

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2301036

论著·实验研究

## 基于HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴探讨褪黑素对氧诱导视网膜病变的保护作用

褚芳芳<sup>1</sup> 赵岩松<sup>2</sup> 赵玉泽<sup>2</sup> 白晨<sup>1</sup> 肖培伦<sup>1</sup> 王晓莉<sup>3</sup> 于树娜<sup>1</sup> 蒋吉英<sup>1</sup>

(1. 潍坊医学院人体解剖学教研室, 山东潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院眼科中心, 山东潍坊 261031; 3. 潍坊医学院医学影像学院, 山东潍坊 261053)

**[摘要]** **目的** 观察褪黑素(melatonin, Mel)对新生小鼠氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)的保护作用,并探讨HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴在其中的作用。**方法** 7日龄C57BL/6J新生小鼠随机分为对照组、模型组(OIR组)及Mel处理组(OIR+Mel组),各组n=9。采用高氧诱导法制备OIR模型。苏木精-伊红染色和视网膜铺片法检测视网膜结构和新生血管;免疫荧光染色法检测HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴相关蛋白和炎症因子及淋巴细胞抗原6G表达;比色法检测髓过氧化物酶活性。**结果** OIR组视网膜结构被破坏,出现大片无灌注区和新生血管,OIR+Mel组可见破坏的视网膜结构改善,新生血管和无灌注区减少。与对照组相比,OIR组HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴相关蛋白和炎症因子表达升高(均P<0.05),淋巴细胞抗原6G表达和髓过氧化物酶活性升高(均P<0.05);Mel处理后,上述各指标降低(均P<0.05)。与对照组相比,OIR组视网膜中褪黑素受体表达降低;Mel处理后,褪黑素受体表达较OIR组升高(均P<0.05)。**结论** Mel可能通过抑制HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴减轻OIR新生小鼠视网膜损伤,且可能通过褪黑素受体途径发挥作用。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25 (6): 645-652]

**[关键词]** 褪黑素; 氧诱导视网膜病变; HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3轴; 炎症; 新生小鼠

### Protective effect of melatonin against oxygen-induced retinopathy: a study based on the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis

CHU Fang-Fang, ZHAO Yan-Song, ZHAO Yu-Ze, BAI Chen, XIAO Pei-Lun, WANG Xiao-Li, YU Shu-Na, JIANG Ji-Ying. Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China (Jiang J-Y, Email: jiangjiy@wfmc.edu.cn); Ophthalmology Center, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261031, China (Zhao Y-S, Email: zhaoyansong74@163.com)

**Abstract: Objective** To study the protective effect of melatonin (Mel) against oxygen-induced retinopathy (OIR) in neonatal mice and the role of the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis. **Methods** Neonatal C57BL/6J mice, aged 7 days, were randomly divided into a control group, a model group (OIR group), and a Mel treatment group (OIR+Mel group), with 9 mice in each group. The hyperoxia induction method was used to establish a model of OIR. Hematoxylin and eosin staining and retinal flat-mount preparation were used to observe retinal structure and neovascularization. Immunofluorescent staining was used to measure the expression of proteins and inflammatory factors associated with the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis and lymphocyte antigen 6G. Colorimetry was used to measure the activity of myeloperoxidase. **Results** The OIR group had destruction of retinal structure with a large perfusion-free area and neovascularization, while the OIR+Mel group had improvement in destruction of retinal structure with reductions in neovascularization and perfusion-free area. Compared with the control group, the OIR group had significant increases in the expression of proteins and inflammatory factors associated with the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis, the expression of lymphocyte antigen 6G, and the activity of myeloperoxidase.

[收稿日期] 2023-01-12; [接受日期] 2023-05-08

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2022MH011); 山东省医药卫生科技发展计划项目(202001020642); 国家自然科学基金(82071888)。

[作者简介] 褚芳芳,女,硕士研究生。

[通信作者] 蒋吉英,女,教授,Email: jiangjiy@wfmc.edu.cn; 赵岩松,男,教授,Email: zhaoyansong74@163.com。

( $P<0.05$ ). Compared with the OIR group, the OIR+Mel group had significant reductions in the above indices ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the OIR group had significant reductions in the expression of melatonin receptors in the retina ( $P<0.05$ ). Compared with the OIR group, the OIR+Mel group had significant increases in the expression of melatonin receptors ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Mel can alleviate OIR-induced retinal damage in neonatal mice by inhibiting the HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis and may exert an effect through the melatonin receptor pathway.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(6): 645-652]

**Key words:** Melatonin; Oxygen-induced retinopathy; HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis; Inflammation; Neonatal mouse

