

分 类 号: R392.12
研究生学号: 2018731008

单位代码: 10183
密 级: 公开



吉林大学

博士学位论文

A20 通过介导 STAT3 的泛素依赖性蛋白酶体降解调节 Th17 的分化

A20 regulates Th17 differentiation by mediating ubiquitin-
dependent proteasomal degradation of STAT3

作者姓名: 马东宵

专 业: 生物化学与分子生物学

研究方向: 自身免疫性疾病

指导教师: 曾 雷 教授

培养单位: 吉林大学白求恩第一临床医学院

2024 年 5 月



A20 通过介导 STAT3 的泛素依赖性蛋白酶体降解调节 Th17 的分化

A20 regulates Th17 differentiation by mediating ubiquitin-
dependent proteasomal degradation of STAT3

作者姓名：马东宵

专业名称：生物化学与分子生物学

研究方向：自身免疫性疾病

指导教师：曾 雷 教授

学位类别：理学博士

培养单位：吉林大学白求恩第一临床医学院

论文答辩日期：2024 年 5 月 26 日

授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会组成：

	姓名	职称	工作单位
主席	宫 旭	教授	吉林大学
委员	邱家章	教授	吉林大学
	郑学星	教授	山东大学
	丁 强	教授	清华大学
	常鹏宇	教授	吉林大学

中文摘要

A20 通过介导 STAT3 的泛素依赖性蛋白酶体降解调节 Th17 的分化

研究背景:

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种慢性炎症性自身免疫病, 属于中轴型脊柱关节炎的一种, 其发病主要累及中轴骨骼和骶髂关节, 导致骨骼结构和功能的失常, 严重影响患者的生存质量。目前为止, 强直性脊柱炎的发病机制还不完全清楚, 但许多研究表明遗传易感性、环境因素以及免疫细胞和细胞因子等均在强直性脊柱炎的发病过程中起到关键作用。

CD4⁺辅助性 T 淋巴细胞是细胞免疫的介质, 在活化其它免疫细胞以及调节免疫反应中起着关键作用, 它进一步分化为以细胞因子分泌和效应功能为特征的 Th1、Th2、Th17 和 Treg 等亚群, 这些亚群在外周血中由固有免疫细胞诱导分化, 产生细胞因子, 从而在适应性免疫、癌症、炎症和自身免疫病中发挥重要作用。

免疫细胞和细胞因子在强直性脊柱炎的发生发展中扮演着重要角色, 其中 Th17 细胞比例增加及其释放的炎症因子最为重要, 因此研究者们对 Th17 细胞的分化诱导机制进行了详尽研究。研究表明, TGF- β 、IL-1、IL-6、IL-21 和 IL-23 等细胞因子可促进 Th17 分化, 而 IL-2、IL-4、IL-27、IL-35 和 IL-Y 等细胞因子可阻碍 Th17 分化。此外, 研究发现 ROR γ t、ROR α 、STAT3、IRF4、BATF、JunB、SMAD2 和 SMAD3 等转录因子可激活 Th17 分化, 而 STAT4、STAT5 和 SMAD4 等转录因子可抑制 Th17 分化。基于上述机制研究, 人们已开发出了包括 TNF 抑制剂、IL-23 阻滞剂、IL-17A 阻滞剂以及 JAK 抑制剂等多种治疗强直性脊柱炎的药物, 然而这些药物的疗效并不十分令人满意。因此, 研究者们也在不断探索 Th17 分化机制以及治疗强直性脊柱炎的新药物和新疗法。

肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (TNFAIP3) 基因可编码 A20 蛋白, 此蛋白被认为是一种泛素编辑酶, 在无细胞和细胞系统中表现出去泛素化酶、E3 泛素连接酶和泛素结合活性, 可通过去泛素化和泛素化机制分别调节多条炎症因子信号通路的活性。研究表明, A20 的表达异常和功能突变与多种炎症、自身免疫病和恶

性疾病相关，其中就包括强直性脊柱炎。然而截止目前，A20 在 Th17 分化和强直性脊柱炎发生发展中的作用机制和临床意义尚未被人们所关注。

赤霉素 (gibberellic acids, GAs) 是一类具备生长调节功能的重要植物激素，在农业和生态学领域有很多研究应用。此前研究发现，赤霉素 GA3 可以在人呼吸道上皮细胞中诱导 A20 的表达从而发挥抗炎效果，这启发我们 GA3 是否同样也可以诱导 Th17 细胞中 A20 的表达，从而在强直性脊柱炎的治疗中发挥一定的作用。由于之前有多项研究表明 GA3 可在特定剂量下通过介导氧化应激导致明显的机体毒性，因此针对 GA3 的临床前研究需要依据其药代动力学指标严格控制其用法用量。在药代动力学研究中，一个关键的内容就是测定血药浓度，因此我们在本研究中还对测定血液中药物浓度的方法进行了优化改进，从而为评估利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性打下技术基础。

研究目的:

在本研究中，我们首次探究了 A20 对于 Th17 分化的调控机制，并力求以此调控机制为靶点探索利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性。

研究方法:

用酶联免疫吸附实验检测了血清中 Th 细胞相关细胞因子的浓度、IL-17A 分泌水平。用流式细胞术分析了 Th17 细胞比例，总 T 细胞和 Th17 细胞中 A20 的蛋白表达水平和 Jurkat 细胞向 Th17 分化水平情况。通过基因过表达和敲低实验发现 A20 可负调控 Th17 细胞分化以及 IL-17 的表达和分泌。用免疫印记评估目标蛋白表达水平，免疫共沉淀 (Co-IP) 分析蛋白间相互作用或泛素化修饰。实时定量 PCR (qRT-PCR) 测定 IL-17A mRNA 表达水平。用 TaqMan 实时定量 PCR 法对 756 例强直性脊柱炎患者和 1001 例健康对照样本进行基因分型。用荧光素酶实验分析单核苷酸多态性对 *TNFAIP3* 基因表达的调控作用。细胞活力检测方法和细胞内活性氧水平检测方法评价 GA3 毒性。利用 LC-MS³ 策略检测血液中药物浓度。

研究结果:

我们发现与健康对照相比,强直性脊柱炎患者血清中的 IL-17A、IFN γ 、IL-2 和 IL-6 等细胞因子浓度显著升高,IL-10 和 TNF- α 的浓度略有升高,而 IL-4 的浓度略有降低。这些结果表明强直性脊柱炎患者发展出了炎症因子释放紊乱的现象。IL-17 在强直性脊柱炎发生发展的病理机制中扮演着重要角色,因此我们探究了强直性脊柱炎患者血清中 IL-17A 显著增高的原因,通过流式细胞术技术,发现 IL-17A 浓度的升高是由 Th17 细胞比例增加所导致的。为探究强直性脊柱炎患者血液中 Th17 细胞比例增加是否与 A20 的表达相关,我们从健康人和强直性脊柱炎患者的外周血中分离出了总 T 细胞和 Th17 细胞并考察了其中 A20 的蛋白表达水平,发现总 T 细胞中 A20 的蛋白表达并无显著变化,但 Th17 细胞中 A20 的蛋白表达显著减少。那么 A20 是否能直接调控 Th17 细胞分化以及 IL-17 的分泌和表达呢?通过基因过表达和敲低实验,我们发现 A20 可负调控 Th17 细胞分化以及 IL-17 的表达和分泌。进一步的机制研究表明,A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解从而负调控 STAT3,进而抑制 Th17 细胞的分化和 IL-17 的表达和分泌。强直性脊柱炎患者 Th17 细胞中 A20 的表达又是通过什么机制被抑制的呢?为了探索这一原因,我们考察了 *TNFAIP3* 基因单核苷酸多态性和 A20 表达之间的关联,发现 rs7749323 和 rs10499194 位点的突变等位基因频率在中国东北汉族人群 AS 患者中偏低,仅为 3.84%和 4.56%,且 AS 患者 rs7749323 位点的突变等位基因频率低于健康对照组,AS 患者 rs10499194 位点的突变等位基因频率高于健康对照组。然而遗憾的是 rs7749323 和 rs10499194 位点等位基因的突变对 A20 的表达水平未见明显差异,导致的原因可能是 AS 患者的样本量偏低,SNPs 突变的样本数量较少,西方研究已经报道的 SNPs 在中国东北地区 AS 患者人群中不具有功能性。

先前研究发现赤霉素 GA3 可以在人呼吸道上皮细胞中诱导 A20 的表达从而发挥抗炎效果,因此我们接下来考察了 GA3 是否也同样可以诱导 Th17 细胞中 A20 的表达,从而通过对 STAT3 的调控来抑制 IL-17A 的表达和分泌。我们设置了高低两种浓度的 GA3 处理组,发现两种浓度的 GA3 处理均可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分泌,且均未引起 Th17 细胞活力下降或活性氧积

累，这说明 GA3 有可能在不引起毒性效应的浓度下在强直性脊柱炎的治疗中发挥作用。这让我们对 GA3 在临床前研究中的表现具备了一定信心。因此我们在本研究中还对测定血液中药物浓度的方法进行了优化改进，从而为评估利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性打下技术基础。具体而言，我们在本研究中首次尝试使用基于 Qtrap 串联质谱仪的 MS³ 策略监测血药浓度，并以临床上用于治疗癫痫病和神经性疼痛的卡马西平作为待测物进行了概念验证实验，并对此方法的准确度、精密度、选择性、线性范围、定量下限等参数进行了评估，发现此方法具有灵敏度高、信噪比高、所需样品量小等优点，是一种高效的临床血药浓度的监测方法。

综上所述，本研究发现 A20 可通过介导 STAT3 泛素化降解从而抑制 Th17 细胞的分化、IL-17A 的表达以及 IL-17A 的分泌，因此 AS 患者中 A20 表达偏低可能是诱导 Th17 分化及促进 IL-17A 表达的重要因素。研究还发现 GA3 可以在不引起细胞毒性和活性氧积累的情况下抑制 Th17 细胞分泌 IL-17A 细胞因子。此外，本研究还成功建立了基于 LC-MS³ 监测血液药物浓度的技术手段。上述研究发现阐明了 Th17 分化的一种新调控机制，说明 GA3 具备用于治疗强直性脊柱炎的潜力，还为包括 GA3 在内的血药浓度监测奠定技术基础。SNPs 分析尽管未见明显差异，还将继续收集样本，并希望通过 GWAS 分析检测中国东北 AS 患者中特异性 SNPs 位点。本研究将为关于强直性脊柱炎的基础和临床前研究提供新的思路和技术手段。

关键词：

强直性脊柱炎（AS），*TNFAIP3*/A20，GA3，Th17，LC-MS³

Abstract

A20 regulates Th17 differentiation by mediating ubiquitin-dependent proteasomal degradation of STAT3

Background:

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory autoimmune disease, belonging to axial spinal arthritis, which mainly involves axial bones and sacroiliac joints, leading to disorders of bone structure and function, and exerts a negative impact on patients' quality of life. To date, the pathogenesis of ankylosing spondylitis has yet been fully understood, but many studies have shown that genetic susceptibility, environmental factors, and immune cells and cytokines play a key role in the pathogenesis of ankylosing spondylitis.

