

胞葬作用调控巨噬细胞极化影响高铁环境下眼表炎症发生

郑景怡, 孟霞, 王智, 夏金丹, 谢安琪, 费志刚, 肖启国

引用: 郑景怡, 孟霞, 王智, 等. 胞葬作用调控巨噬细胞极化影响高铁环境下眼表炎症发生. 国际眼科杂志 2022; 22 (7): 1085-1091

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No.2022JJ30522); 湖南省卫生健康委科研立项课题 (No.202107020686)

作者单位: (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科

作者简介: 郑景怡, 毕业于南华大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 角膜与眼表疾病。

通讯作者: 肖启国, 毕业于中南大学, 博士, 主任医师, 研究方向: 角膜与眼表疾病. nhf2xiaoqiguo@163.com

收稿日期: 2021-07-29 修回日期: 2022-06-14

摘要

目的: 探究胞葬作用是否通过调控巨噬细胞极化影响高铁环境下眼表炎症发生。

方法: 选取 6~8 周龄健康 C57BL/6 雄性小鼠 50 只随机分为正常对照组、单纯铁剂组、抑制剂组、增强剂组及溶剂对照组, 每组 10 只。正常对照组腹腔注射生理盐水 0.2mL, 其它组均腹腔注射 50mg/mL 右旋糖酐铁 0.2mL, 每 3d 注药 1 次; 第 14d 起抑制剂组、增强剂组及溶剂对照组每天分别增加 1 次腹腔注射同体积 (0.2mL) 50mg/kg XMD8-92、10mg/kg 辛伐他汀和 50% DMSO 溶剂。于注药后第 7、14、28d 裂隙灯下观察各组小鼠眼前节情况, 进行眼表炎症指数评估及角膜荧光素染色评分; 28d 后取角膜、结膜及泪腺组织进行 HE 染色、免疫荧光染色, 并采用 RT-PCR 检测巨噬细胞极化相关指标 (CD86、CD206、iNOS、Arg-1); Western blot 检测胞葬作用相关信号因子 (Gas6、MerTK) 的表达; ELISA 检测炎症因子 (IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9) 的表达。

结果: 注药 28d, 与正常对照组比较, 单纯铁剂组及溶剂对照组眼表炎症指数及角膜荧光素染色评分增加; HE 染色显示角膜上皮欠完整, 结膜杯状细胞减少, 泪腺结构欠清晰且细胞排列相对杂乱; 各组织中 CD86、iNOS 等 M1 型巨噬细胞标志物表达上调, CD206、Arg-1 等 M2 型巨噬细胞标志物表达下调, IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子表达上调 (均 $P<0.05$)。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较, 抑制剂组小鼠眼表炎症指数及角膜荧光素染色评分进一步增长; HE 染色显示角膜上皮脱落明显, 结膜杯状细胞进一步减少甚至消失, 泪腺结构紊乱且细胞排列杂乱不规则; 各组织中 Gas6、MerTK 等胞葬作用相关信号因子表达下调 (均 $P<0.05$), CD86、iNOS 等 M1 型巨噬细胞标志物及 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子表达进一步上调 (均 $P<0.05$); 而增强剂组小鼠眼表炎症指数及角膜荧光素染色评分下降, HE 染色显示角膜上皮完整, 结膜杯状细胞增多, 泪腺结构形态改善; 各组织中 Gas6、MerTK 等

胞葬作用相关信号因子表达上调 (均 $P<0.05$), 且 CD206、Arg-1 等 M2 型巨噬细胞标志物表达上调, IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子表达下调 (均 $P<0.05$)。

结论: 高铁环境诱导巨噬细胞向 M1 型定向极化, 加重眼表炎症反应及组织损伤, 胞葬作用可调控巨噬细胞极化影响高铁环境下眼表炎症反应的发生。

关键词: 眼表; 炎症; 胞葬作用; 巨噬细胞极化; 高铁环境

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.7.04

Efferocytosis impacts ocular surface inflammation in high-iron environment by regulating macrophage polarization

Jing-Yi Zheng, Xia Meng, Zhi Wang, Jin-Dan Xia, An-Qi Xie, Zhi-Gang Fei, Qi-Guo Xiao

Foundation items: The Natural Science Foundation of Hunan Province (No.2022JJ30522); Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (No.202107020686)

Department of Ophthalmology, the Second Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Qi-Guo Xiao. Department of Ophthalmology, the Second Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. nhf2xiaoqiguo@163.com

Received: 2021-07-29 Accepted: 2022-06-14

Abstract

• AIM: To explore whether efferocytosis impacts ocular surface inflammation in high-iron environment by regulating macrophage polarization.

• METHODS: A total of 50 healthy C57BL/6 male mice aged 6-8wk were randomly divided into normal control group, iron group, inhibitor group, enhancer group and solvent control group, with 10 mice in each group. The normal control group was injected intraperitoneally with 0.2mL of normal saline, and the other groups were injected intraperitoneally with 50mg/mL iron dextran of 0.2mL, once every 3d. From the 14d, the inhibitor group, the enhancer group and the solvent control group were injected intraperitoneally with the same volume (0.2mL) 50mg/kg XMD8-92, 10mg/kg simvastatin and 50% DMSO solvent once a day, respectively. The anterior segment of the eyes was observed under slit lamp microscope on the 7, 14, 28d after intraperitoneal injection, and the ocular surface inflammation index and corneal fluorescein staining score were evaluated. The cornea, conjunctiva and lacrimal gland tissues were taken at 28d for the HE

staining and immunofluorescence staining, and RT-PCR were used to detect the expression of macrophage polarization related indexes (CD86, CD206, iNOS, Arg-1); Western blot were used to detect the expression of efferocytosis related signal factors (Gas6, MerTK); ELISA was used to detect the expression of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , MMP-9).

