

徐菲,刘健萍,董世访,等. 母体炎性暴露对子代小鼠受 IRBP 抗原诱导的葡萄膜炎的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 297-306.

XU F, LIU J P, DONG S F, et al. Impact of embryonic uveitis exposure on response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein-induced experimental autoimmune uveitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 297-306.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.003

# 母体炎性暴露对子代小鼠受 IRBP 抗原诱导的葡萄膜炎的影响

徐菲<sup>1</sup>,刘健萍<sup>2</sup>,董世访<sup>3</sup>,皇辉<sup>1</sup>,龚心怡<sup>1</sup>,胡开娇<sup>1</sup>,陈飞兰<sup>1\*</sup>

(1. 重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016;2. 中国人民解放军陆军特色医学中心病理科,重庆 400042;3. 重庆医科大学附属儿童医院儿研所,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,重庆 400014)

**【摘要】** 目的 探讨母体葡萄膜炎暴露对子代小鼠受光感受器间视黄醇结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)诱导的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)免疫效应的影响。方法 从本课题组前期获得的受双亲 EAU 暴露的子代 C57BL/6J 小鼠眼球的 RNA 测序转录组数据中,筛选免疫相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。利用基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)的富集分析,确定这些免疫相关的差异表达基因生物学途径。通过蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)分析交集基因以此鉴定出枢纽基因。进一步通过荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qPCR)确定筛选出的异常表达的枢纽基因是否也在受母体葡萄膜炎影响的子代小鼠中差异表达,最后通过视网膜抗原 IRBP<sub>651-670</sub> 诱导受母体活动期炎症影响的子代以评价母体葡萄膜炎对子代患葡萄膜炎的易感性以及相关免疫效应的影响。结果 从受双亲葡萄膜炎影响的子代小鼠眼球组织中鉴定出 72 个免疫相关差异基因。这些基因主要富集参与 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等。进一步进行 PPI 网络互作分析,筛选出 proteasome 26S subunit, ATPase 5 (Psmc5)、proteasome 26S subunit, ATPase 3 (Psmc3)、proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4 (Psmc4) 和 proteasome 26S subunit, non-ATPase 8 (Psmc8) 这 4 个枢纽基因。qPCR 检测证实受母体葡萄膜炎影响的子代小鼠中也上调表达这 4 个枢纽基因。而且与健康子代相比,150  $\mu$ g IRBP 抗原诱导可增加受活动期炎症影响的子代 EAU 临床表现的严重程度和病理组织学损伤( $P = 0.0087, P = 0.0410$ );另外,受母体活动期炎症影响的子代在 IRBP 诱导的 EAU 中脾 T 细胞增殖功能增强,其血清中产生的细胞因子 IL-17 和 IL-6 增加( $P = 0.0450, P = 0.0300$ )。结论 母体活动性炎症暴露加剧子代小鼠受 IRBP 诱导的 EAU 疾病的严重性,增强抗原特异性 T 细胞增殖以及血清中 IL-17、IL-6 的产生,可能与受影响的子代上调表达的 4 个枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 相关。

**【关键词】** 实验性自身免疫性葡萄膜炎;胚胎炎性暴露;子代;枢纽基因;炎症严重程度

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0297-10

## Impact of embryonic uveitis exposure on response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein-induced experimental autoimmune uveitis

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81670843),重庆医科大学未来医学青年创新团队发展支持计划(W0164)。

Funded by the National Natural Science Foundation Project (81670843), Chongqing Medical University Program for Youth Innovation in Future Medicine (W0164).

**【作者简介】** 徐菲,女,在读硕士研究生,研究方向:母本葡萄膜炎对子代的影响。Email:xfel163com@163.com

**【通信作者】** 陈飞兰,女,研究员,博士,研究方向:葡萄膜炎免疫遗传学及疾病动物模型。Email:cf1761219@163.com

XU Fei<sup>1</sup>, LIU Jianping<sup>2</sup>, DONG Shifang<sup>3</sup>, HUANG Hui<sup>1</sup>, GONG Xinyi<sup>1</sup>, HU Kaijiao<sup>1</sup>, CHEN Feilan<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pathology, Army Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Corresponding author: CHEN Feilan. E-mail: cfl761219@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of embryonic inflammatory exposure on the response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-induced experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** RNA transcriptome sequencing data from eyeballs of C57BL/6J mouse offspring born to mothers with active EAU were used to screen immune-associated differentially expressed genes in the eyes of the exposed offspring. Gene fragments overlapping in the two datasets were screened using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses to identify biological pathways associated with the gene fragments. Hub genes were identified from these intersecting genes by protein-protein interaction network analysis. EAU models of maternal uveitis were established by immunization with IRBP<sub>651-670</sub>, and expression levels of the pivotal genes in the offspring exposed to inflammation by maternal uveitis were examined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction. EAU severity, T lymphocyte proliferation, and serum cytokines were detected to investigate the immune effect in offspring from mothers with an active inflammation response to IRBP induction. **Results** Microarray analysis identified 72 immune-related differentially expressed genes in exposed samples compared with the findings in control samples. These genes were mainly enriched in Toll-like receptor signaling, mitogen-activated protein kinase signaling, and B cell receptor signaling pathways. Protein-protein interaction network interaction analysis screened out four hub genes, Psmc5, Psmc3, Psmd4, and Psmd8, and mRNA levels of these four genes were increased in the adult offspring from mothers with active uveitis compared with the findings in healthy offspring. In addition, the group induced with 150  $\mu$ g IRBP showed an increase in the severity of clinical and pathological outcomes in offspring with EAU affected by active inflammation, compared with the healthy offspring group ( $P = 0.0087$ ,  $P = 0.0410$ ). Meanwhile, T cell proliferation in the offspring was enhanced during the inflammatory activity stage and secretion of the inflammatory cytokines interleukin (IL)-17 and IL-6 was increased ( $P = 0.0450$ ,  $P = 0.0300$ ). **Conclusions** Psmc5, Psmc3, Psmd4, and Psmd8 may be important genes exacerbating uveitis in offspring of mothers with active uveitis, associated with increased T cell proliferation and production of IL-17 and IL-6.