CD4⁺ helper T lymphocytes are the mediators of cellular immunity regulating the activation of other immune cells and immune response. They can further differentiate into Th1, Th2, Th17 and Treg subgroups characterized by cytokine secretion and effector function upon being induced by innate immune cells in the periphery, and they play an important role in adaptive immunity, cancer, inflammation, and autoimmune diseases by producing cytokines.

Immune cells and cytokines are crucial for the occurrence and development of ankylosing spondylitis, among which the increase in the proportion of Th17 cells and the release of inflammatory factors are the most important influencing factors. Therefore, the mechanisms modulating Th17 differentiation have attracted intensive research interest. Studies have shown that cytokines TGF- β , IL-1, IL-6, IL-21 and IL-23 can promote Th17 differentiation, while IL-2, IL-4, IL-27, IL-35 and IL-10 can hinder Th17 differentiation. In addition, transcription factors ROR γ t, ROR α , STAT3, IRF4, BATF, JunB, SMAD2, and SMAD3 were found to activate Th17 differentiation, while STAT4, STAT5, and SMAD4 were found to inhibit Th17 differentiation. Based

on the aforementioned research, a variety of drugs have been developed for the treatment of AS, including TNF inhibitors, IL-23 blockers, IL-17A blockers and JAK inhibitors, but the efficacy of these drugs was found to be suboptimal. Hence there is an imperative need for continuous exploration of new drugs and therapies for ankylosing spondylitis treatment.

The A20 protein encoded by the tumor necrosis factor α -induced protein 3 (*TNFAIP3*) gene is considered to be a ubiquitin editing enzyme and exhibits ubiquitin binding, E3 ubiquitin ligase and deubiquitinase activities in acellular and cellular systems, which can regulate the activity of multiple inflammatory cytokine-triggered signaling pathways through deubiquitination and ubiquitination mechanisms, respectively. Studies have shown that abnormal expression and functional mutations of A20 are associated with a variety of inflammatory, autoimmune and malignant diseases, including AS. However, there has been insufficient research on the role and clinical significance of A20 in Th17 differentiation and the development of AS.

Gibberellin (GAs) are a group of plant hormones regulating the growth of plants that have been widely investigated and applied in the fields of agriculture and ecology. A previous study found that GA3 can induce the expression of A20 in human respiratory epithelial cells to exert anti-inflammatory effects. Inspired by this finding, we hypothesized that GA3 may be a potential anti-AS drug that functions through modulating the expression of A20 in Th17 cells. As a number of previous studies have shown that GA3 can lead to significant toxicity in vivo through mediating oxidative stress at specific doses, preclinical studies on GA3 will require strict control on its usage and dosage according to its pharmacokinetic indexes. A crucial part of pharmacokinetic studies is the determination of blood drug concentration. Therefore, we also developed and optimized a novel method for the determination of blood drug concentration in this study, so as to lay a technical foundation for evaluating the possibility of using GA3 in the treatment of AS.

Objective:

This study explored the possibility of using GA3 to treat AS by delving into the regulatory mechanism of A20 on Th17 differentiation for the first time.

Methods:

The levels of Th cell related cytokines and IL-17A secretion in serum are measured by ELISA. The proportion of Th17 cells, the expression level of A20 protein in total T cells and Th17 cells, and the differentiation level of Jurkat cells to Th17 are analyzed by flow cytometry. Through gene overexpression and knockdown experiments, it is found that A20 negatively regulates Th17 cell differentiation and IL-17 expression and secretion. Western blot is used to assess the expression level of target proteins, and co-immunoprecipitation (Co-IP) is used to analyze protein-protein interactions or ubiquitination modifications. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) is used to determine IL-17A mRNA expression. 756 patients with ankylosing spondylitis and 1001 healthy control samples are genotyped by TaqMan real-time quantitative PCR. The regulation effect of single nucleotide polymorphisms on *TNFAIP3* gene expression is analyzed by luciferase assay. GA3 toxicity is evaluated by cell viability assay and intracellular reactive oxygen species assay. The drug concentration in blood is detected by LC-MS³ strategy.

Conclusions:

First, we compared the concentrations of Th cell-related cytokines in serum of AS patients with those of healthy controls by enzyme-linked immunosorbent assays and found that the serum concentrations of IL-17A, IFN- γ , IL-2 and IL-6 in AS patients were significantly increased compared to healthy controls. Additionally, the serum concentrations of IL-10 and TNF- α were slightly higher, while that of IL-4 was slightly lower in AS patients relative to the healthy controls. These results suggest that the included AS patients exhibited a disordered pattern of inflammatory factor release. IL-17 plays an important role in the pathogenesis of AS. Therefore, we investigated the mechanism underlying the significant increase of serum IL-17A in AS patients. Through flow cytometry, we found that the increase in serum IL-17A concentration

could be ascribed to increased Th17 cell proportions in the peripheral blood of AS patients. Then we explored whether the increase in the proportion of Th17 cells in the blood of patients with ankylosing spondylitis was associated with A20 dysregulation. We isolated total T cells and Th17 cells from peripheral blood of healthy controls and AS patients and investigated the expression level of A20 protein in these cells. The results indicated that there was no significant difference in the expression of A20 protein in total T cells between the two cohorts, whereas the Th17 cells of AS patients expressed significantly lower levels of A20 compared with those of healthy controls. These data imply that A20 may play a crucial role in regulating Th17 cell differentiation and IL-17 secretion and expression. To test this hypothesis, we performed gene overexpression and knockdown experiments and found that A20 can indeed inhibit Th17 cell differentiation and IL-17 expression and secretion. Further mechanism studies revealed that A20 can negatively regulate STAT3 expression by mediating its ubiquitination and proteasome degradation, thereby inhibiting Th17 cell differentiation and IL-17 expression and secretion. By what mechanism is A20 expression inhibited in Th17 cells in patients with ankylosing spondylitis? In order to explore this reason, we investigate the association between *TNFAIP3* gene single nucleotide polymorphism and A20 expression, and find that the mutation allele frequencies of rs7749323 and rs10499194 are low in AS patients of Northeast Chinese Han population, only 3.84% and 4.56%. The mutation allele frequency of rs7749323 in AS patients is lower than that of healthy control group, and the mutation allele frequency of rs10499194 in AS patients is higher than that of healthy control group. However, unfortunately, allele mutations at rs7749323 and rs10499194 show no significant difference in the expression level of A20, which may be caused by the low sample size of AS patients and the small number of SNPs mutations, and SNPs reported in Western studies to be not functional in AS patients in northeast China.

Previous studies have found that GA3 can induce the expression of A20 in human respiratory epithelial cells to exert anti-inflammatory effects. Therefore, we next

investigated whether GA3 can also induce the expression of A20 in Th17 cells, thereby inhibiting the expression and secretion of IL-17A through the regulation of STAT3. We set up two treatment groups with high and low concentrations of GA3, and found that both concentrations of GA3 could reduce the expression and secretion of IL-17A through the A20-STAT3 regulatory axis. At the same time, the GA3 treatments did not significantly affect the viability of Th17 cells or their reactive oxygen species levels. This suggests that GA3 can exert therapeutic effects at the doses that do not elicit toxicity during AS treatment and gives us confidence on the performance of GA3 in preclinical studies. Therefore, we next developed and optimized the method for the determination of blood drug concentration in this study, so as to lay a technical foundation for evaluating the possibility of using GA3 in the treatment of AS. Specifically, we utilized the LC-MS³ strategy based on Qtrap series mass spectrometer to monitor blood drug concentration for the first time, and conducted a proof-of-concept experiment with carbamazepine, which is clinically used in the treatment of epilepsy and neuropathic pain, to evaluate the accuracy, precision, selectivity, linear range, lower limit of quantification and other parameters of this method. It was found that this method had the advantages of high sensitivity, high signal-to-noise ratio and small sample size. Therefore, it is an efficient method for monitoring blood drug concentration in clinical settings.

In summary, this study found that A20 can inhibit Th17 cell differentiation, IL-17A expression and IL-17A secretion by mediating STAT3 ubiquitination degradation. It was also found that GA3 can inhibit the secretion of IL-17A cytokine by Th17 cells without causing cytotoxicity and accumulation of reactive oxygen species. In addition, this study also successfully established a technique for monitoring blood drug concentration based on LC-MS³. These findings shed light on a new regulatory mechanism for Th17 differentiation, verified the potential of using GA3 for the treatment of AS, and laid the technical foundation for monitoring blood concentration

of drugs including GA3. This study provides new ideas and technical means for basic and preclinical research on AS.

