

Caspase-1 对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞参与视网膜新生血管生成的促进作用及其机制

胡至察,王雨生,徐文芹,张自峰

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81570856)

作者单位:(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介:胡至察,硕士研究生,研究方向:眼内新生血管疾病。

通讯作者:张自峰,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病、眼外伤、小儿眼底病的临床与基础研究。zffmmu@163.com

收稿日期:2018-01-05 修回日期:2018-03-02

Promotion effect and mechanism of Caspase - 1 on microglia in retinal neovascularization in oxygen - induced retinopathy

Zhi-Cha Hu, Yu-Sheng Wang, Wen-Qin Xu, Zi-Feng Zhang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81570856)

Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese People's Liberation Army, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Zi - Feng Zhang. Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese People's Liberation Army, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. zffmmu@163.com

Received:2018-01-05 Accepted:2018-03-02

Abstract

• AIM: To investigate the effect and mechanism of Caspase - 1 on microglia in oxygen - induced retinal neovascularization in mice.

• METHODS: Twelve 7 - day - old (P7) C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, OIR group and OIR+VX-765 group. OIR models were established in OIR group and OIR + VX - 765 group. Caspase - 1 inhibitor VX-765(4mg/kg, dissolved in 0.4% polyethylene glycol) or 0.4% polyethylene glycol, were intraperitoneally injected from P12 to P16 into the mice of OIR+VX-765 and OIR groups, respectively. Whole retinal flatmounts of P17 mice were prepared, and Lectin staining was performed to calculate the ratio of avascular and neovascular area to retina area. The frozen sections of the posterior ocular segment were prepared, and the distribution of Caspase-1 and activated microglial cells were detected by immunofluorescence technique. Cultured BV-2 cells were divided into control group, hypoxia group and inhibitor group. The cells of inhibitor and hypoxia groups were

pre-treated with VX-765 or 0.4% polyethylene glycol for 3h, and then hypoxic incubated for 24h. The expression levels of Caspase - 1, p20 (active form of Caspase - 1), IL-1 β and VEGF were detected by Western blotting. The angiogenesis and migration capacity of cultured RF/6A cells were assessed by endothelial cell tube formation assay and migration assay, after they were incubated with supernatant of those different BV-2 groups.

• RESULTS: The distribution and morphology of retinal blood vessels were normal in P17 mice of the normal group, and avascular and new blood vessel cluster were found in the mice of OIR group and OIR+VX-765 group. The ratio of avascular area was $12.23\% \pm 1.02\%$ and that of the new blood vessel area was $2.16\% \pm 0.52\%$ in the OIR+VX-765 group, which decreased in comparison with $16.58\% \pm 1.14\%$ and $4.00\% \pm 0.41\%$ of the OIR group ($P < 0.01$). Caspase - 1 was rarely detected by immunofluorescence staining in the normal retina of the mice, whereas it was mainly co-located with activated microglial cells in the ganglion cell layer and the inner plexiform layer in the mice of OIR group. The expression of Caspase-1, p20, IL-1 β and VEGF increased in BV-2 cells of the hypoxia group, which were down-regulated by VX-765 ($P < 0.05$), except Caspase-1. The tube length was 271 ± 12 , and the number of migrated cells was 347 ± 34 in RF/6A cells cultured with supernatant of BV-2 cells in the hypoxia group, which significantly decreased to 171 ± 22 and 212 ± 27 with inhibitor of Caspase-1 ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Caspase - 1 promotes retinal neovascularization in the mice with OIR, probably by activating the downstream inflammatory factor IL-1 β in microglial cells and accelerating the release of VEGF.

• KEYWORDS: Caspase - 1; microglia; retinal neovascularization; oxygen - induced retinopathy; retinopathy of prematurity

Citation: Hu ZC, Wang YS, Xu WQ, et al. Promotion effect and mechanism of Caspase-1 on microglia in retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018; 18(4):615-620

摘要

目的:探讨 Caspase-1 对小鼠氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)中小胶质细胞参与视网膜新生血管生成的作用及其机制。

方法:随机将 12 只 7 日龄(P7) C57BL/6J 小鼠分为正常组、OIR 组和 OIR+VX-765 组,正常组在正常氧环境中饲养,其余两组构建 OIR 模型;P12 ~ P16, OIR+VX-765 组和 OIR 组分别每天腹腔注射 Caspase - 1 抑制剂 VX - 765

(4mg/kg)和等量0.4%聚乙二醇(VX-765溶剂);于P17制作视网膜铺片行Lectin染色,比较三组间视网膜无血管区和新生血管区面积的大小;采用免疫荧光染色法观察视网膜组织中Caspase-1的表达和活化小胶质细胞的分布。培养小胶质细胞BV-2细胞分为对照组、缺氧组及抑制剂组,抑制剂组和缺氧组分别经VX-765和0.4%聚乙二醇预处理3h后,缺氧条件下培养24h;对照组常规培养相同时间。通过Western blot检测Caspase-1、p20(Caspase-1活化形式)、IL-1 β 和VEGF的蛋白表达变化;用各组BV-2细胞培养上清液作为条件培养基,刺激培养血管内皮细胞RF/6A,进行管腔形成和细胞迁移实验,并比较各组间的差异。