• **RESULTS:** After injection for 28d, compared with the normal control group, the ocular surface inflammatory index and corneal fluorescein staining score were increased in the iron group and the solvent control group. HE staining showed incomplete corneal epithelium, reduced conjunctival goblet cells, unclear lacrimal gland structure and relatively disordered arrangement of cells. In all tissues, the expressions of polarization related indexes of M1 macrophages such as CD86 and iNOS were up-regulated, while those of M2 macrophages such as CD206 and Arg-1 were down-regulated, and the expressions of inflammatory factors such as IL-1 β , TNF- α and MMP-9 were up-regulated (all $P < 0.05$). Compared with the iron group and the solvent control group, the ocular surface inflammation index and corneal fluorescein staining score of the inhibitor group were further increased. HE staining showed obvious exfoliation of corneal epithelium, further decrease or even disappearance of conjunctival goblet cells, disorder of lacrimal gland structure and irregular arrangement of cells. In all tissues, the expression of signal factors related to efferocytosis such as Gas6 and MerTK was down-regulated (all $P < 0.05$), the expression of polarization related indexes of M1 macrophages such as CD86 and iNOS and the expression of inflammatory factors such as IL-1 β , TNF- α and MMP-9 were further up-regulated (all $P < 0.05$). But the ocular surface inflammation index and corneal fluorescein staining score decreased in the enhancer group. HE staining showed the integrity of corneal epithelial, the increase of conjunctival goblet cells and the improvement of lacrimal gland structure and morphology. In all tissues, the expression of signal factors related to efferocytosis such as Gas6 and MerTK was up-regulated (all $P < 0.05$), and the expression of polarization related indexes of M2 macrophages such as CD206 and Arg-1 was up-regulated, while the expression of inflammatory factors such as IL-1 β , TNF- α and MMP-9 was down-regulated (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** High-iron environment induces macrophages polarize to M1, which aggravates ocular surface inflammation and tissue damage. Efferocytosis by regulating the polarization of macrophages impact the occurrence of ocular surface inflammation in high-iron environment.

• **KEYWORDS:** ocular surface; inflammation; efferocytosis; macrophage polarization; high-iron environment

Citation: Zheng JY, Meng X, Wang Z, et al. Efferocytosis impacts ocular surface inflammation in high-iron environment by regulating macrophage polarization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(7):1085-1091

0 引言

眼表慢性炎症是干眼、特应性角结膜炎、瘢痕性类天疱疮、Stevens-Johnson 综合征和眼表化学伤等诸多非感染性眼表疾病的共同病理特征及核心发病机制。长期眼表慢性炎症不仅破坏角膜的屏障功能,促进眼表上皮细胞凋亡,进而发展为角膜上皮结膜化、眼表新生血管或鳞状上皮化生,同时也是导致眼部刺激症状并造成视功能障碍的主要原因,因此阐明这类疾病的炎症发生机制及调控因素具有重要的临床意义。

胞葬作用是指吞噬细胞(主要是巨噬细胞)吞噬并清除凋亡细胞的过程。巨噬细胞作为体内细胞因子的主要来源,成功清除凋亡细胞可以减弱炎症因子的表达,诱导巨噬细胞向抑制炎症反应的 M2 型极化^[1]。铁代谢异常将导致组织多种病变的发生^[2-3],本课题组前期研究发现眼表铁过载可能加重眼表炎症及组织损伤,本研究通过腹腔注射右旋糖酐铁建立高铁小鼠模型,继而分别使用 XMD8-92 抑制和辛伐他汀增强巨噬细胞胞葬作用,探讨高铁环境下眼表炎症的发生机制,明确胞葬作用是否通过调控巨噬细胞极化参与眼表炎症发生。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 选取 50 只 6~8 周龄健康 C57BL/6 雄性小鼠,体质量 20 ± 2 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,均在裂隙灯下排除眼表疾病。所有实验小鼠均饲养于南华大学动物实验中心。本研究通过南华大学医学伦理委员会批准。

1.1.2 **主要仪器及试剂** 裂隙灯(卡尔蔡司有限公司),右旋糖酐铁(上海麦克林生化科技有限公司),XMD8-92 原粉、辛伐他汀原粉(Apexbio 公司),CD86、CD206、生长停滞特异性基因 6(growth arrest specific gene 6, Gas6)、Mer 酪氨酸激酶(Mer tyrosine kinase, MerTK)多克隆抗体(Abcam 公司),逆转录试剂盒(北京康为世纪),IgG 抗体-HRP 多聚体、 β -actin(Proteintech 公司),白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein 9, MMP-9)ELISA 试剂盒(Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 **动物模型建立及分组** 采用随机数字表法将实验动物分为 5 组,每组 10 只。正常对照组,腹腔注射生理盐水 0.2mL,每 3d 注药 1 次;单纯铁剂组,腹腔注射 50mg/mL 右旋糖酐铁 0.2mL,每 3d 注药 1 次;抑制剂组,腹腔注射 50mg/mL 右旋糖酐铁 0.2mL,每 3d 注药 1 次,第 14d 起每天增加 1 次腹腔注射 50mg/kg XMD8-92(注射前 0.5h 将 XMD8-92 按小鼠体质量比例溶于 50% DMSO)0.2mL;增强剂组,腹腔注射 50mg/mL 右旋糖酐铁 0.2mL,每 3d 注药 1 次,第 14d 起每天增加 1 次腹腔注射 10mg/kg 辛伐他汀(注射前 0.5h 将辛伐他汀按小鼠体质量比例溶于 50% DMSO)0.2mL;溶剂对照组,腹腔注射 50mg/mL 右旋糖酐铁 0.2mL,每 3d 注药 1 次,第 14d 起每天增加 1 次腹腔注射 50% DMSO 溶剂 0.2mL。

