

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.04.01

◆ 论著 ◆

Amyloid beta 通过激活 NLRP3 炎症小体在湿性年龄相关性黄斑变性发病中的分子机制研究

齐贲, 高珊, 史强, 程育宏

(西安交通大学第一附属医院眼科, 陕西 西安 710061)

【摘要】目的: 探讨 Amyloid beta(A β)通过激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NLRP3)炎症小体在湿性年龄相关性黄斑变性发病中的分子机制。**方法:** 30 只 C57BL/6J 小鼠按数表法随机分为对照组、实验 1 组与实验 2 组, 每组各 10 只。实验 1 组与实验 2 组进行 A β 玻璃体腔注射, 注入剂量为 1 μ L(1 μ mmol/L)A β 与 10 μ L(1 μ mmol/L)A β , 对照组玻璃体腔内注射等量生理盐水。检测小鼠视网膜功能与 NLRP3 炎症小体表达变化情况。**结果:** 所有小鼠在注射后 7 d 与 14 d 的视网膜各层结构清晰、细胞排列整齐, 未出现炎症细胞浸润与明显的组织结构紊乱。玻璃体注射后 7 d 与 14 d, 实验 1 组与实验 2 组的视网膜 a 波振幅、b 波振幅均低于对照组, 且实验 2 组低于实验 1 组 ($P < 0.05$)。实验 1 组与实验 2 组玻璃体中的 IL-6、TNF- α 值与 NLRP3、Caspase-1 蛋白相对表达水平高于对照组, 且实验 2 组高于实验 1 组 ($P < 0.05$)。玻璃体注射后 7 d 与 14 d, 实验 1 组与实验 2 组眼球中的 SOD 活性低于对照组, 且实验 2 组低于实验 1 组 ($P < 0.05$)。**结论:** A β 可通过激活 NLRP3 炎症小体的表达, 抑制 SOD 活性, 诱发炎症因子的释放, 从而在湿性年龄相关性黄斑变性发病中发挥重要作用。

【关键词】 Amyloid beta; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3; 炎症小体; 湿性年龄相关性黄斑变性

【中图分类号】 R774.5 **【文献标志码】** A

Molecular mechanism of the activation of NLRP3 inflammatory corpuscles by amyloid beta in the pathogenesis of wet age-related macular degeneration

QI Yun, GAO Shan, SHI Qiang, CHENG Yu-hong

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective: To investigate molecular mechanism of the activation of NLRP3 inflammatory corpuscles by amyloid beta (A β) in the pathogenesis of wet age-related macular degeneration. **Methods:** 30 cases of C57BL / 6J mice were divided into three groups, the control group, experimental group 1 and experimental group 2, with 10 cases in each group. Experimental group 1 and group 2 were injected with A β vitreous cavity, the injection dose were 1 μ l (1 μ mmol/L) A β and 10 μ l (1 μ mmol/L) A β , and the control group were injected with the same amount of normal saline. The changes of mouse retinal function and expression of NLRP3 inflammatory bodies were detected. **Results:** All the retinal layers at 7 d and 14 d after vitreous injection were clear in all the mice, and the cells were arranged neatly. There were no inflammatory cell infiltration and obvious tissue structural disorder. At 7 d and 14 d after vitreous injection, the retinal a-wave amplitude and b-wave amplitude of the experimental group 1 and experimental group 2 were lower than those of the control group, and the experimental group 2 was lower than experimental group 1 ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-6, TNF- α , NLRP3, and Caspase-1 proteins in the vitreous of the experimental group 1 and the experimental group 2 were higher than those of the control group, and the experimental group 2 were also higher than the experimental group 1 ($P < 0.05$). At 7 d and 14 d after the vitreous injection, the SOD activity in the eyeballs of the experimental group 1 and the experimental group 2 were lower than that of the control group, and the experimental group 2 were also lower than that of the experimental group 1 ($P < 0.05$). **Conclusion:** A β can activate the expression of NLRP3 inflammatory corpuscles and induce the release of inflammatory factors, inhibit SOD activity, thus playing an important role in the pathogenesis of wet age-related macular degeneration.