结果:P17正常组小鼠视网膜血管化完全,未见明显无血管区及视网膜新生血管;OIR组视网膜无血管区和新生血管面积百分比分别为16.58% \pm 1.14%、4.00% \pm 0.41%;OIR+VX-765组两者明显减少,分别为12.23% \pm 1.02%和2.16% \pm 0.52%(P <0.01)。免疫荧光染色结果显示,Caspase-1在正常小鼠视网膜组织中表达较弱,在OIR小鼠中主要在神经节细胞层和内丛状层有明显的阳性表达,并与活化的小胶质细胞有明显的共定位。Western blot检测结果显示,缺氧处理的培养小胶质细胞BV-2中Caspase-1、p20、IL-1 β 和VEGF蛋白表达明显提高,而Caspase-1抑制剂则可明显下调p20、IL-1 β 和VEGF的蛋白表达水平(P <0.05)。管腔形成和细胞迁移实验结果显示,RF/6A细胞经缺氧组BV-2培养上清液处理后,管腔形成长度和细胞迁移数目分别为271 \pm 12和347 \pm 34个,而加入抑制剂后,二者明显减少,分别为171 \pm 22和212 \pm 27个(P <0.05)。

结论:在小鼠OIR中,Caspase-1能够调节小胶质细胞促进视网膜新生血管的生成,其作用机制可能与Caspase-1活化小胶质细胞中其下游炎症效应分子IL-1 β ,并释放VEGF相关。

关键词:Caspase-1;小胶质细胞;视网膜新生血管;氧诱导视网膜病变;早产儿视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.05

引用:胡至察,王雨生,徐文芹,等. Caspase-1对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞参与视网膜新生血管生成的促进作用及其机制. 国际眼科杂志2018;18(4):615-620

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是一种发生于早产儿、低出生体重儿的视网膜新生血管性疾病,现已成为世界范围内首位的儿童致盲性眼病^[1-2]。小胶质细胞作为视网膜组织中定居的单核巨噬细胞,在视网膜血管发育及新生血管的发生发展中发挥着重要作用。本研究组及相关研究均发现,作为ROP的重要危险因素之一,炎症能够通过激活小胶质细胞促进视网膜新生血管的生成^[3-5]。Caspase-1为一种半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶,是炎症信号转导通路中的重要一环^[6-7],它可通过其下游分子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)参与视网膜新生血管类疾病的病理过程^[8-10]。但小胶质细胞是否通过Caspase-1参与ROP等疾病中视网膜新生血管的生成与调控,目前尚不清楚。本研究通过观

察Caspase-1在小鼠氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)视网膜小胶质细胞中的表达变化情况,以及体内、体外不同条件下Caspase-1对视网膜新生血管生成的影响,探讨Caspase-1在小胶质细胞参与视网膜新生血管生成中的调节作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和动物 小鼠小胶质细胞系BV-2和猕猴视网膜/脉络膜血管内皮细胞系RF/6A均购自中国科学院细胞库。新生SPF级C57BL/6J小鼠12只,由第四军医大学实验动物中心提供,饲养温度24 \pm 3 $^{\circ}$ C,环境湿度60% \pm 4%,光照周期明/暗12h/12h。实验动物的使用和饲养符合国家科学技术部发布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 罗丹明标记的蓖麻子凝集素Lectin(美国Vector公司);兔抗小鼠Iba-1一抗(日本Wako公司);兔抗小鼠Caspase-1、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、IL-1 β 一抗(英国Abcam公司);鼠抗小鼠Caspase-1一抗(美国Santa公司);Alex594/Cy3标记的山羊抗小鼠IgG二抗、Alex488/FITC标记的山羊抗兔IgG二抗(北京康为世纪公司);Caspase-1抑制剂VX-765(美国Selleck公司);DMEM培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(杭州四季青公司)。DAPI试剂盒、Matrigel胶(美国BD公司);96孔板、Transwell 24孔板(美国Corning公司)。FSX100荧光显微镜(日本Olympus公司);ECLIPSE Ti型激光扫描共聚焦显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及OIR模型的建立 新生小鼠3窝,每窝任取4只,共12只,按随机数字表法分为正常组、OIR组和OIR+VX-765组。OIR组和OIR+VX-765组小鼠于出生后第7d(P7)与母鼠一起置于(75 \pm 2)%的高氧氧箱中饲养5d以建立OIR模型,于P12返回正常氧环境中饲养^[11]。OIR+VX-765组和OIR组于P12~P16每天分别腹腔内注射Caspase-1抑制剂VX-765(4mg/kg)和等量0.4%聚乙二醇(VX-765溶剂)。正常组小鼠始终在正常氧环境中饲养。

