基于自噬探讨玻璃体腔注射贝伐珠单抗对年龄相关性黄斑变性视网膜损伤的保护作用Δ

梁晓茜*,陈王灵,陈运信(中山大学中山眼科中心/海南省眼科医院眼底病专科,海口 570311)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)03-0281-06
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.03.006

摘 要 目的:探讨玻璃体腔注射贝伐珠单抗对年龄相关性黄斑变性(AMD)小鼠视网膜损伤的保护作用及机制。方法:将40只C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组和贝伐珠单抗高剂量组,每组10只。除对照组外,其余三组小鼠通过尾静脉注射碘酸钠($NaIO_3$)诱导构建AMD模型。贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠分别给予玻璃体腔注射贝伐珠单抗15、20 mg/mL,对照组和模型组小鼠均注射等量磷酸盐缓冲溶液。14 d后,四组小鼠均拍摄眼底图像,采用频域光学相干断层扫描(SD-OCT)检测视网膜厚度,进行荧光素眼底血管造影(FFA)检查,记录视网膜电图。四组小鼠眼静脉取血,检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性,丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)含量;采用苏木精-伊红染色观察视网膜形态学变化,原位末端转移酶标记(TUNEL)染色检测视网膜细胞凋亡情况,免疫荧光染色检测视网膜中微管相关蛋白1轻链3α(LC3)的表达,蛋白质印迹法测定视网膜内自噬相关蛋白的表达。结果:相较于模型组,贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠眼底沉积物减少,视网膜厚度增加,血管渗漏减少。对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组及贝伐珠单抗高剂量组之间a波、b波振幅的差异均有统计学意义(F分别为398.521、501.247,P<0.05);与模型组相比,贝伐珠单抗低、高剂量组a波和b波振幅均升高,差异均有统计学意义(P<0.05)。对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组及贝伐珠单抗高剂量组之间血清SOD、GSH-Px和CAT活性,MDA、ROS含量以及TUNEL阳性率的差异均有统计学意义(F分别为302.547、655.259、218.954、260.135、1 452.098和328.193,P<0.05);与模型组相比,贝伐珠单抗低、高剂量组血清SOD、GSH-Px及CAT活性升高,MDA、ROS含量降低,TUNEL阳性率降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组及贝伐珠单抗高剂量组之间死骨片1(p62)、自噬效应蛋白(Beclin-1)表达和LC3-II/LC3-I比值的差异均有统计学意义(F分别为56.259、105.890和78.314,P<0.05);与模型组比较,贝伐珠单抗低、高剂量组视网膜内LC3荧光表达增强,p62蛋白表达下调,Beclin-1蛋白表达和LC3-II/LC3-I比值均上调,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论:玻璃体腔注射贝伐珠单抗可对$NaIO_3$诱导的AMD小鼠视网膜发挥保护作用,其机制可能与促进自噬相关。

关键词 年龄相关性黄斑变性; 贝伐珠单抗; 氧化损伤; 自噬

Protective Effect of Intravitreal Injection of Avastin on Retinal Damage in Age-Related Macular Degeneration Based on Autophagy Δ

LIANG Xiaoqian, CHEN Wangling, CHEN Yunxin (Dept. of Ocular Fundus Disease, Sun Yat-sen Ophthalmic Center of Sun Yat-sen University/Hainan Eye Hospital, Haikou 570311, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the protective effect and mechanism of intravitreal injection of avastin on retinal damage in mice with age-related macular degeneration (AMD). METHODS: Forty C57BL/6 mice were randomly divided into the control group, model group, avastin low-dose group and avastin high-dose group, with 10 cases in each group. Except for the control group, the other three groups of mice were injected with sodium iodate ($NaIO_3$) through the tail vein to induce the establishment of AMD models. Avastin low-dose and high-dose groups were given intravitreal injections of 15 mg/mL and 20 mg/mL avastin, the control group and model group were injected with the same amount of PBS solution. Fourteen days later, the four groups of mice were all photographed fundus images, frequency domain optical coherence tomography (SD-OCT) was used to detect the thickness of the retina, fundus fluorescein angiography (FFA) was performed, and the electroretinogram was recorded. The four groups of mice were taken blood from the eye vein to detect superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities, malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe retinal morphology changes, TUNEL staining was used to detect retinal cell apoptosis,

