

实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠视网膜蛋白差异表达及生物信息分析

陈爽 邵先锋 张智慧 陈努 吴凌子 崔雪雪 李筱荣 张晓敏

天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 300384

通信作者: 张晓敏, Email: xzhang08@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 观察实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)小鼠视网膜蛋白质表达情况并探讨自身免疫性葡萄膜炎发生的可能分子机制。**方法** 取 12 只 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠采用随机数字表法随机分为模型组和正常对照组,每组 6 只。模型组小鼠皮下注射人光感受器间维生素 A 类结合蛋白(IRBP)651-670 建立 EAU 模型,通过直接检眼镜观察眼底,采用 OCT 仪和组织病理学染色检测视网膜改变。在免疫后第 18 天收集 2 个组小鼠视网膜,进行视网膜蛋白提取、蛋白酶切、质谱检测、数据解析和生物信息学分析。**结果** 成功建立 EAU 小鼠模型,免疫后第 10 天模型鼠视网膜出现局灶性损伤,免疫后第 18 天视网膜炎症反应达峰值,视网膜出现水肿、脱离,玻璃体液中有大量炎性细胞渗透。蛋白质组学结果显示,共鉴定到蛋白质 4 458 个,其中差异表达蛋白(变化倍数 >1.5 , $P<0.05$)有 522 个。在这些差异表达蛋白中,上调的蛋白有 147 个,包括 Stat1、Stat3 等;下调的蛋白有 375 个,包括 Gucy2f、Rho 等。经基因本体(GO)分析和 Reactome 通路分析,这些差异蛋白主要与血小板活化、整合素信号、T 细胞活化、光传导级联、Toll 样受体等密切相关。**结论** EAV 与 Stat1、Stat3 等蛋白的异常表达,以及血小板活化、整合素信号等信号通路的异常调节相关。

【关键词】 葡萄膜炎/免疫; 视网膜; 自身免疫性疾病; 蛋白质组学; C57BL 近交系小鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81671642)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.003

Differential expression and bioinformation analysis of retinal proteins in mice with experimental autoimmune uveitis

Chen Shuang, Shao Xianfeng, Zhang Zhihui, Chen Nu, Wu Lingzi, Cui Xuexue, Li Xiaorong, Zhang Xiaomin

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhang Xiaomin, Email: xzhang08@tmu.edu.cn

[Abstract] Objective To observe the expression of retinal proteins in experimental autoimmune uveitis (EAU) mice and to explore the possible molecular mechanism of autoimmune uveitis. **Methods** Twelve female C57BL/6J mice were randomly divided into model group and normal control group, 6 mice in each group. In the model group, the EAU model was established by subcutaneous injection of human interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) 651-670. The fundal change of EAV mice was assessed by direct ophthalmoscope, OCT and histopathological staining. At 18 days after immunization, the retinas of the two groups were taken for retinal protein extraction, protein restriction enzyme digestion, mass spectrometry detection, data analysis, and bioinformatics analysis. This study was approved by the experimental animal Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (TJYY2018070113). The feeding and use of experimental animals follow the ARVO statement. **Results** The EAU mouse model was successfully established. At 10 days after immunization, the retina of EAV mouse was damaged. At 18 days after immunization, retinal edema and infiltration of inflammatory cells into vitreous were observed. Proteomic results showed that a total of 4 458 proteins were identified in this study, of which 522 were differentially-expressed proteins (fold change >1.5 , $P<0.05$). Among these differentially-expressed proteins, 147 proteins including Stat1 and Stat3 were up-regulated and 375 proteins including Gucy2f and Rho were down-regulated. These differentially-expressed proteins were closely related to platelet activation, integrin signaling, T cell activation, the phototransduction cascade, Toll-like receptor and so on. **Conclusions** EAU is related to the abnormal expression of Stat1, Stat3 and other proteins, as well as the abnormal regulation of platelet activation and integrin signal pathway.

[Key words] Uveitis/immunity; Retina; Autoimmune diseases; Proteomics; Mice, inbred C57BL

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81671642)

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 12. 003

自身免疫性葡萄膜炎是常见的致盲眼病^[1]。目前其治疗方法主要包括皮质类固醇、免疫抑制剂及新型生物制剂,但仍有部分患者出现疗效不佳或难以耐受的不良反应^[2]。基于质谱的蛋白质组学技术具有高通量、高灵敏度、高准确性的特点,可从蛋白质水平研究和发现病理现象的本质,揭示基因活动的动态表达,已广泛用于各种自身免疫性疾病和眼科疾病的病理机制研究^[3-6]。在葡萄膜炎的蛋白质组学研究样本包括视网膜线粒体^[7],人的房水、血清、玻璃体液、外周血源性淋巴细胞^[8-10],马的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞、白细胞分化抗原 4(leukocyte differentiation antigen 4, CD4)阳性 T 细胞^[11-12],大鼠的房水、血浆等^[13-14]。在临床多种类型葡萄膜炎以及哺乳动物的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experiment autoimmune uveitis, EAU)模型中,视网膜是炎症发生的主要靶组织。然而,目前尚未见对葡萄膜炎的视网膜组织进行蛋白质组学的研究。本研究中通过建立 EAU 小鼠模型,应用液相色谱串联二级质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)的数据相关采集(data-dependent acquisition, DDA)模式,检测正常小鼠和 EAU 小鼠的视网膜蛋白质表达情况,对差异表达蛋白进行生物信息学分析,探讨自身免疫性葡萄膜炎可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 6~8 周龄健康 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 12 只(北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:11400700382262)。实验前排除有眼部疾患的小鼠。给予小鼠充足的饲料和水,提供 12 h 的节律性光照。本研究经天津医科大学眼科医院实验动物伦理委员会批准(批文号:TJYY2018070113),实验动物的喂养和使用遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)651-670(上海生物工程有限公司);完全弗氏佐剂、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)(美国 Sigma 公司);结核分枝杆菌(美国 Difco 公司);胰蛋白酶(美国 Promega 公司);甲酸、乙腈(德国 Merck 公司);BCA 蛋白浓度测