1.2.2 细胞培养及分组 BV-2细胞和RF/6A细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中常规培养。取对数生长期状态良好的BV-2细胞分为对照组、缺氧组和抑制剂组。抑制剂组和缺氧组分别加入VX-765(10 μ mol/L)和等量0.4%聚乙二醇(VX-765溶剂),3h后更换为常规培养基,缺氧组和抑制剂组在缺氧培养箱(1%O₂+5%CO₂+94%N₂)中培养24h,对照组在常规条件下培养相同时间。

1.2.3 小鼠视网膜铺片 正常组、OIR组和OIR+VX-765组三组小鼠于P17腹腔内注射1%戊巴比妥钠全身麻醉后,经左心室依次灌注1%PBS及4%多聚甲醛。摘取右侧眼球,将视网膜与外层巩膜、脉络膜钝性分离,经含1%Triton X-100的1%牛血清白蛋白封闭液4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤后,置于1%Lectin避光孵育12h。PBS洗3次,经4个经线将视网膜剪成大小相当的4瓣,内层向上铺片,50%的甘油封片。荧光显微镜下观察拍照。将视网膜局部荧光图像采用Photoshop CS3软件融合重建,得到完整的视网膜铺片图。参照文献^[12-13]的方法,计算无血管区和新生血管区占全视网膜面积的百分比。

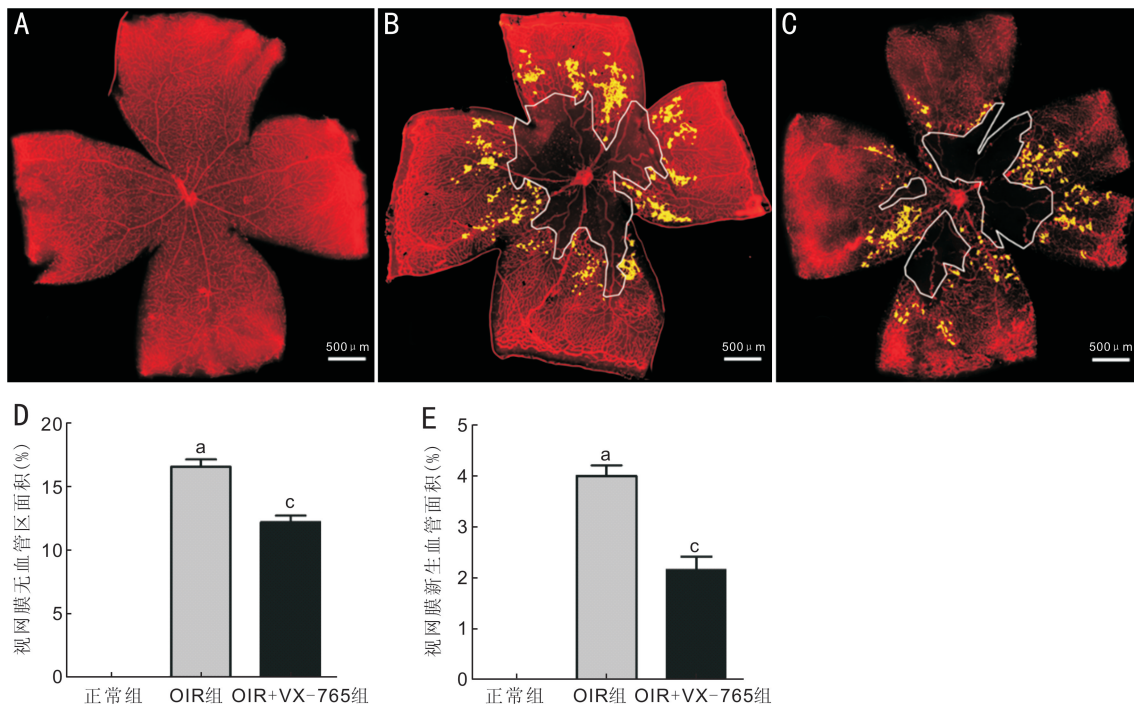


图1 各组小鼠P17视网膜铺片Lectin染色结果图($\times 100$) A:正常组小鼠视网膜血管呈红色荧光,从后极部到周边部视网膜均匀分布,走行良好;B:OIR组小鼠视网膜血管迂曲明显,分布不均,后极部存在大片无血管区(白色线条环绕区域),中周部可见大量视网膜新生血管簇(黄色标记);C:OIR+VX-765组小鼠视网膜血管走行不均,后极部无血管区(白色线条环绕区域)及中周部视网膜新生血管簇(黄色标记)面积均小于OIR组;D:三组小鼠P17视网膜无血管区面积百分比统计对比图;E:三组小鼠P17视网膜新生血管面积百分比统计对比图。 $P < 0.05$ vs 正常组, $^a P < 0.05$ vs OIR组; $n = 4$ 。

1.2.4 小鼠视网膜组织冰冻切片的制作 分别取正常组和OIR组小鼠各4只,于P17按上述方法全身麻醉、灌注,摘取左侧眼球,去除角膜、晶状体,依次置于20%和30%蔗糖溶液中梯度脱水后,制备厚度8mm冰冻切片, -20°C 保存。

