

本文引用:张 逢,戴宗顺,林 也,蔡 雄,宋厚盼,陈 聪,廖 菁.“风寒湿”外邪影响 Th17/Treg 失衡促进类风湿关节炎病证发生的分子机制研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11): 1657-1662.

“风寒湿”外邪影响 Th17/Treg 失衡促进类风湿关节炎病证发生的分子机制研究

张 逢¹,戴宗顺²,林 也¹,蔡 雄¹,宋厚盼²,陈 聪²,廖 菁^{1,2*}

(1.湖南中医药大学湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地,湖南 长沙 410208;

2.湖南中医药大学中医方证转化医学研究湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨 Th17/Treg 细胞在类风湿关节炎(痹证)中的表达情况及“风寒湿”外邪影响痹证发生的分子机制。**方法** (1) 雄性 SD 大鼠 90 只,随机分为正常对照组、单纯佐剂性关节炎(AIA)组和 AIA 风寒湿痹组,每组 30 只。正常对照组和单纯 AIA 组大鼠正常饲养;AIA 风寒湿痹组每天置于人工智能气候箱内接受风寒湿刺激,14 d 后单纯 AIA 组和 AIA 风寒湿痹组免疫含有热灭活结合杆菌的完全弗氏佐剂(CFA);AIA 风寒湿痹组 CFA 免疫后风寒湿再刺激 6 d。各组动物 CFA 免疫前 1 天、免疫后第 6、10 天,分离外周血单核细胞(PBMCs),流式细胞术检测 CD4⁺Th17 和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞,分析 Th17/Treg 细胞比例。(2) 雄性 SD 大鼠 20 只,随机分为正常对照组和 AIA 风寒湿痹组,每组 10 只。正常对照组和 AIA 风寒湿痹组大鼠的实验条件同(1)。CFA 免疫后第 14 天麻醉大鼠,分离 PBMCs,流式细胞术检测外周血 CD4⁺T 细胞 pSTAT3 蛋白、CD4⁺IL-17⁺淋巴细胞 pSTAT4 和 pSTAT6 的蛋白平均荧光强度,RT-PCR 检测外周血 CD4⁺T 细胞中 ROR γ t、Foxp3、STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 的表达。**结果** 随着 AIA 风寒湿痹大鼠病情的进展,外周血 CD4⁺Th17 细胞比例逐渐增加,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例逐渐降低,与同时点单纯 AIA 组大鼠比较,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常对照组比较,AIA 风寒湿痹组大鼠外周血 CD4⁺pSTAT3⁺和 CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺及 CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺蛋白表达量显著增加,CD4⁺T 细胞中 Foxp3 mRNA 表达量显著降低,而 ROR γ t、STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达量显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** “风寒湿”外邪可能通过 JAK/STAT 信号通路激活 Th17 细胞分化,并抑制 Treg 细胞分化,导致 Th17/Treg 细胞失衡,从而促进 RA 病证的发生。

[关键词] 类风湿关节炎;痹证;“风寒湿”外邪;Th17/Treg;JAK/STAT 信号通路

[中图分类号] R255.6

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.003

Mechanistic Studies of Th17/Treg Imbalance Influenced by Exogenous Wind-cold-damp Pathogens on the Development of Rheumatoid Arthritis

ZHANG Feng¹, DAI Zongshun², LIN Ye¹, CAI Xiong¹, SONG Houpan², CHEN Cong², LIAO Jing^{1,2*}

(1. Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry Training

Bases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of

Translational Research in TCM Formulas and Zheng, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the molecular mechanism of “wind-cold-damp” (FHS) exogenous pathogenic factors and the expression of Th17/Treg cells on Bi syndrom (rheumatoid arthritis, RA). **Methods** (1) Ninety male SD rats were randomly and evenly

