

# C57BL/6N 小鼠早期视网膜变性及其小胶质细胞活化状态研究

孟欢<sup>1,2\*</sup>, 邓婷婷<sup>3\*</sup>, 刘自强<sup>4</sup>, 侯小玉<sup>4</sup>, 马传政<sup>2</sup>, 苑维<sup>3</sup>, 金明<sup>3</sup>

引用:孟欢,邓婷婷,刘自强,等. C57BL/6N 小鼠早期视网膜变性及其小胶质细胞活化状态研究. 国际眼科杂志, 2024, 24(10): 1536-1541.

基金项目:中日友好医院院级科研基金项目(No.2019-2-MS-3)  
作者单位:<sup>1</sup>(100029)中国北京市,北京中医药大学第三附属医院眼科;<sup>2</sup>(100029)中国北京市,北京中医药大学;<sup>3</sup>(100029)中国北京市,中日友好医院眼科;<sup>4</sup>(100040)中国北京市,中国科学院眼科医院

\*:孟欢和邓婷婷对本文贡献一致。

作者简介:孟欢,博士,助理研究员,研究方向:中西医结合防治眼底病;邓婷婷,博士,助理研究员,研究方向:细胞免疫学研究。

通讯作者:苑维,副教授,副主任医师,研究方向:中西医结合防治眼底病. [yuanwei318@163.com](mailto:yuanwei318@163.com);金明,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中西医结合防治眼底病. [jinmingyk@163.com](mailto:jinmingyk@163.com)

收稿日期:2023-10-10 修回日期:2024-08-27

## 摘要

目的:观察 C57BL/6N(Crb1<sup>rd8/rd8</sup>)小鼠早期视网膜变性以及小胶质细胞的活化情况。

方法:取雄性 SPF 级 C57BL/6N 小鼠 15 只、C57BL/6J 小鼠 15 只,正常饲养。分别在入组时,入组 4、8、12 wk,使用 Micron-III 小动物视网膜影像系统进行双眼彩色眼底照相检查计算病变数量、病变面积。观察结束后处死小鼠,摘取右侧眼球制备视网膜组织切片,进行 HE 染色后光镜下观察视网膜组织形态;采用免疫组织化学染色分析两组小鼠视网膜 CX3CR1 的表达水平及位置。摘取左侧眼球分离视网膜,使用 Western-Blot 检测 CD86、CD206 的表达情况,使用电化学发光法测定视网膜中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 炎症因子含量水平。

结果:眼底彩照结果显示在入组 4、8、12 wk, C57BL/6N 组眼底病变数量均较入组时显著增加,与 C57BL/6J 组同时间点变化量比较均有差异(均  $P < 0.05$ );眼底病变面积变化量两组间入组 12 wk 有差异( $P < 0.05$ ),各组内变化量比较均无差异(均  $P > 0.05$ );视网膜组织 HE 染色示:C57BL/6N 组视网膜结构异常,细胞排列疏松、紊乱,光感受器层向视网膜内侧明显的玻璃膜疣样凸起, C57BL/6J 组视网膜结构清晰,细胞排列有序,无明显异常;免疫组化结果示:C57BL/6N 组视网膜中 CX3CR1 高表达于神经节细胞层、内外丛状层、感光细胞层及病灶处位置,平均光密度为  $0.285 \pm 0.056$ , C57BL/6J 组为  $0.189 \pm 0.084$  ( $P < 0.05$ ); Western-Blot 结果显示:与 C57BL/6J 组相比, C57BL/6N 组视网膜 CD86、CD206 蛋白有不同程度升高,两组 CD86 蛋白表达有差异( $P < 0.05$ );细胞因子检测结果显示: C57BL/6N 组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著高于 C57BL/6J 组,而 IL-10 含量则明显较低(均  $P < 0.05$ )。

结论:C57BL/6N(Crb1<sup>rd8/rd8</sup>)小鼠视网膜变性进展缓慢,随年龄呈进行性加重,病灶部位视网膜结构紊乱,伴有以 M1 型极化为主的小胶质细胞浸润。

关键词:C57BL/6N;视网膜变性;年龄相关性黄斑变性;小胶质细胞;极化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.10.04

## Early retinal degeneration and activation of microglia in C57BL/6N mice

Meng Huan<sup>1,2\*</sup>, Deng Tingting<sup>3\*</sup>, Liu Ziqiang<sup>4</sup>, Hou Xiaoyu<sup>4</sup>, Ma Chuanzheng<sup>2</sup>, Yuan Wei<sup>3</sup>, Jin Ming<sup>3</sup>

Foundation item: Research Fund of China - Japan Friendship Hospital (No.2019-2-MS-3)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China; <sup>2</sup>Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; <sup>4</sup>Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

\* Co-first authors: Meng Huan and Deng Tingting

Correspondence to: Yuan Wei. Department of Ophthalmology, China - Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China. [yuanwei318@163.com](mailto:yuanwei318@163.com); Jin Ming. Department of Ophthalmology, China - Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China. [jinmingyk@163.com](mailto:jinmingyk@163.com)

Received:2023-10-10 Accepted:2024-08-27

## Abstract

• AIM: To observe the early retinal degeneration and activation of microglia in C57BL/6N (Crb1<sup>rd8/rd8</sup>) mice.

