎片、抗原提呈、分泌神经营养因子、组织修复等功能,但是在高糖刺激下则会持续活化,分泌大量的炎症毒性因子,损伤神经及血管内皮细胞,破坏视网膜内皮屏障功能,加重病理损伤^[18]。Iba1是一种钙结合蛋白,特异性表达于小胶质细胞,而且在小胶质细胞活化时其表达量显著升高,因此检测Iba1表达水平可反映小胶质细胞的活化情况。本研究对Iba1进行免疫荧光染色,结果显示Netrin-1基因沉默可上调Iba1表达,而外源性给予Netrin-1蛋白则可降低其表达,表明Netrin-1可抑制DR导致的小胶质细胞活化。

研究发现,Netrin-1可通过A2BAR受体结合发挥抗炎作用,如Mirakaj等^[19]在急性腹膜炎小鼠模型中发现,外源性给予Netrin-1可以降低腹膜渗出液的炎症因子含量,抑制炎症细胞浸润,但是在A2BAR受体敲除小鼠中则无法发挥保护效应。此外,也有研究报道Netrin-1可通过其他类型受体发挥生物学作用,包括UNC5同源物、整合素 $\alpha 6\beta 4$ 和整合素 $\alpha 3\beta 1$ 等^[20]。然而,这些受体是否参与Netrin-1在DR中的保护作用尚不清楚,未来需要对此进行更为深入地探讨。

综上所述,Netrin-1基因沉默可加重糖尿病大鼠视网膜损伤和炎症,外源性Netrin-1则具有保护作用。

参考文献

- [1] AHSAN H. Diabetic retinopathy--biomolecules and multiple pathophysiology[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(1): 51-54.
- [2] SCANLON P H, ALDINGTON S J, STRATTON I M. Epidemiological issues in diabetic retinopathy[J]. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 2013, 20(4): 293-300.
- [3] ROY S, KERN T S, SONG B, STUEBE C. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: Implications for targeting diabetic retinopathy[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(1): 9-19.
- [4] CAPITAO M, SOARES R. Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(11): 2443-2453.
- [5] YU Y, CHEN H, SU S B. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 141.
- [6] DOMINICI C, MORENO-BRAVO J A, PUIGGROS S R, RAPPE-NEAU Q, RAMA N, VIEUGUE P, et al. Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance[J]. *Nature*, 2017, 545(7654): 350-354.
- [7] VARADARAJAN S G, KONG J H, PHAN K D, KAO T J, PAN-AITOF S C, CARDIN J, et al. Netrin1 produced by neural progenitors, not floor plate cells, is required for axon guidance in the spinal cord[J]. *Neuron*, 2017, 94(4): 790-799.
- [8] ZHANG X, LIU J, XIONG S, XIA X, XU H. Expression of Netrin-1 in diabetic rat retina[J]. *Eye Sci*, 2013, 28(3): 148-152.
- [9] 周贤慧, 孟旭霞, 付浴东, 刘鹏辉, 胡迭. 不同浓度外源性轴突导向因子-1对糖尿病大鼠视网膜血管通透性的影响[J]. *中华眼底病杂志*, 2017, 33(3): 286-289.
- [10] ZHOU X H, MENG X X, FU Y D, LIU P H, HU D. The effect of netrin-1 on the retinal vascular permeability in diabetes mellitus rats[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2017, 33(3): 286-289.
- [11] 周贤慧, 孟旭霞, 孙运波, 胡迭, 郭庆敏. 轴突导向因子 netrin-1对早期糖尿病大鼠血视网膜屏障的影响[J]. *中华眼底病杂志*, 2015, 31(5): 472-476.
- [12] ZHOU X H, MENG X X, SUN Y B, HU D, GUO Q M. The effect of netrin-1 on the retinal vascular permeability in early diabetic retinopathy rats[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2015, 31(5): 472-476.
- [13] MILOUDI K, BINET F, WILSON A, CERANI A, OUBAHA M, MENARD C, et al. Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3006-3022.
- [14] ZHANG T, MEI X, OUYANG H, LU B, YU Z, WANG Z, et al. Natural flavonoid galangin alleviates microglia-triggered blood-retinal barrier dysfunction during the development of diabetic retinopathy[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 65: 1-14.
- [15] 廖洪霞, 魏艳丽, 朱晓燕, 叶剑, 周琦, 吕红彬. siRNA沉默FoxO1对STZ诱导的糖尿病大鼠视网膜IL-1 β 的影响及其作用机制[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2018, 37(2): 183-190.
- [16] LIAO H X, WEI Y L, ZHU X Y, YE J, ZHOU Q, LV H B. The effect of FoxO1 inhibited by siRNA on the expression of IL-1 β in diabetic rats retina induced by STZ and its mechanism[J]. *J Southeast Univ(Med Sci Ed)*, 2018, 37(2): 183-190.
- [17] 晏维, 付好, 廖家智, 田德安, 周珍珍, 王伟, 等. 缺氧环境中Netrin-1对肝癌细胞骨架重组的作用研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2010, 16(4): 300-304.
- [18] YAN W, FU Y, LIAO J Z, TIAN D A, ZHOU Z Z, WANG W, et al. Effect of Netrin-1 on cytoskeletal arrangement induced by hypoxia in HepG2 cells[J]. *Chin J Hepatob Surg*, 2010, 16(4): 300-304.
- [19] TAKEUCHI M, SATO T, SAKURAI Y, TAGUCHI M, HARIMOTO K, KARASAWA Y, et al. Association between aqueous humor and vitreous fluid levels of Th17 cell-related cytokines in patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178230.

