

MAdCAM-1 在 EAU 小鼠模型中的表达及作用

周维通¹ 栾晶^{2*}

1. 西安医学院医学技术学院 陕西西安 710021

2. 陕西省感染与免疫疾病重点实验室(西安医学院) 西安医学院基础医学部 陕西西安 710021

摘要:目的 探讨粘膜地址素细胞黏附分子 1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1, MAdCAM-1) 在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (Experimental autoimmune uveitis, EAU) 小鼠模型眼、小肠、脾中的表达。方法 主动免疫诱导法制备 EAU 小鼠模型, 摘取眼球、小肠、脾制作石蜡切片, 使用 MAdCAM-1 单克隆抗体进行免疫组化检测。制备眼、小肠、脾的总蛋白提取物, 经 Western blot 检测各组织中 MAdCAM-1 蛋白的表达。结果 正常对照组小鼠 MAdCAM-1 阳性细胞在眼内几乎无表达, 在肠和脾中处于低表达; EAU 组小鼠视网膜出现明显的炎性细胞浸润, 眼组织中未见明显的 MAdCAM-1 阳性细胞表达增加, 而小肠、脾中 MAdCAM-1 阳性细胞表达均显著上调。MAdCAM-1 的蛋白正常对照组中几乎不表达, EAU 模型小鼠中, 眼组织中 MAdCAM-1 的蛋白表达略有增加, 小肠、脾中 MAdCAM-1 的蛋白明显上调, 且在肠道中表达上调的最明显。各组结果均具有统计学差异。结论 EAU 小鼠模型中小肠和脾脏中 MAdCAM-1 的细胞和蛋白表达显著上调, 与 EAU 的炎症形成密切相关。

关键词: 自身免疫性葡萄膜炎; EAU; MAdCAM-1; 肠道淋巴细胞归巢

1 材料与方法

1.1 EAU 造模与取材

本实验在中国中医科学院西苑医院中心实验室完成, 取无特定病原体级 (SPF) 6-8 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只, 按随机数字表法将小鼠分为 2 组: 正常对照组 (ddH₂O 组) 10 只; EAU 模型组 (IRBP 多肽 + CFA + LPS 组) 10 只。小鼠均由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 实验动物的采购、饲养及处死均遵循视觉眼科研究协会 (Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) 的相关规定。

造模过程如下: (1) 按照每只鼠 1g/L 的浓度, 将 5mg 肽段 IRBP161-180 溶解于 2.5ml 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中, 另取等体积的 2.5ml 完全弗氏佐剂 (CFA), 在冰上反复充分混匀两种液体 60min, 直至混为白色乳剂, 总体积约为 5ml; (2) 固定小鼠, 按照每只鼠 0.2ml 的量用混匀后的 IPBP+CFA 白色乳剂分别在小鼠的双后肢外侧、尾根部进行皮下注射; (3) 擦掉多余液体, 勿挤压隆起处, 防止液体溢出。上述步骤均给予对照组小鼠同等体积的双蒸水 (ddH₂O), 并于免疫 7、14、21d 时观察 EAU 炎症情况。

取材过程如下: 21d 时将小鼠进行性吸入深度麻醉后, 行颈椎脱臼处死法处死, 将小鼠放入超净台固定。(1) 用

眼科剪和镊子剪开眼周组织, 取出眼球, 放入眼球固定液中; (2) 剪开小鼠腹部, 依次取出小鼠脾脏, 小肠分别置入 4% 的多聚甲醛溶液中固定并贴好标签, 固定完成, -80 摄氏度冰箱保存。

1.2 H & E 染色和组织病理学检测

将新鲜摘除的眼球置于眼球固定液 (4% 戊二醛 + 10% 甲醛 + PBS) 中固定过夜, 石蜡包埋, 沿瞳孔 - 视盘轴向矢状面切片, 行苏木精 - 伊红 (H & E) 染色完成后, 置于光学显微镜下观察眼球组织的病理改变。参照 Caspi 组织病理学分级标准对其评分。(1) 0 分: 无炎症, 视网膜结构正常; (2) 0.5 分: 炎性细胞轻度浸润视网膜, 有光感受器细胞受损; (3) 1 分: 炎性细胞轻度浸润、视网膜折叠和点状脱离、脉络膜、视网膜可见个别肉芽肿和血管周围炎; (4) 2 分: 轻度至中度炎性细胞浸润和 / 或受损部位扩展至外核层、视网膜折叠脱离、斑点状光感受器细胞损伤; (4) 3 分: 中度炎性细胞浸润, 明显的视网膜折叠和脱离, 中等程度光感受器细胞损伤, 中等程度的肉芽肿; (5) 4 分: 重度炎性细胞浸润或视网膜全层破坏、受损、弥漫性视网膜脱离伴渗出, 广泛的光感受器细胞损伤。介于两个等级之间者计 0.5 分。