Keywords:

Ankylosing spondylitis (AS), *TNFAIP3/A20*, GA3, Th17, LC-MS³

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 免疫细胞和细胞因子在强直性脊柱炎发生发展中扮演的角色	1
1.1.2 Th17 细胞分化调控机制	4
1.1.3 强直性脊柱炎的治疗方案及其局限性	10
1.1.4 TNFAIP3 的生物学功能及其相关疾病	12
1.1.5 赤霉素在哺乳动物中的机体和细胞生物学效应	18
1.1.6 利用 LC-MS ³ 策略检测血液中药物浓度的基本原理与设想	19
1.2 研究目标.....	20
1.3 研究意义.....	20
第 2 章 材料与方法	21
2.1 实验材料.....	21
2.1.1 主要试剂和材料.....	21
2.1.2 主要仪器	23
2.2 实验方法.....	24
2.2.1 研究对象入组及排除标准.....	25
2.2.2 细胞的获取与培养.....	26
2.2.3 流式细胞术分析总 T 细胞和 Th17 细胞中 A20 表达的方法	27
2.2.4 流式细胞术分析人外周血中 Th17 细胞比例的方法	30
2.2.5 基因敲除/敲低与过表达方法	31
2.2.6 流式细胞术分析 Jurkat 细胞向 Th17 分化情况的方法 ...	33
2.2.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 IL-17A 分泌水平的方法.	33
2.2.8 实时定量 PCR(qRT-PCR)测定 IL-17A mRNA 表达水平的方法	34
2.2.9 免疫印记评估目标蛋白表达水平的方法	36
2.2.10 免疫共沉淀(Co-IP)分析蛋白间相互作用或泛素化修饰的方法	39
2.2.11 基因组 DNA 的提取方法	40
2.2.12 TaqMan 实时定量 PCR 法鉴定 SNP 位点的基因型	40
2.2.13 双荧光素报告基因法分析 TNFAIP3 单核苷酸多态性对其转录活性的影响	42

2.2.14 细胞活力检测方法.....	44
2.2.15 细胞内活性氧水平检测方法.....	44
2.2.16 利用 LC-MS ³ 策略检测血液中药物浓度方法的构建	45
2.2.17 数据处理与分析.....	46
第 3 章 结果与讨论	49
3.1 实验结果.....	49
3.1.1 强直性脊柱炎患者表现出炎症因子释放紊乱	49
3.1.2 强直性脊柱炎患者外周血中 Th17 细胞比例升高.....	51
3.1.3 强直性脊柱炎患者外周血 Th17 细胞中 A20 的表达降低	52
3.1.4 A20 可负调控人外周血 Th17 细胞中 IL-17 的分泌和表达	53
3.1.5 A20 可抑制 Th17 分化.....	55
3.1.6 STAT3 可能是 A20 调控 Th17 分化的关键转录因子	56
3.1.7 A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解从而负调控 STAT3	58
3.1.8 TNFAIP3 基因单核苷酸多态性与 A20 表达之间的关联性 研究	62
3.1.9 GA3 可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分 泌	68
3.1.10 GA3 处理并未导致 Th17 细胞活力下降或活性氧积累	70
3.1.11 建立基于 LC-MS ³ 策略测定血液药物浓度的技术手段	70
3.2 讨论.....	78
第 4 章 结论.....	83
参考文献.....	85

第1章 绪论

1.1 研究背景

自身免疫病是由于机体对自身抗原的免疫耐受丧失和持续的自身免疫反应，导致自身抗体的过度产生和器官损伤，进而造成的一种免疫类疾病。常见的自身免疫病包括银屑病、重症肌无力、系统性红斑狼疮以及强直性脊柱炎等。

1.1.1 免疫细胞和细胞因子在强直性脊柱炎发生发展中扮演的角色

强直性脊柱炎（ankylosing spondylitis, AS）是一种慢性炎症性自身免疫病，属于中轴型脊柱关节炎（axial spondyloarthritis, axSpA）的一种^[1-2]。其发病主要累及中轴骨骼和骶髂关节，导致骨骼结构和功能的失常。据统计，患有强直性脊柱炎的人群约占总人群的 0.7-3.2%，且男性的比例高于女性^[3-4]。与类风湿性关节炎相比，强直性脊柱炎的炎性损伤部位一般不涉及关节滑膜，而主要局限于肌腱或韧带与骨之间的界面（称为嵌体），以及软骨与骨之间的界面，主要在骶髂关节和脊柱中。先前研究证实，主要组织相容性复合体（MHC）单倍型人类白细胞抗原 B27（HLA-B27）与 AS 的病因有关，然而 HLA-B27 仅占 AS 遗传易感性的 20%-30%。到目前为止，在全基因组关联研究（GWAS）中已经发现了许多潜在的非 HLA 强直性脊柱炎相关遗传因素，其中包括一些易感基因座^[5-6]。目前为止，关于强直性脊柱炎的发病机制还不完全清楚，但许多研究显示，遗传易感性、环境因素以及免疫细胞和细胞因子均在强直性脊柱炎的发病过程中起到关键作用。

CD4+辅助性 T 淋巴细胞（Th）是细胞免疫的介质，在活化其它免疫细胞（如 B 细胞和细胞毒性 T 细胞）以及调节免疫反应中起着关键作用。Th₀ 进一步分化为以细胞因子分泌和效应功能为特征的 Th1、Th2、Th17 和 Treg 等亚群，这些亚群在外周由固有免疫细胞的诱导而实现分化，它们通过产生细胞因子在适应性免疫、癌症、炎症和自身免疫病中发挥重要作用。

1.1.1.1 Th1/Th2 数量比例与强直性脊柱炎的关系

Th1 细胞主要分泌引起炎症和抗病毒作用的细胞因子,如白介素-2 (IL-2)、IL-12、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、和 TNF- β 等,介导细胞免疫反应,起到免疫杀伤作用。Th1 细胞也可促进 B 细胞产生抗体、活化巨噬细胞、自然杀伤细胞和其他细胞毒性淋巴细胞,并可促进迟发型超敏反应。在诱发器官特异性自身免疫疾病、器官移植排斥反应和抗感染免疫中起着重要的免疫调节作用。Th2 细胞主要分泌白细胞介素 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等,调节体液免疫反应,抑制 T 细胞活化,使机体得以接受外来细胞,如在器官移植或妊娠时。Th2 细胞还可以促进细胞增殖、分化、抗体的产生和参与 B 淋巴细胞的体液免疫反应。当机体处于正常状态时, Th1 和 Th2 细胞的数量处于动态平衡状态,它们彼此调节、相互抑制,以维持正常的细胞免疫和体液免疫功能。当机体发生功能异常时, Th1 与 Th2 之间的数量平衡常常被打破,导致二者之一占据主导地位,这种现象被称为“Th1/Th2 漂移”,是造成人体细胞因子网络的动态平衡被破坏,导致疾病发生发展的重要机制。在不同免疫疾病中, Th1/Th2 的平衡漂移方向各不相同。Th1 过度活化时可能会导致免疫细胞攻击错误的目标,引发特异性的自身免疫性疾病,比如在类风湿关节炎、I 型糖尿病、多发性硬化、慢性甲状腺炎和器官移植排斥反应等疾病中, Th1 细胞占优势状态。而在系统性红斑狼疮、硬皮病以及一些常见的变态反应疾病中, Th2 细胞占优势状态。肿瘤患者的体内也存在着 Th1/Th2 漂移。当 Th2 细胞数量占优时, Th2 会过度抑制 Th1 细胞活性,此时机体易发感染和癌变,或可导致肿瘤的免疫逃逸。在强直性脊柱炎患者的血清中, Th1 细胞数量占优势状态, Th1/Th2 比值增高,此时 IFN- γ 和 TNF- α 水平较高而 IL-4 和 IL-10 的水平显著降低。其中 IFN- γ 和 TNF- α 是促炎因子,会导致关节炎的恶化,而 IL-4 和 IL-10 则是抗炎因子,可以缓解关节炎的症状。经过治疗后,强直性脊柱炎患者血清中的 Th1/Th2 比值降低,此时 IL-4 和 IL-10 的水平升高,而 IFN- γ 和 TNF- α 水平降低。这说明 Th1/Th2 的数量比和分泌的细胞因子水平高低可以反应强直性脊柱炎疾病的状态和疗效。

1.1.1.2 Th17 细胞与 IL-17 在强直性脊柱炎发生发展中的作用

Th17 在 2005 年首次被人们所认知, 其主要的生理功能是对抗细菌和真菌感染。Th17 细胞可释放多种细胞因子, 包括 IL-17-A、IL-17F、IL-22、IFN- γ 以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等^[7-8]。其中, 由 Th17 细胞释放的 IL-17 细胞因子在强直性脊柱炎的发病机制中扮演着至关重要的角色。据报道, 强直性脊柱炎患者体内产生 IL-17A 的细胞数量有显著增加^[9]。此外研究发现, 在强直性脊柱炎患者的血清、关节液和滑液中 IL-17 的水平均显著升高^[10]。因此, IL-17 已被公认为强直性脊柱炎的主要致病因子。在动物模型中, 针对 IL-17 的靶向性强直性脊柱炎疗法也取得了很好的效果, 进一步说明了 IL-17 在强直性脊柱炎发生发展中的重要性。尽管 IL-17A 和 IL-17F 具有促炎作用, 但二者本身并非强效促炎因子。事实上, 它们的强效促炎作用主要与其募集免疫细胞的功能以及与其 TNF、IL-1 β 、IFN- γ 、GM-CSF 和 IL-23 等其它促炎细胞因子的协同作用有关^[11]。

1.1.1.3 IL-23 在强直性脊柱炎发生发展中的作用

IL-23 是一种异二聚体细胞因子, 可由树突状细胞和巨噬细胞产生并由肠上皮分泌^[12]。研究表明 IL-23 的受体 IL-23R 与强直性脊柱炎的易感性有关^[13], 从而说明该细胞因子在强直性脊柱炎的发生发展中发挥着一定的功能。IL-23 在调节、激活和扩增 Th17 细胞以及诱导 IL-22 生成方面起到主要作用^[14]。此前的一项研究表明, IL-23 可以在 Th17 细胞已经产生 IL-17 之后提升 IL-17 的表达和分泌水平^[15]。后续一项实验研究表明, 在 IL-23 缺失的情况下, IL-6 和 TGF- β 可以介导非致病性 Th17 细胞分化^[16]。IL-23 还是肥大细胞、NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞亚群以及固有淋巴样细胞中 IL-17 和 IL-22 表达水平的主要调控者。研究表明, 强直性脊柱炎或中轴型脊柱关节炎患者体内有更多的 $\gamma\delta$ T 细胞, 这些细胞 IL-23R 并可产生 IL-17^[17-18]。此外, 用 IL-23 刺激 $\gamma\delta$ T 细胞可使 IL-17 的生成增加 6 倍, 而在添加抗 CD3/CD28 抗体后 IL-17 的生成水平进一步扩大至 9 倍^[19]。

1.1.2 Th17 细胞分化调控机制

从上述内容可以看出, Th17 细胞所分泌的细胞因子在强直性脊柱炎发生发展中处于核心调控地位, 因此研究者们也对 Th17 细胞的分化诱导机制进行了详尽研究, 以期开发出以 Th17 细胞为靶点的强直性脊柱炎新药物或疗法。相关研究现状如下:

