

# 腺苷 A<sub>2A</sub> 受体拮抗剂 KW-6002 对 STZ 诱导的糖尿病视网膜膜病变的作用研究

王彦彦 张艳艳 易全勇

宁波市眼科医院 浙江 宁波 315000

**【摘要】**：目的：探讨腺苷 A<sub>2A</sub> 受体拮抗剂 KW-6002 对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病视网膜膜病变 (DR) 的作用及可能机制。方法：采用 55mg/kg STZ 连续 5 天腹腔注射建立 C57BL/6 小鼠糖尿病模型。小鼠随机分为对照组、糖尿病模型组 (STZ 组) 和 KW-6002 治疗组 (DB+KW-6002 组)。KW-6002 组自确诊糖尿病开始以 10μg/g 腹腔注射，每周 1 次，连续 4 周。采用 HE 染色观察视网膜病理学改变，免疫荧光染色检测胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、小胶质细胞标志物 (IBA-1)、细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 的表达。结果：HE 染色显示 STZ 组视网膜结构出现不同程度异常，神经节细胞层和内外核层细胞排列紊乱、数量减少、变性坏死，KW-6002 治疗组病变程度较 STZ 组减轻。免疫荧光分析显示：STZ 组 GFAP 阳性细胞密度显著升高，提示 Müller 细胞活化；IBA-1 阳性细胞密度增加，小胶质细胞活化明显增多；ICAM-1 阳性细胞密度上调，提示血管炎症反应增强。KW-6002 治疗显著抑制 GFAP (P<0.01)、IBA-1 (P<0.01)、ICAM-1 (P<0.01) 的过度表达。结论：腺苷 A<sub>2A</sub> 受体拮抗剂 KW-6002 能够通过抑制小胶质细胞活化、减轻视网膜炎症反应，对 STZ 诱导的早期糖尿病视网膜膜病变发挥一定的保护作用。

**【关键词】**：DR；腺苷 A<sub>2A</sub> 受体；小胶质细胞

DOI:10.12417/2705-098X.26.10.052

## 前言

糖尿病视网膜膜病变 (Diabetic Retinopathy, DR) 是糖尿病最常见且严重的微血管并发症之一。研究表明，视网膜神经节细胞 (RGC) 死亡和小胶质细胞 (RMC) 激活是 DR 的早期特征，发生在血管损伤之前<sup>[1]</sup>。在高血糖等刺激下，活化的 RMC 释放促炎因子，直接破坏血-视网膜屏障<sup>[2]</sup>。同时，ICAM-1 上调促进白细胞粘附和内皮损伤<sup>[3]</sup>。腺苷能系统在缺血/缺氧损伤中发挥重要作用，糖尿病视网膜膜中 A<sub>2A</sub>AR 表达上调，其过度激活促进小胶质细胞 M1 型极化，加剧神经炎症<sup>[4]</sup>。研究证实 A<sub>2A</sub>AR 拮抗剂可减轻多种视网膜膜病变模型的损伤。KW-6002 是 FDA 批准的 A<sub>2A</sub>AR 特异性拮抗剂，在多种模型中显示出保护作用且对正常视网膜血管无影响。然而，其在 DR 中的作用尚未明确。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

(1) 实验动物 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠购自宁波大学实验动物中心，体重 20-25g。本研究实验动物使用方案经伦理委员会审批 (批号：SYXK (浙) 2024-0002)，遵循 ARVO 关于眼科和视觉研究中动物使用的声明。

(2) 主要试剂与仪器：链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司)；KW-6002 (MedChemExpress 公司)；血糖仪及试纸 (罗氏公司)；兔抗 GFAP 抗体、兔抗 IBA-1 抗体、兔抗 ICAM-1 抗体；

Alexa Fluor 568 标记的二抗；TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒；DAPI；Nikon ECLIPSE CI-L 正置白光显微镜 (日本 Nikon 公司)；Nikon ECLIPSE 80I 正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

### 1.2 方法

(1) 糖尿病模型建立与分组：小鼠随机分为对照组、糖尿病组 (STZ 组) 和 KW-6002 治疗组 (DB+KW-6002 组)。糖尿病模型采用 STZ 诱导，按 55 mg/kg 体重腹腔注射 STZ (溶于 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液，pH 4.5)，连续注射 5 天。对照组注射等量柠檬酸盐缓冲液。注射后第 7 天检测尾静脉空腹血糖，血糖 ≥ 16.7 mmol/L 确认为糖尿病模型成功。在注射后 4 周、8 周和 12 周监测血糖，维持高血糖状态。

(2) 药物干预：KW-6002 溶于 DMSO 中配制成 5 mg/ml 储存液，使用前以 15% DMSO:15% 蓖麻油:70% PBS 的比例稀释，现配现用，避光保存。KW-6002 治疗组自确诊糖尿病开始以 10μg/g 体重剂量腹腔注射，每周 1 次，连续 4 周。对照组和糖尿病组注射等量溶剂。

