

感 染

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001777

树鼩间质视黄醇结合蛋白-3 T 细胞抗原表位的预测 及其致葡萄膜炎的活性

高 杰¹, 曾纹鑫¹, 韩文莉¹, 徐 磊², 韦 莉¹, 潘永全¹, 陈飞兰¹

(1. 重庆医科大学实验动物中心、重庆市啮齿类实验动物工程技术研究中心, 重庆 400016;

2. 遵义医学院实验动物中心, 遵义 563000)

【摘要】目的:预测树鼩间质视黄醇结合蛋白-3(retinol-binding protein 3, RBP3)的 T 细胞抗原表位, 评价其致葡萄膜炎的活性及免疫原性。**方法:**通过 DNAMAN 软件比对树鼩 RBP3 蛋白与人光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinol-binding protein, IRBP)、狒狒 IRBP、牛 IRBP、大鼠 IRBP 和小鼠 IRBP 氨基酸序列的同源性, 利用 DNASTar 软件预测分析树鼩 RBP3 蛋白 T 细胞抗原表位及其与鼠主要组织相容性复合体 II 类分子(major histocompatibility complex II, MHC-II)相互作用的抗原位点, 合成上述预测的 RBP3182-192 抗原多肽片段评价其致 B10.R III 小鼠的葡萄膜炎活性和免疫原性。**结果:**根据 DNAMAN 比对分析, 树鼩 RBP3 与人 IRBP、狒狒 IRBP、牛 IRBP、大鼠 IRBP 和小鼠 IRBP 的氨基酸同源性分别为 83.50%、82.81%、82.23%、82.94%、82.63%。T 细胞抗原表位的预测结果显示, RBP3 含有 47 个潜在辅助性 T 细胞抗原优势表位和 34 个鼠 MHC-II 类分子结合的 CD4⁺ T 细胞抗原表位。合成包含预测抗原位点的 RBP3182-192 抗原多肽能够诱导出 B10.R III 小鼠的全葡萄膜炎疾病和刺激其 T 淋巴细胞增殖。**结论:**树鼩 RBP3 蛋白包含较多 CD4⁺ T 细胞抗原表位, 选择并合成所预测的 RBP3182-192 抗原多肽具有诱导 T 淋巴细胞增殖的免疫活性和致小鼠葡萄膜炎的活性, 可为诱导实验性自身免疫性葡萄膜炎树鼩新型模型的抗原筛选及葡萄膜炎研究提供基本理论依据。

【关键词】树鼩; 间质视黄醇结合蛋白 3; 抗原表位; 实验性自身免疫性葡萄膜炎

【中图分类号】R322.91

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-08-07

Prediction of retinol-binding protein 3(RBP3) epitopes in Chinese tree shrew and validation of its uveitogenic activity

Gao Jie¹, Zeng Wenxin¹, Han Wen li¹, Xu Lei², Wei Li¹, Pan Yongquan¹, Chen Feilan¹

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University;

2. Laboratory Animal Center, Zunyi Medical College)

【Abstract】Objective: To predict the epitopes of tree shrew retinol-binding protein 3(RBP3) and to validate its uveitogenic activity. **Methods:** BLAST was utilized to compare the amino acid sequence homology of RBP3 protein with the IRBP of human, Papio Anubis, bovine, rat and mouse by DNAMAN. The antigenic sites of T cell epitopes of RBP3 and their interaction with murine MHC class II molecules were analyzed by DNASTar software. The B10.R III mouse was immunized by the predicted RBP3182-192 antigen peptide and T cell proliferation assay was conducted to assess its immunogenicity and pathogenicity. **Results:** According to DNAMAN alignment analysis, the amino acid homology of the RBP3 protein in tree shrew with the IRBP of human, Papio anubis, bovine, rat and mice was

83.50%, 82.81%, 82.23%, 82.94% and 82.63%, respectively.

Our results showed that T cell epitope of the RBP3 protein contained 47 potential T cell epitopes and 34 antigen sites that interacted with murine MHC-II molecule. **Conclusion:** Critically, experimental autoimmune uveitis(EAU) in B10.R III mouse and T cell proliferation have also been successfully induced with the predicted RBP3182-192 antigen peptide, suggesting that the predicted T cell epitopes have uveitogenic activities and immunogenicity.

