DOI:10.16016/j.1000-5404.202010079

Nogo66 蛋白复合物对慢性高眼压大鼠视网膜微环境的影响

程 茗*,贺翔鸽 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院眼科

[摘要] **目的** 探讨 Nogo66 蛋白复合物对慢性高眼压大鼠视网膜微环境的影响。**方法** 用 532-二极管激光制备慢性高眼压大鼠模型,每只实验大鼠右眼为模型眼,左眼为对照眼。将造模成功的 18 只大鼠分为两组,分别接种 Nogo66 蛋白复合物和卵清蛋白复合物($n=9$),荧光金逆行标记视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)计数,免疫荧光法及免疫组化法观察视网膜 GAP43、CD3、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)表达,Western blot 检测视网膜 BDNF、GDNF 蛋白表达。**结果** 慢性高眼压大鼠 RGCs 计数显著低于对照组大鼠($P<0.01$),接种 Nogo66-FA 复合物后,RGCs 数量有所增加,显著高于对照组($P<0.05$);且视网膜节细胞层和外丛状层有大量 GAP43 和 CD3 表达,视网膜节细胞层、内丛状层和内核层大量表达 BDNF 和 GNDF,视网膜 BNDF、GDNF 蛋白表达量显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** 接种 Nogo66 蛋白复合物后,慢性高眼压模型大鼠视网膜微环境改善,T 细胞及多种神经营养因子表达上调,RGCs 数量增加。

[关键词] Nogo66;高眼压;视网膜;T 细胞;神经营养因子
[中图法分类号] R339.146; R392.13; R774.6 [文献标志码] A

Effect of protein complex Nogo66-FA on retinal microenvironment in rats with chronic intraocular hypertension

CHENG Ming, HE Xiangge Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of protein complex, Nogo66 and Freund's adjuvant (FA), on retinal microenvironment in rats with chronic ocular hypertension. **Methods** After the rat model of chronic high intraocular pressure was established on the right eye (the left eye served as control) with the aid of 532-diode laser, the 18 model rats were equally divided into Nogo66 and ovalbumin groups, receiving vaccination with corresponding agent of 100 μg (in 300 μL FA) on the 1st, 7th and 14th days. The retinal ganglion cells (RGCs) were counted after retrograde labelling with fluorescent gold. The retinal expression of CD3, growth associated protein 43 (GAP43), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) were observed by immunofluorescence assay and immunohistochemical staining, and the protein levels of retinal BDNF and GDNF were detected by Western blotting. **Results** The count of RGCs was significantly lower in the right eyes with chronic ocular hypertension than the left eyes ($P<0.01$). Inoculation of Nogo66-FA complex resulted in significantly larger number of RGCs when compared with the rats from the ovalbumin group ($P<0.05$). In addition, GAP43 and CD3 were highly expressed in the ganglion cell layer and the outer plexus layer, and BDNF and GNDF in the ganglion cell layer, the inner plexus layer and the inner core layer. The protein levels of BNDF and GDNF in the retina were significantly higher in the Nogo66-FA group than the ovalbumin group ($P<0.05$). **Conclusion** Inoculation of protein complex Nogo66-FA can improve the retinal microenvironment and the activation of T cells, up-regulate the expression of various neurotrophic factors, and increase the count of RGCs in the rat model of chronic ocular hypertension.

[**Key words**] Nogo66; ocular hypertension; retina; T cells; neurotrophic factor

Corresponding author: HE Xiangge, E-mail: he_xiangge@sina.com

[通信作者] 贺翔鸽,E-mail:he_xiangge@sina.com
* 现工作单位为重庆佑佑宝贝妇儿医院眼科

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Nogo 是一种髓磷脂蛋白,可抑制中枢神经损伤后再生。研究表明:使用抗 Nogo 单克隆抗体 IN-1 能明显促进神经突起生长,通过主动接种髓磷脂衍生蛋白可促进轴突再生[1-2]。Nogo 复合物也有类似的作用[3]。但这种保护作用的机制尚不清楚。有研究表明视神经损伤后在受损部位有短暂的内源性 T 细胞聚集[4],被动转移髓磷脂反应性 T 细胞可减轻视神经继发性退行性变,提高视神经节细胞的存活率和视神经的传导程度[5]。通过髓磷脂蛋白主动免疫也同样有神经保护作用,可显著促进神经功能恢复[6-7]。髓鞘或脊髓匀浆复合物可使脊髓损伤的大鼠长距离轴突再生,且髓鞘免疫组再生轴突数目和再生范围远超过抗体组,免疫组除了解剖再生外还有更好的功能恢复[8]。表明使用髓磷脂复合物接种较被动转移髓磷脂特异性抗体更能促进 CNS 受损神经元修复再生。我们在前期工作中分离、表达、纯化了 Nogo66 蛋白,并制备成复合物,证实了 Nogo66 蛋白具有免疫原性[9]。本研究拟建立慢性高眼压模型,探讨 Nogo66 蛋白复合物对视网膜视神经损伤的免疫保护作用机制,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 主要试剂 包括:Nogo66 蛋白(本室表达纯化[10]),弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant,CFA)和复视不完全佐剂(incomplete freund's adjuvant,IFA)(Sigma,美国),刀豆蛋白 A(ConA)(Sigma,美国),Rabbit anti-rat GAP43、Rabbit anti-rat CD3、Rabbit anti-rat BDNF(Abcam,美国),Rabbit anti-rat GDNF(Santa Cruz Biotechnology,美国),荧光金 FG(Sigma,美国)。

