

# MANF 在 Lewis 大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎中的作用

鲍颖超<sup>1</sup>, 高翔<sup>1</sup>, 徐龙<sup>2</sup>, 蒋正轩<sup>1</sup>, 陶黎明<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察中脑胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) 在大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎 (EAU) 中的作用。方法 用感光细胞间维生素 A 类结合蛋白 (IRBP) 免疫 Lewis 大鼠, 制造 EAU 模型。实验组在免疫后第 3、7、11 天通过玻璃体腔给予 MANF, 对照组给予磷酸盐溶液 (PBS) 作为阳性对照, 正常组不做处理。采用 Caspi 的方法进行炎症程度评分。在炎症高峰期处死大鼠, 采用 HE 染色法检测 3 组大鼠视网膜炎症反应情况和组织结构形态学变化。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测白细胞介素-17 (IL-17)、干扰素- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) 的表达。结果 大鼠在免疫后第 3 天开始出现炎症, 第 14 天为炎症高峰期。免疫后第 14 天组织病理学和临床表现提示, 实验组大鼠的眼部炎症、病理组织学改变较对照组明显改善。实验组致炎因子 IL-17 和 INF- $\gamma$  表达水平显著低于对照组。结论 MANF 玻璃体腔给药减轻大鼠 EAU 的炎症程度, 降低 IL-17 和 INF- $\gamma$  的表达可能是其机制一部分作用, 具体机制有待进一步研究。

**关键词** 葡萄膜炎; 自身免疫性疾病; 光感受器间维生素 A 类结合蛋白; 动物模型; 中脑胶质细胞来源的神经营养因子

中图分类号 R 773. 9

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 01 - 0100 - 05  
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2020. 01. 021

葡萄膜炎是一种以葡萄膜炎为特征的疾病, 被认为是眼睛中血管层的炎症, 是虹膜、睫状体及脉络膜组织炎症的总称。其眼部并发症包括带状角膜变性、角膜水肿、囊样黄斑水肿、白内障、青光眼以及视网膜脱离等, 这些与葡萄膜炎相关的并发症可导致的严重视力损失<sup>[1-2]</sup>。

中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF), 又称 armet, 是一种新发现的神经营养因子, 在内质

网中的表达尤为丰富, 并且受内质网应激的调节<sup>[3-4]</sup>。尽管它可以保护细胞免受内质网应激诱导的细胞死亡, 也可以调节神经炎症和免疫反应, 以促进组织修复和再生<sup>[5-6]</sup>, 但很少有关于 MANF 在葡萄膜炎中作用的研究。Gao et al<sup>[7]</sup>的研究中首次证明 MANF 在小鼠视网膜中表达, 并发挥免疫调节功能, 促进视网膜组织修复和成功再生。由此推断, MANF 可使免疫细胞偏向于抗炎表型, 具有保守的免疫调节功能, 能促进脊椎动物和无脊椎动物的组织修复, 并具有加强视网膜再生治疗的作用。现设计如下试验, 以验证此假说。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 6 ~ 8 周龄雄性 Lewis 大鼠 30 只 (北京维通利华实验动物技术有限公司)。实验前在 SPF 环境下饲养 1 周, 所有动物均自由饮水和饮食。所有实验动物的喂养及使用均遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

**1.2 实验试剂及耗材** 光感受器间维生素 A 类结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP) 1169-1191 (上海生工); 含有 5 mg/ml 结核杆菌的完全福氏佐剂 (complete freund adjuvant, CFA)、百日咳毒素 (美国 Sigma 公司); 大鼠中脑胶质细胞源性神经营养因子蛋白 (美国 Novus 公司)。Davidson's fixative (北京索莱宝公司); TRIzol Reagent (美国 Ambion 公司); 荧光定量染料、DNA 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (日本 Takara 公司); 其余常见试剂和耗材均来自安徽医科大学基础医学院免疫学教研室。

## 1.3 方法

**1.3.1 大鼠自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 模型的建立以及 MANF 的注射** 根据文献<sup>[8]</sup>所述方法构建大鼠 EAU。MANF 以粉末形式溶解于磷酸盐 (phosphate buffered saline, PBS) 中。将大鼠分为 3 组, 即正常组、实验组和对照组, 每组 10 只。其中, 实验组药物为 MANF (2  $\mu$ g/ $\mu$ l), 对照组药物为 PBS (阳性对照)。正常组不做任何处理; 实验组的大鼠, 免疫后第 3、7、11