[收稿日期] 2021-03-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703920);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2293、2019JJ40225);湖南省高校创新平台开放基金项目(17K069);湖南省中医药科研计划项目(201909);湖南中医药大学中医国内一流建设学科项目(校行科学[2018]3号)。

[作者简介] 张 逢,女,助理实验师,研究方向:自身免疫性疾病动物模型研究。

[通信作者] *廖 菁,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:304906848@qq.com。

assigned into normal control group, simple adjuvant-induced arthritis (AIA) group and FHS+AIA group. Normal control group and simple AIA group were normally fed, and the FHS+AIA group was placed in an intelligent artificial climate box every day to receive FHS stimulation. After 14 days of FHS stimulation, rats in the simple AIA group and FHS+AIA group were injected complete Freund's adjuvant (CFA) containing heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* to establish AIA. FHS+AIA group continued to receive FHS stimulation for additional 6 days. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated 1 day before, 6 and 10 days after CFA immunization. Percentages of CD4⁺Th17 and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells were detected by flow cytometry. (2) Twenty male SD rats were randomly and evenly assigned into normal control group and FHS+AIA group. The experimental conditions of rats in normal control group and FHS+AIA group were the same (1). On day 14 after CFA injection, rats were anesthetized and blood specimens were collected for isolation of PBMCs. Mean fluorescence intensity of pSTAT3 protein in CD4⁺T cells, pSTAT4 and pSTAT6 proteins in CD4⁺IL-17⁺T cells were detected and analyzed by flow cytometry, and mRNA expression levels of ROR γ t, Foxp3, STAT3, STAT4, and STAT6 in CD4⁺T cells were examined by RT-PCR. **Results** With the progression of the disease in FHS+AIA group of rats, the proportion of peripheral blood CD4⁺Th17 cells gradually increased, and the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells gradually decreased, compared with the simple AIA group of rats at the same time point, the difference was statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with normal control group of rats, FHS+AIA group of rats showed significantly elevated fluorescent intensities of CD4⁺pSTAT3⁺, CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺ and CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺ proteins in the peripheral blood, markedly decreased mRNA level of Foxp3 and significantly increased mRNA levels of ROR γ t, STAT3, STAT4, and STAT6 detected in CD4⁺T cells, the difference was statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** FHS exogenous pathogenic factors may activate the differentiation of CD4⁺Th17 cells and inhibit the differentiation of Treg cells through the JAK/STAT signaling pathway, leading to imbalance of Th17/Treg cells, thus promoting the occurrence of RA syndrome.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; Bi syndrom; wind-cold-damp exogenous pathogenic factors; Th17/Treg; JAK/STAT signaling pathway

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜慢性炎症、软骨及骨组织侵蚀,最终导致关节结构破坏、畸形为主要临床特征的慢性、系统性自身免疫疾病^[1]。流行病学研究^[2-3]表明,全球 RA 发病率约为 0.5%~1.2%,我国 RA 患病率约为 0.28%~0.36%,其 5 年致残率高达 30%~50%,至今仍缺乏理想的治疗药物与方法,是造成劳动力丧失及致残的主要疾病之一。RA 病因不明,发病机制复杂,目前认为主要与遗传、饮食和环境等因素有关^[4]。根据其临床症状和体征,RA 属于中医学“痹证”范畴,与中医古籍所记载的“历节”“鹤膝风”“尪痹”等病证相似^[5]。对其病因病机的认识,《素问·痹论》有云:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹、寒气胜者为痛痹、湿气胜者为着痹也”“不与风寒湿气合,故不为痹”^[6-7]。另外,痹的产生与饮食和生活环境有关,所谓“食饮居处,为其病本也”^[6]。

基于“风寒湿三气杂至合而为痹也”的中医经典理论和现代医学对于环境因素在 RA 发病机制中重

要作用的认识,推测“风寒湿”外邪能显著影响 RA 的发生和/或发展。选择应用最广泛的经典佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)动物模型,采用改良人工智能气候箱,给予大鼠风寒湿刺激,再诱导 AIA 的方案,研究“风寒湿”外邪刺激对 AIA 发生发展的影响^[8]。李鑫等^[9]研究表明,“风寒湿”外邪只影响 AIA 的发生,其在疾病初发阶段中医证候表现为风寒湿痹证。

