

引文格式: 刘晓瑞, 杨淑芳, 曾峥, 丁然然, 赵宇, 由彩云. 利妥昔单抗对实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠的抗炎作用及其机制[J]. 眼科新进展, 2023, 43(6): 434-438. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0087

【实验研究】

# 利妥昔单抗对实验性自身免疫性葡萄膜炎小鼠的抗炎作用及其机制<sup>△</sup>

刘晓瑞 杨淑芳 曾 峥 丁然然 赵 宇 由彩云

**【摘要】 目的** 探讨利妥昔单抗(RTX)对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)小鼠的抗炎作用及其机制。**方法** 取 SPF 级 6~8 周龄健康雌性 C57BL/6J 小鼠 27 只,使用光感受器间维生素 A 类结合蛋白 1-20(IRBP<sub>1-20</sub>)建立 EAU 小鼠模型,将 EAU 小鼠随机分为 PBS 对照组、50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组,每组各 9 只小鼠,PBS 对照组小鼠腹腔注射 PBS,50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠每千克体重分别腹腔注射 50 mg RTX 和 100 mg RTX。造模后第 21 天,对各组小鼠进行眼底图像的采集与视网膜组织 HE 切片的制作,通过小动物视网膜成像仪采集各组小鼠眼底图像并参照 Caspi 临床评分标准进行炎症评分,将 HE 染色切片置于显微镜下观察并进行拍照,参照 Caspi 组织病理学评分标准进行评分。采用实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠视网膜组织白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-4 和 IL-10 的 mRNA 相对表达量。采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。**结果** 眼底图像显示:PBS 对照组 EAU 小鼠眼底出现多发性血管炎,血管扩张,视网膜脉络膜出现多发病灶及少量线样病变;50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠眼底发生轻度血管炎,视网膜出现个别局部病灶,无线样病变;100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜局部出现个别病灶,无线样病变。PBS 对照组、50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠眼底图像 Caspi 临床评分分别为(1.944 $\pm$ 0.808)分、(1.667 $\pm$ 0.791)分、(1.667 $\pm$ 0.829)分,三组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。PBS 对照组、50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织病理学评分分别为(1.563 $\pm$ 1.116)分、(1.063 $\pm$ 0.623)分、(1.250 $\pm$ 0.655)分,三组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠视网膜组织 IL-6、IL-10 mRNA 相对表达量以及 IL-10/IL-6 比值均高于 PBS 对照组(均为  $P<0.05$ );100 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠视网膜组织 IL-6、IL-10 mRNA 相对表达量以及 IL-10/IL-6 比值均高于 50 mg·kg<sup>-1</sup> RTX 实验组(均为  $P<0.05$ )。**结论** 腹腔注射 RTX 可一定程度缓解 EAU 小鼠视网膜组织的炎性病变,其机制可能与 RTX 提高小鼠视网膜组织 IL-10/IL-6 比值有关。

**【关键词】** 实验性自身免疫性葡萄膜炎;利妥昔单抗;白细胞介素-6;白细胞介素-10

**【中图分类号】** R773

非感染性葡萄膜炎是一类常见的、严重威胁视力的炎症性眼病,好发于青壮年,可造成沉重的社会经济负担<sup>[1]</sup>。糖皮质激素、免疫抑制剂或生物制剂是目前治疗非感染性葡萄膜炎的主要方式,但这些药物长期使用时疗效局限并可能产生局部或全身副作用<sup>[2-3]</sup>。因此,寻求一种毒副作用小,疗效确切且稳定的治疗药物成为当前非感染性葡萄膜炎研究的重点。

利妥昔单抗(RTX)是一种人鼠嵌合型抗 CD20 单克隆抗体,可特异性地与前体 B 细胞和成熟 B 细胞膜表面 CD20 受体结合,已被批准用于治疗类风湿性关节炎、Wegener 肉芽肿和寻常型天疱疮等自身免疫性疾病<sup>[4]</sup>。在炎症性眼病治疗方面有少数应用 RTX 的病例报道,包括周边溃疡性角膜炎<sup>[5-6]</sup>、难治性葡萄膜炎<sup>[7]</sup>、幼年特发性关节炎相关性葡萄膜炎<sup>[8]</sup>和视网膜血管炎<sup>[9-10]</sup>等,但其中的具体作用机制尚不明确。本研究通过构建与非感染性葡萄膜炎