• METHODS: Totally 15 male SPF C57BL/6N mice and 15 male SPF C57BL/6J mice were raised normally, and fundus photography examinations were performed by Micron-III at the time of 0, 4, 8, 12 wk of enrollment to calculate the number and area of retinopathy. At the end of experiment, all mice were sacrificed and the right eyeballs were removed to prepare retinal tissue slices. After HE staining, the retinal tissue morphology was observed under optical microscope while the location and level of CX3CR1 expression were detected in immunohistochemical staining. The left eyeballs were removed to isolate retina, then Western-Blot was used to analyze the expression of CD86 and CD206 proteins in retina, and the concentration of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL - 10 in retina was detected by electrochemiluminescence.

• **RESULTS:** The result of fundus photography examinations showed that the number of retinopathy in the C57BL/6N significantly increased at 4, 8, and 12 wk, and there were differences in variations compared with the C57BL/6J at the same time point (all  $P < 0.05$ ). In the changes in area of retinopathy, there was a difference between two groups at 12 wk ( $P < 0.05$ ), but no difference in variations within groups (both  $P > 0.05$ ). HE staining of retinal tissue showed that the retinal structure of C57BL/6N mice was abnormal, with loose and disordered cell arrangement, and the photoreceptor layer was obviously protruding to the inner side of retina with a drusen-like protrusion. The retinal structure of C57BL/6J mice was clearer, with orderly cell arrangement and no obvious abnormality. Immunohistochemical results showed that CX3CR1 was highly expressed in ganglion cell layer, inner and outer plexiform layer, photoreceptor cell layer and lesion in the retina of C57BL/6N mice, with a mean density of  $0.285 \pm 0.056$  in C57BL/6N and  $0.189 \pm 0.084$  in C57BL/6J mice ( $P < 0.05$ ). The results of Western-Blot showed that the expression of CD86 and CD206 in retina of C57BL/6N increased compared with that in C57BL/6J to varying degrees, and the difference of CD86 was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The results of cytokine detection showed that the level of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in C57BL/6N was significantly higher than that of C57BL/6J, while IL-10 was significantly lower (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** The retinal degeneration of C57BL/6N (Crb1<sup>rd8/rd8</sup>) mice progressed slowly and gradually aggravated with age. The retinal structure of the lesion was disordered and accompanied by microglial infiltration dominated by M1 polarization.

• **KEYWORDS:** C57BL/6N; retinal degeneration; age-related macular degeneration; microglia; polarization

**Citation:** Meng H, Deng TT, Liu ZQ, et al. Early retinal degeneration and activation of microglia in C57BL/6N mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(10):1536-1541.

## 0 引言

视网膜变性 (retinal degeneration, RD) 是一类由于各种原因造成光感受器丧失或功能障碍而导致视力受损甚至失明的眼科神经退行性病变, 包括视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP)、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD)、Leber 先天性黑矇等<sup>[1]</sup>。为了了解光感受器细胞死亡的原因, 多年来人们一直在研究视网膜变性的小鼠模型, 目前已发现多种自然发生的小鼠突变类型, 包括 RD1 (Pde6b<sup>rd1</sup>)、浦肯野细胞变性 (Pcd)、RD2 (Prph<sup>rd2</sup>)、RD3、RD4、RD5 (Tub)、RD6、RD7 (Nr2e3<sup>rd7</sup>)、RD8 (Crb1<sup>rd8</sup>)、RD9、RD10 (Pde6b<sup>rd10</sup>) 等, 它们在保留所有其他视网膜细胞类型的情况下均表现出视网膜光感受器的退化, 但表型和特征各异<sup>[2]</sup>, 对 RD 小鼠的研究有助于进一步探索多种视网膜退行性病变的发生机制。

C57BL/6N 是 Crb1<sup>rd8/rd8</sup> 纯合突变的品系小鼠, 有典型的视网膜变性表现, 在其眼底病灶区域还观察到明显的小胶质细胞 (microglia, MG) 与巨噬细胞聚集, 且体内表达更