2019 - 10 - 16 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (编号: 81300755)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第二附属医院眼科, 合肥 230601

<sup>2</sup> 安徽医科大学免疫教研室, 合肥 230032

作者简介: 鲍颖超, 女, 硕士研究生;

陶黎明, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: lmtao9@163.com

天通过玻璃体腔注 MANF (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ,2  $\mu\text{l}$  每只眼<sup>[5-9]</sup>; 对照组大鼠免疫后第 3、7、11 天通过玻璃体腔注 PBS 2  $\mu\text{l}$  每只眼。

**1.3.2 裂隙灯显微镜下观察眼前节炎症反应** 从免疫后第 7 天起,每天用裂隙灯显微镜观察并进行每组眼内炎症的临床评价和临床评分。参照 Caspi 的临床分级标准<sup>[10]</sup> 进行评分并记录。评分细则如下 0 分: 正常,未见明显炎症; 0.5 分: 虹膜血管扩张; 1 分: 虹膜中度充血,瞳孔收缩异常; 2 分: 前房轻度浑浊; 3 分: 中度不透明的前房伴暗红色反射,瞳孔缩小; 4 分: 可见前房积脓,瞳孔膜闭,视网膜红光反射消失。

**1.3.3 视网膜组织病理学观察** 实验中的 Lewis 大鼠在 IRBP 免疫后第 14 天处死大鼠后立即摘取眼球(注意保留 2 mm 的视神经) 固定在 Davidson's fixative 中,石蜡包埋,平行于视神经方向进行切片,HE 染色。在 200 倍光学显微镜下观察大鼠视网膜组织结构,并参照 Caspi 组织病理学分级标准<sup>[10]</sup> 进行评分。基于视网膜炎性细胞浸润程度,将通过 0 分(无炎症)至 4 分(炎症最大程度) 进行评分。

**1.3.4 RT-qPCR 检测** 实验中的 Lewis 大鼠在 IRBP 免疫后第 14 天,处死大鼠后摘取眼球,根据文献所述方法<sup>[11]</sup>: ①提取眼球组织的总 mRNA; ②逆转录 (mRNA  $\rightarrow$  cDNA); ③ RT-qPCR 按照 SYBR Premix Ex Taq II 定量 PCR 试剂盒的操作步骤进行操作; ④ 结果: 以 GAPDH 为内参,应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各趋化因子 mRNA 相对表达量,并采用单因素方差分析进行统计。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,临床以及病理组织学评分采用非参数 Mann-Whitney U 检验,曲线数值以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示。炎症因子 IL-17、INF- $\gamma$  mRNA 的表达水平的比较采用单因素方差分析进行统计。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠眼前节炎症分级** 通过裂隙灯观察,免疫前实验组和对照组大鼠眼前节,虹膜血管正常,未见炎症反应,对光反射亦正常(图 1A、B)。免疫后第 7 天,对照组可见大鼠眼前节出现有明显的虹膜充血和瞳孔阻塞(图 1C); 实验组可见虹膜轻度充血,瞳孔无明显改变(图 1D)。免疫后第 14 天,对照组可见角膜水肿,虹膜严重充血,瞳孔阻塞且有明显新生血管(图 1E); 实验组仅见虹膜轻度充血,少量