致病机制相似的实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)小鼠模型<sup>[11]</sup>,探讨 RTX 对 EAU 小鼠的抗炎作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取 SPF 级 6~8 周龄健康雌性 C57BL/6J 小鼠 27 只,体重 18~20 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养条件:温度 20~26℃,相对湿度 30%~70%,最低工作照度 150 lx,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h,自由饮水,使用灭菌垫料与鼠粮进行喂养。实验动物操作符合天津医科大学总医院医学动物保护与伦理委员会相关规定。本研究方案经天津医科大学总医院伦理委员会审批(批文号:IRB2022-DW-31)。

#### 1.1.2 试剂及仪器

光感受器间维生素 A 类结合蛋白 1-20(IRBP<sub>1-20</sub>)多肽、特异性引物(上海生工生

物工程股份有限公司),完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司),结核分枝杆菌(美国 Difco 公司),百日咳毒素(美国 List Biological Laboratories 公司),RTX 注射液、SYBR(瑞士 Roche 公司),Trizol(美国 Thermo 公司),cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司),FAS 眼球固定液、苏木素、伊红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司);小动物视网膜成像仪(美国 Phoenix Research Labs 公司),PCR 热循环仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

**1.2.1 EAU 模型的建立及分组** 将含有 300 μg IRBP<sub>1-20</sub>多肽的 PBS 溶液与等体积含有 300 μg 结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂溶液充分混合为油包水状态的乳化剂,在每只小鼠四肢根部皮下注射 50 μL,同时腹腔注射 0.5 μg 百日咳毒素以增强免疫,建立 EAU 小鼠模型。采用随机数字表法将 EAU 小鼠随机分为 PBS 对照组、50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组,每组各 9 只小鼠,PBS 对照组小鼠腹腔注射 PBS,50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠每千克体重分别腹腔注射 50 mg RTX 和 100 mg RTX,从造模后第 1 天至第 21 天对各组小鼠进行连续干预。

**1.2.2 EAU 小鼠眼底图像采集及临床评分** 于造模后第 21 天,使用复方托吡卡胺滴眼液散瞳,贝复舒凝胶涂眼,通过小动物视网膜成像仪采集各组小鼠眼底图像并参照 Caspi 临床评分标准进行炎症评分<sup>[12]</sup>。

**1.2.3 EAU 小鼠视网膜组织 HE 染色及组织病理学评分** 于造模后第 21 天,颈椎脱臼法处死小鼠,取一侧眼球置于 FAS 眼球固定液固定 24 h,之后进行梯度酒精脱水,石蜡包埋,再沿瞳孔-视神经轴连续切片,切片厚度为 4 μm。然后,将石蜡切片依次进行二甲苯脱蜡,酒精脱水,流水冲洗,HE 染色,再经脱水、透明,最后中性树胶封片,完成视网膜组织的 HE 染色。将 HE 染色切片置于显微镜下观察并进行拍照,参照 Caspi 组织病理学评分标准进行评分<sup>[12]</sup>。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR** 采用实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠视网膜组织白细胞介素(IL)-1β、IL-4、IL-6 和 IL-10 mRNA 相对表达量,使用 Trizol

试剂提取视网膜组织总 RNA,NanoDrop one 超微量分光光度计测量 RNA 浓度,根据逆转录试剂盒反应体系将 RNA 逆转录为 cDNA,最后以 cDNA 和基因特异性引物(表 1)为模板,进行实时荧光定量 PCR。反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 + 延伸 1 min,共设置 40 个循环。反应结束后,应用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各基因表达水平。

表 1 特异性引物序列

基因	引物序列(5'至3')
IL-1β	上游引物:TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG 下游引物:AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
IL-6	上游引物:CTTCTTGGGACTGATGCTGCTGAC 下游引物:AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC
IL-4	上游引物:GGTCTCAACCCCCAGCTAGT 下游引物:GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
IL-10	上游引物:TGCACTACCAAAGCCACAAG 下游引物:TGATCCTCATGCCAGTCACT
GAPDH	上游引物:TTCAGCTCTGGGATGACCTT 下游引物:TGCCACTCAGAAGACTGTGG

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,GraphPad Prism 9 软件制作统计图。计量资料以均数 ± 标准差表示。行正态性检验,符合正态分布的数据两组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的数据两组间比较采用非参数检验即 Mann-Whitney U 检验。检验水准:α = 0.05。