- [16] LIN C M, TITCHENELL P M, KEIL J M, GARCIA-OCAÑA A, BOLINGER M T, ABCOUWER SF, *et al.* Inhibition of atypical protein kinase C reduces inflammation-induced retinal vascular permeability [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188 (10) : 2392-2405.
- [17] MIRAKAJ V, THIX C A, LAUCHER S, MIELKE C, MOROTE-GARCIA J C, SCHMIT M A, *et al.* Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181 (8) : 815-824.
- [18] ARROBA A I, VALVERDE A M. Modulation of microglia in the retina; new insights into diabetic retinopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54 (6) : 527-533.
- [19] MIRAKAJ V, GATIDOU D, POTZSCH C, KÖNIG K, ROSENBERGER P. Netrin-1 signaling dampens inflammatory peritonitis [J]. *J Immunol*, 2011, 186 (1) : 549-555.
- [20] STANCO A, SZEKERES C, PATEL N, RAO S, CAMPBELL K, KREIDBERG J A, *et al.* Netrin-1- α 3 β 1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (18) : 7595-7600.

Protective effect of Netrin-1 on rats with diabetic retinopathy

LIU Anqi, ZUO Zhongfu, WU Chuanling, LIU Xuezheng

Basic Medical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Corresponding author: LIU Xuezheng, E-mail: 878599033@qq.com

[Abstract] Objective To explore the protective effect of Netrin-1 on rats with diabetic retinopathy (DR). **Methods**

The DR rat models were constructed by intraperitoneal injection of streptozotocin, and normal saline was used as control. To study the effect of Netrin-1 gene silencing on DR, si-NC and si-Netrin-1 rats were constructed and randomly divided into 4 groups: Group A (si-NC rats), group B (si-Netrin-1 rats), group C (si-NC rats + DR modeling) and group D (si-Netrin-1 rats + DR modeling). To study the effect of exogenous Netrin-1 on DR, WT rats were randomly divided into 3 groups: Control group, DR group and Netrin-1 group. Three months after modeling, the thickness of retinal tissues at each layer were measured by HE staining, the expression of Iba1 was detected by immunofluorescence staining, and the levels of inflammatory factors were measured by real time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with group C, the thickness of inner nuclear layer and outer plexiform layer decreased, the expression of Iba1 and levels of IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α increased in group D, and statistical differences were observed (all $P < 0.05$). Compared with DR group, the thickness of inner nuclear layer and outer plexiform layer in Netrin-1 group increased, and the expression of Iba1 and levels of inflammatory factors decreased, and statistical differences were observed (all $P < 0.05$). **Conclusion** Netrin-1 gene silencing can aggravate retinal injury and inflammation in diabetic rats, while exogenous Netrin-1 has protective effect.

[Key words] diabetic retinopathy; Netrin-1; inflammation; microglia