

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0045

文章编号 1671-8852(2026)04-0459-05

# CD3 $\zeta$ 在小鼠视网膜缺血再灌注模型的作用及其机制

郁璐<sup>1,2</sup> 张宁致<sup>1</sup> 杨宁<sup>1</sup> 邢怡桥<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>武汉大学人民医院眼科中心 湖北 武汉 430060;

<sup>2</sup>武汉大学附属爱尔眼科医院 湖北 武汉 430060

**摘要** 目的:探究 T 细胞是否参与视神经损伤及保护的过程。方法:将小鼠随机分为对照组、IR7D 组、shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组并观察视网膜神经细胞(RGCs)、T 细胞受体-CD3 复合物中 CD3 $\zeta$ 、细胞凋亡相关蛋白、丝裂原活化蛋白激酶通路中 P38 等表达水平。结果:在小鼠视网膜缺血再灌注(IR)后视网膜中 CD3 $\zeta$  表达升高。通过玻璃体腔注射靶向抑制 CD3 $\zeta$  表达的 AAV9 型病毒改善了 IR 后 RGCs 丢失和功能障碍。抑制 CD3 $\zeta$  可以增加 BCL-2/BAX 相对蛋白表达量,促使细胞向抗凋亡的方向转变,抑制丝裂原活化蛋白激酶通路中 P38 的磷酸化。结论:该研究进一步证实了 T 细胞参与了青光眼等眼部神经退行性疾病的发生,调节 T 细胞及 CD3 $\zeta$  的表达水平可能成为未来治疗视神经损伤的潜在靶点之一,为视神经损伤患者带来希望。

**关键词** T 细胞;CD3 $\zeta$ ;适应性免疫;视网膜神经节细胞;神经保护

中图分类号 R774

文献标志码 A

## Role and mechanism of CD3 $\zeta$ in retinal ischemia-reperfusion injury in mice

YU Lu<sup>1,2</sup>, ZHANG Ningzhi<sup>1</sup>, YANG Ning<sup>1</sup>, XING Yiqiao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China;

<sup>2</sup>Aier Eye Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

### Abstract

**Objective:** To investigate whether T cells are involved in the process of optic nerve injury and protection. **Methods:** Mice were randomly divided into control group, IR7D group, shRNACD3 $\zeta$ +IR7D group, and the expression levels of CD3 $\zeta$ , retinal ganglion cells (RGCs), apoptosis-related proteins and P38 of mitogen-activated protein kinase pathway were observed. **Results:** In this study, we identified increased expression of CD3 $\zeta$  in the retina following retinal ischemia reperfusion (IR) in mice. AAV9 targeted to inhibit CD3 $\zeta$  expression by intravitreal injection rescued RGCs loss and dysfunction after IR. Inhibition of CD3 $\zeta$  can increase the relative protein expression of BCL-2/BAX, promote the anti-apoptosis direction of cells, and inhibit the phosphorylation of P38. **Conclusion:** This study further confirmed that T cells are involved in the occurrence of ocular neurodegenerative diseases such as glaucoma, and regulating T cell activity or CD3 $\zeta$  expression may be one of the potential targets for the treatment of optic nerve injury in the future, which brings hope for patients with optic nerve injury.

**Key Words** T Cell; CD3 $\zeta$ ; Adaptive Immunity; Retinal Ganglion Cells; Neuroprotective

课题来源:湖北省自然科学基金资助项目(编号:2020CFB240;2023AFC019)。

作者简介:郁璐,女,1998—,医学硕士,主要从事视神经损伤及修复研究,E-mail: 2022283020100@whu.edu.cn。

通信作者:邢怡桥,E-mail: yiqiao\_xing57@whu.edu.cn。

视神经损伤(optic nerve injury, ONI)可由外伤性疾病、青光眼、炎症、遗传性疾病等多种原因引起,以视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)及其轴突的丧失为特征<sup>[1]</sup>。视神经来源于RGCs的延伸,作为中枢神经系统在眼部的延续,也有着中枢神经细胞的不可再生性<sup>[1-2]</sup>。因此 ONI 常引起不可逆的视力损害和视野丧失,极大地降低了患者的生活质量。小鼠视网膜缺血再灌注损伤模型(retinal ischemia/reperfusion, IR)可以模拟临床上视神经损伤后视网膜和视神经的各种变化,即通过快速升高的眼内压力导致视网膜血管阻塞,压力解除后,视网膜会发生炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等一系列的级联反应,导致视网膜屏障受损,各层结构被破坏,尤其是RGCs的丢失<sup>[3]</sup>。