新生血管(图 1F)。大鼠眼前节临床评分实验组明显低于对照组(图 2)。

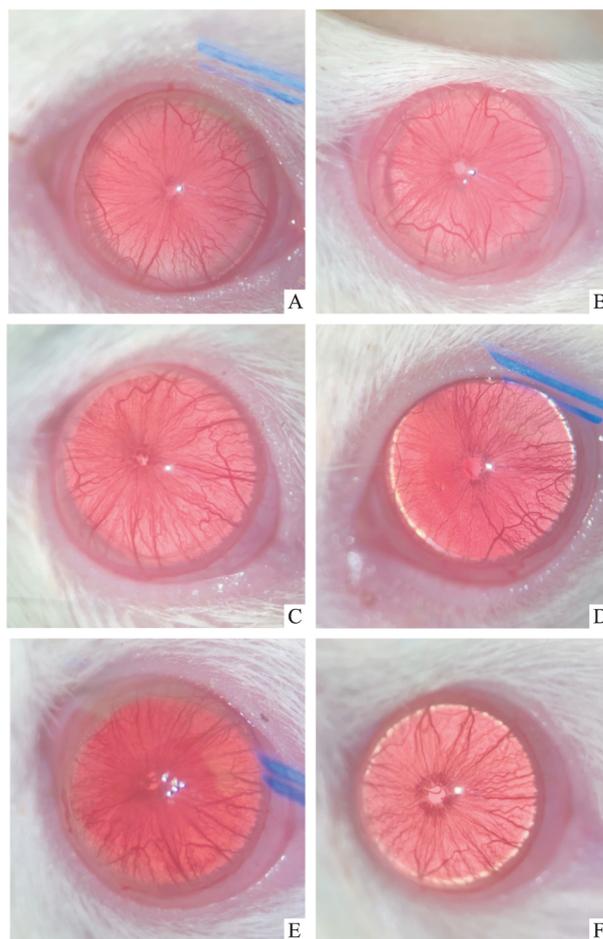


图 1 免疫后第 0、7、14 天对照组和实验组大鼠眼前节进行裂隙灯显微镜观察  $\times 10$

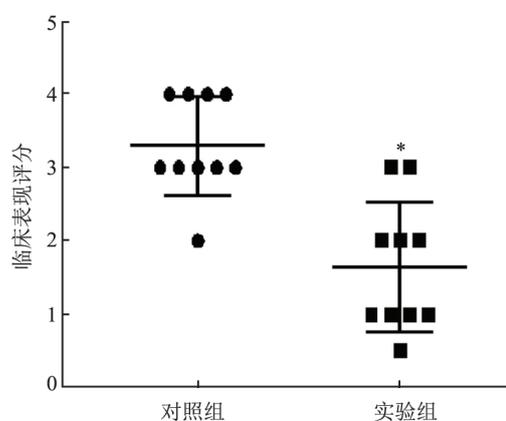


图 2 炎症高峰期(免疫后第 14 天)对照组和实验组大鼠眼前节临床表现评分曲线与对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 视网膜组织病理学炎症情况** EAU 发病高峰期(免疫后第 14 天)视网膜结构变化和病理组织学

评分如图 3 所示。HE 染色显示 ,正常组视网膜组织结构规律 ,各层分界清楚(图 3A a);对照组视网膜结构紊乱、松散 ,内核层与外核层中间位置长出大量新生血管 ,部分结构模糊(图 3A b)。而实验组视网膜结构清晰 ,仅有少量新生血管(图 3A c)。病理组织学评分显示实验组优于对照组 ( $P < 0.01$ ) ,见图 3B。

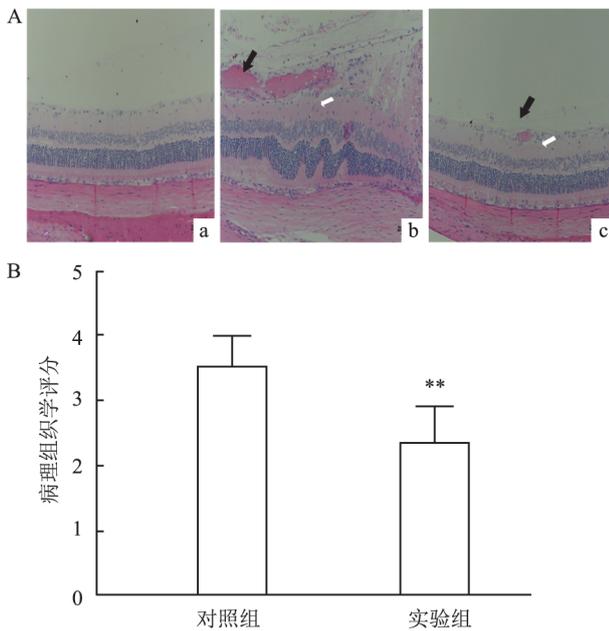


图 3 免疫后第 14 天组织病理学观察

A: 不同组大鼠免疫后第 14 天眼球组织切片 HE 染色结果  $\times 200$ ; a: 正常组大鼠的视网膜结构; b: 对照组大鼠视网膜结构; c: 实验组大鼠视网膜结构(黑色箭头: 视网膜新生血管; 白色箭头: 炎症细胞浸润图); B: 不同组大鼠病理组织学评分; 与对照组比较:  $** P < 0.01$