【Key words】tree shrew; retinol-binding protein 3; epitopes; experimental autoimmune uveitis

作者介绍:高 杰, Email: 2570122758@qq.com,

研究方向: 实验性自身免疫性葡萄膜炎动物模型的建立及其机制的研究。

通信作者:陈飞兰, Email: cfl761219@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81670843); 重庆市科学技术委员会研究资助项目(编号: cstc2016jcyjA0265、cstc2015shmszx120031、cstc2015shmszxsydw-1); 重庆市渝中区科技计划和重庆市发改委资助项目(编号:渝发改技[2015]1650号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180608.1715.006.html>
(2018-06-11)

间质视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, RBP)又称光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP),是一种位于视网膜感光器基质中的色素上皮细胞核感光细胞界面上的高度保守的糖蛋白,分子量约 140 kD^[1-2]。IRBP 普遍存在于脊椎动物视网膜中,主要由光感受器合成并分泌到光间受体基质中(interphotoreceptor matrix, IPM)^[3-4],在此与维生素 A 类物质结合,继而参与光感受器和视网膜色素上皮之间的维生素 A 类转运过程^[5-7],因此对维持正常的视循环发挥重要的作用。此外,IRBP 具有抗原性和致葡萄膜炎的活性,其不同序列的氨基酸肽段可诱导小鼠^[8-9]、大鼠^[10]、兔^[11]、猴^[12]等多种动物的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveoretinitis, EAU), IRBP 诱导的 EAU 主要特征以后葡萄膜炎为主,类似于人类后葡萄膜炎,但疾病的具体表型取决于动物的易感性、IRBP 的剂量以及所用的辅佐剂的种类。例如,牛源性 IRBP 的 R16 多肽诱导的 Lewis 大鼠 EAU 模型多表现为急性严重葡萄膜炎,炎症浸润主要在脉络膜,视网膜具有轻度的病变^[13]; IRBP1-20 诱导的 C57BL/6 小鼠 EAU 中,炎症主要影响眼后段,并表现为轻度至中度的慢性过程^[14];而 IRBP161-180 诱导的 B10.R III 小鼠 EAU 炎症具有严重的急性过程,涉及眼睛的前后端,类似于人类的全葡萄膜炎^[15]等。尽管这些不同动物的 EAU 在临床表现、病理组织学特征、病程以及免疫发病机制上能够不同程度模拟人类葡萄膜炎不同类型的特征和属性,但目前建立的 EAU 动物模型仍不能完全再现人类葡萄膜炎特征。

树鼩作为灵长类的近亲,在生理功能、生化代谢、基因组学、视觉系统以及免疫系统等方面与人类的相似性远高于小鼠、大鼠等实验动物^[16-17],而且其参与免疫反应的抗原提呈主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II 类分子含有人类相应的 MHC-II 类分子^[18]。因此,树鼩将可能成为主要由 T 细胞反应介导的自身免疫性葡萄膜炎研究的潜在模式动物。新近有全基因组测序报道了树鼩间质视黄醇结合蛋白 RBP3(ELW66657.1),但有关其蛋白的 T 细胞抗原表位以及是否具有潜在的致葡萄膜炎活性并未见报道。因此,本研究运用 DNASTar 软件对 T 细胞抗原表位进行预测并探

讨其致葡萄膜炎活性,以期寻找其特异的 T 细胞抗原表位,为建立新型葡萄膜炎树鼩模型以及为葡萄膜炎研究提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 RBP3 蛋白 RBP3 蛋白氨基酸序列来源:从 NCBI 网站获取来源于中国树鼩全基因组测序的氨基酸序列(GenBank 序列号为 ELW66657.1),含有 1277 个氨基酸。

1.1.2 抗原表位分析软件 DNASTar 软件包是 DNASTar 有限公司开发的生物软件,可在计算机上进行 DNA 和蛋白质分析,其中 DNASTar 软件包中 Protean 软件可对蛋白质抗原表位进行预测和分析。

1.1.3 实验动物 选取 6~8 周龄 SPF 级 B10.R III 小鼠(来源于美国 Jackson 实验室,由重庆医科大学附属第一医院杨培增教授友情赠送)12 只,在重庆医科大学实验动物中心 SPF 级屏障环境系统中饲养[生产许可证号:SCXK(渝)2017-0001,使用许可证号:SYXK(渝)2017-0023]。实验动物保持在 12 h/12 h 明暗交替照明环境中,自由采食和饮水。