【Key words】 Amyloid beta; NLRP3; Inflammatory corpuscles; Wet age-related macular degeneration

湿性年龄相关性黄斑变性(wet age-related macular degeneration, AMD)是目前临床上常见的致盲性

眼病,常在 50 岁以后发病^[1]。该病也是与遗传和环境相关的多种因素作用造成的黄斑退化性病理改变,也是导致中心视力受损的眼底疾病^[2],其病因包括高血压、吸烟、动脉硬化、饮食、阳性家族史、紫外线等。研究^[3]显示,湿性年龄相关性黄斑变性患者的脉络膜毛细血管发生地图样萎缩,形成瘢痕组织,造成正常视网膜和脉络膜破坏,导致中心视力受损。炎症小体是由多种蛋白组成的复合体,是体内免疫炎症反应的核心,可被很多损伤性刺激活化,激活下游的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18,介导细胞炎症反应^[4]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors 3, NLRP3) 炎症小体是目前研究最为广泛的炎症小体,在湿性年龄相关性黄斑变性的发生发展中, NLRP3 炎症小体发挥着重要的作用^[5]。体外实验表明当视网膜细胞在受到外界刺激物攻击后, NLRP1 及 NLRP3 炎症小体活化,信号通路下游炎症因子 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IL-33 以及 TNF- α 等分泌增加,同时抗炎因子 IL-37 等明显减低^[6]。Amyloid beta (A β) 是玻璃膜疣的主要成分之一,可以刺激视网膜细胞分泌炎症因子和血管生成因子,这可能是玻璃膜疣参与湿性年龄相关性黄斑变性发病的重要原因之一^[7-8]。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 属于参与氧化应激的高活性分子之一,研究^[9]显示, SOD 可通过使细胞免受氧化还原损伤从而发挥保护组织细胞的作用,而对于 AMD, SOD 可能仅在视网膜局部发挥作用。因此,推测在 AMD 发病早期, NLRP3 等炎症小体活化相关的炎症反应可引起视网膜病变的形成,导致 AMD 的发生。本项目通过研究 A β 及 NLRP3 炎症小体活化在 AMD 发展中的作用机制,以期确立新的分子生物学靶标,为寻找新的 AMD 治疗靶点提供依据。现将研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物使用遵循伦理要求,实验操作步骤经本院动物伦理委员会批准。C57BL/6J 小鼠 30 只 (许可证号: SCXK2019-0001; No. 1001455, 都为雄性) 购买于美国 Jackson Laboratories, 在本院实验动物中心饲养, 6~8 周龄, 体重 18~25 g。小鼠饲养环境: 给予足够的食物和水, 室温 22~25 $^{\circ}\text{C}$, 光照为明暗循环 12 h/12 h。

A β 1-40 购自美国 Sigma 公司, 炎症因子 (IL-6、TNF- α) 检测试剂盒购自上海生工公司, 抗 NLRP3 抗体、抗 Caspase-1 抗体购自美国 BD 公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组与处理 30 只 C57BL/6J 小鼠数表法随机分为对照组、实验 1 组与实验 2 组, 每组各 10 只。实验 1 组与实验 2 组给予 A β 玻璃体腔注射, 过程如下: C57BL/6J 小鼠 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 复方托吡卡胺散瞳, 盐酸布比卡因表面麻醉, 将小鼠的头部固定于显微镜下, 打开眼睑, 充分暴露眼球, 用微量注射器由角膜缘 15 $^{\circ}$ 斜向下进入玻璃体腔, 分别快速注入 1 μL (1 $\mu\text{mmol/L}$) A β 与 10 μL (1 $\mu\text{mmol/L}$) A β 。对照组玻璃体腔内注入等量生理盐水。所有小鼠注射进针时注意避开晶状体, 注意不要损伤周围组织, 退针时要快速准确, 注射完毕后采用林可霉素眼药水滴眼。