**[Keywords]** experimental autoimmune uveitis; embryonic inflammatory exposure; offspring; pivotal gene; inflammation severity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

葡萄膜炎 (uveitis) 是一类世界性的致盲性眼病,也是我国最常见的眼内炎症性疾病,其炎症主要累及眼组织内的葡萄膜、视网膜、视网膜血管和玻璃体等。非感染性葡萄膜炎作为我国最主要的葡萄膜炎类型之一,占有葡萄膜炎的 43.6%。其平均发病年龄为 35.4 岁,以 30 ~ 39 岁最多,由此可见工作年龄和生育年龄人群是非感染性葡萄膜炎高危年龄群<sup>[1]</sup>。家族聚集性研究发现,患葡萄膜炎的母亲其所生孩子在一定年龄时也会患上葡萄膜炎<sup>[2-3]</sup>。而且,流行病学调查结果显示,患葡萄膜炎的儿童越来越多,越来越幼龄化<sup>[4]</sup>。

近年来,研究发现孕妇孕期健康对后代健康和疾病风险的形成具有重要作用。母体免疫激活会

影响子代成年后多种疾病的发生,如自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD)、注意力缺陷多动障碍 (attention deficit and hyperactivity disorder, ADHD)、图雷氏综合征 (Tourette syndrome, TS) 等<sup>[5]</sup>。另外,母亲孕期受到的急性或慢性炎症刺激,也可通过炎症细胞信号通路和表观遗传学机制将影响传递给胎儿。本课题组前期研究发现,在 B10R III 小鼠和 C57BL/6J 小鼠中,双亲发生实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experience autoimmune uveitis, EAU) 可增加子代鼠患葡萄膜炎的易感性<sup>[6-7]</sup>。但母体孕期葡萄膜炎是否能影响成年子代对视网膜抗原诱导的葡萄膜炎并不清楚。

由此,本课题组从前期受双亲 EAU 影响的

C57BL/6J 小鼠子代 RNA 转录组测序数据中筛选出与免疫相关的差异表达基因,通过基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析,京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)和蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)分析,筛选出可能参与子代易感性的 4 个上调表达的枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8,随后研究人员通过荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qPCR),证实受母体孕期葡萄膜炎影响的子代上调表达这 4 个枢纽基因,进一步发现受影响的子代在 150  $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$  免疫剂量下产生更严重的葡萄膜炎,血清中细胞因子 IL-17、IL-6 增加,由此提示母体葡萄膜炎可能通过上调免疫相关基因加剧成年子代受视网膜抗原诱导的葡萄膜炎严重程度,可为葡萄膜炎危险因素预测提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

8 ~ 12 周 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 48 只(雌性 27 只,雄性 21 只),体重约为 25 g,购自重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2022-0010】,饲养于重庆医科大学实验动物中心屏障环境系统【SYXK(渝)2022-0016】。实验动物可自由采食和饮水,维持 12 h/12 h 明暗交替照明,湿度 30% ~ 70%,温度保持在 22 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ 。本研究中的所有程序都遵循重庆医科大学医学研究伦理委员会动物使用声明中关于动物护理和使用的指导方针,经过重庆医科大学医学研究伦理委员会批准(IACUC:2021064)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

IRBP<sub>651-670</sub> (LAQGAYRTAVDLESLASQLT, 强耀生物科技有限公司,中国),结核菌素(*Mycobacterium tuberculosis*, TB, Sigma, 美国),完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant complete, CFA, Sigma, 美国),百日咳毒素(*Bordetella pertussis*, PTX, List, 美国),MTT (Solarbio, 中国),ELISA 试剂盒(mouse IL-17A/F heterodimer DuoSet ELISA; mouse IL-6 quantikine ELISA kit; mouse TNF- $\alpha$  DuoSet ELISA, R&D systems, 美国),qPCR 相关试剂(RNA 提取液;引物;逆转录试剂盒等,武汉赛维尔生物科技有限公司,中国)。LS 裂隙灯显微镜检查仪(上邦医疗设备有限公司,中国),双目间接检眼镜检查系统

(Keeler, 英国),酶标仪(Crystal, 美国),酶联免疫检测仪(Bio-Tek, 美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国),超微量分光光度计(Thermo, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 EAU 模型的建立

为诱导母本 EAU,取溶解于 PBS 的人 IRBP<sub>651-670</sub> 多肽溶液与包含 2.5 mg/mL 结核菌素的完全弗氏佐剂按 1 : 1 比例混合,充分乳化后,将包含 150  $\mu\text{g}$  人 IRBP<sub>651-670</sub> 多肽的 200  $\mu\text{L}$  乳化剂注射至 3 只 8 ~ 12 周龄 C57BL/6J 雌鼠,分 4 点皮下注射至小鼠背部两侧和尾根部两侧,随后腹腔注射 1  $\mu\text{g}$  的百日咳毒素(母本免疫组, MG),同时设立正常未免疫 IRBP<sub>651-670</sub> 的健康对照(HG)。MG 于免疫后第 15 天出现炎症临床表现后,将免疫后的雌鼠与健康雄鼠按 3 : 2 进行合笼交配。同时,以未经抗原免疫健康双亲所产同日龄的健康子代作为对照。实验重复 3 次。次日早上开始检查雌性小鼠的阴栓,以出现阴栓作为孕期第 1 天。为研究母本 EAU 对子代 EAU 易感性和严重性的影响,分别对 8 ~ 12 周的母本 EAU 炎症活动期子代小鼠和健康子代小鼠皮下注射 150  $\mu\text{g}$  IRBP<sub>651-670</sub>,该 IRBP<sub>651-670</sub> 乳化在含有 2.5 mg/mL 结核分枝杆菌的 200  $\mu\text{L}$  CFA 中,同时腹腔注射 0.5  $\mu\text{g}$  PTX,得到炎症活动期子代组(EG)和健康子代组(CG)。子代 EAU 模型实验重复 3 次,每次 EG 和 CG 各 3 只。

#### 1.2.2 临床及组织学检查

子代小鼠免疫后自第 8 ~ 9 天起使用裂隙灯和眼底镜检查眼前端和眼底临床症状,每周检查 2 ~ 3 次。母本 EAU 小鼠于免疫后第 72 天取材。取抗原诱导的 EG 和 CG 小鼠在炎症高峰期(免疫后的 27 d)摘取眼球组织。眼球组织放置于 4% 戊二醛缓冲液中固定 60 min 后,再浸泡于 10% 中性福尔马林中固定 24 h。将固定后的眼球进行脱水、透明、石蜡包埋、切片以及苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色、光学显微镜下观察。采用双盲法参照 CASPI<sup>[8]</sup>报道的方法进行病理组织学的炎症评分。