RA 的特征是以大量 CD4⁺T 细胞浸润为主的慢性滑膜炎反应,而大鼠 AIA 也是一种 T 细胞介导的免疫性炎症动物模型^[10]。CD4⁺T 细胞作为效应 T 细胞的重要成分,可参与免疫应答过程中的各个阶段,其介导的免疫反应异常被认为是 RA 的主要发病机制之一^[9-10]。用流式细胞仪初步检测了风寒湿刺激 14 d 后大鼠外周血 T 细胞种类和表面抗原,显示 CD4⁺T 细胞亚群数量明显升高^[9]。根据其产生的细胞因子及其与之相关的功能不同,通常将 CD4⁺T 细胞分为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 四大亚群。课题组

前期研究发现,与正常饲养大鼠比较,风寒湿刺激大鼠可见 CD4⁺Th17 细胞亚群明显增多,血清 IL-17 含量显著升高^[1]。因此,本研究主要围绕 CD4⁺Th17 分化和 Th17/Treg 失衡,进一步深入探讨“风寒湿”外邪影响类风湿关节炎(痹证)发生的分子机制,以期为中医论治痹证与相关药物研发提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量为 90~110 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXX(湘)2011-0003,合格证编号:43004700008303;43004700008412;43004700008456;43004700008423。饲养处及实验地:湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,许可证号:SYXK(湘)2019-0009,室温(22±3)℃,相对湿度 40%~70%,自由采食,分笼饲养。动物房中明暗交替(12 h 白天:12 h 黑夜),动物适应环境 7 d 后开始进行实验。

1.2 主要试剂

热灭活结合杆菌 H37Ra(批号:20170320)、矿物油(批号:M8410)、Ficoll 淋巴细胞分离液(批号:F4375)均购自美国 Sigma Aldrich 公司;抗鼠 CD4 抗体(批号:11-0040-81)、抗鼠 IL-17 抗体(批号:12-7177-81)、抗鼠 CD25 抗体(批号:12-0251-81)、抗鼠 pSTAT3 抗体(批号:MA5-32089)、抗鼠 pSTAT4 抗体(批号:71-7900)、抗鼠 pSTAT6 抗体(批号:PA5-104892)、抗鼠 Foxp3-APC 抗体(批号:17-5773-80)、试剂 A 破膜剂(批号:23228)、试剂 B 破膜剂(批号:23224)均购自美国 eBioscience 公司;异氟烷气体麻醉剂(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:084989);逆转录试剂盒(美国 ABI 公司,批号:4374967);SYBR Premix Ex Taq™ II RORγt 试剂盒(上海生物工程技术公司,批号:B110032)。

1.3 主要仪器

改良人工智能气候箱(上海汗诺仪器公司,型号:PRX-150);250i 细胞二氧化碳培养箱(型号:51033587)、超微量核酸定量检测仪(型号:701-058112)均购自美国 Thermo Fisher 公司;全自动细胞计数器(美国 Bio-Rad 公司,型号:TC20);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司,型号:AXYPCR384LC480CNF);气体麻醉机(美国 SurgiVet 公司,型号:SurgiVet

CDS9000);流式细胞分析仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:TM X-20);台式超高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司,型号:Allegra 64R);电子天平(日本岛津公司,型号:ATY224)。

