

## 研究论文

# 高氧对星形胶质细胞的损伤及抗氧化剂对其保护作用

杨晖<sup>#</sup> 张玲霞<sup>#</sup> 叶雨露 董志章 陈婕灵 刘丹 吴秋萍 郑穗联<sup>\*</sup>  
(温州医科大学附属第二医院育英儿童医院, 温州 325000)

**摘要** 该文旨在探究高氧环境对星形胶质细胞的损伤情况及抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)对其的保护作用。该文将星形胶质细胞随机分为常氧组、高氧组(6 h、12 h、24 h)、常氧NAC组和高氧NAC组(6 h、12 h、24 h)。在高氧环境下培养不同时间后,检测星形胶质细胞的活性、细胞内线粒体膜电位的变化、细胞内的总活性氧(ROS)和线粒体ROS的改变,用免疫荧光染色法及Western blot检测细胞VEGF及VEGFR的表达情况。结果显示,高氧环境培养后,星形胶质细胞的活性显著下降( $P < 0.05$ )。细胞内总ROS水平及线粒体ROS水平较常氧组明显增加。星形胶质细胞在高氧环境下VEGF与VEGFR的表达下调。加入抗氧化剂NAC后,星形胶质细胞的细胞活性在高氧6 h和高氧12 h组增强( $P < 0.01$ ),而在高氧24 h组减弱( $P < 0.05$ )。加入抗氧化剂后6 h组与12 h组星形胶质细胞内的ROS较未加抗氧化剂组明显减少,但对24 h高氧处理的星形胶质细胞内ROS无明显影响。加入抗氧化剂后高氧处理的星形胶质细胞的VEGF与VEGFR的表达量也有所增加,但在高氧24 h组,星形胶质细胞的VEGF和VEGFR表达仅少量增加。结果证实,星形胶质细胞在高氧条件下产生损伤,且与高氧持续时间相关,而使用NAC能够在一定程度上挽救短期内高氧对星形胶质细胞的损伤。以上结果提示,对高氧刺激后星形胶质细胞的抗氧化保护可能可以作为ROP治疗的一种方法。

**关键词** 高氧; 星形胶质细胞; 抗氧化剂; 血管内皮生长因子; 早产儿视网膜病变

## The Damage of High Oxygen to Astrocytes and the Protective Effect of Antioxidants

YANG Hui<sup>#</sup>, ZHANG Lingxia<sup>#</sup>, YE Yulu, DONG Zhizhang, CHEN Jieling, LIU Dan,  
WU Qiuping, ZHENG Suilian<sup>\*</sup>

(The 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

**Abstract** This study aimed to explore the damage of hyperoxia on astrocytes and the protective effect of antioxidants (N-acetyl-L-cysteine, NAC). Astrocytes were randomly divided into normoxic group, hyperoxic group (6 h, 12 h, 24 h), normoxic NAC group and hyperoxic NAC group (6 h, 12 h, 24 h). After different periods

收稿日期: 2019-10-08 接受日期: 2020-01-09

浙江省自然科学基金项目(批准号: LY15H120004)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 13587583636, E-mail: 39072628@qq.com

Received: October 8, 2019 Accepted: January 9, 2020

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY15H120004)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-13587583636, E-mail: 39072628@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5261>

of exposure to hyperoxia, the activity of astrocytes, the changes of mitochondrial membrane potential in cells, the changes of total intracellular ROS (reactive oxygen species), mitochondrial ROS in cells, the expressions of VEGF and VEGFR were detected. The activity of astrocytes decreased significantly after hyperoxic culturing ( $P < 0.05$ ). The total intracellular ROS and mitochondrial ROS significantly increased compared with normoxic group. The expression of VEGF and VEGFR decreased in astrocytes in hyperoxic environment. After the using of the antioxidant NAC, the activity of astrocytes increased at 6 h and 12 h hyperoxia groups ( $P < 0.01$ ), but decreased at 24 h hyperoxia group ( $P < 0.05$ ). The ROS of astrocytes in the 6 h hyperoxic NAC group and the 12 h hyperoxic NAC group significantly reduced compared with those in the non-antioxidant group, but no significant changes of the ROS were observed in 24 h hyperoxic NAC group. VEGF and VEGFR levels also increased in hyperoxic astrocytes at 6 h and 12 h after the addition of the antioxidant. Astrocytes are damaged under high oxygen conditions and it is related to the duration of high oxygen. However, the use of NAC can save the damage of astrocytes caused by high oxygen in the short term to some extent, suggesting that the antioxidant protection of astrocytes after high oxygen stimulation may be a new therapy of ROP.