定试剂盒(北京索莱宝公司);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社)。相对分子质量 10 000 超滤浓缩管(德国 Sartorius 公司);直接检眼镜(德国 Heine 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)仪(德国海德堡公司);Infinite M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);超声仪、NanoDrop 2000 分光光度仪、真空干燥机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Tri ToF 6600 质谱仪、ekspert nano LC 415 液相色谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 EAU 模型建立 将 12 只小鼠按照随机数字表法随机分为模型组和正常对照组,每组 6 只。将 3 mg/ml 人 IRBP 651-670 和结核菌素质量浓度为 4 mg/ml 的完全弗氏佐剂等比例混匀成乳剂,在模型组小鼠大腿根部和背部皮下注射至少 4 个点,每只小鼠注射 200 μ l 乳剂,在免疫前和免疫后 24 h 分别腹腔内注射 5 μ g 百日咳毒素。正常对照组不做处理。通过直接检眼镜、OCT 仪、组织病理学染色评估 EAU 严重程度。

1.2.2 直接检眼镜检查眼底并评分 于免疫后第 10 天开始每天用直接检眼镜观察小鼠眼底,参照 Caspi 分级进行评分^[15]。具体如下:眼底无炎症为 0 分;视网膜周边出现 1~2 处局灶性损伤为 0.5 分;视网膜出现 <5 处局灶性损伤或 \leq 1 处线性损伤为 1 分;视网膜出现 >5 处局灶性损伤或 <5 处线性损伤或严重血管炎为 2 分;视网膜出现大量线状损伤或大的融合性损伤,视网膜下新生血管形成,视网膜出血,视盘水肿为 3 分;视网膜出现大范围的脱离萎缩为 4 分。

1.2.3 OCT 仪检测视网膜改变 于免疫后第 18 天,用复方托吡卡胺滴眼液给 2 个组小鼠双眼扩瞳,体积分数 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,双眼点用玻璃酸钠滴眼液,观察眼配戴硬性角膜接触镜,对侧眼配戴遮挡小帽。使用 OCT 仪对小鼠眼底以视盘为中心进行扫描:以视盘为交叉点,扫描眼底横向和纵向的各层结构,根据视网膜各层光反射强度,观察是否出现视网膜水肿、视网膜脱离等情况。

1.2.4 组织病理学观察视网膜组织改变 于免疫后第 18 天,腹腔注射过量 4% 水合氯醛处死各组小鼠,摘取小鼠双眼眼球,小鼠眼球经固定、脱水、包埋、切片、染色等步骤后电子显微镜下观察视网膜形态。

1.2.5 视网膜标本收集及处理 按照 1.2.4 部分摘取各组小鼠眼球,在冰上剥离出小鼠视网膜,立即在液氮中冷冻,保存在 -80°C 冰箱中。用 8 mol/L 尿素裂解液通过研磨、35%强度的超声提取视网膜蛋白,用 BCA 法测定蛋白质量浓度。

1.2.6 蛋白酶切和质谱检测 取 $100\ \mu\text{g}$ 视网膜蛋白,加入 DTT, 37°C 孵育 1 h ,打开蛋白二硫键;加入 IAA,避光条件下室温孵育 1 h ;平衡相对分子质量 $10\ 000$ 超滤管之后,将样本放入超滤管中离心,用 NH_4HCO_3 清洗超滤管;加入胰蛋白酶, 37°C 孵育 $12\sim 16\text{ h}$;离心超滤管,向收集管中加体积分数 1% 甲酸水溶液中止酶切, 60°C 真空蒸干;用体积分数 0.1% 甲酸水溶液重悬样品, NanoDrop 分光光度仪测量浓度;取 $2\ \mu\text{g}$ 肽段进行 LC-MS/MS 检测,采用 DDA 模式进行检测。

