

CD300c-Ig 对小鼠关节损伤的影响及机制

田欣鑫^{1*}, 王立俊^{1*}, 李琳¹, 孙正达², 刘海燕¹

(1. 山东第一医科大学附属省立医院儿科, 山东 济南 250021;

2. 山东第一医科大学附属济南妇幼保健院新生儿科, 山东 济南 250001)

摘要:目的 探讨 CD300c-Ig 对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritish, CIA)小鼠关节损伤的影响及作用机制。方法 分别在第1天及第21天免疫 DBA/1J 小鼠,构建 CIA 模型,随机分为处理组和对照组,每组10只。处理组腹腔注射 20 μ g CD300c-Ig 100 μ L,1次/3d,共6次,总剂量为 120 μ g;对照组则腹腔注射相同质量的对照 Ig 蛋白(control-Ig),1次/3d,共6次。观察四肢关节肿胀程度,记录关节炎指数评分;DBA/1J 小鼠初次免疫 40 d 后,取小鼠脾脏制成单细胞悬液,流式细胞术检测调节性 T 细胞(T regulatory cells, Treg)、辅助性 T 细胞(T helper cells, Th17)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的表达;取小鼠下肢,脱钙,制成切片进行苏木精-伊红染色及番红 O 染色,观察小鼠关节病理特征并进行评分。采用荧光定量 PCR 法检测叉头框蛋白 P3(forkhead box protein P3, Foxp3)、白介素-17(interleukin-17, IL-17)和白介素-23(interleukin-23, IL-23)的 mRNA 表达。结果 处理组关节肿胀程度较对照组减轻,关节炎指数与对照组相比明显降低;苏木精-伊红染色及番红 O 染色显示,处理组关节滑膜细胞增殖较对照组减轻、血管翳形成、骨质侵蚀情况均比对照组有明显改善($P<0.05$);流式细胞术检测结果显示,处理组脾脏 Th17 细胞比例较对照组明显降低($P<0.05$),Treg 细胞比例较对照组明显升高($P<0.05$);同时,处理组脾脏 TNF- α 、IFN- γ 表达与对照组相比明显降低($P<0.05$);荧光定量 PCR 结果显示,处理组 IL-17 和 IL-23 mRNA 表达水平明显低于对照组。结论 CD300c-Ig 可减轻 CIA 小鼠的关节损伤,其机制与其对 Th17/Treg 细胞平衡的调控和抑制炎症因子的释放有关。

关键词:CD300c;细胞免疫;调节性 T 细胞;辅助性 T 细胞 17;胶原诱导性关节炎

中图分类号:R392.32

文献标志码:A

Effects of CD300c-Ig on joint injury in mice with collagen-induced arthritis

TIAN Xinxin^{1*}, WANG Lijun^{1*}, LI Lin¹, SUN Zhengda², LIU Haiyan¹

(1. Department of Pediatrics, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Department of Neonatology, Jinan Maternity and Child Care Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250001, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of CD300c-Ig on joint injury in collagen-induced arthritis (CIA) mice. **Methods** To construct the CIA model, DBA/1J mice were immunized on day 1 and day 21, and then randomly divided into the treatment group and control group, with 10 mice in either group. Mice in the treatment group were intraperitoneally injected with 100 μ L of 20 μ g CD300c-Ig once every 3 days for 6 times, with a total dose of 120 μ g; mice in the control group were intraperitoneally injected with control Ig of the same volume once every 3 days for 6 times. The degree of swelling in the joints of the extremities was observed and the arthritis index score was recorded. Forty days after the initial immunization, the spleens of the mice were taken to make single-cell suspension, and the expressions of T regulatory cells (Treg), T helper cells (Th17), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon-