1.2.2 **各组小鼠相关观察及检测指标** 分别于注药后第 7、14、28d 同一时间点(7p.m.)在裂隙灯下观察各组小鼠眼前节情况并对右眼进行拍照,并参照文献方法进行眼表炎症指数评估^[4]及角膜荧光素染色评分^[5];注药 28d 后,

所有实验小鼠处死后在显微镜下迅速摘取右侧完整眼球(带结膜及眶周皮肤)和泪腺组织,0.9%生理盐水冲洗去除眼球壁血迹及毛发,各组分别选取3只小鼠的右侧完整眼球和泪腺组织迅速置于4%多聚甲醛溶液中,4℃保存,用于HE染色及免疫荧光染色等相关检测;各组其余完整眼球在显微镜下进行角膜、结膜分离,与泪腺组织分别置于对应EP管,-80℃保存,用于RT-PCR、Western blot、ELISA等相关检测。

1.2.3 HE染色及免疫荧光染色 将完整眼球及泪腺组织固定、包埋、切片。常规HE染色,封片后显微镜下观察。免疫荧光染色滴加稀释比例为1:50的CD86、CD206多克隆抗体过夜孵育,洗涤复温后滴加荧光标记二抗孵育,复染封片后荧光显微镜下观察(其中绿色为阳性信号,蓝色为DAPI核染信号)。

1.2.4 RT-PCR检测 采用Trizol试剂分别提取各组小鼠角膜、结膜及泪腺组织总RNA,逆转录合成cDNA,加入正向和反向引物以及SYBR后,实时定量PCR进行扩增。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)正向引物序列5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3',反向引物序列5'-GTGGACGGTTCGATGTCAC-3';精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)正向引物序列5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3',反向引物序列5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3';内参照 β -actin正向引物序列5'-ACATCCGTAAGACCTCTATGCC-3',反向引物序列5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。通过QuantStudioTM 7系统对数据进行分析处理,定量检测采用比较阈值循环(Ct)方法, β -actin作为内参照,用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.2.5 Western blot免疫印迹分析 将各组小鼠角膜、结膜及泪腺组织中加入裂解液提取蛋白,制胶,取200 μ L蛋白,与50 μ L 5×Loading buffer混匀,根据蛋白定量的结果加样,第一孔marker 2.5 μ L,其它每孔10 μ L,电泳,分别切胶Gas6(69kD)、MerTK(160kD)、 β -actin(42kD)后转膜,经封闭后加入适当稀释的兔抗Gas6、MerTK(1:1000)和鼠抗 β -actin(1:5000)过夜孵育,洗膜后加入羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体(1:6000)或羊抗鼠IgG抗体-HRP多聚体(1:5000)孵育,ECL显影,结果以目的蛋白与参照蛋白条带比值表示各种目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 ELISA检测 将各组小鼠角膜、结膜及泪腺组织研碎后离心取上清提取蛋白,按照ELISA试剂盒步骤,酶标仪检测各组小鼠组织中IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9的表达水平。加生物素标记抗体工作液(稀释比例为1:100),加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液(稀释比例为1:100),然后每孔加入底物溶液,37℃避光显色,用酶标仪在450nm波长处依序对各孔光密度(OD值)进行检测。以OD值为横坐标,标准品的浓度为纵坐标,绘制标准曲线,计算样本浓度。

统计学分析:采用统计学软件SPSS 25.0进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用重复测量数据的方差分析检验多组间多时间点各指标变化差异,采用单因素方差分析检验多组间各指标变化差异,组间及组内两两比较均采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼表情况及眼表炎症指数评估 正常对照组小鼠全程角膜透明,结膜未见明显充血。注射右旋糖酐铁后小鼠眼表炎症反应持续加重,注药后第7、14d,单纯铁剂组、抑制剂组、增强剂组、溶剂对照组组间差异均无统计学意义($P>0.05$);注药后第28d,与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组眼表炎症反应加重明显($P<0.05$),而增强剂组眼表炎症反应减轻($P<0.05$),见表1。

2.2 角膜荧光素染色 正常对照组小鼠全程角膜透明,角膜荧光素染色均无染色斑点。注射右旋糖酐铁后小鼠角膜荧光素染色评分持续上升,注药后第7、14d,单纯铁剂组、抑制剂组、增强剂组、溶剂对照组组间差异均无统计学意义($P>0.05$);注药后第28d,与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组角膜上皮屏障功能破坏明显加重($P<0.05$),而增强剂组角膜上皮屏障功能修复($P<0.05$),见表2。

2.3 眼表组织病理学变化 注药28d后,正常对照组小鼠角膜上皮光滑,各层结构完整清晰且染色均匀;结膜上皮光滑连续,可见散在分布的杯状细胞;泪腺各小叶及腺泡间细胞排列紧密,腺泡结构完整,大小均一。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组小鼠角膜上皮层细胞数量略增加,细胞排列相对杂乱,且少量扁平细胞缺失脱落,上皮欠光滑;结膜上皮完整性欠佳,细胞排列杂乱,杯状细胞减少;泪腺各小叶及腺泡细胞排列相对杂乱,结构欠清晰,腺泡大小欠均一。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组小鼠角膜上皮层细胞数量增多,排列杂乱不规则,扁平细胞脱落明显;结膜上皮细胞数量增多,排列杂乱,上皮欠光滑,且杯状细胞明显减少甚至消失;泪腺各小叶及腺泡间细胞明显排列杂乱不规则,结构明显紊乱,且腺泡大小不均一。增强剂组小鼠在角膜结构完整性和细胞形态方面明显改善,细胞排列较为规则,相应损伤有所减轻;结膜中杯状细胞增加,上皮完整性稍改善;泪腺腺泡结构形态方面明显改善,腺泡大小较为均匀。除正常对照组外,其他各组小鼠结膜及泪腺中均可见片状的褐色铁沉积,见图1。