1.2.7 蛋白质谱数据解析 原始数据用 Maxquant 软件(版本 1.6.4.0,德国马克斯·普朗克生物化学研究所)进行数据库的搜索,参数设置:酶切方式为胰蛋白酶酶切且最多允许存在 2 个漏切位点,可变修饰为甲硫氨酸的氧化,蛋白氮端乙酰化,固定修饰为半胱氨酸氨基甲酰化;前体离子相对质量偏差为 0.1 ,碎片离子质量偏差为 $50\ \text{ppm}$;数据库为 SWISS 小鼠数据库(发行于 2019 年 2 月,含 $17\ 009$ 个已注释蛋白),蛋白和谱图假阳性率(false discovery rate, FDR)均小于 0.01 。采用 iBAQ 算法对蛋白进行定量,且 unique+razor 肽段不少于 2 个。

1.2.8 差异表达蛋白生物信息学分析 使用 R 软件对定量数据进行生物信息学分析,先进行样本间的相关性分析,筛选出差异表达蛋白,然后对差异表达蛋白进行基因本体(Gene Ontology, GO)注释分析和 Reactome 通路分析。

1.3 统计学方法

采用 R 软件(版本 3.5.3)进行统计分析。各样本蛋白检测数据经 \log_2 转换后呈正态分布,样本间的相关性分析使用 Pearson 相关性系数,差异蛋白的筛选使用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。数据可视化、基因注释和通路分析使用 R 软件的 cluster Profiler 软件包。

2 结果

2.1 各组眼底炎症评分

正常对照组小鼠视盘无充血、水肿,眼底血管分界清晰、无渗漏,未见炎症反应,评分为 0 分;模型组小鼠在免疫后第 11 天视网膜开始出现局灶性损伤,炎症评分为 (0.25 ± 0.09) 分,后逐渐加重,在免疫后第 18 天视网膜出现大量线状损伤或融合性损伤、视网膜下新生血管形成、视盘水肿,评分为 (2.50 ± 0.21) 分,随后炎症逐渐减轻。正常对照组和模型组的炎症评分曲线见图 1。本实验成功地建立了 EAU 模型。

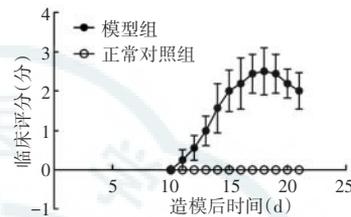


图 1 各组小鼠眼底炎症评分曲线图($n=8$) 正常对照组评分为 0 ;模型组小鼠在免疫后第 11 天视网膜炎症评分为 (0.25 ± 0.09) 分,之后逐渐升高,免疫后第 18 天炎症评分为 (2.50 ± 0.21) 分,之后逐渐下降

2.2 各组小鼠的 OCT 眼底图像

眼底 OCT 图像显示,模型组小鼠视网膜各层反射光不均匀、界限不清晰,视网膜水肿,视网膜层间出现点状反射光带,在近视网膜侧玻璃体腔出现大量点状或片状反射光带;正常对照组小鼠视网膜结构清晰,各层分界明显(图 2)。

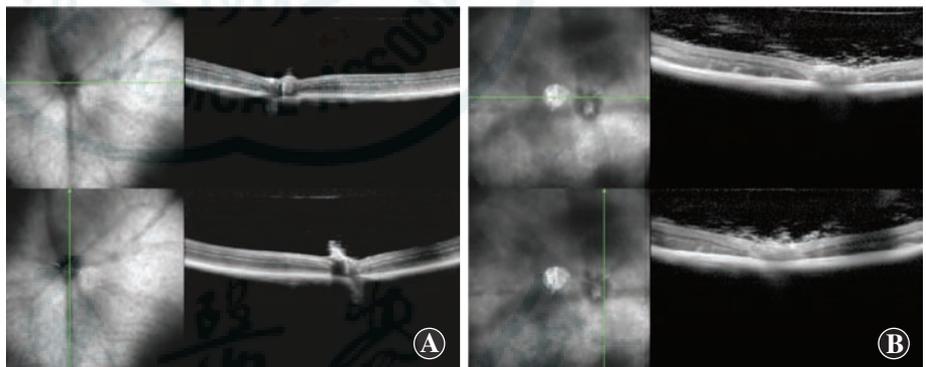


图 2 各组小鼠双眼 OCT 图像 A:正常对照组 小鼠视网膜结构清晰,各层分界明显,玻璃体腔无异常反射光带 B:模型组 小鼠视网膜结构紊乱,视网膜增厚,玻璃体腔出现大量点状或片状反射光带

2.3 各组小鼠视网膜的组织病理学染色

小鼠视网膜组织病理学染色结果显示,模型组小鼠出现弥漫性视网膜脱离伴严重渗出,玻璃体腔中有大量炎性细胞渗透;正常对照组小鼠视网膜结构清晰(图 3)。

2.4 各组小鼠视网膜蛋白质鉴定分析

各样本间蛋白检测数据 Pearson 线性相关分析显示,均 $r\geq 0.80$,其中模型组和正常对照组样本间蛋白数据 $r>0.90$ 的比例分别为 80.0% 和 73% ,提示各组数据之间具有很好的相关性(图 4A)。共鉴定到蛋白质

4 458 个,其中差异表达蛋白 522 个(变化倍数 > 1.5, $P < 0.05$);与正常对照组相比,表达升高的蛋白质有 147 个,表达降低的蛋白质有 375 个(图 4B,C)。表 1 和表 2 分别列出了模型组和正常对照组小鼠视网膜组织中上调和下调显著性前十的蛋白质。