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是一种以视网膜新生血管为特征的视网膜病变, 随着早产儿存活率的提高, ROP 的发病率也显著提高, 已成为儿童致盲的主要原因之一<sup>[1]</sup>。然而, ROP 的发病机制尚不明确, 缺乏明确的治疗措施。因此, 探索 ROP 的相关机制及新的治疗方法具有重要的临床意义。氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 新生小鼠模型可以较好地模拟高氧刺激后视网膜血管闭塞和新生血管的形成, 是研究 ROP 的经典模型。以往的研究多侧重于血管新生, 近年来的研究显示, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体介导的炎症也参与了 OIR 的病理进程, 提示抑制炎症反应亦可作为 ROP 的治疗靶点。褪黑素 (melatonin, Mel) 是一种具有抗炎、抗氧化、抗凋亡作用的内分泌激素<sup>[2-3]</sup>, 已有研究证实 Mel 对 ROP、视网膜缺血再灌注损伤等眼部疾病有保护作用<sup>[4-5]</sup>。由此推测 Mel 可能通过抑制 NLRP3 炎性小体的活化减轻 OIR。为验证上述假说, 本研究通过建立 OIR 新生小鼠模型, 观察 HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 轴在 Mel 对新生小鼠 OIR 保护作用中的影响, 以期 Mel 在 ROP 中的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验分组及模型建立

健康成年 C57BL/6J 小鼠 20 只 (山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司), 体重 22~25 g, SPF 级, 常规鼠颗粒饲料喂养, 雄鼠与雌鼠按 1:3 比例合笼。取 27 只自然分娩喂养至出生后第 7 天 (postnatal day 7, P7) 的新生小鼠进行实验, 雌雄不限, 体重  $3.13 \pm 0.16$  g。将 P7 新生小鼠随机分为对照组 ( $n=9$ )、模型组 (OIR 组,  $n=9$ ) 与 Mel 处理组 (OIR+Mel 组,  $n=9$ )。参照文献 [6] 建立 OIR 小鼠模型, 即将哺乳母鼠与 P7 新生小鼠置于氧气体积分数为  $75\% \pm 2\%$  的氧舱 (DYC-I, 武汉

七〇一研究所) 内饲养 5 d, 隔日更换母鼠和垫料、加食换水。于 P12 时移出氧箱, 置于常氧环境继续饲养 5 d。对照组小鼠在常氧环境中饲养。Mel 处理组从 P12 开始, 每日上午 8:00 腹腔注射 Mel 10 mg/kg (美国 Sigma 公司)<sup>[4]</sup>, 连续 5 d, 于 P17 时处死动物、取材。

### 1.2 视网膜铺片法观察视网膜新生血管

P17 小鼠乙醚麻醉后固定, 暴露心脏, 剪开右心耳, 从左心室依次注入 0.9% 氯化钠溶液、4% 多聚甲醛溶液、5% 明胶墨汁 (上海晨光墨汁), 以口、鼻、四肢呈黑色为灌注成功, 冰上静置 30 min 使明胶墨汁凝固后取眼, 置于 4% 多聚甲醛固定 2 h。在体视显微镜下沿角巩膜缘剪开眼球, 分离巩膜和脉络膜, 去除晶状体、残存的玻璃体及色素, 以视神经乳头为中心沿鼻上、鼻下、颞上、颞下 4 个方向将视网膜剪为四叶草形状, 置于准备好的载玻片上, 甘油明胶封片, 研究级正置光学显微镜下观察并拍照。

### 1.3 标本的采集及处理

P17 小鼠乙醚麻醉下摘取眼球, 去除角膜及晶状体, 用 4% 多聚甲醛固定过夜, 常规石蜡包埋, 连续切片 (厚  $4 \mu\text{m}$ ), 每 3~5 张切片取 1 张切片, 分别行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色及免疫荧光染色; 取眼后保留视网膜组织, 称重, 行髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性检测。

### 1.4 HE 染色

石蜡切片, 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 采用 HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 染色, 苏木素染核 10 min, 盐酸酒精分化 30 s, 去离子水冲洗, 伊红胞浆染色 2 min, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。于光学显微镜下观察视网膜结构、计数突破内界膜的血管内皮细胞核数。

### 1.5 免疫荧光染色

石蜡切片, 脱蜡水化、抗原修复、0.3% TritonX-100 透膜、5% BSA-PBS 封闭 2 h, 分别加入兔抗 NLRP3 (1:100, 英国 Affinity 公司)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like

protein, ASC) (1 : 200, 北京博奥森生物技术有限公司)、半胱氨酸蛋白水解酶-1 前体 (procaspase-1) (1 : 100, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)、剪切的半胱氨酸蛋白水解酶-1 (cleaved-caspase-1, 1 : 100, 英国 Affinity 公司)、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$  (1 : 200, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) (1 : 100, 上海爱必信生物科技有限公司)、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- $\kappa$ B) (1 : 100, 北京博奥森生物技术有限公司)、淋巴细胞抗原 6G (lymphocyte antigen 6G, Ly-6G) (1 : 200, 美国 CST 公司)、褪黑素受体 1 (melatonin receptor 1, MT1) (1 : 50, 美国 ABBIOTEC 公司) 和褪黑素受体 2 (melatonin receptor 2, MT2) (1 : 100, 英国 Affinity 公司)、鼠抗 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) (1 : 200, 美国 Santa 公司)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) (1 : 100, 美国 Santa 公司) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日, 37 $^{\circ}$ C 复温, PBS 漂洗 3 次, 滴加 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 或 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗鼠 IgG 荧光二抗 (1 : 200, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 用含 DAPI 的荧光封片剂 (美国 Santa 公司) 封片。正置荧光显微镜下进行观察拍照, 并用 Image J 软件进行分析。