1.2 方法

1.2.1 BLAST 分析 采用 DNAMAN(5)软件对 RBP3 蛋白氨基酸序列与人 IRBP(GenBank AAA59188.1)、狒狒 IRBP(XP_003903694.1)、牛 IRBP(GenBank AAA30591.1)、大鼠 IRBP(NP_001178761.1)以及小鼠 IRBP(GenBank AAH42480.1)蛋白氨基酸序列的同源性进行比对分析。

1.2.2 RBP3 蛋白 T 细胞抗原表位的预测 应用 Rothbard-Taylor 方法^[19]预测含有特定基序(motif)的潜在 T 淋巴细胞抗原决定簇,参考 AMPHI 方法^[20]预测免疫优势辅助性 T(Th)细胞抗原位点,最后综合测评及预测 Th 细胞抗原优势表位。

1.2.3 RBP3 蛋白与鼠 MHC-II 类分子相互作用位点分析 为进一步评价 RBP3 蛋白与 MHC-II 类分子相互作用位点,即 CD4⁺ T 抗原表位,应用 Sette MHC Motifs 方法预测 RBP3 蛋白与鼠 MHC-II 类分子相互作用的 T 细胞抗原位点。

1.2.4 RBP3 蛋白的致葡萄膜炎活性 为评价预测的与 MHC-II 类分子相互作用的 T 细胞抗原位点致葡萄膜炎活性,选择包含上述预测位于第 184-189 的氨基酸序列抗原位点并合成 RBP3182-192 抗原肽。由弗氏完全佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA, 美国 Sigma 公司)充分乳化的包含 100 μg RBP3182-192 多肽(YVISYLHPGST, 上海生工生物工程公司合成)的 PBS 溶液 200 μL 经皮下免疫 B10.R III 小鼠(尾根部注射 100 μL, 两大腿内侧各注射 50 μL)共 6 只。用 CFA-PBS 乳化物 200 μL 按照上述的注射方法及注射剂量免疫 B10.R III 小鼠 6 只作为正常对照组。应用裂隙灯显微镜和 HE 染色法评价小鼠眼部炎症的发生、临床表现和病理

组织学变化。本研究所有程序遵循重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理标准执行。

1.2.5 T 淋巴细胞增殖实验 为评价所预测的 RBP3182-192 抗原肽的免疫原性,取上述 RBP3182-192 抗原免疫 B10.R III 小鼠,在炎症高峰期第 13 天取其脾脏制成单个细胞悬液,应用淋巴细胞分离液(Solarbio,中国北京)分离获得淋巴细胞,按 8×10^5 个细胞/孔加入 96 孔板中,加入 $20 \mu\text{g/mL}$ RBP3182-192 抗原多肽刺激培养细胞 24 h,即刺激组,不加入 RBP3 抗原为未刺激组,每组做 3 个复孔。最后应用 MTT 细胞增殖检测试剂盒(Solarbio,中国北京)检测 T 淋巴细胞增殖。

1.3 数据统计分析

应用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据采用独立样本 t 检验分析以确定是否具有组间差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BLAST 分析结果

结果显示,树鼩 RBP3 与人类 IRBP、狒狒 IRBP、牛 IRBP、大鼠 IRBP、小鼠 IRBP 蛋白氨基酸的同源性高达 80% 以上,其中与人的 IRBP 同源性最高,为 83.50%;与狒狒 IRBP 的同源性为 82.81%;与牛 IRBP 蛋白的同源性最小,为 82.23%;与大鼠 IRBP 的同源性为 82.94%,与小鼠 IRBP 的同源性为 82.63%。

2.2 RBP3 蛋白的 T 细胞抗原表位预测

分别应用 Rothbard-Taylor 方法预测含有特定基序的潜在 T 淋巴细胞抗原决定簇和 AMPHI 方法预测免疫优势辅助性 Th 细胞抗原位点,最后综合分析预测 Th 细胞优势抗原表位。结果显示,Th 细胞优势抗原表位可能主要位于 29~36、

