

伏立诺他对干燥综合征大鼠免疫功能的影响

胡丹^{1*},袁婷²,董峥³(1.运城市中心医院风湿免疫科,山西运城 044000;2.运城市中心医院耳鼻咽喉科,山西运城 044000;3.运城市中心医院超声科,山西运城 044000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1226-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.13



摘要 目的 探讨伏立诺他(SAHA)调节白细胞介素6(IL-6)/信号转导及转录活化因子3(STAT3)信号通路对干燥综合征(SS)大鼠免疫功能的影响。方法 采用弗氏完全/不完全佐剂免疫诱导法构建SS大鼠模型,并将造模成功的大鼠分为模型组,SAHA低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg)和SAHA高剂量+IL-6/STAT3信号通路激活剂组(100 mg/kg SAHA+0.05 mg/kg重组IL-6蛋白),每组10只;另选10只健康大鼠为对照组。各组大鼠腹腔注射相应药液/生理盐水,每天1次,连续2周。检测各组大鼠的饮水量(1 d)、唾液流量(10 min)和脾脏指数、颌下腺指数,观察其颌下腺组织病理变化,检测其血清干扰素 γ (IFN- γ)、IL-17、IL-10水平和外周血T淋巴细胞亚群分化情况,并检测其颌下腺组织中IL-6/STAT3信号通路相关蛋白的表达情况。结果 与对照组比较,模型组大鼠颌下腺组织可见明显的淋巴细胞局灶性浸润,腺泡细胞明显减少;其饮水量,脾脏指数,颌下腺组织病理评分,血清IFN- γ 、IL-17水平,外周血辅助性T细胞1(Th1)、Th17比例,以及颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);唾液流量、颌下腺指数、血清IL-10水平和外周血调节性T细胞(Treg)比例均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠颌下腺组织病理损伤均有所减轻,各定量指标均显著改善,且有剂量依赖性($P<0.05$);重组IL-6蛋白可逆转SAHA对大鼠上述指标的改善作用($P<0.05$)。结论 SAHA可减轻SS大鼠的颌下腺损伤,调节其免疫功能,上述作用可能与抑制IL-6/STAT3信号通路有关。

关键词 伏立诺他;干燥综合征;免疫功能;IL-6/STAT3信号通路

Effects of vorinostat on immune function in rats with Sjögren syndrome

HU Dan¹, YUAN Ting², DONG Zheng³(1. Dept. of Rheumatology and Immunology, Yuncheng Central Hospital, Shanxi Yuncheng 044000, China; 2. Dept. of Otolaryngology, Yuncheng Central Hospital, Shanxi Yuncheng 044000, China; 3. Dept. of Ultrasound, Yuncheng Central Hospital, Shanxi Yuncheng 044000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of vorinostat (SAHA) on immune function in rats with Sjögren syndrome (SS) by regulating interleukin-6 (IL-6)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **METHODS** SS model was constructed by complete/incomplete Freund's adjuvant immune induction, and the rats with successful modeling were divided into model group, SAHA low-dose, medium-dose and high-dose groups (25, 50, 100 mg/kg), and high-dose SAHA+IL-6/STAT3 signaling pathway activator group (100 mg/kg SAHA+0.05 mg/kg recombinant IL-6 protein), with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were collected as the control group. Rats in each group were intraperitoneally injected with the corresponding drug/normal saline, once a day, for consecutive 2 weeks. The water intake (1 d) and saliva flow (10 min) of rats in each group were measured, and the spleen index and submandibular gland index were measured; pathological changes in submandibular gland tissue were observed. The serum levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-17 and IL-10 were detected, and the differentiation of T lymphocyte subgroups in peripheral blood was also detected; the expressions of IL-6/STAT3 signaling pathway-related proteins in submandibular gland were detected. **RESULTS** Compared with the control group, obvious focal infiltration of lymphocytes was observed in the submandibular gland tissue of rats in the model group, and the number of acinar cells was decreased significantly; the water intake, spleen index, pathological score of submandibular gland, serum levels of IFN- γ and IL-17, and the ratios of helper T cell 1 (Th1) and Th17 as well as the protein expression of IL-6 and the protein phosphorylation of STAT3 in submandibular gland were increased obviously ($P<0.05$); the saliva flow, submandibular gland index, serum level of IL-10 and regulatory T cell (Treg) ratio were obviously decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the damage to the submandibular gland in SAHA groups was relieved, the quantitative indexes were obviously improved in dose-dependent manner ($P<0.05$); recombinant IL-6 protein could reverse the improvement effect of SAHA on above indexes of rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** SAHA can relieve the injury of submandibular gland and regulate its immune function in SS rats, which may be related to inhibiting the IL-6/STAT3 signaling pathway.