### 1.6 比色法检测 MPO 活性

将视网膜组织按重量体积比 1 : 19 加匀浆介质

制备成 5% 的组织匀浆, 按 MPO 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 说明书加入试剂后混匀, 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后取出, 吸取 200  $\mu$ L 于 96 孔板中, 立即用分光光度计在 450 nm 波长处测量各组的吸光度值。根据说明书提供公式, 计算 MPO 活力。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Mel 对 OIR 小鼠视网膜血管新生及视网膜形态结构的影响

视网膜铺片结果显示, OIR 组视网膜血管分布被破坏, 中央部出现大片无灌注区, 无灌注区附近出现新生血管, 新生血管呈团簇状, 分布紊乱; OIR+Mel 组视网膜的无灌注区和新生血管数量减少。HE 染色结果显示, OIR 组视网膜结构排列疏松紊乱, 可见细胞丢失和空泡化, 内界膜不完整, 突出内界膜的新生血管内皮细胞核数 ( $25.17 \pm 1.61$ ) 较对照组 ( $0.75 \pm 0.25$ ) 多; OIR+Mel 组视网膜的内界膜基本恢复平滑, 偶见细胞出现空泡变性, 突出内界膜的新生血管内皮细胞核数 ( $4.25 \pm 0.75$ ) 较 OIR 组减少, 各组比较, 差异均具有统计学意义 ( $F=489.006, P<0.001$ )。见图 1。

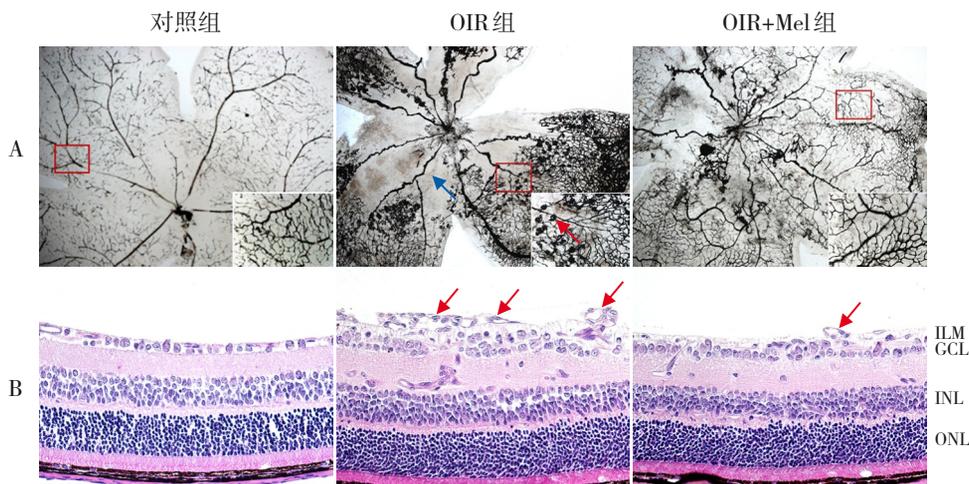


图 1 各组小鼠视网膜结构和新生血管变化 A: 视网膜铺片结果 (光学显微镜,  $\times 40$ )。OIR 组出现大量无灌注区和病理性新生血管, OIR+Mel 组视网膜的无灌注区和新生血管数量减少。蓝色箭头指示视网膜的无灌注区, 红色箭头指示新生血管。B: 苏木精-伊红染色结果 ( $\times 400$ )。OIR 组大量新生血管内皮细胞突出内界膜, OIR+Mel 组突出内界膜的新生血管内皮细胞核数减少。箭头指示突出内界膜的新生血管内皮细胞。[GCL] 神经节细胞层; [INL] 内核层; [ONL] 外核层; [ILM] 内界膜。

## 2.2 Mel对OIR小鼠视网膜NLRP3炎性小体相关因子表达的影响

免疫荧光染色显示, 对照组 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 $\beta$  阳性表达少, OIR 组和 OIR+Mel 组视网膜神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 与内核层 (inner nuclear layer, INL) 均可见其阳性表达, 且 OIR 组 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 $\beta$  阳性表达较对照组显著升高 ( $P<0.05$ ), OIR+Mel 组 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、cleaved-

caspase-1 和 IL-1 $\beta$  阳性表达较 OIR 组减少 ( $P<0.05$ )。见图 2、表 1。

## 2.3 Mel对OIR小鼠视网膜HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B表达的影响

免疫荧光染色显示, 对照组 HMGB1、TLR4 和 NF- $\kappa$ B 阳性表达较少, OIR 组和 OIR+Mel 组 GCL 与 INL 均可见其阳性表达, OIR+Mel 组 HMGB1、TLR4 和 NF- $\kappa$ B 阳性表达低于 OIR 组 ( $P<0.05$ )。见图 3、表 2。