γ (IFN- γ) were detected with flow cytometry. The lower limbs of the mice were taken, decalcified, and sliced for hematoxylin-eosin staining and safranin O staining to visualize the pathological features of the joints and to score them. The mRNA expressions of forkhead box protein P3 (Foxp3), interleukin-17 (IL-17) and interleukin-23 (IL-23) were detected with fluorescence quantitative PCR. **Results** The degree of joint swelling and AI in the treatment group were significantly reduced compared with those in the control group. Hematoxylin-eosin staining and safranin O staining showed that the proliferation of synoviocytes in the synovial joints of the treatment group was reduced, and the formation of vascular cataracts and the erosion of bone were significantly improved ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the proportion of Th17 cells in the spleens of the treatment group was significantly lower ($P < 0.05$) while the proportion of Treg cells was significantly higher ($P < 0.05$). The expressions of TNF- α and IFN- γ in the spleen of the treatment group were significantly lower ($P < 0.05$). Fluorescence quantitative PCR showed that the mRNA expressions of IL-17 and IL-23 in the treatment group were significantly lower. **Conclusion** CD300c-Ig can reduce joint injury in CIA mice, and the mechanism is related to its regulation of Th17/Treg cell balance and inhibition of inflammatory factor release.

Key words: CD300c; Cell-mediated immunity; T regulatory cell; T helper cell 17; Collagen-induced arthritis

T 淋巴细胞的活化在肿瘤、感染以及自身免疫性疾病的发生发展中具有重要的作用。而 B7 家族是重要的协同刺激分子,在维持 T 淋巴细胞免疫应答的第二信号中发挥重要作用,近年来程序性死亡受体-1 (programmed Death Receptor1, PD-1)/细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 等 B7 家族成员在癌症和自身免疫性疾病取得了良好的效果,使得 B7 家族的抗体、配体或受体成为研究热点^[1]。CD300c 是新型 T 细胞抑制分子,是近年发现的 B7 家族新成员。本课题组前期使用融合蛋白技术制备 CD300c IgG2a Fc (CD300c-Ig) 融合蛋白,并发现 CD300c-Ig 可通过与其受体结合,调节免疫细胞反应,调控 Treg 细胞的表达。对于 CD300c-Ig 的相关研究,尤其是 CD300c-Ig 对自身免疫疾病影响的研究较少^[2-5]。本研究通过建立胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 模型,CD300c-Ig 处理小鼠,观察关节损伤的程度,检测辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17)、调节性 T 细胞 (T regulatory cell, Treg)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 及叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein P3, Foxp3)、白细胞介素 17 (interleukin 17, IL-17) 和白细胞介素 23 (interleukin 23, IL-23) mRNA 的表达,探讨 CD300c-Ig 对 CIA 小鼠关节损伤的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄雄性 DBA/1J 小鼠 20 只,体质量(20 \pm 2)g,

购自北京维通利华实验动物技术有限公司,通过动物实验伦理审批 (NSFC: NO.2022-531),并饲养于山东第一医科大学附属省立医院模式动物研究所。

1.1.2 主要试剂与仪器

诱导 CIA 动物模型的弗氏完全佐剂 (F5881) 和不完全弗氏佐剂 (F5506) 购自美国 Sigma 公司,牛 II 型胶原蛋白 (20022) 购自美国 Chondrex 公司; FITC-抗小鼠 CD4 抗体 (100406)、APC-抗小鼠 CD25 抗体 (162106)、PE-抗小鼠叉头蛋白翼状螺旋转录因子 P3 (forkhead/winged helix transcription factor p3, Foxp3) 抗体 (126404) 和 PE-抗小鼠 IL-17A 抗体 (506904)、PE-抗小鼠 TNF- α (506104)、APC-抗小鼠 IFN- γ 抗体 (505810) 均购自美国 Bio-Legend 公司;总 RNA 提取试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;SYBR Green 购自美国 bimake 公司。LSR-Fortessa 流式细胞分析仪购自美国 BD 公司;Nano-drop2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Roche LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司;BX63 正置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组人 CD300c-Ig 融合蛋白的制备

将人 CD300c 的胞外结构域克隆到含有小鼠 IgG2a 恒定区的 pCMV6-AC-FC-S 表达载体中。将该载体转染 HEK293F 细胞,重组产生 CD300c-IgG2a (CD300c-Ig) 融合蛋白,用 protein G Sepharose 4 Fast Flow 方法从培养细胞上清液中提纯蛋白。提纯出的蛋白采用 Western blotting 方法进行验证,具体步骤见参考文献[5]。