(3) 标本采集与处理：确诊糖尿病后 12 周，小鼠经水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉处死，迅速摘除眼球。一部分经 4% 多聚甲醛固定 24 小时后，常规脱水、石蜡包埋，用于 HE 染色。另一部分眼球经 4% 多聚甲醛固定 2 小时后，30% 蔗糖溶液脱水，OCT 包埋，冰冻，用于免疫荧光染色和 TUNEL 染色。

(4) HE 染色: 石蜡切片脱蜡, 苏木素染色, 1%盐酸酒精分化数秒, 流水返蓝, 伊红染色, 脱水、透明、封片。显微镜下观察视网膜组织结构, 采集图像。

(5)免疫荧光染色: 冰冻切片室温复温 30 分钟, 0.3%Triton X-100 室温通透 10 分钟, 5%正常山羊血清室温封闭 1 小时, 分别加入兔抗 GFAP 抗体 (1:500)、兔抗 IBA-1 抗体 (1:200) 或兔抗 ICAM-1 抗体 (1:200), 4°C过夜。加入 Alexa Fluor 568 标记的山羊抗兔二抗 (1:500), 室温避光孵育 1 小时, DAPI 复染细胞核, 封片。荧光显微镜采集图像。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 视网膜组织病理学改变

对照组各层结构清晰完整, 神经节细胞排列紧密, 未见变性坏死; STZ 组结构异常, 神经节细胞变性坏死, 内核层和外核层结构紊乱, 细胞排列稀疏, 可见坏死缺失; DB+KW-6002 组结构轻度异常, 神经节细胞可见变性坏死, 细胞排列稀疏。(图 1)

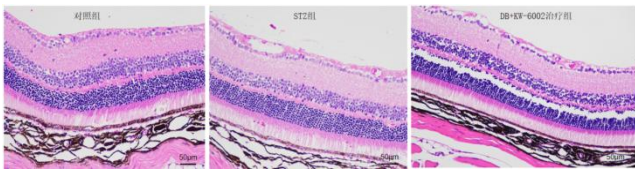


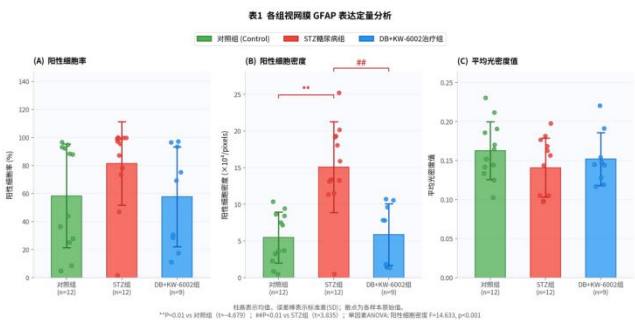
图 1 3 组视网膜组织病理学改变

对照组各层结构清晰完整; STZ 组结构异常; DB+KW-6002 组结构轻度异常。

### 2.2 视网膜胶质细胞活化及炎症标志物表达

#### 2.2.1 GFAP 表达

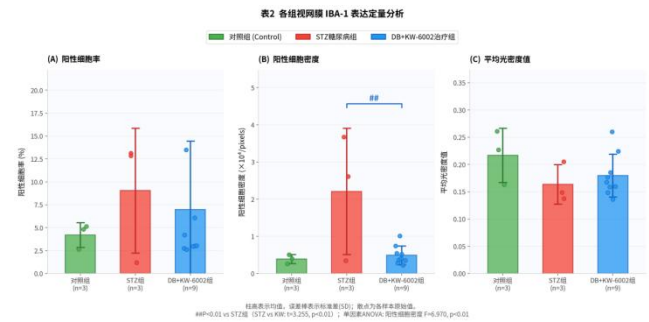
与对照组相比, STZ 组阳性细胞密度显著增加 ( $p<0.01$ )。DB+KW-6002 治疗组较 STZ 组阳性细胞密度显著降低 ( $p<0.01$ )。(表 1)



#### 2.2.2 IBA-1 表达

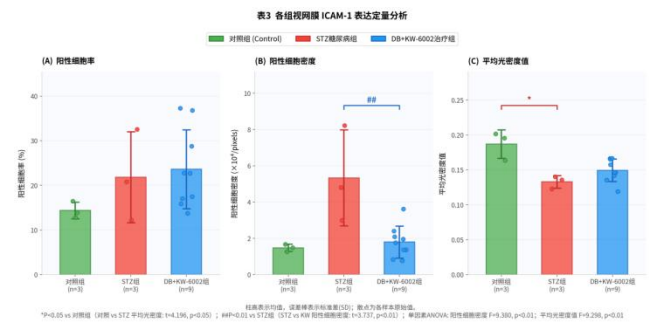
与对照组相比, STZ 组 IBA-1 阳性细胞率及阳性细胞密度

显著增多 ( $p<0.01$ ); 与 STZ 组相比, DB+KW-6002 组细胞密度显著降低 ( $p<0.01$ )。(表 2)