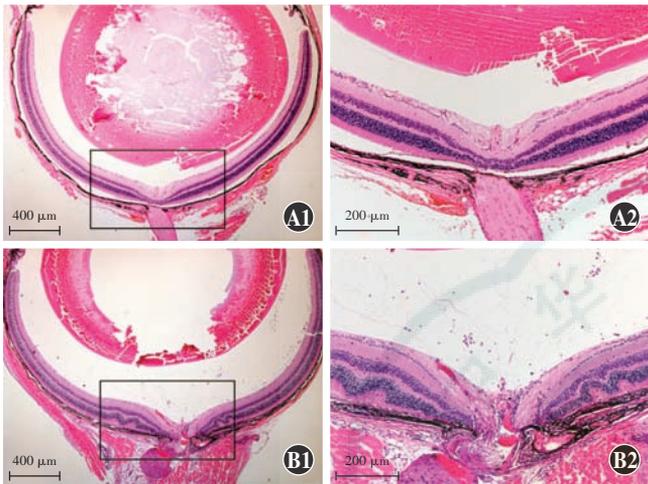


图 3 各组小鼠视网膜组织病理学染色(HE) A:正常对照组小鼠视网膜结构清晰(A1:×40,标尺=400 μm;A2:×100,标尺=200 μm) B:模型组小鼠出现弥漫性视网膜脱离伴严重渗出,玻璃体液中有大量炎性细胞渗透(B1:×40,标尺=400 μm;B2:×100,标尺=200 μm)

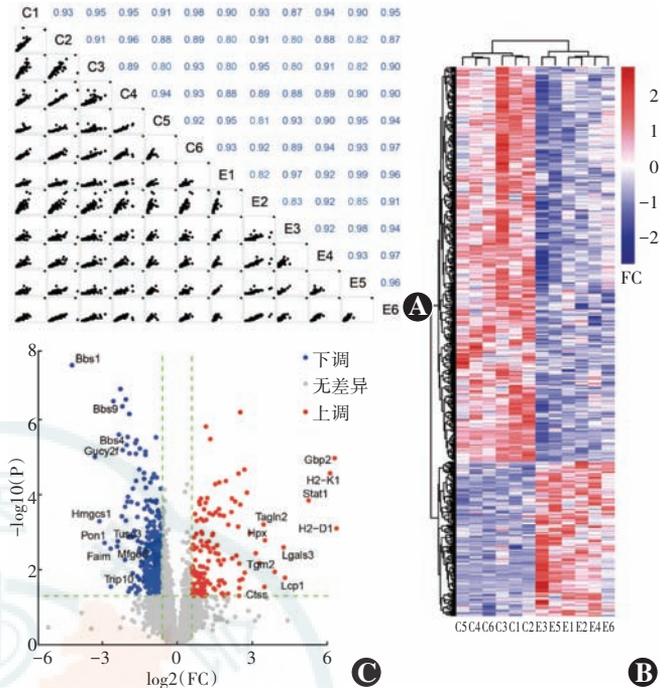


图 4 各组小鼠视网膜蛋白表达和分析结果 A:各样本间蛋白表达数据 Pearson 线性相关分析 B:差异蛋白的聚类分析 红色为相对于正常对照组上调,紫色为相对于正常对照组下调,颜色越深变化倍数越大 C:可定量蛋白表达情况 红点为模型组相对于正常对照组上调的蛋白,蓝点代表模型组相对于正常对照组下调的蛋白,灰点代表表达差异无统计学意义的蛋白 C:正常对照组样本;E:模型组样本;FC:变化倍数

表 1 前十位显著上调的差异表达蛋白列表

蛋白代码	基因名	蛋白名称	中文名称	P 值	变化倍数
P01899	<i>H2-D1</i>	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	H-2 I 类组织相容性抗原 D-B α 链	<0.001	82.54
Q9Z0E6	<i>Gbp2</i>	Guanylate-binding protein 2	鸟苷酸结合蛋白 2	<0.001	78.31
P01901	<i>H2-K1</i>	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain	H-2 I 类组织相容性抗原 K-B α 链	<0.001	69.15
P42225	<i>Stat1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	信号转导和转录激活子 1	<0.001	38.09
P16110	<i>Lgals3</i>	Galectin-3	半乳糖凝集素-3	0.003	19.04
Q91X72	<i>Hpx</i>	Hemopexin	血凝素	0.002	11.36
Q9WVA4	<i>Tagln2</i>	Transgelin-2	转胶蛋白-2	0.001	10.93
Q8K0E8	<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain	纤维蛋白原 β 链	0.007	9.72
E9PV24	<i>Fga</i>	Fibrinogen alpha chain	纤维蛋白原 α 链	0.004	8.81
Q60710	<i>Samhd1</i>	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase	脱氧核苷三磷酸水解酶	0.001	7.50