**2.3 RT-qPCR 法检测眼球炎症因子 mRNA 的表达情况** 结果显示 ,IL-17、INF- $\gamma$  的 mRNA 分别在免疫后的第 14 天 ,正常组、实验组和对照组表达水平存在差异。对照组两者的表达水平明显高于正常组 ,而实验组两者表达水平升高幅度低于对照组 (图 4A、B)。

### 3 讨论

葡萄膜炎的遗传与易感性与免疫应答中的 T 细胞和 B 细胞受累、细胞因子和趋化因子信号和信号通路以及环境影响有关<sup>[12]</sup>。目前已知的研究<sup>[13]</sup>结果表明 ,在葡萄膜炎发病过程中 T 细胞受体介导初始的 CD4<sup>+</sup> T 分化为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 四个主要细胞亚型。其中 Th1 细胞分泌的 TNF- $\alpha$  及 INF- $\gamma$  ,Th17 细胞分泌的 IL-17 ,介导主要的炎症反

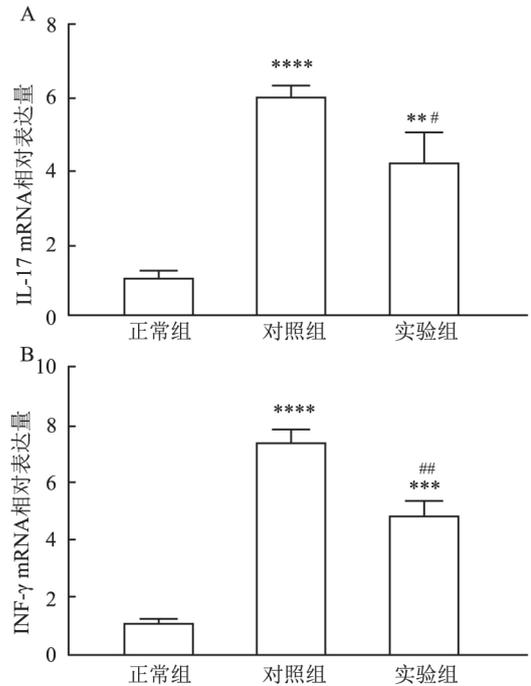


图 4 免疫后第 14 天大鼠眼球组织 IL-17 和 INF- $\gamma$  mRNA 的表达量  
A: 免疫后第 14 天大鼠眼球组织 IL-17 mRNA 的表达量; B: 免疫后第 14 天大鼠眼球组织 INF- $\gamma$  mRNA 的表达量; 与正常组比较:  $** P < 0.01$  ,  $*** P < 0.001$  ,  $**** P < 0.0001$ ; 与对照组比较:  $# P < 0.05$  ,  $## P < 0.01$

应。现今临床上葡萄膜炎的常规治疗药物多使用非甾体抗炎药和类固醇激素 ,如前列腺素、阿司匹林等。另热敷、超短波理疗或结合手术治疗相关并发症。而上述治疗药物的缺陷也相当明显 ,很可能会引起其他器官甚至全身副反应。为寻求新的治疗方向和药物 ,近来一些主要针对 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-17、IL-22、IL-23 等炎症因子进行的靶向治疗的免疫调节型药物在临床上被逐渐重视<sup>[14]</sup> ,它们效应作用好 ,治疗针对性强 ,与此同时副作用也明显少于传统药物 ,因此具有很好的使用前景<sup>[15]</sup>。

Mochizuki et al<sup>[16]</sup>发现 ,在自身免疫性眼部炎症性疾病中两大类型的细胞数量大量增加 ,分别是 Th1 和 Th17 细胞。其中 Th17 细胞和 IL-17 在人葡萄膜炎和 EAU 动物模型眼内炎症的发病机制中起重要作用<sup>[17]</sup> ,Th17 细胞在急性葡萄膜炎或巩膜炎期间增加 ,治疗后减少。本研究中 ,为了证明 MANF 的抗炎作用 ,课题组测定了 IL-17、INF- $\gamma$  这两种炎症因子浓度。结果表明 ,MANF 治疗组于免疫后第 14 天抑制 IL-17 的产生 ,下调炎症细胞 Th1 和 Th17 效应反应 ,减少炎症因子 IL-17、INF- $\gamma$  的分泌 ,降低炎症反应的发生。本研究证明  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  的 MANF 玻璃体注射不仅可以抑制 EAU 的持续发生 ,还可以