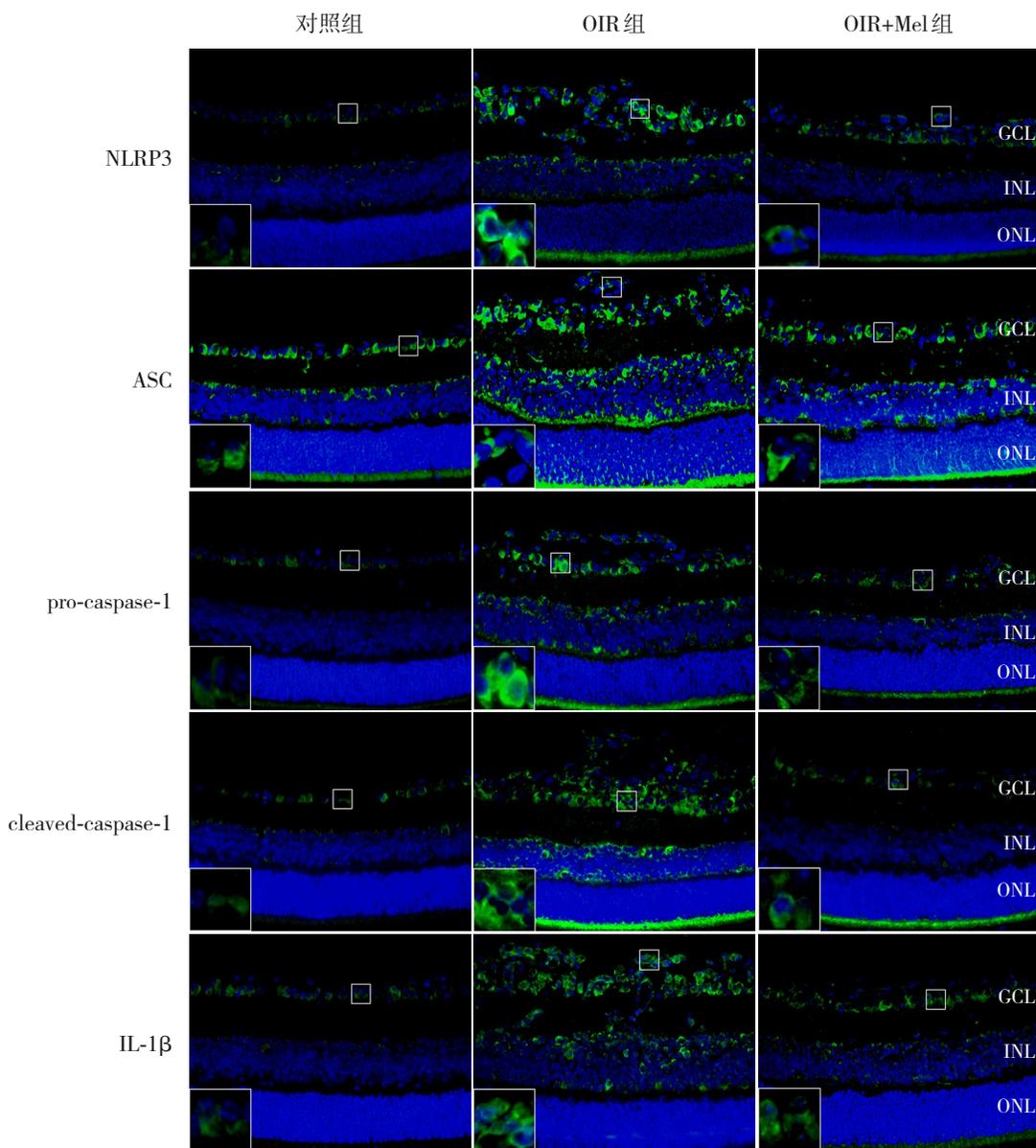


图 2 各组小鼠视网膜 NLRP3 炎性小体相关因子表达变化 (免疫荧光染色,  $\times 400$ ) NLRP3<sup>+</sup>、ASC<sup>+</sup>、pro-caspase-1<sup>+</sup>、cleaved-caspase-1<sup>+</sup> 和 IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> 胞浆染色为绿色, DAPI<sup>+</sup> 细胞核染为蓝色。OIR+Mel 组 NLRP3<sup>+</sup>、ASC<sup>+</sup>、pro-caspase-1<sup>+</sup>、cleaved-caspase-1<sup>+</sup> 和 IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> 表达少于 OIR 组。[GCL] 神经节细胞层; [INL] 内核层; [ONL] 外核层。

表 1 各组小鼠视网膜 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1、IL-1 $\beta$  平均荧光强度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NLRP3	ASC	pro-caspase-1	cleaved-caspase-1	IL-1 $\beta$
对照组	13.5 $\pm$ 1.2	40.2 $\pm$ 1.7	13.8 $\pm$ 1.9	14.1 $\pm$ 4.0	15.4 $\pm$ 0.8
OIR 组	39.5 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	57.7 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	41.9 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	46.2 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
OIR+Mel 组	23.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>	48.7 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	26.1 $\pm$ 3.6 <sup>ab</sup>	23.0 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	20.4 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
F 值	56.524	63.628	43.664	115.852	63.821
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 OIR 组比较,  $P<0.05$ 。[NLRP3] 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; [ASC] 凋亡相关斑点样蛋白; [pro-caspase-1] 半胱氨酸蛋白酶-1 前体; [cleaved-caspase-1] 剪切的半胱氨酸蛋白酶-1; [IL-1 $\beta$ ] 白细胞介素-1 $\beta$ 。