#### 1.2.3 T 淋巴细胞增殖实验

子代免疫后第 27 天,取 EG 和 CG 小鼠的脾和淋巴结。通过尼龙羊毛柱富集脾和淋巴结中的抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)和 T 细胞。然后,分别将  $1 \times 10^5$  个 APC 细胞和  $4 \times 10^5$  个 T 细胞加入 96 孔板中,再向上述体系添加含 IRBP<sub>651-670</sub> 的完全培养基,使体系最终浓度分别为

0、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中孵育 72 h。然后加入 MTT, 使用酶联免疫检测仪检测 490 nm 处 OD 值。

#### 1.2.4 细胞因子检测

母本免疫后 72 d 收集其外周血血清, 使用酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒检测细胞因子 IL-6 的产生, 并取健康小鼠血清作为对照。此外, 收集子代免疫后第 27 天, EG 和 CG 小鼠的外周血血清, 使用酶标仪检测 IL-17、IL-6 以及 TNF- $\alpha$  的表达。细胞因子的 ELISA 检测步骤严格按照说明书操作, 大致分为以下步骤: 包被一抗、样品稀释、加入待测样本、孵育二抗、辣根过氧化物酶孵育、A/B 显色剂孵育、终止显色、酶标仪检测 (450 nm 和 540 nm)。

#### 1.2.5 荧光定量聚合酶链反应 (qPCR)

为了验证枢纽基因的表达, 在 Applied Biosystems Bio-rad CFX 96 Real-Time PCR 检测系统上, 采用 qPCR (95  $^{\circ}\text{C}$  30 s 预变性, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s 变性, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s 退火/延伸共 40 个循环, 从 65 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$ , 每升温 0.5  $^{\circ}\text{C}$ , 采集 1 次荧光信号生成熔解曲线)。方法对 4 个基因和 Cel-miR-39-3P 外源控制基因进行了 3 次表达。引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法测定相对基因表达量。

表 1 qPCR 引物

Table 1 Primers used for qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
Cel-miR-39-3p	F: ACACTCCAGCTGGGTCACCGGTGTAATC R: CTCAACTGGTCTCGGAGTCGGCAA TTCAGTTGAGCAAGCTGA
Psmc5	F: GGTGCCAGACTCAACCTACGA R: CAAACAGCTCCCTCACCATTC
Psmc3	F: CCTGCCGTACTTGTCTCCA R: GCATCCACCAACCCAATCACT
Psmc4	F: CTCGGATGACGCCCTACTGA R: GACGTCATAGTCATCTCTCTCT
Psmc8	F: CCTCAATCTCTCTTCTGCTAT R: GCTTTCGGCAGGGATGTTTC

#### 1.2.6 RNA 测序数据

数据来自本课题组前期的双亲免疫 500  $\mu\text{g}$  IRBP<sub>651-670</sub> 的 C57BL/6J 小鼠炎性后代眼球组织 RNA 测序 (RNA-seq) 结果<sup>[6]</sup>。利用 R 软件包 DESeq2 (version 1.32.0) 进行差异分析 (将  $|\log_2(\text{FC})| > 2$  且  $P < 0.05$  的基因鉴定为 DEGs), 筛选数据中与免疫相关的差异基因, 进一步对交集基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。最后进行 PPI

网络互作分析, 包括度数 (DEGREE)、最大集团中心性 (maximum group centrality, MCC)、最大邻域分量 (maximum neighborhood component, MNC)、边缘渗透分量 (edge penetration component, EPC)、最大邻域分量的密度 (density of maximum neighborhood component, DMNC), 使用 Cytohubba 3.10.1 软件对 PPI 中的关键基因进行分析, 根据基因的节点度和相互作用网络筛选出枢纽基因。

#### 1.3 统计学分析

实验重复 2 ~ 3 次, 以保证数据的准确性。数据的统计分析采用 SPSS 17.0, 并以平均值  $\pm$  标准误差 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) 的形式呈现。实验组和对照组小鼠的临床及组织病理学评分通过 Mann-Whitney  $U$  检验或 Kruskal-Wallis 检验进行比较。  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 免疫相关差异基因的筛选

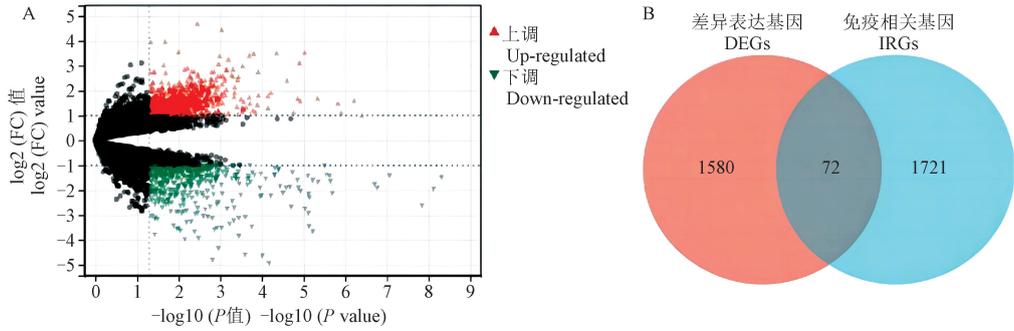
首先分析了来自先前双亲 C57BL/6J 小鼠 EAU 子代的眼球转录组测序数据集与健康双亲所生的健康子代样本之间的差异基因<sup>[6]</sup>, 根据两 (组) 样品之间表达水平的相对高低, 确定出差异基因中表达上调和下调基因。如图 1 所示, 与 HG 样本相比, 双亲 EAU 子代眼球样本中共鉴定出 1652 个差异基因, 其中包括 1108 个上调基因和 544 个下调基因 (图 1A); 其中与免疫相关的基因有 72 个 (图 1B)。