**Keywords** hyperoxia; astrocytes; antioxidants; vascular endothelial growth factor; retinopathy of prematurity

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是一种发达国家儿童盲 (最佳矫正视力小于 0.05) 的最主要的新生血管性疾病。ROP 主要发生于出生早、体质量低, 长期需要氧气支持治疗的婴儿, 特别是胎龄 < 30 周, 体质量  $\leq 1\ 500\text{ g}$  的胎儿<sup>[1]</sup>。ROP 的病因是多因素的, 除了胎龄小、体质量低外, 还包括吸氧障碍、炎症、营养不良、遗传因素等<sup>[2]</sup>。ROP 不同于其他新生血管性疾病比如糖尿病性视网膜病变, 其主要原因在于不完全血管化的视网膜缺氧而引起视网膜血管异常增生, 属于发育异常型视网膜血管病。

视网膜的血管发育与星形胶质细胞密切相关。在有中心凹的生物中, 星形胶质细胞仅存在于有血管的区域<sup>[3-4]</sup>。星形细胞网络在视网膜中扩张, 随后促进引导视盘上的血管形成, 形成了发育中的视网膜血管系统初级丛, 这些血管与分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的星形胶质细胞提供的构架紧密集合<sup>[5-8]</sup>。由视网膜生理性缺氧诱导的 VEGF 表达刺激视网膜血管的发育生长。因此, 星形胶质细胞介导的 VEGF 是星形胶质细胞与视网膜血管之间相互作用的重要因子。以上均提示, 还存在其他因素影响视网膜血管发育过程中星形胶质细胞与血管内皮细胞的密切关系。这些因素使视网膜血管发育保持平衡, 既不会生成异常血管, 同时也保证了视网膜的正常血供。

在人类视网膜发育过程中, 大部分视网膜血管的发育都在子宫内完成, 在 36~40 周时视网膜血管发

育到达鼻侧, 40 周时到达颞侧<sup>[9]</sup>。一系列动物实验表明, 在高氧环境中繁殖发育的小鼠的视网膜血管发育收到明显抑制, 其血管发育异常会导致视网膜缺氧, 从而使星形胶质细胞的增殖异常、分化减弱, 进一步阻止正常视网膜血管网的形成<sup>[8,10]</sup>。因此, 合适的氧浓度 (氧环境) 在视网膜血管发育中起重要作用, 能够使视网膜血管发育保持平衡。然而在高氧环境中繁殖发育的视网膜血管发育为何受到抑制, 其星形胶质细胞如何被影响, 仍尚未完全明确。

我们认为, 星形胶质细胞在高氧环境下出现的一系列改变在一定程度上促进了 ROP 的发病。基于以上假设, 我们在体外对星形胶质细胞进行高氧刺激, 探究高氧环境引起的星形胶质细胞活性的改变, 探究其高氧条件下产生的氧化应激反应及其 VEGF 和血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 的表达, 并使用抗氧化剂挽救星形胶质细胞的凋亡, 揭示星形胶质细胞在 ROP 发病过程中的作用, 为 ROP 的早期治疗及预防提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及试剂

将星形胶质细胞 (U373MG 细胞系, ECACC) 培养于含有 5% 热灭活胎牛血清中, 然后置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 培养箱中培养, 传代至 3 代后用于实验。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC)、DCFH-DA

试剂盒及JC-1试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。GFAP抗体试剂盒购自美国Affinity Biosciences公司。CCK8试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司。MitoSOX试剂盒购自美国Thermo Fisher公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 星形胶质细胞培养与鉴定** 将星形胶质细胞按 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于铺有爬片的6孔板中。待细胞铺满约50%后,吸去6孔板中培养基,用PBS清洗2次。在常温下用1 mL/孔的4%多聚甲醛固定细胞20 min, PBS清洗3次。用0.5% TritonX-100覆盖细胞,室温孵育15 min打孔, PBS清洗3次。用5%正常山羊血清封闭液覆盖细胞,室温孵育30 min。吸干封闭液,滴加新鲜稀释的一抗完全覆盖玻片上的细胞,4 °C孵育过夜,按1:200的比例稀释一抗(anti-GFAP antibody)。于37 °C恒温箱复温45 min, PBS清洗3次。以下操作均需在避光条件下进行,关闭日光灯,加二抗,用新鲜稀释的二抗覆盖细胞,于室温孵育1 h。带荧光标记的二抗稀释比例为1:200, PBS清洗3次。用新鲜稀释的DAPI(1 ng/mL)染核,于室温下孵育5 min, PBS清洗3次。载玻片上滴一滴抗荧光淬灭剂,用镊子夹取爬片从抗荧光淬灭剂的一侧轻轻盖到载玻片上封片,注意细胞面朝向抗荧光淬灭剂。荧光显微镜进行图像的采集(抽取2张盖玻片,每张随机观察6个视野)。

**1.2.2 实验分组与造模** 将生长状态良好的细胞随机分为常氧组、高氧组(6 h、12 h、24 h)、常氧NAC组和高氧NAC组(6 h、12 h、24 h)。待细胞铺满约80%时,弃培养液,用预温的PBS缓冲液洗涤细胞1次,常氧组与高氧组加入含0.5%血清的培养基。高氧组(6 h、12 h、24 h)置入含有85% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>的高氧培养箱中分别高氧培养6 h、12 h、24 h;常氧组置入37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养24 h。常氧NAC组与高氧NAC组(6 h、12 h、24 h)将培养基改为NAC浓度为0.312 5 mmol/L的含0.5%血清的培养基,按上述方式培养。