1.1.2 主要仪器 包括:Zeiss 光学手术显微镜(Zeiss,德国),532-二极管激光(Alcon,美国),光学生物显微镜(Olympus CH20,日本),Tono-PenXL 眼压计(Medtronic SALON,美国),全光谱激光共聚焦显微镜(Nikon,日本)。

1.2 动物模型的建立

选择正常成年 SD 大鼠 18 只,8~10 周龄,体质量 200~220 g,雌雄不拘,由本院实验动物中心提供[许可证号:SCXK(渝)20020003]。建立慢性高眼压大鼠模型:用 532-二极管激光对 SD 大鼠右眼经角膜缘行小梁网及颞上、颞下巩膜浅层静脉血管激光光凝。TONO-PenXL 眼压计检测眼压。激光光凝后,每周再次测眼压,持续 1 周眼压超过 21 mmHg 认为造模成功。左眼为对照眼。

1.3 Nogo66 蛋白复合物接种

将本室表达纯化的 Nogo66 蛋白溶液与 CFA 或 IFA 按 1∶1体积比例混合,反复碾磨使之完全乳化,4 ℃保存备用。以相同的方法制备卵清蛋白(ovalbumin,OVA)弗氏佐剂复合物。将造模成功的慢性高眼压大鼠均分为 2 组:Nogo66 蛋白弗氏佐剂复合物组(Nogo66-FA 组)和卵清蛋白弗氏佐剂复合物组(OVA-FA 组),每组 9 只。Nogo66-FA 组给予 Nogo66 蛋白弗氏佐剂复合物 300 μL(含 Nogo66 蛋白 100 μg)接种于四肢皮下,于第 7 天和第 14 天各加强接种 1 次,共 3 次。OVA-FA 组以相同策略分别接种相同卵清蛋白复合物。

1.4 主要检测指标及方法

1.4.1 荧光金逆行标记视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs) 于末次接种后 2 周分别取两组实验大鼠各 2 只,麻醉动物并固定于立体定位仪上,消毒、沿颅顶中线切开皮肤,30%双氧水涂抹颅骨骨缝,辨认 Bregma 点。按 Paxinos 大鼠脑立体定位图谱确定上丘及外侧膝状体的位置[3]。用牙科钻钻开颅骨。通过微量进样器向双侧上丘及外侧膝状体分别缓慢注入 2% FG 1 μL,2 min 内注射完。人工骨粉封闭骨孔,缝合皮肤。肌注青霉素 10 万单位。7 d 后左心室-主动脉插管,生理盐水和 4%多聚甲醛 250 mL 灌注后,分别取出左右眼球。沿角巩膜缘剪去角膜,去除晶状体、玻璃体,再置于 4%多聚甲醛液中固定过夜。仔细剥离视网膜,以玻璃体面朝上,将其平铺于多聚赖氨酸处理的载玻片上。75%甘油封片。在荧光显微镜下(激发波长 323 nm)观察视网膜神经节细胞,并采集图片,使用 spot(Diagnostic Instruments. Inc, version 3.5.2)软件对每张图片单位面积内的 FG 标记 RGCs 进行细胞计数。

1.4.2 免疫荧光观察 GAP43、CD3、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)在视网膜中的表达 于末次接种后 2、4、6 周分别取两组实验大鼠各 2 只,3%戊巴比妥钠以 1.3/kg 行大鼠腹腔注射麻醉。左心室-主动脉插管,生理盐水和 4%多聚甲醛 250 mL 灌注,分别取出左右眼球,用 OCT 胶包埋速冻后,冰冻切片,厚度为 10 μm。倾掉固定液,4 ℃保存。0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 5 min×3 次。0.1%Triton X-100 通透 10 min,0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 3 次,每次 5 min,或 0.01 mol/L 枸橼酸盐(pH=6.0),92 ℃ 15 min,自然冷却,0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 3 次,每次 5 min。5%BSA 封闭 15 min,倾掉。滴加 1∶300 倍稀释的第一抗体,4 ℃过夜,0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 5 min×

3 次。滴加 1∶200 倍稀释二抗,37 ℃培养箱 1 h,0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 3 次,每次 5 min。滴加 DAPI 显色剂工作液室温 1 min,0.1 mol/L PBS(pH 值:7.2~7.6)洗 3 次,每次 5 min。抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜镜检。