高的促炎性基因水平, 因此尽管小鼠在解剖结构上没有黄斑, 部分学者仍认为 C57BL/6N 或许可作为干性 ARMD 的实验动物模型<sup>[3-5]</sup>。CX3CR1 在眼底主要表达于 MG, 与其配体 CX3CL1 间的信号定义了局部髓系细胞群体对炎性刺激的激活与调节功能, 介导 MG 向病损处转移, ARMD 患者眼底视网膜变性部位积聚的 MG 总是表达 CX3CR1 阳性<sup>[6-7]</sup>, 因此对 CX3CR1 的检测基本可反映 MG 的分布。活化的 MG 呈经典 M1 型或替代 M2 型, 这种发挥不同生理功能并表达不同表面标志物的过程为极化, M1 型极化通常发生于损伤产生最初的几小时或几天内, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-12 等具有促炎效应的细胞因子被大量分泌, 表现为明显的细胞毒性作用, 表面标志物为 iNOS、CD86、CD32 等; M2 型极化释放的 IL-4、IL-10、IL-13 和转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 以及精氨酸酶-1 (Arg1)、几丁质酶 3 样蛋白 3 (YM1/Chi3l3) 等, 在抑制炎症、组织重塑、血管生成、神经保护等方面有积极作用, 表面标志物包括 CD206、Arg1 等<sup>[8-9]</sup>。正常状态下 M1/M2 型极化水平维持动态的平衡, 而在病理状态下这种平衡将被打破造成组织损伤<sup>[10]</sup>, 对 CD86/CD32 及 CD206/Arg1 等表面标志物的检测可反应 MG 的极化状态。

本研究记录了 C57BL/6N 小鼠早期视网膜变性程度随时间的变化, 并通过检测 CX3CR1、CD86、CD206 的观察小胶质细胞在眼底的分布与极化情况, 分析其作为干性 ARMD 实验动物模型的可行性, 也为进一步研究干性 ARMD 等眼底退行性病变提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF 级健康雄性 10 周龄 C57BL/6N (Crb1<sup>rd8/rd8</sup>) 小鼠 15 只、C57BL/6J (Crb1<sup>wt/wt</sup>) 小鼠 15 只 (均购自北京维通利华实验动物技术有限公司), 饲养于中日友好医院临床医学研究所 SPF 级中心动物实验室, 标准实验室条件。实验开始前, 对所有小鼠在散瞳状态下进行裂隙灯显微镜和检眼镜检查, 分别检查小鼠双眼眼前节及眼底, 排除眼前节异常或屈光间质不清者。本研究通过中日友好医院实验动物伦理委员会审查批准 (伦理编号: zryhy21-21-03-09)。主要试剂: 兔抗小鼠 CX3CR1 多克隆抗体 (GB11861, Servicebio)、兔抗小鼠 CD86 抗体 (GTX32507, GeneTex)、兔抗小鼠 CD206 抗体 (ab64693, Abcam)、HRP 标记山羊抗兔 (GB23303, Servicebio)、V-PLX Proinflammatory Panel 1 试剂盒 (K15048D, MesoScale Discovery)。主要仪器: Micron-III 小动物视网膜影像系统 (美国 Phoenix Research Labs 公司), MSD 超敏多因子电化学发光分析仪 (美国 Meso Scale Discovery, 型号 Meso QuickPlex SQ 120)。

## 1.2 方法

**1.2.1 彩色眼底照相检查** 每组随机选择 5 只小鼠, 分别在入组时, 入组 4、8、12 wk, 使用 Micron-III 小动物视网膜影像系统进行双眼彩色眼底照相检查, 拍摄时使视盘位于视野正中, 调整焦距拍摄清晰眼底图像。选择眼位合适、图像清晰的眼底检查原图输入 Image J 软件, 以小鼠自身视乳头直径 (papillary diameter, PD) 为标准, 以直径 0.2 PD 为界点, 较小的病灶计算病变数量; 较大的病灶测量病变面积, 如有多处较大病灶, 则病变面积为多处病灶面积之和。分别计算病变数量和病变面积, 同一病灶两者不重复计算。

**1.2.2 苏木素-伊红染色** 所有小鼠在实验结束最后一次检查后禁食水 12 h 后取材。充分麻醉后快速摘除右侧眼球,放入 4%多聚甲醛固定液,4 ℃条件下固定 72 h;使用眼科穿刺刀片在眼球角结膜缘切口,沿角膜缘环形剪开眼球,剔除眼前节及玻璃体,制作眼杯;眼杯固定 24 h 后石蜡包埋,沿视网膜纵切面,设置切片厚度为 4 μm 连续切片制备视网膜石蜡切片;制备好的切片经脱蜡、染色、脱水、透明、封片等操作进行苏木素-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 后使用病理切片扫描仪扫描图像。