Δ 基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(No. 20A200138)
* 主治医师。研究方向:眼底病、白内障。E-mail:lstlst99@163.com

immunofluorescence staining was used to detect the expression of LC3 in retina, Western blotting was used to determine the expression of autophagy-related proteins in retina. RESULTS: Compared with the model group, the avastin low-dose and high-dose groups had reduced fundus deposits, increased retinal thickness, and decreased vascular leakage. There were significant differences in the amplitudes of a and b waves between the control group, model group, avastin low-dose group and avastin high-dose group (F was 398.521 and 501.247 respectively, $P<0.05$). Compared with the model group, the a-wave and b-wave amplitudes in the avastin low-dose group and avastin high-dose increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). There were significant differences in activities of serum SOD, GSH-Px, CAT, contents of MDA, ROS and positive rate of TUNEL among the control group, model group, avastin low-dose group and avastin high-dose group (F was 302.547, 655.259, 218.954, 260.135, 1 452.098 and 328.193 respectively, $P<0.05$). Compared with the model group, the activities of serum SOD, GSH-Px and CAT in the avastin low-dose group and avastin high-dose group increased, while the contents of MDA and ROS decreased, the positive rate of TUNEL decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). There were significant differences in p62, Beclin-1 protein expression and LC3-II/LC3-I ratio among the control group, model group, avastin low-dose group and avastin high-dose group (F was 56.259, 105.890 and 78.314 respectively, $P<0.05$). Compared with the model group, the fluorescence expression of LC3 in retina of avastin low-dose group and avastin high-dose group was enhanced, the expression of p62 protein was down-regulated, and the protein expression of Beclin-1 and the ratio of LC3-II/LC3-I were up-regulated, with statistically significant differences ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Intravitreal injection of avastin can protect the retina of AMD mice induced by $NaIO_3$, and its mechanism may be related to the promotion of autophagy.

KEYWORDS AGE-related macular degeneration; Avastin; Oxidative damage; Autophagy

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是导致全球中老年人视力低下甚至发生不可逆失明的主要原因,并且随着年龄的增长,其发病率也不断升高,给社会带来了的巨大负担[1-2]。临床上将 AMD 分为湿性和干性 2 种,其中干性 AMD 较为常见。湿性 AMD 的特征是在视网膜下血管生成异常,导致视力快速下降或丧失;干性 AMD 表现为视网膜色素上皮、脉络膜毛细血管和光感受器细胞的变性萎缩[3-4]。近年来,抗血管生成疗法和激光光凝等有效地延缓了湿性 AMD 的进展。然而,治疗干性 AMD 的方法仍不明确,缺乏有效药物来减缓或抑制其发生发展。贝伐珠单抗是一种重组人源化单克隆免疫球蛋白 G1 抗体,可与人血管内皮生长因子 A 的所有同种型和生物活性蛋白水解片段结合,从而阻止血管生成。贝伐珠单抗可作为化疗的辅助手段,用于多种类型恶性肿瘤的治疗[5-6]。此外,已有研究结果表明,通过玻璃体腔注射贝伐珠单抗能够有效提高眼底病患者的视力,改善黄斑水肿,促进出血的吸收,表现出较好的治疗效果[7]。因此,本研究通过碘酸钠($NaIO_3$)诱导构建 AMD 小鼠模型,观察玻璃体腔注射贝伐珠单抗对 AMD 小鼠视网膜的影响,并明确该作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级、健康 C57BL/6 小鼠,雄性,6~8 周龄,体重 20~25 g,由海南省实验动物中心提供,饲养于温度(23±2)℃、相对湿度(50±10)%、光照/黑暗 12 h 交替的动物饲养箱,自由饮食,适应性饲养 1 周后开始实验。本研究获得我院伦理委员会审核与批准(审批号:202012160153)。