1.1.2.1 调节 Th17 细胞分化的细胞因子

(1) 促进 Th17 分化的细胞因子

促进 Th17 分化的细胞因子包括 TGF- β 、IL-1、IL-6、IL-21 和 IL-23 等。其中, IL-6 和 TGF- β 是 Th17 分化不可或缺的细胞因子。此前研究利用小鼠模型证明了 IL-6 和 TGF- β 可通过调节 *IL-17F* 基因位点的染色质重塑来启动 Th17 分化^[20-22]。IL-6 可以通过激活信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 增强 ROR γ t 转录, 从而促进 Th17 分化^[23]。TGF- β 细胞因子可通过经典的 SMAD 信号转导或 SMAD 非依赖性途径上调 ROR γ t 表达水平、促进 Th17 细胞因子的产生, 从而调节 Th17 分化。矛盾的是, Yang 等人表明, TGF- β 可以诱导激活 FOXP3, 后者通过拮抗 ROR γ t 和 ROR α 来抑制 Th17 分化, 而 IL-6 可以克服 FOXP3 的抑制功能, 激活 STAT3 并下调 FOXP3, 以将诱导型 Treg 细胞转化为 Th17 细胞^[24-26]。此外 Tanaka 等人在 2018 年还报道了 Trim33 可以在 Th17 细胞中转导 TGF- β 信号通路, 从而增强 Th17 细胞的促炎功能^[27]。随后的一项研究发现 IL-6-STAT3 调控轴似乎在很大程度上依赖于保守的非编码序列 9 (CNS9) 来控制 ROR γ t 的表达, 而仅 TGF- β 就足以通过 SMAD 蛋白与 CNS6 的结合以 CNS6 依赖性的方式诱导 ROR γ t 的表达^[28]。这些发现说明 TGF- β 和 IL-6 可通过不同的顺式调节元件协同调节 ROR γ t 表达, 从而调控 Th17 细胞的分化。

IL-21 信号分子可作为 IL-6 的替代细胞因子, 在没有 IL-6 的情况下与 TGF- β 共同诱导 ROR γ t 的表达, 从而调节 Th17 细胞的分化^[29-30]。在 IL-21 诱导 Th17 细胞分化的过程中, SMAD4 是一个重要的调节因子^[31]。此外, IL-6 诱导的 IL-21 可以进一步促进 Th17 细胞的发育^[32]。

IL-23 的功能主要是维持 Th17 细胞的表型。此外, IL-23 还可以驱动人 Th17 细胞分化, 同时在没有 CD28 共刺激的情况下增加葡萄糖摄取和糖酵解^[33], 这说明 IL-2 可通过调节细胞代谢影响 Th17 细胞的分化。重要的是, TGF- β 和 IL-6 诱导产生的 Th17 细胞需要在有 IL-23 参与的情况下才能诱导自身免疫性疾病, 这表明 IL-23 可驱动 Th17 细胞的致病性转化^[34]。此外, Jain 等人发现 IL-23 可通过 Blimp1 刺激 Th17 细胞的炎症功能^[35]。临床上, IL-23/IL-17 通路或调控轴与许多疾病密切相关, 可为治疗这些疾病提供理想靶点^[36-37]。

IL-1 β 可通过上调干扰素调节因子 4 (IRF4) 和 ROR γ t 的表达, 在 Th17 分化的早期阶段发挥重要作用^[38]。此外, IL-1 β 可以抑制 TGF- β 诱导的 FOXP3 表达, 抑制向 Treg 方向的分化^[39]。另外, IL-1 β 可以诱导 Treg 中 FOXP3 的选择性剪接, 导致 Treg 发生向 Th17 的功能转换^[40]。

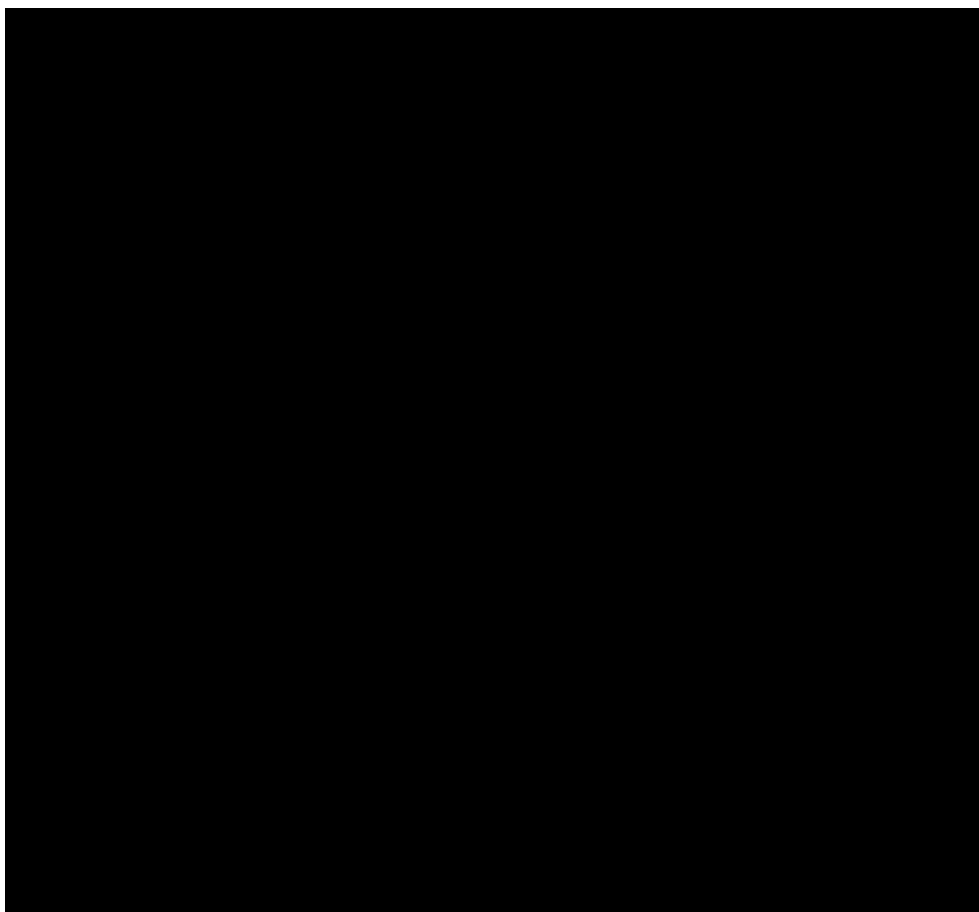


图 1.1 促进 Th17 分化的关键细胞因子、信号通路与转录因子

Figure 1.1 Key cytokines, signaling pathways, and transcription factors that promote Th17 differentiation

After IL-6 or IL-1 induces STAT3 signaling and ROR γ t upregulation in the presence of TGF- β , Naive CD4+T cells begin to differentiate to the Th17 lineage. IL-21 maintains Th17 differentiation in an autocrine manner, while IL-23 from antigen-presenting cells promotes Th17 maturation, survival, and effector function.

(2) 阻碍 Th17 分化的细胞因子

除了上述可以促进 Th17 分化的细胞因子以外, IL-2、IL-4、IL-27、IL-35 和 IL-Y 等细胞因子可以阻碍 Th17 分化, 具体研究现状如下:

IL-2 是 Th17 分化的抑制因子。尽管 IL-2 对于活化 CD4+T 细胞的克隆扩增十分重要, 但它在小鼠模型中可负调控 Th17 分化^[41]。研究表明, IL-2 可通过下调 IL-6 受体的表达同时诱导 STAT5 磷酸化来抑制 IL-6 信号通路, 从而抑制 Th17 分化^[42-43]。既然 IL-2 可以抑制 Th17 细胞分化, 那么在 Th17 分化过程中, IL-2 的功能是如何被抑制的呢? Kim 等人的研究表明 PTEN 可阻止 IL-2 的产生来驱动 Th17 的分化^[44]。基于 IL-2 在 Th17 细胞分化中发挥的抑制作用, 一项关于系统性红斑狼疮的研究将 IL-2 与雷帕霉素联合使用以恢复和维持 Th17 与 Treg 细胞之间比例的长期平衡^[45]。在一项关于原发性干燥综合征的研究中, 研究者发现 IL-2 对 Th17 分化抑制作用的缺失可增加 Th17 细胞的生成, 且此机制与 Treg 的分化无关^[46]。因此, IL-2 可能是介导 Th17 和 Treg 细胞比例失衡引起的 Th17 相关疾病的关键因素。

IL-4 主要由 Th2 和 Tfh 细胞产生, 是驱动 Th2 细胞与 naïveT 细胞分化的必需细胞因子, 也是 Th17 细胞分化的负调节因子。在 Th17 分化过程中, 用 IL-4 的抗体阻断 IL-4 信号通路可促进 IL-17A 的产生, 而添加外源性的 IL-4 则可抑制 IL-17A 的表达^[47-48]。Cooney 等人进一步发现 IL-4 可以以 STAT6 依赖性的方式抑制 Th17 细胞产生 IL-17 F^[49]。此外, IL-4 可以通过沉默抗原呈递细胞中的 IL-23 来消除 Th17 细胞引起的炎症^[50]。IL-4 疗法已被应用于胶原蛋白诱导的关节炎^[51]和实验性自身免疫性脑脊髓炎^[52]等 Th17 相关疾病的治疗, 并展现出了喜人的疗效。

IL-27、IL-35 和 IL-Y 与 IL-23 同属 IL-12 家族, 但它们在调控 Th17 分化过程中却发挥着与 IL-23 截然不同的作用, 可以通过促进 Treg 细胞的扩增来负调

节 Th17 分化^[53-55]。在小鼠过敏性结膜炎模型中, IL-27 的缺乏可导致 IL-17A、IL-17 F 和 ROR γ t 表达升高, 说明 IL-27 的缺乏可导致 Th17 细胞过度活化^[56]。在过敏性鼻炎患儿中, IL-35 可以通过丝裂原活化蛋白激酶 (MEK) 和 c-Jun N 末端激酶 (JNK) 途径抑制 Th17 的活化^[57]。在所有抗炎细胞因子中, IL-35 可能是唯一一个本身就具有抗炎特性的细胞因子, 这也让 IL-35 成为治疗 Th17 相关自身免疫性疾病的高潜力候选药物。

1.1.2.2 调节 Th17 细胞分化的转录因子

细胞分化的本质是由基因时序性表达介导的细胞功能特化, 因此转录因子在细胞分化调节中起到了决定性的作用。从上述内容也可以看出, 细胞因子主要是通过信号通路介导转录因子的活化, 从而在转录水平调控 Th17 分化的。因此, 研究者对于调控 Th17 细胞分化的转录因子同样进行了详尽的研究。