1.2.2 小鼠 CIA 模型制备及分组

构建 CIA 模型:第 1 天,将弗氏完全佐剂与牛

Ⅱ型胶原蛋白等体积混合乳化后,进行初次免疫小鼠,在小鼠尾根部皮下注射 100 μL 乳化液;第 21 天,将弗氏不完全佐剂与牛Ⅱ型胶原蛋白等体积混合乳化后再次免疫小鼠,小鼠尾根部皮下注射 100 μL 混合后的乳化液。模型构建成功,将 20 只小鼠随机分为处理组和对照组,每组 10 只。在第 2 次免疫后,处理组小鼠腹腔注射 20 μg 的 CD300c-Ig 100 μL ,对照组小鼠腹腔注射相同质量的 control Ig,1 次/3 d,共 6 次^[6]。

1.2.3 AI 评分

在第 2 次免疫小鼠后,每隔 1 d 对小鼠四肢进行评分,AI 评分为 5 级。0 分:正常,关节无发红及肿胀;1 分:小趾关节有轻度发红及肿胀,没有任何关节畸形;2 分:脚趾关节及足跖部位出现发红及肿胀;3 分:踝关节以下脚掌发红肿胀,并出现关节变形;4 分:整个脚掌(包括踝关节在内的)发红及肿胀并且伴有运动功能障碍。AI 评分为每只小鼠四肢关节评分之和,最高总分为 16 分^[7]。

1.2.4 采用流式细胞术法检测 Treg、Th17 细胞及 CD⁴⁺T 细胞中 TNF- α 、IFN- γ 的表达

小鼠被处死后,留取脾脏,放置在孔径为 40 μm 细胞筛滤网上进行研磨,过滤匀浆,重悬细胞,制备成单细胞悬液,并加入 PBS 将细胞密度调整为 1×10^9 个/mL。取细胞悬液放置 EP 管中,每管 50 μL ,加 50 μL 流式染色缓冲液,分别进行染色。Treg 细胞检测:将 100 μL 染色缓冲液加入 EP 管重悬细胞,并加入 CD4-FITC 和 CD25-APC 抗体,放置冰上,避光处染色 30 min,冲洗 2 次,加入破膜剂,避光进行孵育 30 min,加破膜洗液冲洗 2 次,加入 2 μL Foxp3-PE 抗体,避光染色 30 min,破膜洗液冲洗

2 次。Th17 细胞及 TNF- α 、IFN- γ 检测:将 100 μL 缓冲液加入重悬细胞,并加入 CD4-FITC 抗体,冰上操作,避光染色 30 min,PBS 冲洗 2 次,加入破膜剂,避光,孵育 30 min,破膜洗液冲洗细胞 2 次,分别加入 2 μL 的 IL-17A-PE、TNF- α -PE 和 IFN- γ -APC 抗体,避光孵育 30 min,破膜洗液冲洗细胞 2 次。加入流式染色缓冲液 1 mL 上机检测。

1.2.5 采用苏木精-伊红染色及番红 O 染色法表达关节病理组织切片

将小鼠右后肢自踝关节以上约 1 cm 处截断,去除附着的皮肤和肌肉,放置于配置好的 Bouin's 固定液中 24 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 、13% EDTA(pH 7.4)中脱钙 7 d,石蜡包埋切片。切片经苏木精-伊红染色及番红 O 染色,封片,通过光学显微镜下观察各小鼠关节滑膜、软骨、骨组织的形态结构改变,观察其血管翳形成的情况,并依据文献[6]进行评分并记录,1 分:滑膜有较多单核细胞的浸润;2 分:滑膜可见单核细胞浸润及出现血管翳;3 分:不仅有单核细胞浸润、血管翳形成,还有纤维素沉着;4 分:出现较多单核细胞浸润、血管翳、纤维素沉着及滑膜增厚。