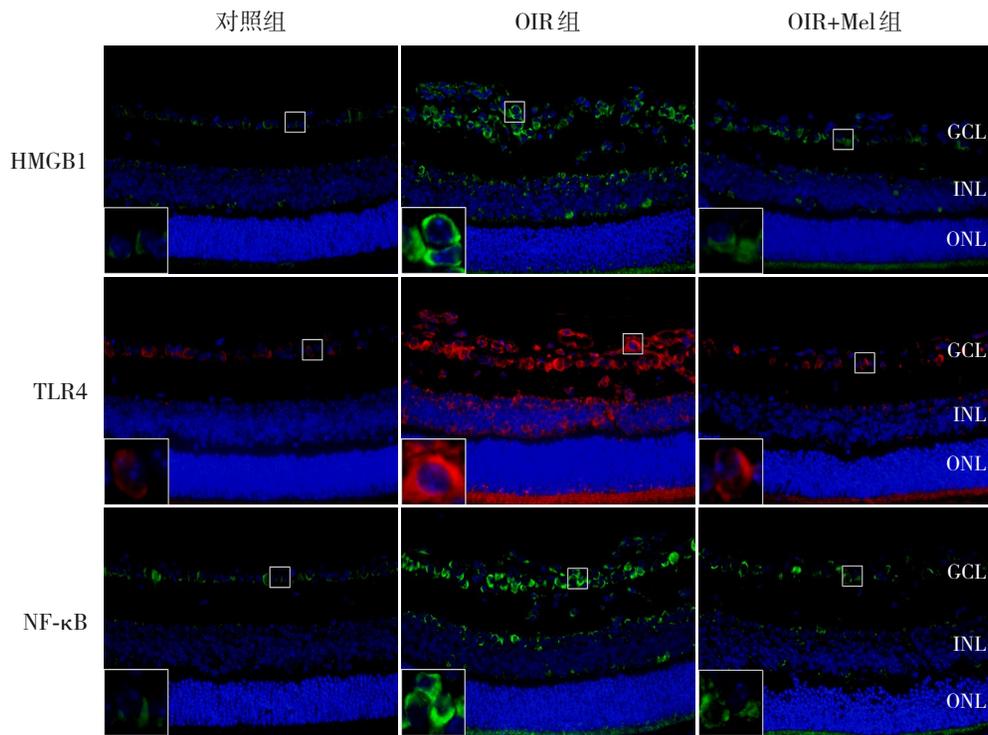


图 3 各组小鼠视网膜 HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B 表达的变化 (免疫荧光染色,  $\times 400$ ) HMGB1<sup>+</sup>、NF- $\kappa$ B<sup>+</sup> 胞浆染色为绿色, TLR4<sup>+</sup> 胞浆染色为红色, DAPI<sup>+</sup> 细胞核染为蓝色。OIR+Mel 组 HMGB1<sup>+</sup>、NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>、TLR4<sup>+</sup> 表达少于 OIR 组。[GCL] 神经节细胞层; [INL] 内核层; [ONL] 外核层。

表 2 各组小鼠视网膜 HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B 平均荧光强度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	HMGB1	TLR4	NF- $\kappa$ B
对照组	13.5 $\pm$ 1.2	40.2 $\pm$ 1.7	13.8 $\pm$ 1.9
OIR 组	39.5 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	57.7 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	41.9 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>
OIR+Mel 组	23.3 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>	48.7 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	26.1 $\pm$ 3.6 <sup>ab</sup>
F 值	56.524	63.628	43.664
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较,  $P<0.05$ ; b 示与 OIR 组比较,  $P<0.05$ 。[HMGB1] 高迁移率族蛋白 B1; [TLR4] Toll 样受体 4; [NF- $\kappa$ B] 核转录因子- $\kappa$ B。

#### 2.4 Mel 对 OIR 小鼠中性粒细胞浸润和促炎因子表达的影响

免疫荧光染色显示, 对照组中性粒细胞标志

物 Ly-6G 和 TNF- $\alpha$  阳性表达较少, OIR 组和 OIR+Mel 组 GCL 与 INL 均可见 Ly-6G、TNF- $\alpha$  阳性表达, 且 OIR+Mel 组 Ly-6G、TNF- $\alpha$  阳性表达显著低于 OIR 组 ( $P<0.05$ )。MPO 活力检测结果显示, 与对照组相比, OIR 组 MPO 活力显著升高, OIR+Mel 组较 OIR 组 MPO 活力降低 (均  $P<0.05$ )。见图 4、表 3。

#### 2.5 Mel 对 OIR 小鼠 Mel 受体表达的影响

免疫荧光染色显示, 对照组可见 MT1 和 MT2 的阳性表达主要位于 GCL 与 INL, OIR 组 GCL 与 INL 中 MT1 和 MT2 阳性表达较对照组显著减少, OIR+Mel 组 MT1 和 MT2 阳性表达较 OIR 组增多 (均  $P<0.05$ )。见表 4、图 5。