(1) 促进 Th17 分化的转录因子

ROR γ t 和 ROR α 是调控 Th17 细胞分化的两种关键转录因子。ROR 由三个成员组成, 即 ROR α 、ROR α 和 ROR γ 。在哺乳动物中有两种不同的 ROR γ 蛋白, 即 ROR γ 和 ROR γ t。Ivanov 等人表明 ROR γ t 在 Th17 细胞中选择性表达, 其过表达增强了 Th17 分化, 但同时抑制了 Th1 和 Th2 细胞的发育^[58]。相反, ROR γ t 缺乏会导致严重的 Th17 细胞缺乏, 同时可以防止小鼠发生实验性自身免疫性脑脊髓炎。上述结果表明 ROR γ t 在 Th17 分化中发挥着关键作用。此外, 还有研究表明 ROR γ t 的泛素化或 SUMOylation 可抑制 IL-17 的产生, 并介导结肠炎症和肿瘤发生^[59]。ROR α 也是一种 Th17 细胞特异性转录因子, 可以与 ROR γ t 共同作用介导 Th17 的特异性谱系分化^[60-62]。ROR α 和 ROR γ t 均可调节 *IL-17A*、*IL-17 F* 和 *IL-23R* 等 Th17 分化相关基因的表达^[63]。研究发现, 转录因子 ROR α 也可以像 ROR γ t 一样响应 STAT3 信号通路, 并促进 Th17 分化和功能性细胞因子的表达^[64]。此外, ROR α 和 ROR γ t 还可以以协同方式促进 Th17 的分泌, 二者共同缺失会导致 Th17 细胞发育完全抑制^[65]。

STAT3 是调节 Th17 细胞分化的重要转录因子。STAT3 可被多种信号分子激活, 包括 IL-6、IL-23 和 IL-21 等, 在 IL-6/IL-21/IL-23 介导的 Th17 细胞分化调节中起到重要作用^[66-68]。STAT3 的过表达会增强 Th17 细胞的分化, 而 STAT3

的缺失会抑制 Th17 细胞分化^[69-70]。STAT3 缺乏会导致 ROR γ t 和 ROR α 转录因子的表达显著降低^[71-73]。FOXP3 是 Treg 细胞的谱系特异性转录因子,可以结合 ROR γ t 并拮抗其功能,而 STAT3 可以抑制 TGF- β 诱导的 FOXP3 表达增加^[74-75]。从上述内容可以得知,影响 STAT3 活性的因素或分子将对 Th17 的分化产生重要影响。例如,E3 泛素连接酶 Hectd3 可通过激活 STAT3 来促进 Th17 分化,而 microRNA let-7f-5p 则可通过抑制 STAT3 表达阻碍 Th17 分化^[76-78]。

IRF4 在调节 IL-4 产生和 Th2 分化中发挥重要作用^[79-80]。但同时,IRF4 也可以通过激活 ROR γ t 和 ROR α 来促进 Th17 分化^[81]。此外,IRF4 还可以与其他转录因子(如 STAT3 和 BATF)一起调节与 Th17 分化密切相关的 IL-17、IL-17F 和 ROR γ 等蛋白的表达^[82]。然而也有研究发现,在树突状细胞中抑制 IRF4 的表达会抑制 Th2 反应,但却促进 Th17 反应^[83]。

BATF 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子,属于激活蛋白-1 (AP-1) 家族^[84]。研究表明,BATF 对 Th17 和 Tfh 细胞的产生至关重要,而对于 Th1 和 Treg 细胞的发育则并非不可或缺^[85]。BATF 的过表达会增加 Th17 细胞的数量,而 *Batf* 敲除小鼠则会出现 Th17 和 Tfh 细胞严重缺乏的表型^[86]。就机制而言,BATF 可以介导染色质的开放,从而引导 Th17 分化过程的发生^[87]。BATF 还可以与 IRF4 相互作用,促进 IRF4 与 DNA 结合,从而诱导 Th17 细胞中 IL-17A 和 IL-21 的表达。在胶原诱导的关节炎疾病模型中,BATF 可以通过促进 Th17 分化和抑制 Th17 转化为 Treg 细胞来改善疾病症状^[88]。此外,在乙型肝炎病毒转基因小鼠中,BATF 敲低显著降低了 Th17 细胞和相关炎症反应的比例,导致肝脏病变得缓解^[89]。综上,BATF 可能是治疗 Th17 相关疾病的一个有前途的靶点。

JunB 是 Jun 家族的成员,是 AP-1 家族的另一个转录因子。Li 等人证明 T 细胞中 IRF4 介导的转录过程依赖于 BATF/Jun 复合物^[90]。这说明 JunB 可能在 Th17 分化中发挥一定作用。2017 年发表的两项研究表明 JunB 可参与 ROR γ t 和 ROR α 在 Th17 细胞中的特异性激活,但却可降低 FOXP3 的表达^[91-92]。另一项研究进一步探索了 JunB 在致病性和非致病性 Th17 细胞中的作用,结果表明,在 IL-23 依赖性的致病性 Th17 细胞中,JunB 可通过增强 BATF 与 *Rorc* 位点的 DNA 结

合来介导 ROR γ t 的表达,但在 TGF- β 1 依赖性非致病性 Th17 细胞中并不存在上述现象^[93]。

SMAD 是高度保守的转录因子。许多 SMAD 蛋白可被 TGF- β 信号通路激活,在 Th17 分化过程中发挥着重要的调控作用。SMAD 家族蛋白对于 Th17 分化的调控机制极为复杂,关于此问题的研究也常常得出不同乃至截然相反的结论。例 Martinez 等人的研究表明 SMAD3 可以降低 ROR γ t 的活性,其缺陷会导致 Th17 分化增强^[94],而另一项研究则表明 SMAD2 和 SMAD3 的双重缺陷会抑制 Th17 细胞分化,且抑制效果比 SMAD2 单独缺陷所造成的抑制效果要强得多,这表明 SMAD3 可能在 Th17 分化中发挥正调控作用^[95]。显然 SMAD3 对于 Th17 细胞分化的调控作用有待进一步研究。与 SMAD3 的功能不同,人们一致认为 SMAD2 可促进 Th17 细胞分化。Martinez 等人的另一项研究表明,SMAD2 可与 ROR γ t 一起促进 Th17 分化^[96]。Tanaka 等人的一项研究还表明 TRIM33 可以与 ROR- γ 和 Smad2 形成复合物,共同驱动 Th17 细胞的促炎功能^[97]。

(2) 抑制 Th17 分化的转录因子

STAT4 起初被认为是 Th17 分化的负调节因子,因为 STAT4 是一种众所周知的 Th1 特异性表达转录因子,对 IFN- γ 的产生至关重要,而 IFN- γ 可抑制 IL-17 的产生^[98]。此外,白血病抑制因子(LIF,一种 IL-6 家族细胞因子)可以激活 STAT4,从而通过阻碍 Th17 细胞分化来抑制肠道炎症^[99-100]。然而,其它研究证明 STAT4 可以在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型中调控 Th17 和 Th1 细胞产生 GM-CSF^[101]。此外,研究证明 IL-23 激活的 STAT3/STAT4 在 Th1/Th17 介导的中枢神经系统自身免疫中发挥重要作用^[102]。可见 STAT4 可能在 Th17 细胞发育的不同阶段发挥截然不同的作用。

IL-2/STAT5 调控轴可以抑制 Th17 细胞分化。此外 STAT5 还可以与 STAT3 相互拮抗,以维持 Th17 和 Treg 细胞之间的平衡。研究表明,STAT5 可以与 BATF 合作将 Th17 细胞转化为可以产生 IL-9 的细胞^[103]。在急性冠脉综合征患者中,STAT5 的过表达可增加 Treg 细胞数量但减少 Th17 细胞数量,且当 STAT3 被敲低时,更多的 STAT5 可以与 *FOXP3* 基因位点结合^[104]。在慢性阻塞性肺疾病的

临床治疗中, 中药补肺益肾方可通过调节 STAT3 和 STAT5 的激活导致 Treg 细胞数量的上调和 Th17 细胞数量的下调, 从而恢复 Th17 和 Treg 之间的平衡^[105]。

与 SMAD2 的作用不同, SMAD4 可抑制 Th17 分化。研究表明, 在 TGF- β 信号通路未被激活的情况下, SMAD4 可通过抑制 ROR γ t 的表达来抑制 IL-21 介导的 Th17 分化^[106]。

1.1.3 强直性脊柱炎的治疗方案及其局限性

基于上述关于强直性脊柱炎的基础研究, 人们开发出了多种治疗药物, 并开展了多项临床前和临床研究以评价它们的疗效和局限性, 现将相关研究现状总结如下:

1.1.3.1 TNFi 的疗效与局限性

TNFi 是 TNF 的抑制剂。在过去的二十年中, TNFi 已被成功用于强直性脊柱炎的临床治疗。根据国际脊柱关节炎评估协会 (ASAS) 反应标准 20 和国际脊柱关节炎评估协会 (ASAS) 反应标准 40, 依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗和戈利木单抗等 TNFi 均分别展现出约为 60% 和 40% 的缓解率^[107-110]。上述所有 TNFi 均能改善疼痛、功能、僵硬和整体健康状况^[111]。此外, 磁共振成像结果也表明 TNFi 治疗可以改善脊柱和骶髂关节炎症。对于葡萄膜炎和炎症性肠病等症状而言, TNF- α 单克隆抗体的疗效要优于其它生物药物, 这是因为经 TNF- α 单克隆抗体治疗后这些症状的复发和加重发生率相对较低^[112]。此外, 虽然目前尚无针对强直性脊柱炎新骨形成的治疗方案, 但用 TNFi 治疗强直性脊柱炎超过 4 年可以抑制脊柱影像学进展^[113]。TNFi 疗法的局限性在于其副作用。有报道称用 TNFi 治疗炎症性肠病可造成 I 型干扰素表达失调, 进而诱发银屑病和反常关节炎^[114-115]。

1.1.3.2 IL-23 阻滞剂的疗效与局限性

虽然 IL-23 阻滞剂可用于治疗银屑病, 但它们对于强直性脊柱炎患者的疗效有限^[116-117]。乌司奴单抗是一种可以与 IL-12 和 IL-23 的 p40 亚基结合的人源单克隆抗体。用乌司奴单抗治疗强直性脊柱炎的临床试验未能证明该药物可以改善疾病症状, 因此这些临床实验被终止了^[118-119]。一项基于大鼠动物模型的研究显