1.2.5 免疫荧光染色法检测Caspase-1的表达和活化小胶质细胞的分布 取1.2.4制备的冰冻切片,室温下干燥1h,PBS洗涤,用含1% Triton X-100的3%牛血清白蛋白溶液室温封闭2h。分别滴加鼠抗小鼠Caspase-1一抗(1:100)、兔抗小鼠Iba-1一抗(1:500), 4°C 孵育过夜,然后滴加相应二抗室温避光孵育2h。PBS洗3次,DAPI(1:1000)染色10min,PBS洗涤后50%甘油封片。激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot法检测Caspase-1、p20、IL-1 β 、VEGF的表达 分别收取对照组、缺氧组和抑制剂组BV-2细胞,提取总蛋白后,行SDS-PAGE电泳,转膜后于5%脱脂奶粉中封闭1h,加入相应抗体行免疫杂交,化学法发光、扫描和成像。采用Image J软件行灰度分析,内参为 β -actin。

1.2.7 血管内皮细胞管腔形成实验 取对数生长期生长状态良好的RF/6A细胞悬液,接种于Matrigel胶处理的96孔板,1.8 $\times 10^4$ 个/孔。分别设立正常对照组、常规条件培养基(conditioned medium,CM)组、缺氧CM组和抑制剂CM组。常规CM组、缺氧CM组、抑制剂CM组分别加入1.2.2中对照组、缺氧组和抑制剂组BV-2细胞培养上清液(50 μL /孔)及含胎牛血清DMEM培养基(50 μL /孔);正常对照组加入含胎牛血清DMEM培养基(100 μL /孔)。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱常规孵育6h后观察管腔形成情况,FSX100显微镜下观察、拍照并使用Image-Pro Plus软件测量管腔形成长度。以正常对照组完整管腔相对长度为100,各处理组完整管腔长度分别与正常对照组相比进行标准化,以完

整管腔相对长度表示RF/6A细胞的管腔形成能力。

1.2.8 血管内皮细胞迁移情况 RF/6A细胞接种于Transwell上室(1.5 $\times 10^4$ 个/孔),细胞分组及各组下室中加入的条件培养基种类(500 μL /孔)同1.2.7管腔形成实验。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育24h后取出Transwell小室,4%多聚甲醛固定10min,1%结晶紫染色10min,PBS清洗3次后,FSX100显微镜下观察并随机选择3个视野($\times 500$)拍照、计数迁移细胞数目。

统计学分析:采用SPSS 20.0进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经W检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数的比较采用独立样本t检验,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,组间比较均采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caspase-1对OIR小鼠视网膜无血管区和新生血管的影响 小鼠视网膜铺片Lectin染色结果显示,正常组P17小鼠视网膜血管化基本完成,血管发育良好,分布均匀,未见明显视网膜无血管区及新生血管(图1A);OIR组和OIR+VX-765组P17小鼠视网膜血管迂曲,分布不均,以前者更为明显(图1B、C),两组视网膜血管化不完全,后极部均可见无血管区,无血管区面积百分比分别为16.58% \pm 1.14%和12.23% \pm 1.02%,OIR+VX-765组较OIR组无血管区面积减小,差异有统计学意义($t = 5.681, P < 0.01$;图1D)。OIR组和OIR+VX-765组P17小鼠中周部视网膜可见散在分布的视网膜新生血管簇(图1B、C),新生血管面积百分比分别为4.00% \pm 0.41%和2.16% \pm 0.52%,后者较前者减少,差异有统计学意义($t = 5.557, P < 0.01$;图1E)。视网膜铺片结果提示,抑制Caspase-1活性后,可明显减小OIR小鼠视网膜无血管区的面积及并减少视网膜新生血管的形成。