* 第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:风湿免疫。E-mail: liweihudan@163.com

KEYWORDS vorinostat; Sjögren syndrome; immune function; IL-6/STAT3 signaling pathway

干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)是一种病因不明的慢性自身免疫性疾病,主要累及唾液腺、泪腺等外分泌腺体,主要症状包括口干、眼干等^[1],可单独出现(即原发性SS)或伴随系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等其他自身免疫性疾病出现(即继发性SS)。据报道,SS患者普遍存在免疫紊乱,包括T细胞亚群紊乱、炎症细胞高水平表达和促炎性细胞因子、自身抗体过度产生^[2]。因此,调节异常免疫反应、改善自身免疫稳态失衡,可能是治疗SS的有效策略之一。

伏立诺他(vorinostat, SAHA)是一种口服组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂,作为一种具有免疫调节活性的潜在抗炎剂,其可通过调节免疫功能来减轻干眼症小鼠的炎症反应^[3]。研究指出,白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)是一种多效细胞因子,可参与免疫反应、炎症、造血、骨代谢、胚胎发育等过程,与其受体结合后可激活信号转导及转录活化因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),进一步调控多种细胞活动^[4]。失调的IL-6/STAT3信号通路与多种自身免疫性疾病的发生发展有关,并可影响机体的免疫功能^[5]。此外,还有研究指出,IL-6可通过激活STAT3来诱导唾液管细胞再生因子I α 编码基因的转录,在SS的发生发展中具有重要作用^[6]。基于此,本研究拟通过构建SS大鼠模型,探究SAHA对其免疫功能及IL-6/STAT3信号通路的影响,以期为该疾病的临床治疗提供新的药物和思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX53型显微镜(日本Olympus公司)、FACS型流式细胞仪(美国BD公司)、M2型多功能酶标仪(美国Molecular Device公司)、GENESYS 10S型分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)、DYCZ-24K型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、GelDoc Go型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

SAHA原料药(纯度 $\geq 98\%$,货号F0080)购自北京索莱宝科技有限公司;毛果芸香碱对照品(纯度 $\geq 98\%$,货号92-13-7)购自美国MedKoo Biosciences公司;弗氏不完全佐剂(货号D615-0100)、弗氏完全佐剂(货号D614-0100)均购自武汉艾美捷科技有限公司;大鼠重组IL-6蛋白(IL-6/STAT3信号通路激活剂,货号RP-2186R)购自美国Advanced BioMatrix公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(货号KL-X126)购自上海康朗生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号E-IR-R117)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号JKSW71076)购自上海晶抗科技生物有限公司;IL-17 ELISA试剂盒(货号EK-R36872)购自上海酶研生物科技有限公司;IL-10 ELISA试剂盒(货号CSB-E04595r-1)

购自上海恒斐生物科技有限公司;藻红蛋白(PE)标记的鼠CD4抗体(货号116006)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠CD4抗体(货号130308)、别藻蓝蛋白(APC)标记的鼠IFN- γ 抗体(货号505810)、FITC标记的鼠IL-17A抗体(货号506908)均购自美国BioLegend公司;PE标记的鼠叉头框蛋白P3(forkhead box P3, FoxP3)抗体(货号12-5773-82)购自美国eBioscience公司;兔源IL-6、STAT3、磷酸化STAT3(phosphorylated STAT3, p-STAT3)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号分别为ab9324、ab109085、ab76315、ab8227)均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(货号HZ131125-100)购自上海沪震实业有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,购自广东南模生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0062。所有大鼠均在室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、每12 h光暗循环、相对湿度(55 ± 5)%的条件下饲养,自由进食和饮水,适应性喂养1周后开始后续实验。本研究方案经运城市中心医院医学伦理委员会批准(批号DWLL2022014)。

2 方法

2.1 动物模型的建立及分组干预

参照相关文献方法构建SS模型^[7]:50只大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉后处死,于无菌条件下分离其颌下腺,以冷冻的磷酸盐缓冲液(PBS)匀浆,再于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以2 000 r/min离心20 min,收集上清液(即颌下腺蛋白),使用BCA试剂盒测定蛋白含量,分别加入等体积的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂至2.5 mg/mL(即每毫升含蛋白2.5 mg),分别记为乳剂A、乳剂B。于实验第0、7天,在造模大鼠尾部和背部皮下注射乳剂A 0.1 mL进行免疫;于实验第14天,在造模大鼠尾部和背部皮下注射乳剂B 0.1 mL增强免疫。若大鼠唾液减少且颌下腺可见明显病理损伤,则表明造模成功。另取10只健康大鼠,于相同部位皮下注射等体积生理盐水,作为对照组。