1.4.3 免疫组化观察 GAP43、CD3、BDNF、GDNF 在视网膜的表达 于末次接种后 2、4、6 周分别取两组实验大鼠各 2 只,同前多聚甲醛 250 mL 灌注后,取左右眼球,浸入 4%多聚甲醛固定 48 h。将固定好的标本蒸馏水稍洗,修成大约 2.0 cm×2.0 cm×0.2 cm 的组织块,脱水透明包埋:70%乙醇 4 h→80%乙醇 4 h→95%乙醇 2 h→95%乙醇 2 h→无水乙醇 1 h 20 min→无水乙醇 2 h 20 min→二甲苯 1∶1无水乙醇 10 min→二甲苯 30 min→二甲苯 30 min→60 ℃熔点石蜡 10 min→62 ℃熔点石蜡 15 min→62 ℃熔点石蜡 1 h→包埋,蜡块自然冷却后,修掉标本周围多余的蜡,贴上标本对应的标签于蜡块正上方。蜡块稍冻,3~5 μm 切片,62 ℃烤箱烘烤 1 h。脱蜡至水:二甲苯 10 min,二甲苯 10 min,100%乙醇 2 min,95%乙醇 2 min,80%乙醇 2 min,自来水洗 1 min,蒸馏水洗 1 min。将盛有 0.01 mol/L(pH=6.0)柠檬盐溶液加热至沸腾(98~100 ℃),切片放入进行抗原修复,其中继续加热 10 min。置室温下自然冷却 20 min。PBS 洗 5 min×3 次,每片滴加 50 μL 过氧化酶阻断剂,以阻断内源性过氧化物酶活性,室温孵育 10 min。5% BSA 封闭 15 min,倾掉。滴加 50 μL GAP-43 第一抗体,4 ℃冰箱过夜。PBS 洗 5 min×3 次,每片滴加 50 μL 生物素标记的二抗,37 ℃温箱孵育 10 min。PBS 洗 5 min×3 次,每片滴加 50 μL 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37 ℃温箱孵育 10 min。PBS 洗 5 min×3 次;每片滴加 100 μL 新鲜配制的 DAB+H_2O_2 溶液,显色 5 min;流水冲洗,苏木精复染 3 min,自来水洗,0.6%盐酸酒精分化 15 s,自来水冲洗 15 min。梯度酒精干燥脱水:80%乙醇 2 min,95%乙醇 2 min,100%乙醇 2 min,100%乙醇 2 min。透明:二甲苯 10 min,二甲苯 10 min。中性树胶封片。显微镜下观察。

1.4.4 Western blot 检测视网膜 BDNF、GDNF 蛋白表达 同前多聚甲醛 250 mL 灌注后,取左右眼球,剥离视网膜,研磨成匀浆,蛋白变性,SDS PAGE 电泳,一抗(兔抗大鼠 BDNF,兔抗大鼠 GDNF)4 ℃摇床孵育过夜,TBST 漂洗;二抗(FITC 山羊抗兔 IgG,CY3 兔抗山羊 IgG,CY3 山羊抗兔 IgG)室温摇床孵育 2 h,TBST 漂洗;PVDF 膜曝光。

1.5 统计学分析

应用 Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析软件处理免疫组化图片;使用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,两组之间数据采用成组比较 t 检验或 t' 检验,检验水准:$\alpha=0.05$。

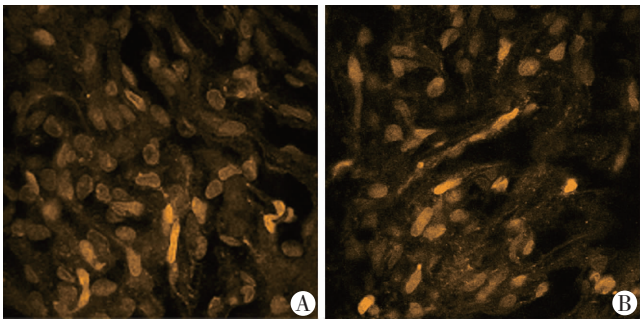
2 结果

2.1 实验组和对照组眼压比较

532-激光造模前,实验组和对照组眼压无明显差别。激光造模后第 3 天,实验组眼压开始升高,但仍<21 mmHg,在正常范围之内。此后持续缓慢升高。1 周时超过 21 mmHg,与对照组眼压比较差异有统计学意义($P<0.05$)。第 4 周时达最高峰,到 12 周时眼压未见明显下降,与对照组比较眼压差异有统计学意义($P<0.05$)。整个观察过程中对照组眼压在正常范围,未见明显波动(表 1)。

2.2 Nogo66-FA 复合物接种后 RGCs 数量增加

接种 Nogo66 蛋白复合物后,慢性高眼压大鼠 RGCs 单位面积计数为(1 839.30±62.46),虽然仍低于对照组大鼠($t=4.685$,$P<0.001$),但高于 OVA-FA 组单位面积计数(1 721.19±57.53),差异有统计学意义($t=1.492$,$P=0.039$,图 1)。



A:接种 Nogo66-FA 复合物后慢性高眼压大鼠 RGCs 逆行 FG 染色(×1 000);B:接种 OVA-FA 复合物后慢性高眼压大鼠 RGCs 逆行 FG 染色(×1 000)