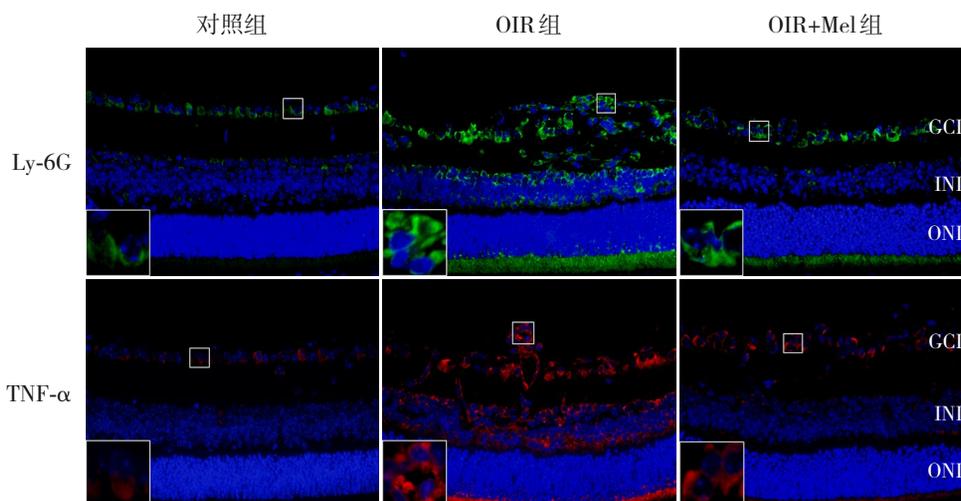


图4 各组小鼠视网膜Ly-6G、TNF- $\alpha$ 免疫荧光染色结果 ( $\times 400$ ) Ly-6G为中性粒细胞标志物, Ly-6G<sup>+</sup>胞浆染色为绿色, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>胞浆染色为红色, DAPI<sup>+</sup>细胞核染为蓝色。OIR+Mel组Ly-6G<sup>+</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>表达少于OIR组。[GCL]神经节细胞层; [INL]内核层; [ONL]外核层。

表3 各组小鼠视网膜Ly-6G、TNF- $\alpha$ 平均荧光强度及MPO活力比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Ly-6G	TNF- $\alpha$	MPO活力 (U/g)
对照组	19.7 $\pm$ 0.3	16.5 $\pm$ 0.9	0.46 $\pm$ 0.06
OIR组	35.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	30.6 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
OIR+Mel组	31.8 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>	24.6 $\pm$ 3.2 <sup>ab</sup>	0.75 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>
F值	118.964	17.005	30.853
P值	<0.001	0.003	<0.001

注: a示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b示与OIR组比较,  $P < 0.05$ 。  
[Ly-6G] 淋巴细胞抗原6G; [TNF- $\alpha$ ] 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; [MPO] 髓过氧化物酶。

表4 各组小鼠视网膜MT1、MT2平均荧光强度比较

组别	MT1	MT2
对照组	27.5 $\pm$ 0.8	40.0 $\pm$ 4.4
OIR组	7.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	14.3 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
OIR+Mel组	23.5 $\pm$ 1.6 <sup>ab</sup>	32.7 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
F值	295.048	44.576
P值	<0.001	<0.001

注: a示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b示与OIR组比较,  $P < 0.05$ 。  
[MT1] 褪黑素受体1; [MT2] 褪黑素受体2。

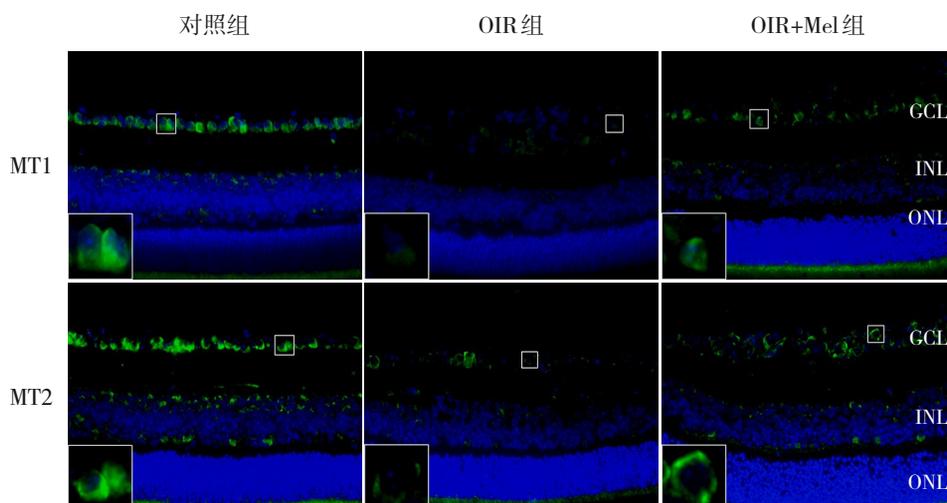


图5 各组小鼠视网膜中MT1和MT2表达变化 (免疫荧光染色,  $\times 400$ ) MT1<sup>+</sup>、MT2<sup>+</sup>胞浆染色为绿色, DAPI<sup>+</sup>细胞核染为蓝色。OIR+Mel组MT1<sup>+</sup>、MT2<sup>+</sup>表达较OIR组多。[GCL]神经节细胞层; [INL]内核层; [ONL]外核层。