表 2 前十位显著下调的差异表达蛋白列表

蛋白代码	基因名	蛋白名称	中文名称	P 值	变化倍数
Q3V3N7	<i>Bbs1</i>	Bardet-Biedl syndrome 1 protein homolog	Bardet-Biedl 综合征 1 蛋白同源物	<0.001	-18.49
Q5SDA5	<i>Gucy2f</i>	Retinal guanylyl cyclase 2	视网膜鸟苷酸环化酶 2	<0.001	-9.79
Q8JZK9	<i>Hmgcs1</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	细胞质的羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶	<0.001	-8.65
P52430	<i>Pon1</i>	Serum paraoxonase/arylesterase 1	血清对氧磷酶/芳酯酶 1	0.002	-7.50
Q9WUD8	<i>Faim</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule 1	Fas 凋亡抑制分子 1	0.003	-6.33
Q811G0	<i>Bbs9</i>	Protein PTHB1	PTHB1 蛋白	<0.001	-5.88
P21956	<i>Mfge8</i>	Lactadherin	乳胶黏附素	0.002	-5.27
Q8BTV1	<i>Tusc3</i>	Tumor suppressor candidate 3	抑癌基因候选基因 3	0.002	-5.18
Q8C1Z7	<i>Bbs4</i>	Bardet-Biedl syndrome 4 protein homolog	Bardet-Biedl 综合征 4 蛋白同源物	<0.001	-5.05
P15499	<i>Prph2</i>	Peripherin-2	外周蛋白 2	<0.001	-4.82

2.5 各组小鼠视网膜差异蛋白的 GO 功能分析

对视网膜组织差异表达的蛋白质进行进一步的 GO 分析,各功能富集结果前十位如图 5 显示,表达上调的蛋白显著富集的生物过程功能条目主要有细胞形状的调节、蛋白质的同寡聚化、死亡域受体对外源性凋亡信号通路的调控;细胞组分类别富集到的功能条目主要有含胶原细胞外基质、细胞外基质、溶酶体;分子功能类别富集到的功能条目主要有钙依赖蛋白结合、细胞黏附分子结合、肌动蛋白丝结合。表达下调的蛋白参与的生物过程显著富集的功能条目包括视觉感知、光刺激的感觉直觉、前体代谢产物和能量的产生;细胞组分类别主要富集到线粒体内膜、细胞器内膜、线粒体膜成分;分子功能类别主要富集到电子转移活性、辅酶结合、磷酸酯水解酶活性等。

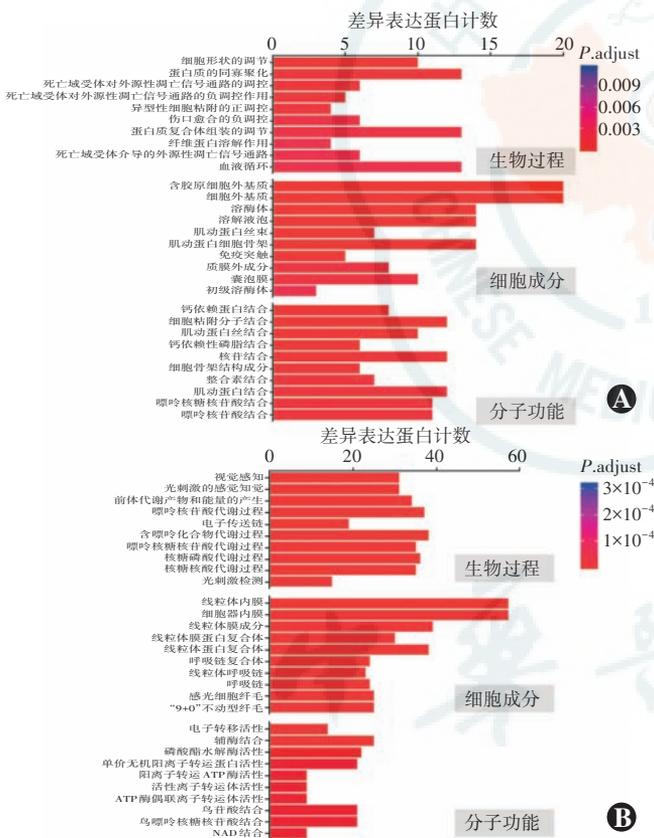


图 5 差异表达蛋白的 GO 富集分析 A:模型组表达上调蛋白的 GO 分析 B:模型组表达下调蛋白的 GO 分析 横坐标代表参与各功能条目的差异表达蛋白数量,纵坐标代表各通路

2.6 视网膜差异表达蛋白的 Reactome 通路分析

将差异表达蛋白进行 Reactome 通路分析,发现模型组表达上调的蛋白质富集到 18 条信号通路(图 6A),主要包括血小板脱颗粒,血小板细胞质 Ca²⁺升高的反应,血小板活化、信号传导和聚集等,可能与葡萄膜炎导致的 T 细胞活化、血管内皮损伤以及细胞间的

黏附降低相关。表达下调的蛋白富集到 29 条信号通路(图 6B),主要包括光传导级联,三羧酸循环与呼吸电子传递,光传导级联的失活、恢复和调节等,可能与缺氧损伤、视网膜细胞凋亡增加有关。