**1.2.3 细胞活性的检测** 将星形胶质细胞消化、传代,按 $1 \times 10^5$ 个/mL浓度接种于96孔培养板中,常规培养,待细胞贴壁,细胞融合达80%左右时,按上述分组方法进行实验,并设置空白孔,每组设置6个复孔,继续培养24 h后,每孔加入10 μL CCK8,再至培养箱内孵育30~60 min,用酶联免疫检测仪在450 nm波长处测各孔吸光度(D)值,计算细胞活性,用Graphpad 8.0软件进行显著性差异分析。

**1.2.4 细胞内总ROS、线粒体ROS的检测** 以 $2 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板中,以“1.2.2”项下分组方法进行实验。取浓度为1 mmol/L的DCFH-DA贮备液加入无血清培养基中,配成终浓度为10 μmol/L的DCFH-DA工作液;去除细胞培养液,用PBS洗涤1次,加入37 °C预温的DCFH-DA工作液,于37 °C下孵育30 min;去除DCFH-DA染色工作液,用预温的PBS洗涤3次;用Tryple-express消化DCFH-DA染色后的细胞,用预温的PBS洗涤3次,细胞染色液重悬细胞,用荧光显微镜观察细胞内总ROS含量。按照每50 μg MitoSOX粉末添加13 μL DMSO配制成5 mmol/L的MitoSOX染色贮备液,将染色储备液加入到DMEM中配成浓度为5 μmol/L的染色工作液;去除细胞培养液,用PBS洗涤1次,加入预温的MitoSOX染色工作液,于37 °C下避光孵育10 min;去除MitoSOX染色工作液,用PBS洗涤3次;用Tryple-express消化MitoSOX染色后的细胞,用预温的PBS洗涤3次,离心后用细胞染色液重悬细胞,用荧光显微镜观察细胞内线粒体ROS含量。

**1.2.5 细胞膜电位检测** 按 $2 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板中,按“1.2.2”项下分组方法进行实验。将JC-1粉末溶解在DMSO中,配成终浓度为2.5 mg/mL的储存液。按照工作液浓度为2 nmol/L将适量储存液以边振荡边加入的方式加入到预温的无血清培养基中。吸除6孔板中的培养液,用PBS洗涤细胞1次;按每孔1 mL加入染色工作液,在37 °C下避光孵育30 min。孵育结束后去除上清,用预温的PBS洗涤2次。用Tryple-express消化后收集细胞,用荧光显微镜观察红绿荧光强度。

**1.2.6 免疫荧光法及Western blot法观察VEGF和VEGFR表达** 按 $2 \times 10^5$ 个/mL接种于铺有爬片的6孔板中,按“1.2.2”项下分组方法进行实验。培养24 h后,将细胞固定,进行免疫荧光染色,一抗加VEGF抗体和VEGFR抗体,其他步骤同“1.2.1”。在镜下取6个不同视野,用荧光显微镜进行图像的采集。按 $2.5 \times 10^5$ 个/mL接种于6 cm培养皿中,按“1.2.2”项下分组方法进行实验后,加入RIPA细胞裂解液于冰上裂解15 min,12 000 r/min离心15 min,取上清。BCA法定量后,取20 μg总蛋白用12%聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离,电转至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h。加入适当浓度的一抗(VEGF、VEGFR、GAPDH),于4 °C孵育过夜;TBST洗涤3次,每次5 min,加入二抗室温孵

育1.5 h, 再用TBST洗涤3次, 每次5 min, 用化学发光试剂发光、显影。用AlphaEaseFC分析条带的灰度值。

### 1.3 统计学分析

统计数据用于两样本均值之间比较选用Unpaired Student's *t*-test, 用于多样本均值之间比较选用One-Way ANOVA。所有统计分析均使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.0进行处理。所有实验均独立重复3次,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 星形胶质细胞的鉴定

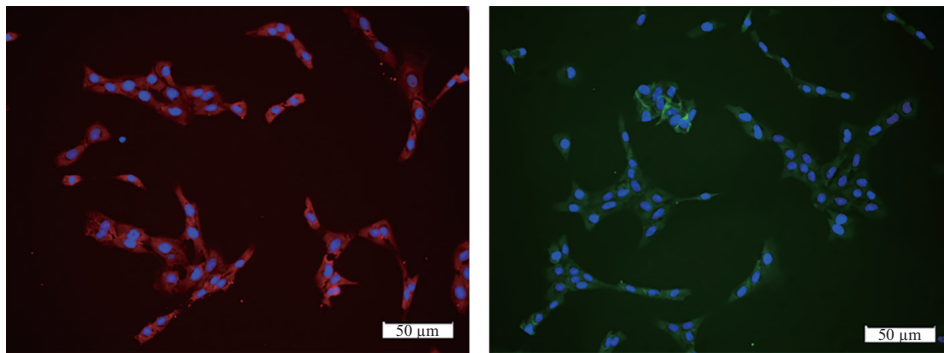
免疫荧光图像显示, 超过95%的细胞发出红色或绿

色荧光, 提示胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性, 说明我们培养的是星形胶质细胞(图1)。