许多研究<sup>[4-5]</sup>表明,多种免疫细胞如小胶质细胞和T细胞,参与视神经损伤后的神经保护。小胶质细胞属于视网膜常驻免疫细胞,对多种视网膜细胞的损伤与修复重要作用。一般认为,当血视网膜屏障被破坏时,适应性免疫细胞如T细胞才能渗入视网膜,破坏视网膜稳态<sup>[6-7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>发现,将青光眼模型小鼠体内的T淋巴细胞移植到生理状态正常及眼压正常的小鼠体内,正常小鼠也出现RGCs及其轴突的进行性丧失,进一步说明T细胞参与视神经的损伤及其修复过程。T细胞受体-CD3复合物(T cell receptor-CD3, TCR-CD3)被认为是T细胞识别、激活、发挥其功能的重要环节,TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 则负责识别MHC蛋白,CD3 $\zeta$ 是CD3复合体上一个重要的亚基,包含免疫受体酪氨酸激活基序<sup>[9-10]</sup>。但目前的研究对于T细胞具体通过哪种机制作用影响RGCs存活与功能还没有明确的答案。因此本文将通过研究CD3 $\zeta$ 进一步探讨T细胞在小鼠 ONI 及RGCs保护中是否发挥作用,并探讨其可能的机制,从而为 ONI 的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 本实验选用健康6~7周龄的雄性C57BL/6J小鼠,体质量均为19~23 g。所有实验动物在武汉大学第一临床学院眼科实验室动物室饲养,温度及湿度相对适宜,昼夜周期12 h,实验期间正常喂养小鼠。所有小鼠随机挑选并给予不同的实验措施。

**1.2 IR模型的构建** 随机挑选各组小鼠,麻醉后清洁小鼠眼周皮肤,扩大小鼠瞳孔。将连接有生理

盐水溶液的32号针头插入前房,可见前房进一步加深,球结膜颜色变淡,血管闭塞,无液体流出,维持该状态约60 min。针头取出后,可见眼部血液供应恢复<sup>[11]</sup>。

**1.3 视网膜铺片免疫荧光染色并计数** 免疫荧光染色检测不同条件下RGCs数量变化。处死小鼠后取出眼球,多聚甲醛中浸泡约45 min去除眼前节及玻璃体后小心分离出完整四叶草形状的视网膜<sup>[12]</sup>。再将视网膜置于含有5%牛血清白蛋白和0.5% TritonX-100的封闭液中,于4℃冰箱过夜。将视网膜转移至含有Brn3a抗体(Abcam)溶液中于4℃孵育48 h<sup>[13]</sup>。用PBS溶液漂洗视网膜,20 min一次,共漂洗3次。将漂洗好的视网膜转移至含有抗594荧光二抗(Jackson)液体中过夜。封片后使用显微镜观察和拍摄,在每个视网膜距视盘大致相同距离处取上下左右4个方向,每个方向连续取两个视野,Image J软件统计RGCs数量。

**1.4 玻璃体腔注射 shRNACD3 $\zeta$ /AAV9 型病毒** 采用微量注射装置行玻璃体腔注射,病毒滴度为 $3.60 \times 10^{12}$  VG $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,体积为1  $\mu$ L,成功转染后将抑制视网膜中CD3 $\zeta$ 的表达。麻醉小鼠后暴露角膜缘,于角膜缘后方1 mm左右处注射,缓慢退出针头。玻璃体腔注射可以突破血-视网膜屏障,帮助药物快速递送到眼部。注射病毒3周后再行IR。

**1.5 RT-PCR** 处死小鼠后,使用试剂盒(Ab-clonal)提取小鼠视网膜中RNA。使用Nanodrop One (Thermo)测量RNA浓度。使用试剂盒(塞维尔)进行逆转录和扩增。使用荧光染料试剂盒(塞维尔)于LightCycler<sup>®</sup>96仪器分两步进行实时荧光定量PCR。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法检测相关基因的表达水平并进行归一化处理。