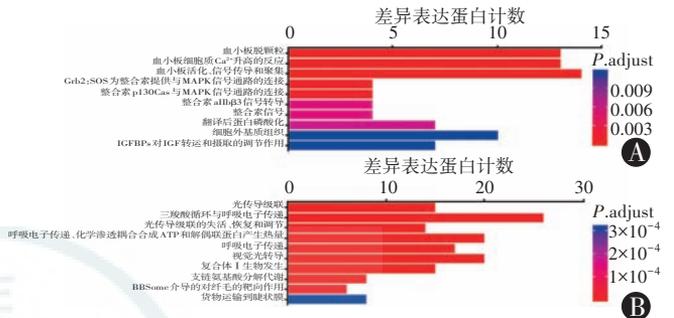


图 6 差异表达蛋白的 Reactome 通路分析 A:模型组表达上调蛋白主要参与的通路 B:模型组表达下调蛋白主要参与的通路 横坐标代表参与各功能条目的差异蛋白数量,纵坐标代表各通路

3 讨论

由于近年来在蛋白质化学、质谱、生物信息学等方面的研究进展,蛋白质组学在葡萄膜炎研究领域也受到越来越多的关注。EAU 早期视网膜线粒体蛋白组学分析显示,αA 晶体蛋白、βB2 晶体蛋白水平升高,ATP 合成酶水平下降,这为早期应激性视网膜损伤提供了证据^[7,16]。Kalinina Ayuso 等^[10]通过对青少年特发性关节炎(juvenile idiopathic arthritis, JIA)并发葡萄膜炎患者房水的液相串联质谱检测发现,甲状腺素运载蛋白(thyroxine transporter protein, TTR)是 JIA 相关葡萄膜炎的一种潜在眼内生物标志物。S-arrestin 是一种视网膜蛋白,是导致自身免疫性视网膜退行性变的潜在原因。Velez 等^[9]在 1 例进行性特发性视力丧失患者的血清中检测到 S-arrestin 抗体,根据蛋白质组学分析结果进行诊断指导,逆转了视觉丧失,结果表明利用蛋白质组学工具可以实现个体化治疗。

目前认为 EAU 的病理过程是初始 T 细胞在体内被视网膜抗原激活,发生增生和分化,激活的视网膜抗原特异性 T 细胞从引流淋巴结和/或脾脏移行进入眼内,识别眼内抗原,破坏血-视网膜屏障,通过分泌的黏附分子和趋化因子等进一步募集 T 细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞等于眼内,放大炎症反应,导致眼内实质细胞损害^[17]。自身免疫性葡萄膜炎发病的具体机制尚不明确,涉及多个蛋白和信号通路,深入学习 EAU 的生物信息学信息,可以从中寻找到有价值的蛋白质进行进一步分析,揭示自身免疫性葡萄膜炎的病理机制,为其针对性治疗提供理论依据。EAU 小鼠模

型是目前自身免疫性葡萄膜炎公认且广泛应用的动物模型,可以模拟疾病状态下机体的变化,利用蛋白质组学检测视网膜组织中发生变化的蛋白质,再从中选取变化倍数高且差异有统计学意义的蛋白进行后续实验,可为机制研究提供下一步的方向和基础。

本研究中共检测到视网膜组织蛋白 4 458 个,与 Ahmad 等^[6]研究视网膜蛋白质总数 4 832 个接近。本研究中共筛选出差表达蛋白 522 个,其中上调 147 个,下调 375 个。本实验研究显示,Stat1 在 EAU 小鼠视网膜组织中出现了明显上调,约为正常对照组的 38 倍。Stat1 是信号转换器和转录激活剂家族成员,可诱导特异性转录因子 T-bet 的表达,促进 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的表达,促进辅助性 T 细胞 (T helper, Th) 1 细胞的分化。Stat3 出现明显上调,约为正常对照组的 5 倍。Stat3 可以诱导 Th17 转录因子维 A 酸相关孤儿受体 (retinoic acid-related orphan receptor, ROR) γ t 的表达,促进白细胞介素 (interleukin, IL)-17A、IL-17F 和 IL-22 的表达,促进 Th17 的分化。Th1 细胞和 Th17 细胞共同参与促进 EAU 的发生和发展^[18],而在 CD4⁺ T 细胞中存在 Stat3 靶向缺失的小鼠不会发展为 EAU^[19]。在表达上调的其他蛋白中,大部分参与免疫功能,如 Lgals3、Irgm1 和 Erp1 等。Lgals3 是一种强烈的促炎信号,可诱导 T 细胞活化和凋亡,在肿瘤免疫耐受中起作用^[20]。Irgm 在炎症疾病中具有保护作用,Irgm/Irgm1 能抑制含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 (NLR family, pyrin domain containing, NLRP) 3 炎症小体的活化,进而抑制炎症反应^[21]。Erp1 对主要组织相容性复合体-I 结合多肽的稳定性和免疫学特性有影响,Erp1 基因的多态性参与白塞病的遗传易感性^[22-23]。

