

楚瑞雪,孙先桃,王惠. 基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 46-52.

Chu RX, Sun XT, Wang H. Effects of naringenin on microglial activation in oxygen-induced retinopathy based on the miR-223/NLRP3 axis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 46-52.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 007

基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响

楚瑞雪*, 孙先桃, 王 惠

(郑州大学附属儿童医院, 河南省儿童医院, 郑州儿童医院眼科, 郑州 450000)

【摘要】 目的 基于微小 RNA (miR)-223/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 轴探讨柚皮素 (NAR) 对氧诱导视网膜病变 (OIR) 中小胶质细胞活化的影响。**方法** 150 只 7 日龄 (P7) C57BL/6J 幼鼠分为常氧组、OIR 组、NAR 组、NAR+阴性对照组、NAR+miR-223 拮抗剂组, 每组 30 只。除常氧组外, 其余各组幼鼠及其母鼠在 P7~P12 移至氧气体积分数 (75±2)% 封闭氧箱中, 连续 5 d, P12 返回正常氧环境中; 常氧组在正常氧环境中常规饲养。NAR 组幼鼠腹腔注射 100 mg/(kg·d) NAR, NAR+阴性对照组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂阴性对照, NAR+miR-223 拮抗剂组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂, 常氧组、OIR 组每天腹腔注射等体积 CMC、P12 尾静脉注射等体积生理盐水。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测视网膜中 miR-223 水平; 幼鼠眼底行荧光素眼底血管造影 (FFA); 苏木精-伊红 (HE) 染色观察视网膜形态; 免疫荧光检测视网膜中小胶质细胞标志物钙离子结合蛋白-1 (Iba-1) 情况; Western blot 检测视网膜中 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、白细胞介素 (IL)-1 β 及 IL-18 蛋白表达情况。**结果** OIR 组出现血管破裂, 荧光漏在视网膜中, 视网膜泛白, 血管出现收缩, 视网膜厚度变厚、细胞排列松散, 部分出现细胞缺失现象、血管新生现象; NAR 组、NAR+阴性对照组血管破裂现象缓解, 视网膜泛白现象减轻, 但视网膜细胞仍松散; NAR+miR-223 拮抗剂组血管破裂, 荧光漏在视网膜中, 视网膜泛白明显, 视网膜细胞松散严重、细胞缺失明显。与常氧组相比, OIR 组视网膜中 miR-223 水平降低 ($P<0.05$), 视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平升高 ($P<0.05$); 与 OIR 组相比, NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 miR-223 水平升高 ($P<0.05$), 视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比, NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 miR-223 水平降低 ($P<0.05$), 视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。**结论** NAR 能够升高 miR-223 的表达进而抑制 NLRP3 炎症体的表达, 从而缓解小胶质细胞过度活化现象, 实现对 OIR 的缓解。

【关键词】 微小 RNA-223/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 轴; 柚皮素; 氧诱导视网膜病变; 小胶质细胞活化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0046-07

Effects of naringenin on microglial activation in oxygen-induced retinopathy based on the miR-223/NLRP3 axis

CHU Ruixue*, SUN Xiantao, WANG Hui

(Department of Ophthalmology, Children's Hospital Affiliated of Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of naringenin (NAR) on microglial activation in oxygen-induced retinopathy (OIR) based on the microRNA (miR)-223/nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (LHGJ20190953)。

[作者简介] 楚瑞雪 (1985—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 小儿眼科。E-mail: rxchu0371@163.com