2.4 眼表组织中巨噬细胞极化情况

2.4.1 CD86在眼表组织中的表达 注药28d后对小鼠角膜、结膜及泪腺组织进行CD86蛋白免疫荧光染色。正常对照组各组织中较少有CD86表达。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组各组织中免疫荧光染色均增强,即CD86蛋白表达增强。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组各组织中CD86蛋白的免疫荧光染色强度进一步增强,而增强剂组各组织中CD86蛋白表达均下调,见图2。

2.4.2 CD206在眼表组织中的表达 注药28d后对小鼠角膜、结膜及泪腺组织进行CD206蛋白免疫荧光染色。正常对照组小鼠各组织中均可见CD206蛋白表达。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组各组织中CD206的免疫荧光染色强度减弱,即CD206蛋白表达下调。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组免疫荧光染色强度进一步减弱,即CD206蛋白表达水平进一步下调,而增强剂组各组织中CD206蛋白免疫荧光染色增强,CD206蛋白的表达相对增强,见图3。

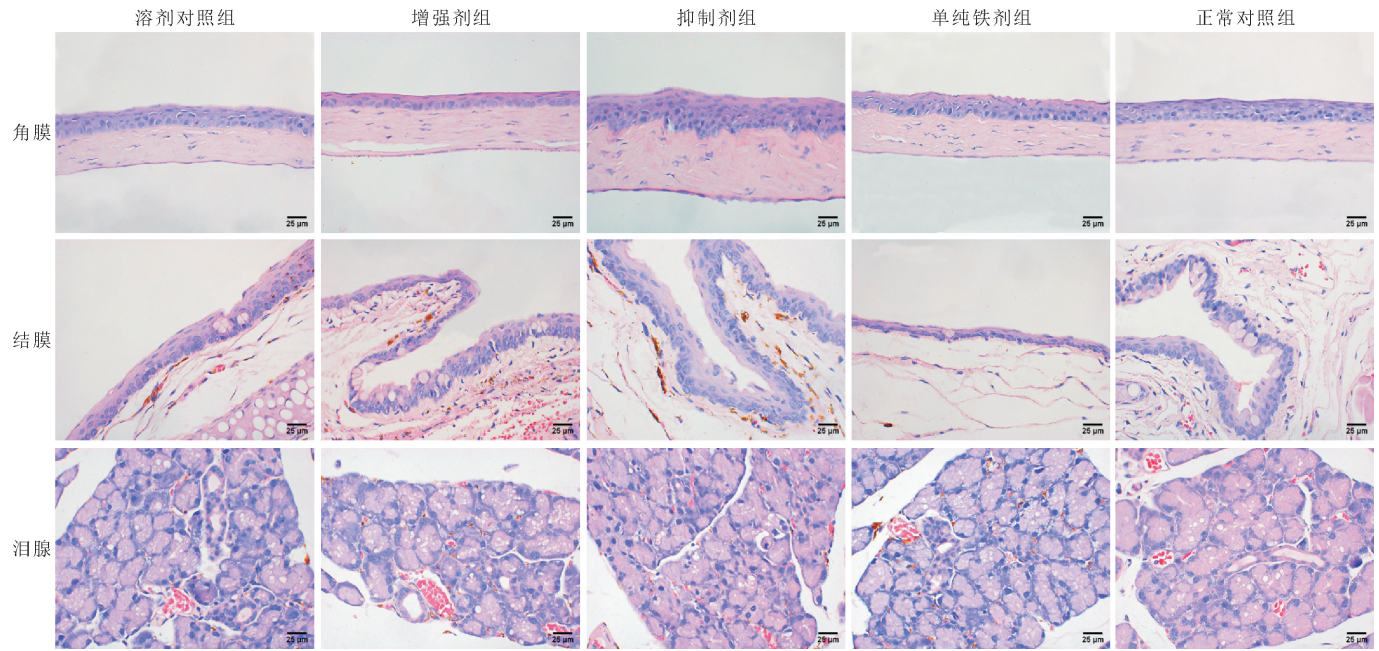


图1 注药28d后 HE 染色观察小鼠各眼表组织的病理学变化。

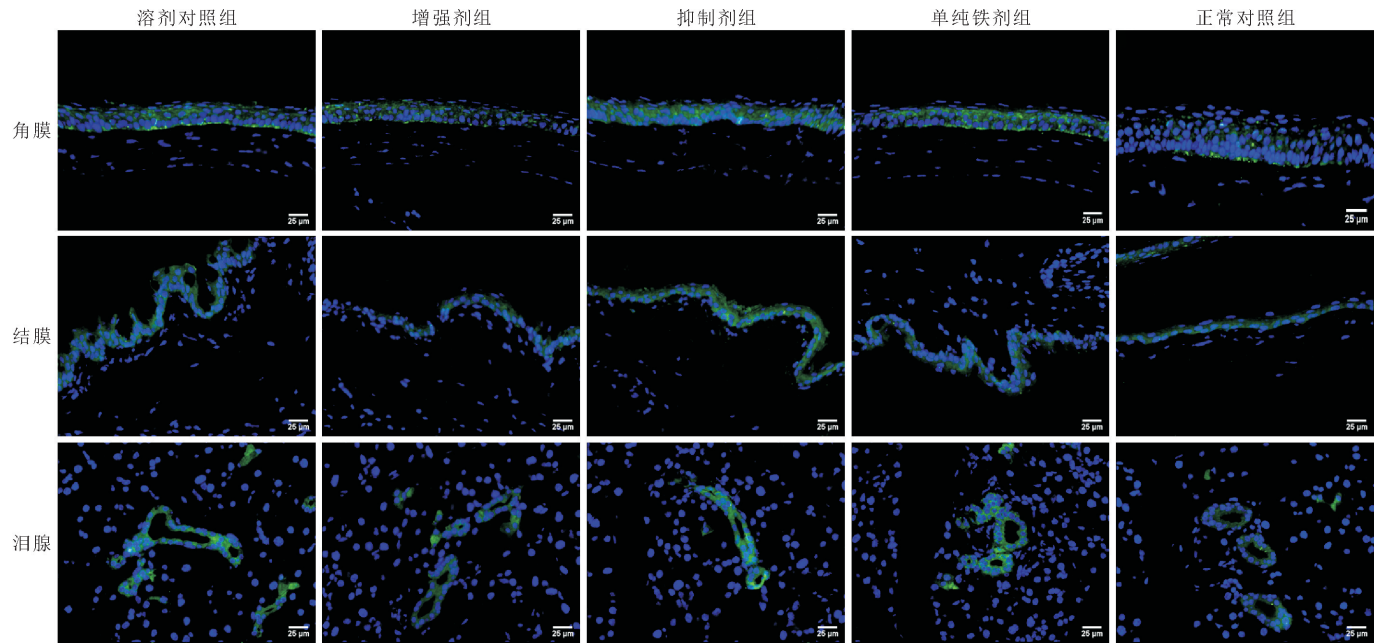


图2 注药28d后免疫荧光染色检测小鼠各眼表组织中 CD86 表达情况。

表1 各组注药后不同时间点眼表炎症指数评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

分组	第7d	第14d	第28d
正常对照组	0.037±0.064	0.074±0.064	0.037±0.064
单纯铁剂组	0.267±0.061 ^a	0.311±0.050 ^a	0.489±0.061 ^a
抑制剂组	0.185±0.064 ^a	0.296±0.064 ^a	0.800±0.050 ^{a,c}
增强剂组	0.259±0.064 ^a	0.333±0.111 ^a	0.311±0.050 ^{a,c,e}
溶剂对照组	0.222±0.000 ^a	0.296±0.128 ^a	0.489±0.061 ^{a,c,g}