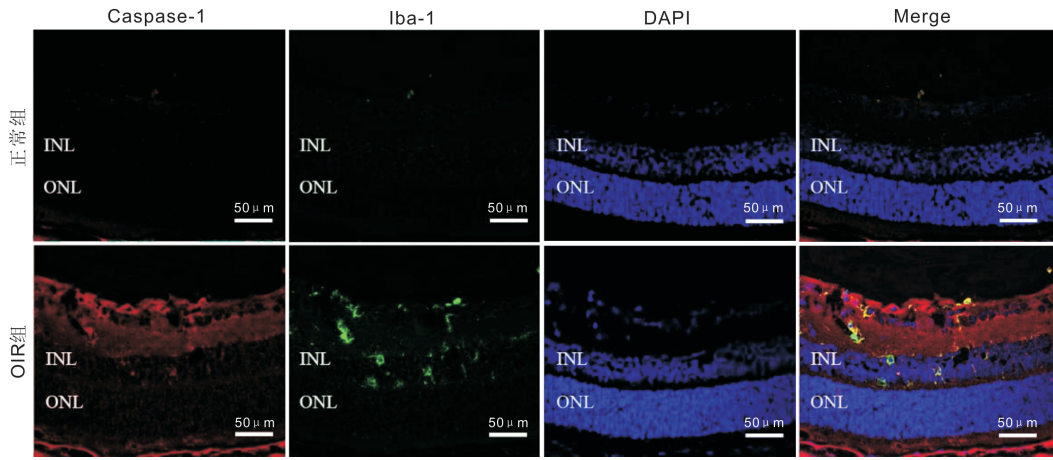


图2 P17小鼠视网膜组织 Caspase-1、Iba-1 免疫荧光染色结果图(×400) 正常组: Caspase-1 无明显阳性表达, Iba-1 染色阳性的活化小胶质细胞在神经节细胞层和神经纤维层少量散在分布, 呈绿色荧光; OIR 组: Caspase-1 的表达明显增多, 呈红色荧光, 活化小胶质细胞数量也显著增多, 且 Caspase-1 与活化小胶质细胞有较明确的共染现象。红色荧光: Caspase-1; 绿色荧光: Iba-1 显示活化的小胶质细胞; 蓝色荧光: DAPI 显示细胞核; INL: 内核层; ONL: 外核层。

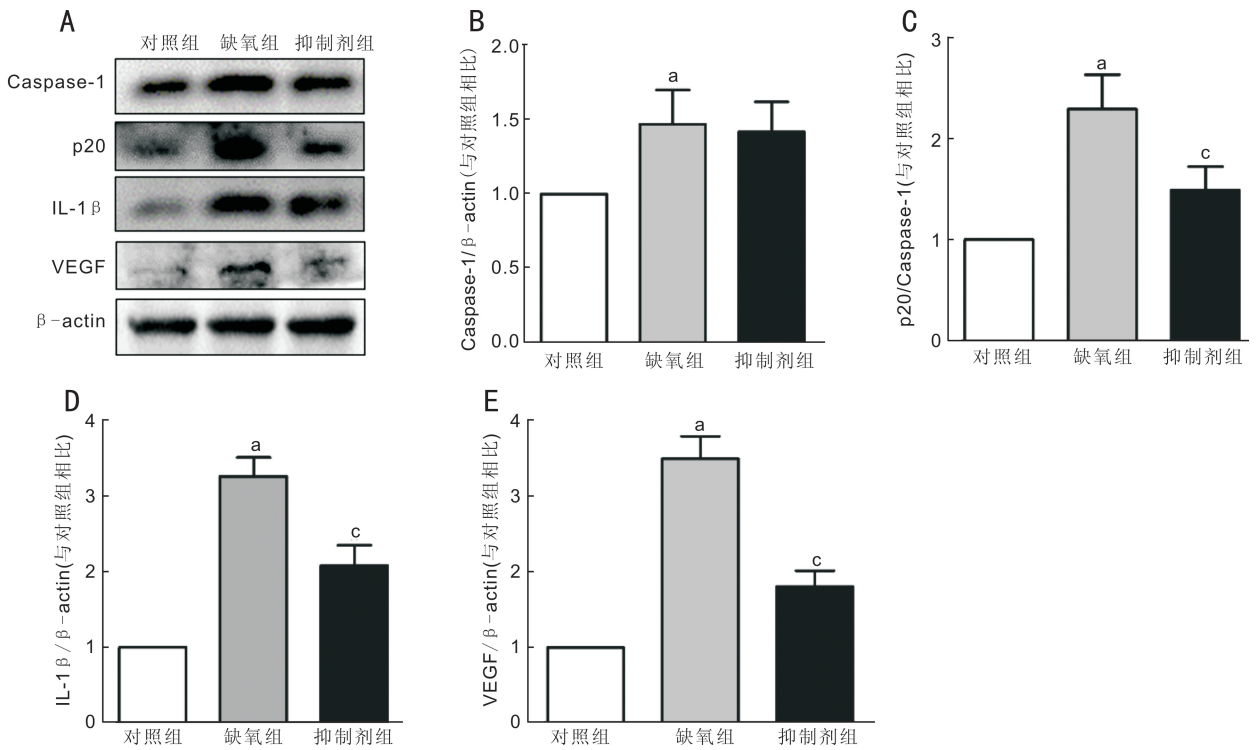


图3 Western blot 检测 BV-2 细胞中 Caspase-1 及相关细胞因子的表达变化 A: 各组蛋白表达的 Western blot 结果图; B: Caspase-1 在不同处理组 BV-2 细胞中的表达情况; C: p20 在不同处理组 BV-2 细胞中的表达情况; D: IL-1 β 在不同处理组 BV-2 细胞中的表达情况; E: VEGF 在不同处理组 BV-2 细胞中的表达情况。^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 缺氧组; $n = 3$ 。

2.2 小鼠视网膜组织中 Caspase-1 的表达和活化小胶质细胞的分布 P17 小鼠视网膜组织免疫荧光染色结果显示, 正常组小鼠视网膜中 Caspase-1 荧光信号较弱, 无明显阳性表达; Iba-1 染色阳性的活化小胶质细胞数量很少, 仅在视网膜神经节细胞层和神经纤维层少量散在分布。OIR 组小鼠视网膜组织中, Caspase-1 荧光信号较正常组显著增强, 主要集中在视网膜神经节细胞层和内丛状层, 内核层也有散在分布; Iba-1 标记的活化小胶质细胞数量较正常组明显增多, 主要集中在神经节细胞层、内丛状层和内核层。融合后的图像显示, Caspase-1 与活化的小胶质细胞有明显的共定位表达(图2)。