(NLRP3) axis. **Methods** Seven-day-old (P7) C57BL/6J mice ($n = 150$) were divided into normoxia, OIR, NAR, NAR + negative RNA control and NAR + miR-223 antagomir groups with 30 mice per group. Except for mice in the normoxic group, the young mice and their mothers were moved to a closed oxygen box with an oxygen volume fraction of $(75 \pm 2)\%$ for 5 consecutive days from P7~P12 and subsequently returned to a normoxic environment; the normoxic group was raised in a normoxic environment. The 12-day-old mice in the NAR groups were injected intraperitoneally with 100 mg/(kg · d) NAR. The mice in the NAR + negative RNA control group were also injected with 2.5 mg/kg miR-223 negative control RNA via the tail vein, and mice in the NAR + miR-223 antagomir group were injected with 2.5 mg/kg miR-223 antagomir via the tail vein. Mice in the normoxic and OIR groups were intraperitoneally injected with an equal volume of carboxymethyl cellulose and tail vein-injected with an equal volume of normal saline each day. For evaluation of retinas in the young mice, real time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the level of miR-223; fundus fluorescein angiography was performed; hematoxylin eosin staining was used to observe morphology; immunofluorescence was used to detect the expression of the microglia marker calcium binding protein-1 (Iba-1); and Western blot were used to detect the expression NLRP3, cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1), interleukin (IL)-1 β and IL-18. **Results** In the OIR group, blood vessels were ruptured, fluorescence leaked in the retina, the retinas were white, blood vessels were contracted, the retinas were thickened, cell arrangement was loose, and some cells were missing and angiogenesis occurred. In the NAR and NAR + negative RNA control groups, vascular rupture and retinal whitening were alleviated, but retinal cells were still loosely arranged. In the NAR + miR-223 antagomir group, vessels were ruptured, fluorescence leaked in the retina, retinal whitening was obvious, and retinal cells were severely loosened and missing. Compared with that in the normoxic group, miR-223 levels in retinas of the OIR mice decreased ($P < 0.05$), and the retinal levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 increased ($P < 0.05$). Compared with that in the OIR group, miR-223 levels in the retinas from the NAR and NAR + negative RNA control groups increased ($P < 0.05$), and retinal levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 decreased ($P < 0.05$). Compared with that in the NAR and NAR + negative control groups, retinal levels of miR-223 in the NAR + miR-223 antagomir group decreased ($P < 0.05$), and the levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 increased ($P < 0.05$). **Conclusions** NAR increased the expression of miR-223 and inhibited components of the NLRP3 inflammasome, thus alleviating the over-activation of microglia and reducing OIR.

【Keywords】 microRNA-223/nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 axis; naringenin; oxygen-induced retinopathy; microglial activation

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是发生在早产儿、低出生质量儿的视网膜血管异常增生疾病, 现已成为儿童致盲和视力损伤的主要原因^[1]。目前治疗 ROP 的主要方法包括抗血管内皮生长因子、激光术、冷凝术等, 但治疗后部分患儿仍出现视觉异常甚至失明现象^[2], 因此, 探求更有效的治疗方法是临床上 ROP 治疗关键。随着研究深入, 发现小胶质细胞异常活化可以影响视网膜新生血管的形成, 且炎症能够激活小胶质细胞异常活化^[3-4], 推测炎症可能是 ROP 形成的原因之一。柚皮素 (naringenin, NAR) 作为抗炎、抗氧化的黄酮类化合物, 能够通过抑制小胶质细胞的活化从而缓解小鼠记忆功能^[5], 但其在 ROP 中的作用机制尚未发现研究。微小 RNA (microRNA, miR) - 223 在单核/巨噬细胞和胚胎干细胞分化、破骨细胞形成等方面发挥重要作用, 研究发现, 上调 miR-223 后可以抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like

receptor protein 3, NLRP3) 炎症体表达, 进而可以改善脂多糖诱导的小胶质细胞的过度活化现象^[6], 推测 NAR 亦可能通过 miR-223/NLRP3 轴发挥作用。因此, 本文建立氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 模型, 通过体内实验观察 NAR 对 OIR 的影响, 并初步探讨其作用机制, 为临床上 ROP 的治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只健康成年 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雌性: 雄性 = 2 : 1), 8 周龄, 体重 (23 ± 2) g, 均购自中国医学科学院医学生物学研究所 [SCXK (滇) K2019-0002]。小鼠均在郑州大学 (药物研究院) 动物实验室内饲养 [SYXK (豫) 2018-0004], 饲养条件: 单个分笼饲养, 均在温度 $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、湿度 $(45 \pm 5)\%$ 、12 h 光照 12 h 黑暗条件下自由饮食饮水, 并保持饲养环境透气、干净。20 只雌性小鼠和 10 只雄性小鼠

适应性饲养 1 周后,按雌雄 2:1 合笼交配,雌性小鼠怀孕后取出单独饲养,并足日龄产下幼鼠,其中 150 只幼鼠母乳喂养至 7 日龄 (postnatal 7, P7),进行随机分组,开始后续实验。实验动物符合 3R 原则,经本院动物伦理审查委员会审查 (IACUC: 2020090123),符合动物伦理。