**1.2.3 免疫组化染色** 将制备好的石蜡切片经二甲苯、梯度浓度酒精依次脱蜡、封闭,使用兔抗小鼠 CX3CR1 多克隆抗体 (1:1 000) 一抗孵育,HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育并显色、复染、脱水封片后,使用病理切片扫描仪扫描图像并保存。选取每只眼球制备较好的 1 张切片,每张切片选择 3 个高倍视野拍照记录,使用 Image J 软件分别测量每张切片图片中 CX3CR1 阳性表达的积分光密度 (integral optical density, IOD) 和阳性像素面积,通过计算平均光密度 (mean density, IOD/阳性像素面积),对结果进行定量统计。

**1.2.4 Western-Blot 检测视网膜 CD86 和 CD206 蛋白的相对表达量** 实验结束后充分麻醉小鼠后快速摘取小鼠左侧眼球,置于 35 mm 无菌培养皿中,加入生理盐水 3 mL。将培养皿置于冰上操作,在显微镜下使用眼科穿刺刀片、眼科剪、显微镊等分离眼前节组织和玻璃体等结构,剥离视网膜后,每组留取 9 只小鼠的视网膜组织使用 Western-Blot 检测视网膜 CD86、CD206 蛋白的相对表达量。依次经提取视网膜总蛋白,蛋白变性、SDS-PAGE 电泳、转膜封闭、一抗孵育 (抗 CD86 抗体、抗 CD206 抗体,稀释浓度均为 1:1 000)、洗膜、化学发光后,使用 AlphaEase FC 软件对目的条带与内参条带光密度值进行分析,计算目的蛋白的相对表达量。

**1.2.5 电化学发光法多因子检测视网膜炎性因子含量** 每组取 6 只小鼠的视网膜组织使用电化学发光法多因子检测炎症因子含量。将剥离的视网膜组织按照 V-PLEX Proinflammatory Panel 1 试剂盒说明书,经视网膜匀浆、浓度检测、标准品准备、洗板、孵育、加抗体、再次孵育、洗板、上机检测等操作,进行电化学发光法测定 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-4、IL-10 炎症因子含量水平。

统计学分析:使用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内比较采用配对样本 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料,采用四分位数  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,使用 Mann-Whitney *U* 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 彩色眼底照相检查结果** 每组分别在入组时,入组 4、8、12 wk 随机选择 5 只小鼠进行双眼彩色眼底照相检查。C57BL/6N 组小鼠存在不同程度的视网膜变性表现,眼底彩照表现为大小不等、点片状的白色斑点,多见于视网膜下方;C57BL/6J 组小鼠则少见类似病变,表现为清晰的眼底结构,见图 1。C57BL/6N 组小鼠在入组 4、8、12 wk 的视网膜病变数量与入组时分别比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而病变面积与入组时分别比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );C57BL/6J 组小鼠入组时,入组 4、8、12 wk 视网膜病变数量和视网膜病变面积与入组时分别比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。为消除基线不一致带来的误差,因此计算时取当前节点较入组时的差值,即变化量进行组间比较。两组小鼠入组 4、8、12 wk 视网膜病变数量变化量比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );入组 12 wk 两组视网膜病变面积变化量比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),入组 4、8 wk 病变面积变化量比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1,2。

**2.2 视网膜组织 HE 染色结果** HE 染色结果显示 C57BL/6J 组小鼠眼底视网膜结构清晰、各层细胞排列整齐、组织结构致密;C57BL/6N 组小鼠可见视网膜结构异常,光感受器层向视网膜内侧明显的玻璃膜疣 (Drusen) 样凸起,外核层变薄、细胞排列紊乱,外丛状层结构混乱,内核层细胞排列疏松数量减少 (图 2)。

**2.3 免疫组化染色结果** 免疫组化染色显示 C57BL/6N 小鼠的视网膜神经节细胞层、内外丛状层、感光细胞层及病灶处均可见明显的棕黄色点片状染色,C57BL/6J 组小鼠视网膜则未见明显着色 (图 3)。经计算 CX3CR1 在 C57BL/6N 组小鼠视网膜中的平均光密度为  $0.285 \pm 0.056$ ,C57BL/6J 组为  $0.189 \pm 0.084$ ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,图 4)。

表 1 两组小鼠视网膜病变数量比较

( $n = 10, \bar{x} \pm s$ , 个)

分组	入组时	入组 4 wk	入组 8 wk	入组 12 wk	Δ4 wk	Δ8 wk	Δ12 wk
C57BL/6N 组	32.00±14.39	39.70±12.44 <sup>a</sup>	40.80±8.51 <sup>a</sup>	45.30±11.60 <sup>a</sup>	7.70±6.99	8.80±8.70	13.30±10.67
C57BL/6J 组	2.10±1.91	2.50±2.17	2.30±2.79	2.90±2.92	0.40±1.65	0.20±2.53	0.80±2.53
<i>t</i>					3.213	3.001	3.606
<i>P</i>					0.009	0.013	0.005

