

【实验研究】

高翔 王雨生

模型可较好地模拟视网膜新生血管的病理变化^[2]。有研究表明,巨噬细胞作为炎症反应中心环节,可能参与调控视网膜新生血管的形成^[3]。为了更好地研究巨噬细胞在视网膜新生血管形成中的作用,本研究通过建立小鼠 OIR 模型,采用全身清除巨噬细胞

的方法,结合视网膜铺片、染色及视网膜病理组织学技术,观察 OIR 的形态学变化,探讨巨噬细胞在视网膜新生血管发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 新生 C57BL/6J 小鼠 3 窝,每窝取 6 只,共 18 只 36 眼(随机取 2 窝为 OIR 组共 12 只,另 1 窝为常氧对照组共 6 只),每窝小鼠与母鼠同笼饲养。饲养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为 59%~61%,每天光照与黑暗时间各 12 h,由专人管理。动物饲养与使用均遵照视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范。OIR 组 2 窝 12 只新生小鼠再随机分为 OIR 模型组和清除巨噬细胞的 OIR 组,每组各 6 只。

1.2 小鼠 OIR 模型的建立 OIR 组 2 窝新生 C57BL/6J 小鼠于生后第 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,于 P12 返回正常空气中。常氧对照组小鼠则始终置于正常空气中饲养。

1.3 给药方式与剂量 清除巨噬细胞的 OIR 组:OIR 小鼠于 P9、P11、P13 和 P15 接受腹腔注射氯膦酸二钠脂质体(clodronate-liposomes)4 次,按 $10\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量注射,以清除小鼠全身单核-巨噬细胞;OIR 模型组:OIR 小鼠于上述 4 个时间点接受腹腔注射 PBS 脂质体(PBS-liposomes),按 $100\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量注射。

1.4 小鼠视网膜铺片 Lectin 染色及图像分析 OIR 组和常氧对照组小鼠均于 P17 腹腔注射过量麻醉药物处死,摘除右眼、标记方向。将眼球置于 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛中固定 2 h,去除角膜、晶状体和残留玻璃体;从角巩膜缘处将视网膜与外层巩膜、脉络膜分离并置于封闭液($50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA、 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100 溶于 PBS)中,室温 9~12 h。将视网膜置于 Lectin-1 (GSL-IB4 血管标记物;1:100 溶于 PBS;Vector,美国)中 12 h,4 $^\circ\text{C}$ 避光。PBS 洗 3 次后从 4 个方向径向剪开视网膜,内层向上行铺片,体积分数 50%甘油封片。荧光显微镜(BX51;Olympus;日本)下观察视网膜表层血管病理变化,重点观察后极部无血管区及视网膜中周部新生血管区情况。采用 Photoshop CS3 软件对所拍摄的视网膜局部荧光图像进行融合、重建,得到完整的视网膜铺片图。根据 Connor 等^[6]所发表的方案,统计每张完整视网膜铺片图的无血管区、新生血管区及整个视网膜像素值,计算百分比进行分析。光学显微镜下观察视网膜出血严重程度。将清除巨噬细胞的 OIR 组与常氧对照组、OIR 模型组铺片进行对比分析。

1.5 小鼠视网膜病理切片检查 按上述方法处死 P17 小鼠并摘除其左眼、标记方向。将眼球置于眼球固定液中固定 48~72 h,去除角膜和晶状体;依次梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋。修整蜡块,做眼球矢状轴向连续切片,厚 4~5 μm ,每隔 30 μm 选取 1 张

切片。每个标本选取 6 个切片(不包含视神经)行常规 HE 染色。脱蜡,苏木精、伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片^[4]。光学显微镜下观察视网膜组织病理学变化,重点分析突破内界膜新生血管内皮细胞数目情况。6 个切片内界膜前内皮细胞核数平均值代表每个标本中突破内界膜新生血管内皮细胞核数。将清除巨噬细胞的 OIR 组与常氧对照组、OIR 模型组结果进行对比,并结合上述铺片结果进行分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述计量资料。清除巨噬细胞的 OIR 组与 OIR 模型组比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞对 OIR 小鼠视网膜出血及血管形态的影响 P17 时,常氧对照组小鼠视网膜未见出血现象。OIR 模型组小鼠视网膜可见大片出血,在检测的 6 只眼球中,有 5 眼可观察到出血灶,多位于视网膜中周部。使用光学显微镜进行铺片时,还可观察到玻璃体内出血。清除巨噬细胞的 OIR 组小鼠可见散在的视网膜出血,未见玻璃体内出血(图 1)。