2 方法

2.1 AIA 风寒湿痹大鼠体内 Th17/Treg 细胞失衡检测

2.1.1 分组与造模 动物模型构建参考文献[8-9],90 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、单纯 AIA 组和 AIA 风寒湿痹组,每组 30 只。正常对照组和单纯 AIA 组大鼠正常饲养 14 d;AIA 风寒湿痹组大鼠每天置于人工智能气候箱内接受风寒湿刺激(风速 5 m/s、温度 0~2℃、相对湿度 90%~95%)1 次,每次 4 h,14 d 后,除正常对照组外,其他两组于尾根部皮下注射 0.1 mL 含 200 g Mtb 的 CFA 诱导 AIA,AIA 风寒湿痹组 CFA 免疫后继续接受风寒湿刺激 6 d。

2.1.2 AIA 关节炎指数评定 CFA 免疫后,依据大鼠多发性关节炎的特性,采用 5 级评分法^[12]对 CFA 免疫后的大鼠进行关节炎指数评分:正常情况,无红肿,计 0 分;脚趾关节红斑或轻度红肿,计 1 分;趾关节和足跖或踝关节中度红肿,记 2 分;踝关节以下足爪全部红肿或者踝关节重度红肿,计 3 分;裸关节在内全部足爪红肿变形,计 4 分,最高每只可达 16 分。

2.1.3 流式细胞术检测外周血 CD4⁺Th17 和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的细胞比例 CFA 免疫前 1 天、免疫后第 6、10 天分别麻醉大鼠,腹主动脉取血,用淋巴细胞分离液分离出外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs),用 RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10⁷/mL,稀释 FITC 标记的抗鼠 CD4 抗体(1:200),每个样本 2.0 μL 染色 30 min,冰上孵育;洗涤后,按细胞内染色试剂盒说明书进行后续细胞内染色;固定破膜,洗涤 3 次;分别加稀释 PE 标记的抗鼠 IL-17(1:400)、Foxp3-APC(1:300)和 CD25-PE 抗体(1:400),4℃避光孵育 30 min,洗涤,对照管加入同型对照。上流式细胞分析仪检测,应用 BD Cell Quest 软件获取数据进行分析。

2.2 AIA 风寒湿痹大鼠 JAK/STAT 信号通路检测

2.2.1 分组与造模 雄性 SD 大鼠,体质量 90~110 g,随机分为正常对照组和 AIA 风寒湿痹组,每组 10

只。正常对照组大鼠正常饲养; AIA 风寒湿痹组大鼠风寒湿刺激 14 d 后, 于尾根部皮下免疫含 Mtb 的 CFA, 继续接受风寒湿刺激 6 d, 风寒湿刺激和 AIA 免疫方法同“2.1.1”项。

2.2.2 流式细胞术检测外周血 CD4⁺T 细胞 pSTAT3 蛋白、CD4⁺IL-17⁺淋巴细胞 pSTAT4 和 pSTAT6 蛋白的含量 CFA 免疫后 14 d, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 用淋巴细胞分离液分离出 PBMCs, 用 RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。以稀释后的 CD4-FITC (1:200) 设门, 固定破膜, 根据需要, 分别用稀释后的 IL-17-APC (1:300)、pSTAT3-PE (1:400)、pSTAT4-PE (1:400)、pSTAT6-PE (1:400) 染色, 洗涤后上机检测。CD4⁺pSTAT3⁺蛋白平均荧光强度代表 CD4⁺T 细胞 JAK/STAT 信号通路活化状态。CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺和 CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺蛋白平均荧光强度代表 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞 JAK/STAT 通路的活化状态。

2.2.3 RT-PCR 检测外周血 CD4⁺T 细胞中 ROR γ t、Foxp3、STAT3、STAT4 和 STAT6 mRNA 表达 PBMCs 经免疫磁珠法分选 CD4⁺T 细胞, 设计引物, 其中各基因 PCR 引物序列见表 1。Trizol 提取滑膜组织总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量及纯度, 逆转录合成 cDNA, 并进行定量 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参。数据以 ABI 自带软件 SDS 对 RT-PCR 进行分析, ROR γ t mRNA 表达水平代表 Th17 细胞水平, Foxp3 mRNA 表达水平代表 Treg 细胞水平, STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达水平代表 CD4⁺T 细胞 JAK/STAT 通路的活化状态。