1.2.2 观察指标 在玻璃体注射后 7 d 与 14 d, 每组随机挑选 5 只小鼠检测以下指标。(1) 视网膜形态学及功能学检测: 注射后 7 d 与 14 d 后进行眼电生理检测, 采用视网膜电图检测视觉功能, 包括 a 波振幅与 b 波振幅, 光刺激强度为 1.0 log cd. s/m²。同时取出眼球, 固定后石蜡切片, 切片沿角膜-视神经轴方向进行 (厚度为 4 μM 左右)。脱蜡和酒精水化后, 苏木精染色、水洗、伊红染色、脱水、二甲苯透明后中性树脂封片, 观察 A β 对视网膜厚度及结构的影响。(2) ELISA 等方法检测玻璃体中 IL-6、TNF- α 的表达变化情况; Western blot 法检测视网膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白 (NLRP3、Caspase-1) 表达情况。(3) 同时取眼球组织, 充分剪碎匀浆, 采用黄嘌呤法在 550 nm 波长下的吸光度值并计算 SOD 活性。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行分析处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两对比为 *t* 检验, 多组间对比采用 One-way ANOVA 方法分析; 计数资料以 [*n* (%)] 表示, 两两对比用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三组不同时间点的视网膜功能比较

玻璃体注射后 7 d 与 14 d, 实验 1 组与实验 2 组的视网膜 a 波振幅与 b 波振幅都低于对照组, 且实验 2 组低于实验 1 组, 差异比较有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 视网膜形态对比

所有小鼠在玻璃体注射后 7 d 与 14 d 的视网膜各层结构清晰、细胞排列整齐, 未出现炎症细胞浸润与明显的组织结构紊乱。见图 1。

2.3 三组不同时间点玻璃体中炎症因子表达水平比较

玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组玻璃体中的 IL-6、TNF- α 值高于对照组,且实验 2 组高于实验 1 组,差异比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 三组不同时间点视网膜 NLRP3、Caspase-1 蛋白相对表达水平比较

玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组视网膜中的 NLRP3、Caspase-1 蛋白相对表达水平高于对照组,且实验 2 组高于实验 1 组,差异比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

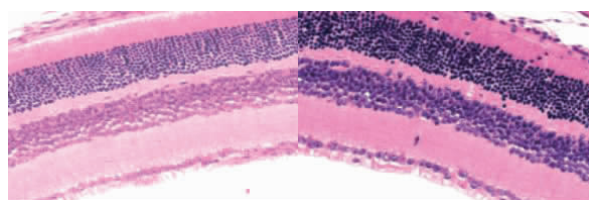


图 1 视网膜形态

A.注射后 7 d 视网膜;B.注射后 14 d 视网膜。

表 1 三组不同时间点的视网膜功能比较 ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

组别	7 d		14 d	
	a 波振幅	b 波振幅	a 波振幅	b 波振幅
对照组 ($n=5$)	80.02 \pm 6.78	287.83 \pm 18.92	102.85 \pm 7.14	288.14 \pm 16.77
实验 1 组 ($n=5$)	50.55 \pm 4.19*	243.87 \pm 20.19*	78.89 \pm 8.13*	234.77 \pm 18.92*
实验 2 组 ($n=5$)	34.98 \pm 5.10*#	200.79 \pm 18.74*#	56.98 \pm 9.11*#	202.76 \pm 12.75*#
F 值	87.662	25.440	39.464	34.807
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与实验 1 组相比。

表 2 三组不同时间点玻璃体中炎症因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	7 d		14 d	
	IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
对照组 ($n=5$)	3.13 \pm 0.22	2.83 \pm 0.13	3.09 \pm 0.14	2.88 \pm 0.16
实验 1 组 ($n=5$)	5.98 \pm 0.31*	6.09 \pm 0.22*	6.02 \pm 0.13*	6.11 \pm 0.18*
实验 2 组 ($n=5$)	12.19 \pm 0.41*#	12.65 \pm 0.56*#	12.77 \pm 0.42*#	13.00 \pm 0.51*#
F 值	1 029.835	990.325	1 736.141	1 259.979
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与实验 1 组相比。