1.2 主要试剂与仪器

羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC) (伊士曼,执行标准: GB/T5005-2001); NAR (美国 Sigma 公司,批号: 192025,纯度 $\geq 95\%$); miR-223 拮抗剂阴性对照、miR-223 拮抗剂均购自广州锐博生物科技公司; miRNA 提取分离试剂盒、miRNA 反转录试剂盒 (TIANGEN,批号分别为: 20201006、20201205); 荧光素钠注射液 (广州白云山明兴制药有限公司,批号: 20190206); 一抗小胶质细胞标志物钙离子结合蛋白-1 (ionized calcium binding adapter-1, Iba-1)、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-18, Alexa Fluor[®] 488 标记的荧光二抗 (英国 abcam 公司,批号分别为: 12-NOV-2019、05-DEC-2020、26-JAN-2020、08-Nov-2019、02-NOV-2020、09-FEB-2020)。眼底荧光造影仪 (上海伊沐医疗器械有限公司,型号: SK-650B); 实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (美国 ABI 公司,型号: StepOnePlus); 蛋白凝胶成像仪 (赛默飞世尔,型号: iBright CL750)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物建模与分组

实验前所有幼鼠均用眼科裂隙灯观察眼部,均未发现异常。150 只幼鼠按照随机数字表法分为常氧组、OIR 组、NAR 组、NAR+阴性对照组、NAR+miR-223 拮抗剂组,每组 30 只。除常氧组外,其余各组参考文献^[7],幼鼠及其母鼠在 P7~P12 移至封闭氧箱中,氧气体积分数 (75 $\pm$ 2)%,连续 5 d, P12 返回正常氧环境中。常氧组在正常氧环境中常规饲养。

250 mg CMC 溶于 ddH₂O 中,定容至 100 mL 过夜。1.0 g NAR 溶于含 CMC 的溶剂中,定容 100 mL,配置成 10 mg/mL 溶液备用。NAR 组幼鼠腹腔注射 100 mg/(kg·d) NAR, NAR+阴性对照组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂阴性对照, NAR+miR-223 拮抗剂组在 NAR 基

础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂,常氧组、OIR 组每天腹腔注射等体积 CMC、P12 尾静脉注射等体积生理盐水。P17 检测幼鼠各项指标。

1.3.2 RT-qPCR 检测视网膜中 miR-223 水平

每组随机取 10 只,小心取下视网膜,置于 -80℃ 冰箱保存备用; miRNA 提取试剂盒提取 miRNA,非变性凝胶电泳检测提取质量, miRNA 反转录试剂盒将 miRNA 反转录成 cDNA。miR-223 上游引物: 5'-GGTGGTGAATACCCTCCTG-3',下游引物: 5'-GTCTGTCCGTGGTGCTGA-3'; U6 上游引物: 5'-AAGACGGGCGGAGAGAAACC-3',下游引物: 5'-CGTTGACTCCGACCTTCACC-3'。RT-qPCR 仪检测 miR-223 水平。20 μ L 反应体系: 50 ng/ μ L cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 上游引物/下游引物 0.5 μ L/0.5 μ L, 2 $\times$ Hi SYBR Green QPCR Mix 10 μ L, ddH₂O 8.0 μ L。反应条件: 95℃、5 min; 94℃、50 s, 59℃、30 s, 40 个循环, 72℃、10 min。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 miR-223 水平。

1.3.3 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 检查

每组随机取 10 只,幼鼠散瞳、2 mL/kg 10% 荧光素钠注射液腹腔注射,待荧光素钠循环至眼底时,眼底荧光造影仪以视盘和激光光凝为中心对幼鼠行 FFA 检查。

1.3.4 HE 染色观察视网膜形态

每组取剩余 10 只,处死后取眼球,置于 4% 多聚甲醛中固定。左眼球石蜡包埋后平行眼轴方向连续切片 (切片厚度 5 μ m),切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木精染色、1% 盐酸乙醇分化后,伊红染色,再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,封片观察。