表 1 各基因引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段大小/bp
GAPDH	反向 CTTCACCACCATGGAGAAGGC	238
	正向 GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
STAT3	反向 GCGCCTGGAGCCAGCATA	217
	正向 CTGGCTGCATATGCCCAATCTT	
STAT4	反向 GCCTCAAGTGGGTGGAGAAATG	116
	正向 CTCTCTCCGTCCAGGCAGTG	
STAT6	反向 GAACCCTTGTGACCAGCTCT	141
	正向 CTCTGACCAGTGGAGGCTTG	
ROR γ t	反向 AATGTGGCCTACTCCTGCAC	195
	正向 CTGCTGCTGTTGCAGTTGTT	
Foxp3	反向 GCAGCTCCGGCAACTTTTC	103
	正向 CTTGTCTGAGGCAGGCTGGAT	

2.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 计量资料描述用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 用 *LSD* 法; 方差不齐时, 用 *Dunnnett*'3 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠外周血 CD4⁺Th17 细胞比例

免疫前 1 天, 各组间的 CD4⁺Th17 细胞比例比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在免疫后第 6、10 天, 与正常对照组相比, 单纯 AIA 组及 AIA 风寒湿痹组大鼠的外周血 CD4⁺Th17 细胞比例均增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时间点, AIA 风寒湿痹组与单纯的 AIA 组相比, CD4⁺Th17 细胞比例增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠外周血 CD4⁺Th17 细胞比例 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	外周血 CD4 ⁺ Th17 细胞比例/%		
	免疫前 1 天	免疫后第 6 天	免疫后第 10 天
正常对照组	1.05±0.01	1.08±0.02	1.09±0.05
单纯 AIA 组	1.06±0.30	4.69±0.79*	7.93±0.95**
AIA 风寒湿痹组	1.03±0.31	8.16±0.82*** [#]	10.52±0.93***

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单纯 AIA 组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 各组大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例

免疫前 1 天, 各组间的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在免疫后第 6、10 天, 与正常对照组相比, 单纯 AIA 组及 AIA 风寒湿痹组大鼠的外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时间点, AIA 风寒湿痹组与单纯 AIA 组相比, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例

组别	外周血 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg 细胞比例/%		
	免疫前 1 天	免疫后第 6 天	免疫后第 10 天
正常对照组	8.12±0.44	8.28±0.48	8.19±0.41
单纯 AIA 组	7.94±0.43	7.13±0.47*	6.68±0.45**
AIA 风寒湿痹组	8.15±0.50	6.93±0.55*** [#]	4.19±0.46***

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单纯 AIA 组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.3 各组大鼠外周血 CD4⁺pSTAT3⁺、CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺和 CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺蛋白表达比较

与正常对照组比较,AIA 风寒湿痹组外周血 CD4⁺pSTAT3⁺、CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺及 CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺蛋白表达量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组大鼠外周血 CD4⁺pSTAT3⁺、CD4⁺IL-17⁺pSTAT4⁺、CD4⁺IL-17⁺pSTAT6⁺表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	CD4 ⁺ pSTAT3 ⁺	CD4 ⁺ IL-17 ⁺ pSTAT4 ⁺	CD4 ⁺ IL-17 ⁺ pSTAT6 ⁺
正常对照组	0.10±0.03	0.13±0.04	0.18±0.04
AIA 风寒湿痹组	0.45±0.11**	0.48±0.10**	0.49±0.13*

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.4 各组大鼠外周血 CD4⁺T 细胞中 ROR γ t、Foxp3 mRNA 表达水平比较

与正常对照组比较,AIA 风寒湿痹组外周血 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 mRNA 表达量降低,ROR γ t mRNA 表达量增加($P<0.01$)。见表 5。