1.3 石蜡切片免疫组化检测

将制备的石蜡切片置于 67℃烘箱中 67℃烘 2h，二甲苯脱蜡，梯度酒精处理至 50% 乙醇后用 pH7.4 的 PBS 冲洗三次，每次 3min。将切片置于 pH6.0 的 PBS 缓冲液，微波修复。3%H₂O₂ 处理 10min，PBS 冲洗 3 次。将 MAdCAM-1 二抗（1:200，兔抗，索莱宝，中国）同源动物血清室温封闭 1h，去除血清，滴加 MAdCAM-1 一抗（1:200，兔抗，索莱宝，中国），室温下孵育 2h。PBS 冲洗 3 次。滴加 1 滴酶标鼠抗兔聚合物（1:500，兔抗，索莱宝，中国），室温下孵育 30min。PBS 冲洗 3 次。滴加新鲜配制的 DAB（二氨基联苯胺）液，显微镜下观察 5min。再次复染，0.1% HCl 分化，自来水冲洗，氨水蓝化，切片经梯度酒精脱水干燥，二甲苯透明，中性树脂封固，晾干后置于显微镜下观察。以上实验各组重复 3 次以上，正常组 C57BL/6J 小鼠作为空白对照，不加一抗为阴性对照。

1.4 样本总蛋白提取及 Western blot 检测

总蛋白提取液、蛋白电泳和转膜参照试剂盒说明书方法进行。转膜后备好样品，孵育 MAdCAM-1 一抗（1:200，兔抗，索莱宝，中国）加入：用 5% 脱脂牛奶-TBST 稀释 MAdCAM-1 一抗，室温孵育 10min，放 4℃过夜。第二天从 4 度拿出膜，在室温孵育 30min。TBST 洗 5 次，孵育 MAdCAM-1 二抗加入：用 5% 脱脂牛奶-TBST 稀释（1:200，兔抗，索莱宝，中国），室温轻摇 40min。洗 3 次后加入 ECL 到膜上后反应 3-5min，经曝光显影于胶片 10s-5min 显影 2min，定影，得到 MAdCAM-1 于 β-actin 条带强度。以上实验重复 3 次以上。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，将各组结果进行统计处理。计量资料采用均数 ± 标准差（表示，各组间比较采用单因素方差分析，若方差齐采用 LSD-t 检验；若方差不齐则行 Tamhane's T2 检验，以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠炎症评分和组织病理学评分

免疫第 21d 时观察正常对照组 EAU 模型组小鼠眼球炎症情况并进行评分。EAU 组小鼠大部分出现虹膜血管扩张、虹膜粘连、前房混浊。瞳孔缩小（膜闭）等炎症反应，这提示 EAU 造模成功。组织病理学评分结果：（1）正常对照

组：虹膜睫状体未见血管扩张及炎性渗出，视网膜及玻璃体均无炎性渗出，病理评分为 0 分；（2）EAU 组：部分小鼠可见虹膜睫状体轻微炎症、血管扩张以及少量的蛋白渗出，炎性细胞的浸润及渗出不明显，病理评分为 0.5 分；但视网膜部出现中度至重度的炎性细胞浸润、视网膜结构排列出现较为明显褶皱和脱离、光感受器细胞损伤，病理评分为 3.5 分。两组行单因素方差分析结果，见表 1。EAU 组炎症评分（3.10 ± 0.966）显著高于正常对照组炎症评分（0.021 ± 0.018），差异有统计学意义（F=101.539，P=0.000）。

表 1 两组小鼠视网膜组织病理学评分比较

组别	组织病理评分
正常对照组	0.021 ± 0.018
EAU 组	3.10 ± 0.966
F	101.539
P	0.000

2.2 两组小鼠眼、肠、脾中 MAdCAM-1 阳性细胞的表达

两组小鼠行眼、肠、脾石蜡切片免疫组化染色，检测 MAdCAM-1 的阳性细胞的表达，并选取相同倍数下视野内 MAdCAM-1 表达情况计数统计，重复三次取均值，见表 2。正常对照组和 EAU 组眼组织中均未见明显 MAdCAM-1 阳性细胞表达，正常对照组中小肠和脾脏均可见少量 MAdCAM-1 阳性细胞表达（肠 1：15.40 ± 1.222；脾 1：10.20 ± 0.772）。而 EAU 组中肠道和脾脏中 MAdCAM-1 表达明显增加（肠 2：51.90 ± 2.354；脾 2：35.10 ± 2.292）。两组均为肠道中 MAdCAM-1 表达高于脾脏中 MAdCAM-1 表达水平，差异有统计学意义（F 肠 =189.330，P 肠 =0.000；F 脾 =105.985，P 脾 =0.000）。