图 1 接种不同蛋白复合物后 RGCs 逆行 FG 染色

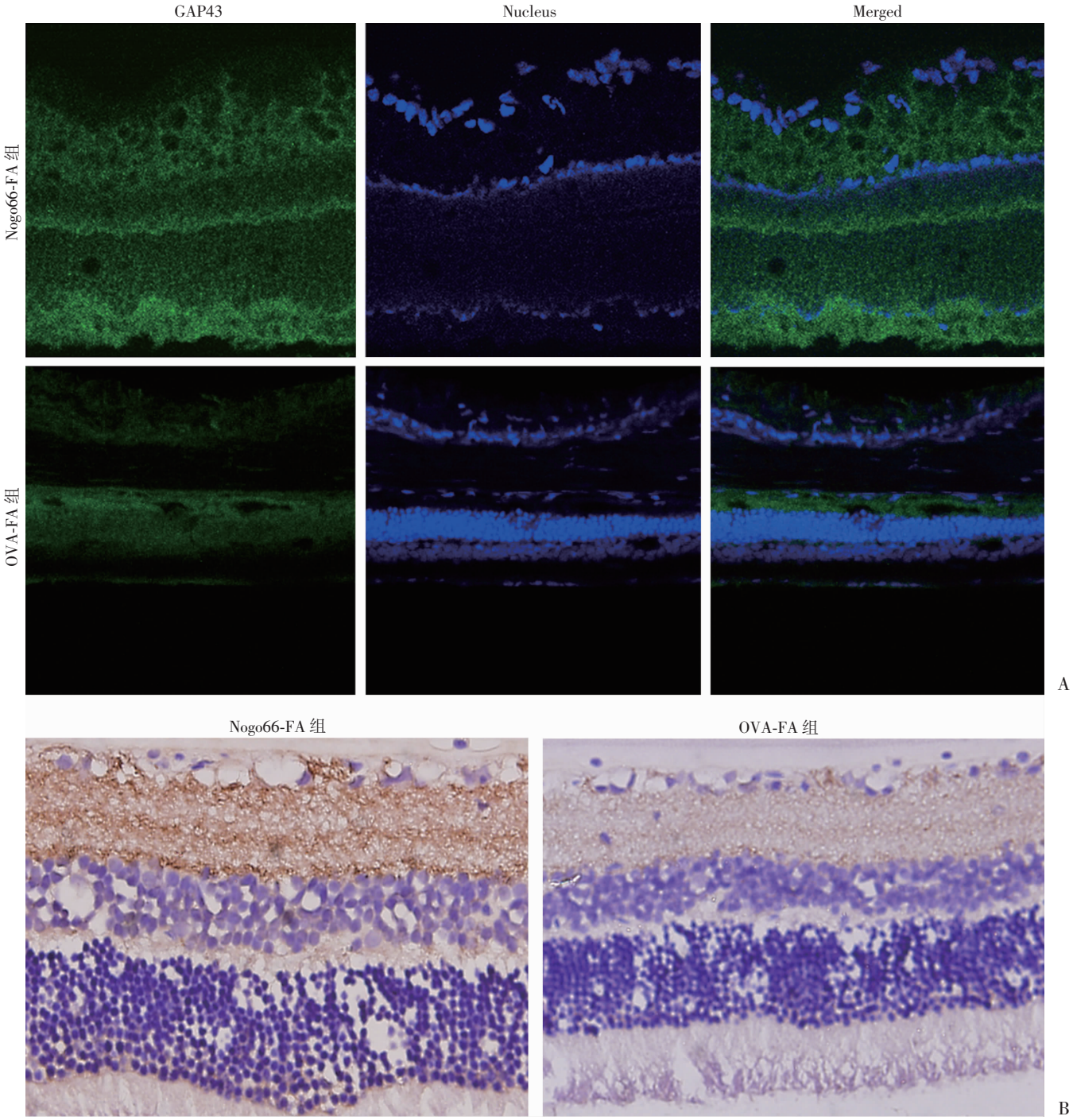
表 1 532-激光造模后不同时间点实验组及对照组 SD 大鼠的眼压值变化(mmHg,$n=18$,$\bar{x}\pm s$)

组别	激光前	激光后 3 d	激光后 1 周	激光后 4 周	激光后 8 周	激光后 12 周
对照组	16.8±3.9	17.1±3.2	16.2±3.3	17.1±3.0	17.4±2.8	16.2±3.7
实验组	17.0±3.2	19.6±4.0	21.5±3.7[a]	24.8±3.2[a]	23.1±3.4[a]	20.8±2.1[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