1.2.6 采用实时荧光定量法检测 Foxp3、IL-17 和 IL-23 mRNA 表达

研磨小鼠脾脏组织提取总 RNA,逆转录为 cDNA。引物序列见表 1,利用 SYBR Green qPCR Mix 进行荧光定量 PCR。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,40 个循环。内参基因为 GAPDH,放置机器中与待测样本共同扩增,每个样品均重复 3 次实验。根据各组平均 CT 值,计算 Foxp3、IL-17 和 IL-23 的相对表达水平。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	引物序列	
Foxp3	F:ACCTACGCCACGCTCATC	R:TCATTGAGTGTCGCTGCT
IL-17	F:ATCCTCGTCCCTGTCACCTGC	R:ACATGCTGAGGGAAGTTCTTGTC
IL-23	F:GAGCAGCAACCCTGAGTCCCTA	R:CAAATTTCCCTTCCCATCTAATAA
GAPDH	F:CGGAGTCAACGGATTGGTCGTATH	R:AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件。定量资料若通过 Shapiro-Wilk 正态性检验且方差齐性,则使用非配对 t 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 示,若满足正态性但经 Levene 检验方差不齐,则使用 welch 校正后的非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD300c-Ig 对 CIA 小鼠四肢关节形态及 AI 评分的影响

两组小鼠于第一次免疫 24 d 后,其四肢陆续出

现关节红肿,随着时间增加,膝、踝关节、趾间关节红肿程度明显增加,后期出现关节严重肿胀、畸形,无法站立及正常行走。AI评分均随时间延长而升高。

与对照组相比,处理组关节肿胀程度明显减轻,AI评分显著降低($P<0.05$)。见图1。

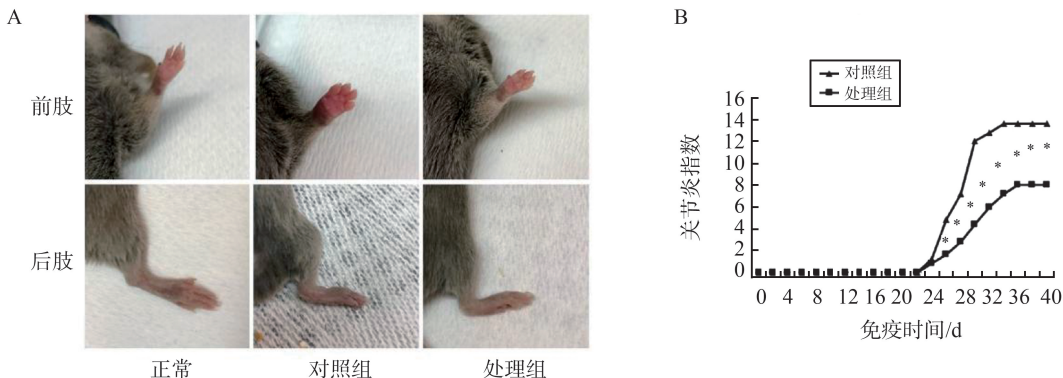


图1 CD300c-Ig对CIA小鼠关节形态(A)及AI评分(B)的影响 (* $P<0.05$ vs 处理组)

Figure 1 Effects of CD300c on joint morphology (A) and arthritis index (B) in CIA mice (* $P<0.05$ vs the treatment group)

2.2 CD300c-Ig对脾脏Th17/Treg细胞比例的影响

分离脾脏中的CD4⁺T细胞,Foxp3⁺CD25⁺代表Treg细胞,CD4⁺IL-17A⁺T细胞代表Th17细胞。处理组与对照组相比,Th17(CD4⁺IL-17A⁺)细胞比例明显降低($P<0.05$),Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)细胞