45~56、63~80、95~109、112~127、131~140、142~151、154~162、169~177、197~207、235~249、258~265、282~295、308~314、324~364、367~374、376~379、417~427、453~468、495~498、502~516、520~526、562~569、600~606、619~659、681~693、724~729、742~759、764~772、806~825、848~864、920~928、938~943、958~965、967~975、977~984、1019~1029、1045~1068、1087~1098、1108~1123、1143~1150、1154~1161、1174~1180、1197~1205、1207~1211、1225~1235、1245~1253 位氨基酸残基(图 1),约占整个氨基酸序列的 44%。

2.3 RBP3 蛋白与鼠 MHC-II 类分子 I 区相互作用位点

为进一步预测 RBP3 蛋白的 CD4⁺T 细胞抗原致病位点(目前软件无法预测 RBP3 与树鼩 MHC-II 类分子相互作用的抗原位点),通过 Sette MHC Motifs 软件预测树鼩 RBP3 蛋白与鼠 MHC-II 类分子 I 区免疫相关抗原结合位点。结果显示,RBP3 与鼠 MHC-II 类分子 I 区免疫相关抗原结合位点主要位于 8~13、63~75、84~89、171~176、184~189、227~235、247~250、269~274、316~325、331~334、387~392、450~455、502~507、535~543、551~556、572~577、589~594、647~652、655~669、677~686、752~757、814~819、838~850、871~876、896~902、928~941、961~971、996~1001、1083~1095、1137~1149、1184~1193、1217~1224、1233~1236、1246~1273 位氨基酸残基(图2),约占整个氨基酸序列的 19%。

2.4 RBP3 蛋白的致葡萄膜炎活性

为验证上述所预测的 T 细胞抗原表位的致病性,我们合成了 RBP3182-192 抗原肽 YVISYLHPGST(实际位置为 184-189 肽段),并将其免疫目前公认的最易感葡萄膜炎 B10.R III 小鼠。B10.R III 小鼠在免疫后 10 d 开始发病,13 d 炎症达高峰。通过临床裂隙灯观察发现,小鼠角膜浑浊、睫状充血、虹膜异常色素沉着、前房积脓、瞳孔不规则和缺损。病理组织