表 5 各组大鼠外周血 CD4⁺T 细胞中 ROR γ t、Foxp3 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	ROR γ t mRNA	Foxp3 mRNA
正常对照组	0.43±0.04	1.62±0.08
AIA 风寒湿痹组	1.50±0.08**	0.60±0.05**

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.5 各组大鼠外周血 CD4⁺T 细胞中 STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达水平比较

与正常对照组比较,AIA 风寒湿痹组外周血 CD4⁺T 细胞中 STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 6。

表 6 各组大鼠外周血 CD4⁺T 细胞中 STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	STAT3 mRNA	STAT4 mRNA	STAT6 mRNA
正常对照组	0.56±0.04	0.52±0.05	0.58±0.03
AIA 风寒湿痹组	0.88±0.09**	0.74±0.08*	0.72±0.07*

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

4 讨论

RA 属于中医“痹证”中最为常见的临床疾患之一,是一种以慢性侵蚀性关节炎为主要特征的自身免疫性疾病。RA 病因不明,发病机制复杂,其分子病理特征是以大量 CD4⁺T 细胞浸润为主的慢性滑膜炎反应。Th17 细胞是 CD4⁺T 细胞新亚型,高分分泌 IL-17 等炎性细胞因子,促进炎症反应和延续骨

破坏进程^[13]。RA 患者外周血 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞的比例增加,而 Treg 细胞的比例降低,导致 Th17/Treg 细胞失衡,而 Treg 细胞通过直接接触或产生抑制性细胞因子(如 TGF- β 、IL-10)对自身反应 T 细胞活化和增殖起负调控作用^[14-15]。本研究结果显示,RA 风寒湿痹大鼠存在 Th17/Treg 细胞失衡现象,风寒湿刺激大鼠外周血 CD4⁺Th17 细胞比例较单纯 AIA 组显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),Treg 细胞比例显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),Th17/Treg 细胞比例处于失衡状态。

有研究^[16]表明,JAK/STAT 信号通路活化参与 RA 的发生,且炎症位点中的 T 细胞分化由 JAK/STAT 信号通路激活所介导。在树突细胞、单核细胞等抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)作用下,IL-6 协同低浓度的 TGF- β ,激活 JAK1,进而招募 STAT3,并使其磷酸化,活化的 JAK1/STAT3 通路激活 ROR γ t,使初始 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化^[17-18]。同时,在 Th17 分化的负向调节研究中,细胞因子信号转导抑制蛋白因子 3(suppressor of cytokine signaling3, SOCS3)是重要的负向调节因子,它通过抑制 STAT3 的磷酸化发挥作用^[19]。ROR γ t 被认为是 Th17 细胞谱系特异性的转录激活因子,可诱导调控 IL-17 的高水平分泌,并抑制 Treg 细胞分化^[20]。Th17 细胞被转录因子 STAT4 和 STAT6 调控,生成 IL-17,同时可产生 IL-23、IL-6 和 TNF- α 等炎性细胞因子,IL-23 可促进激活的记忆细胞产生 IL-17,使 Th17 细胞得以存活和维持功能^[17]。Foxp3 是 Treg 的特异性标志物,其持续表达是维持 Treg 活性的关键因素。研究^[21-22]表明,RA 患者外周血 ROR γ t 表达量显著增加,Foxp3 表达量显著降低。本研究结果显示,AIA 风寒湿痹大鼠外周血 ROR γ t 表达量显著增加,Foxp3 表达量显著降低,与文献报道一致,提示 AIA 风寒湿痹大鼠 Th17/Treg 细胞处于失衡状态。研究^[23-24]显示,RA 患者 STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达量显著增加。本研究结果显示,AIA 风寒湿痹大鼠外周血 CD4⁺T 细胞中 STAT3、STAT4、STAT6 mRNA 表达量显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),ROR γ t 和 Foxp3 mRNA 表达量也显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),提示 JAK/STAT 信号通路活化并参与了炎症位点中的 T 细胞分化。