比例明显升高($P<0.05$)。见图2。

2.3 CD300c-Ig对CIA小鼠CD4⁺T细胞中TNF- α 、IFN- γ 表达的影响

与对照组相比,处理组CD4⁺T细胞中TNF- α 、IFN- γ 表达明显降低($P<0.05$)。见图3。

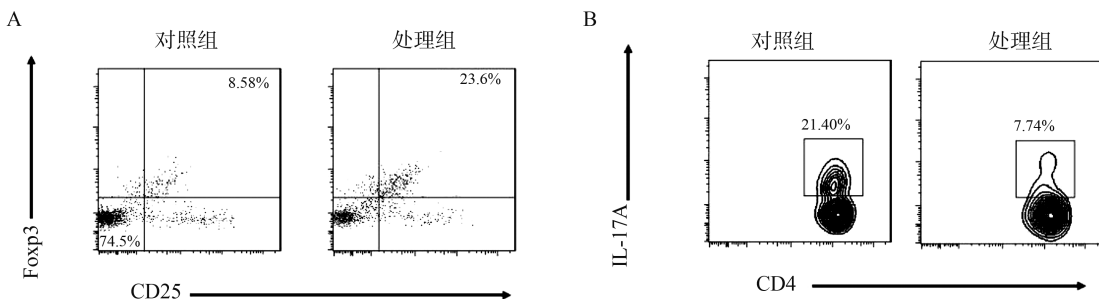


图2 CD300c-Ig对脾脏Th17/Treg细胞的影响

A: Treg细胞; B: Th17细胞。

Figure 2 Effects of CD300c-Ig on Th17/Treg cells of the spleen

A: Treg cells; B: Th17 cells.