将造模成功的大鼠分为模型组,SAHA低、中、高剂量组和SAHA高剂量+重组IL-6组,每组10只。其中,SAHA低、中、高剂量组大鼠腹腔注射25、50、100 mg/kg的SAHA(以生理盐水为溶剂)^[8],SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠腹腔注射100 mg/kg的SAHA和0.05 mg/kg的重组IL-6蛋白(均以生理盐水为溶剂)^[9],对照组和模型组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续2周。

2.2 大鼠饮水量和唾液流量测定

末次给药后24 h,记录各组大鼠1 d的饮水量。随后,各组大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,再腹腔注射毛果芸香碱5 mg/kg诱导唾液分泌;5 min后,将已称重的干燥棉球放入大鼠口中收集唾液;10 min后,取出棉球,称重,棉球质量差即为大鼠10 min的唾液流量。

2.3 大鼠器官指数测定

饮水量和唾液流量检测完成后,称定各组大鼠体重,然后腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,于腹主动脉取

血,备用;随后,处死各组大鼠,于无菌条件下取其脾脏、颌下腺,称重,按下式计算各脏器指数:脏器指数=脏器质量/体重。

2.4 大鼠颌下腺组织病理变化观察

采用HE法观察。取各组大鼠颌下腺组织适量,经4%多聚甲醛固定24 h后,行常规石蜡包埋、切片(厚度3 μm);切片经脱蜡、脱水后,进行HE染色,使用光学显微镜观察其病理改变并根据腺体活检标准进行病理评分:无淋巴细胞浸润,记0分;轻度淋巴细胞浸润,记1分;中度淋巴细胞浸润但未见明显淋巴细胞病灶,记2分;1个淋巴细胞病灶,记3分;>1个淋巴细胞病灶,记4分^[10]。

2.5 大鼠血清中IFN- γ 、IL-17、IL-10水平检测

采用ELISA法检测。取“2.3”项下各组大鼠腹主动脉血适量,以3 000 r/min离心20 min,取上层血清,按照相应试剂盒说明书方法操作,以酶标仪检测其血清IFN- γ 、IL-17、IL-10水平。

2.6 大鼠外周血T淋巴细胞亚群分化情况检测

采用流式细胞术检测。取“2.3”项下各组大鼠腹主动脉血适量,经乙二胺四乙酸抗凝后制备外周血单核细胞悬液,经固定、透化后静置过夜;使用PE标记的CD4抗体或FITC标记的CD4抗体对细胞表面蛋白染色20 min(4 $^{\circ}\text{C}$),使用APC标记的IFN- γ 抗体、FITC标记的IL-17A抗体或PE标记的FoxP3抗体对细胞内细胞因子染色1 h(室温),使用流式细胞仪记录细胞染色情况进行数据分析[细胞内IFN- γ 、IL-17A、FoxP3染色阳性CD4细胞分别对应辅助性T细胞1(helper T cell 1, Th1)、Th17、调节性T细胞(regulatory T cell, Treg),分别呈红色、绿色、黄色]。

2.7 大鼠颌下腺组织中IL-6/STAT3信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取各组大鼠颌下腺组织适量,以RIPA裂解液在冰上提取总蛋白,以12 000 r/min离心5 min,取上清液,使用BCA试剂盒测定蛋白含量后,在沸水浴中静置10 min使变性。取变性蛋白(50 μg)进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后转移至聚偏二氟乙烯膜上,以5%脱脂乳封闭2 h;洗膜后,加入IL-6、STAT3、p-STAT3、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:2 000、1:1 000、1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗膜后,加入相应IgG二抗(稀释比例为1:2 000),于室温孵育2 h;经化学发光法显色后,置于凝胶成像系统下成像。使用Image J软件对目的蛋白的表达水平进行定量分析,以IL-6蛋白与内参 β -actin的条带灰度值比值表示IL-6蛋白的表达水平,以p-STAT3与STAT3蛋白的条带灰度值比值表示STAT3蛋白的磷酸化水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 SAHA对大鼠饮水量和唾液流量的影响