示, IL-23 阻滞剂能够抑制强直性脊柱炎疾病发作, 但对炎症反应没有显著影响^[120]。此外, IL-17A 的产生也不仅仅依赖于 IL-23/IL-17A 调控轴, 因此阻断 IL-23 可能无法完全抑制 IL-17 引起的炎症反应。虽然 IL-23 阻滞剂对于强直性脊柱炎的疗效有限, 但它对于银屑病的外周滑膜炎和附着点炎显示出了良好疗效, 并且对银屑病关节炎的脊髓区域疼痛有显著改善^[121-122]。

1.1.3.3 IL-17A 阻滞剂的疗效与局限性

司库奇尤单抗是首个直接阻断 IL-17A 与 IL-17 受体结合的重组人单克隆抗体^[123]。用司库奇尤单抗治疗强直性脊柱炎 16 周后, 根据 ASAS 反应标准 40 计算的缓解率达到约 40%, 同时降低了 C 反应蛋白浓度, 降低了基于磁共振成像的骶髂关节水肿评分, 同时提升了患者的生活质量^[124]。滑膜炎症的组织病理学检查显示, 使用 300 mg 司库奇尤单抗 12 周后, CD15+中性粒细胞和 CD56+巨噬细胞均较基线下降^[125]。依奇珠单抗对关节改善的效果与阿达木单抗相当^[126]。一项关于银屑病关节炎的扩展研究显示, 依奇珠单抗具有持续的疗效、安全性和对影像学进展的抑制作用^[127]。除了可以改善骨骼症状外, IL-17A 阻滞剂还可以改善皮肤症状。然而, IL-17A 阻滞剂对于肠道症状几乎没有改善, 甚至还会引发或加重炎症性肠病^[128]。司库奇尤单抗在控制结核感染方面也具有优势, 因为经司库奇尤单抗治疗后, 没有结核发生或再激活的现象出现^[129]。

布罗达单抗是一种抗 IL-17 受体 A 的单克隆抗体。一项针对布罗达单抗的 3 期试验显示, 布罗达单抗治疗第 16 周时, 中轴型脊柱关节炎患者的 ASAS 40 和 ASAS 20 缓解率分别为 43.8%和 67.5%^[130]。在该研究的扩展试验中, 安慰剂组在第 16 周改用布罗达单抗, 而在第 68 周时安慰剂组在治疗效果和临床指标上确实追上了布罗达单抗治疗组^[131]。此外, 磁共振成像显示两组患者在第 68 周时的柏林脊柱评分均有所改善。该项研究中发现的严重药物和治疗相关不良事件包括耳带状疱疹、急性心肌梗死、蜂窝织炎、阑尾炎和憩室炎各 1 例。一项关于 IL-17A 和 IL-17F 的中和单克隆抗体比美吉珠单抗的研究显示, 每 4 周给予 160 mg 和 320 mg 比美吉珠单抗的强直性脊柱炎患者在第 12 周时 ASAS 40 缓解率为 46%, 且在 IIb 期试验中, 约 60%的患者在第 48 周时症状缓解^[132]。

1.1.3.4 JAK 抑制剂的疗效与局限性

JAK 抑制剂托法替尼和乌帕替尼已被美国食品药品监督管理局批准用于治疗强直性脊柱炎。其中乌帕替尼是一种选择性 JAK1 抑制剂。一项 3 期试验显示, 在 15 mg/天的剂量下, 乌帕替尼对于用疾病改善性抗风湿生物药治疗无效的强直性脊柱炎患者有较好治疗效果, 在 14 周时 ASAS 40 缓解率为 45%^[133]。该试验的重症感染发生率为 2.4%, 涉及 5 个病例, 其中 4 例为 COVID-19 感染, 1 例为葡萄膜炎。此外该试验的带状疱疹感染率为 0.9%。托法替尼是靶向 JAK1、JAK2 和 JAK3 的第一代 JAK 抑制剂^[134]。一项关于强直性脊柱炎的 3 期临床试验显示, 托法替尼在第 14 周时的 ASAS 40 缓解率为 40.6%^[135]。该试验的非严重带状疱疹感染率为 2.3%, 并有 0.8% 的严重感染率。在关于乌帕替尼和托法替尼的两项研究中, 没有发生重大不良心血管事件、血栓栓塞事件、恶性肿瘤或死亡。

1.1.4 *TNFAIP3* 的生物学功能及其相关疾病

从上述内容可以看出, 现有强直性脊柱炎治疗方法的疗效只能说差强人意, 因此研究者们一直没有停下探索新靶点、药物或治疗方案的脚步。在本研究中, 考虑到 *TNFAIP3* 的生物学功能和它与各类疾病的关系, 我们将目光集中于这个基因及其所编码的 A20 蛋白上, 首次考察了 *TNFAIP3* 对 Th17 分化和强直性脊柱炎发生发展的影响, 以期以 *TNFAIP3* 靶点探索治疗强直性脊柱炎的新药物。

1.1.4.1 *TNFAIP3* 的生物学功能

肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, *TNFAIP3*) 基因由 Dixit 等人于 1990 年被发现报道, 其表达由肿瘤坏死因子诱导。*TNFAIP3* 编码 A20 蛋白, 其在序列上具有一定的保守性, 在氨基端含有卵巢肿瘤结构域 (ovarian tumor domain, OTU), 羧基端含有七个锌指结构域 (zinc finger domain, ZnF)。A20 被认为是一种泛素编辑酶, 在无细胞和细胞系统中表

现出去泛素化（DUB）、E3 泛素连接酶和泛素结合活性（图 1.2）。

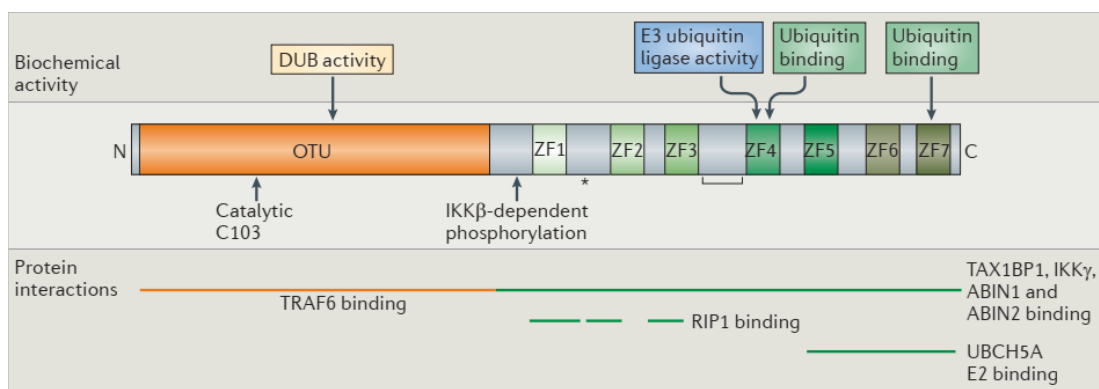


图 1.2 A20 蛋白功能的生化特征

Figure 1.2 Biochemical characterization of A20 protein function

A20 的去泛素化（DUB）活性由 OTU 结构域内 103 位（C103）的催化半胱氨酸介导。A20 的七个锌指结构则介导其 E3 泛素连接酶活性（通过 ZF4）及其泛素结合活性^[136-140]。A20 可通过 ZF4-ZF7 与 E2 泛素结合酶如 UBCH5A 结合，通过 ZF4 与 K63 连接的多泛素链结合^[141]，并通过 ZF7 与线性多泛素链条结合。A20 还可通过 ZF1-ZF3 与如受体相互作用蛋白 1（RIP1）等底物相互作用，其中 ZF1 对结合至关重要^[142-143]。此外，A20 的 OTU 结构域可以与如 TNFR 相关因子 6（TRAF6）等 E3 泛素连接酶相互作用，并通过 ZF 结构域与泛素结合蛋白如 TAX1 结合蛋白 1（TAX1BP1）、I κ B 激酶- γ （IKK γ ）、A20 NF- κ B 活化结合抑制剂 1（ABIN1）和 ABIN2 等相互作用。然而，介导 A20 与环指蛋白 11（RNF11）和 ITCH 等 E3 泛素连接酶以及其自身相互作用的区域尚未明确定义。此外，C103 和 ZF4 基序还被证明可以支持 E2 泛素结合酶的降解^[144]。

多泛素链与信号蛋白的连接可刺激泛素结合蛋白的募集。众所周知，K48 连接的多泛素链修饰可介导靶蛋白被蛋白质体降解，而通过其他赖氨酸残基连接的多泛素链，如 K63 连接的多泛素链则可以募集下游信号蛋白从而传递信号。A20 的 DUB 活性可切割 K63 连接的多泛素链，因此可能有助于限制泛素依赖性信号传递。K63 连接的多泛素链的组装介导了 IL-1R 和 TLR 信号转导过程中 TNFR 相关因子 6（TRAF6）介导的 NF- κ B 激活，并且 A20 去除这些多泛素链可能是 A20 限制 TLR 信号转导的机制^[145-148]（图 1.3）。此外，A20 可在 NOD 信号转导

过程中限制 RIP2（也称为 RIPK2）的泛素化，且在双链 RNA 诱导的信号传导过程中限制 TBK1 和 IKK ϵ （也称为诱导型 IKK）的泛素化^[149]，这表明 A20 的 DUB 活性存在其它潜在靶点（图 1.3）。A20 还限制由 T 细胞受体（TCR）、BCR 和 CD40 触发的 NF- κ B 信号转导，这也很可能与 A20 的去泛素化酶活性有关^[150-151]。这些研究证明了 A20 的 DUB 活性可以通过从靶信号蛋白中切割活化的 K63 连接的多泛素链来限制细胞活化信号。除了通过切割多泛素链来限制泛素化外，A20 还被证明通过干扰 E2-E3 结合来抑制泛素链合成^[152]。A20 抑制 E2 酶 UBCH5C 和 UBC13 与 TRAF2 和细胞凋亡抑制剂（cIAP）蛋白（即环指 E3 泛素连接酶）的相互作用^[153]。这些发现表明，A20 可以抑制多种 E2-E3 组合，从而抑制广泛的泛素化事件。无论 A20 是通过切割多泛素链还是通过抑制泛素连接酶活性来限制底物泛素化，信号蛋白泛素化的限制似乎是 A20 调节免疫信号的重要机制。