2.3 小胶质细胞 BV-2 中 Caspase-1、p20、IL-1 β 和 VEGF 的表达情况 Western blot 法检测经不同条件处理

的 BV-2 细胞中 Caspase-1、p20 (Caspase-1 活性形式)、IL-1 β 和 VEGF 的表达(图3A)。经灰度扫描, 与 β -actin 对比进行量化(p20 与 Caspase-1 对比), 将各处理组 BV-2 细胞中四种蛋白的表达量分别与对照组相比进行标准化后, 缺氧组 Caspase-1、p20、IL-1 β 及 VEGF 的表达水平分别为 1.47 ± 0.24 、 2.29 ± 0.34 、 3.26 ± 0.25 和 3.51 ± 0.30 , 抑制剂组四种蛋白表达水平分别为 1.42 ± 0.21 、 1.49 ± 0.23 、 2.08 ± 0.27 和 1.81 ± 0.21 (图3B~E)。四种蛋白在各组间总体比较, 差异有统计学意义($F = 6.455, P < 0.05$; $F = 22.65, P < 0.01$; $F = 84.93, P < 0.0001$; $F = 109.2, P < 0.0001$)。缺氧组 Caspase-1、p20、IL-1 β 以及 VEGF 蛋白水平较对照组明显升高($t = 3.271, P < 0.05$; $t = 6.666, P < 0.05$; $t = 13.03, P < 0.05$; $t = 14.48, P < 0.05$)。与缺氧组相

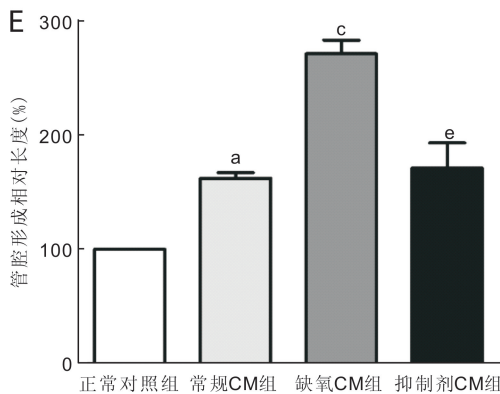
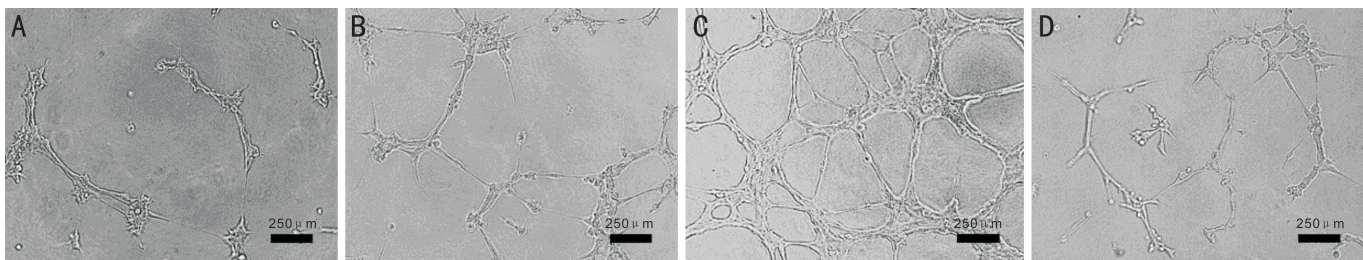


图4 血管内皮细胞 RF/6A 管腔形成实验 ($\times 400$) A: 正常对照组; B: 常规 CM 组; C: 缺氧 CM 组; D: 抑制剂 CM 组; E: 不同条件小胶质细胞培养基处理的 RF/6A 细胞管腔形成相对长度统计对比图。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 常规 CM 组; ^e $P < 0.05$ vs 缺氧 CM 组; $n = 3$ 。