2 结果

**2.1 各组小鼠眼底图像及临床评分比较** 眼底图像显示:PBS 对照组 EAU 小鼠眼底出现多发性血管炎,血管扩张,视网膜脉络膜出现多发病灶及少量线样病变;50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠眼底发生轻度血管炎,视网膜出现个别局部病灶,无线样病变;100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜局部出现个别病灶,无线样病变(图 1)。PBS 对照组、50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠眼底图像 Caspi 临床评分分别为(1.944 ± 0.808)分、(1.667 ± 0.791)分、(1.667 ± 0.829)分,三组间比较差异无统计学意义(P > 0.05)。

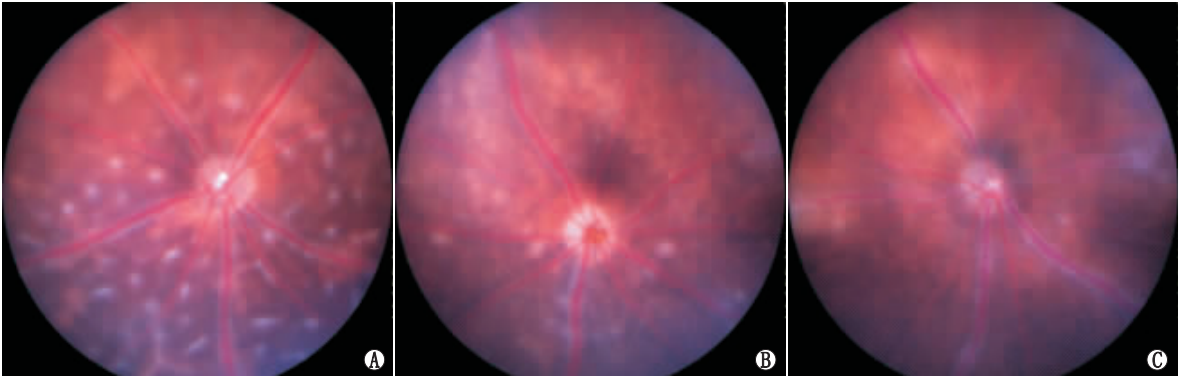


图 1 各组 EAU 小鼠眼底图像 A:PBS 对照组;B:50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组;C:100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组。

**2.2 各组小鼠视网膜组织 HE 染色结果及组织病理学评分比较** HE 染色结果显示:PBS 对照组 EAU 小鼠玻璃体内及视网膜组织中出现大量炎症细胞浸润,视网膜结构部分紊乱,存在大量视网膜皱褶,部分光感受器细胞破坏;50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠玻璃体内及视网膜组织中有少量炎症细胞浸

润;100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织中出现少数炎症细胞浸润(图 2)。PBS 对照组、50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织病理学评分分别为(1.563 ± 1.116)分、(1.063 ± 0.623)分、(1.250 ± 0.655)分,三组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

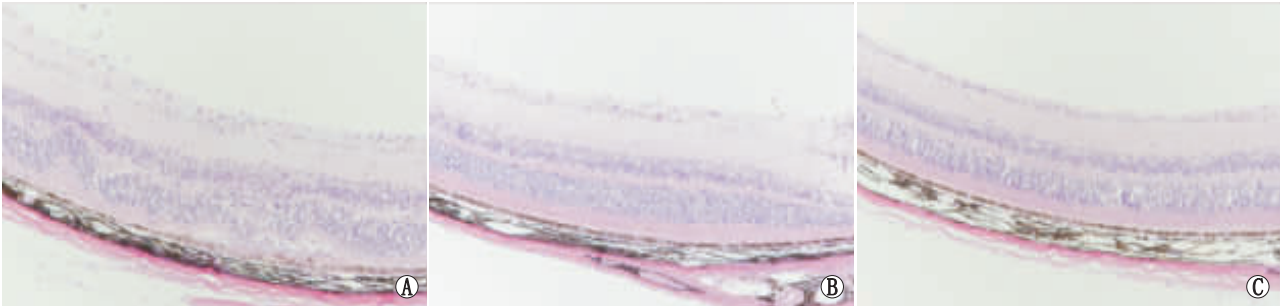


图 2 各组 EAU 小鼠视网膜组织 HE 染色结果(×200) A:PBS 对照组;B:50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组;C:100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组。

**2.3 各组小鼠视网膜组织炎症细胞因子表达情况** 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组和 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠视网膜组织 IL-6、IL-10 mRNA 相对表达量以及 IL-10/IL-