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 入组时。

表 2 两组小鼠视网膜病变面积比较

[ $n = 10, M(P_{25}, P_{75}), PD$ ]

分组	入组时	入组 4 wk	入组 8 wk	入组 12 wk	Δ4 wk	Δ8 wk	Δ12 wk
C57BL/6N 组	(0,0.062)	(0,0.138)	(0,0.196)	(0,0.412)	(0,0.031)	(0,0.049)	(0,0.184)
C57BL/6J 组	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)
<i>Z</i>					-0.162	-1.027	-2.000
<i>P</i>					0.871	0.304	0.045

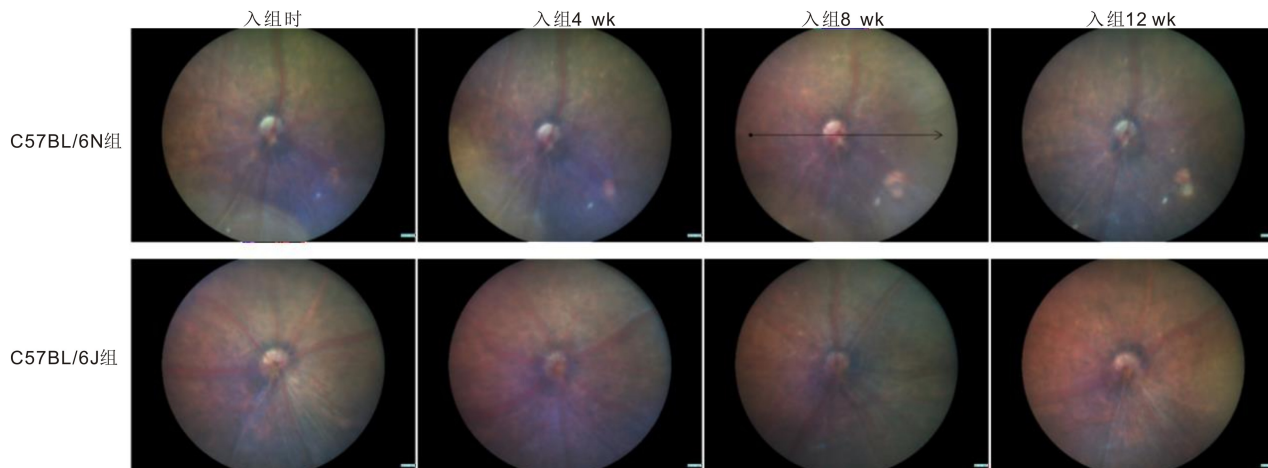


图1 两组小鼠不同时间点眼底彩照。

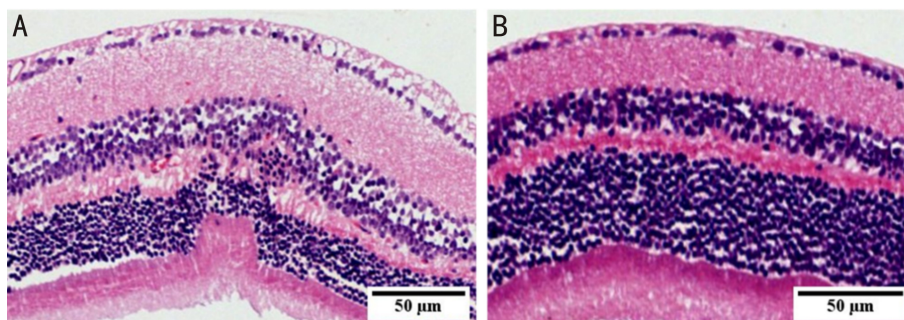


图2 两组小鼠视网膜 HE 染色 A: C57BL/6N 组, B: C57BL/6J 组。

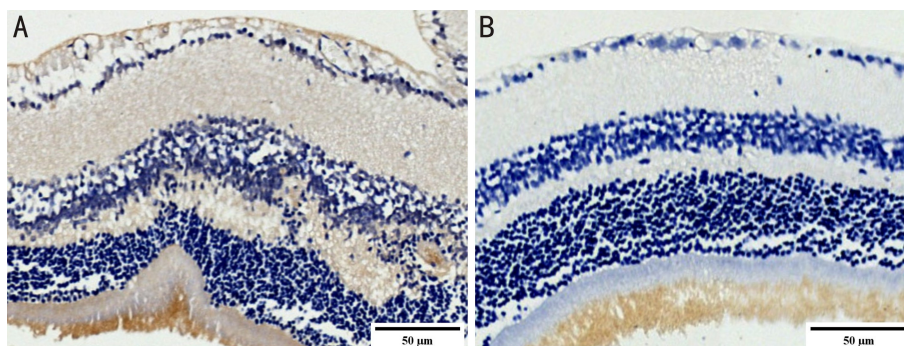


图3 两组小鼠视网膜免疫组化染色结果 A: C57BL/6N 组, B: C57BL/6J 组。

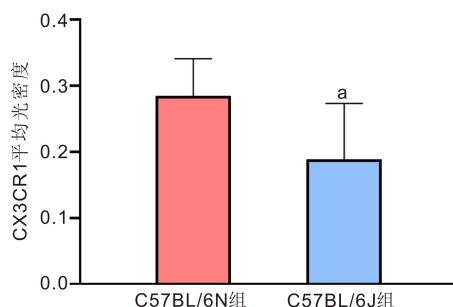


图4 两组小鼠视网膜 CX3CR1 平均光密度 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C57BL/6N 组。

**2.4 Western-Blot 检测两组小鼠视网膜 CD86 和 CD206 蛋白的相对表达量** 每组留取 9 只小鼠的单眼视网膜组织进行 Western-Blot 检测,结果显示与 C57BL/6J 组相比, C57BL/6N 组小鼠视网膜内 CD86 与 CD206 均处于较高水平,其中两组小鼠视网膜 CD86 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义,而 CD206 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 (CD86:  $0.530 \pm 0.132$  vs  $0.183 \pm 0.042$ ,  $P < 0.05$ ;

CD206:  $0.487 \pm 0.204$  vs  $0.183 \pm 0.051$ ,  $P > 0.05$ ), 见图 5。

**2.5 两组小鼠视网膜炎症因子含量比较** 每组留取 6 只小鼠单眼的视网膜组织使用电化学发光法多因子检测与胶质细胞极化相关的炎症因子含量。结果显示 C57BL/6N 组小鼠视网膜中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的水平高于 C57BL/6J 组小鼠,而 IL-10 含量明显低于 C57BL/6J 组小鼠,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

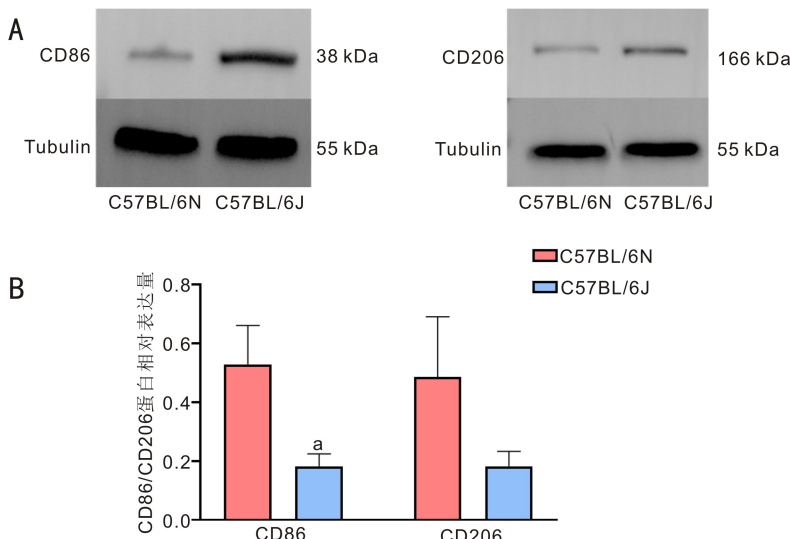


图5 Western-Blot 检测两组小鼠视网膜 CD86 和 CD206 蛋白的相对表达量 A: Western-Blot 检测结果; B: 柱状图; <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs C57BL/6N 组。

表3 两组小鼠视网膜炎症因子含量比较

( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

分组	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-4	IL-10
C57BL/6N 组	0.079 $\pm$ 0.011	5.247 $\pm$ 0.331	0.182 $\pm$ 0.028	0.017 $\pm$ 0.017	0.526 $\pm$ 0.478
C57BL/6J 组	0.048 $\pm$ 0.015	3.093 $\pm$ 1.464	0.113 $\pm$ 0.006	0.053 $\pm$ 0.025	1.648 $\pm$ 0.384
<i>t</i>	2.818	2.484	4.183	-2.047	-3.170
<i>P</i>	0.048	0.068	0.014	0.110	0.034