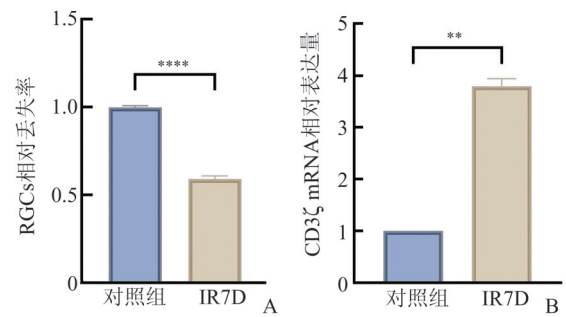
**1.6 Western Blot检测** Western Blot检测视网膜中各项蛋白的表达水平。于冰上分离小鼠视网膜,加入裂解液及蛋白酶抑制剂后研磨、离心,转移上清液即蛋白原液至EP管中。使用BCA法测蛋白浓度并用酶标仪检测蛋白吸光度,计算蛋白浓度。150 V的电泳条件下进行1 h,400 mA恒流条件下转膜35 min,裁取相应分子量大小的条带于快速封闭液中封闭10 min。TBST漂洗5 min,漂洗3次后转移至放有一抗的孵育盒中,4℃条件下孵育过夜。再次用TBST漂洗3次10 min,每次漂洗3次后转移至含有HRP(塞维尔)的二抗中,室温下孵育2 h。最后用ECL显影剂显影条带。使用Image J软件分析条带中内参基因及目的基因的灰度值。

**1.7 统计学分析** 所有数据均采用 GraphPad Prism 软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差进行表示,分析前数据均进行正态分布检验,两组数据间使用配对  $t$  检验,三组之间分析比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  表明数据之间差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 成功构建小鼠 IR 模型,RGCs 持续丢失,视网膜内 CD3 $\zeta$  表达增加** 视网膜铺片免疫荧光结果显示用 Brn3a 抗体标记的 RGCs 数量在 IR7D 后明显下降,并存在统计学意义( $P < 0.01$ ),该实验说明 IR 对视神经造成持续性的退行性损伤(如图 1A)。RT-PCR 检测结果显示 IR7D 后视网膜上 CD3 $\zeta$  的表达量明显上调,两组 CD3 $\zeta$  的表达量存在统计学意义( $P < 0.01$ ),进一步说明了 CD3 $\zeta$  及 T 细胞在损伤后被激活。

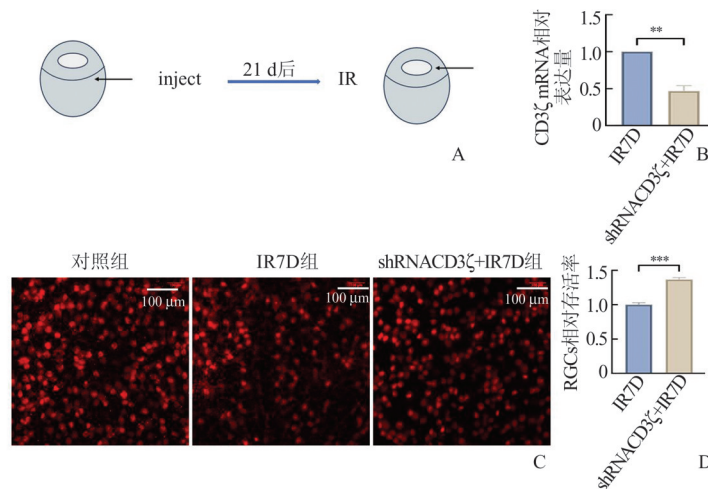
**2.2 玻璃体腔注射携带 shRNA-CD3 $\zeta$  的 AAV9 病毒可挽救 IR 后 RGCs 的丢失** 玻璃体腔注射携带



A. 对照组和 IR7D 组 RGCs 数量比较; B. 对照组和 IR7D 组 CD3 $\zeta$  表达量比较。\*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图1 RGCs 荧光染色结果及 CD3 $\zeta$  表达水平

靶向 CD3 $\zeta$  的 shRNA 的 AAV9 型病毒,3 周之后行 IR 造模(图 2A)。RT-PCR 结果显示:与 IR7D 组相比,shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组小鼠视网膜中 CD3 $\zeta$  的表达水平明显下降( $P < 0.01$ ),病毒成功转染到视网膜并成功抑制 CD3 $\zeta$  的表达(图 2B)。视网膜铺片免疫荧光结果显示:IR7D 后 RGCs 数量明显减少(图 2C),shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组小鼠视网膜中 RGCs 被明显挽救,数量增加(图 2D)( $P < 0.01$ )。



A. 玻璃体腔注射病毒及 IR 造模部位及时间示意图; B. IR7D 组和 shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组 CD3 $\zeta$  表达量比较; C. 对照组、IR7D 组和 shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组视网膜铺片免疫荧光染色图片; D. IR7D 组和 shRNACD3 $\zeta$ +IR7D 组 RGCs 数量比较。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