1.3.5 免疫荧光检测视网膜中 Iba-1 表达情况

4% 多聚甲醛中固定的右眼球在 4℃ 经 20% 和 30% 蔗糖溶液脱水,冰冻切片机平行眼轴方向连续切片 (切片厚度 6 μ m),切片经 0.3% Triton 处理 30 min,加入山羊血清 37℃ 封闭 1 h,随后加入一抗 Iba-1 (1:1000),第 2 天洗去一抗滴加荧光二抗 (1:500) 室温孵育 1 h,统计单位面积 Iba-1 阳性细胞数。

1.3.6 Western blot 检测视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达情况

-80℃ 中取出视网膜,加 100 μ L 组织匀浆液匀浆, 10000 r/min 4℃ 离心 20 min,上清 (即为总蛋白) 置于新的离心管中,每孔上样 20 μ g,凝胶电泳分离

蛋白, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, PBST 清洗后分别添加一抗 NLRP3 (1 : 1000)、Caspase-1 (1 : 1000)、IL-1 β (1 : 500)、IL-18 (1 : 500), 4℃ 孵育过夜; PBST 清洗后加入对应二抗, 室温孵育 1 h。DAB 显色试剂盒避光显色, 蛋白凝胶成像仪拍照和定量分析。

1.4 统计学方法

统计学软件 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析, 计量数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 法。 $P<0.05$, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAR 对视网膜中 miR-223 水平的影响

与常氧组相比, OIR 组视网膜中 miR-223 水平降低 ($P<0.05$); 与 OIR 组相比, NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 miR-223 水平升高 ($P<0.05$); 分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比, NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 miR-223 水平降低 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 NAR 对 FFA 的影响

常氧组荧光分布均匀; OIR 组出现血管破裂 (黑色箭头), 荧光漏在视网膜中, 视网膜泛白, 血管出现收缩; NAR 组、NAR+阴性对照组血管破裂现象缓解,

视网膜泛白现象减轻; NAR+miR-223 拮抗剂组血管破裂, 荧光漏在视网膜中, 视网膜泛白明显。见图 1。

2.3 NAR 对视网膜形态的影响

常氧组各层次细胞排列整齐且紧密; OIR 组视网膜厚度变厚、细胞排列松散, 部分出现细胞缺失现象、血管新生现象 (黑色箭头); NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜变厚、细胞松散现象存在, 未见新生血管; NAR+miR-223 拮抗剂组细胞松散严重、细胞缺失明显。见图 2。

2.4 NAR 对视网膜中 Iba-1 表达的影响

与常氧组相比, OIR 组视网膜中 Iba-1 水平升高 ($P<0.05$); 与 OIR 组相比, NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 Iba-1 水平降低 ($P<0.05$); 分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比, NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 Iba-1 水平升高 ($P<0.05$)。见图 3、表 1。

2.5 NAR 对视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

与常氧组相比, OIR 组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平升高 ($P<0.05$); 与 OIR 组相比, NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比, NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。见图 4、表 2。

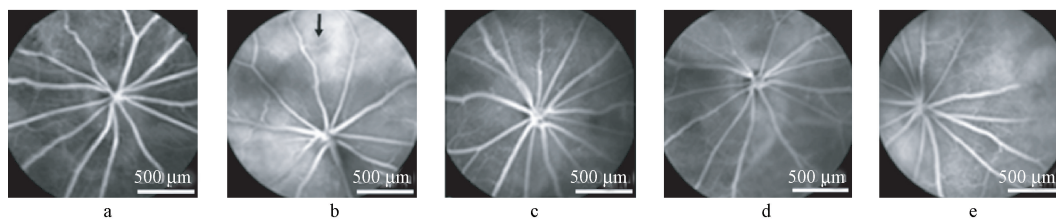
表 1 5 组视网膜中 miR-223 水平及 Iba-1 表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of miR-223 levels and Iba-1 in the retinas of the 5 groups

组别 Groups	miR-223	Iba-1 (cells/mm ²)
常氧组 Normal oxygen group	1.01 $\pm$ 0.12	15.35 $\pm$ 2.71
OIR 组 OIR group	0.38 $\pm$ 0.05 [#]	83.43 $\pm$ 11.75 [#]
NAR 组 NAR group	0.74 $\pm$ 0.07 [*]	28.56 $\pm$ 3.16 [*]
NAR+阴性对照组 NAR+negative control group	0.75 $\pm$ 0.06 [*]	30.15 $\pm$ 4.48 [*]
NAR+miR-223 拮抗剂组 NAR+miR-223 antagonist group	0.26 $\pm$ 0.03 ^{△▲}	76.18 $\pm$ 8.15 ^{△▲}

注: 与常氧组相比, [#] $P<0.05$; 与 OIR 组相比, ^{*} $P<0.05$; 与 NAR 组相比, [△] $P<0.05$; 与 NAR+阴性对照组相比, [▲] $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal oxygen group, [#] $P<0.05$. Compared with OIR group, ^{*} $P<0.05$. Compared with NAR group, [△] $P<0.05$. Compared with NAR+negative control group, [▲] $P<0.05$.