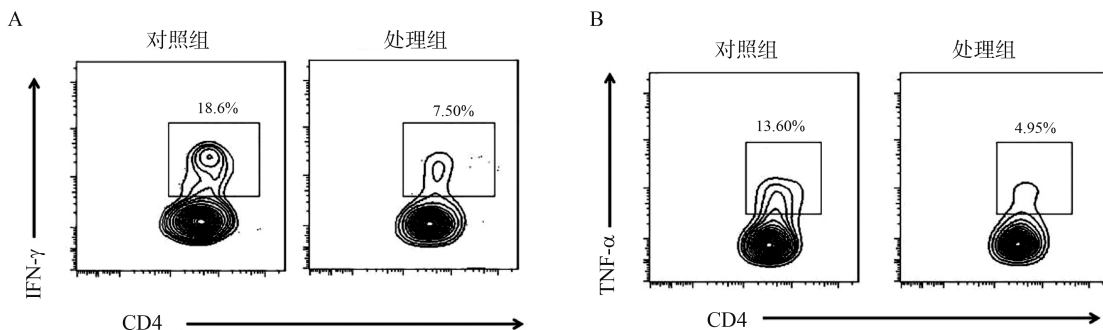


图3 CD300c对CIA小鼠T细胞中IFN- γ (A)、TNF- α (B)水平的影响

Figure 3 Effects of CD300c on IFN- γ (A) and TNF- α (B) levels in T cells

2.4 CD300c-Ig对CIA小鼠关节病理改变的影响

两组第一次免疫40d后,苏木精-伊红染色及

番红O染色显示,正常小鼠关节软骨边缘光滑完整,未见淋巴细胞浸润与软骨缺失;对照组病理切片

显示,关节中的滑膜细胞排列紊乱,细胞增生,并有大量炎性细胞浸润,肿胀,关节软骨被侵蚀,骨组织中骨小梁被破坏;与对照组相比,处理组滑膜细胞排

列紊乱及增生、炎性细胞浸润程度减轻,骨组织破坏侵蚀程度均减轻。处理组病理评分也显著降低。见图 4。

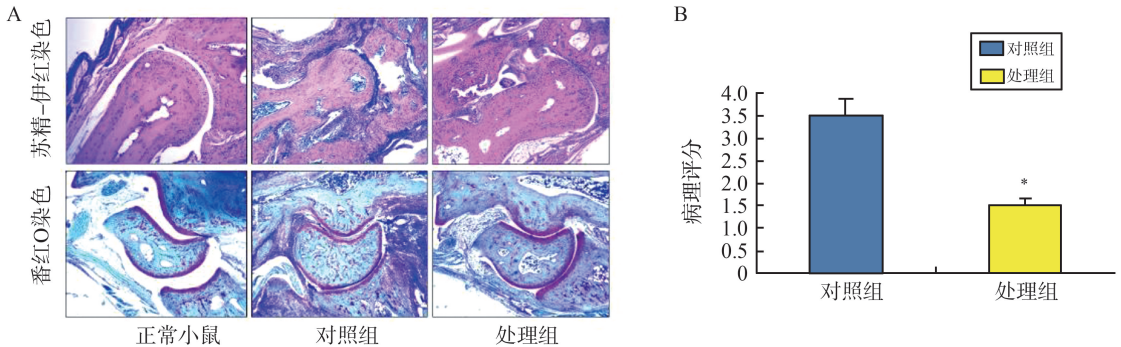


图 4 CD300c-Ig 对 CIA 小鼠关节病理组织学改变的影响

A: 小鼠关节病理切片苏木素-伊红染色及番红 O 染色 ($\times 100$); B: 病理评分结果 (* $P < 0.05$ vs 对照组)。

Figure 4 Effects of CD300c on joint histopathological changes in CIA mice

A: Pathological sections of mouse joints were stained with H&E or safranin O staining ($\times 100$); B: The results of pathology score (* $P < 0.05$ vs the control group).

2.5 CD300c-Ig 对小鼠脾脏中 Foxp3、IL-17、IL-23 mRNA 表达水平的影响

Foxp3 mRNA 表达表示小鼠脾脏 Treg 细胞分化水平, IL-17、IL-23 mRNA 表达表示小鼠脾脏中 Th17 细胞活化水平。实时荧光定量结果示,处理组 Foxp3 mRNA 表达量略高于对照组,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),处理组 IL-17、IL-23 mRNA 表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因尚未完全明确的自身免疫性疾病,其特征为关节慢性滑膜炎,导致关节强直、关节变形、出现功能丧失^[7]。在 RA 的研究过程中,T 淋巴细胞的活化及其细胞因子的产生,越来越引起人们的重视^[8]。T 细胞的活化及抗原特异性 T 细胞免疫应答的产生及维持至少需要 2 个信号,即抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 上 MHC II-抗原复合物与 T 细胞表面的 TCR/CD3 复合物相互作用产生的第一信号,第二信号是来自 APC 上的 B7 家族分子与其在 T 细胞上的配体 CD28 家族分子相结合产生的协同刺激信号,如 B7-1、B7-2 与 CD28、CTLA-4 结合,该途径被称为经典的 B7 途径。CD300 分子是近年发现的 B7 家族成员,位于染色体 17q25.1;由 7 个基因构成,即 CD300a~CD300g,在免疫应答及炎症中发挥重要的作用。CD300c 又名 CLM6、LIR、CMRF35、IGSFI6、CMRF35A^[9-13],近年研究发现,在 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状

细胞等抗原提呈细胞上有 CD300c 的表达,并证实其在 T 细胞的免疫应答第二信号中为共抑制分子^[9,14]。同时,在人单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞以及 B 和 T 细胞亚群中也相应地发现存在有 CD300c 受体^[11]。本课题组前期制备并验证了 CD300c-Ig 融合蛋白能够与 T 细胞表面的 CD300c 受体结合抑制效应性 T 细胞的增殖与活化,促进 Treg 细胞的分化,从而抑制免疫反应,改善移植宿主病小鼠的症状及预后,诱导免疫耐受;已经证实 CD300c 受体可在 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上表达,受体激活后表达水平上调^[4,5,14]。由此推测,CD300c-Ig 可能会抑制类风湿关节炎的进展。

有多项研究证实,外周 Treg 的比例在 RA 患者显著降低,而 Th17 细胞比例增加,细胞增殖,导致 RA 炎症和损伤的重要因素可能与 Th17/Treg 比例失衡有关^[15-18]。Treg 细胞能够分泌多种细胞因子如 IL-10 和 TGF- β ,这些细胞因子也在抑制淋巴细胞活化,诱导免疫耐受,预防及减轻自身免疫性疾病的发生发展过程中起了重要作用。Foxp3 是 Treg 细胞分泌的特异性转录因子,同时 Foxp3 又能调控 Treg 细胞的生长发育与免疫活性^[16],Treg 细胞数量减少或者 Foxp3 表达降低的现象,在自身免疫性疾病的病人及动物模型中均可被观察到。Th17 细胞是在自身免疫性疾病的进展中起促进作用重要的一类细胞,成骨细胞的核因子 κ B 受体活化因子配体在 Th17 细胞活化诱导下表达增加,加剧关节破坏的程度,研究证实,抑制 Th17 细胞的分化、减少 IL-17 分泌均能显著改善多种自身免疫性疾病进展^[17-19]。正常人体内 Treg 细胞与 Th17 细胞处于稳