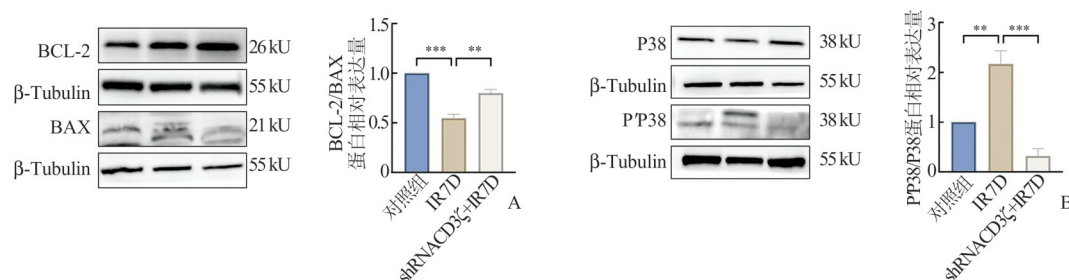
图2 CD3 $\zeta$  表达水平降低并成功挽救 RGCs 数量

**2.3 抑制 CD3 $\zeta$  可能通过调节细胞凋亡及 P38 通路起到神经保护作用** Western Blot 检测结果显示,3 组小鼠视网膜中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2)家族蛋白中 BCL-2 及 BAX 表达具有明显差异(均为  $P < 0.01$ )(如图 3A)。与对照组相比,IR7D 组 BCL-2/BAX 蛋白相对表达量明显下降,诱导细胞凋亡;与单纯 IR 组相比,当抑制 CD3 $\zeta$  表达之后再行 IR 组中 BCL-2/BAX 相对表达量明显增加,防止细胞进入凋

亡状态。P38 通路是参与细胞凋亡的重要一环,通过 Western Blot 检测发现,与对照组相比,IR 组 P38 的磷酸化程度明显增加( $P < 0.01$ );抑制 CD3 $\zeta$  则可以显著减少 P38 的磷酸化( $P < 0.01$ )(如图 3B)。

## 3 讨论

小鼠视网膜缺血再灌注损伤模型可以模拟多种眼科疾病,如缺血性视神经疾病、糖尿病性视网



A. 对照组、IR7D组和shRNACD3 $\zeta$ +IR7D组BCL-2/BAX相对表达量比较;B. 对照组、IR7D组和shRNACD3 $\zeta$ +IR7D组P38磷酸化相对表达量比较。\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ 。

图3 各组细胞凋亡及P38通路相对表达结果

膜病变<sup>[11]</sup>。构建视网膜缺血时急剧升高的眼压也可以很好地模拟临床上急性高眼压的病理机制。青光眼也是世界范围内造成不可逆性视力损伤及视野缺损的重要病因,目前主要的治疗手段依旧集中在降低眼内压力这一方面,但患者的视力依旧表现出不可逆的下降,因此找寻新的不依赖于降低眼压的治疗手段是十分迫切的<sup>[3, 14]</sup>。最近研究<sup>[7]</sup>指出免疫细胞特别是T细胞的参与可能是独立于眼压的危险因素。因此探究T细胞与ONI后RGCs之间的关系是十分重要的。

近年来,RGCs死亡方式有了越来越多的新观点,如细胞凋亡、铁死亡、坏死性凋亡等,但细胞凋亡依旧是保护RGCs的主要且有效靶点之一,BCL2家族中BCL-2/BAX表达水平是影响细胞凋亡作用强弱的重要因素<sup>[15]</sup>。BCL-2是发挥抑制凋亡作用的主要蛋白,可以通过线粒体、内质网等途径对抗凋亡。BAX则是典型的促凋亡基因,通过促进细胞色素C的释放,破坏线粒体膜的完整性发挥其功能。本实验证明了IR后视网膜细胞中BAX及BCL-2表达上调,BCL-2/BAX相对表达下降,这一结果说明IR促使视网膜各类细胞尤其是RGCs向着增强细胞凋亡的途径发展。当使用病毒抑制CD3 $\zeta$ 表达之后,BAX表达明显下降,BCL-2蛋白表达上调,BCL-2/BAX相对表达明显增加,这一结果说明了抑制CD3 $\zeta$ 的表达可以促进细胞发挥抗凋亡作用从而保护RGCs。

MAPK是细胞生长、分化、应激、炎症反应等多种效应的重要调控点,主要有4条通路,分别是P38、ERK、JNK、ERK5<sup>[5, 16]</sup>。其中P38通路是参与细胞凋亡,细胞应激和机体的炎症反应等多种生理及病理过程极为重要的一环<sup>[17]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明阻断P38的磷酸化可以防止急性或慢性高眼压症诱导的RGCs死亡。当细胞外受到炎症等刺激,P38被激活并磷酸化,发挥促凋亡作用。本实验证明了CD3 $\zeta$