### 3 讨论

ROP 作为一种新生血管性视网膜疾病,其发病机制尚未完全阐明,且已有研究证实高氧在诱导 ROP 新生血管生成中起着关键作用,新生小鼠 OIR 模型已被广泛应用于 ROP 的研究<sup>[7]</sup>。本研究亦采用经典的 Smith 等<sup>[6]</sup>设计的方法建立新生小鼠 OIR 模型。视网膜铺片结果显示,视网膜血管的正常分布被破坏,中央部出现大片无灌注区,无灌注区附近出现病理性新生血管;HE 染色结果显示,视网膜结构疏松、排列紊乱,内界膜不完整,可见较多的新生血管内皮细胞突破内界膜,均提示 OIR 模型建立成功。

Mel 是松果体分泌的一种内分泌激素,除了调节昼夜节律外,还具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及调节血管生成等多种生物学功能<sup>[8]</sup>。本实验室以往的研究已证实 Mel 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用<sup>[9-10]</sup>。Xu 等<sup>[4]</sup>的研究证实, Mel 可通过抑制视网膜血管新生,减轻 OIR 小鼠模型中的视网膜损伤。本研究发现, Mel 干预后,视网膜的内界膜基本恢复平整,突出内界膜的新生血管内皮细胞核数减少,病理性新生血管显著减少,说明 Mel 可改善 OIR 新生小鼠视网膜的组织学损伤,对视网膜损伤具有保护作用。

目前的研究认为氧化应激和炎症反应可能参与了 ROP 的发生发展,因此推测抑制炎症反应、清除氧自由基可能减轻 OIR 诱导的视网膜损伤。在各种视网膜疾病中,损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)的释放被认为是连接细胞死亡和炎症的重要生物过程,释放到胞外的 DAMPs 通过与模式识别受体结合,如 Toll 样受体家族、NOD 样受体家族,进而将损伤信号转化为分子事件<sup>[11]</sup>。其中 HMGB1 是这一过程中的关键分子,通过与 TLR4 结合,激活 NF- $\kappa$ B,诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子和趋化因子的产生,这些炎症因子和趋化因子又可募集大量的中性粒细胞浸润,使更多细胞死亡,形成炎症级联反应,从而加重视网膜损伤<sup>[12-14]</sup>。本研究结果显示, HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、Ly-6G 在 OIR 组小鼠视网膜的阳性表达及 MPO 活性较对照组显著升高, Mel 处理可使之降低。此外,活化的 NF- $\kappa$ B 是 NLRP3 的上游分子,可调控 NLRP3 炎性小体的组装<sup>[15-16]</sup>,使 pro-caspase-1 募集到 NLRP3-ASC 复合物上,发生自体的剪切活化,

参与 IL-1 $\beta$  的成熟、分泌,而 IL-1 $\beta$  是炎症反应的重要介质<sup>[4, 17-18]</sup>,提示 NLRP3 炎性小体在 OIR 诱导的炎症反应中充当重要角色。Sui 等<sup>[19]</sup>的研究证明, OIR 模型小鼠中 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  等的表达升高,而 NLRP3 的抑制剂(MCC950)使视网膜的新生血管减少、血管渗漏减轻。另有研究显示,视网膜缺血再灌注诱导的 TLR4 的表达先于 NLRP3 炎性小体的活化,并且 TLR4 的抑制剂吡格列酮可以抑制 NLRP3 炎性小体的激活,从而减轻缺血再灌注诱导的视网膜损伤<sup>[20-21]</sup>。本研究发现, OIR 组小鼠视网膜 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、cleaved-caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的阳性反应强度较对照组显著升高, Mel 处理可使之降低。以上提示 Mel 可有效减弱小鼠 OIR 损伤后视网膜的炎症反应,且 Mel 可能通过 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 OIR 诱导的 NLRP3 炎性小体的活化和中性粒细胞浸润。

Baba 等<sup>[22]</sup>研究证实视网膜、角膜等多种眼部组织中均有 MT1 和 MT2 的表达; Jiang 等<sup>[23]</sup>报道,在实验性糖尿病视网膜病变中, Mel 可以通过受体介导的信号传导对视网膜炎症发挥保护作用,表明 Mel 可能通过受体途径对眼部疾病发挥保护作用。本研究结果显示, OIR 组 MT1、MT2 表达显著减少, Mel 处理后可挽救 OIR 诱导的受体丢失,提示 Mel 对小鼠 OIR 损伤后视网膜的保护作用可能是通过褪黑素受体途径发挥作用。

综上所述, Mel 可能通过抑制 HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 轴减轻 OIR 诱导的视网膜损伤,且可能通过褪黑素受体途径发挥作用的。本研究仍存在一些局限性,仅使用免疫荧光染色观察了 HMGB1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 轴相关因子的表达,后续实验将采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 技术,检测相关因子 mRNA 和蛋白质的表达;并观察 Mel 受体拮抗剂 N-乙酰-2-苄基色胺或 MT 小干扰 RNA 对 Mel 保护作用的影响,进一步探讨 Mel 对 OIR 的保护作用的机制,为其在 ROP 中的临床应用提供理论基础和实验依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bancalari A, Schade R. Update in the treatment of retinopathy of prematurity[J]. *Am J Perinatol*, 2022, 39(1): 22-30. PMID: 32544962. DOI: 10.1055/s-0040-1713181.
- [2] Crooke A, Huete-Toral F, Colligris B, et al. The role and therapeutic potential of melatonin in age-related ocular diseases[J]. *J Pineal Res*, 2017, 63(2): e12430. PMID: 28658514.