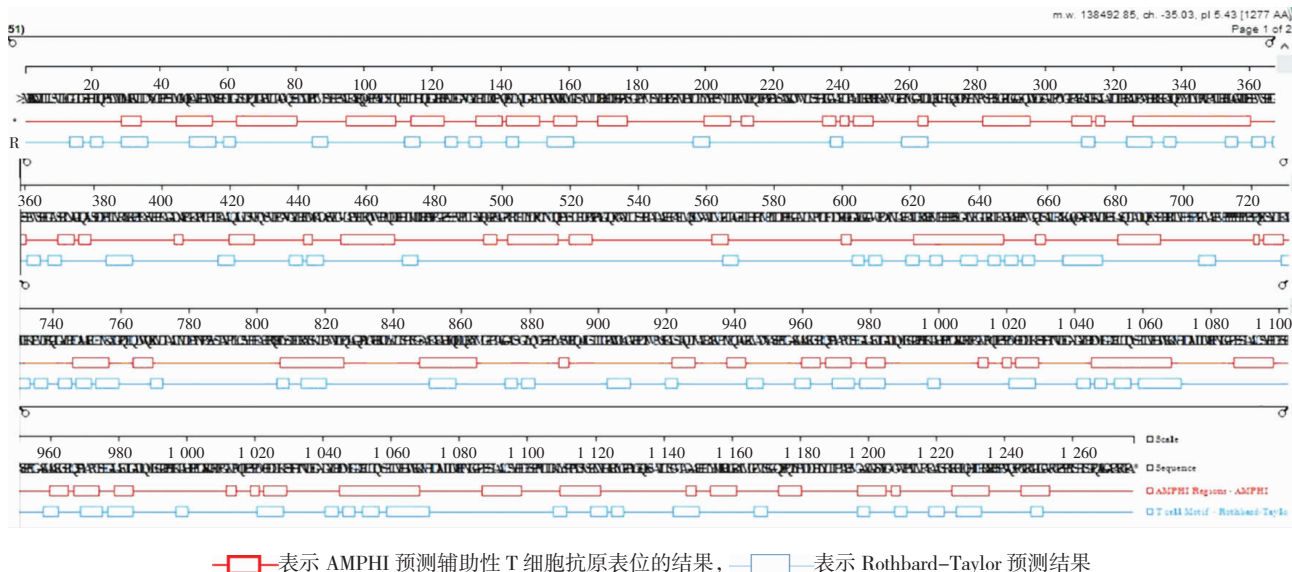


图 1 树鼩 RBP3 T 细胞抗原表位的预测分析

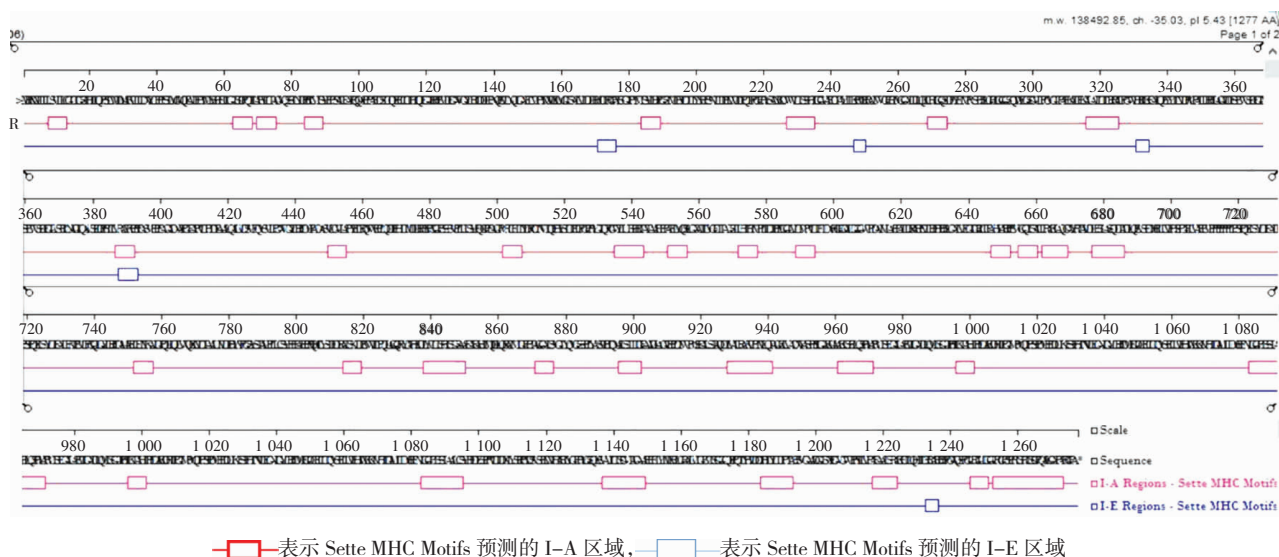
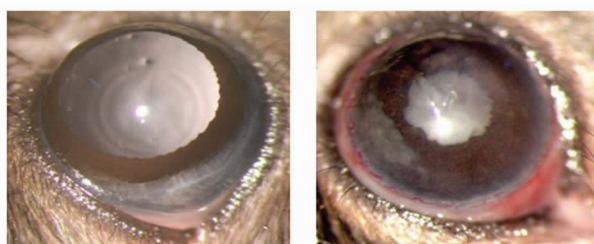


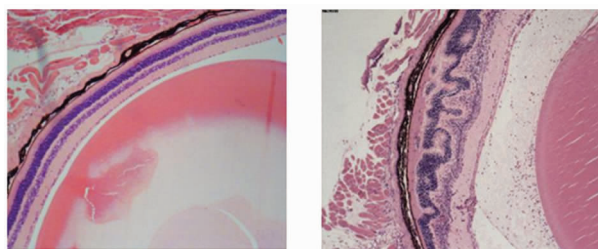
图 2 树鼯 RBP3 与鼠 MHC-II 类分子 相互作用位点

HE染色结果发现,眼组织呈现全葡萄膜炎,眼前段和眼后段大量炎性细胞浸润,视网膜结构紊乱折叠,视网膜内可见肉芽肿形成,视网膜下腔广泛纤维素渗出(图 3B,图 4B)。对照组临床裂隙灯以及组织病理学观察均未见明显炎症(图 3A,图 4A)。