1.1.2 仪器:Micron Ⅲ型小动物视网膜成像系统(美国 Phoenix Research Lab 公司);频域光学相干断层扫描(SD-OCT)系统(美国 Thorlabs 公司);HMSERG 型内置 Ganzfeld 光刺激器(上海玉研科学仪器有限公司);DCM8 型光学显微镜(德国 Leica 公司);BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);ZY2 小型电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.1.3 药品与试剂:贝伐珠单抗注射液[广东百奥泰生物制药股份有限公司,国药准字 S20210044,规格:100 mg(4 mL)/瓶];$NaIO_3$(武汉远城科技公司,CAS 号:7681-55-2);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒及活性氧(ROS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A001-3、A006-2、A007-1、A003-1 及 E004);原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒(瑞士 Roche 公司,批号:12156792910);免疫荧光染色试剂(美国 Cell Biolabs 公司,批号:CBA-5115);二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒、增强化学发光(ECL)试剂液和苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物研究所,批号:P0012S、P0018FS 和 C0105S);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司,批号:ISEQ00010);抗体自噬效应蛋白(Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3α(LC3)-II、LC3-I 及死骨片 1(p62)(美国 CST 公司,批号:3495S、3868S、4599S 及 3534S);磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(北京中杉金桥生物科技公司,批号:TA-1203、ZB-2306 和 ZF-0316)。

1.2 分组和建模

将 40 只小鼠按随机数字表法分为四组,每组 10 只,包括对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组和贝伐珠单抗高剂量

组。参考文献[8]建立 AMD 模型,将 $NaIO_3$ 粉末溶于 0.9%氯化钠溶液,小鼠消毒后,显露两侧尾静脉,对照组小鼠注射 0.9%氯化钠溶液,其余三组小鼠注射 25 μg/g 的 $NaIO_3$ 建立 AMD 模型。贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠分别于玻璃体腔注射 15、20 mg/mL 的贝伐珠单抗各 5 μL,过程如下:采用水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,复方托吡卡胺散两侧瞳孔,盐酸布比卡因表面麻醉,将小鼠固定于显微镜下,拨开眼睑,充分暴露角巩膜缘,使用微量注射器倾斜 15°沿角膜缘刺入玻璃体腔,注射贝伐珠单抗;对照组和模型组注射等量磷酸盐缓冲溶液(PBS),注射完毕后,以左氧氟沙星滴眼预防感染。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 小鼠眼底及 OCT 检查:注射 14 d 后,麻醉各组小鼠,以复方托吡卡胺滴眼散瞳,使用小动物视网膜成像 Micron Ⅲ系统拍摄眼底图像,通过 SD-OCT 系统检测视网膜厚度,测定标准为距视神经 450 mm。

1.3.2 荧光素眼底血管造影(FFA)检测:将各组小鼠麻醉后,以复方托吡卡胺滴眼散瞳,腹腔注射 10%荧光素钠溶液,注射 5 min 后,采用小动物视网膜成像 Micron Ⅲ系统观察视网膜血管变化。

1.3.3 视网膜电图:将各组小鼠麻醉后,以复方托吡卡胺滴眼散瞳,Ganzfeld 光刺激器记录视网膜电图,以强度为 600 $(cd\cdot s)/m^2$ 刺激,间隔为 20 s,记录并评估视网膜 a 波振幅和 b 波振幅。

1.3.4 血清氧化指标测定:采集各组小鼠眼静脉血,置于无菌离心管,待凝固后,以 3 000 r/min 离心 15 min(离心半径 15 cm),取血清进行检测。根据酶联免疫吸附试验试剂盒测定血清 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性,采用植物丙二醛比色法检测血清 MDA 含量,采用芬顿反应和格里斯显色法检测血清 ROS 含量。

1.3.5 HE 染色:取各组小鼠视网膜组织,置于 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,低温切片为 6 μm 厚度的组织切片,脱蜡水化,苏木精染色 5 min,流水冲洗干净,伊红染液复染 3 min,经脱水、透明后,以中性树胶封片,光学显微镜下观察视网膜结构并拍照。

1.3.6 TUNEL 染色:取制备的各组小鼠视网膜组织切片,脱蜡水化,以稀释的蛋白酶 K 工作液在 37 ℃下孵育 10 min,PBS 漂洗干净,浸入封闭液封闭 10 min,加入 TUNEL 50 μL 孵育 1 h,再以 3,3-二氨基联苯胺显色,苏木精复染,经脱水、透明后,以中性树胶封片,光学显微镜下观察视网膜着色情况,棕褐色为凋亡细胞,随机选择 5 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞数目和总细胞数目,以 TUNEL 阳性细胞数与总细胞数的比值作为 TUNEL 阳性率。