本研究显示,表达下调的蛋白主要集中在视觉感知和传导功能、光刺激的感觉知觉功能,这与 EAU 发病后视网膜各层组织结构破坏相一致。Gucy2f 可能在光感受器的视杆细胞和/或视锥细胞中起特殊作用,Gucy2f 敲除斑马鱼的视觉运动反应降低,视锥视杆外节丢失和缩短,出现视功能障碍和光感受器层营养不良^[24]。Rho 是低强度成像视觉所需的光感受器,另外 Rho/ROCK 通路在眼部炎症中起作用,可能通过抑制核转录因子 (nuclear transcription factor, NF)- κ B 的核转位而抑制炎症细胞的浸润^[25]。

Reactome 通路分析显示,差异表达蛋白质与 T 细胞活化、血小板活化和凝血级联、整合素信号、光传导级联、代谢途径、丝裂原活化蛋白激酶、p21 活化激酶、Toll 样受体等密切相关。T 细胞活化过程中,会发生

一系列的生物化学反应,如细胞内游离 Ca²⁺ 浓度升高,进而活化钙调磷酸酶使 NF- κ B、活化 T 细胞核因子等转录因子入核启动转录过程,蛋白酪氨酸激酶磷酸化后募集 Grb2 等结合分子,与信号分子相互作用激活下游信号分子^[26-27]。血小板活化可以释放出大量具有调节细胞功能的因子,如二磷酸腺苷、三磷酸腺苷、钙离子、肾上腺素等^[28];释放出的这些因子会进一步促进血小板的活化、聚集和分泌作用,导致级联放大作用;同时招募大量的淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞,并且促进其激活和分泌^[29]。T 细胞激活后,下游的整合素信号也会激活^[26],而由整合素介导的血管内皮细胞与白细胞之间的黏附是炎症细胞浸润的先决条件,整合素信号上调,这与视网膜组织大量炎症细胞浸润密切相关。显著上调的信号通路还有内源性配体对 TLR 的调节作用,TLR 与自身免疫性葡萄膜炎之间的关系已有多篇文献报道,TLR 是连接天然免疫和获得性免疫之间的桥梁。内毒素激活 TLR4 可诱导小鼠葡萄膜炎的标准模型^[30],TLR7 激动剂可以促进骨髓来源树突状细胞分泌与 Th17 细胞极化相关的细胞因子,并促进特异性 Th17 细胞的分化^[31],而通过壳聚糖负载的 TLR3-小干扰 RNA 转染 RPE 可有效缓解 B10R III 小鼠 EAU^[32]。

综上所述,本研究表明 EAU 发病后视网膜组织出现多种蛋白质的差异表达,差异表达的蛋白质主要与 T 细胞活化、血小板活化、整合素信号、光传导级联、Toll 样受体等密切相关。后续实验可以针对这些蛋白质和通路探索研究葡萄膜炎的具体机制以及生物标志物,为葡萄膜炎的靶向治疗提供新方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shandas M, Bassilious K, Murray PI. Health-related quality of life in patients with uveitis [J]. Br J Ophthalmol, 2019, 103 (9) : 1284-1288. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2018-312882.
- [2] Pan J, Kapur M, McCallum R. Noninfectious immune-mediated uveitis and ocular inflammation [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2014, 14 (1) : 409. DOI: 10. 1007/s11882-013-0409-1.
- [3] Rovin BH, Klein JB. Proteomics and autoimmune kidney disease [J]. Clin Immunol, 2015, 161 (1) : 23-30. DOI: 10. 1016/j. clim. 2015. 04. 021.
- [4] Chen DY, Chen YM, Chien HJ, et al. Metabolic disturbances in adult-onset Still's disease evaluated using liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomic analysis [J/OL]. PLoS One, 2016, 11 (12) : e0168147 [2019-01-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/28005947. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0168147.
- [5] Ferreira T, de Andrade HM, de Pádua PM, et al. Identification of potential biomarkers for systemic lupus erythematosus diagnosis using two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) and mass spectrometry [J]. Autoimmunity, 2017, 50 (4) : 247-256. DOI: 10. 1080/08916934. 2017. 1344975.
- [6] Ahmad MT, Zhang P, Dufresne C, et al. The human eye proteome project: updates on an emerging proteome [J/OL]. Proteomics, 2018,