降低视网膜脱离、光感受器层的损伤和水肿以及白细胞浸润和新生血管的形成。本实验结果显示,实验组大鼠眼内的炎症因子 IL-17、INF- $\gamma$  明显被抑制,并且组织病理学结果同样支持 MANF 对眼内炎症的改善作用,从而推断 MANF 玻璃体腔注射可能是一种有效的抑制眼部炎症的方法。本实验可初步推断玻璃体腔注射 MANF 通过抑制致病性 T 细胞分化和细胞因子的产生来减轻眼部炎症。然而,MANF 抑制眼部炎症的机制和对全身免疫反应的影响尚不清楚,还需要进一步探究。

综上所述,玻璃体腔注射 MANF 可以通过抑制眼部组织炎性细胞因子的表达,从而抑制大鼠 EAU 的持续发展,可能为葡萄膜炎的抗炎治疗提供新途径。

### 参考文献

- [1] Gritz D C, Wong I G. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California epidemiology of uveitis study[J]. *Ophthalmology*, 2004, 111(3): 491–500.
- [2] Ksiazia I, Abroug N, Kechida M, et al. Eye and Behçet's disease[J]. *J Fr Ophtalmol*, 2019, 42(4): e133–46.
- [3] Apostolou A, Shen Y, Liang Y, et al. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(13): 2454–67.
- [4] Tadimalla A, Belmont P J, Thuerauf D J, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart[J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1249–58.
- [5] Neves J, Zhu J, Sousa-Victor P, et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina[J]. *Science*, 2016, 353(6294): aaf3646.
- [6] Park Y H, Broyles H V, He S, et al. Involvement of AMPA receptor and its flip and flop isoforms in retinal ganglion cell death following oxygen/glucose deprivation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(2): 508–26.
- [7] Gao F J, Zhang S H, Li T T, et al. Expression and distribution of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in the retina and optic nerve[J]. *Front Hum Neurosci*, 2016, 10: 686.
- [8] Klaska I P, Forrester J V. Mouse models of autoimmune uveitis[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(18): 2453–67.
- [9] Gao F J, Wu J H, Li T T, et al. Identification of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor as a novel neuroprotective factor for retinal ganglion cells[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 76.
- [10] Agarwal R K, Silver P B, Caspi R R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102: 395–419.
- [11] 余舜武, 刘鸿艳, 罗利军. 利用不同实时定量 PCR 方法分析相对基因表达差异[J]. *作物学报*, 2007, 33(7): 1214–8.
- [12] Bose T, Diedrichs-Möhrling M, Wildner G. Dry eye disease and uveitis: A closer look at immune mechanisms in animal models of two ocular autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(12): 1181–92.
- [13] Yin X, Liu B, Wei H, et al. Activation of the notch signaling pathway disturbs the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 761–74.
- [14] Boisseaux P, Noury P, Thomas H, et al. Immune responses in the aquatic gastropod lymnaea stagnalis under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, 139: 358–66.
- [15] Levin S N, Kaplan T B. Infectious complications of novel multiple sclerosis therapies[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2017, 19(2): 7.
- [16] Mochizuki M, Sugita S, Kamo K. Immunological homeostasis of the eye[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 33: 10–27.
- [17] Wilke C M, Bishop K, Fox D, et al. Deciphering the role of Th17 cells in human disease[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(12): 603–11.

## The role of MANF in experimental autoimmune uveitis in Lewis rats

Bao Yingchao<sup>1</sup>, Gao Xiang<sup>1</sup>, Xu Long<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Immunization, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the effect of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) on experimental autoimmune uveitis (EAU) in rats. **Methods** Lewis rats were immunized with interphotoreceptor retinoid-binding peptide (IRBP) in order to generate EAU model. The experimental group was administered MANF on the 3rd, 7th and 11th day after immunization, and the control group was administered phosphate buffered saline (PBS) as a positive control. The normal group was not treated. Caspi method was used to score the degree of inflammation. The rats were killed during the peak period of inflammation, and the retinal inflammatory reaction and histopathological changes of the three groups were detected by hematoxylin-eosin staining. The expressions of inter-