### 2.2 GO 和 KEGG 途径富集分析

对选取的 72 个交集基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。从 GO 分析中提取的生物过程 (biological process, BP) 结果显示, DEGs 主要富集于细胞趋化作用、趋化因子产生的活化以及趋化因子产生的调控等方面 (图 2A); 前 3 个富集的细胞组分 (cellular component, CC) 分别是蛋白酶体、内肽酶体和分泌颗粒管腔 (图 2B); 分子功能 (molecular function, MF) 分析显示, 前 3 位富集的功能分别是荷尔蒙活性、趋化因子结合、细胞因子活性 (图 2C)。进一步对 72 个交集基因进行了 KEGG 通路富集分析。结果表明, 这些基因显著富集于 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等关键通路 (图 2D)。

### 2.3 PPI 网络和枢纽基因分析

为深入分析交集基因涉及的关键生物学通路, 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 构建了 PPI 网络,



注:A:差异表达基因;红色:上调基因;绿色:下调基因;B:差异表达基因与免疫相关基因的交集;DEGs:差异表达基因;IRGs:免疫相关基因。

图 1 双亲 EAU 子代小鼠差异表达基因火山图以及 DEGs 和 IRGs 交集基因

Note. A. Differentially expressed genes. Red. Up-regulated genes. Green. Down-regulated genes. B. Intersection of differentially expressed genes and immune-related genes. DEGs. Differentially expressed genes. IRGs. Immune-related genes.

Figure 1 Volcano map of differentially expressed genes as well as DEGs and IRGs intersecting genes in the offspring of parental EAU

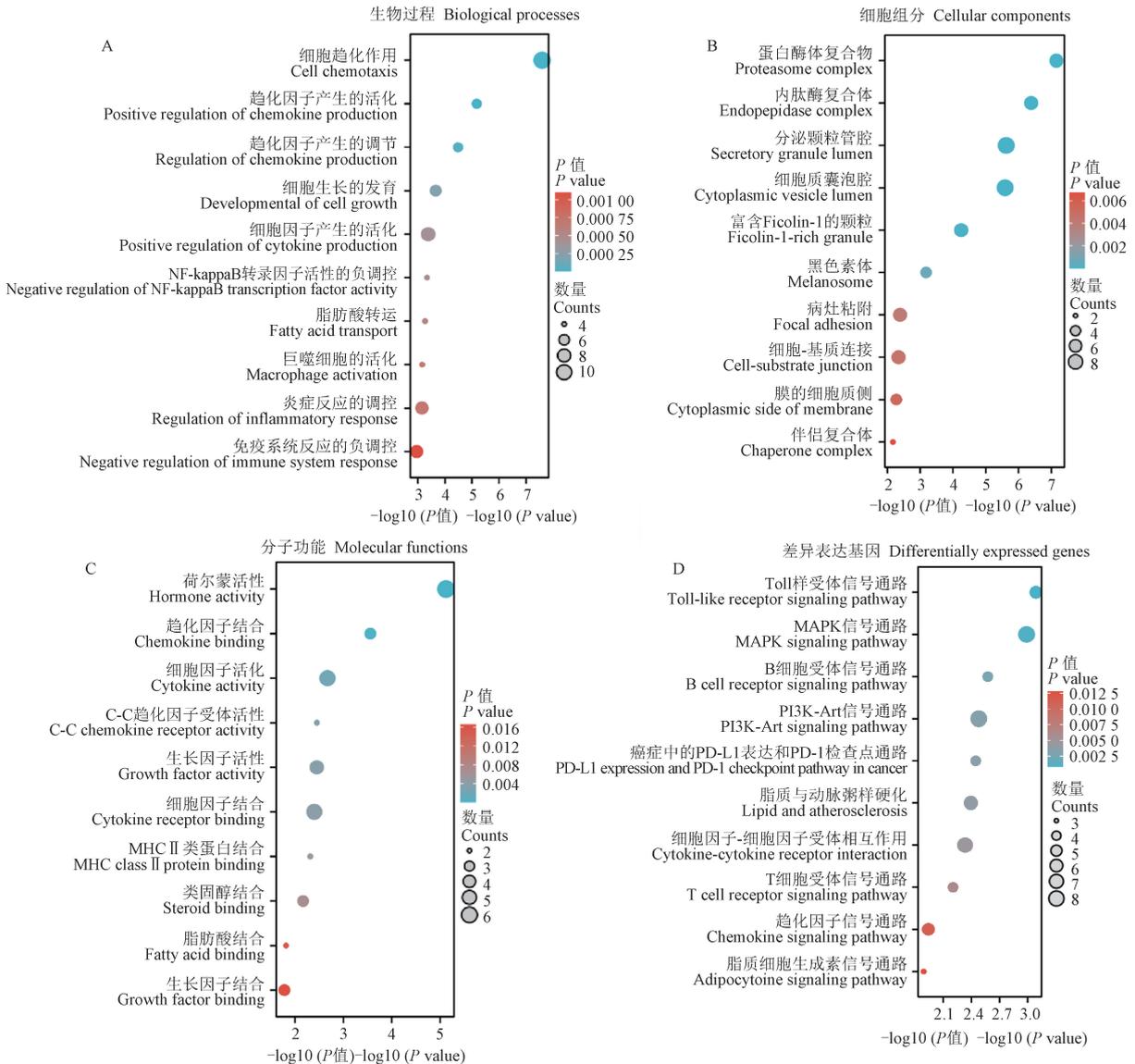


图 2 双亲 EAU 子代小鼠差异表达基因富集分析

Figure 2 Enrichment of differentially expressed genes in the offspring of parental EAU

探索 72 个基因之间潜在的相互作用。通过 Cytoscape 3.10.1 软件,分别使用 DEGREE、MCC、MNC、EPC、DMNC 这 5 种算法分析,通过绘制不同算法的交集得出枢纽基因(图 3)。结果显示,PPI 网络中前 4 位的枢纽基因分别为 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8,提示亲本 EAU 可能影响子代。

#### 2.4 来源于母本 EAU 不同孕期的子代划分

为了探究枢纽基因是否参与母本 EAU 影响子代 EAU 的过程,建立了母本 EAU 模型。结果显示,母本于免疫后 15 d 开始发病,18 d 左右达到炎症高峰期(视盘出现明显的炎性渗出物,视网膜血管鞘形成,结膜严重充血),随后炎症逐渐消退,至 44 d 进入炎症缓解期(图 4A)。此外,与正常未免疫 IRBP<sub>651-670</sub> 的 HG 相比,免疫后第 72 天母本小鼠的外周血血清中检测到细胞因子 IL-6 的显著上调(图 4B,  $P = 0.0270$ )。上述结果表明母本 EAU 模型的成功构建,根据炎症变化,研究人员将来自母本 EAU 小鼠免疫后第 15 ~ 44 天发育的胎鼠定义为源于炎症活动期的子代小鼠(ZG),44 d 及之后发育的胎鼠定义为源于炎症缓解期的子代小鼠。