6 比值均高于 PBS 对照组(均为  $P < 0.05$ );100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组小鼠视网膜组织 IL-6、IL-10 mRNA 相对表达量以及 IL-10/IL-6 比值均高于 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组(均为  $P < 0.05$ )(表 2)。

表 2 各组小鼠视网膜组织 IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10 mRNA 相对表达量

组别	mRNA 相对表达量				IL-10/IL-6 比值
	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-10	
PBS 对照组	17.729 0 ± 12.034 2	1.918 9 ± 1.256 7	2.300 3 ± 1.404 0	1.700 1 ± 1.492 6	1.041 1 ± 1.143 6
50 mg · kg <sup>-1</sup> RTX 实验组	18.596 2 ± 5.722 1	4.519 7 ± 2.295 2	7.543 0 ± 2.162 6 <sup>a</sup>	22.652 6 ± 11.174 9 <sup>a</sup>	2.940 7 ± 1.100 1 <sup>a</sup>
100 mg · kg <sup>-1</sup> RTX 实验组	11.425 6 ± 4.449 2	4.581 9 ± 3.582 6	8.055 5 ± 4.919 9 <sup>ab</sup>	27.890 7 ± 24.077 8 <sup>ab</sup>	3.264 8 ± 1.800 4 <sup>ab</sup>

注:与 PBS 对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

葡萄膜炎是一类严重威胁视力的眼病,目前仍有部分难治型非感染性葡萄膜炎患者没有合适的治疗方法。少数临床病例报道 RTX 对葡萄膜炎<sup>[13]</sup>有一定疗效,但缺乏相关基础实验研究的证据。本研究通过构建 EAU 小鼠模型探讨不同剂量的 RTX 在缓解 EAU 炎症中的作用及机制。研究结果显示,腹腔注射 RTX 后,不同剂量 RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织 IL-6、IL-10 mRNA 表达及 IL-10/IL-6 比值均显著升高(均为  $P < 0.05$ ),且 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 IL-6、IL-10 mRNA 表达及 IL-10/IL-6 比值均高于 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组(均为  $P < 0.05$ )。但不同剂量 RTX 实验组 EAU 小鼠眼底临床评分与组织病理学评分差异均无统计学意义,结合视网膜组织 IL-6 与 IL-10 细胞因子水平的变化与 RTX 剂量相关,我们考虑给药剂量与取材时间是影响 EAU 眼底临床表现的主要因素。研究结果显示,腹腔注射 RTX 可调节 EAU 小鼠视网膜组织 IL-10 与 IL-6 之

间的平衡,使 IL-10/IL-6 比值显著升高且与剂量相关,表明 RTX 在改善 EAU 小鼠视网膜组织的炎症性病变中起正向调节作用。

IL-6 由内皮细胞和眼实质细胞产生,可促进巨噬细胞激活和 B 细胞向浆细胞分化,在包括葡萄膜炎在内的多种自身免疫性疾病中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。实验结果显示,腹腔注射 RTX 后 EAU 小鼠视网膜组织 IL-6 mRNA 表达升高,我们考虑这可能与给药方式、给药剂量以及取材时间相关。IL-10 是一种重要的抗炎多功能细胞因子,可由多种免疫细胞分泌,可促进 B 淋巴细胞增殖及抗体分泌,促进非单核细胞依赖性 T 淋巴细胞增殖成熟<sup>[15]</sup>。已有文献证明,IL-10 的产生与疾病的消退有关,提示其在 EAU 病情的缓解中可能具有重要意义<sup>[16]</sup>。Sun 等<sup>[17]</sup>研究发现,在重症肌无力患者中,对 RTX 治疗反应良好的患者体内 B 细胞增殖明显,这些 B 细胞能快速地产 IL-10。Chocova 等<sup>[18]</sup>发现,在抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎中,应用 RTX 治疗的患者在缓解期产生 IL-10 的单核细胞比例会保持稳定。在本研究中,



不同剂量 RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织 IL-10 mRNA 表达均显著高于 PBS 对照组,且 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组 IL-10 mRNA 表达显著高于 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX 实验组,表明 RTX 在 EAU 小鼠的炎症缓解中发挥正向作用。