Figure 1 Representative images of retinal flatmounts in each group ($\times 40$). The retinal hemorrhage plaques were indicated by red arrowhead. A: Normoxic control group; B: OIR control group; C: OIR group with macrophages depleted 各组小鼠视网膜铺片图($\times 40$),红色箭头示出血斑点。A:常氧对照组;B:OIR 模型组;C:清除巨噬细胞的 OIR 组

视网膜铺片 Lectin 染色高倍镜下观察到,P17 时常氧对照组小鼠视网膜血管走行清晰、形态正常;OIR 模型组小鼠视网膜上出现大量迂曲、呈簇状分布的新生血管及大片无血管区;清除巨噬细胞的 OIR 组小鼠视网膜未见明显无血管区,但存在走行迂曲、呈团簇状分布的形态异常血管(图 2)。

2.2 巨噬细胞对 OIR 小鼠视网膜无血管区面积和新生血管数目的影响 P17 时视网膜铺片 Lectin 染色显示,常氧对照组小鼠视网膜血管走行正常,从后极部到周边部均有血流灌注;OIR 模型组小鼠后极部视网膜存在大片无血管区,在中周部观察到大量视网膜新生血管簇,呈强荧光;清除巨噬细胞的 OIR 组小鼠后极部视网膜也可观察到无血管区,在血管化-无血管化交界处可见少量呈强荧光的视网膜新生血管簇(图 3)。统计学分析显示,全身清除巨噬细胞后,P17 时 OIR 小鼠视网膜无血管区及新生血

管区面积均明显减少($t_a = 8.680, P < 0.01; t_n = 10.83, P < 0.01$;见表1)。

P17时视网膜切片HE染色结果显示,常氧对照组小鼠视网膜组织各层结构排列整齐,内界膜完整;OIR模型组小鼠视网膜上可观察到大量突破内界膜的新生血管内皮细胞,为(18.50 ± 0.85)个;在清除巨噬细胞的OIR组小鼠中,突破内界膜的新生血管内皮细胞核数明显减少,为(7.17 ± 0.48)个,差异有统计学意义($t = 11.66, P < 0.01$;见图4)。

Figure 2 Representative images of retinal flatmounts stained with Lectin in each group ($\times 200$). The retinal avascular area and abnormal neovascular tufts were indicated by white arrow and white arrowhead, respectively. A: Normoxic control group; B: OIR control group; C: OIR group with macrophages depleted 各组小鼠视网膜铺片Lectin染色图($\times 200$),白色箭头示无血管区,白色箭头异常新生血管簇。A:常氧对照组;B:OIR模型组;C:清除巨噬细胞的OIR组

Figure 3 Representative images of retinal flatmounts stained with Lectin in each group ($\times 40$). A: Normoxic control group; B: OIR control group; C: OIR group with macrophages depleted; D: The avascular retina and neovascular tufts in (B) were highlighted in white and green, respectively. E: The avascular retina and neovascular tufts in (C) were highlighted in white and green, respectively 各组小鼠视网膜铺片Lectin染色图($\times 40$)。A:常氧对照组;B:OIR模型组;C:清除巨噬细胞的OIR组;D:用白色和绿色分别显示图B中的无血管区和新生血管簇;E:用白色和绿色分别显示图C中的无血管区和新生血管簇

Figure 4 Representative images of retinal cross-sections stained with H&E in each group ($\times 400$). The neovascular cell nuclei anterior to the retinal internal limiting membrane were indicated by black arrowhead above. A: Normoxic control group; B: OIR control group; C: OIR group with macrophages depleted 各组小鼠视网膜切片HE染色图($\times 400$),黑色箭头示突破内界膜的新生血管。A:常氧对照组;B:OIR模型组;C:清除巨噬细胞的OIR组

3 讨论

一般认为,巨噬细胞是机体固有免疫和获得性

表1 OIR小鼠P17视网膜无血管区、新生血管区像素百分比

Table 1 Pixel value ratio of retinal avascular area and neovascular area at P17 in OIR mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Avascular area/%	Neovascular area/%
OIR17/PBS-lip	6	17.19 \pm 0.58	4.60 \pm 0.15
OIR17/clodronate-lip	6	10.38 \pm 0.53 *	2.51 \pm 0.13 *