#### 2.5 受母本 EAU 影响的子代表达上调枢纽基因

为进一步了解受母本 EAU 影响的子代小鼠是否与受双亲葡萄膜炎影响的子代小鼠相同上调表达上述 4 个免疫相关枢纽基因,收集受母本 EAU 影响的 ZG 和 HG 小鼠外周血,分离获得血清,应用 qPCR 法检测 4 个差异基因的表达水平。如图 5 所示,与 HG 相比,受母本 EAU 炎症活动期影响的 ZG 均显著上调表达 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8(依次为:  $P = 0.0076$ ,  $P = 0.0279$ ,  $P = 0.0049$ ,  $P = 0.0026$ )。

#### 2.6 母本活动性炎症可加剧子代受 IRBP 免疫诱导的 EAU 炎症反应

为了评价母本活动期炎症是否影响成年后的子代受视网膜抗原免疫诱导反应,研究人员对 EG 和 CG 小鼠进行 150  $\mu\text{g}$  IRBP<sub>651-670</sub> 抗原免疫诱导。如图 6A 所示,EG 小鼠从免疫后第 8 天开始发病,到炎症活动高峰期免疫后 13 ~ 27 d,眼底出现中度炎症,表现为明显的视盘模糊、视网膜点状病变以及血管套;如图 6B 所示,CG 小鼠仅在免疫后第 13 天出现轻微视盘炎症,炎症活动期子代的临床评分

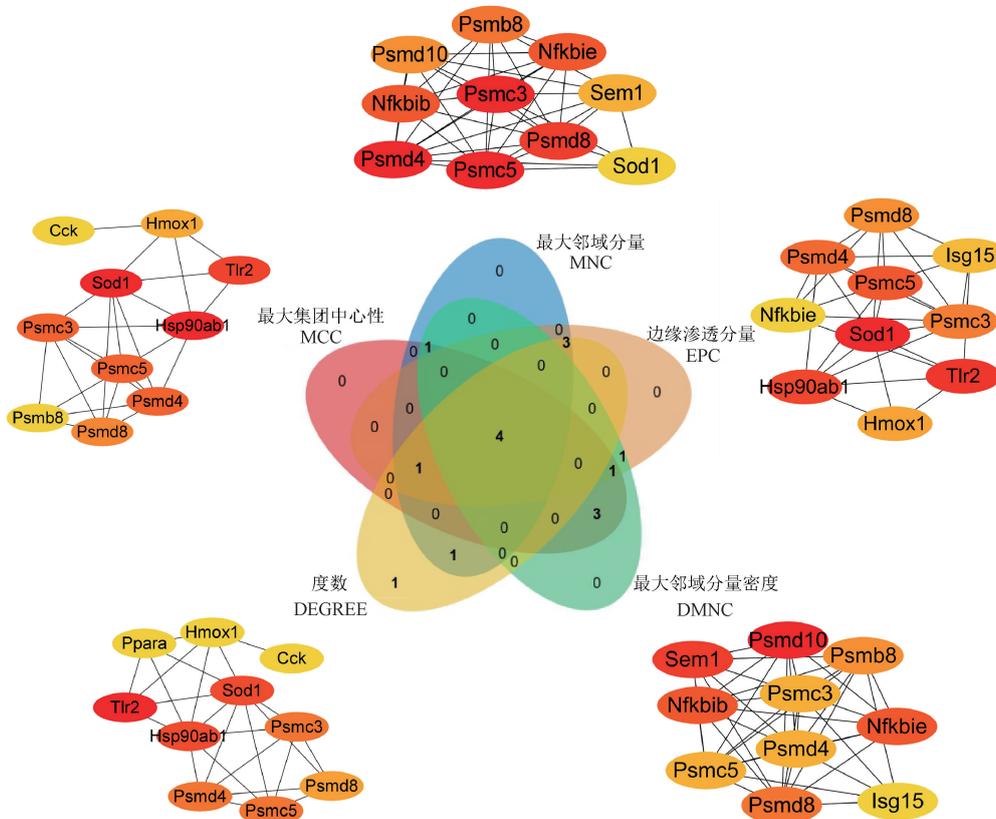
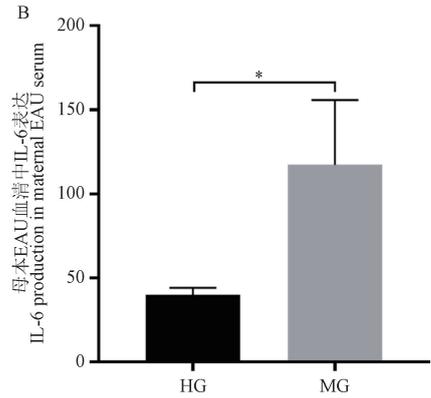
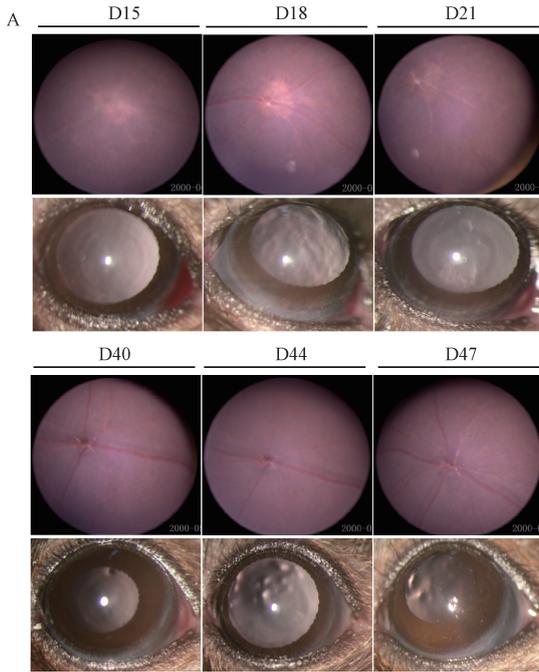