A. 对照组 B. 13d 炎症高峰期

图 3 裂隙灯显微镜观察眼前段

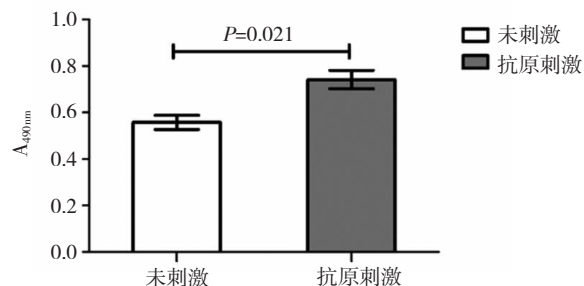


A. 对照组 B. 13d 炎症高峰期

图 4 组织病理学改变

2.5 RBP3182-192 刺激淋巴细胞增殖

为确定 RBP3182-192 是否具有特异性刺激 T 细胞增殖的作用,应用 MTT 法评价了 RBP3182-192 多肽刺激上述 EAU 模型中小鼠脾脏淋巴细胞的增殖情况。结果发现,在刺激 24h 后,与未刺激组(0.56 ± 0.03)相比,RBP3182-192 抗原刺激组(0.74 ± 0.04)的淋巴细胞明显增殖(图 5, $t=3.718$, $P=0.021$)。



未刺激:分离得到的淋巴细胞培养 24 h,用 MTT 试剂盒检测其 OD 值;抗原刺激:分离得到淋巴细胞后,再用 $20 \mu\text{g/mL}$ RBP3182-192 抗原刺激培养 24 h,用 MTT 试剂盒检测其 OD 值; $P=0.021$, 差异具有统计学意义; $n=3$

图 5 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 多肽诱导 T 淋巴细胞增殖

3 讨论

本研究通过对 NCBI 数据库来源的中国树鼯 RBP3 蛋白的氨基酸序列与人、狒狒、牛等 IRBP 同源性的分析,树鼯 RBP3 蛋白的 T 细胞抗原表位的预测及其免疫原性和致病性的研究发现,树鼯 RBP3 蛋白与人、狒狒、牛、大鼠和小鼠的 IRBP 同源性比例占 80%以上,树鼯 RBP3 蛋白包含 47 个 Th 细胞抗原表位和 34 个与鼠 MHC-II 类分子结合的 CD4⁺ T 细胞抗原表位。随后,选择并合成了预测的 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 抗原多肽,免疫 B10.RIII 小鼠后,发现 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 抗原多肽不仅具有诱导 B10.RIII 小鼠葡萄膜炎的致病性,而且还具有诱导 EAU 小鼠 T 细胞

增殖的免疫原性。

通过 DNAMAN(5)软件 Blast 比对发现,树鼩 RBP3 蛋白与人 IRBP、狒狒 IRBP、牛 IRBP、大鼠 IRBP 和小鼠 IRBP 同源性高达 80%以上,其中与人的同源性最高,然后依次是狒狒、大鼠、小鼠和牛,提示树鼩 RBP3 在氨基酸组成方面不仅与人、狒狒、大鼠、小鼠和牛的 IRBP 一样皆为相对保守序列,而且树鼩的 RBP3 氨基酸组成与人亲源性最高,接着是狒狒,大鼠、小鼠次之,最后为牛。这些结果将可能为树鼩 RBP3 应用于人类葡萄膜炎研究提供新的理论依据。