与对照组比较,模型组大鼠的饮水量显著升高,唾液流量显著降低($P<0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠的饮水量均显著降低,唾液流量均显著升高,且有剂量依赖性($P<0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠饮水量显著升高,唾液流量显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠的饮水量和唾液流量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	饮水量(g/d)	唾液流量/mg
对照组	3.82 \pm 0.43	24.85 \pm 2.93
模型组	5.74 \pm 0.52 ^a	8.63 \pm 0.92 ^a
SAHA低剂量组	4.91 \pm 0.50 ^b	14.73 \pm 1.63 ^b
SAHA中剂量组	4.42 \pm 0.48 ^{bc}	18.05 \pm 1.92 ^{bc}
SAHA高剂量组	4.05 \pm 0.44 ^{cd}	21.93 \pm 2.75 ^{cd}
SAHA高剂量+重组IL-6组	5.58 \pm 0.64 ^e	11.05 \pm 1.46 ^e

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与SAHA低剂量组比较, $P<0.05$;d:与SAHA中剂量组比较, $P<0.05$;e:与SAHA高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 SAHA对大鼠脾脏指数、颌下腺指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠的脾脏指数显著升高,颌下腺指数显著降低($P<0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠的脾脏指数均显著降低,颌下腺指数均显著升高,且有剂量依赖性($P<0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠的脾脏指数显著升高,颌下腺指数显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠的脾脏指数、颌下腺指数、病理评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

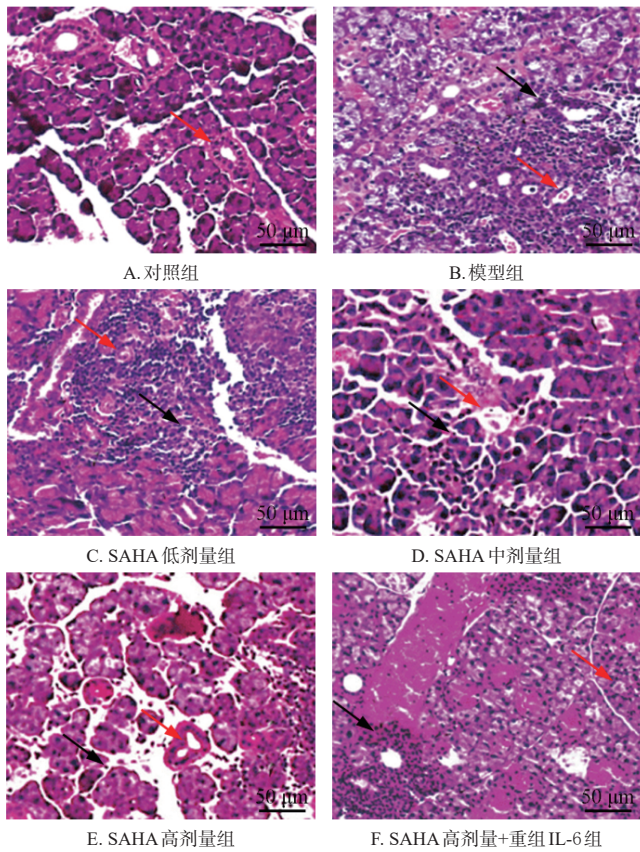
组别	脾脏指数(mg/g)	颌下腺指数(mg/g)	病理评分
对照组	3.05 \pm 0.37	4.73 \pm 0.67	0
模型组	4.27 \pm 0.49 ^a	3.02 \pm 0.53 ^a	3.53 \pm 0.42 ^a
SAHA低剂量组	3.85 \pm 0.38 ^b	3.61 \pm 0.46 ^b	2.82 \pm 0.35 ^b
SAHA中剂量组	3.52 \pm 0.31 ^{bc}	4.16 \pm 0.51 ^{bc}	2.46 \pm 0.39 ^{bc}
SAHA高剂量组	3.20 \pm 0.24 ^{cd}	4.58 \pm 0.56 ^{cd}	1.83 \pm 0.22 ^{cd}
SAHA高剂量+重组IL-6组	4.13 \pm 0.45 ^e	3.47 \pm 0.41 ^e	3.37 \pm 0.39 ^e

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与SAHA低剂量组比较, $P<0.05$;d:与SAHA中剂量组比较, $P<0.05$;e:与SAHA高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.3 SAHA对大鼠颌下腺组织病理变化的影响