- 18(5-6) : e1700394 [2019-02-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356342>. DOI:10.1002/pmic.201700394.
- [7] Saraswathy S, Rao NA. Mitochondrial proteomics in experimental autoimmune uveitis oxidative stress [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(12) : 5559-5566. DOI:10.1167/iops.08-2842.
- [8] Hauck SM, Lepper MF, Hertl M, et al. Proteome dynamics in biobanked horse peripheral blood derived lymphocytes (PBL) with induced autoimmune uveitis [J/OL]. *Proteomics*, 2017, 17(19) : 1700013 [2019-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846213>. DOI:10.1002/pmic.201700013.
- [9] Velez G, Roybal CN, Colgan D, et al. Precision medicine; personalized proteomics for the diagnosis and treatment of idiopathic inflammatory disease [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(4) : 444-448. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2015.5934.
- [10] Kalinina Ayuso V, de Boer JH, Byers HL, et al. Intraocular biomarker identification in uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(5) : 3709-3720. DOI:10.1167/iops.12-10865.
- [11] Uhl PB, Szober CM, Amann B, et al. *In situ* cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis [J]. *J Proteomics*, 2014, 109 : 50-62. DOI:10.1016/j.jprot.2014.06.020.
- [12] Degroote RL, Uhl PB, Amann B, et al. Formin like 1 expression is increased on CD4⁺ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis [J]. *J Proteomics*, 2017, 154 : 102-108. DOI:10.1016/j.jprot.2016.12.015.
- [13] Guo D, Gu P, Liu Z, et al. Proteomic analysis of rat plasma with experimental autoimmune uveitis based on label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 976-977 : 84-90. DOI:10.1016/j.jchromb.2014.11.015.
- [14] Pepple KL, Rotkis L, Wilson L, et al. Comparative proteomic analysis of two uveitis models in lewis rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(13) : 8449-8456. DOI:10.1167/iops.15-17524.
- [15] Agarwal RK, Silver PB, Caspi RR. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 900 : 443-469. DOI:10.1007/978-1-60761-720-4_22.
- [16] 徐琼, 赵明威, 黎晓新. α A 晶状体蛋白的功能及其在相关眼部疾病中的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(2) : 149-154. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.015.
- Xu Q, Zhao MW, Li XX. The function of α A-crystallin and effects in ocular diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37(2) : 149-154. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.015.
- [17] Caspi RR. Understanding autoimmune uveitis through animal models. The Friedenwald Lecture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3) : 1872-1879. DOI:10.1167/iops.10-6909.
- [18] 王贝贝, 田庆梅, 解孝锋, 等. $\gamma\delta$ T 细胞在实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠脾脏中的动态表达及作用机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(9) : 793-798. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.006.
- Wang BB, Tian QM, Xie XF, et al. Dynamic expression and mechanism of $\gamma\delta$ T cells in the spleen of mouse with experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(9) : 793-798. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.006.
- [19] Liu X, Lee YS, Yu CR, et al. Loss of STAT3 in CD4⁺ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 2008, 180(9) : 6070-6076. DOI:10.4049/jimmunol.180.9.6070.
- [20] Xue H, Zhao Z, Lin Z, et al. Selective effects of ginseng pectins on galectin-3-mediated T cell activation and apoptosis [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 219 : 121-129. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.05.023.
- [21] Mehto S, Jena KK, Nath P, et al. The Crohn's disease risk factor IRGM limits NLRP3 inflammasome activation by impeding its assembly and by mediating its selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(3) : 429-445. DOI:10.1016/j.molcel.2018.11.018.
- [22] López de Castro JA. How ERAP1 and ERAP2 shape the peptidomes of disease-associated MHC-I proteins [J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 2463 [2019-02-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30425713>. DOI:10.3389/fimmu.2018.02463.
- [23] Zhang L, Yu H, Zheng M, et al. Association of ERAP1 gene polymorphisms with Behçet's disease in han chinese [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(10) : 6029-6035. DOI:10.1167/iops.15-17544.
- [24] Stiebel-Kalish H, Reich E, Rainy N, et al. Gucy2f zebrafish knockdown—a model for Gucy2d-related leber congenital amaurosis [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(8) : 884-889. DOI:10.1038/ejhg.2012.10.
- [25] Uchida T, Honjo M, Yamagishi R, et al. The anti-inflammatory effect of ripasudil (K-115), a Rho kinase (ROCK) inhibitor, on endotoxin-induced uveitis in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(12) : 5584-5593. DOI:10.1167/iops.17-22679.
- [26] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27 : 591-619. DOI:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- [27] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4) : 227-242. DOI:10.1038/nri3405.
- [28] Mitrugno A, Rigg RA, Laschober NB, et al. Potentiation of TRAP-6-induced platelet dense granule release by blockade of P2Y12 signaling with MRS2395 [J]. *Platelets*, 2018, 29(4) : 383-394. DOI:10.1080/09537104.2017.1316482.
- [29] Xu X, Sun B. Platelet granule secretion mechanisms: Are they modified in sepsis? [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(5) : 845-850. DOI:10.1016/j.thromres.2015.09.008.
- [30] Allensworth JJ, Planck SR, Rosenbaum JT, et al. Investigation of the differential potentials of TLR agonists to elicit uveitis in mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(6) : 1159-1166. DOI:10.1189/jlb.0511249.
- [31] 陈琳, 粘红, 魏瑞华, 等. TLR7 激动剂 CL097 对实验性自身免疫性葡萄膜炎中 Th17 细胞活性的促进作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(4) : 294-299. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.002.
- Chen L, Nian H, Wei RH, et al. Enhancement effect of TLR7 agonist CL097 on the activity of Th17 cells in experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(4) : 294-299. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.002.
- [32] Chen S, Yan H, Sun B, et al. Subretinal transfection of chitosan-loaded TLR3-siRNA for the treatment of experimental autoimmune uveitis [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3 Pt A) : 726-735. DOI:10.1016/j.ejpb.2013.09.005.

(收稿日期:2019-07-10 修回日期:2019-11-02)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确、能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)