表 3 三组不同时间点视网膜 NLRP3、Caspase-1 蛋白相对表达水平对比 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	7 d		14 d	
	NLRP3	Caspase-1	NLRP3	Caspase-1
对照组 ($n=5$)	0.93 \pm 0.11	1.29 \pm 0.13	0.99 \pm 0.02	1.34 \pm 0.12
实验 1 组 ($n=5$)	4.52 \pm 0.12*	6.09 \pm 0.12*	4.67 \pm 0.19*	6.87 \pm 0.18*
实验 2 组 ($n=5$)	8.20 \pm 0.19*#	9.76 \pm 0.22*#	7.10 \pm 0.13*#	9.09 \pm 0.17*#
F 值	3 166.270	3 395.540	2 658.212	3 156.268
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与实验 1 组相比。

2.5 三组不同时间点眼球 SOD 活性比较

玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组眼球中的 SOD 活性低于对照组,且实验 2 组低于实验 1 组,差异比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 三组不同时间点眼球 SOD 活性比较 ($\bar{x} \pm s, \text{U/mL}$)

组别	7 d	14
	对照组 ($n=5$)	116.92 \pm 11.32
实验 1 组 ($n=5$)	69.24 \pm 10.22*	65.98 \pm 9.11*
实验 2 组 ($n=5$)	50.01 \pm 9.11*#	54.87 \pm 5.18*#
F 值	56.405	57.794
P 值	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$,与对照组相比;# $P < 0.05$,与实验 1 组相比。

3 讨论

湿性年龄相关性黄斑变性在中老年人群中比较常见,以脉络膜新生血管形成为特征,常可引起黄斑区出血纤维瘢痕化^[10]。该病目前的治疗手段有限,已有的治疗药物费用比较昂贵,部分患者最终会出现耐药状况。目前湿性年龄相关性黄斑变性的发病机制还不明确,涉及到遗传、基因易感、氧化应激、免疫炎症等多种学说^[11]。炎症小体是固有免疫的关键成分,其与眼病、肿瘤、自身免疫病、糖尿病等多种疾病的发生和发展关系紧密,其激活也被认为是视网膜疾病的一种内在表现^[12]。已有研究^[13]显示,

NLRP3 炎症小体存在于萎缩型和渗出型年龄相关性黄斑变性的视网膜细胞及毗连的玻璃膜疣中,视网膜细胞溶酶体破坏和组织蛋白酶释放可激活炎症小体并促使炎症因子的分泌。而在激光诱导形成的渗出型年龄相关性黄斑模型中,相较于野生型和 IL-1 受体敲除小鼠, NLRP3 基因敲除小鼠视网膜下出血加重,黄斑形成增多,表明 NLRP3 炎症小体参与了湿性年龄相关性黄斑变性的病理过程^[14]。因此,本项目开展了 Amyloid beta 通过激活 NLRP3 炎症小体在湿性年龄相关性黄斑变性发病中的分子机制研究,拟通过基础实验,研究 A β 刺激 NLRP3 炎症小体活化在 AMD 中的作用,阐释 NLRP3 炎症小体的免疫炎症反应、表达变化、作用机制,证实两者之间的密切关系,以期确立新的分子生物学靶标。

本研究显示,小鼠在玻璃体注射后 7 d 与 14 d 的视网膜各层结构清晰、细胞排列整齐,未出现炎症细胞浸润与明显的组织结构紊乱。实验 1 组与实验 2 组玻璃体注射后 7 d 与 14 d 的视网膜 a 波振幅与 b 波振幅都低于对照组,且实验 2 组低于实验 1 组 ($P < 0.05$)。当前也有研究^[15]显示,在湿性年龄相关性黄斑变性出现临床症状前,玻璃膜疣中 A β 的积聚可使炎性小体、炎症细胞因子升高而使外层视网膜发生损伤。同时本研究中视网膜形态没有发生明显的改变,主要在于炎症因子的释放不能引起视网膜产生肉眼可见的炎症细胞浸润。以上结果均提示,A β 玻璃体腔注射可以有效的改善视网膜 a 波振幅与 b 波振幅。雷春燕等^[16]通过向小鼠玻璃体腔注射不同浓度的 A β 检测小鼠视网膜功能发现 A β 各组视网膜功能均发生不同程度的损害,具体表现为视网膜 a 波振幅与 b 波振幅均显著降低。