### 2.2 星形胶质细胞的细胞活性及线粒体膜电位

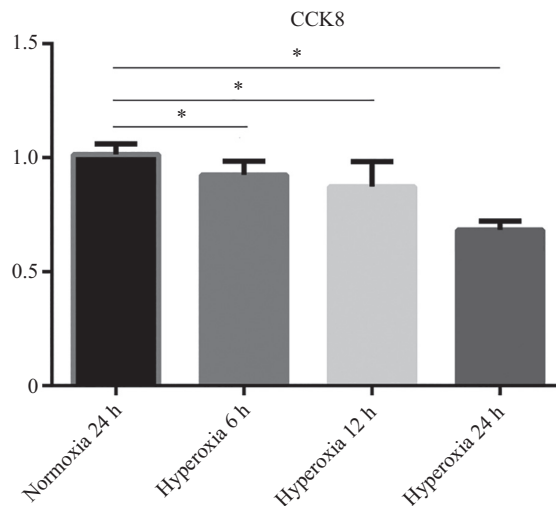
高氧处理后星形胶质细胞的活性显著下降( $P < 0.05$ ), 下降程度呈时间相关性(图2)。而在加入抗氧化剂后, 高氧NAC组(6 h)和高氧NAC组(12 h)细胞活性较常氧NAC组增强, 而高氧NAC组(24 h)较常氧NAC组减弱, 提示NAC在短期内能够增加星形胶质细胞活性, 有效缓解高氧对其造成的损伤(图3)。

JC-1结果发现, 随着高氧时间增加, 绿色荧光强度增加, 提示高氧条件下的星形胶质细胞线粒



GFAP在使用Alexa Fluor 647二抗时表现为红色荧光, 在使用Alexa Fluor 488二抗时表现为绿色荧光。蓝色荧光表示细胞核。GFAP showed red fluorescence while using Alexa Fluor 647 secondary antibody, and showed green fluorescence while using Alexa Fluor 488 secondary antibody. The blue fluorescence showed the nucleus.

图1 星形胶质细胞的GFAP鉴定  
Fig.1 Identification of astrocytes by GFAP



星形胶质细胞在常氧与高氧6 h、12 h及24 h条件培养下的细胞活性,  $*P < 0.05$ 。

Cell activity of astrocytes cultured in normoxia and hyperoxia for 6 h, 12 h and 24 h,  $*P < 0.05$ .

图2 高氧状态下星形胶质细胞活性  
Fig.2 Astrocyte activity after hyperoxic process

体膜电位随着高氧的时间增加而下降。而在加入NAC后, 高氧NAC组(6 h)及高氧NAC组(12 h)绿色荧光分别较高氧组(6 h)及高氧组(12 h)稍低, 而高氧NAC组(24 h)绿色荧光与高氧组(24 h)无明显差异(图4)。

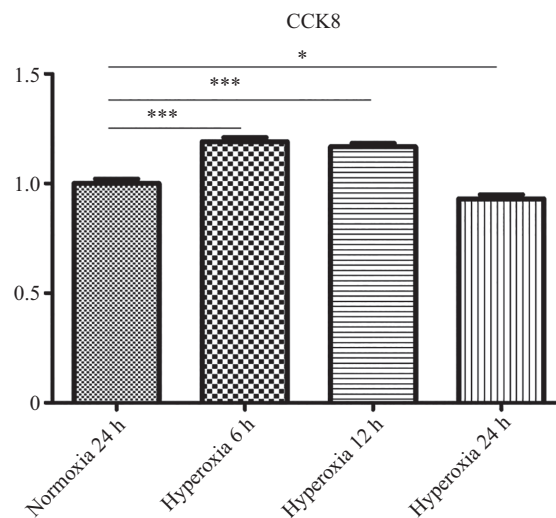
### 2.3 星形胶质细胞氧化应激指标

高氧组(6 h)与常氧组线粒体活性氧无明显差异, 而高氧组(12 h)及高氧组(24 h)相比于常氧组线粒体活性氧显著增加。加入NAC后, 高氧NAC组(12 h)及高氧NAC组(24 h)的线粒体活性氧较高氧组(12 h)及高氧组(24 h)显著下降(图5)。

高氧处理后细胞内的总活性氧随着高氧时间增加而增加。高氧NAC组(6 h)及高氧NAC组(12 h)较未加入NAC时增加较少, 而高氧NAC组(24 h)的细胞内总活性氧较常氧NAC组明显增加(图6)。