1.3.7 免疫荧光染色:取制备的各组小鼠视网膜组织切片,脱蜡水化,进行抗原修复后,置于 10%山羊血清湿盒内封闭 30 min,结束后抗体染色,滴加 LC3 抗体(1∶100)4 ℃下孵育过夜;次日,弃去原液,漂洗干净后,加入荧光标记的二抗(1∶200),室温(25 ℃)避光孵育 2 h,再以 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚染核,甘油封片,荧光显微镜下观察视网膜染色情况并拍照,红色荧光为 LC3 染色,蓝色荧光为细胞核染色。

1.3.8 蛋白质印迹法:将各组小鼠视网膜组织在无菌工作台剪碎后,加入蛋白裂解液于冰上裂解 40 min,以 12 000 r/min 离心 30 min(离心半径 15 cm),取上清液,BCA 法定量蛋白。制备 10%聚丙烯酰胺凝胶,取提取的蛋白上样,进行电泳分离,将蛋白电转至 PVDF 膜,在 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h,加入一抗(1∶1 000),4 ℃孵育;次日,弃去原液,充分洗膜,加入对应二抗(1∶5 000),室温孵育 1 h,利用 ECL 显影,通过 Image Pro-Plus 软件分析蛋白条带灰度值,并以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据处理。小鼠视网膜厚度,a 波振幅、b 波振幅,血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性,血清 MDA、ROS 含量,TUNEL 阳性率,p62 蛋白表达,Beclin-1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值符合正态分布,均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较不同组别小鼠视网膜厚度,a 波振幅、b 波振幅,血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性,血清 MDA、ROS 含量,TUNEL 阳性率,p62 蛋白表达,Beclin-1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值,当差异有统计学意义时,进一步采用 LSD-t 检验进行组间两两数据比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠眼底及视网膜厚度的影响

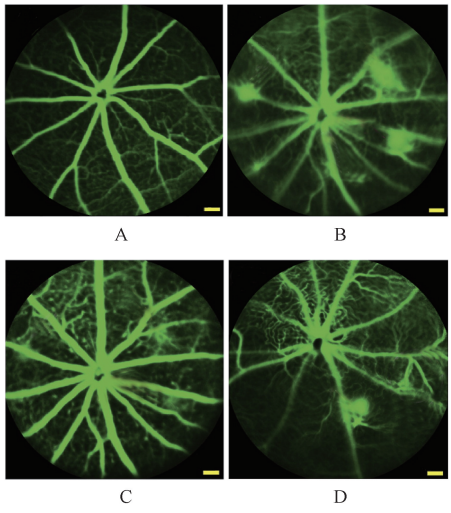
通过眼底图像观察到对照组小鼠眼底未见黄白色物质,即玻璃膜疣;模型组小鼠眼底有明显的黄白色物质,表明玻璃膜疣数量较多;贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠眼底仍可见黄白色物质,但玻璃膜疣数量较模型组明显减少,且高剂量组的数量更少。对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组和贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜厚度分别为(312.23±28.09)、(234.46±21.21)、(279.92±24.34)和(300.18±26.08) μm,各组间小鼠视网膜厚度比较,差异有统计学意义($F=569.023$,$P<0.05$)。进一步两两比较:与对照组比较,模型组小鼠视网膜厚度显著减少($P<0.05$);与模型组比较,贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠的视网膜厚度均显著增加($P<0.05$);贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜厚度显著高于贝伐珠单抗低剂量组($P<0.05$),上述差异均有统计学意义。

2.2 玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠视网膜血管的影响

FFA 结果显示,对照组小鼠视网膜血管正常,未见异常荧光,见图 1(A);模型组小鼠视网膜血管内出现多个渗漏区,见图 1(B);贝伐珠单抗低、高剂量组的视网膜血管有渗漏区,但区域明显小于模型组,其中贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜血管内渗漏区很少,明显少于模型组和贝伐珠单抗低剂量组,见图 1(C—D)。

2.3 玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠视网膜电图的影响

视网膜电图检测结果显示,各组间小鼠 a 波、b 波振幅比



A. 对照组；B. 模型组；C. 贝伐珠单抗低剂量组；D. 贝伐珠单抗高剂量组

A. control group; B. model group; C. avastin low-dose group; D. avastin high-dose group

图 1　各组小鼠视网膜 FFA 检查结果

Fig 1　Results of FFA examination of retina of mice in each group

较，差异均有统计学意义（F 分别为 398.521、501.247；$P<0.05$）。进一步两两比较：与对照组比较，模型组小鼠 a 波、b 波振幅均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，贝伐珠单抗低、高剂量组的 a 波、b 波振幅均显著升高（$P<0.05$）；与贝伐珠单抗低剂量组比较，贝伐珠单抗高剂量组 a 波、b 波振幅显著升高（$P<0.05$），上述差异均有统计学意义。