IL-6 和 IL-10 的表达水平常被用于衡量炎症和抗炎的平衡情况。研究表明,在 HLA-B27 阳性葡萄膜炎患者以及系统性红斑狼疮患者中,IL-6/IL-10 比值与疾病活动程度呈正相关且对患者的预后具有临床指导意义<sup>[14,19]</sup>。Talaat 等<sup>[20]</sup>研究发现,与健康对照组相比,白塞病患者血清中 IL-6/IL-10 比值显著升高。本研究结果显示不同剂量 RTX 实验组 EAU 小鼠视网膜组织 IL-10/IL-6 比值均显著升高,提示 RTX 可通过调节 IL-10/IL-6 比值改善 EAU 小鼠视网膜组织的炎性环境且作用强度与 RTX 剂量相关。

综上所述,我们探讨了不同剂量的 RTX 对 EAU 小鼠的抗炎作用及其机制,结果表明,腹腔注射 RTX 可一定程度缓解 EAU 小鼠视网膜组织的炎性病变,其机制可能与 RTX 提高小鼠视网膜组织 IL-10/IL-6 比值有关。

## 参考文献

- [1] CHEN N, CHEN S, ZHANG Z, CUI X, WU L, GUO K, *et al.* Overexpressing kallistatin aggravates experimental autoimmune uveitis through promoting Th17 differentiation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 756423.
- [2] CHEN Y, LI Z, LI H, SU W, XIE Y, PAN Y, *et al.* Apremilast regulates the T<sub>H</sub>17/Treg balance to ameliorate uveitis via PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 581673.
- [3] WILDNER G, DIEDRICHS-MÖHRING M. Resolution of uveitis [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(6): 727-736.
- [4] AL-ANI M R, RAJU T K, HACHIM M Y, HACHIM I Y, EL-EMAM N M, GUIMEI M, *et al.* Rituximab prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): comparison with prophylactic, therapeutic or combinational regimens [J]. *J Inflamm Res*, 2020, 13: 151-164.
- [5] FREIDLIN J, WONG I G, ACHARYA N. Rituximab treatment for peripheral ulcerative keratitis associated with Wegener's granulomatosis [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(10): 1414.
- [6] HUERVA V, SANCHEZ M C, TRAVESET A, JURJO C, RUIZ A. Rituximab for peripheral ulcerative keratitis with Wegener's granulomatosis [J]. *Cornea*, 2010, 29(6): 708-710.
- [7] TAPPEINER C, HEINZ C, SPECKER C, HEILIGENHAUS A.

- Rituximab as a treatment option for refractory endogenous anterior uveitis [J]. *Ophthalmic Res*, 2007, 39(3): 184-186.
- [8] MISEROCCHI E, PONTIKAKI I, MODORATI G, BANDELLO F, MERONI P L, GERLONI V. Rituximab for uveitis [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(1): 223-224.
  - [9] HICKMAN R A, DENNISTON A K, YEE C S, TOESCU V, MURRAY P I, GORDON C. Bilateral retinal vasculitis in a patient with systemic lupus erythematosus and its remission with Rituximab therapy [J]. *Lupus*, 2010, 19(3): 327-329.
  - [10] SADREDDINI S, NOSHAD H, MOLAEFARD M, NOSHAD R. Treatment of retinal vasculitis in Behçet's disease with rituximab [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3): 306-308.
  - [11] MUHAMMAD F, AVALOS P N, MURSALIN M H, MA J X, CALLEGAN M C, LEE D J. Kallistatin attenuates experimental autoimmune uveitis by inhibiting activation of T cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 975.
  - [12] AGARWAL R K, SILVER P B, CASPI R R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 900: 443-469.
  - [13] LASAVE A F, YOU C, MA L, ABUSAMRA K, LAMBA N, VALDES NAVARRO M, *et al.* Long-term outcomes of Rituximab therapy in patients with noninfectious posterior uveitis refractory to conventional immunosuppressive therapy [J]. *Retina*, 2018, 38(2): 395-402.
  - [14] KUMAR A, SHARMA S P, AGARWAL A, GUPTA V, KATOCH D, SEHGAL S, *et al.* Tear IL-6 and IL-10 levels in HLA-B27-associated uveitis and its clinical implications [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2021, 29(2): 237-243.
  - [15] 李茂新, 寸向农, 杨开明. 免疫抑制因子 IL-10 在肝脏疾病中的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(9): 1528-1529.
  - [15] LI M X, CUN X N, YANG K M. Research progress of immunosuppressive factor IL-10 in liver diseases [J]. *J Pract Med*, 2009, 25(9): 1528-1529.
  - [16] OOI K G, GALATOWICZ G, CALDER V L, LIGHTMAN S L. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype [J]. *Clin Med Res*, 2006, 4(4): 294-309.
  - [17] SUN F, LADHA S S, YANG L, LIU Q, SHI S X, SU N, *et al.* Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to Rituximab in myasthenia gravis [J]. *Muscle Nerve*, 2014, 49(4): 487-494.
  - [18] CHOCOVA Z, HRUSKOVA Z, MARECKOVA H, SVOBODOVA B, DUSKOVA D, BEDNAROVA V, *et al.* Rituximab use in patients with ANCA-associated vasculitis: clinical efficacy and impact on immunological parameters [J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(1): 107-115.
  - [19] JIN S, YU S, YU B. Changes of serum IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical value [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4): 2867-2874.
  - [20] TALAAT R M, SIBAI H, BASSYOUNI I H, EL-WAKKAD A. IL-17, IL-10, IL-6, and IFN- $\gamma$  in Egyptian Behçet's disease: correlation with clinical manifestations [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2019, 30(1): 15-22.