### 2.4 星形胶质细胞VEGF及VEGFR的表达

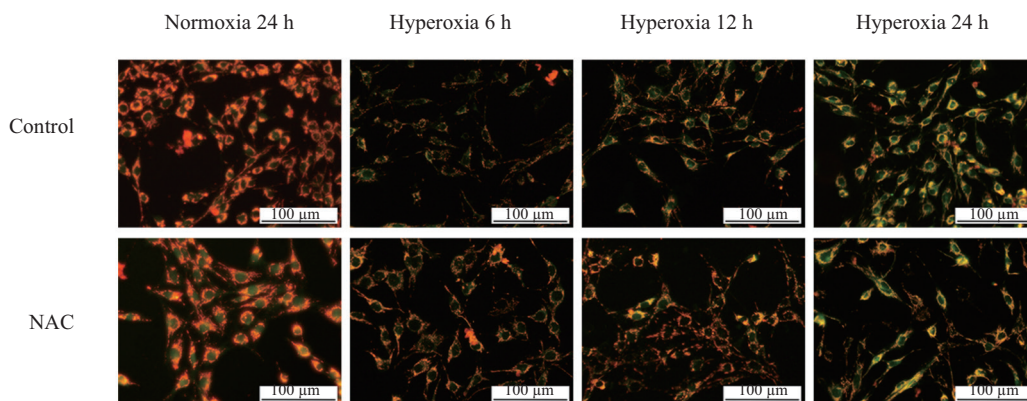
随着高氧时间的增加, 星形胶质细胞的VEGF及VEGFR表达量逐渐下降。NAC处理后, 高氧NAC组(6 h)、高氧NAC组(12 h)的VEGF表达量均较无NAC处理时增加, 但仍随着高氧时间的增加而下降, 而高氧NAC组(24 h)与高氧组(24 h)的VEGF表达量无明显变化(图7)。高氧NAC组(6 h)及高氧NAC组(12 h)的VEGFR表达量显著增



NAC预处理后星形胶质细胞在常氧与高氧6 h、12 h及24 h条件培养下的细胞活性, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .  
Cell activity of NAC-pretreated astrocytes cultured in normoxia and hyperoxia for 6 h, 12 h and 24 h, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 加入抗氧化剂时高氧状态下星形胶质细胞活性

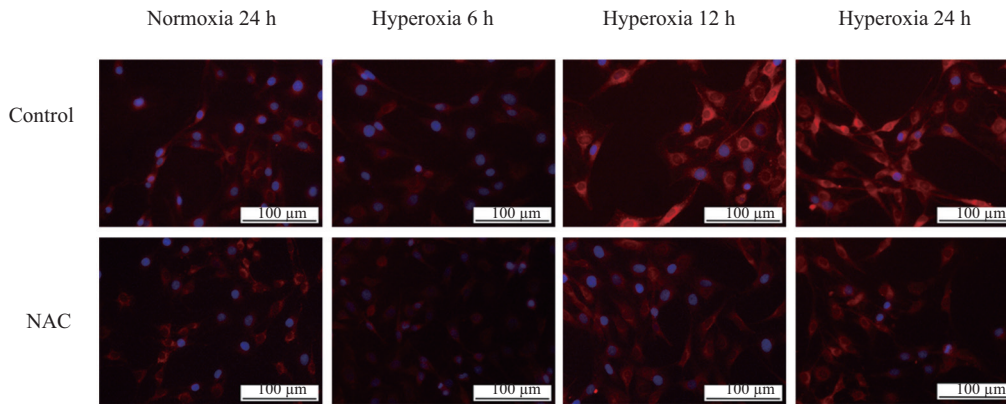
Fig.3 Astrocyte activity after hyperoxic process with the addition of antioxidants



红色荧光提示JC-1在线粒体内聚集, 提示线粒体膜电位较高。绿色荧光提示JC-1为单体, 无法在线粒体内聚集, 提示线粒体膜电位较低。  
The accumulation of JC-1 in mitochondria was suggested by the red fluorescence, which indicated that the mitochondrial membrane potential was higher. Green fluorescence indicated that JC-1 was a monomer and could not accumulate in the mitochondria, indicating that the mitochondrial membrane potential was low.

图4 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞JC-1实验

Fig.4 JC-1 of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

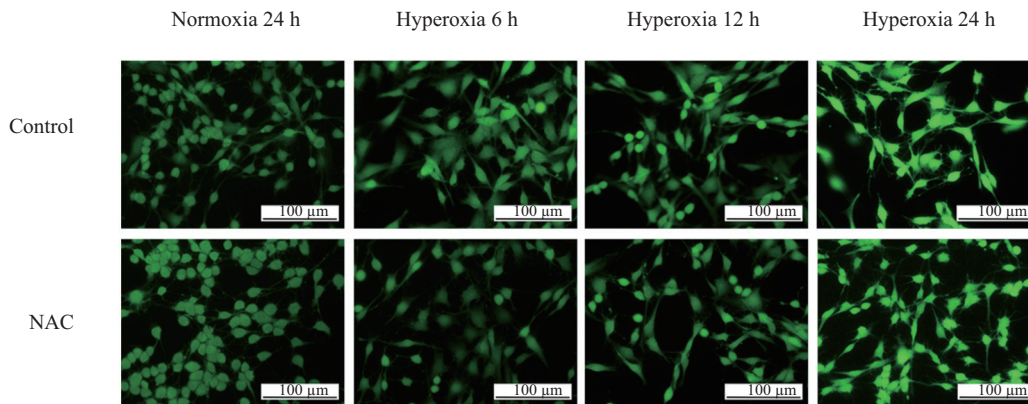


红色荧光表示Mitoxox被线粒体中的超氧化物氧化, 提示线粒体活性氧显著增加。蓝色荧光提示细胞核位置。

Red fluorescence indicated that Mitoxox had been oxidized by superoxide in mitochondria, suggesting a significant increase of reactive oxygen species in mitochondrial. Blue fluorescence indicated nuclear location.