注: $F_{\text{组间}} = 43.661, P_{\text{组间}} < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 45.533, P_{\text{时间}} < 0.001$; $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 10.992, P_{\text{组间} \times \text{时间}} < 0.001$ 。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 单纯铁剂组; ^e $P < 0.05$ vs 抑制剂组; ^g $P < 0.05$ vs 增强剂组。

表2 各组注药后不同时间点角膜荧光素染色评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

分组	第7d	第14d	第28d
正常对照组	0.333±0.577	0.667±0.577	0.333±0.577
单纯铁剂组	3.000±1.000 ^a	5.667±1.155 ^a	6.667±0.577 ^a
抑制剂组	3.333±0.577 ^a	5.667±0.577 ^a	9.667±0.577 ^{a,c}
增强剂组	3.000±0.000 ^a	6.000±1.000 ^a	4.333±0.577 ^{a,c,e}
溶剂对照组	3.333±0.577 ^a	5.000±0.000 ^a	6.333±0.577 ^{a,c,g}

注: $F_{\text{组间}} = 76.154, P_{\text{组间}} < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 85.824, P_{\text{时间}} < 0.001$; $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 15.088, P_{\text{组间} \times \text{时间}} < 0.001$ 。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 单纯铁剂组; ^e $P < 0.05$ vs 抑制剂组; ^g $P < 0.05$ vs 增强剂组。

2.4.3 iNOS 在眼表组织中的表达 注药28d后采用 RT-PCR 检测小鼠角膜、结膜及泪腺组织中 iNOS mRNA 的表达情况。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组各

组织中 iNOS mRNA 的表达均明显增加 ($P < 0.05$)。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组各组织中 iNOS mRNA 的表达均增强 ($P < 0.05$),而增强剂组各组织中