对照组大鼠颌下腺组织腺泡细胞大小均匀,排列紧密;模型组大鼠颌下腺组织可见明显的淋巴细胞局灶性浸润,腺泡细胞明显减少,导管扩张,部分组织变性坏死;SAHA各剂量组大鼠颌下腺组织淋巴细胞局灶性浸润减少,部分导管扩张,腺泡细胞少量减少,且随SAHA剂量增加,改善效果越明显;SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠颌下腺组织的淋巴细胞浸润较SAHA高剂量组增加,病理损伤加重。结果见图1。

与对照组比较,模型组大鼠的病理评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠的病理评分均显著下降,且有剂量依赖性($P<0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠的病理评分显著升高($P<0.05$)。结果见表2。



红色箭头:腺泡细胞;黑色箭头:淋巴细胞局灶性浸润。

图1 各组大鼠颌下腺组织病理变化的显微图(HE染色)

3.4 SAHA对大鼠血清IFN- γ 、IL-17、IL-10水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清IFN- γ 、IL-17水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠血清IFN- γ 、IL-17水平均显著降低,IL-10水平均显著升高,且有剂量依赖性($P < 0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠血清IFN- γ 、IL-17水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠的血清IFN- γ 、IL-17、IL-10水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IFN- γ /(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
对照组	53.58 \pm 6.92	48.36 \pm 4.92	228.19 \pm 28.35
模型组	137.42 \pm 16.91 ^a	95.36 \pm 10.85 ^a	86.83 \pm 12.04 ^a
SAHA低剂量组	92.08 \pm 10.37 ^b	78.26 \pm 7.93 ^b	135.52 \pm 14.39 ^b
SAHA中剂量组	75.36 \pm 8.02 ^c	63.57 \pm 6.50 ^c	162.86 \pm 18.35 ^c
SAHA高剂量组	60.38 \pm 6.29 ^{bd}	55.93 \pm 8.54 ^{bd}	198.52 \pm 20.44 ^{bd}
SAHA高剂量+重组IL-6组	115.27 \pm 13.72 ^e	84.27 \pm 8.75 ^e	102.18 \pm 12.71 ^e

a:与对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与SAHA低剂量组比较, $P < 0.05$;d:与SAHA中剂量组比较, $P < 0.05$;e:与SAHA高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 SAHA对大鼠外周血T淋巴细胞亚群分化的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清Th1、Th17比例均显著升高,Treg比例显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠血清Th1、Th17比例均显著降低,Treg比例均显著升高,且有剂量依赖性($P < 0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大