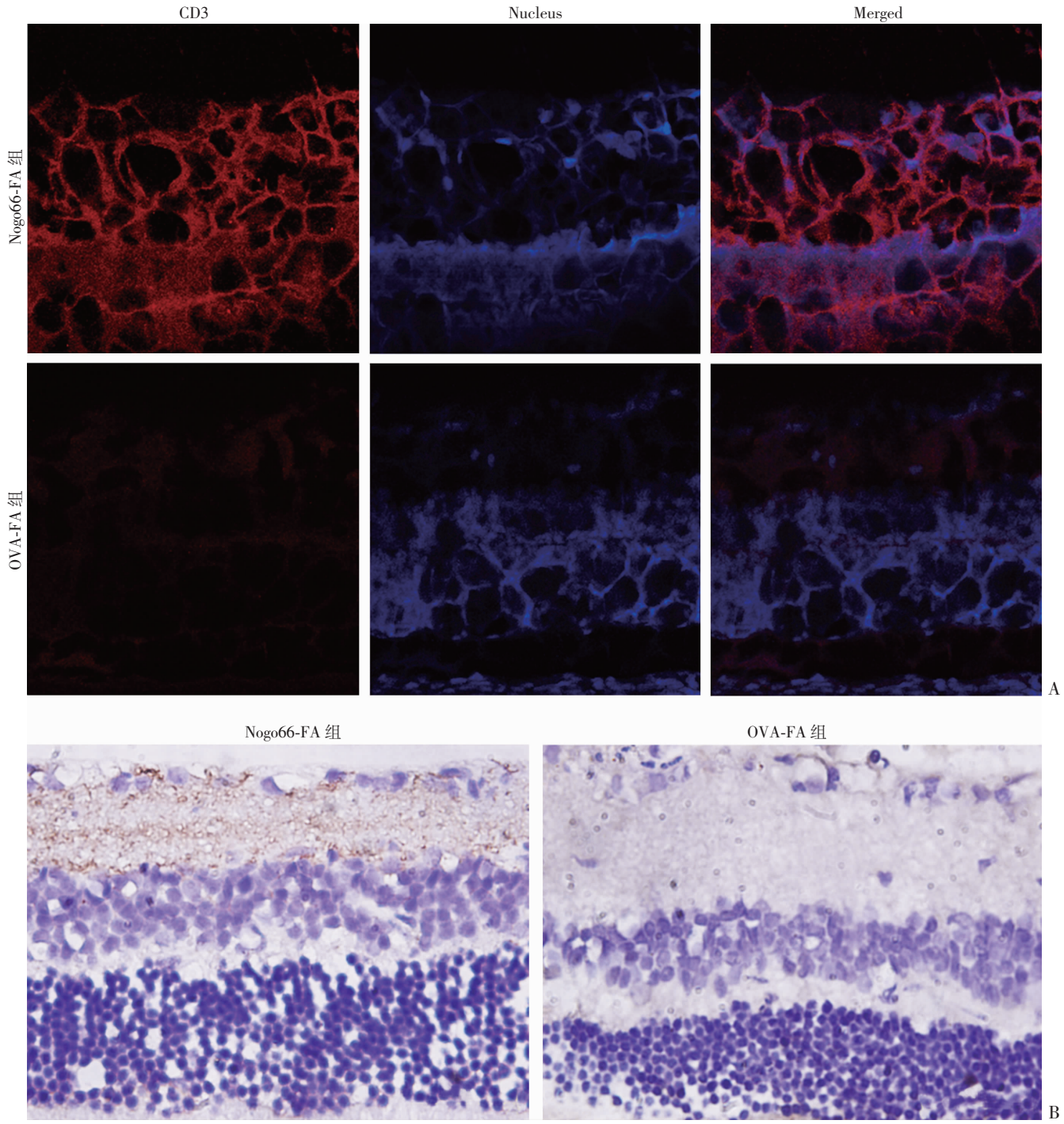
2.3　Nogo66-FA 复合物接种后视网膜 GAP43、CD3 表达上调

慢性高眼压模型大鼠 Nogo66-FA 组视网膜有大量 GAP43 表达,主要在节细胞层和外丛状层,内核层、外丛状层和外核层亦有少量表达;OVA-FA 组仅有外丛状层有少量表达(图 2)。Nogo66-FA 组视网膜节细胞层和外丛状层有 CD3 表达;OVA-FA 组视网膜未见明显 CD3 表达(图 3)。



A:免疫荧光观察两组大鼠视网膜 GAP-43 表达(激光共聚焦显微镜×400);B:HE 染色观察两组大鼠视网膜 GAP-43 表达(×400)