## Anti-inflammatory effect and mechanism of Rituximab on mice with experimental autoimmune uveitis

LIU Xiaorui<sup>1</sup>, YANG Shufang<sup>1</sup>, ZENG Zheng<sup>2</sup>, DING Ranran<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>, YOU Caiyun<sup>1</sup>

1. Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

2. Department of Neurosurgeon, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: YOU Caiyun, E-mail: youcaiyun@126.com

**[Abstract] Objective** To investigate the anti-inflammatory effect of Rituximab (RTX) on experimental autoimmune uveitis (EAU) mice and its mechanism. **Methods** A total of 27 healthy female C57BL/6J mice aged 6 to 8 weeks in specific pathogen-free grade were selected and the EAU mouse model was established using interphotoreceptor retinoid-binding protein 1-20 (IRBP<sub>1-20</sub>). EAU mice were randomly divided into the phosphate-buffered saline (PBS) control group, 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group and 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group, with 9 mice in each group. Mice in the PBS con-

trol group were intraperitoneally injected with PBS, while mice in the 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group and 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group were intraperitoneally injected with 50 mg RTX and 100 mg RTX per kg body weight, respectively. At 21 d after the modeling, fundus images of mice in each group were collected and hematoxylin-eosin (HE) staining slices of retinal tissue were prepared. Fundus images of mice in each group were collected by a small animal retinal imager and inflammation scores were obtained according to Caspi clinical scoring criteria. HE staining slices were observed and photographed under a microscope, and the score was made according to the Caspi histopathological scoring criteria. The relative messenger ribonucleic acid (mRNA) expressions of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 and IL-10 in the retinal tissues of mice in each group were detected by real-time quantitative PCR. SPSS 21.0 software was used for statistical analysis.

**Results** Fundus images showed that the EAU mice in the PBS control group presented multiple vasculitis and vasodilatation in the fundus, as well as multiple lesions and a few linear lesions in the retinal choroid. The EAU mice in the 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group showed mild vasculitis in the fundus, a few local lesions and no linear lesions in the retina. The EAU mice in the 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group showed a few local retinal lesions and no linear lesions in the retina. The Caspi clinical scores in fundus images of EAU mice in the PBS control group, 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group and 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group were (1.944 ± 0.808) points, (1.667 ± 0.791) points and (1.667 ± 0.829) points, with no significant difference ( $P > 0.05$ ). The retinal histopathological scores of EAU mice in the PBS control group, 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group and 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group were (1.563 ± 1.116) points, (1.063 ± 0.623) points and (1.250 ± 0.655) points, with no significant difference ( $P > 0.05$ ). The results of real-time quantitative PCR showed that the relative mRNA expressions of IL-6 and IL-10 and the IL-10/IL-6 ratio in the retinal tissue of mice in the 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group and 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group were higher than those of the PBS control group (all  $P < 0.05$ ); the relative mRNA expressions of IL-6 and IL-10 and the IL-10/IL-6 ratio of mice in the 100 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group were higher than those of the 50 mg · kg<sup>-1</sup> RTX experimental group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Intraperitoneal injection of RTX can alleviate the inflammatory lesions in the retinal tissue of EAU mice to a certain extent, and the mechanism may be related to the increase of IL-10/IL-6 ratio in the retinal tissue.

**[Key words]** experimental autoimmune uveitis; Rituximab; interleukin-6; interleukin-10