鼠血清Th1、Th17比例均显著升高,Treg比例显著降低($P < 0.05$)。结果见图2(以Th1比例为例)、表4。

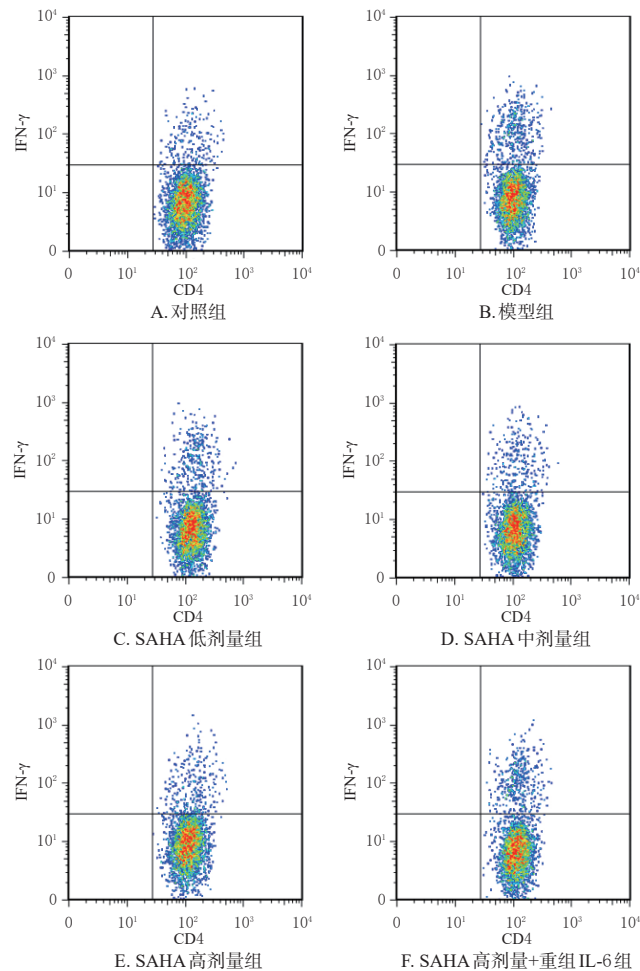


图2 各组大鼠外周血Th1比例的流式检测图

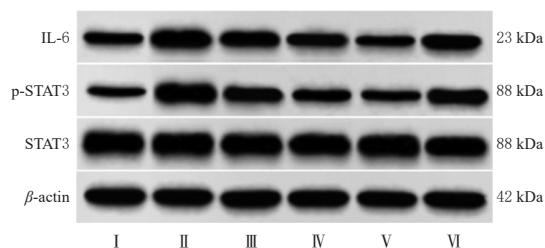
表4 各组大鼠外周血Th1、Th17、Treg比例比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Th1比例/%	Th17比例/%	Treg比例/%
对照组	4.42 \pm 0.46	1.51 \pm 0.25	13.82 \pm 1.42
模型组	7.39 \pm 0.78 ^a	3.58 \pm 0.36 ^a	7.34 \pm 0.87 ^a
SAHA低剂量组	6.42 \pm 0.68 ^b	2.81 \pm 0.30 ^b	8.62 \pm 0.94 ^b
SAHA中剂量组	5.19 \pm 0.57 ^{bc}	2.44 \pm 0.27 ^{bc}	10.29 \pm 1.26 ^c
SAHA高剂量组	4.85 \pm 0.48 ^{bd}	1.89 \pm 0.21 ^{bd}	12.58 \pm 1.23 ^{bd}
SAHA高剂量+重组IL-6组	6.83 \pm 0.69 ^e	3.15 \pm 0.33 ^e	7.85 \pm 0.84 ^e

a:与对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与SAHA低剂量组比较, $P < 0.05$;d:与SAHA中剂量组比较, $P < 0.05$;e:与SAHA高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3.6 SAHA对大鼠颌下腺组织中IL-6/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,SAHA各剂量组大鼠颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著降低,且有剂量依赖性($P < 0.05$);与SAHA高剂量组比较,SAHA高剂量+重组IL-6组大鼠颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图3、表5。



I: 对照组; II: 模型组; III: SAHA低剂量组; IV: SAHA中剂量组; V: SAHA高剂量组; VI: SAHA高剂量+重组IL-6组。

图3 各组大鼠颌下腺组织中IL-6/STAT3信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠颌下腺组织中IL-6/STAT3信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	IL-6/ β -actin	p-STAT3/STAT3
对照组	0.53 \pm 0.08	0.39 \pm 0.07
模型组	1.15 \pm 0.13 ^a	0.92 \pm 0.09 ^a
SAHA低剂量组	0.93 \pm 0.10 ^b	0.75 \pm 0.08 ^b
SAHA中剂量组	0.78 \pm 0.09 ^c	0.58 \pm 0.06 ^c
SAHA高剂量组	0.59 \pm 0.07 ^{cd}	0.46 \pm 0.05 ^{cd}
SAHA高剂量+重组IL-6组	1.03 \pm 0.10 ^e	0.87 \pm 0.09 ^e

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与SAHA低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与SAHA中剂量组比较, $P < 0.05$; e: 与SAHA高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

SS是一种累及唾液腺、泪腺等外分泌腺并干扰上述腺体免疫功能的慢性自身免疫性疾病,严重影响患者的生活质量^[1]。目前,SS的临床治疗以局部泪液和唾液替代物、免疫抑制剂、全身促分泌剂为主,但临床疗效有限,且有增加感染和恶性肿瘤发生的风险^[11]。因此,挖掘更安全、有效的治疗方法十分必要。

研究指出,SAHA能通过DNA甲基化和组蛋白乙酰化等表观遗传修饰来影响染色质构象,从而影响多种基因表达和蛋白结构,进而调节T淋巴细胞等免疫细胞的功能,现已被广泛用于肿瘤、炎症性疾病、自身免疫性疾病等多种疾病的治疗,如SAHA可通过下调Th17比例、上调Treg比例来调节Th17/Treg的平衡,从而减轻自身免疫性关节炎的相关症状^[6];可通过降低泪腺中促炎性细胞因子的表达,增加FoxP3的表达,调节Treg比例,从而缓解干眼症^[3]。本研究结果显示,经低、中、高剂量SAHA干预后,SS大鼠颌下腺组织病理损伤明显减轻,其病理评分、饮水量、脾脏指数均显著降低,唾液流量、颌下腺指数均显著升高,且上述指标的改变均有剂量依赖性,表明SAHA能剂量依赖性地改善SS大鼠的相关症状,减轻其颌下腺组织的病理损伤。