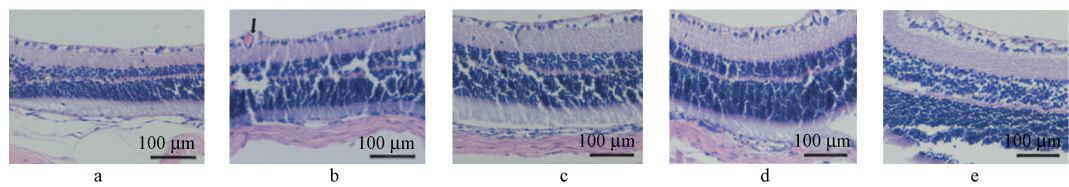


注: a: 常氧组; b: OIR 组; c: NAR 组; d: NAR+阴性对照组; e: NAR+miR-223 拮抗剂组。黑色箭头表示血管破裂。

图 1 5 组幼鼠 FFA 情况

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagonist group. Black arrow indicates vessel rupture.

Figure 1 FFA situation of the young mice of 5 groups

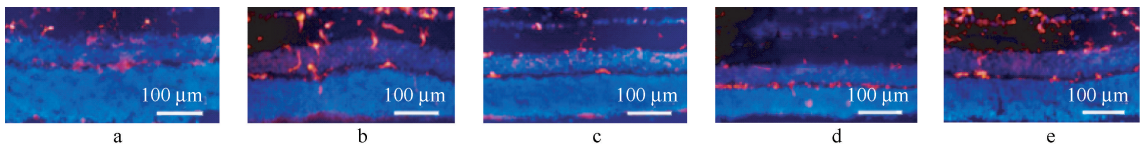


注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 2 5 组幼鼠视网膜形态情况(HE 染色)

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagonist group.

Figure 2 Morphology of retina in the young mice of 5 groups(HE staining)

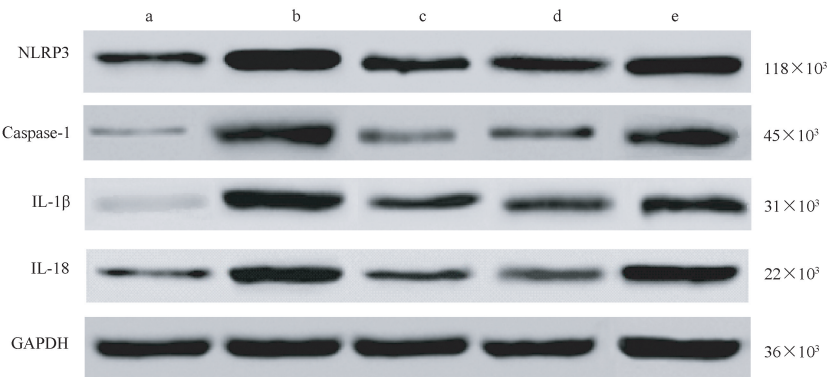


注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 3 5 组幼鼠视网膜中 Iba-1 表达情况(免疫荧光)

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagonist group.

Figure 3 Iba-1 expression in the retina of the young mice of 5 groups(immunofluorescence)



注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 4 5 组幼鼠视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达情况

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagonist group.