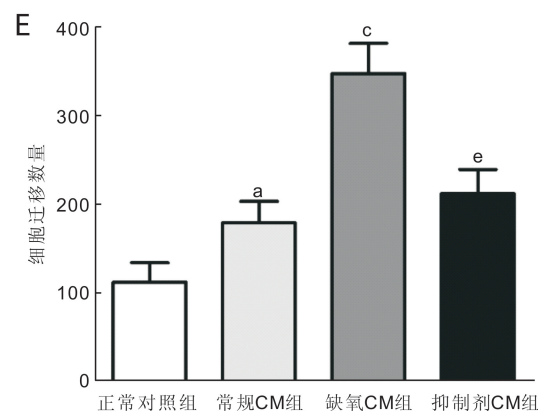
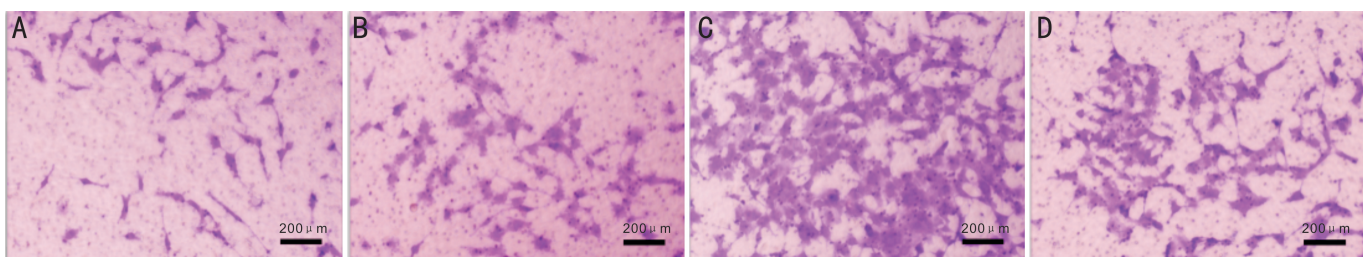


图5 血管内皮细胞 RF/6A 迁移实验结果 ($\times 500$) A: 正常对照组; B: 常规 CM 组; C: 缺氧 CM 组; D: 抑制剂 CM 组; E: 不同条件小胶质细胞培养基处理的 RF/6A 细胞迁移数统计对比图。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 常规 CM 组; ^e $P < 0.05$ vs 缺氧 CM 组; $n = 3$ 。

比,抑制剂组四种蛋白中,除 Caspase-1 外,表达水平均显著降低 ($t = 0.3480, P > 0.05$; $t = 4.134, P < 0.05$; $t = 6.803, P < 0.05$; $t = 9.790, P < 0.05$)。

2.4 小胶质细胞条件培养基对血管内皮细胞管腔形成的影响 RF/6A 细胞经不同条件处理的小胶质细胞 BV-2 培养上清液孵育 6h 后,正常对照组细胞管腔形成较少(图 4A),完整管腔形成相对长度为 100;常规 CM 组管腔形成增多(图 4B),相对长度为 162 ± 5 ($t = 5.943, P < 0.05$);缺氧 CM 组管腔形成明显增多(图 4C),相对长度为 271 ± 12 ($t = 10.45, P < 0.05$);而抑制剂 CM 组则较缺氧 CM 组明显减少(图 4D),相对长度为 171 ± 22 ($t = 9.586,$

$P < 0.05$)。四组间总体比较,差异有统计学意义 ($F = 92.02, P < 0.0001$;图 4E)。结果提示,缺氧处理后的小胶质细胞可显著促进血管内皮细胞 RF/6A 管腔形成,而 Caspase-1 被抑制后则可减弱小胶质细胞的这种能力。

2.5 小胶质细胞条件培养基对血管内皮细胞迁移的影响 培养血管内皮细胞 RF/6A 于 Transwell 小室,经不同培养条件小胶质细胞 BV-2 上清液处理后,细胞迁移数量明显不同(图 5A ~ D)。正常对照组、常规 CM 组、缺氧 CM 组和抑制剂 CM 组迁移细胞数目分别为 112 ± 22 、 179 ± 24 、 347 ± 34 和 212 ± 27 个,各组间总体比较,差异有统计学意义 ($F = 39.81, P < 0.0001$)。常规 CM 组内皮细胞迁移数

较正常对照组明显增多($t=3.024, P<0.05$);缺氧CM组迁移数较常规CM组显著增多($t=7.583, P<0.05$);而抑制剂CM组内皮细胞迁移数则较缺氧CM组明显减少($t=6.093, P<0.05$,图5E)。结果表明,缺氧处理后的小胶质细胞可明显促进血管内皮细胞RF/6A的迁移能力,而抑制Caspase-1后则可减弱小胶质细胞的这种促进效能。

3 讨论

临床和基础研究均表明,除早产、低出生体质量和不规范吸氧外,炎症也是ROP发生的重要危险因素^[3]。在OIR动物模型中,炎症不仅能阻碍视网膜血管化的进程,并能加重类似ROP的视网膜无血管区及视网膜新生血管^[14]。Tremblay等^[4]认为,炎症可介导视网膜小胶质细胞参与这一过程,并干预视网膜血管发育进程。本课题组前期研究也证实,Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)及其下游的炎症信号通路能够激活小胶质细胞,并促进视网膜新生血管的生成^[5]。Caspase-1是这一炎症信号通路中的核心分子之一,生物信息学研究结果也显示Caspase-1在OIR视网膜组织中转录水平增高^[15]。因此,Caspase-1介导的炎症信号通路可能通过小胶质细胞在OIR中发挥重要作用。