图5 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞线粒体活性氧实验

Fig.5 Mitoxox assay of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

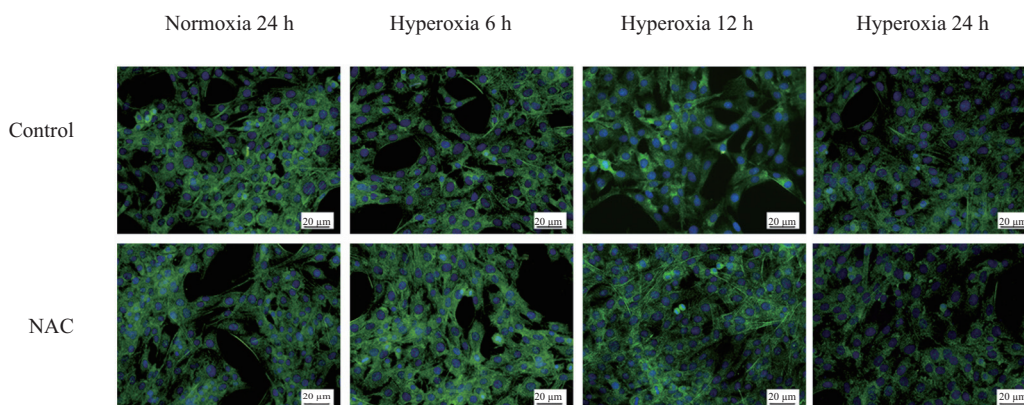


绿色荧光表示进入细胞内的DCFH-DA被氧化生成DCF。

Green fluorescence indicated that DCFH-DA entering the cell was oxidized and transformed to DCF.

图6 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞DCFH-DA实验

Fig.6 DCFH-DA of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

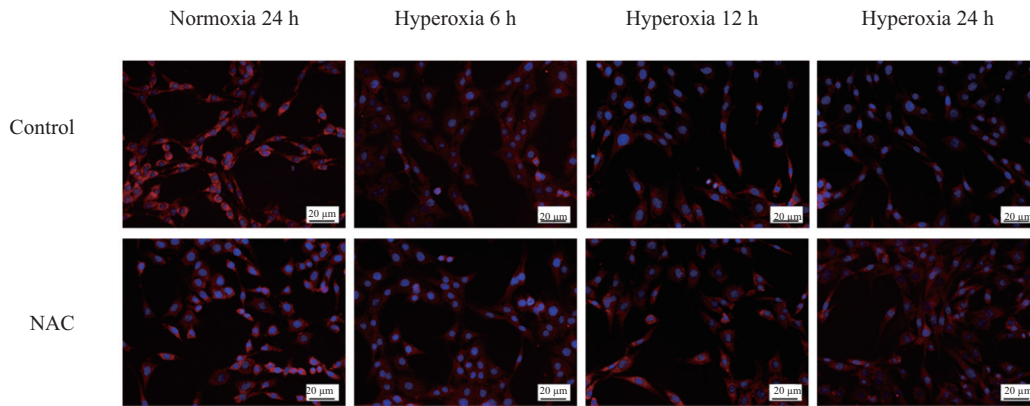


绿色荧光表示VEGF, 蓝色荧光表示细胞核。

Green fluorescence represented VEGF, and blue fluorescence represented the nucleus.

图7 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞VEGF表达

Fig.7 VEGF expression of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition



红色荧光表示VEGFR, 蓝色荧光表示细胞核。

Red fluorescence represented VEGFR, and blue fluorescence represented the nucleus.

图8 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞VEGFR表达

Fig.8 VEGFR expression of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

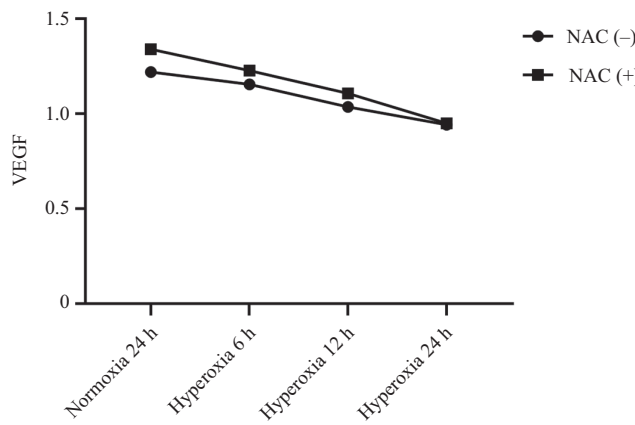


图9 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞VEGF表达量

Fig.9 VEGF expression of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

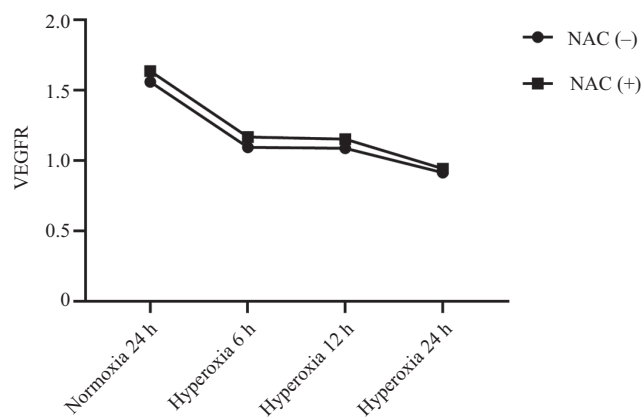


图10 高氧状态下及加入抗氧化剂后星形胶质细胞VEGFR表达量

Fig.10 VEGFR expression of astrocytes after hyperoxic process and with the antioxidant addition