SS的发病机制尚未完全阐明,其中T细胞介导的慢性炎症反应和免疫系统平衡失调与该病的发生发展密切相关^[12]。研究表明,SS患者外周血Th1、Th17比例和血清IFN- γ 、IL-17水平均显著升高,其中IFN- γ 、IL-17分别为Th1、Th17的标志性细胞因子,主要存在于浸润的CD4⁺T细胞中,参与SS的发生^[13]。研究指出,Th17和

Treg在炎症和免疫反应中具有相反作用,Th17细胞可通过分泌特异性炎症因子来促进慢性炎症和自身免疫的发生,而Treg则可通过抑制Th17的过度激活来抑制炎症反应并维持外周Th17和Treg的动态平衡^[14]。此外,Treg可通过维持FoxP3蛋白的稳定表达来抑制生理、病理性免疫反应,并可通过分泌IL-10来维持机体免疫耐受,从而抑制自身免疫^[15]。已有研究表明,通过促进Treg的功能稳定和抑炎因子IL-10的分泌,可有效减缓SS的进展^[16]。可见,抑制Th1、Th17分化并促进Treg生成可能是抑制SS疾病发生发展的潜在策略。本研究结果显示,与对照组比较,SS大鼠血清IFN- γ 、IL-17水平和外周血Th1、Th17比例均显著升高,IL-10水平和Treg比例均显著降低,表明SS大鼠出现免疫失衡。经低、中、高剂量SAHA干预后,大鼠血清IFN- γ 、IL-17水平和外周血Th1、Th17比例均显著降低,IL-10水平和Treg比例均显著升高,且上述指标的改变均有剂量依赖性,表明SAHA可能通过改善免疫失衡来发挥对SS大鼠的改善作用。

IL-6作为一种重要的促炎性细胞因子,在慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病和恶性肿瘤中具有重要作用;STAT3是IL-6下游的主要信号因子,可通过磷酸化Tyr705残基而转位到细胞核中,活化的STAT3可与靶基因的启动子区域结合,从而介导细胞因子信号转导并引发免疫反应^[17]。此外,IL-6/STAT3信号通路在T细胞分化中具有关键作用,如Lai等^[18]研究指出,抑制该通路信号转导可调节Th17和Treg的平衡,从而减轻溃疡性结肠炎的症状;抑制STAT3的磷酸化可抑制泪腺中Th17相关基因和IL-17蛋白的表达,从而缓解持续性自身免疫性泪腺炎^[19];此外,抑制IL-6、STAT3、IL-17的表达,减少外周血和脾脏中Th1、Th17数量,增加Treg数量,可改善小鼠的唾液腺炎症和功能减退^[20]。本研究结果显示,SS大鼠颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著升高,表明IL-6/STAT3信号通路被激活;经低、中、高剂量SAHA干预后,大鼠颌下腺组织中IL-6蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平均显著降低,提示SAHA对免疫失衡的改善作用可能与抑制IL-6/STAT3信号通路有关。为进一步验证上述结果,本研究联合高剂量SAHA和IL-6/STAT3信号通路激活剂重组IL-6进行干预,结果显示,高剂量SAHA对SS大鼠免疫失衡和颌下腺损伤的改善作用被重组IL-6蛋白逆转,表明SAHA可通过抑制IL-6/STAT3信号通路来发挥对SS大鼠的免疫调节作用。

综上所述,SAHA可减轻SS大鼠的颌下腺损伤,调节其免疫功能,这种作用可能与抑制IL-6/STAT3信号通路有关。本研究为SS的治疗药物研究提供了新的方向,但其具体机制及临床应用还需进一步探究。