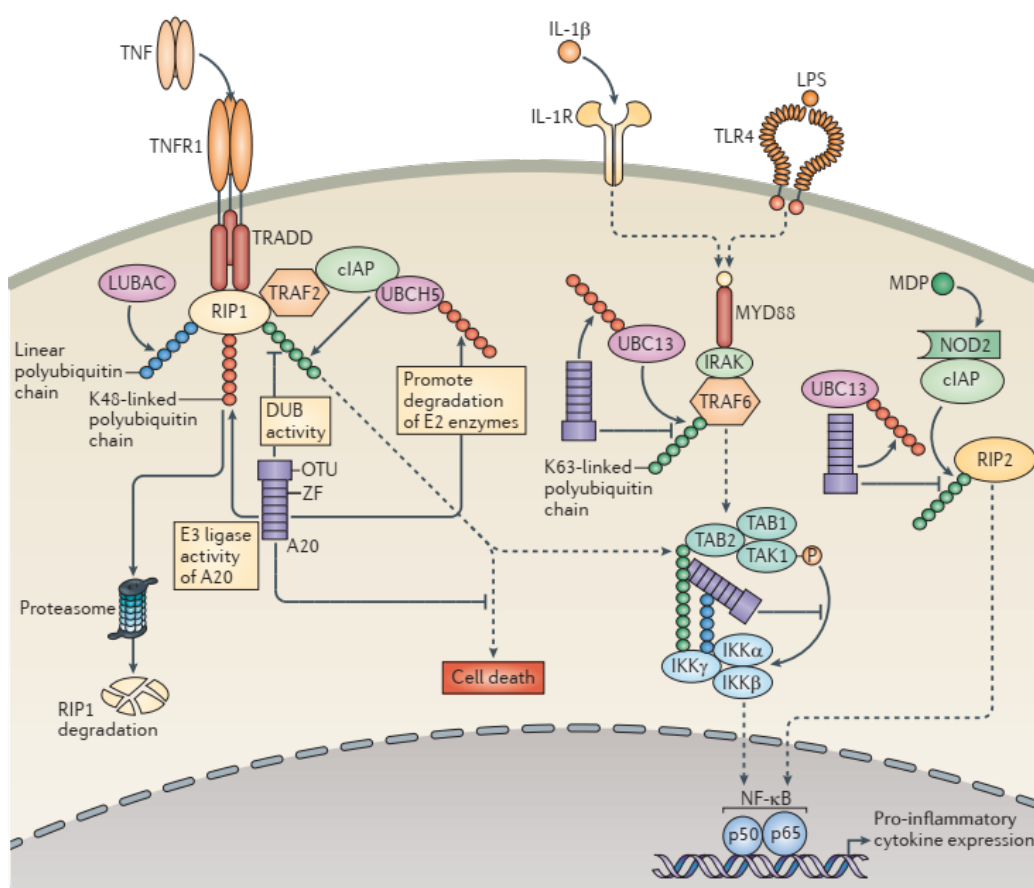


图 1.3 A20 调节泛素依赖性信号通路的分子机制

Figure 1.3 Molecular mechanism of A20 regulating ubiquitin-dependent signaling pathway

A20 调节多种泛素依赖性的先天免疫信号通路, 包括肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1)、白细胞介素-1 受体 (IL-1R)、Toll 样受体 4 (TLR4) 和核苷酸结合寡聚结构域(NOD)蛋白下游的信号通路。在这些信号级联过程中, 包括UBCH5 和 UBC13 在内的 E2 酶, 以及包括 cIAP、TRAF6 和 TRAF2 在内的 E3 连接酶可协同作用, 介导多泛素链的构建。这些多泛素链可以通过 K48、K63 或其它赖氨酸残基连接到底物上, 其底物包括 RIP1、TRAF6、I κ B 激酶- γ (IKK γ) 和 RIP2 等。一种被称为 LUBAC (线性泛素链组装复合物) 的独特酶复合物可以在 RIP1 和 IKK γ 上构建线性多泛素链^[154-155]。此外, 未固定的泛素链 (即未共价连接到信号蛋白上的泛素链) 也是这些信号级联的组成部分。A20 可以通过其 OTU 结构域的去泛素化 (DUB) 活性从 RIP1、TRAF6 和/或 IKK γ 上切割 K63 连接的泛素链来调节这些信号复合物的活性。A20 还可以通过支持 E2 酶 UBCH5 和 UBC13 的降解来调节这些信号通路, 从而抑制依赖于这些 E2 酶的 E3 连接酶的活性。最后, A20 可以通过在 RIP1 上构建 K48 连接的多泛素链导致其降解。

此外, 体外研究表明, A20 的 ZF4 和 ZF7 结构域可分别与 IKK 复合物和 TNFR 复合物上 K63 连接的泛素链和线性泛素链结合, 并可利用这些相互作用抑制这些信号复合物的活性。A20 还可以与其他具有泛素结合活性的蛋白形成竞争关系或作为其他调节因子的衔接蛋白发挥作用, 如 NF- κ B 活化的 A20 结合抑制剂 1 (ABIN1)、ITCH、环指蛋白 11 (RNF11) 或 TAX1 结合蛋白 1 (TAX1BP1)。除了可以限制 TNFR、IL-1R、TLR 和 NOD 等信号通路外, A20 还可调节由 T 细胞受体和 CD40 触发的信号级联反应。最后, A20 还可能通过限制胱天蛋白酶 8 的泛素化来限制 TNF 诱导的细胞凋亡^[156]。

1.1.4.2 TNFAIP3 与人类疾病的关联

TNFAIP3 基因编码的 A20 是核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的重要负调控因子。NF- κ B 的过度激活可能会使许多促炎基因过度表达从而引发炎症反应和组织损伤, A20 通过抑制 NF- κ B 的功能参与介导免疫和炎症反应。此外, 大量证据表明 A20 可以限制 B 细胞的存活并预防自身免疫性病理, 同时 A20 被发现在调节树突状细胞 (DC) 的成熟和功能方面发挥了重要作用。A20 沉默的 DC 抑制调节性 T 细胞 (Tregs)、辅助 T 细胞 (Th) 以及过度活化的肿瘤浸润细胞毒性 T 淋巴细胞, 这些淋巴细胞产生白细胞介素-6 (IL-6) 和 TNF- α ^[157]。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP), 是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的一种 DNA 序列多态性。这种变异可由单个碱基的转换或颠换所引起, 也可由碱基的插入或缺失所致, 最小等位基因频率 (MAF, minor allele frequency) 大于 1% 的 SNP 位点大约有 1000 万个, 占总的 SNP 位点的 90%。SNP 是人类可遗传的变异中最常见的一种, 也是基因组中最为稳定的变异, 最大限度地代表了不同个体之间的遗传差异, 所以 SNP 成为遗传学上重要分子标记, 而更重要的将其应用于疾病遗传易感性研究, 有助于阐明某些基因与疾病易感性的关系, 从而找到疾病易感基因, 为进一步阐述疾病的发病机制提供重要线索^[158-159]。

TNFAIP3 基因非编码区域的上游或者下游以及内含子区域的单核苷酸多态性与免疫性疾病和自身免疫病均相关, 包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病和炎症性肠病等, 如图 1.4 所示。*TNFAIP3* 基因位点上的单核苷酸多态性或突变可能会影响其表达或者功能。比如 rs5029941/A125V 和 rs2230926/F127C 是两个错义突变, 这两个突变位点位于 *TNFAIP3* 基因的 3 号外显子中, 属于 DUB 结构域的编码区域。这两个错义突变可导致 A20 蛋白表达降低以及 NF- κ B 的功能受到抑制。此外, *TNFAIP3* 基因的单核苷酸多态性也可以通过影响 A20 蛋白的表达或功能来影响免疫细胞的生理活动, 进而导致其携带者罹患某种免疫性疾病的风险发生改变。例如 *TNFAIP3* 基因位点的 rs2230926、rs6920220 和 rs10499194 等单核苷酸多态性与类风湿性关节炎密切相关。在一项分析研究中, 作者总结了关于 *TNFAIP3* 基因 rs10499194 单核苷酸多态性的 13 项研究结果, 发现 rs10499194 多态性与类风湿性关节炎患病风险降低相关, 且此相关性在白种人群中尤为显著。Parhalad 等人分析了 445 位幼年特发性关节炎患者与 643 位健康对照, 发现 *TNFAIP3* 基因的 rs10499194 和 rs6920220 单核苷酸多态性与幼年特发性关节炎密切相关。此外, 有研究表明对 *TNFAIP3* 基因的 5 个单核苷酸多态性 (SNPs) 进行基因分型, 只有 rs10499194 多态性与强直性脊柱炎的风险降低具有相关性, 然而在 Bonferroni 校正后没有显著的相关性; 随后分层分析表明, rs10499194 多态性降低了男性亚组、年龄 ≥ 29 岁亚组、HLA-B27 阳性亚组以及 BASFI < 4 和 BASDAI < 4 亚组患 AS 的风险 (均 $P < 0.05$)^[160]。

有遗传学研究者提出了一对串联多态二核苷酸(TT>A, rs148314165, rs200820567) 风险等位基因, 携带在与 *TNFAIP3* 基因座和 A20 蛋白表达相关的风险单倍型上^[161]。TT>A 突变体代表一个 T 的缺失, 随后一个 T 突变成 A, 在第 6 号染色体的第 138272732–138271733 位置上, *TNFAIP3* 基因下游 42 kb 处^[162-164]。后续研究表明, TT>A 突变体位于一个功能增强子元件中, 该 TT>A 突变体结合到一个包含 *NF-κB* 和 SATB1 转录因子的核蛋白复合物上, 通过长程 DNA 环与 *TNFAIP3* 启动子相互作用, 从而导致 A20 的表达降低^[165]。多项研究证明, 位于 TT>A 突变体下游 349 bp 的 SNP rs7749323 已被用作有效的替代 SNP, 用于鉴定欧洲、韩国和中国汉族的功能性 TT>A 突变体^[166-168], TT>A 突变体与替代 SNP rs7749323 处于完全的连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD) 中, r^2 值为 1, 即 rs7749323 能完全连锁 TT>A 突变体进行基因分型^[206]。尽管 TT>A 突变体与欧洲人群的 SLE 有关, 但它在中国汉族人群中的存在概率以及对强直性脊柱炎的疾病易感性的作用还不太清楚。