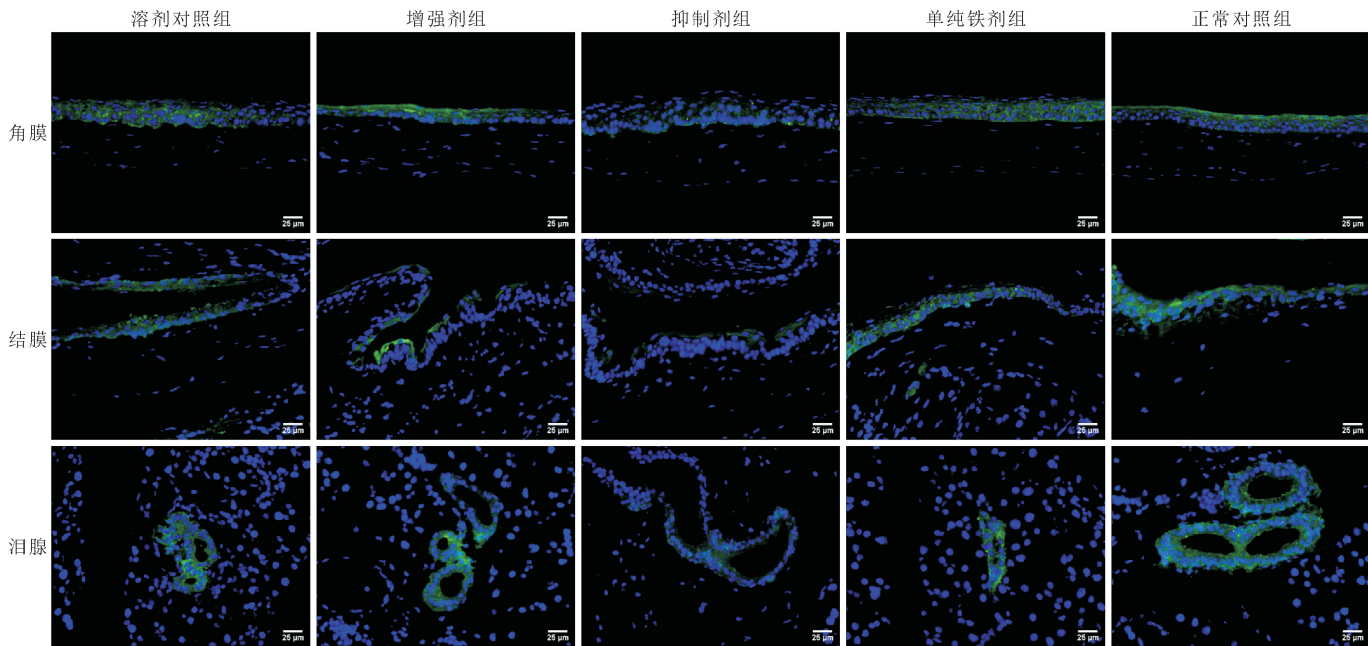


图3 注药28d后免疫荧光染色检测小鼠各眼表组织中CD206表达情况。

iNOS mRNA 的表达均受到抑制 ($P < 0.05$), 见表3。

2.4.4 Arg-1 在眼表组织中的表达 注药28d后采用 RT-PCR 检测小鼠角膜、结膜及泪腺组织中 Arg-1 mRNA 的表达情况。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组各组织中 Arg-1 mRNA 的表达均明显下调 ($P < 0.05$)。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组各组织中 Arg-1 mRNA 的表达均受到抑制 ($P < 0.05$), 而增强剂组各组织中 Arg-1 mRNA 的表达均上调 ($P < 0.05$), 见表4。

2.5 眼表组织中胞葬作用情况 注药28d后采用 Western blot 检测小鼠角膜、结膜及泪腺组织中 Gas6、MerTK 蛋白表达情况。与溶剂对照组比较,抑制剂组各组织中 Gas6、MerTK 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$), 而增强剂组各组织中 Gas6、MerTK 蛋白表达均明显上调 ($P < 0.05$), 见图4, 表5。

2.6 眼表组织中炎症因子的表达 注药28d后采用 ELISA 检测小鼠角膜、结膜及泪腺组织中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子的表达情况。与正常对照组比较,单纯铁剂组和溶剂对照组各组织中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子的表达均明显上调 ($P < 0.05$)。与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组各组织中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子的表达情况均明显上调 ($P < 0.05$), 而增强剂组各组织中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 等炎症因子的表达均明显下调 ($P < 0.05$), 见表6~8。

3 讨论

巨噬细胞在组织器官发育、人体内稳态的维持、组织修复与再生中均发挥重要作用^[6]。受不同的微环境影响,巨噬细胞主要极化为促进炎症反应发生的 M1 型^[7]和抑制炎症反应并促进损伤修复的 M2 型^[8], 在功能上相互拮抗。CD86、iNOS 与 CD206、Arg-1 分别作为 M1 型与 M2 型巨噬细胞从精氨酸代谢途径^[9]、细胞膜蛋白的表达^[10]等方面的鉴别指标。高铁环境是保持巨噬细胞自然防御的关键,巨噬细胞内铁的含量可以影响其极化类型^[11]。泪液乳铁蛋白含量下降是干眼重要的病理生理特征之一。本课题组前期研究发现泪液乳铁蛋白含量下降可导致眼

表3 注药28d后小鼠各眼表组织中 iNOS mRNA 的表达情况

分组	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	1.001±0.045	1.001±0.054	1.000±0.032
单纯铁剂组	7.630±0.982 ^a	5.674±0.256 ^a	8.412±1.386 ^a
抑制剂组	17.345±3.634 ^{a,c}	16.211±1.122 ^{a,c}	10.774±0.974 ^{a,c}
增强剂组	4.375±0.327 ^{a,c,e}	1.718±0.262 ^{c,e}	3.360±0.208 ^{a,c,e}
溶剂对照组	8.198±0.848 ^{a,e,g}	6.068±0.573 ^{a,e,g}	8.476±1.013 ^{a,e,g}
<i>F</i>	37.310	321.253	62.709
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P < 0.05$ vs 正常对照组;^c $P < 0.05$ vs 单纯铁剂组;^e $P < 0.05$ vs 抑制剂组;^g $P < 0.05$ vs 增强剂组。

表4 注药28d后小鼠各眼表组织中 Arg-1 mRNA 的表达情况

分组	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	1.001±0.041	1.001±0.060	1.003±0.094
单纯铁剂组	0.051±0.008 ^a	0.081±0.006 ^a	0.049±0.005 ^a
抑制剂组	0.031±0.002 ^{a,c}	0.045±0.006 ^{a,c}	0.027±0.003 ^{a,c}
增强剂组	0.157±0.042 ^{a,c,e}	0.156±0.008 ^{a,c,e}	0.685±0.025 ^{a,c,e}
溶剂对照组	0.062±0.010 ^{a,e,g}	0.085±0.004 ^{a,e,g}	0.055±0.008 ^{a,e,g}
<i>F</i>	717.538	660.177	323.753
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P < 0.05$ vs 正常对照组;^c $P < 0.05$ vs 单纯铁剂组;^e $P < 0.05$ vs 抑制剂组;^g $P < 0.05$ vs 增强剂组。

表铁过载,进而加重眼表炎症及组织损伤,提示高铁环境可以加重眼表炎症反应。本研究给小鼠腹腔注射高剂量右旋糖酐铁,对眼表情况进行动态观察,发现单纯铁剂组与正常对照组小鼠比较眼表炎症反应加重,眼表组织中 M1 型巨噬细胞表达占优势且炎症因子的表达增强,说明腹腔注射过量铁剂可使机体铁代谢失衡,诱导巨噬细胞向 M1 型极化,促进眼表炎症发生。