Figure 4 NLRP3, Caspase-1, IL-1β, IL-18 protein expression in the retina of young mice in the 5 groups

表 2 5 组幼鼠视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 protein expression in the retina of young mice in the 5 groups

组别 Groups	NLRP3	Caspase-1	IL-1β	IL-18
常氧组 Normal oxygen group	0.56±0.08	0.09±0.01	0.05±0.01	0.21±0.03
OIR 组 OIR group	1.13±0.12 [#]	1.56±0.17 [#]	1.73±0.18 [#]	1.03±0.11 [#]
NAR 组 NAR group	0.69±0.08 [*]	0.24±0.03 [*]	0.45±0.05 [*]	0.31±0.03 [*]
NAR+阴性对照组 NAR+ negative control group	0.70±0.06 [*]	0.26±0.04 [*]	0.46±0.06 [*]	0.32±0.04 [*]
NAR+miR-223 拮抗剂组 NAR+miR-223 antagonist group	1.02±0.05 ^{△▲}	1.05±0.10 ^{△▲}	0.81±0.09 ^{△▲}	0.93±0.08 ^{△▲}

注:与常氧组相比,[#] $P<0.05$;与 OIR 组相比,^{*} $P<0.05$;与 NAR 组相比,[△] $P<0.05$;与 NAR+阴性对照组相比,[▲] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal oxygen group, [#] $P<0.05$. Compared with OIR group, ^{*} $P<0.05$. Compared with NAR group, [△] $P<0.05$. Compared with NAR+negative control group, [▲] $P<0.05$.

3 讨论

ROP 又称晶状体后纤维增生症,是视网膜正常血管化停滞,新生血管异常增生,严重情况下会牵拉视网膜脱落,损害视力,甚至失明,即使患儿未失明,视网膜光感受器细胞发育异常,患儿出现斜视、弱视、屈光不正等的几率也极高^[8]。随着研究深入,发现感染在 ROP 发生、发展中起一定作用,骨髓造血干细胞来源的巨噬细胞迁移至视网膜中并分化成小胶质细胞。小胶质细胞能够参与免疫系统的免疫监视,损伤情况下小胶质细胞激活,在初期可以作为抗原呈递细胞,吞噬坏死的视网膜神经节细胞碎片,但小胶质细胞过度激活还可分泌一系列炎症因子,发挥炎症作用^[9-10]。且在 ROP 中小胶质细胞过度活化传递缺氧信号,促进视网膜血管新生^[11]。本研究以小鼠出生 7 d 幼鼠为研究对象, OIR 处理模拟 ROP 症状,研究发现, OIR 中 FFA 可见血管破裂严重,荧光漏在视网膜中,视网膜泛白,血管出现收缩现象; HE 染色可见视网膜出现血管新生现象、细胞排列紊乱,提示 OIR 在一定程度上可以模拟 ROP 现象。研究发现,小胶质细胞主要集中在神经纤维层、内核层和外丛状层,本研究对小胶质细胞标志物 Iba-1 免疫荧光染色发现,在常氧组中仅有少量活化的小胶质细胞,可能用于对正常代谢的视网膜碎片进行清理,但在 OIR 组中视网膜相同部位出现大量活化的小胶质细胞,可能影响血管破裂、增生。中医作为传统医学,中草药的治疗对于疾病意义重大,其中 NAR 作为中药中重要成分,广泛存在于植物和中药中,研究发现,其在糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤、细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[12]。在本研究中, NAR 可以减轻血管新生现象,降低小胶质细胞活化现象,从而缓解 OIR,但其具体机制尚需进一步研究。

miRNA 存在于哺乳动物体内,通过转录后基因表达从而参与调控表观遗传^[13], miR-223 一直认为是与造血、免疫相关的特异性 miRNA, miR-223 存在于血管内皮细胞中,在血管新生中处于下调状态,能够拮抗血管新生^[14];作为髓系细胞中表达 miRNA,能够调控免疫细胞发育和维持免疫细胞稳态^[15],能够通过调控多种炎症相关因子表达从而调控单核细胞的分化和巨噬细胞极化^[16]。NLRP3 作

为 miR-223 的靶基因之一^[17],是中枢神经系统炎症小体,可触发炎症反应过程,在 OIR 视网膜中处于高表达状态^[18]。NLRP3 可以与效应分子结合形成成熟的炎症小体和成熟的 Caspase-1, Caspase-1 作为 IL-1 β 、IL-18 特异有效的蛋白酶,激活后的 Caspase-1 能够促进炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达, IL-1 β 、IL-18 进一步发挥致炎促损伤作用^[19-20]。本研究发现在 OIR 视网膜中 miR-223 处于低表达状态, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平均升高,提示在 OIR 中 miR-223 表达降低,从而升高 NLRP3 的表达,发挥作用。NAR 组较 OIR 组视网膜中 miR-223 水平升高、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平降低,而在 NAR 组的基础上添加 miR-223 拮抗剂后可以逆转上述过程,提示 NAR 能够升高 miR-223 水平、降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平,实现对小胶质细胞活化的缓解,进而抑制血管新生。