图 3 双亲 EAU 子代小鼠差异表达基因 PPI 互作网络

Figure 3 PPI of differentially expressed genes in the offspring of parental EAU



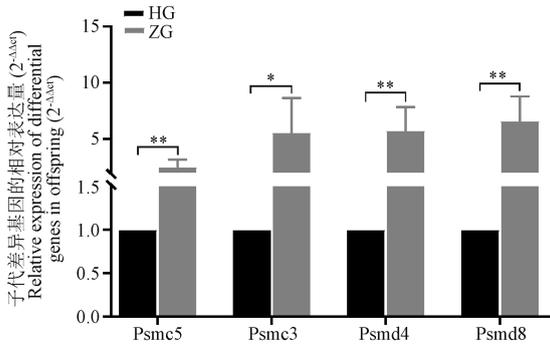
注:A;母本 EAU 的临床表现;D15 ~ D47 为免疫后天数(D15;免疫后第 15 天);B;母本 EAU 血清中 IL-6 的表达;与 HG 相比, \*  $P < 0.05$ 。(下图同)

图 4 母本 EAU 的临床表现( $n = 6$ )和血清中 IL-6 表达( $n = 3$ )

Note. A. Clinical manifestations of maternal EAU. D15 to D47 are the number of days after immunization (D15. Day 15 after immunization).

B. Expression of IL-6 in serum of maternal EAU. Compared with HG, \*  $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 4 Clinical manifestations ( $n = 6$ ) and serum expression of IL-6 in maternal EAU ( $n = 3$ )



注:与 HG 相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 qPCR 法验证 RNA-seq 测序差异表达基因情况( $n = 4$ )

Note. Compared with HG, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 5 qPCR to verify RNA-seq sequencing differentially expressed genes( $n = 4$ )

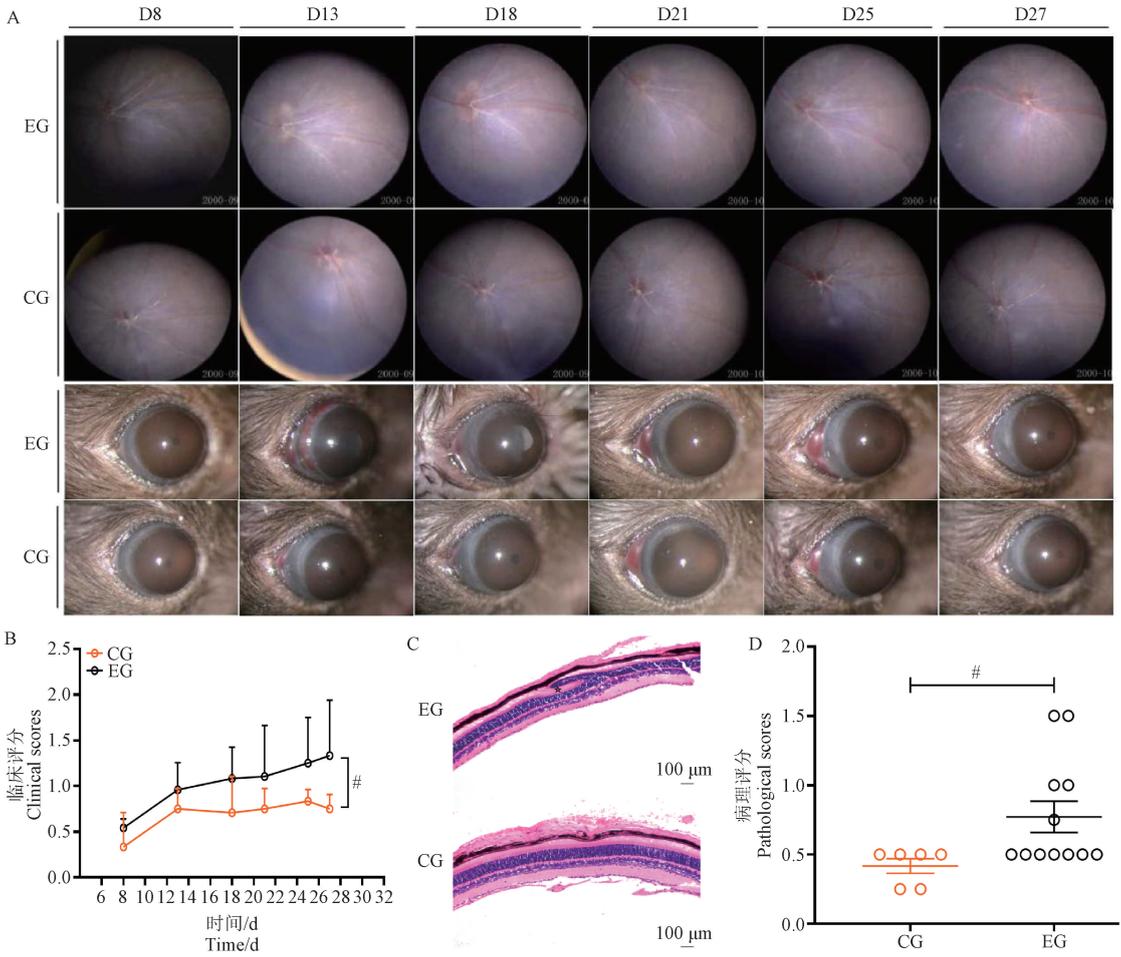
显著高于正常对照组( $P = 0.0247$ )。此外,如图 6C 病理组织学所示,EG 小鼠出现明显视网膜折叠或损伤,视盘血管和玻璃体腔中,可见散在的炎性细胞浸润,而 CG 小鼠眼底只有极少数的炎性细胞浸润。图 6D 显示,EG 小鼠组织病理学评分也显著性升高( $P = 0.0410$ )。

## 2.7 母本活动期炎症所孕子代产生 IRBP 特异性 T 细胞增殖增强反应

于 150  $\mu\text{g}$  IRBP 免疫后第 27 天炎症高峰期取材,收集 EG 和 CG 小鼠 APC 细胞和 T 淋巴细胞,分别进行含 IRBP 或不含 IRBP 体外共培养。结果显示,EG 小鼠 T 细胞的增殖能力显著高于 CG 小鼠,且其增殖能力随 IRBP 浓度增加而增强(图 7,  $P = 0.0002, P < 0.0001, P < 0.0001$ )。以上结果提示,母本 EAU 可通过影响子代小鼠的视网膜抗原特异的 T 细胞增殖而调控对子代葡萄膜炎的严重程度。