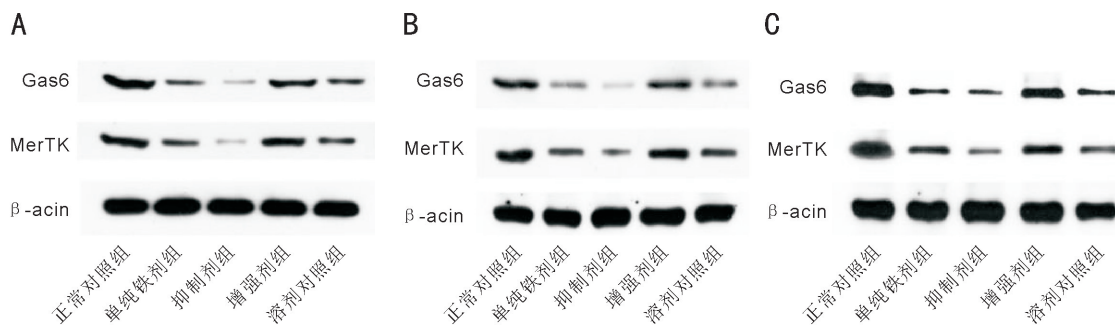


图4 注药28d后 Western blot 检测小鼠各眼表组织中 Gas6 和 MerTK 蛋白表达情况 A:角膜;B:结膜;C:泪腺。

表5 注药28d后小鼠各眼表组织中胞葬作用相关蛋白的表达情况

分组	Gas6 蛋白			MerTK 蛋白		
	角膜	结膜	泪腺	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	0.723±0.046	0.630±0.118	0.660±0.061	0.697±0.117	0.550±0.072	0.650±0.082
单纯铁剂组	0.257±0.067 ^a	0.273±0.055 ^a	0.277±0.021 ^a	0.323±0.112 ^a	0.260±0.053 ^a	0.280±0.010 ^a
抑制剂组	0.143±0.038 ^{a,c}	0.117±0.040 ^{a,c}	0.177±0.045 ^{a,c}	0.163±0.057 ^{a,c}	0.110±0.056 ^{a,c}	0.147±0.015 ^{a,c}
增强剂组	0.383±0.040 ^{a,c,e}	0.433±0.042 ^{a,c,e}	0.460±0.046 ^{a,c,e}	0.510±0.044 ^{a,c,e}	0.393±0.058 ^{a,c,e}	0.400±0.050 ^{a,c,e}
溶剂对照组	0.263±0.049 ^{a,e,g}	0.283±0.045 ^{a,e,g}	0.290±0.010 ^{a,e,g}	0.310±0.046 ^{a,e,g}	0.253±0.04 ^{a,e,g}	0.280±0.030 ^{a,e,g}
<i>F</i>	61.950	25.199	64.835	19.098	25.721	51.626
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组;^c*P*<0.05 vs 单纯铁剂组;^e*P*<0.05 vs 抑制剂组;^g*P*<0.05 vs 增强剂组。

表6 注药28d后小鼠各眼表组织中 IL-1β 蛋白的表达情况

分组	(x̄±s, pg/mL)		
	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	49.041±2.250	25.768±3.325	58.554±2.734
单纯铁剂组	109.557±9.681 ^a	70.857±8.224 ^a	120.475±6.394 ^a
抑制剂组	152.708±2.754 ^{a,c}	94.692±4.959 ^{a,c}	153.765±4.321 ^{a,c}
增强剂组	72.538±2.757 ^{a,c,e}	41.330±2.043 ^{a,c,e}	80.072±0.761 ^{a,c,e}
溶剂对照组	101.211±6.740 ^{a,e,g}	67.238±3.061 ^{a,e,g}	114.818±3.749 ^{a,e,g}
<i>F</i>	145.323	92.896	252.163
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组;^c*P*<0.05 vs 单纯铁剂组;^e*P*<0.05 vs 抑制剂组;^g*P*<0.05 vs 增强剂组。

表7 注药28d后小鼠各眼表组织中 TNF-α 蛋白的表达情况

分组	(x̄±s, pg/mL)		
	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	83.444±1.020	55.275±3.910	118.018±4.751
单纯铁剂组	157.131±5.013 ^a	106.463±6.515 ^a	219.849±3.811 ^a
抑制剂组	251.172±3.816 ^{a,c}	137.451±7.811 ^{a,c}	307.731±18.900 ^{a,c}
增强剂组	111.539±8.565 ^{a,c,e}	81.046±7.306 ^{a,c,e}	150.142±6.435 ^{a,c,e}
溶剂对照组	161.460±3.089 ^{a,e,g}	104.060±2.504 ^{a,e,g}	215.733±7.802 ^{a,e,g}
<i>F</i>	493.867	79.271	161.819
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组;^c*P*<0.05 vs 单纯铁剂组;^e*P*<0.05 vs 抑制剂组;^g*P*<0.05 vs 增强剂组。

胞葬作用在维持机体正常生长发育、内稳态及促进炎症消退等方面有重要作用。细胞外信号调节激酶5 (extracellular signal regulated kinase 5, ERK5) 作为丝裂原活化蛋白激酶家族的重要组成部分,在调控细胞反应过程中起着重要作用,可被不同因素作用而介导细胞发生相应变化,参与细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡等多种病理

表8 注药28d后小鼠各眼表组织中 MMP-9 蛋白的表达情况

分组	(x̄±s, pg/mL)		
	角膜	结膜	泪腺
正常对照组	5.541±0.413	4.663±0.175	7.206±0.300
单纯铁剂组	11.965±0.751 ^a	10.230±0.844 ^a	16.755±0.654 ^a
抑制剂组	15.529±1.270 ^{a,c}	14.764±1.292 ^{a,c}	18.933±1.195 ^{a,c}
增强剂组	7.303±1.072 ^{a,c,e}	6.703±0.646 ^{a,c,e}	9.834±0.569 ^{a,c,e}
溶剂对照组	11.543±0.299 ^{a,e,g}	10.783±0.449 ^{a,e,g}	15.200±0.789 ^{a,e,g}
<i>F</i>	66.181	75.544	124.506
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 正常对照组;^c*P*<0.05 vs 单纯铁剂组;^e*P*<0.05 vs 抑制剂组;^g*P*<0.05 vs 增强剂组。