2.4　玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA、ROS 含量的影响

四组小鼠血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA、ROS 含量进行比较，差异均有统计学意义（F 分别为 302.547、655.259、218.954 及 260.135、1 452.098；$P<0.05$）。进一步两两比较：与对照组比较，模型组小鼠血清 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著降低，MDA、ROS 含量显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著升高，MDA、ROS 含量显著降低（$P<0.05$）；与贝伐珠单抗低剂量组比较，贝伐珠单抗高剂量组 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著升高，MDA、ROS 含量显著降低（$P<0.05$），上述差异均有统计学意义，见表 1。

2.5　玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠视网膜形态学变化的影响

HE 染色结果显示，对照组小鼠视网膜结构清晰，未见病理学改变，见图 2（A）；模型组小鼠视网膜结构发生明显损伤，视网膜色素上皮层出现黑色沉积物，有大量细胞坏死、脱落，见图 2（B）；相较于模型组，贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠的视网膜色素上皮层黑色沉积物明显减少，坏死、脱落细胞也减少，损伤程度明显小于模型组，其中贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜损伤程度明显小于模型组和贝伐珠单抗低剂量组，未见坏死、脱落细胞，见图 2（C—D）。

表 1　各组小鼠血清 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA、ROS 含量比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Comparison of activity of serum SOD, GSH-Px, CAT and content of MDA, ROS of mice in each group（$\bar{x}\pm s$）

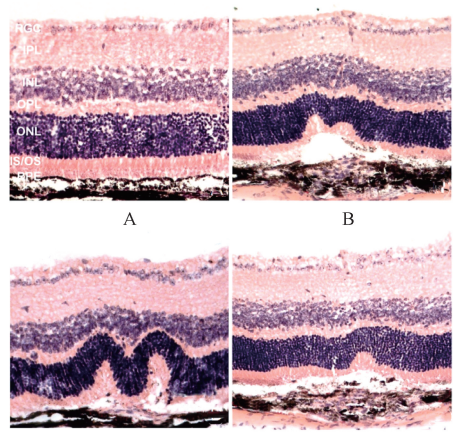
组别	SOD/（U/mL）	GSH-Px/（U/mL）	CAT/（U/mL）	MDA/（nmol/mL）	ROS/（U/mL）
对照组（$n=10$）	54.81±5.10	156.32±14.29	11.23±1.05	14.55±1.28	1 327.92±118.84
模型组（$n=10$）	24.35±2.27[a]	68.71±6.18[a]	3.64±0.31[a]	35.73±3.20[a]	3 661.83±321.69[a]
贝伐珠单抗低剂量组（$n=10$）	31.46±3.08[b]	100.55±9.86[b]	6.17±0.59[b]	24.71±2.19[b]	2 537.69±218.05[b]
贝伐珠单抗高剂量组（$n=10$）	44.58±4.21[bc]	132.82±12.39[bc]	9.04±0.87[bc]	20.02±2.11[bc]	2 104.77±189.65[bc]
F	302.547	655.259	218.954	260.135	1 452.098
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型组比较，[b]$P<0.05$；与贝伐珠单抗低剂量组比较，[c]$P<0.05$

Note: *vs.* the control group, [a]$P<0.05$; *vs.* the model group, [b]$P<0.05$; *vs.* the avastin low-dose group, [c]$P<0.05$

2.6　玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠视网膜细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示，对照组、模型组、贝伐珠单抗低剂量组和贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜 TUNEL 阳性率分别为（2.56±0.23）%、（44.45±4.10）%、（23.76±2.01）%和（7.18±0.69）%，差异有统计学意义（$F=328.193$，$P<0.05$）。进一步两两比较：模型组小鼠视网膜 TUNEL 阳性率显著高于对照组（$P<0.05$）；贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠视网膜 TUNEL 阳性率显著低于模型组（$P<0.05$）；与贝伐珠单抗低剂量组比较，贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜 TUNEL 阳性率显著降低（$P<0.05$），上述差异均有统计学意义，见图 3。图 3（A）显示，对照组小鼠视网膜内未见凋亡细胞；图 3（B）显示，模型组小鼠视网