#### 2.2.3 ICAM-1 表达

与对照组相比, STZ 组 ICAM-1 阳性细胞密度显著增加 ( $p<0.05$ ); DB+KW-6002 组较 STZ 组阳性细胞密度显著降低 ( $p<0.01$ )。(表 3)



## 3 讨论

本研究探讨了腺苷 A2A 受体拮抗剂 KW-6002 对早期 DR 的作用。HE 染色结果显示, STZ 组视网膜出现典型的病理改变, 而 DB+KW-6002 组病变程度较轻, 提示该药物对视网膜结构具有保护作用。

免疫荧光揭示了糖尿病诱导的炎症反应: STZ 组 GFAP 阳性细胞密度显著升高, 反映 Müller 细胞活化和胶质增生反应增强。IBA-1 阳性细胞密度在 STZ 组明显增加, 提示小胶质细胞活化状态增强并向受损区域迁移浸润。ICAM-1 阳性细胞密度上调, 反映血管内皮细胞功能障碍和炎症反应增强。而 KW-6002 治疗可部分程度减轻这些改变: GFAP、IBA-1 和 ICAM-1 阳性细胞密度均减少。推测 KW-6002 通过抑制小胶质细胞活化、调节 Müller 细胞反应性增生、减轻血管炎症, 对早期糖 DR 发挥保护作用。

本研究中 STZ 组小胶质细胞显著增多, 与既往研究一致 [4,5]。ICAM-1 过表达促进白细胞浸润, 形成炎症级联反应。Müller 细胞活化和胶质增生是视网膜对损伤的反应性改变, 可分泌促炎因子和 VEGF, 加剧神经炎症 [6,7]。这些分子机制的发现为理解 DR 的复杂病理过程提供了新视角。

KW-6002 是高选择性 A2AR 拮抗剂, 本研究发现其显著抑制胶质细胞活化和 ICAM-1 过表达, 可能通过拮抗 A2AR 阻断

cAMP-PKA-CREB 信号通路,抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 活化,减少促炎因子释放<sup>[4]</sup>;通过减少促炎因子间接保护血-视网膜屏障完整性,减少血管渗漏。

综上,本研究初步证实腺苷 A2A 受体拮抗剂 KW-6002 通过抑制胶质细胞活化、减轻视网膜炎症反应,对早期 DR 发挥神经保护作用。

### 参考文献:

- [1] Hu A,Schmidt MHH,Heinig N.Microglia in retinal angiogenesis and diabetic retinopathy.Angiogenesis.2024;27(3):311-331.
- [2] Llorián-Salvador M,Cabeza-Fernández S,Gomez-Sanchez JA,de la Fuente AG.Glial cell alterations in diabetes-induced neurodegeneration.Cell Mol Life Sci.2024;81(1):47.
- [3] Liu L,He D,Fang L,Yan X.Association between E469K polymorphism in the ICAM1 gene and the risk of diabetic nephropathy:a meta-analysis.Lipids Health Dis.2018;17(1):293.
- [4] Boia R,Elvas F,Madeira MH,Aires ID,Rodrigues-Neves AC,Tralhão P,Szabó EC,Baqi Y,Müller CE,Tomé ÂR,Cunha RA,Ambrósio AF,Santiago AR.Treatment with A2A receptor antagonist KW6002 and caffeine intake regulate microglia reactivity and protect retina against transient ischemic damage.Cell Death Dis.2017;8(10):e3065.
- [5] Yamaguchi M,Nakao S,Arima M,Little K,Singh A,Wada I,Kaizu Y,Zandi S,Garweg JG,Matoba T,Shiraishi W,Yamasaki R,Shibata K,Go Y,Ishibashi T,Uemura A,Stitt AW,Sonoda KH.Heterotypic macrophages/microglia differentially contribute to retinal ischaemia and neovascularisation.Diabetologia.2024;67(10):2329-2345.
- [6] Li Z,Xiong Q,Li Q,Tang L.Parthenolide ameliorates diabetic retinopathy by suppressing microglia-induced Müller cell gliosis and inflammation via the NF- $\kappa$ B signalling.Int Immunopharmacol.2025;151:114219.
- [7] Russo B,D'Addato G,Salvatore G,Menduni M,Frontoni S,Carbone L,Camaioni A,Klinger FG,De Felici M,Picconi F,La Sala G.Gliotic response and reprogramming potential of human Müller cell line MIO-M1 exposed to high glucose and glucose fluctuations.Int J Mol Sci.2024;25(23):12877.