综上所述, NAR 能够上调 miR-223 的表达进而抑制 NLRP3 炎症小体的表达,缓解视网膜炎症作用,进而缓解小胶质细胞过度激活,实现对 OIR 的保护。但 miR-223 下游靶基因众多,亦可能通过别的基因发挥作用,且小胶质细胞过度激活机制复杂,需进一步研究发现其机制。

参考文献:

- [1] Mirjalili A, Manaviat MR, Noori-Shadkam M. Evaluation of the oral propranolol effect on retinopathy of prematurity: randomized clinical trial [J]. J Pediatr, 2020, 163(6): 1570-1577.
- [2] Arima M, Fujii Y, Sonoda KH. Translational research in retinopathy of prematurity: from bedside to bench and back again [J]. J Clin Med, 2021, 10(2): 331.
- [3] Ma W, Silverman SA, Zhao L, et al. Absence of TGF β signaling in retinal microglia induces retinal degeneration and exacerbates choroidal neovascularization [J]. Elife, 2019, 8: e42049.
- [4] Liu Y, Dai Y, Li Q, et al. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia [J]. Neurosci Lett, 2020, 736: 135279.
- [5] 张德松, 徐胜春. 柚皮素对 APP/PS1 转基因小鼠淀粉样斑块沉积和胶质细胞活化的抑制作用 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(1): 20-24.
- [6] Tatan B. Dimethyl fumarate ameliorates NLRP3 inflammasome activation induced by LPS and ATP in murine microglia [J]. Inflammasomes, 2019, 351(17): 457-463.

- [7] Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(3): 576-585.
- [8] Li JO, Liu H, Ting DSJ, et al. Digital technology, tele-medicine and artificial intelligence in ophthalmology: A global perspective [J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 82: 100900.
- [9] Moseman EA, Blanchard AC, Nayak D, et al. T cell engagement of cross-presenting microglia protects the brain from a nasal virus infection [J]. Sci Immunol, 2020, 5(48): eabb1817.
- [10] Liu R, Xu NG, Yi W, et al. Electroacupuncture attenuates inflammation after ischemic stroke by inhibiting NF- κ B-mediated activation of microglia [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8163052.
- [11] Goebel U, Scheid S, Spassov S, et al. Argon reduces microglial activation and inflammatory cytokine expression in retinal ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(1): 192-198.
- [12] 徐辉勇, 陈金鹏, 章剑. 柚皮素对糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤, 细胞凋亡及 Nrf2-ARE 的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 128-132.
- [13] Qin L, Zhong M, Adah D, et al. A novel tumour suppressor lncRNA F630028O10Rik inhibits lung cancer angiogenesis by regulating miR-223-3p [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(6): 3549-3559.
- [14] Shao J, Fan G, Yin X, et al. A novel transthyretin/STAT4/miR-223-3p/FBXW7 signaling pathway affects neovascularization in diabetic retinopathy [J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 498: 110541.
- [15] Roffel MP, Bracke KR, Heijink IH, et al. miR-223: a key regulator in the innate immune response in asthma and COPD [J]. Front Med, 2020, 7: 196-213.
- [16] Qu H, Liu R, Chen J, et al. Aerobic exercise inhibits CUMS-Depressed mice hippocampal inflammatory response via activating hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF- κ B pathway [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(8): 2676.
- [17] Long FQ, Kou CX, Li K, et al. MiR-223-3p inhibits rTp17-induced inflammasome activation and pyroptosis by targeting NLRP3 [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24): 14405-14414.
- [18] Sui A, Chen X, Shen J, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 ameliorates retinal neovascularization and leakage by reversing the IL-1 β /IL-18 activation pattern in an oxygen-induced ischemic retinopathy mouse model [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 901.
- [19] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP 3 炎症小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- [20] Zuo W, Tian R, Chen Q, et al. miR-330-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting TIM3 [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2020, 35(4): 691-705.

[收稿日期] 2021-03-23