表达减少会抑制P38的过度磷酸化,从而阻碍下游促凋亡事件,从而保护RGCs。

众多证据表明T细胞参与青光眼等神经退行性疾病的发生发展<sup>[4, 18-19]</sup>,本研究构建视网膜缺血再灌注模型,很好模拟了神经退行性疾病中的RGCs丧失,并通过抑制T细胞受体中的关键亚基CD3 $\zeta$ ,揭示了抑制T细胞的参与可以有效挽救RGCs的丢失,并发现抑制CD3 $\zeta$ 似乎可以将IR后视网膜的促凋亡状态转变为抗凋亡状态,抑制P38的磷酸化,这或许是T细胞参与视神经损伤与保护的重要一环。但实验依然存在不足许多之处,可能存在着其他许多目前未被发现和探查的靶点及机制,需要进一步探讨。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

#### 参考文献

- [1] CEN L P, PARK K K, SO K F. Optic nerve diseases and regeneration: How far are we from the promised land? [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2023, 51(6): 627-641.
- [2] NI Y, HU Y, ZHU L, et al. Lycium barbarum polysaccharide-derived nanoparticles protect visual function by inhibiting RGC ferroptosis and microglial activation in retinal ischemia-reperfusion mice [J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(26): e2304285.
- [3] BOU GHANEM G O, WAREHAM L K, CALKINS D J. Addressing neurodegeneration in glaucoma: Mechanisms, challenges, and treatments [J]. Prog Retin Eye Res, 2024, 100: 101261.
- [4] GENG Y, LU Z, GUAN J, et al. Microglia/Macrophages and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells enhance the ability of injury-activated lymphocytes to reduce traumatic optic neuropathy *in vitro* [J]. Front Immunol, 2021, 12: 687898.
- [5] PARK H B, BAEK K H. E3 ligases and deubiquitination

- ing enzymes regulating the MAPK signaling pathway in cancers [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(3): 188736.
- [6] TOMKINS NETZER O, NIEDERER R, GREENWOOD J, et al. Mechanisms of blood-retinal barrier disruption related to intraocular inflammation and malignancy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2024, 99: 101245.
- [7] WANG L, WEI X. T cell-mediated autoimmunity in glaucoma neurodegeneration [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803485.
- [8] GRAMLICH O W, DING Q J, ZHU W, et al. Adoptive transfer of immune cells from glaucomatous mice provokes retinal ganglion cell loss in recipients [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, 3: 56.
- [9] ALCOVER A, ALARCÓN B, DI BARTOLO V. Cell biology of T cell receptor expression and regulation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 103-125.
- [10] CHAPMAN N M, BOOTHBY M R, CHI H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(1): 55-70.
- [11] ZHANG Z, PENG S, XU T, et al. Retinal microenvironment-protected Rhein-GFFYE nanofibers attenuate retinal ischemia-reperfusion injury via inhibiting oxidative stress and regulating microglial/macrophage M1/M2 polarization [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(30): e2302909.
- [12] FANG F, ZHUANG P, FENG X, et al. NMNAT2 is downregulated in glaucomatous RGCs, and RGC-specific gene therapy rescues neurodegeneration and visual function [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(4): 1421-1431.
- [13] REBOUSSIN É, BASTELICA P, BENMESSABIH I, et al. Evaluation of Rho kinase inhibitor effects on neuroprotection and neuroinflammation in an *ex-vivo* retinal explant model [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2024, 12(1): 150.
- [14] BASAVARAJAPPA D, GALINDO ROMERO C, GUPTA V, et al. Signalling pathways and cell death mechanisms in glaucoma: Insights into the molecular pathophysiology [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 94: 101216.
- [15] WU J, ZHANG D, LIU H, et al. Neuroprotective effects of apigenin on retinal ganglion cells in ischemia/reperfusion: Modulating mitochondrial dynamics in *in vivo* and *in vitro* models [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 447.
- [16] CHEN W, ZHANG Y, WANG Z, et al. Dapagliflozin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing ferroptosis via MAPK signaling inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1078205.
- [17] ZHANG C, YU N, QIN Q, et al. Keratin8 deficiency aggravates retinal ganglion cell damage under acute ocular hypertension [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(12): 1.
- [18] HE C, XIU W, CHEN Q, et al. Gut-licensed  $\beta 7^{+}$  CD4 $^{+}$  T cells contribute to progressive retinal ganglion cell damage in glaucoma [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(707): eadg1656.
- [19] HE C, PENG K, ZHU X, et al. Th1 cells contribute to retinal ganglion cell loss in glaucoma in a VCAM-1-dependent manner [J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 43.

(2025-01-12 收稿)

编辑 孙孝云