加,而高氧NAC组(24 h)的VEGFR表达量也较高氧组(24 h)显著增加(图8)。Western blot实验提示,加入抗氧化剂后VEGF及VEGFR的表达较对照组高(图9和图10)。

### 3 讨论

此前的大量研究表明,ROP发病主要分为两个阶段,即早期的“血管生长阻滞阶段”和晚期的“血管

增殖阶段”<sup>[11-14]</sup>。在早产儿出生后,由于其从母体的低氧环境进入母体外的相对高氧环境,导致VEGF等血管生长因子下调,继而视网膜血管发育受到抑制。在“血管增殖阶段”,由于前期的血管发育被抑制,视网膜的氧供应不足,刺激视网膜无灌注区生成VEGF等血管生长因子,继而视网膜新生血管发育异常,导致ROP发病。

从我们的实验结果可以发现,星形胶质细胞在高氧环境下产生明显变化,随着高氧时间延长,活性氧显著增加,出现氧化应激反应,细胞活性显著减弱,同时VEGF分泌表达减少,我们认为这是抑制视网膜血管发育的重要原因,即ROP的第一阶段,如果在该阶段不能有效阻止或延缓疾病进展,随着视网膜逐渐发育,需氧量逐渐增加,周边视网膜缺氧导致VEGF分泌表达增加,ROP进入第二阶段,异常的视网膜血管发生增殖,甚至可能出现牵拉性视网膜脱离。然而在我们加入抗氧化剂后发现能够在一定程度上挽救星形胶质细胞的凋亡,挽救其VEGF的分泌情况,这为ROP的早期预防和治疗提供理论依据。但抗氧化剂的挽救效果也存在限制,当高氧时间达到24 h,加入抗氧化剂组仍出现活性减弱、活性氧增加和VEGF表达减少的现象,提示抗氧化剂NAC仅在短期内提供一定程度的保护作用。

视网膜的正常血管发育分为两个阶段:血管发生阶段和血管新生阶段。而ROP的发病主要是在血管新生阶段,早产儿由于外界氧环境突然改变,导致视网膜氧浓度较前增加,从而导致血管发育受到抑制,继而引起视网膜的缺氧,最终引起ROP发病。血管新生阶段的正常进程与星形胶质细胞密不可分。星形胶质细胞由视盘处侵入视网膜,在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)分泌的血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGFA)的作用下逐渐形成星形胶质细胞网络,从而促进初级血管丛的形成。而Cre介导的血小板源生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFRA)的失活几乎完全消除了视网膜星形细胞群和随后的视网膜血管发育<sup>[15]</sup>。星形胶质细胞网络在内界膜和神经纤维层之间扩散,形成星形胶质细胞网络,紧接着血管沿着星形胶质细胞网络发育,形成视网膜血管系统初级丛,这些星形胶质细胞分泌的VEGF很可能是维持其与视网膜血管紧密关系的重要因素。大量研究提示,星形胶质细胞分泌的VEGF对于血管发

育至关重要<sup>[5-7]</sup>。另外,UEMURA等<sup>[16]</sup>发现,星形胶质细胞在血管生长前表达纤维连接蛋白。纤维连接蛋白和硫酸肝素协同作用结合VEGF共同引导内皮细胞迁移,纤维连接蛋白基因缺失会影响血管迁移<sup>[17]</sup>。该研究提示,星形胶质细胞可能作为基础架构为血管发育提供物理支持,而高氧会引起星形胶质细胞的凋亡,继而破坏血管发育的空间架构,这可能也是抑制血管发育的因素之一。

VEGF通过VEGF/Notch信号通路影响血管发育。在正常视网膜血管发育过程中,血管内皮细胞存在尖端与茎部两种形态,而单个细胞可以在两种形态间转换,动态竞争尖端位置。尖端形态的内皮细胞高表达VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2)及VEGFR3(vascular endothelial growth factor receptor 3),对VEGF浓度更为敏感,同时其通过Notch信号通路抑制周围茎部形态内皮细胞表达VEGFR1(vascular endothelial growth factor receptor 1),VEGFR1具有诱骗受体活性的作用,因此能够抑制茎部形态内皮细胞向尖端形态转换。尖端细胞能够通过感受VEGF浓度引导血管发育方向<sup>[18-20]</sup>,尽管VEGF在视网膜中的浓度梯度尚未被正式证实,但VEGF mRNA在周边视网膜表达更高<sup>[8]</sup>。当眼内注射VEGF或VEGF拮抗剂时,VEGF浓度梯度受到干扰,血管边缘的丝状伪足减少从而导致血管扩展减少<sup>[21-22]</sup>。

在氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)小鼠实验中,高氧处理的小鼠视网膜VEGF表达显著被抑制,在高氧结束后,视网膜血管才逐渐生成。该研究认为在高氧阶段,VEGF信号下调导致血管发育过程在早期中断,而星形胶质细胞在其中起重要作用<sup>[10]</sup>。同时视网膜星形胶质细胞分泌的VEGF在维持血管稳定方面有重要作用,而这可能与ROP相关<sup>[23]</sup>。缺氧及低糖环境处理后的星形胶质细胞在高氧环境更容易凋亡<sup>[24]</sup>。结合以上研究,胎儿从母体低氧环境进入到外界高氧环境,星形胶质细胞的氧环境也随之改变,这种改变对ROP的发病起到关键作用,尤其在星形胶质细胞VEGF的表达和视网膜血管发育的空间支持方面,同时我们应用抗氧化剂在一定程度上缓解了星形胶质细胞在高氧环境下的损伤,本实验结果有助于理解星形胶质细胞在ROP疾病过程中发挥的作用机制,并为ROP的预防及治疗提供实验依据。



但是本研究也存在一些不足之处, 抗氧化剂的干预时间有待明确, 在高氧处理后或高氧处理时应用抗氧化剂效果是否有差异, 及最佳的用药时间点需要进一步探索。同时, 对于我们的体外实验结果, 还缺乏动物实验的验证。

基于星形胶质细胞在血管发育过程中的重要作用, 我们认为星形胶质细胞的氧化应激反应是ROP发病机制中的关键因素。而对星形胶质细胞的氧化应激反应进行阻断和挽救可能能够起到预防和治疗ROP的作用。

### 参考文献 (References)

- [1] 张国明, 李娜, 张福燕. 早产儿视网膜病变和足月新生儿眼病筛查指南[J]. 眼科新进展(ZHANG G M, LI N, ZHANG F Y. Guideline of screening for retinopathy of prematurity and neonates' eye disease [J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2014, 34(2): 101-7.
- [2] BASHINSKY A L. Retinopathy of prematurity [J]. *N C Med J*, 2017, 78(2): 124-8.
- [3] GARIANO R F, SAGE E H, KAPLAN H J, et al. Development of astrocytes and their relation to blood vessels in fetal monkey retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(12): 2367-75.
- [4] SCHNITZER J. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina [J]. *Neurosci Lett*, 1987, 78(1): 29-34.
- [5] FRUTTIGER M. Development of the retinal vasculature [J]. *Angiogenesis*, 2007, 10(2): 77-88.
- [6] PIERCE E A, FOLEY E D, SMITH L E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity [J]. *Arch Ophthalmol*, 1996, 114(10): 1219-28.
- [7] STONE J, ITIN A, ALON T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(7Pt1): 4738-47.
- [8] WEST H, RICHARDSON W D, FRUTTIGER M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes [J]. *Development*, 2005, 132(8): 1855-62.
- [9] BROXTERMAN E C, HUG D A. Retinopathy of prematurity: a review of current screening guidelines and treatment options [J]. *Mo Med*, 2016, 113(3): 187-90.
- [10] MORITA A, USHIKUBO H, MORI A, et al. Exposure to high-concentration oxygen in the neonatal period induces abnormal retinal vascular patterning in mice [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2016, 107(6): 216-24.
- [11] SMITH L E. Pathogenesis of retinopathy of prematurity [J]. *Semin Neonatol*, 2003, 8(6): 469-73.
- [12] Chen J, Smith L E. Retinopathy of prematurity [J]. *Angiogenesis*, 2007, 10: 133-40.
- [13] Heidary G, Vanderveen D, Smith L E. Retinopathy of prematurity: current concepts in molecular pathogenesis [J]. *Semin Ophthalmol*, 2009, 24: 77-81.
- [14] Hartnett M E, Penn JS. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367: 2515-26.
- [15] TAO C, ZHANG X. Retinal proteoglycans act as cellular receptors for basement membrane assembly to control astrocyte migration and angiogenesis [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(7): 1832-44.
- [16] UEMURA A, KUSUHARA S, WIEGAND S J, et al. Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 369-77.
- [17] STENZEL D, LUNDKVIST A, SAUVAGET D, et al. Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis [J]. *Development*, 2011, 138(20): 4451-63.
- [18] ADAMS R H, EICHMANN A. Axon guidance molecules in vascular patterning [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a001875.
- [19] CARMELIET P, TESSIER-LAVIGNE M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 193-200.
- [20] LARRIVEE B, FREITAS C, SUCHTING S, et al. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 428-41.
- [21] GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia [J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(6): 1163-77.
- [22] UBEZIO B, BLANCO R A, GEUDENS I, et al. Synchronization of endothelial Dll4-Notch dynamics switch blood vessels from branching to expansion [J]. *Elife*, 2016, 5(11): e12167.
- [23] SCOTT A, POWNER M B, GANDHI P, et al. Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11863.
- [24] DANILOV C A, FISKUM G. Hyperoxia promotes astrocyte cell death after oxygen and glucose deprivation [J]. *Glia*, 2008, 56(7): 801-8.