参考文献

- [1] NEGRINI S, EMMI G, GRECO M, et al. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease[J]. Clin Exp Med, 2022, 22(1):9-25.
- [2] ZENG P, LIU W, YANG X C, et al. Qing Zao Fang(QZF) alleviates the inflammatory microenvironment of the submandibular gland in Sjögren's syndrome based on the PI3K/Akt/HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. Dis Markers, 2022, 2022:6153459.
- [3] RATAY M L, BALMERT S C, BASSIN E J, et al. Controlled release of an HDAC inhibitor for reduction of inflammation in dry eye disease[J]. Acta Biomater, 2018, 71:261-270.
- [4] LU X, XU C, DONG J, et al. Liraglutide activates nature killer cell-mediated antitumor responses by inhibiting IL-6/STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Transl Oncol, 2021, 14(1):100872.
- [5] LI D W, CHEN J N, LIN B R, et al. Celastrol pretreatment attenuates concanavalin A-induced hepatitis in mice by suppressing interleukin-6/STAT3-interleukin-17 signaling[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2023, 38(5):821-829.
- [6] FUJIMURA T, FUJIMOTO T, ITAYA-HIRONAKA A, et al. Significance of interleukin-6/STAT pathway for the gene expression of REG I α , a new autoantigen in Sjögren's syndrome patients, in salivary duct epithelial cells[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2017, 52(3):351-363.
- [7] 宋维海, 李琴, 茅建春. 一贯煎对干燥综合征模型大鼠及颌下腺 PI3K/Akt/eNOS 通路的影响[J]. 中药材, 2020, 43(7):1721-1725.
- SONG W H, LI Q, MAO J C. Effect of yiguanjian on PI3K/Akt/eNOS pathway in Sjögren's syndrome model rats and submandibular glands[J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(7):1721-1725.
- [8] KIM D S, MIN H K, KIM E K, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid attenuates autoimmune arthritis by suppressing Th17 cells through NR1D1 inhibition[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019:5648987.
- [9] 周怡锦, 田新磊, 祝志朋, 等. 黄芪甲苷通过抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路调节肺脾气虚反复呼吸道感染模型大鼠的 Th17/Treg 细胞平衡[J]. 中药材, 2022, 45(9):2228-2233.
- ZHOU Y J, TIAN X L, ZHU Z P, et al. Astragaloside IV regulates Th17/Treg cell balance in rats with repeated respiratory infection due to deficiency of lung and spleen by inhibiting IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(9):2228-2233.
- [10] 文凤, 李清, 李萃, 等. 东莨菪碱法和高渗盐水法复制小鼠干燥综合征模型的比较[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(2):261-266.
- WEN F, LI Q, LI C, et al. Comparison of mice models of Sjögren's syndrome with scopolamine method and hypertonic saline method[J]. Chin J Immunol, 2023, 39(2):261-266.
- [11] ZHAN Q P, ZHANG J N, LIN Y B, et al. Pathogenesis and treatment of Sjögren's syndrome: review and update[J]. Front Immunol, 2023, 14:1127417.
- [12] GUO X Y, DANG W Y, LI N, et al. PPAR- α agonist fenofibrate ameliorates Sjögren syndrome-like dacryoadenitis by modulating Th1/Th17 and Treg cell responses in NOD mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(6):12.
- [13] LEE G A, CHANG C M, WU Y C, et al. Chinese herbal medicine SS-1 inhibits T cell activation and abrogates Th1 responses in Sjögren's syndrome[J]. J Formos Med Assoc, 2021, 120(1 Pt 3):651-659.
- [14] 王金凤, 黄海量, 刘杰, 等. 中药调控 Th17/Treg 平衡治疗类风湿关节炎的研究现状[J]. 中国药房, 2023, 34(6):763-768.
- WANG J F, HUANG H L, LIU J, et al. Research status of traditional Chinese medicine regulating Th17/Treg balance in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. China Pharm, 2023, 34(6):763-768.
- [15] 严宏, 严华. miR-135a 调节 Treg/Th17 免疫平衡参与变应性鼻炎模型小鼠发病及机制探讨[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(8):1628-1632.
- YAN H, YAN H. miR-135a regulates immune balance of Treg/Th17 and participates in pathogenesis of AR animal models and its mechanism[J]. Chin J Immunol, 2023, 39(8):1628-1632.
- [16] 程丹丹, 李永明, 侯佳奇, 等. 基于 Treg 细胞功能的稳定性探讨解毒通络生津方对干燥综合征模型鼠免疫调节的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9):119-128.
- CHENG D D, LI Y M, HOU J Q, et al. Immunoregulatory effect of Jiedu tongluo shengjin prescription on Sjögren's syndrome mice based on stability of Treg cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(9):119-128.
- [17] WANG Y Y, SANG X Q, SHAO R, et al. Xuanfei baidu decoction protects against macrophages induced inflammation and pulmonary fibrosis via inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283:114701.
- [18] LAI H M, YANG Z B, LOU Z H, et al. Root extract of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. modulates the Th17/Treg balance to attenuate DSS-induced colitis in mice by IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:615506.
- [19] ZHAO X Y, LI N, YANG N, et al. Thymosin β 4 alleviates autoimmune dacryoadenitis via suppressing Th17 cell response[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(11):3.
- [20] KIM J W, KIM S M, PARK J S, et al. Metformin improves salivary gland inflammation and hypofunction in murine Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1):136.

(收稿日期:2023-10-17 修回日期:2024-04-07)

(编辑:张元媛)