表 2 组肠、脾组织中 MAdCAM-1 阳性细胞表达比较。

组别	正常对照组		EAU 组	
	肠 1	脾 1	肠 2	脾 2
MAdCAM-1	15.40 ± 1.222	10.20 ± 0.772	51.90 ± 2.354	35.10 ± 2.292
F	189.330	105.985	189.330	105.985
P	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 两组小鼠眼、小肠、脾中 MAdCAM-1 蛋白表达水平比较

采用 Western blot 法检测了正常对照组小鼠和 EAU 组小鼠眼、肠、脾中 MAdCAM-1 蛋白的表达情况。结果显示，正常对照组中，眼组织几乎未见 MAdCAM-1 蛋白的表达（眼 1：0.010 ± 0.003），而小肠和脾脏均可见少量 MAdCAM-1 蛋白表达（肠 1：1.247 ± 0.105；脾 1：0.702 ± 0.477），相

比之下,EAU 组中眼 MAdCAM-1 蛋白表达略有增高(眼 2: 0.025 ± 0.002),而脾和肠道 MAdCAM-1 蛋白表达显著增加(肠 2: 3.675 ± 0.867 、脾 2: 1.444 ± 0.177),差异有统计学意义(F 眼 =14.766, P 眼 =0.001; F 肠 =317.998, P 肠 =0.000; F 脾 =227.194, P 脾 =0.000),见表 3。

表 3 两组眼、肠、脾中 MAdCAM-1 蛋白表达水平。

组别	眼	小肠	脾
正常对照组(组 1)	0.010 ± 0.003	1.247 ± 0.105	0.702 ± 0.477
EAU 组(组 2)	0.125 ± 0.002	3.675 ± 0.867	1.444 ± 0.177
F	14.766	317.998	227.194
P	0.001	0.000	0.000

3 结论

本研究中,我们观察到正常对照组小鼠眼中 MAdCAM-1 无论细胞水平还是分子水平均处于低表达状态。尽管在 EAU 模型中 MAdCAM-1 蛋白的表达略有增加,但眼组织中未见明显 MAdCAM-1 阳性细胞。正常对照组小鼠肠道和脾脏中有少量 MAdCAM-1 阳性细胞,而在 EAU 模型组中,我们首次发现大量 MAdCAM-1 阳性细胞表达于小肠黏膜固有层中的扁平血管内皮细胞表面,以及脾脏白髓的血管内皮表面,同时 MAdCAM-1 的蛋白表达显著上调,分别升高了 2.95 倍和 2.06 倍,且以小肠中的表达含量和上升幅度为最,均具有显著的差异性。表明小肠内膜免疫系统和脾脏中的 MAdCAM-1 表达上调可能与 EAU 的炎症密切相关,

我们的结果与 Kristina 等在 EAE 中的检测结果一致。说明 EAE 与 EAU 的发生都与 MAdCAM-1 介导的 ILH 作用相关,循环中的组织特异性 T 淋巴细胞进入肠道被活化,之后随着血液循环并穿越血-眼屏障或血-脑屏障从而引发了局部的炎症。

综上,肠道菌群所产生的模拟抗原信号在 EAU 中可能起着类似于“导火索”的作用;ILH 和归巢因子 MAdCAM-1 可能起到类似于“大门”和“门锁”的作用。肠道免疫、归巢机制、归巢因子 MAdCAM-1 的研究可能会为揭示自身免疫疾病中组织特异性 T 细胞的活化、增殖、迁移,及疾病的发生、发展、转归找到新的线索。

参考文献:

- [1] 杨培增,杜利平.中国葡萄膜炎的研究进展[J].中华眼科杂志,2019,55(4):5.
- [2] 杨培增.我国葡萄膜炎领域研究现状及未来发展方向[J].中华眼科杂志,2015(10):5.
- [3] 郑曰忠.葡萄膜炎的免疫学研究现状与展望[J].中华眼科杂志,2013,49(03):277-280.

作者简介:周维通(1996—),男,汉族,陕西省西安市,助教,硕士,研究方向为眼科学。

通讯作者:栾晶(1988—),女,汉族,陕西省西安市,副教授,博士,研究方向为肿瘤免疫治疗。

基金项目:西安医学院校级青年基金(2023QN08)。