炎症是机体受到内外在刺激时发生的重要防御反应,与免疫系统活化密切相关。炎症小体可被多种病原体或损伤信号激活,也是由胞内模式识别受体参与组装的多蛋白复合物,是固有免疫的重要组成部分^[17]。本研究结果显示,在玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组玻璃体中的 IL-6、TNF- α 水平高于对照组,且实验 2 组高于实验 1 组 ($P < 0.05$),提示注射 A β 后能够引起 IL-6、TNF- α 高表达,说明 IL-6、TNF- α 参与了 AMD 发病的相关炎症机制,这可能是因为以上三种炎症因子通过结合视网膜细胞表面受体发挥了促进炎症反应的作用。从机制上分析,在年龄相关性黄斑变性发病早期,炎症反应可引起视网膜病变的形成,导致疾病的发生。一项临床研究显示,A β 能够通过此刺激人视网膜上皮细胞诱导炎症体活化,诱导 IL-6、IL-8、TNF- α 、

IL33 等因子转录和蛋白表达,可能提示 A β 通过上调 IL-6、IL-8、TNF- α 、IL33 等因子的表达,参与了 AMD 的发生和发展^[18]。已有研究证实无菌性炎症反应在湿性年龄相关性黄斑变性的发生发展中具有重要作用。

NLRP3 作为 NLRPs 家族成员之一,通过识别病原相关分子模式或损伤相关分子模式,可与 Caspase-1 结合形成多蛋白复合物,也就是 NLRP3 炎症小体。本研究显示,玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组视网膜中的 NLRP3、Caspase-1 蛋白相对表达水平都高于对照组,且实验 2 组高于实验 1 组 ($P < 0.05$),可能是因为年龄相关性黄斑变性患者的玻璃膜疣成分 A β 可以激活 NLRP3 导致 Caspase-1 激活引起视网膜色素上皮细胞萎缩,进而引起视网膜病变的形成。同时视网膜髓样细胞的炎症反应引起 NLRP3 激活,抑制视网膜新生血管的形成,而玻璃膜疣中成分能够促进 NLRP3 的激活,玻璃体注射后 7 d 与 14 d,实验 1 组与实验 2 组眼球中的 SOD 活性低于对照组,且实验 2 组低于实验 1 组 ($P < 0.05$),提示 A β 能够显著降低眼球中的 SOD 活性,导致小鼠眼球组织中自由基损伤效应加剧,从而引起视网膜功能明显下降。从机制上分析,A β 能使视网膜功能受损,其诱导的视网膜产生的炎症因子和激活的炎性小体可导致视网膜产生二次损伤,也可增加氧化因子表达水平,抑制 SOD 活性,促进视网膜细胞凋亡,加剧视网膜氧化损伤^[16]。

总之,A β 可通过激活 NLRP3 炎症小体的表达,诱发炎症因子的释放,抑制 SOD 活性,从而在湿性年龄相关性黄斑变性发病中发挥重要作用。本研究也有一定的不足,没有进行细胞水平的研究分析,也未进行信号通路分析,将在后续研究中进一步探讨。

参考文献

- [1] 李铭,魏伟. 湿性年龄相关性黄斑变性的治疗进展[J]. 国际眼科杂志,2015,15(2):251-254.
- [2] 胡军平,杨华,李国栋,等. 光动力疗法联合玻璃体内注射雷珠单抗治疗湿性年龄相关性黄斑变性后黄斑区中心视野的改变[J]. 眼科新进展,2015,35(11):1039-1043.
- [3] Kuehlewein L, Dustin L, Sagong M, et al. Predictors of Macular Atrophy Detected by Fundus Autofluorescence in Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration After Long-Term Ranibizumab Treatment[J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina,2016,47(3):224-231.
- [4] 吴丹,周树生. 炎症小体调控机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2015,43(1):59-63.

(下转第 567 页)