葡萄膜炎是一种主要由 T 细胞反应介导的自身免疫性疾病,其中 CD4⁺ T 细胞发挥了重要作用^[21]。Rothbard-Taylor 方法主要针对 T 细胞潜在的优势抗原表位进行预测,所预测的抗原表位可包括 Tc 细胞抗原表位和 Th 细胞表位。而 DNASTAR 软件的 AMPHI 方法主要针对 Th 细胞潜在的优势抗原表位进行预测。因此,课题组先应用 Rothbard-Taylor 方法预测树鼩 RBP3 蛋白 T 细胞总的潜在优势抗原表位,在此基础上结合 AMPHI 方法预测 Th 细胞抗原表位。结果表明,树鼩 RBP3 蛋白的 Th 细胞抗原含有 47 个片段左右,其中包含目前文献报道常用的具有致葡萄膜炎疾病的各种属抗原片段,如树鼩 RBP3₂₉₋₃₆ 位氨基酸残基(DMAKVLLD)与免疫 C57BL/6 小鼠的人 IRBP₁₋₂₀(GPTHLFQPSLVLD-MAKVLLD)多肽片段中的第 13-30 位点氨基酸残基一致^[22-23],提示预测的树鼩 RBP3₂₉₋₃₆ 抗原表位可能具有与人 IRBP₁₋₂₀ 多肽一致的致葡萄膜炎活性。RBP3₁₁₉₇₋₁₂₁₁ 位氨基酸残基(GAADGTSWEGVGVP)与建立 Lewis 大鼠单相或复发性 EAU 模型的人 R14(PTARSVGASDGSSWEGVGVT PHV)、R16(SDGSSWEGVGVT PHV)多肽片段^[24-26],和诱导马 EAU 模型的牛 R14(PTARSVGASDGSSWEGVGVT PHV)、R16(ADGSSWEGVGVPDV)多肽片段^[27-28]同源性较高,提示树鼩 RBP3₁₁₉₇₋₁₂₁₁ 抗原表位可能是与人 R14 和牛 R14、R16 的抗原表位相似。

MHC-II 类分子抗原表位为 CD4⁺ T 细胞抗原表位。对树鼩 RBP3 蛋白与鼠 MHC-II 类分子相互作用位点进行了预测,树鼩 RBP3 蛋白包含 34 个与鼠 MHC-II 类分子相互结合的 CD4⁺ T 细胞抗原表位,其中 RBP3₁₈₂₋₁₉₂(YVISYLHPGST)抗原片段与建

立经典的 B10.R III 小鼠 EAU 模型的人 IRBP₁₆₁₋₁₈₀(SGIPYIISYLHPGNTILHVD)^[29-30]以及树鼩 RBP3₆₇₇₋₆₈₆(LESLASQLTA)与诱导 C57BL/6J 小鼠 EAU 模型的人 IRBP₆₅₁₋₆₇₀(LAQGAYRTAVDLELASQLT)^[31]抗原片段位点以及氨基酸序列具有相似性,提示树鼩 RBP3₁₈₄₋₁₉₄ 和 RBP3₆₇₇₋₆₈₆ 抗原片段可能与人 IRBP₁₆₁₋₁₈₀、IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 多肽具有相同的致葡萄膜炎疾病的作用。

为进一步评价本课题组预测的 CD4⁺ T 细胞抗原表位是否具有致病性,代表性地合成了 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 抗原多肽,通过诱导 B10.R III 小鼠葡萄膜炎模型,证实了树鼩 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 多肽具有致 B10.R III 小鼠葡萄膜炎的抗原性,并确定出 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 多肽诱导的 EAU 模型与人 IRBP₁₋₂₀ 诱导的经典 EAU 模型在疾病发生、发展、转归、临床表现、病理组织学特征以及免疫等表型方面的异同(数据尚未发表)。最后,应用 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 致敏 T 细胞增殖试验发现 RBP3₁₈₂₋₁₉₂ 抗原肽具有特异性刺激 T 细胞增殖的免疫原性。以上结果提示树鼩 RBP3 蛋白的 T 细胞抗原具有免疫实验动物建立 EAU 模型的潜在能力。

综上所述,本研究通过生物信息学的 DNAMAN 软件比对分析、Protean 软件等对 T 细胞抗原表位进行预测,证明了所预测的树鼩 RBP3 蛋白的 T 细胞抗原表位具有致葡萄膜炎疾病和诱导 T 细胞增殖的免疫原性,可为 RBP3 蛋白的应用以及建立新型的 EAU 模型提供基本的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Wroblewski K, Sen HN, Yeh S, et al. Long-term daclizumab therapy for the treatment of noninfectious ocular inflammatory disease[J]. Can J Ophthalmol, 2011, 46(4): 322-328.
- [2] Benesi DA, Donoso LA, Edelberg KE, et al. Human retinal S-antigen. Isolation, purification, and characterization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984, 25(6): 686-690.
- [3] Redmond TM, Wiggert B, Robey FA, et al. Isolation and characterization of monkey interphotoreceptor retinoid-binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina[J]. Biochemistry, 1985, 24(3): 787-793.
- [4] Vachali PP, Besch BM, Gonzalez-Fernandez F, et al. Carotenoids as possible interphotoreceptor retinoid-binding protein(IRBP) ligands: a surface plasmon resonance (SPR) based study[J]. Arch Biochem Biophys, 2013, 539(2): 181-186.
- [5] Garlipp MA, Nowak KR, Gonzalez-Fernandez F. Cone outer segment extracellular matrix as binding domain for interphotoreceptor