综上,“风寒湿”外邪可能通过激活 JAK/STAT

信号通路,并在 STAT3、STAT4、STAT6、ROR γ t 及 Foxp3 mRNA 的参与下,激活 Th17 细胞分化,并抑制 Treg 细胞分化,导致 Th17/Treg 细胞失衡,从而促进炎症发生。

参考文献

- [1] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4: 18001.
- [2] SAFIRI S, KOLAHI A A, HOY D, et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: A systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2019, 78(11): 1463–1471.
- [3] LI Z G. A new look at rheumatology in China—opportunities and challenges [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 11(5): 313–317.
- [4] 栗占国.类风湿关节炎年度回顾[J].*医学研究杂志*,2013,42(3):4–5.
- [5] 林也,廖菁,戴宗顺,等.风寒湿外邪作用于 EPO 影响痹证(类风湿关节炎)的发生[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(3):345–349.
- [6] 潘胡丹,刘良.类风湿关节炎中医治疗经验探讨[J].*中医杂志*, 2016,57(2):173–175.
- [7] 吴晋英,李俊莲,张世霞.《金匮要略》痹证探析[J].*中国中医基础医学杂志*,2013,19(5):496,520.
- [8] 林也,戴宗顺,张婷,等.基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(5): 668–672.
- [9] 李鑫,魏艳霞,林也,等.风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2017,37(12):1496–1501.
- [10] VAN EDEN W, WAKSMAN B H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: Possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis[J]. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48(7): 1788–1796.
- [11] 林也.基于以方测证的类风湿关节炎风寒湿痹病证结合动物模型构建研究[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [12] CAI X, WONG Y F, ZHOU H, et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2006, 373 (2): 140–147.
- [13] MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 361(9): 888–898.
- [14] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W D, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235–238.
- [15] BEHRENS F, HIMSEL A, REHART S, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2007, 66(9): 1151–1156.
- [16] KRAUSE A, SCALETTA N, JI J D, et al. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3[J]. *Journal of Immunology*, 2002, 169(11): 6610–6616.
- [17] MATHUR A N, CHANG H C, ZISOULIS D G, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2007, 178(8): 4901–4907.
- [18] WU H X, YAN S X, CHEN J Y, et al. JAK1-STAT3 blockade by JAK inhibitor SHR0302 attenuates inflammatory responses of adjuvant-induced arthritis rats and decreases Th17 and total B cells[J]. *Joint Bone Spine*, 2016, 83(5): 525–532.
- [19] KIM E K, KWON J E, LEE S Y, et al. IL-17-mediated mitochondrial dysfunction impairs apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through activation of autophagy[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(1): e2565.
- [20] KLUGER M A, NOSKO A, RAMCKE T, et al. ROR γ t expression in Tregs promotes systemic lupus erythematosus via IL-17 secretion, alteration of Treg phenotype and suppression of Th2 responses[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017, 188 (1): 63–78.
- [21] SUN H Q, GAO W W, PAN W P, et al. Tim3⁺Foxp3⁺ treg cells are potent inhibitors of effector T cells and are suppressed in rheumatoid arthritis[J]. *Inflammation*, 2017, 40(4): 1342–1350.
- [22] KANEKO S, KONDO Y, YOKOSAWA M, et al. The ROR γ t-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovia of rheumatoid arthritis patients[J]. *Modern Rheumatology*, 2018, 28(5): 814–825.
- [23] WALKER J G, AHERN M J, COLEMAN M, et al. Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: Unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2006, 65(2): 149–156.
- [24] 吕卓,李娟,冯知涛,等.RA 患者外周血 HLA-DR4、PAD4、STAT4 mRNA 表达及与疾病活动的相关性[J].*南方医科大学学报*,2010,30(6):1349–1353.

(本文编辑 匡静之 周旦)