### 3 讨论

近交系 C57BL/6 小鼠是第一个完成基因组测序的小鼠品系,在上世纪四、五十年代分别由美国杰克逊实验室和美国国立卫生研究院分离成 C57BL/6J 和 C57BL/6N 亚系<sup>[11]</sup>。与 C57BL/6J 不同,C57BL/6N 小鼠是 RD8 突变的纯合子,这是一种 Crb1 (Crumbs Homolog 1) 基因中自发的单核苷酸缺失,Crb1 基因主要表达于中枢神经系统和视网膜,其编码的 Crb1 蛋白是一种细胞表面膜结合蛋白,参与整合到黏附小带和肌动蛋白细胞骨架,还引导外胚层上皮细胞的极性并参与维持 Müller 神经胶质细胞和光感受器之间的连接,是视网膜外界膜的重要组成部分,因此 Crb1 基因对维持视觉系统正常生理功能有关键作用,但 RD8 突变会导致终止密码子的形成从而使该基因功能丧失<sup>[12-13]</sup>,因此具有 Crb1 基因 RD8 突变的 C57BL/6N 小鼠眼底会发生缓慢的视网膜退化,表现为视网膜发育异常和解剖结构的紊乱<sup>[14]</sup>。对 C57BL/6N 小鼠的研究有助于对多种退行性眼病的机制探索,分析其作为相关疾病动物模型的可能性。

我们的研究以 C57BL/6N 小鼠为研究对象,与 C57BL/6J 相比较,首先观察 C57BL/6N 小鼠眼底病变的形态学特征,并记录病变早期的动态变化。很早就有学者关注到 C57BL/6N 小鼠的基因突变与视网膜变性的直接关系,并且进行了可靠的研究,发现这种特征在眼底图像上体现为视网膜下方大量的白色斑点,在 5 周龄时从组织学检测观察到与白色斑点区域相对应的视网膜皱褶、假突起及局灶性视网膜发育不良与变性,但保留光感受器功能和结构、出现轻微的视杆细胞及视锥细胞的电生理反应降低等<sup>[2, 15]</sup>。但既往的研究更多集中于评价其影像学和

组织结构特征,或以此为基础进行基因修饰构建其他视网膜病变动物模型<sup>[16-17]</sup>,本研究关注其自身 Crb1 基因突变引起的眼底病变,通过影像记录早期视网膜变性病变程度在 12 wk 内随时间的动态变化,反映这种特征在一段时间内的变化趋势及进展过程;结合对形态学的观察,还原 Crb1<sup>rd8/rd8</sup> 突变对视网膜的影响。在我们的实验中,观察到 10 周龄的雄性 C57BL/6N 小鼠眼底出现了与文献报道一致的异常白色斑点,而 C57BL/6J 小鼠则少见此类改变,为消除基线不一致造成的实验误差,使两组数据可比,我们引入变化量计算,比较两组组间差异,结果显示 C57BL/6N 小鼠眼底病变数量随时间逐渐增加,但病变面积的变化不显著,提示这种视网膜变性随年龄增长呈进行性加重,但早期进展较缓慢,变性区域多以点状呈散在分布,局部融合不明显。形态学则观察到 C57BL/6N 小鼠视网膜明显的结构异常,表现为光感受器层向视网膜内侧的玻璃膜疣样凸起,外核层、外丛状层及内核层的紊乱等,与以往文献报道基本一致。

我们在观察到 Crb1<sup>rd8/rd8</sup> 小鼠特征性眼底表现后,后续研究主要围绕着探索病变与 MG 活化状态的相关性展开。MG 是存在于视网膜内的主要吞噬细胞,约占视网膜细胞的 0.3% - 1%,主要存在于内、外丛状层,通过清除代谢产物、病原体、渗出的血清蛋白和细胞碎片及产生神经营养因子和抗炎细胞因子等维持视网膜稳态<sup>[18-20]</sup>。MG 在视网膜下间隙的积聚是 drusen 的典型病理改变,反映了单核细胞向视网膜迁移的增加,或免疫细胞清除的失败,MG 吞噬能力的变化直接导致代谢产物在球后部的沉积,构成了 drusen 形成的早期事件,光感受器变性也继发于此<sup>[21]</sup>。我们选用 CX3CR1 作为反映 MG 含量及位置的检测指标,

并以 CD86、CD206 蛋白分别作为 MG M1/M2 型极化的标记物,通过免疫组化观察到 C57BL/6N 小鼠病灶处明显的 CX3CR1 着染,表明 MG 在局部的浸润;进一步检测发现,与 C57BL/6J 小鼠相比,C57BL/6N 小鼠视网膜 CD86、CD206 等蛋白水平不同程度地升高,与 M1 型极化相关的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子显著升高,提示 MG 在局部的激活以促炎表型的 M1 型极化为主。当前研究也发现,MG 的 M1 型极化或许是眼底退行性病变过程中的关键步骤,对干性 ARMD 病程具有推动作用,所释放的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子造成的炎症环境是导致患者光感受器死亡的重要原因;而在 C57BL/6N 小鼠眼底,则观察到 MG 的总数会随年龄的增长而增加,衰老小鼠表达更高的 CD16/CD32、iNOS 水平,表现出与 M1 促炎转变一致的表型、形态学和基因表达特征等<sup>[3, 22-23]</sup>。