生理过程^[12]。Heo 等^[13]在对巨噬细胞胞葬作用抑制动脉粥样硬化机制的研究中发现,ERK5 的失活可通过下调胞葬作用相关信号因子如 Gas6、MerTK 等的表达抑制胞葬作用,并提出他汀类药物能显著激活巨噬细胞中 ERK5 及其相关信号分子,并上调胞葬作用相关信号因子的表达,增强胞葬作用。而 XMD8-92 作为 ERK5 的抑制剂可下调胞葬作用相关信号因子的表达,使巨噬细胞胞葬作用功能受损^[14]。

研究表明,胞葬作用影响炎症发生和消退,并诱导巨噬细胞表型和功能改变^[15]。巨噬细胞吞噬功能受损可产生更高水平的促炎症细胞因子,而巨噬细胞成功清除凋亡细胞可以减弱炎症因子的表达,促进抗炎介质白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 或转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 等释放,诱导 M2 型极化^[1]。眼表上皮细胞过度凋亡不仅是眼表炎症发病机制之一,也是眼表炎症重要特征之一^[16],巨噬细胞通过胞葬作用持续不断地吞噬凋亡细胞对维持眼表损伤与修复平衡、促进眼表炎症反应消退具有重要的积极意义。本研

究通过观察注药后 28d 小鼠眼表情况发现,与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,抑制剂组眼表炎症反应进一步加重,眼表组织中 M1 型巨噬细胞表达进一步上调,同时炎症因子的表达相应增强,说明 XMD8-92 作为胞葬作用的抑制剂通过调控巨噬细胞向 M1 型极化促进眼表炎症发生,加重眼表组织损伤;而与单纯铁剂组和溶剂对照组比较,增强剂组眼表炎症反应减轻,眼表组织中 M2 型巨噬细胞表达占优势,同时炎症因子的表达出现下调,说明辛伐他汀作为胞葬作用增强剂通过调控巨噬细胞向 M2 型极化减轻眼表炎症反应,促进眼表组织损伤修复。

综上所述,本研究发现腹腔注射右旋糖酐铁可成功诱导巨噬细胞向 M1 型极化,而 XMD8-92 作为胞葬作用的抑制剂可进一步诱导巨噬细胞向 M1 型极化促进眼表炎症反应,加重眼表组织损伤,辛伐他汀作为胞葬作用的增强剂可诱导巨噬细胞向 M2 型极化减轻眼表炎症反应从而有效地改善组织损伤,说明胞葬作用可通过调控巨噬细胞极化影响眼表炎症反应发生。本研究不仅证实了高铁环境可以加重眼表炎症反应,而且为阐明眼表炎症发生机制提供了新的依据。

参考文献

- 1 Ortega - Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013; 5 (5): 661-674
- 2 Handa P, Thomas S, Morgan - Stevenson V, et al. Iron alters macrophage polarization status and leads to steatohepatitis and fibrogenesis. *J Leukoc Biol* 2019; 105(5): 1015-1026
- 3 曹小立, 赵明峰, 李德冠, 等. 铁过载巨噬细胞体外模型的建立及氧化应激对铁过载巨噬细胞的损伤作用. *中华医学杂志* 2016; 96 (2): 129-133
- 4 Zhang ZH, Ma JX, Gao GQ, et al. Plasminogen Kringle 5 inhibits alkali-burn-induced corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4062-4071
- 5 Pauly A, Brignole -Baudouin F, Labbé A, et al. New tools for the

evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(12): 5473-5483

6 Thiriot JD, Martinez - Martinez YB, Endsley JJ, et al. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathog Dis* 2020; 78(1): ftaa009

7 He DQ, Liu FL, Cui SJ, et al. Mechanical load - induced H₂S production by periodontal ligament stem cells activates M1 macrophages to promote bone remodeling and tooth movement via STAT1. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 112

8 Li T, He HT, Yang ZZ, et al. Strontium - doped gelatin scaffolds promote M2 macrophage switch and angiogenesis through modulating the polarization of neutrophils. *Biomater Sci* 2021; 9(8): 2931-2946

9 Xie YY, Tian LJ, Fang ZH, et al. Bushen Kangshuai Tablet inhibits progression of atherosclerosis by intervening in macrophage autophagy and polarization. *J Tradit Chin Med* 2020; 40(1): 28-37

10 Schliefssteiner C, Peinhaupt M, Kopp S, et al. Human placental hofbauer cells maintain an anti-inflammatory M2 phenotype despite the presence of gestational diabetes mellitus. *Front Immunol* 2017; 8: 888

11 Behmoaras J. The versatile biochemistry of iron in macrophage effector functions. *FEBS J* 2021; 288(24): 6972-6989

12 Chander Y, Kumar R, Khandelwal N, et al. Role of p38 mitogen - activated protein kinase signalling in virus replication and potential for developing broad spectrum antiviral drugs. *Rev Med Virol* 2021; 31(5): 1-16

13 Heo KS, Cushman HJ, Akaike M, et al. ERK5 activation in macrophages promotes efferocytosis and inhibits atherosclerosis. *Circulation* 2014; 130(2): 180-191

14 王建茹, 刘萍. ERK5 抑制剂对巨噬细胞胞葬作用及 ProS、Axl 表达的影响. *暨南大学学报(自然科学与医学版)* 2018; 39(2): 93-98

15 Kraynak CA, Yan DJ, Suggs LJ. Modulating inflammatory macrophages with an apoptotic body-inspired nanoparticle. *Acta Biomater* 2020; 108: 250-260

16 Lee HS, Cui L, Li Y, et al. Influence of light emitting diode-derived blue light overexposure on mouse ocular surface. *PLoS One* 2016; 11 (8): e0161041