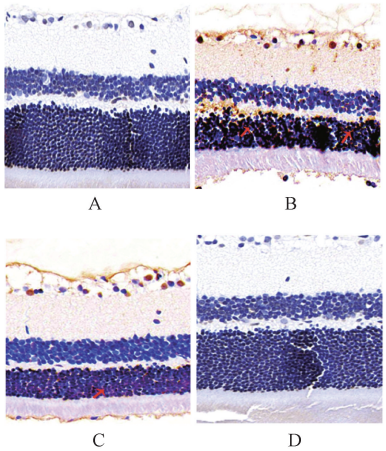
A. 对照组；B. 模型组；C. 贝伐珠单抗低剂量组；D. 贝伐珠单抗高剂量组

A. control group; B. model group; C. avastin low-dose group; D. avastin high-dose group

图 2　各组小鼠视网膜结构（HE，×400）

Fig 2　Structure of mouse retina in each group（HE, ×400）

膜内可见较多凋亡细胞;图 3(C)显示贝伐珠单抗低剂量组小鼠视网膜内凋亡细胞数目明显少于模型组;图 3(D)显示,贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜内未见凋亡细胞。



A. 对照组;B. 模型组;C. 贝伐珠单抗低剂量组;D. 贝伐珠单抗高剂量组;红色箭头所指为凋亡细胞

A. control group; B. model group; C. avastin low-dose group; D. avastin high-dose group; apoptotic cells are indicated by red arrows

图 3　各组小鼠视网膜细胞凋亡情况(TUNEL,×400)

Fig 3　Apoptosis of retinal cells in mice in each group (TUNEL, ×400)

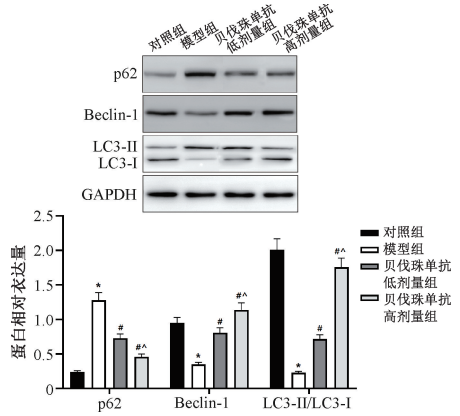
2.7　玻璃体腔注射贝伐珠单抗对小鼠视网膜自噬相关蛋白表达的影响

免疫荧光染色检测小鼠视网膜 LC3 蛋白表达结果显示,模型组小鼠视网膜内荧光明显弱于对照组,表明 LC3 蛋白表达减少;贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠视网膜荧光明显强于模型组,表明 LC3 蛋白表达增加;贝伐珠单抗高剂量组小鼠视网膜荧光明显强于贝伐珠单抗低剂量,表明 LC3 蛋白表达进一步增加。

蛋白质印迹法检测结果显示,各组小鼠视网膜组织 p62、Beclin-1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值比较,差异均有统计学意义(F 分别为 56.259、105.890 及 78.314,P<0.05)。进一步两两比较:与对照组比较,模型组小鼠视网膜 p62 蛋白表达显著上调,Beclin-1 蛋白表达、LC3-II/LC3-I 比值显著下调(P<0.05);与模型组比较,贝伐珠单抗低、高剂量组小鼠 p62 蛋白表达显著下调,Beclin-1 蛋白表达、LC3-II/LC3-I 比值显著上调(P<0.05);与贝伐珠单抗低剂量组比较,贝伐珠单抗高剂量组小鼠 p62 蛋白表达显著下调,Beclin-1 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值显著上调(P<0.05),上述差异均有统计学意义,见图 4。

3　讨论

衰老是 AMD 发展的重要危险因素,此外,血压升高、动脉粥样硬化和糖尿病视网膜病变等也会增加患 AMD 的风险[9-11]。目前,激光、移植视网膜色素上皮细胞、抗血管内皮生长因子及基因治疗等方法可以减缓 AMD 的进展[12],然而,AMD 发病机制复杂,彻底治愈仍存在困难,因此,改进现有的治疗方法以及开发新型 AMD 治疗途径是十分必要的。此外,保持健康的生活方式对于降低 AMD 的风险也具有重要意义。本研究经过 $NaIO_3$ 诱导小鼠后,模型组小鼠眼底玻璃膜疣数量