Note: Compared with OIR control group, * $P < 0.01$

免疫反应的关键调节者,在炎症反应中发挥重要作用,是宿主防御的第一道防线。除了这些众所周知的功能外,巨噬细胞在维持机体内稳态方面也发挥

着重要作用,其可参与血管形成、组织创伤修复、组织重建和肿瘤形成等^[7]。既往研究表明,清除巨噬细胞可明显减少血管生成,相反,特异性趋化巨噬细胞则可促进组织血管生成^[8-9]。具体到视网膜新生血管形成方面,缺血缺氧一直是其形成的基本原因,然而近年来研究发现多种因素,如炎症、氧化应激、凋亡等均参与了其形成过程,且巨噬细胞在这些因素中扮演着多种角色^[3,10-11]。在视网膜应激状态下,血液、睫状体、玻璃体、脉络膜、视神经处的单核-巨噬细胞能很快移行到受损处视网膜,发挥其促进或抑制新生血管形成的功能^[12-14]。本研究旨在探究巨噬细胞在氧诱导视网膜新生血管形成中的作用。

Michael 等^[11]认为参与视网膜新生血管形成的巨噬细胞并非局部增殖,而是由血液来源的。因此本研究采用腹腔注射氯膦酸二钠脂质体的方法,以清除小鼠全身巨噬细胞。该药物可被巨噬细胞特异性摄取,通过吞噬作用介导其在巨噬细胞内的毒素释放,从而诱发巨噬细胞特异性凋亡,而不会对其他细胞如血管内皮细胞等造成毒副作用。该药物注射后,外周血和组织中的巨噬细胞数目会明显减少,并持续 24~48 h,是清除单核巨噬细胞安全有效的方法^[14-16]。本研究结果也显示,腹腔注射 4 次氯膦酸二钠脂质体后,小鼠全身(脾脏免疫荧光染色)及视网膜局部 F4/80 阳性巨噬细胞数目减少,视网膜 F4/80mRNA 表达下降,视网膜局部巨噬细胞清除率达 $(79.53 \pm 1.02)\%$ 。

本研究观察到,与常氧对照组和 OIR 模型组相比,清除巨噬细胞的 OIR 组小鼠视网膜无血管区和新生血管簇显著减少、异常血管形态减轻、视网膜出血不明显、未见玻璃体内出血等,表明清除全身巨噬细胞后小鼠 OIR 减轻,提示巨噬细胞在视网膜新生血管形成中具有促血管形成的作用。分析其机制为巨噬细胞可能通过多种途径促进视网膜新生血管形成,包括其释放促血管形成细胞因子影响血管生成^[13],通过与视网膜其他细胞相互作用促进血管生成祖细胞参与血管发生^[15,17],或其自身直接参与构成新生血管等^[18]。

本研究结果证实,巨噬细胞对氧诱导视网膜新生血管形成具有促进作用,这一结果有利于深入理解炎症在视网膜新生血管性疾病中的作用,对揭示视网膜新生血管性疾病的发病机理、发现干预新靶点具有重要的理论和现实意义。

参考文献

1 Yanai R, Thanos A, Connor KM. Complement involvement in

neovascular ocular diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946(2): 161-183.

2 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.

3 Shen J, Xie B, Dong A, Swaim M, Hackett SF, Campochiaro PA. *In vivo* immunostaining demonstrates macrophages associate with growing and regressing vessels[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(9): 4335-4341.

4 Chu ZJ, Dou GR, Wang YS, Qu XJ, Zhang Y. Preliminary study of retinal pathological features in preterm birth pups exposed to an animal model of oxygen-induced retinopathy in mice[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251(8): 1937-1943.

5 Li R, Yang X, Wang Y, Chu Z, Liu T, Zhu T, et al. Effects of pre-term birth on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the neonatal rat[J]. *Curr Eye Res*, 2013, 38(12): 1266-1273.

6 Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, 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.

7 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.

8 Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, et al. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(12): 2009-2018.

9 Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, et al. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(5): 1089-1102.

10 Liu H, Zhang W, Xu Z, Caldwell RW, Caldwell RB, Brooks SE. Hyperoxia causes regression of vitreous neovascularization by downregulating VEGF/VEGFR2 pathway[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(2): 918-931.

11 Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina[J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 467-477.

12 Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elner SG, Elner VM. Role of MCP-1 and MIP-1alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(1): 137-144.

13 Marchetti V, Yanes O, Aguilar E, Wang M, Friedlander D, Moreno S, et al. Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy[J]. *Sci Rep*, 2011, 1: 76.

14 Kataoka K, Nishiguchi KM, Kaneko H, van Rooijen N, Kachi S, Terasaki H. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3): 1431-1438.

15 Shi YY, Wang YS, Zhang ZX, Cai Y, Zhou J, Hou HY, et al. Monocyte/macrophages promote vasculogenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(11): 1667-1679.

16 Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications[J]. *J Immunol Methods*, 1994, 174(1-2): 83-93.

17 Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad[J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3): 207-216.

18 Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(8): 3595-3602.