- DOI: 10.1111/jpi.12430.
- [3] Xu Y, Cui K, Li J, et al. Melatonin attenuates choroidal neovascularization by regulating macrophage/microglia polarization via inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway[J]. *J Pineal Res*, 2020, 69(1): e12660. PMID: 32323368. DOI: 10.1111/jpi.12660.
- [4] Xu Y, Lu X, Hu Y, et al. Melatonin attenuated retinal neovascularization and neuroglial dysfunction by inhibition of HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway in oxygen-induced retinopathy mice[J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(4): e12473. PMID: 29411894. DOI: 10.1111/jpi.12473.
- [5] Yan M, Wang H, Gu Y, et al. Melatonin exerts protective effects on diabetic retinopathy via inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as revealed by quantitative proteomics[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 205: 108521. PMID: 33636209. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108521.
- [6] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111. PMID: 7507904.
- [7] Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(1): 200-210. PMID: 25444347. PMCID: PMC4277936. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.07.050.
- [8] Doğanlar ZB, Güçlü H, Öztöpus Ö, et al. The role of melatonin in oxidative stress, DNA damage, apoptosis and angiogenesis in fetal eye under preeclampsia and melatonin deficiency stress[J]. *Curr Eye Res*, 2019, 44(10): 1157-1169. PMID: 31090463. DOI: 10.1080/02713683.2019.1619778.
- [9] 马瑞, 马瑜徽, 张新月, 等. 不同褪黑素治疗方案对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑白质损伤的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021, 23(3): 300-305. PMID: 33691926. PMCID: PMC7969183. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2011132.
- [10] 陈伟, 陈岚芬, 张梦蓓, 等. 不同褪黑素治疗方案对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞增殖的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(8): 830-835. PMID: 31416511. PMCID: PMC7389905. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.08.017.
- [11] Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies[J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 24(Pt A): 29-39. PMID: 25641058. DOI: 10.1016/j.arr.2015.01.003.
- [12] Dvorianchikova G, Hernandez E, Grant J, et al. The high-mobility group box-1 nuclear factor mediates retinal injury after ischemia reperfusion[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(10): 7187-7194. PMID: 21828158. PMCID: PMC3207720. DOI: 10.1167/iovs.11-7793.
- [13] Lee YM, Kim J, Jo K, et al. Ethyl pyruvate inhibits retinal pathogenic neovascularization by downregulating HMGB1 expression[J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 245271. PMID: 24371837. PMCID: PMC3858882. DOI: 10.1155/2013/245271.
- [14] 孙玉莹, 肖欧, 黄春雨. HMGB1-TLR4 和 Müller 细胞在视网膜血管生成中的作用[J]. *山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报*, 2021, 42(5): 362-368. DOI: 10.3969/j.issn.2097-0005.2021.05.007.
- [15] Mugisho OO, Green CR. The NLRP3 inflammasome in age-related eye disease: evidence-based connexin hemichannel therapeutics[J]. *Exp Eye Res*, 2022, 215: 108911. PMID: 34958779. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108911.
- [16] Jo EK, Kim JK, Shin DM, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2): 148-159. PMID: 26549800. PMCID: PMC4786634. DOI: 10.1038/cmi.2015.95.
- [17] Wang Y, Gao S, Gao S, et al. Blocking the interaction between interleukin-17A and endoplasmic reticulum stress in macrophage attenuates retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 82. PMID: 33933165. PMCID: PMC8088655. DOI: 10.1186/s13578-021-00593-6.
- [18] 楚瑞雪, 孙先桃, 王惠. 基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(2): 46-52. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.02.007.
- [19] Sui A, Chen X, Shen J, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 ameliorates retinal neovascularization and leakage by reversing the IL-1 $\beta$ /IL-18 activation pattern in an oxygen-induced ischemic retinopathy mouse model[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 901. PMID: 33093455. PMCID: PMC7582915. DOI: 10.1038/s41419-020-03076-7.
- [20] Qi Y, Zhao M, Bai Y, et al. Retinal ischemia/reperfusion injury is mediated by toll-like receptor 4 activation of NLRP3 inflammasomes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(9): 5466-5475. PMID: 25097240. DOI: 10.1167/iovs.14-14380.
- [21] Zhang YL, Wang RB, Li WY, et al. Pioglitazone ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury via suppressing NLRP3 inflammasome activities[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(12): 1812-1818. PMID: 29259897. PMCID: PMC5733506. DOI: 10.18240/ijo.2017.12.04.
- [22] Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, et al. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(35): 15043-15048. PMID: 19706469. PMCID: PMC2736407. DOI: 10.1073/pnas.0904400106.
- [23] Jiang T, Chang Q, Cai J, et al. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3528274. PMID: 27143993. PMCID: PMC4837288. DOI: 10.1155/2016/3528274.

(本文编辑: 杨丹)