与对照组比较,$^*P$<0.05;与模型组比较,$^\#P$<0.05;与贝伐珠单抗低剂量组比较,$^\wedge P$<0.05

vs. the control group, $^*P$<0.05; *vs.* the model group, $^\#P$<0.05; *vs.* the avastin low-dose group, $^\wedge P$<0.05

图 4　蛋白质印迹法检测各组小鼠视网膜内自噬相关蛋白表达

Fig 4　Expression of autophagy-related proteins detected by Western blotting in retina of mice in each group

较多,FFA 结果显示视网膜血管内出现多个渗漏区,视网膜厚度降低,a 波和 b 波的振幅也均降低,以上结果均显示 AMD 小鼠造模成功。

视网膜是人体耗氧量较高的组织之一,氧化应激的积累在 AMD 的病理生理过程中起着重要作用,氧化应激的主要特征为 ROS 水平升高,导致细胞蛋白质、脂质和 DNA 的形态学损伤和功能弱化。视网膜的代谢非常活跃,需要维持正常的生理功能,因此,可以消耗大量氧气并产生许多 ROS,而视网膜色素上皮的累积氧化损伤主要由 ROS 的产生和消除之间不平衡引起。高氧代谢、高浓度多不饱和脂肪酸和光敏剂的存在会导致视网膜中过量产生 ROS,脂褐质是 ROS 的主要来源,随着年龄的增长其会在视网膜色素上皮中积累,进一步增强视网膜中的氧化应激反应[13-14]。视网膜色素上皮细胞负责光感受器外段的吞噬作用,光感受器外段含有大量不饱和脂肪酸,在吞噬过程中,吞噬体内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶或过氧化物酶会氧化光感受器外段中的脂肪酸,产生大量的 ROS。当 ROS 过度积累时会引发氧化应激反应,导致细胞结构和功能紊乱,造成视网膜损伤[15]。本研究结果显示,AMD 模型小鼠发生了氧化应激反应,而玻璃体腔注射贝伐珠单抗小鼠的氧化反应明显减轻,说明贝伐珠单抗具有抑制氧化应激诱导损伤的作用。

自噬是一种广泛存在于真核细胞中的溶酶体依赖性过程,可分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬可以是选择性或者非选择性,属于主要的自噬途径。在该过程中,受损的细胞器和蛋白质聚集体被双膜液泡吞没形成自噬体,然后转运至溶酶体形成自噬溶酶体进行最终的降解[16]。相关研究结果发现,视网膜色素上皮细胞是 AMD 发生病理改变的主要部位,视网膜色素上皮细胞自噬功能障碍在 AMD 的发生发展中起关键作用,与健康的视网膜色素上皮细胞相比,来自 AMD 供体的视网膜色素上皮细胞中的自噬通量水平明显降

低[17-18]。本研究结果发现,AMD 小鼠视网膜内自噬水平受到抑制,AMD 小鼠玻璃体腔注射贝伐珠单抗后视网膜内自噬水平增强,由此推测,贝伐珠单抗能够通过促进自噬水平对 AMD 小鼠视网膜起到保护作用。此外,自噬还被认为是 AMD 氧化应激的关键调节机制。自噬作为主要的蛋白质降解系统之一,对于维持视网膜色素上皮和光感受器细胞的稳态至关重要。在 AMD 中,退行性视网膜色素上皮细胞中的内吞-吞噬体和自噬途径受到干扰,可能导致蛋白水解和氧化应激增加,从而导致对有丝分裂后的视网膜色素上皮细胞造成不可逆损伤[19-21]。由于视网膜色素上皮细胞在 AMD 的发展过程中暴露于持续的氧化应激中,因此会使自噬在氧化应激反应中得到增强,以去除氧化损伤的蛋白质和细胞器,所以说增强自噬可以减轻 AMD 的氧化应激,保护视网膜色素上皮和光感受器细胞免于发生变性。

综上所述,本研究证实了通过玻璃体腔注射贝伐珠单抗能改善 $NaIO_3$ 诱导的 AMD 小鼠视网膜形态的损伤,保护视网膜功能及血管的完整性,抑制氧化应激反应,该作用可能是通过促进自噬水平实现的,为阐明 AMD 的病理机制及治疗研究提供了新思路。

参考文献

[1] STAHL A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration[J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(29/30): 513-520.