# HTK 液 3 种不同灌注方法对兔心脏保存移植后心肌组织 ICAM 和 IL - 17 表达的影响

韦雪梅<sup>1</sup> 郭义龙<sup>2</sup> 徐志新<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 HTK 液 3 种不同灌注方法(单纯低温浸泡、持续灌注与间断 2 h 灌注)对同种异体兔心保存移植后心肌组织细胞间黏附分子(ICAM)-1 和白细胞介素(IL)-17 表达的影响,探讨 HTK 液灌注方式对心脏移植后急性排斥反应的影响机制。方法 选择健康 2 月龄新西兰兔共 18 对 36 只,雌雄各半,体质量(2.15 ± 0.33) kg,随机分为 3 组,即单纯低温浸泡组(单纯组) 5 对、持续灌注组(持续组) 5 对和间断 2 h 灌注组(间断组) 8 对。供体心脏离体后经主动脉根部灌注 HTK 液停跳保护心脏,4 °C 保存心脏 8 h,根据改良 Ono 术式完成心脏移植模型,取出供体心脏。制备石蜡切片,光学显微镜下 HE 染色观察组织和细胞的病理改变,分别采用实时定量 RT-PCR 和 Western blot 检测组织 ICAM-1 和 IL-17 水平,TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡率。结果 HE 染色发现 3 组大部分心肌组织结构完整,伴细胞水肿、黏液样变性或坏死,炎性细胞浸润、脂肪化生及小血管生成。半定量分析发现,间断组细胞水肿、炎性细胞和小血管数目明显少于持续组,单纯组最多(P < 0.05)。定量检测 ICAM-1 和 IL-17 mRNAs 和蛋白表达水平发现,间断组显著低于持续组,单纯组最高(P < 0.05)。间断组细胞凋亡率低于持续组,单纯组最高(P < 0.05)。结论 HTK 液不同灌注方法对同种异体兔心移植后的急性排斥反应影响不同,间断 2 h 灌注可明显降低受体心肌 ICAM-1 和 IL-17 表达,抑制细胞凋亡效应最明显。

**关键词** HTK 液; 间断灌注; 移植心脏; 急性排斥反应; 细胞间黏附分子; IL-17; 凋亡

中图分类号 R 654.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020) 01 - 0104 - 05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.01.022

供体心脏通常需要经过一定时间的保存才能进行移植,此时离体心脏的保存技术可能对受体心脏发生缺血再灌注损伤和急性排斥反应产生重要影响<sup>[1]</sup>。再灌注损伤和急性排斥反应也是导致心脏移植失败、受体心脏复跳欠佳和失能的主要机制<sup>[2-3]</sup>。低温和 HTK 停搏保护液是目前应用最成熟的离体心脏保存技术,可显著降低心肌能耗,保护心肌功能<sup>[4]</sup>。其中 HTK 液单纯低温浸泡应用最广泛,简单、安全,缺点是不能及时清除停搏期间心肌组织代谢产物和氧自由基,补充心肌代谢需要,导致钙超载、细胞水肿、炎症反应、氧化应激、免疫损伤等<sup>[5]</sup>。研究发现<sup>[6-7]</sup>,持续灌注或间断 2 h 灌注可明显改善复跳效果,降低心律失常和心肌损伤风险,提高受体心脏存活率。细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1 和白细胞介素(interleukin, IL)-17 的表达在同种异体心脏移植早期再灌注损伤和急性排斥反应过程中表达明显上调,可能参与受体心脏存活和功能恢复过程<sup>[8-9]</sup>。既往关于 HTK 液不同灌注方式对移植心脏受体心肌免疫损伤和炎症反应的研究较少,因此,该研究通过比较 HTK 液 3 种不同灌注方法对同种异体兔心保存移植后心肌组织 ICAM-1 和 IL-17 表达的影响,探讨

2019 - 10 - 10 接收

基金项目: 海南省科技厅自然科学基金(编号: 818QN319)

作者单位: 海南医学院第二附属医院<sup>1</sup> 麻醉科、<sup>2</sup> 心脏外科,海口 570311

作者简介: 韦雪梅,女,副主任医师,责任作者,E-mail: hkwxm1978@163.com

leukin-17 (IL-17) and interferon-gamma (INF-γ) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** The inflammation began on the 3rd day after immunization, and reached the peak on the 14th day. The pathological and clinical manifestations on the 14th day after immunization suggested that the ocular inflammation and pathological changes of the experimental group were significantly better than those of the control group. The expression levels of inflammatory factors IL-17 and INF-γ in the experimental group were significantly lower than those of the control group. **Conclusion** MANF vitreous cavity administration can reduce the inflammation of EAU in rats, and the decrease of the expressions of IL-17 and INF-γ may be a part of the effect, and the specific mechanisms need to be further studied.

**Key words** uveitis; autoimmune disease; IRBP; animal model; MANF