图 2　接种不同蛋白复合物后 GAP43 在大鼠视网膜的表达

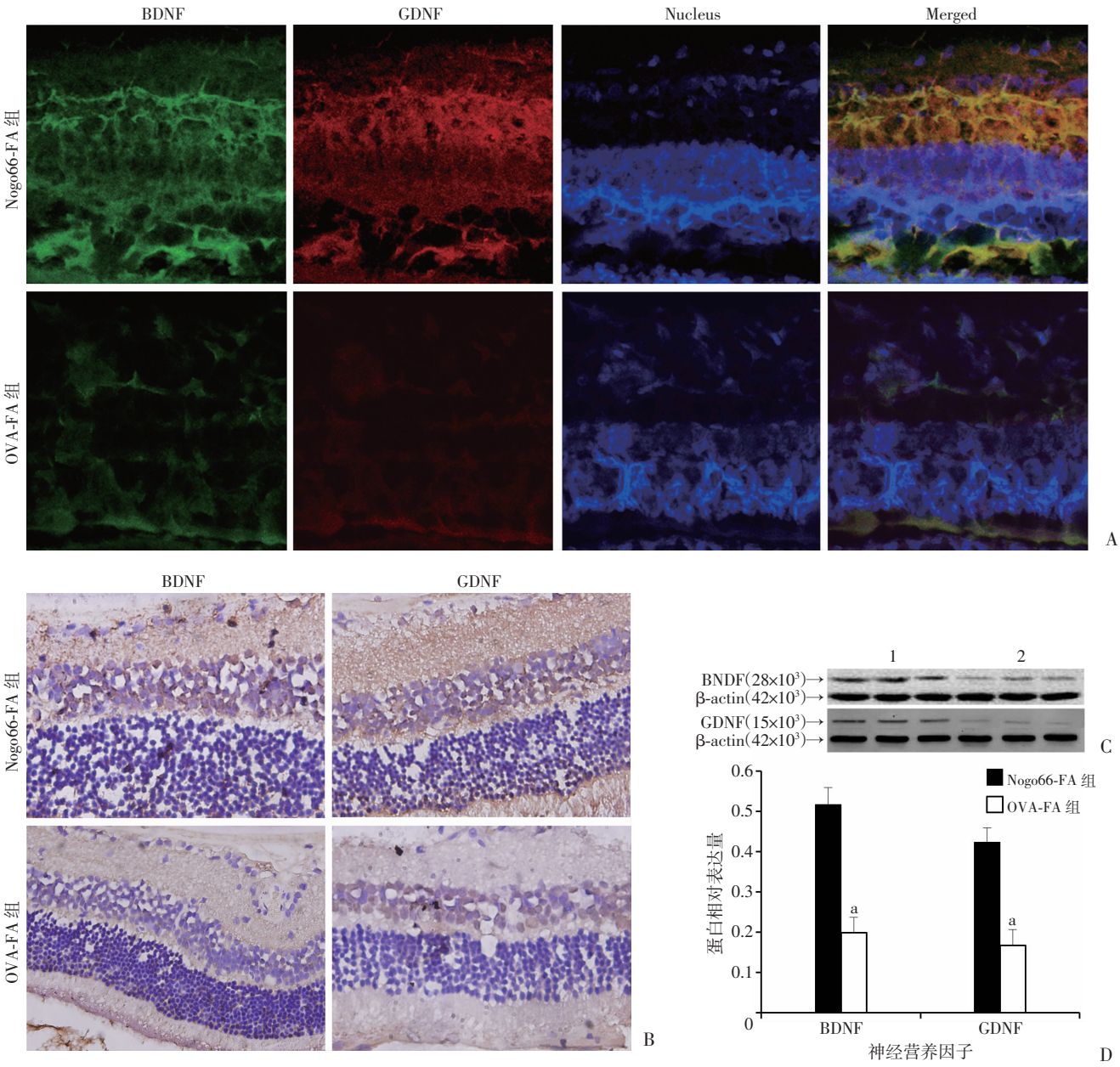


A:免疫荧光观察两组大鼠视网膜 CD3 表达(激光共聚焦显微镜×400);B:HE 染色观察两组大鼠视网膜 CD3 表达(×400)

图 3 接种不同蛋白复合物后 CD3 在大鼠视网膜的表达

2.4 Nogo66-FA 复合物接种后视网膜 BDNF、GDNF 表达上调

慢性高眼压模型大鼠 Nogo66-FA 组视网膜各层大量表达 BDNF 和 GNDF,主要分布在节细胞层、内丛状层和内核层;OVA-FA 组视网膜可见少量 BDNF 和 GNDF 表达,主要分布在内核层。Western blot 结果亦显示 Nogo66-FA 组视网膜 BNDF、GDNF 蛋白表达显著高于 OVA-FA 组($P<0.01$,图 4)。



A:免疫荧光观察两组大鼠视网膜 BDNF 和 GDNF 表达(激光共聚焦显微镜×400);B:HE 染色观察两组大鼠视网膜 BDNF 和 GDNF 表达(×400);C: Western blot 检测实验两组大鼠视网膜 BDNF 和 GDNF 表达　1:Nogo66-FA 组;2:OVA-FA 组;D:半定量分析(n=6)　a: P<0.01,与 Nogo66-FA 组比较

图 4　接种不同蛋白复合物后大鼠视网膜 BDNF、GDNF 的表达

3　讨论

慢性高眼压动物模型的建立是研究青光眼相关视网膜视神经损害所必需的,目前有多种造模方式,以破坏小梁结构[11]为主,另外还有在角膜缘植入硅胶环[12-13],或者直接缝合房角[14]等方法,目的均为通过阻止房水外流来升高眼压,眼压升高且维持一段时间是鉴定造模成功的主要指标[11]。本研究使用 523 激光破坏小梁组织来达到眼压升高的目的,损伤小,易操作,造模成功率较高。

中枢神经系统(central nervous system,CNS)损伤后的再生修复一直是困扰医学界的世界性难题。胚胎时期的 CN 具有良好的再生性,但成熟的 CN 在损伤后却几乎无再生能力,其原因可能有两个:一是 CNS 神经元自身缺乏足够的再生能力;二是 CNS 神经元所生存的外部微环境中各种外源性生长促进性和抑制性因子的影响。目前认为外部微环境起主要作用。CNS 中许多阻断轴突再生的抑制分子与髓磷脂有关,已确认的有 Nogo、髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白

(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp),它们被证实与相同的神经元受体 NgR 结合而发出抑制信号。目前一致认为 Nogo 具有最强的抑制作用[15]。

本研究将 Nogo66 蛋白复合物接种于慢性高眼压模型大鼠后,考察其视网膜微环境改变。发现慢性高眼压模型大鼠接种 Nogo66 蛋白复合物后视网膜均有明显 T 细胞浸润,考虑弗氏佐剂有一定的免疫增强作用,同时发现视网膜 RGCs 存活率明显高于对照组,视网膜局部神经营养因子表达上调,可能是视网膜局部浸润的 T 细胞影响所致,这种微环境的变化对受损的视网膜视神经有一定的保护作用,这个结论和国外报道一致[16-17]。T 细胞的浸润可能与视网膜视神经损伤后血视网膜外屏障功能改变和视网膜血管渗透率改变有关。前期实验已证实,Nogo66 蛋白复合物接种后,可刺激动物机体特异性 IgG 抗体增殖和 T 细胞活化,并产生以细胞免疫为主的自身免疫反应[9]。研究表明:损伤时 CNS 存在很弱的自身免疫神经保护作用,被动转移自身免疫性 T 细胞可增强这种保护作用[18]。据此可以推测,在视网膜视神经受损的病理情况下,视网膜血管通透率增高,T 细胞进入视网膜并在受损部位聚集,可能增强了视网膜局部受损的神经细胞的自我修复。