态平衡,而 Th17 细胞过度活化, Treg/Th17 的比例失衡,在类风湿关节炎等自身免疫性疾病的患者中尤为突出^[20-22]。本研究结果显示, CD300c-Ig 能够减轻 CIA 小鼠关节损伤的病理改变,改善关节损伤程度,流式细胞检测结果证实, CD300c-Ig 能够显著降低 CIA 小鼠 Th17 细胞的活化增殖,增加 Treg 细胞的比例,荧光定量 PCR 结果进一步证实 CD300c-Ig 能够显著降低 Th17 细胞的活化增殖,在维持 Th17/Treg 细胞的平衡中起了重要作用。

炎性细胞因子对 RA 的发生也具有促进作用。其中 TNF- α 能刺激滑膜细胞产生炎症反应,释放基质金属蛋白酶,促进结缔组织降解和血管翳形成,最终导致 RA^[23-24]。Th1 细胞分泌的 INF- γ ,能激活抗原递呈细胞,发挥促炎作用,是标志性促炎细胞因子。INF- γ 能通过 Th1 活化巨噬细胞,促进表达 MHC I、II 类抗原,增强 NK 细胞活性,抑制纤维母细胞产生胶原,促进 RA 的进展^[25-27]。本研究结果显示, CD300c-Ig 能显著抑制炎性细胞因子 TNF- α 和 INF- γ 的产生,也是 CD300c-Ig 抑制 CIA 进展的重要原因及机制之一。

综上所述, CD300c 作为一种新型 T 细胞共抑制分子,能够与 T 细胞表面的 CD300c 受体结合抑制通路激活的特性,抑制 T 细胞的增殖与活化,从而抑制免疫反应,诱导免疫耐受;可通过调节 Th17/Treg 细胞的平衡及抑制 TNF- α 和 INF- γ 等炎性因子的释放,改善 CIA 小鼠的关节损害,可能是治疗 RA 等自身免疫性疾病的一种新策略。目前相关研究较少, CD300c 对自身免疫性疾病的作用及机制尚不明确,需更深入的研究。

参考文献:

[1] 李涛,王礼,张廷. Foxp3 磷酸化通过调控调节性 T 细胞功能对类风湿关节炎大鼠 TNF- α 抑制状态影响的分子机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(9): 921-924.
LI Tao, WANG Li, ZHANG Ting. Molecular mechanism of Foxp3 phosphorylation on the inhibition of TNF- α in rheumatoid arthritis rats by regulating regulatory T cell function[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2020, 19(9): 921-924.

[2] Vitallé J, Terrén I, Orrantia A, et al. Increased expression levels of CD300c on basophils from allergic individuals[J]. World Allergy Organ J, 2019, 12(9): 100060.

[3] Rozenberg P, Reichman H, Moshkovits I, et al. CD300 family receptors regulate eosinophil survival, chemotaxis, and effector functions[J]. J Leukoc Biol, 2018, 104(1):

21-29.

[4] Liu HY, Zhao J, Su M, et al. Recombinant CD300c-Ig fusion protein attenuates collagen-induced arthritis in mice [J]. Rheumatology (Oxford), 2022, 61(3): 1255-1264.

[5] Cui C, Su M, Lin Y, et al. A CD300c-fc fusion protein inhibits T cell immunity [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2657. doi: 10.3389/fimmu.2018.02657.

[6] 姜慧钰, 王林, 潘继红. siRNA 沉默 PCSK6 基因对胶原诱导性关节炎的影响 [J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(12): 20-26.
JIANG Huiyu, WANG Lin, PAN Jihong. Effects of PCSK6 silence by siRNA on FLS in CIA [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2015, 53(12): 20-26.

[7] Tian X, Wei W, Cao Y, et al. Gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes are immunosuppressive in preventing collagen-induced arthritis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(3): 693-708.

[8] Mourão AF, Fonseca JE, Canhão H, et al. Practical guide for the use of biological agents in rheumatoid arthritis-December 2011 update [J]. Acta Reumatol Port, 2011, 36(4): 389-395.