首先,我们建立了小鼠OIR动物模型。视网膜铺片结果显示,OIR小鼠P17视网膜血管化不完全,后极部存在大片无血管区,中周部可见大量视网膜新生血管簇,而Caspase-1抑制剂VX-765能够明显减少视网膜无血管区面积和新生血管数量,从而减轻OIR的视网膜损害。提示Caspase-1参与了小鼠OIR的病变过程,并与视网膜新生血管的生成密切相关。免疫荧光检测发现,Caspase-1在正常小鼠视网膜组织中的表达量很低,而在OIR小鼠视网膜中表达明显增高,并主要高表达于活化的小胶质细胞,提示Caspase-1可能通过小胶质细胞参与并加重OIR病变。

小胶质细胞在视网膜新生血管的生成中扮演着重要的角色。本课题组前期研究表明,活化的小胶质细胞主要集中于视网膜新生血管部位,抑制小胶质细胞能明显减少新生血管面积,提示活化的小胶质细胞与视网膜新生血管的生成密切相关^[16-17]。Rivera等^[10]发现,在大鼠OIR模型视网膜中Caspase-1转录水平升高,其下游分子IL-1 β 主要由活化的小胶质细胞分泌,这不仅可以损伤血管内皮细胞,还对维持小胶质细胞的活化起到关键作用。也有报道称,抑制Caspase-1能够抑制小胶质细胞的活化^[18];而使用小胶质细胞抑制剂米诺环素能够显著降低Caspase-1活性^[19]。因此,Caspase-1可能通过调节小胶质细胞的活性参与视网膜新生血管的生成,从而参与OIR的发生与发展。

为此,我们进一步通过体外实验观察Caspase-1在小胶质细胞调控新生血管生成中的作用。Western blot检测结果显示,缺氧处理的小胶质细胞中Caspase-1、p20、IL-1 β 以及VEGF的表达水平均有显著升高;而Caspase-1抑制剂则会明显抑制Caspase-1活性形式p20、效应炎性分子IL-1 β 以及血管生成直接相关因子VEGF^[20]的升高,提示Caspase-1是OIR中重要的炎症效应分子,可能有一定的血管生成调节作用。推测抑制Caspase-1能阻断IL-1 β 的合成与分泌,低水平的IL-1 β 不足以维持小胶质细胞的活化,引起VEGF的水平降低。而在血管内皮细胞RF/6A管腔形成实验和细胞迁移实验中也观察到缺氧处理的小胶质细胞能够显著促进内皮细胞的管腔形成能力

和迁移能力,而Caspase-1活性受抑制后则会明显减弱小胶质细胞的这种调控能力。

综上所述,Caspase-1可能通过激活相关的炎症反应过程,调控小胶质细胞参与视网膜新生血管的生成,从而在OIR病变过程中发挥作用,而其中具体的分子机制及信号转导均有待进一步研究探讨。

参考文献

- 1 Chan-Ling T, Gole GA, Quinn GE, et al. Pathophysiology, screening and treatment of ROP: A multi-disciplinary perspective. *Prog Retin Eye Res* 2018;62:77-119
- 2 Cayabyab R, Ramanathan R. Retinopathy of prematurity: therapeutic strategies based on pathophysiology. *Neonatology* 2016; 109 (4): 369-376
- 3 Lee J, Dammann O. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17(1):26-29
- 4 Tremblay S, Miloudi K, Chaychi S, et al. Systemic inflammation perturbs developmental retinal angiogenesis and neuroretinal function perinatal sepsis provokes developmental retinal vascular anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(13):8125-8139
- 5 徐文芹,尹婕,王雨生. Toll样受体4对氧诱导视网膜新生血管发生的促进作用及其机制. *中华实验眼科杂志* 2016;34(4):317-323
- 6 Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol* 2016; 100(5): 961-967
- 7 Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, et al. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immun* 2014;20(2):115-125
- 8 Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1 β in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(11):4161-4166
- 9 Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2004;88(10):1343-1347
- 10 Rivera JC, Sitaras N, Noueihed B, et al. Microglia and interleukin-1 β in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):1881-1891
- 11 Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(3):576-585
- 12 Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* 2009;4(11):1565-1573
- 13 杨湘敏,李蓉,王雨生,等. 早产对大鼠视网膜血管形态发育的影响. *中华眼科杂志* 2013;49(8):729-735
- 14 Hong HK, Lee HJ, Ko JH, et al. Neonatal systemic inflammation in rats alters retinal vessel development and simulates pathologic features of retinopathy of prematurity. *J Neuroinflammation* 2014;11(1):87
- 15 Stahl A, Connor KM, Sapienza P, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(6):2813-2826
- 16 Yin J, Xu WQ, Ye MX, et al. Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2017; 21(12):3467-3480
- 17 Xu W, Yin J, Sun L, et al. Impact of minocycline on vascularization and visual function in an immature mouse model of ischemic retinopathy. *Sci Rep* 2017;7(1):7535
- 18 Pan Y, Shen B, Gao Q, et al. Caspase-1 inhibition attenuates activation of BV2 microglia induced by LPS-treated RAW264.7 macrophages. *J Biomed Res* 2016;30(3):225-233
- 19 Vincent JA, Mohr S. Inhibition of caspase-1/interleukin-1 β signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 2007;56(1):224-230
- 20 Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006;443(7114):993-997