目前对自身免疫 T 细胞的神经保护作用机制尚了解不多。自身免疫 T 细胞的神经保护作用可能主要是拯救那些逃脱了原发性损伤的濒危神经元,减轻损伤引起的继发性损害[19-20]。其依据有:①从损伤到恢复的时间较短,尚不足以形成再生;②对完全横断的脊髓损伤几乎无保护作用;③形态学和影像学研究显示组织结构近似于正常组织,而非新生组织[21]。

有研究证实:聚集的自身反应性 T 细胞分泌多种细胞因子和神经生长因子,在 T 细胞介导的神经保护作用中很明确地起到了重要作用[22-23]。不同抗原特异性 T 细胞可表达神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3 (NT-3)和神经营养因子- 4/5(NT-4/5)的 mRNA 和蛋白[24],神经营养因子可改善受损神经元局部微环境,促进神经元再生修复。本研究亦发现 Nogo66 蛋白复合物接种实验大鼠后,视网膜局部多种神经营养因子如 BDNF、GDNF 表达上调,这改善了受损视网膜神经元周围微环境,为促进受损神经元再生提供了良好了条件,可能为视网膜视神经损伤后 RGCs 再生修复的机制之一。

另外,在分子水平,神经发育和再生时轴突的生长与一组生长相关蛋白(growth-associated proteins, GAPs)的表达有关,GAP43 是其中重要成员,主要影响神经发育和再生轴突的生长能力[25],其参与突触重建过程,能调节神经元对轴突引导信号的反应,通过引导轴突生长和调节新连接形成而影响轴突生长能力[26],即使在缺乏其他营养因子时,GAP43 也能使神经元发出新的终末[27]。所以 GAP43 被认为是神经元生长期的内在决定因子,可作为神经再生的标志。本研究发现 Nogo66 蛋白复合物接种后慢性高眼压大鼠视网膜局部节细胞层和外丛状层 GAP43 表达增多,提示视网膜神经节细胞轴突再生活跃。有研究表明神经营养因子可刺激神经轴突 GAP43 表达上调,故而推测实验大鼠视网膜局部 GAP43 表达增多可能与视网膜神经营养因子表达上调有关。局部微环境的改善和 GAP43 表达上调可能是慢性高眼压大鼠 RGCs 再生活跃的原因之一。

本研究初步探讨了 Nogo66 蛋白复合物促进慢性高眼压大鼠视网膜神经细胞再生修复的机制,但慢性高眼压损伤后,视网膜局部 GAP43 是通过何种机制表达增加的?是否与局部聚集的 T 细胞和表达上调的神经营养因子有关?局部表达增多的神经营养因子是否由局部聚集的 T 细胞直接分泌而来?总之,各种因子变化的相关性尚需进一步实验证实。

参考文献:

[1] SEKINE Y, LINDBORG J A, STRITTMATTER S M. A proteolytic C-terminal fragment of Nogo-A (reticulon-4A) is released in exosomes and potently inhibits axon regeneration [J]. J Biol Chem, 2020, 295(8): 2175-2183. DOI:10.1074/jbc.ra119.009896.

[2] DE LA VEGA GALLARDO N,DITTMER M,DOMBROWSKI Y, *et al*. Regenerating CNS myelin: Emerging roles of regulatory T cells and CCN proteins[J]. Neurochem Int, 2019, 130: 104349. DOI:10.1016/j.neuint.2018.11.024.

[3] BOURQUIN C, VAN DER HAAR M E, ANZ D, *et al*. DNA vaccination efficiently induces antibodies to Nogo-A and does not exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 588(1): 99-105. DOI:10.1016/j.ejphar.2008.04.026.

[4] SOMMER C, LEINDERS M, ÜÇEYLER N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain[J]. Pain, 2018, 159(3): 595-602. DOI:10.1097/j.pain.0000000000001122.

[5] PENG W. Neuroprotective effects of G-CSF administration in microglia-mediated reactive T cell activation *in vitro* [J]. Immunol Res, 2017, 65(4): 888-902. DOI: 10.1007/s12026-017-8928-9.

[6] LOMBARDI M, PAROLISI R, SCARONI F, *et al*. Detrimental and protective action of microglial extracellular vesicles on myelin lesions: astrocyte involvement in remyelination failure[J]. Acta Neuropathol, 2019, 138(6): 987-1012. DOI:10.1007/s00401-019-02049-1.

[7] BUSTO R, SERNA J, PERIANES-CACHERO A, *et al*. Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Biochim et Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids, 2018, 1863(9): 958-967. DOI:10.1016/j.bbalip.2018.05.009.

[8] STADELMANN C, TIMMLER S, BARRANTES-FREER A, *et al*. Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology[J]. Physiol Rev, 2019, 99(3): 1381-1431. DOI:10.1152/physrev.00031.2018.