[2] KNIGGENDORF V, DREYFUSS J L, REGATIERI C V. Age-related macular degeneration: a review of current therapies and new treatments[J]. Arq Bras Oftalmol, 2020, 83(6): 552-561.

[3] SOMASUNDARAN S, CONSTABLE I J, MELLOUGH C B, et al. Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: a review of major disease mechanisms[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2020, 48(8): 1043-1056.

[4] GUIMARAES T A C D, GEORGIOU M, BAINBRIDGE J W B, et al. Gene therapy for neovascular age-related macular degeneration: rationale, clinical trials and future directions[J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105(2): 151-157.

[5] GARCIA J, HURWITZ H I, SANDLER A B, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102017.

[6] MELOSKY B, REARDON D A, NIXON A B, et al. Bevacizumab biosimilars: scientific justification for extrapolation of indications [J]. Future Oncol, 2018, 14(24): 2507-2520.

[7] 孙京晶. 眼底病患者应用玻璃体腔注射 Avastin 治疗的临床疗效及可行性研究[J]. 中国疗养医学, 2017, 26(7): 758-759.

[8] 张艳莉, 赵岐, 黄强. P2X7 受体阻断对碘酸钠诱导的年龄相关性黄斑变性小鼠 NLRP3/Caspase-1 通路的影响[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(7): 865-869, 封 2.

[9] HEESTERBEEK T J, LORÉS-MOTTA L, HOYNG C B, et al. Risk factors for progression of age-related macular degeneration[J]. Ophthalmic Physiol Opt, 2020, 40(2): 140-170.

[10] DIGHE S, ZHAO J W, STEFFEN L, et al. Diet patterns and the incidence of age-related macular degeneration in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. Br J Ophthalmol, 2020, 104(8): 1070-1076.

[11] LAM N C V. Adult eye conditions: diabetic retinopathy and age-related macular degeneration[J]. FP Essent, 2022, 519: 24-28.

[12] SHARMA R, BOSE D, MAMINISHKIS A, et al. Retinal pigment epithelium replacement therapy for age-related macular degeneration: are we there yet? [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2020, 60: 553-572.

[13] LIU Y L, LI R C, XIE J, et al. Protective effect of hydrogen on sodium iodate-induced age-related macular degeneration in mice [J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 389.

[14] KAARNIRANTA K, PAWLOWSKA E, SZCZEPANSKA J, et al. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2374.

[15] BLASIAK J. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(5): 789-805.

[16] WANG S B, WANG X R, CHENG Y Q, et al. Autophagy dysfunction, cellular senescence, and abnormal immune-inflammatory responses in AMD: from mechanisms to therapeutic potential[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3632169.

[17] KAARNIRANTA K, TOKARZ P, KOSKELA A, et al. Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration[J]. Cell Biol Toxicol, 2017, 33(2): 113-128.

[18] HYTTINEN J M T, VIIRI J, KAARNIRANTA K, et al. Mitochondrial quality control in AMD: does mitophagy play a pivotal role? [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(16): 2991-3008.

[19] KEELING E, LOTERY A J, TUMBARELLO D A, et al. Impaired cargo clearance in the retinal pigment epithelium (RPE) underlies irreversible blinding diseases[J]. Cells, 2018, 7(2): 16.

[20] MITTER S K, SONG C J, QI X P, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD[J]. Autophagy, 2014, 10(11): 1989-2005.

[21] ZHANG Z Y, BAO X L, CONG Y Y, et al. Autophagy in age-related macular degeneration: a regulatory mechanism of oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 2896036.

(收稿日期:2022-05-30　修回日期:2022-11-01)

(上接第 280 页)

[22] ASKARI V R, SHAFIEE-NICK R. The protective effects of β-caryophyllene on LPS-induced primary microglia M1/M2 imbal-ance: a mechanistic evaluation[J]. Life Sci, 2019, 219: 40-73.

[23] ORECCHIONI M, GHOSHEH Y, PRAMOD A B, et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1084.

(收稿日期:2022-05-31　修回日期:2022-08-30)