[9] Clark GJ, Cooper B, Fitzpatrick S, et al. The gene encoding the immunoregulatory signaling molecule CMRF-35A localized to human chromosome 17 in close proximity to other members of the CMRF-35 family [J]. Tissue Antigens, 2001, 57(5): 415-423.

[10] Takahashi M, Izawa K, Kashiwakura JI, et al. Human CD300C delivers an Fc receptor- γ -dependent activating signal in mast cells and monocytes and differs from CD300A in ligand recognition [J]. J Biol Chem, 2013, 288(11): 7662-7675.

[11] Simhadri VR, Mariano JL, Gil-Krzewska A, et al. CD300c is an activating receptor expressed on human monocytes [J]. J Innate Immun, 2013, 5(4): 389-400.

[12] Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells [J]. J Exp Med, 2001, 193(7): 839-846.

[13] Jackson DG, Hart DN, Starling G, et al. Molecular cloning of a novel member of the immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor [J]. Eur J Immunol, 1992, 22(5): 1157-1163.

[14] Dimitrova M, Zenarruzabeitia O, Borrego F, et al. CD300c is uniquely expressed on CD56 bright Natural Killer Cells and differs from CD300a upon ligand recognition [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23942. doi: 10.1038/srep23942.

[15] Paradowska-Gorycka A, Wajda A, Romanowska-Próchnicka K, et al. Th17/treg-related transcriptional factor expression and cytokine profile in patients with rheumatoid arthritis [J].

- Front Immunol, 2020, 11: 572858. doi: 10.3389/fimmu.2020.572858.
- [16] 李智伟, 田永芳, 卢佩佩, 等. 类风湿性关节炎患者淋巴细胞和 Treg/Th17 平衡的检测及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(16): 2026-2028.
- LI Zhiwei, TIAN Yongfang, LU Peipei, et al. Detection and significance of lymphocyte and Treg/Th17 balance in patients with rheumatoid arthritis [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(16): 2026-2028.
- [17] 杨金玲. 外周血中 Th17/Treg 亚群失衡与类风湿性关节炎的临床意义分析[J]. 黑龙江医学, 2019, 43(8): 957-959.
- YANG Jinling. Clinical significance of Th17/treg subsets imbalance in peripheral blood and rheumatoid arthritis[J]. Heilongjiang Medical Journal, 2019, 43(8): 957-959.
- [18] Jiang Q, Yang GC, Liu Q, et al. Function and role of regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 626193. doi: 10.3389/fimmu.2021.626193.
- [19] Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(3): 283-297.
- [20] Komatsu N, Takayanagi H. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(7): 415-429.
- [21] Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, et al. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:3908061. doi:10.1155/2017/3908061.
- [22] Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2018, 87: 1-15. doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.007.
- [23] Qin Y, Cai ML, Jin HZ, et al. Age-associated B cells contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing activation of fibroblast-like synoviocytes via TNF- α -mediated ERK1/2 and JAK-STAT1 pathways [J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81(11): 1504-1514.
- [24] 罗硕. 类风湿性关节炎患者血清 IL-6 和 TNF- α 水平临床意义探讨[J]. 中国保健营养, 2018, 28(12): 11-12.
- LUO Shuo. The investigation of clinical significance of serum IL-6 and TNF - alpha levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. China Health Care & Nutrition, 2018, 28(12): 11-12.
- [25] Kato M. New insights into IFN- γ in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors [J]. Immunol Med, 2020, 43(2): 72-78.
- [26] Hayashi S, Matsubara T, Fukuda K, et al. Predictive factors for effective selection of Interleukin-6 inhibitor and tumor necrosis factor inhibitor in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Sci Rep, 2020, 10: 16645. doi: 10.1038/s41598-020-73968-3.
- [27] 徐连那, 李旭艳, 庞琳娜, 等. 类风湿性关节炎患者外周血 Th1/Th2 细胞因子与继发骨质疏松症的关系研究[J]. 国际免疫学杂志, 2023, 46(1): 25-32.
- XU Lianna, LI Xuyan, PANG Linna, et al. Relationship between Th1/Th2 cytokines in peripheral blood and secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis patients [J]. International Journal of Immunology, 2023, 46(1): 25-32.

(编辑:徐苗蓁)