[9] 程茗, 肖虹, 贺翔鸽. Nogo66蛋白疫苗接种对大鼠免疫应答的影响[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(5): 630-632. DOI: 10.3579/j.pmj.2009.05.630.
CHENG M, XIAO H, HE X G. Effects of inoculating Nogo66 vaccine on immunoresponse of rats[J]. Med J PLA, 2009, 34(5): 630-632. DOI: 10.3579/j.pmj.2009.05.630.

[10] 谢琳, 贺翔鸽, 苏踊跃, 等. Nogo-66融合蛋白的原核表达及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(3): 256-258. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8861.2005.03.026.
XIE L, HE X G, SU Y Y, *et al*. Identification and prokaryotic expression of Nogo-66[J]. Immunol J, 2005, 21(3): 256-258. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8861.2005.03.026.

[11] TU S, LI K, DING X, *et al*. Relationship between intraocular pressure and retinal nerve fibre thickness loss in a monkey model of chronic ocular hypertension[J]. Eye (Lond), 2019, 33(12): 1833-1841. DOI: 10.1038/s41433-019-0484-1.

[12] LIU H H, BUI B V, NGUYEN C T O, *et al*. Chronic ocular hypertension induced by circumlimbal suture in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(5): 2811. DOI:10.1167/iovs.14-16009.

[13] LAKSHMANAN Y, WONG F S Y, ZUO B, *et al*. Posttreatment intervention with Lycium barbarum polysaccharides is neuroprotective in a rat model of chronic ocular hypertension[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(14): 4606-4618. DOI:10.1167/iovs.19-27886.

[14] LIU H H, FLANAGAN J G. A mouse model of chronic ocular hypertension induced by circumlimbal suture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(1): 353. DOI:10.1167/iovs.16-20576.

[15] SEKINE Y, LINDBORG J A, STRITTMATTER S M. A proteolytic C-terminal fragment of Nogo-A (reticulon-4A) is released in exosomes and potently inhibits axon regeneration[J]. J Biol Chem, 2020, 295(8): 2175-2183. DOI:10.1074/jbc.ra119.009896.

[16] NARDO G, TROLESE M C, VERDERIO M, *et al*. Counteracting roles of MHCI and $CD8^+$ T cells in the peripheral and central nervous system of ALS SOD1G93A mice[J]. Mol Neurodegener, 2018, 13(1): 42. DOI:10.1186/s13024-018-0271-7.

[17] MOCKUS T E, REN H M, SHWETANK, *et al*. To go or stay: the development, benefit, and detriment of tissue-resident memory CD8 T cells during central nervous system viral infections[J]. Viruses, 2019, 11(9): 842. DOI:10.3390/v11090842.

[18] SMOLDERS J, HEUTINCK K M, FRANSEN N L, *et al*. Tissue-resident memory T cells populate the human brain[J]. Nat Commun, 2018, 9: 4593. DOI:10.1038/s41467-018-07053-9.

[19] HAASE S, HAGHIKIA A, WILCK N, *et al*. Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity[J]. Immunology, 2018, 154(2): 230-238. DOI:10.1111/imm.12933.

[20] CIGNARELLA F, CANTONI C, GHEZZI L, *et al*. Intermittent fasting confers protection in CNS autoimmunity by altering the gut microbiota[J]. Cell Metab, 2018, 27(6): 1222-1235.e6. DOI:10.1016/j.cmet.2018.05.006.

[21] VAN KAER L, POSTOAK J L, WANG C, *et al*. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE[J]. Cell Mol Immunol, 2019, 16(6): 531-539. DOI:10.1038/s41423-019-0221-5.

[22] GAUBLOMME J T, YOSEF N, LEE Y, *et al*. Single-cell genomics unveils critical regulators of Th17 cell pathogenicity[J]. Cell, 2015, 163(6): 1400-1412. DOI:10.1016/j.cell.2015.11.009.

[23] GOLAN M, MAUSNER-FAINBERG K, IBRAHIM B, *et al*. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor level secretion from circulating T cells of patients with multiple sclerosis[J]. CNS Drugs, 2019, 33(12): 1229-1237. DOI:10.1007/s40263-019-00675-7.

[24] TAN Z, KANG T, ZHANG X, *et al*. Nerve growth factor prevents arsenic-induced toxicity in PC12 cells through the AKT/GSK-3β/NFAT pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4726-4738. DOI:10.1002/jcp.27255.

[25] DUBOVÝ P, KLUSÁKOVÁ I, HRADILOVÁ-SVÍŽENSKÁ I, *et al*. Expression of regeneration-associated proteins in primary sensory neurons and regenerating axons after nerve injury-an overview[J]. Anat Rec (Hoboken), 2018, 301(10): 1618-1627. DOI:10.1002/ar.23843.

[26] BURSOVA S, DUBOVY P, VLCKOVA-MORAVCOVA E, *et al*. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Neurol Sci, 2012, 315(1/2): 60-63. DOI:10.1016/j.jns.2011.11.038.

[27] ZHOU B, YU P P, LIN M Y, *et al*. Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits[J]. J Cell Biol, 2016, 214(1): 103-119. DOI:10.1083/jcb.201605101.

(收稿:2020-10-15;修回:2020-12-28)
(编辑 王 红)