## 2.8 母本活动期炎症所孕子代诱导的 EAU 产生更多的细胞因子 IL-17 和 IL-6

为了评估炎症活动期子代外周血细胞因子的产生情况,在抗原免疫后第 27 天,离心收集免疫后的 EG 和 CG 小鼠外周血血清,使用 ELISA 法检测炎症高峰期小鼠血清中细胞因子产生。结果显示,与 CG 相比,EG 小鼠血清中效应性 Th17 细胞特异性细胞因子 IL-17 和 APC 相关细胞因子 IL-6 显著性升高(图 8,  $P = 0.0450, P = 0.0300$ ),TNF- $\alpha$  并无显著性差异( $P = 0.5730$ )。以上结果表明,母本 EAU 可能通过增加子代鼠 EAU 中细胞因子 IL-17

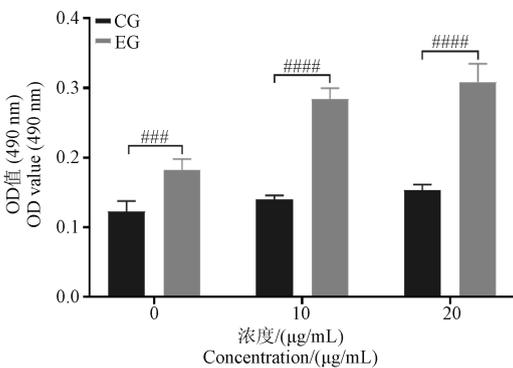


注:A:子代小鼠的临床表现;B:子代小鼠的临床评分( $n = 6$ );C:子代小鼠的病理组织学表现;D:子代小鼠的病理组织学评分( $n$  (CG) : $n$  (EG) = 6:10);五角星表示视网膜折叠或损伤;与CG相比, $\#P < 0.05$ 。(下图同)

**图 6** 免疫 150  $\mu\text{g}$  IRBP 子代小鼠的 EAU 炎症反应

Note. A. Clinical manifestations of offspring mice. B. Clinical scores of offspring mice ( $n = 6$ ). C. Histopathological appearance of offspring mice. D. Histopathological scores of offspring mice ( $n$  (CG) : $n$  (EG) = 6:10). Pentagrams show retinal folding or damage. Compared with CG,  $\#P < 0.05$ . (The same in the following figures)

**Figure 6** Inflammation response of offspring mice immunized with 150  $\mu\text{g}$  IRBP

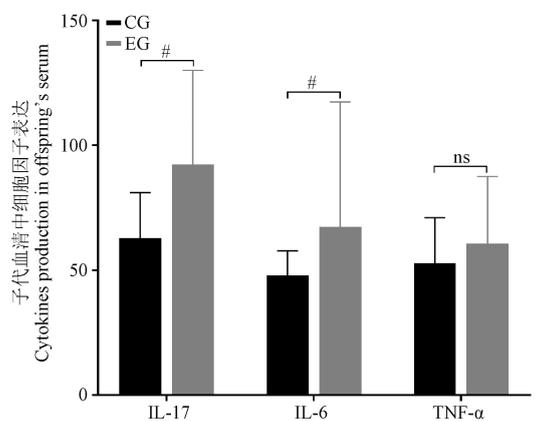


注:与CG相比, $\###P < 0.001$ , $\####P < 0.0001$ 。

**图 7** 免疫 150  $\mu\text{g}$  IRBP 子代小鼠的 T 细胞增殖( $n = 3$ )

Note. Compared with CG,  $\###P < 0.001$ ,  $\####P < 0.0001$ .

**Figure 7** T-cells proliferation of offspring mice immunized with 150  $\mu\text{g}$  IRBP ( $n = 3$ )



**图 8** 免疫 150  $\mu\text{g}$  IRBP 子代小鼠血清中炎症性细胞因子的表达( $n = 3$ )

**Figure 8** Expression of inflammatory cytokines in serum of 150  $\mu\text{g}$  IRBP ( $n = 3$ )

和 IL-6 的产生,从而增加对母本 EAU 严重性的影响。

### 3 讨论

在本研究中,利用 R 语言对先前双亲 EAU C57BL/6J 小鼠子代 RNA 转录组数据进行深入挖掘,通过 GO、KEGG 以及 PPI 网络互作分析,筛选出参与亲本葡萄膜炎影响子代的 4 个枢纽基因: Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8,可能通过调控 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等途径来发挥作用。此外,本文进一步研究了胚胎期葡萄膜炎暴露对新生 C57BL/6J 小鼠患葡萄膜炎的影响。数据表明,这 4 个基因在受母本葡萄膜炎影响的炎症活动期子代小鼠(ZG)中上调表达。此外,与 CG 小鼠相比,150  $\mu\text{g}$  IRBP<sub>651-670</sub> 诱导的受母本 EAU 影响的炎症活动期 EG 小鼠葡萄膜炎的严重程度增强。

与先前报道的研究结果相符<sup>[6]</sup>,本研究在炎症后代免疫后 27 d 的血清中检测到参与亲本葡萄膜炎影响子代发生发展的枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 的显著上调。这 4 个基因一直是神经退行性疾病(阿尔茨海默症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、脊髓灰质炎等)或癌症(直肠癌、肺癌、乳腺癌等)等领域广泛关注的基因。近期研究发现,Psmc5 和 Psmc3 蛋白酶体基因通过产生变体扰动 T 细胞 I 型干扰素(interferon, IFN)信号传导通路,在蛋白酶体相关自身炎症综合征(proteasome-associated autoinflammatory syndrome, PRAAS)致病<sup>[9]</sup>、神经发育障碍发病机制等方面起促进作用<sup>[10]</sup>。此外,Psmc5 可以调节多种途径,包括上皮间充质转化、缺氧和免疫反应等,Psmc5 还与 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 B 细胞的水平呈负相关,可以促进巨噬细胞和中性粒细胞的浸润<sup>[11]</sup>。一项关于年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的研究发现,控制蛋白质相互作用时空顺序的 Hsp90 与 Psmc4 和 Psmc8 相互作用,以调节 AMD 进展过程中错误折叠蛋白的降解。Psmc4 通过编码蛋白,招募核因子  $\kappa\text{B}$  抑制因子  $\alpha$  (NF- $\kappa\text{B}$  inhibitor alpha, I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$ )进而活化 B 细胞核因子 kappa 轻链增强子(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa\text{B}$ ),以诱导细胞衰老<sup>[12]</sup>。而 Psmc8 作为 19S 蛋白酶体调节复合体亚基,主要参与能量代谢、DNA 复制、蛋白质合成等生物过程。研究发现,Psmc8 的过表达可显著增强卵

巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[13]</sup>。本文结果与之前的报道一致<sup>[6-7]</sup>,即暴露于母本活动性炎症的子代小鼠在视网膜抗原刺激下可产生更严重的炎症反应:视盘和玻璃体腔中出现大量炎性细胞浸润以及明显的特异性 T 细胞增殖。

EAU 是一种由 T 细胞介导的针对神经视网膜细胞,尤其是光感受器细胞的自身免疫反应。Th17 是介导自身免疫性葡萄炎的主要致病性 T 细胞,并且由 Th17 细胞产生的高水平 IL-17 被认为是致病性的关键。研究证明,IRBP<sub>161-180</sub> 诱导的 B10R III 小鼠 EAU 模型,表现出以 Th17 细胞及其分泌细胞因子 IL-17 为主的免疫反应特征。并且 B10R III 双亲葡萄膜炎可能通过 T 细胞和 IL-17 的产生,增加后代对 EAU 的易感性<sup>[7]</sup>。而本文在免疫 150  $\mu\text{g}$  抗原的子代小鼠血清中发现 IL-17 细胞因子水平升高,这和之前的研究结果一致<sup>[7]</sup>,说明 Th17 细胞在胚胎期炎症暴露中受到了影响,并可能因此增加了子代小鼠患葡萄膜炎的严重程度。IL-6 是一种由巨噬细胞和 T 细胞产生的多效性细胞因子,被认为是包括葡萄膜炎在内的自身免疫性疾病的重要介质<sup>[14]</sup>。IL-6 在生理情况下水平非常低,但在系统性红斑狼疮、白塞氏病相关性葡萄膜炎、类风湿关节炎等炎症期间,IL-6 的水平显著增加<sup>[15-16]</sup>。而本文在母本 EAU 体内和 150  $\mu\text{g}$  免疫的子代小鼠体内都发现了 IL-6 细胞因子明显增加,即 IL-6 参与了胚胎炎症暴露增加小鼠患葡萄膜炎严重程度这一过程,并将炎症传递给胎儿。

综上所述,参与双亲葡萄膜炎影响子代葡萄膜炎发生发展相关的 4 个枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 还影响了受母本活动性炎症暴露的子代小鼠,导致子代小鼠在视网膜抗原诱导下产生更严重的葡萄炎。因此,Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 有望成为预测葡萄膜炎的可能危险因素,为探讨母本患葡萄膜炎对子代的影响提供理论证据。

### 参 考 文 献(References)

- [1] YANG P, ZHONG Z, DU L, et al. Prevalence and clinical features of systemic diseases in Chinese patients with uveitis [J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105(1): 75-82.
- [2] JULIÁN K, TERRADA C, QUARTIER P, et al. Uveitis related to juvenile idiopathic arthritis: familial cases and possible genetic implication in the pathogenesis [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2010, 18(3): 172-177.
- [3] DUSEK J, URBANOVA I, STEJSKAL J, et al. Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome in a mother and her son [J]. Pediatr Nephrol, 2008, 23(11): 2091-2093.

- [ 4 ] SISKONEN M, HIRN I, PESÄLÄ R, et al. Prevalence, incidence and epidemiology of childhood uveitis [ J ]. Acta Ophthalmol, 2021, 99(2): e160-e163.
- [ 5 ] HAN V X, PATEL S, JONES H F, et al. Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders [ J ]. Nat Rev Neurol, 2021, 17(9): 564-579.
- [ 6 ] LIU J, YIN G, HU K, et al. Parental uveitis causes elevated hair loss in offspring of C57BL/6J mice [ J ]. Exp Eye Res, 2022, 219: 109056.
- [ 7 ] YIN G, ZENG W, HU K, et al. Parental uveitis influences offspring with an increased susceptibility to the experimental autoimmune uveitis [ J ]. Front Immunol, 2020, 11: 1053.
- [ 8 ] CASPI R R. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse [ J ]. Curr Protoc Immunol, 2003, 15: 1-20.
- [ 9 ] PAPENDORF J J, EBSTEIN F, ALEHASHEMI S, et al. Identification of eight novel proteasome variants in five unrelated cases of proteasome-associated autoinflammatory syndromes (PRAAS) [ J ]. Front Immunol, 2023, 14: 1190104.
- [ 10 ] EBSTEIN F, KÜRY S, MOST V, et al. PSMC3 proteasome subunit variants are associated with neurodevelopmental delay and type I interferon production [ J ]. Sci Transl Med, 2023, 15(698): eabo3189.
- [ 11 ] HE Z, YANG X, HUANG L, et al. PSMC5 promotes proliferation and metastasis of colorectal cancer by activating epithelial-mesenchymal transition signaling and modulating immune infiltrating cells [ J ]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 657917.
- [ 12 ] XING C, LIU X F, ZHANG C F, et al. Hsp90-associated DNA replication checkpoint protein and proteasome-subunit components are involved in the age-related macular degeneration [ J ]. Chin Med J, 2021, 134(19): 2322-2332.
- [ 13 ] LI X, LI X, HU Y, et al. PSMD8 can serve as potential biomarker and therapeutic target of the PSMD family in ovarian cancer: based on bioinformatics analysis and *in vitro* validation [ J ]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 573.
- [ 14 ] LIN P. Targeting interleukin-6 for noninfectious uveitis [ J ]. Clin Ophthalmol, 2015, 9: 1697-1702.
- [ 15 ] NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. Interleukin 6: from bench to bedside [ J ]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(11): 619-626.
- [ 16 ] TAKEUCHI M, KARASAWA Y, HARIMOTO K, et al. Analysis of Th cell-related cytokine production in behçet disease patients with uveitis before and after infliximab treatment [ J ]. Ocul Immunol Inflamm, 2017, 25(1): 52-61.

[ 收稿日期 ] 2023-11-28

## 《中国实验动物学报》2024 年征订启事

《中国实验动物学报》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。