- retinoid-binding protein[J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(4): 756–769.
- [6] Garlipp MA, Gonzalez-Fernandez F. Cone outer segment and Müller microvilli pericellular matrices provide binding domains for interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 113: 192–202.
- [7] Ho MT, Massey JB, Pownall HJ, et al. Mechanism of vitamin A movement between rod outer segments, interphotoreceptor retinoid-binding protein, and liposomes[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(2): 928–935.
- [8] Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, et al. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens[J]. *J Immunol*, 1988, 140(5): 1490–1495.
- [9] Chen J, Qian H, Horai R, et al. Mouse models of experimental autoimmune uveitis; comparative analysis of adjuvant-induced vs spontaneous models of uveitis[J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(6): 550–557.
- [10] Tian QM, Bi HS, Cui Y, et al. Influence of Yanyankang powder on Th1/Th2 in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(3): 214–218.
- [11] Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Saari JC. Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein[J]. *Exp Eye Res*, 1987, 44(3): 425–438.
- [12] Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, et al. Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein[J]. *Arch Ophthalmol*, 1986, 104(11): 1698–1702.
- [13] Gery I, Wiggert B, Redmond TM, et al. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986, 27(8): 1296–1300.
- [14] Broderick C, Hoek RM, Forrester JV, et al. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5): 1669–1677.
- [15] Jiang HR, Lumsden L, Forrester JV. Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(13): 3177–3185.
- [16] Novacek MJ. Mammalian phylogeny: shaking the tree[J]. *Nature*, 1992, 356(6365): 121–125.
- [17] Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 476–482.
- [18] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1426.
- [19] Kutubuddin M, Kolaskar AS, Galande S, et al. Recognition of helper T cell epitopes in envelope (E) glycoprotein of Japanese encephalitis, west Nile and Dengue viruses[J]. *Mol Immunol*, 1991, 28(1–2): 149–154.
- [20] Gao XM, Liew FY, Tite JP. Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of influenza A virus[J]. *J Immunol*, 1989, 143(9): 3007–3014.
- [21] Yuan LF, Li GD, Ren XJ, et al. Rapamycin ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis by inhibiting Th1/Th2/Th17 cells and upregulating CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(4): 659–664.
- [22] Gutowski MB, Wilson L, Van Gelder RN, et al. In vivo bioluminescence imaging for longitudinal monitoring of inflammation in animal models of uveitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(3): 1521–1528.
- [23] Umazume A, Kezuka T, Matsuda R, et al. Role of PU.1 expression as an inflammatory marker in experimental autoimmune uveoretinitis[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2017[Epub ahead of print].
- [24] Kaufmann U, Diedrichs-Mohring M, Wildner G. Dynamics of intraocular IFN- γ , IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49008.
- [25] Tang K, Guo D, Zhang L, et al. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on CD4+/CD8+ T cells and associated inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2746–2754.
- [26] He C, Yu CR, Mattapallil MJ, et al. SOCS1 mimetic peptide suppresses chronic intraocular inflammatory disease (uveitis)[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 2939370.
- [27] Deeg CA, Amann B, Raith AJ, et al. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(2): 652–656.
- [28] Guo DD, Hu B, Tang HY, et al. Proteomic profiling analysis reveals a link between experimental autoimmune uveitis and complement activation in rats[J]. *Scand J Immunol*, 2017, 85(5): 331–342.
- [29] Tode J, Richert E, Koinzer S, et al. Intravitreal injection of anti-interleukin (IL)-6 antibody attenuates experimental autoimmune uveitis in mice[J]. *Cytokine*, 2017, 96: 8–15.
- [30] Horai R, Chong WP, Zhou R, et al. Spontaneous ocular autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific to retina: a tool to dissect mechanisms of uveitis[J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(6): 511–516.
- [31] Mattapallil MJ, Silver PB, Cortes LM, et al. Characterization of a new epitope of IRBP that induces moderate to severe uveoretinitis in mice with H-2b haplotype[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(9): 5439–5449.

(责任编辑: 方 济)