综上,本研究初步观察了 C57BL/6N 小鼠视网膜变性随时间的动态变化,并研究了 MG 在其视网膜的分布和活化规律,为深入研究视网膜退行性疾病和进一步以此为模型开展相关研究提供了基础。关于干性 ARMD,这是一种复杂眼病,是代谢、功能、遗传和环境因素之间复杂的多因素相互作用的结果,发病机制涉及免疫与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、自噬等多种途径<sup>[24-25]</sup>,当前并没有一种动物模型能完整反映人类干性 ARMD 的所有特征,尽管 C57BL/6N 小鼠在眼底表现、形态结构、病理特征等方面与干性 ARMD 有一定一致性,或许可作为干性 ARMD 的实验动物模型,但仍需进一步研究探索其具体机制。

#### 参考文献

[1] Veleri S, Lazar CH, Chang B, et al. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease; insights from mouse models. *Dis Model Mech*, 2015,8(2):109-129.

[2] Chang B, Hawes NL, Hurd RE, et al. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res*, 2002,42(4):517-525.

[3] Aredo B, Zhang KY, Chen X, et al. Differences in the distribution, phenotype and gene expression of subretinal microglia/macrophages in C57BL/6N (Crb1 rd8/rd8) versus C57BL6/J (Crb1 wt/wt) mice. *J Neuroinflammation*, 2015,12:6.

[4] Schnabolk G, Stauffer K, O'Quinn E, et al. A comparative analysis of C57BL/6J and 6N substrains; chemokine/cytokine expression and susceptibility to laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*, 2014,129:18-23.

[5] Yang L, Meng H, Luo D, et al. Inhibition of experimental age-related macular degeneration by ZQMT in mice. *Curr Mol Med*, 2019,19(6):434-442.

[6] Luhmann UF, Robbie SJ, Bainbridge JW, et al. The relevance of chemokine signalling in modulating inherited and age-related retinal degenerations. *Adv Exp Med Biol*, 2014,801:427-433.

[7] 祁玉麟,贾茜钰,叶河江. CX3CR1 及小胶质细胞在视网膜退行性疾病中的研究进展. *国际眼科杂志*, 2021,21(8):1363-1367.

[8] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 2016,173(4):649-665.

[9] 张琼,刘文娟. 小胶质细胞特性及其功能的研究进展. *医学研究生学报*, 2017,30(2):216-219.

[10] Zhou T, Huang ZJ, Sun XW, et al. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Front Neuroanat*, 2017,11:77.

[11] Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res*, 2017,33(2):119-123.

[12] Richert E, Klettner A, von der Burchard C, et al. CRB1<sup>rd8</sup> mutation influences the age-related macular degeneration phenotype of NRF2 knockout mice and favors choroidal neovascularization. *Adv Med Sci*, 2020,65(1):71-77.

[13] Stojic A, Fairless R, Beck SC, et al. Murine autoimmune optic neuritis is not phenotypically altered by the retinal degeneration 8 mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017,58(1):318-328.

[14] Rashid K, Dannhausen K, Langmann T. Testing for known retinal degeneration mutants in mouse strains. *Methods Mol Biol*, 2019,1834:45-58.

[15] Moore BA, Roux MJ, Sebbag L, et al. A population study of common ocular abnormalities in C57BL/6N rd8 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018,59(6):2252-2261.

[16] Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, et al. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012,53(6):2921-2927.

[17] Badia A, Salas A, Duarri A, et al. Transcriptomics analysis of Ccl2/Cx3cr1/Crb1<sup>rd8</sup> deficient mice provides new insights into the pathophysiology of progressive retinal degeneration. *Exp Eye Res*, 2021,203:108424.

[18] Wang SK, Cepko CL. Targeting microglia to treat degenerative eye diseases. *Front Immunol*, 2022,13:843558.

[19] Wang X, Zhao L, Zhang J, et al. Requirement for microglia for the maintenance of synaptic function and integrity in the mature retina. *J Neurosci*, 2016,36(9):2827-2842.

[20] Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina. *Glia*, 2020,68(4):768-796.

[21] Fletcher EL. Contribution of microglia and monocytes to the development and progression of age related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2020,40(2):128-139.

[22] Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in retinal degeneration. *Front Immunol*, 2019,10:1975.

[23] 孟欢,邓婷婷,罗丹,等. 小胶质细胞在年龄相关性黄斑变性中的作用研究进展. *眼科新进展*, 2023,43(2):151-155.

[24] Fabre M, Mateo L, Lamaa D, et al. Recent advances in age-related macular degeneration therapies. *Molecules*, 2022,27(16):5089.

[25] Rubner R, Li KV, Canto-Soler MV. Progress of clinical therapies for dry age-related macular degeneration. *Int J Ophthalmol*, 2022,15(1):157-166.