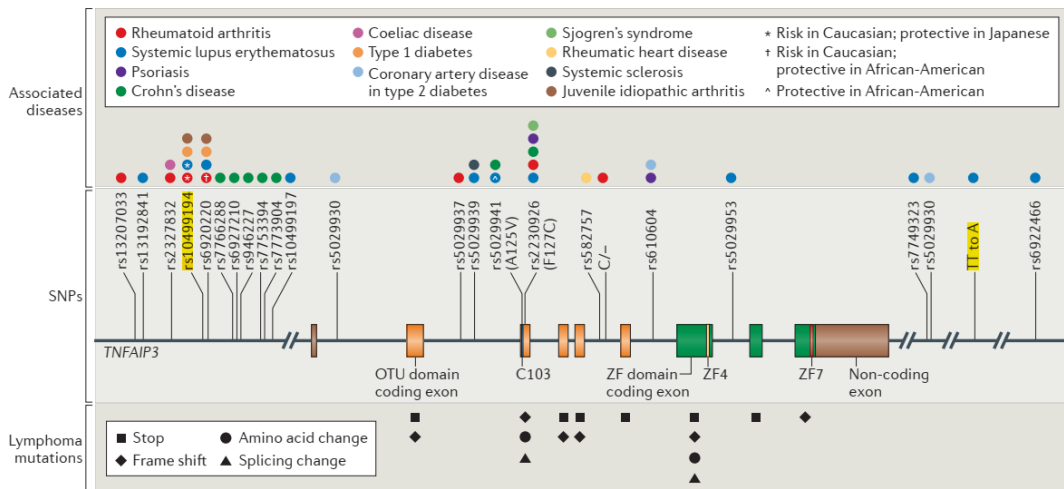


图 1.4 *TNFAIP3* 多态性或突变与人类疾病

Figure 1.4 *TNFAIP3* polymorphism or mutation and human disease

鉴于 A20 的生物学功能和 *TNFAIP3* 基因 SNP 人类疾病已有的关联, 本研究首次探索了 A20 对于 Th17 分化的调控机制。

1.1.5 赤霉素在哺乳动物中的机体和细胞生物学效应

赤霉素 (gibberellins, GAs) 是一大类四环二萜类羧酸, 是具备生长调节功能的重要植物激素^[169-171]。在一些植物物种中, 赤霉素与对生物胁迫 (如捕食和感染) 和非生物胁迫 (如冷、盐和渗透胁迫) 的应对反应直接相关^[172]。迄今为止, 文献中共描述了 136 种赤霉素^[173], 按照发现的先后顺序, 这些赤霉素被命名为 GA1-GA136。其中, GA3 是研究最多的一种赤霉素。

1.1.5.1 赤霉素的生物学效应

尽管在农业和生态学领域有很多关于赤霉素的研究, 但少有研究分析它们在哺乳动物中的生物学效应。一项研究显示, GA3 可在哺乳动物气道上皮细胞中诱导炎症调节因子 A20 的表达, 从而抑制 NF- κ B 的活性, 导致 IL-6 和 IL-8 释放减少^[174]。另一项早期的研究则发现用 2-100 mg/kg 的 GA 可明显缓解糖尿病小鼠的急性炎症反应^[175]。此外也有文献报道了 GAs 对医学和牙科相关微生物群的影响。其中之一表明, GA4 广泛抑制多种人类临床细菌分离株的群落增长, 包括大肠杆菌、植物拉氏菌、铜绿假单胞菌、诺丁汉沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌等。而与 GA4 相比, GA7 的抑菌效果似乎较差, 可抑制铜绿假单胞菌、诺丁汉沙菌、蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌等的生长^[176]。此后的一项工作探究了 GA4 和 GA7 在体外实验中所展现出的抗 NF- κ B、抗菌和抗氧化活性及其毒性效应, 发现 GA4 可以抑制 NF- κ B 的活性。GA7 虽然没有抗 NF- κ B 活性, 但却可以抑制念珠菌的生长。此外 GA4 和 GA7 均展现出了抗过氧化物自由基的活性, 且无显著细胞毒性^[177]。

1.1.5.2 赤霉素的毒性效应

此外还有多项研究评价了 GA3 的体内毒性。例如一项研究关于 GA3 的亚慢性毒性研究表明每天饮用含有 75 ppm GA3 的饮用水 50 天后, 大鼠可的抗氧化机制被激活, 但抗氧化机制不能阻止 GA3 引起的组织脂质过氧化的增加, 说明经过 50 天的亚慢性暴露后, GA3 在脾脏、肺、胃、心脏和肾脏中产生了明显的器官毒性^[178]。另一项研究表明, 在每天饮用含有 75 ppm GA3 的饮用水 6 周后,

GA3 可在成年雄性白化大鼠中诱导出显着的肝毒性，而 6 周的随访期不足以使这些毒性效应完全恢复^[179]。此外一项用体外培养人源细胞进行的研究表明赤霉素可诱导人永生化角质形成细胞 HaCaT 和表皮样癌细胞 A431 启动内质网应激并激活其分化^[180]。

上述内容说明 GA3 既可以通过 A20 发挥调节炎症反应的功能，同时也在特定剂量下展现出了明显的机体毒性。本研究中，我们发现 GA3 可以调控 T 细胞中 A20 的蛋白水平，且并没有在体外实验中展现出明显的细胞毒性。因此我们后续将探索利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性。

1.1.6 利用 LC-MS³ 策略检测血液中药物浓度的基本原理与设想

关于药物有效性和毒性的探讨需要在特定的药物剂量下进行，这就需要对药物进行药代动力学研究。在药代动力学研究中，一个关键的内容就是测定血药浓度。因此，我们在本研究中还对测定血液中药物浓度的方法进行了优化改进，从而为评估利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性打下技术基础。

长期以来，人们一直使用免疫测定法进行血液药物浓度监测^[181-186]。然而，免疫测定法的特异性并不理想，其测定结果可能受到生物基质、结构相似化合物或代谢产物的影响。与免疫测定法相比，液相色谱-串联质谱法（liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）在特异性和灵敏度方面显示出更多的优势。此外，LC-MS/MS 方法的结果更加精准。这就是为什么 LC-MS/MS 方法被认为是测定生物样品中化合物的“金标准”。然而据我们所知，基于 Qtrap 串联质谱仪的 MS³ 检测策略尚未被用于在测定生物样品中治疗药物的浓度^[187-196]。MS³ 的激发效率高，扫描速度快，其扫描速度最高可达 20,000 Da/s。MS³ 扫描模式的工作流程如下：首先，在 Q1 中选择待分析物母离子。然后在碰撞池（Q2）中通过碰撞诱导解离将母离子碎裂，以产生子离子。接着通过线性离子阱捕获子离子。随后，在线性离子阱中选择特定的子离子进行二次碎裂。最终的二代子离子则可被检测器所捕获。因此，MS³ 扫描模式可以通过质谱多反应监测特定的转换反应来实现更准确的定量。综上，LC-MS³ 是一种具有高灵敏度、选择性和更好检测限的检测策略。

由于 GA3 并未被用于任何疾病的临床治疗,我们无法基于血液中 GA3 浓度的检测来优化上述血药浓度监测策略,因此我们选择临床上使用比较普遍,用于治疗癫痫病和神经性疼痛的卡马西平作为待测物进行了概念验证实验。

1.2 研究目标

强直性脊柱炎是一种慢性炎症性自身免疫病,其发病主要累及中轴骨骼和骶髂关节,导致骨骼结构和功能的失常,严重影响患者的生存质量。现有强直性脊柱炎治疗方法的疗效差强人意,因此研究者们一直没有停下探索新靶点、药物或治疗方案的脚步。在本研究中,我们力求以 A20 对于 Th17 分化的调控机制作为切入点,探索利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性。具体的研究目标如下:

- (1) 阐明 A20 对于 Th17 分化的调控作用和调控机制;
- (2) 初步探索 GA3 对于 Th17 分泌 IL-17A 细胞因子水平的影响;
- (3) 建立基于 LC-MS³ 监测血液药物浓度的技术手段;
- (4) 分析中国东北地区 AS 患者单核苷酸多态性与 A20 表达的关联性。

1.3 研究意义

本研究发现 A20 可通过介导 STAT3 泛素化降解从而抑制 Th17 细胞的分化、IL-17A 的表达以及 IL-17A 的分泌,分析了 *TNFAIP3* 单核苷酸多态性与 A20 表达之间的关联。还研究还发现 GA3 可以在不引起细胞毒性和活性氧积累的情况下抑制 Th17 细胞分泌 IL-17A 细胞因子。此外,本研究还成功建立了基于 LC-MS³ 监测血液药物浓度的技术手段。上述研究发现有如下重要意义:

- (1) 阐明了 A20 是 Th17 分化的一种新调控机制;
- (2) 说明 GA3 具备用于治疗强直性脊柱炎的潜力;
- (3) 为包括 GA3 在内的血药浓度监测奠定技术基础;
- (4) 为中国东北汉族人群提供了 *TNFAIP3* 基因单核苷酸多态性研究基础。

第2章材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂和材料

试剂耗材名称	公司名称
RPMI-1640 培养基	武汉普诺赛
10%胎牛血清	武汉普诺赛
100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素母液	武汉普诺赛
DMEM 高糖培养基	Hyclone
10%的 Gibco One-shot 胎牛血清	武汉普诺赛
人重组 IL-6 细胞因子	武汉普诺赛
人重组 TGF- β 细胞因子	武汉普诺赛
10 μ M MG132	Glpbio
GA3	Glpbio
ImmunoSep TM 细胞分选液	北京诺为生物
ImmunoSep TM 密度梯度细胞分离液	北京诺为生物
SepTube TM 密度梯度离心管	北京诺为生物
ImunoSep TM Human T Cell Enrichment Kit	北京诺为生物
EasySep TM Human Th17 Cell Enrichment Kit II	加拿大 STEMCELL 公司
固定剂	上海翌圣生物
破膜剂	上海翌圣生物
流式染色缓冲液	Biosharp
<i>TNFAIP3</i> Monoclonal Antibody	ThermoFisher Scientific
FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)	碧云天生物技术有限公司
A20 的 siRNA 套装	锐博生物
A20 的 CRISPR 敲除质粒	Santa Cruz

RFect ^{SP} 悬浮细胞质粒 DNA 转染试剂	百代生物
RFect ^{SP} 悬浮细胞小核酸转染试剂	百代生物
Uncoated Human IL-17AELISA Kit	Elabscience
RNA 提取试剂盒（纯化柱型）	北京奥秘佳得
cDNA Synthesis SuperMix	北京全式金生物
TransStart [®] Top Green qPCR SuperMix（+Dye I）	北京全式金生物
RIPA 裂解缓冲液	上海雅酶
Omni-Easy [™] 即用型 BCA 蛋白定量试剂盒	上海雅酶
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶
Omni-Easy [™] 速溶型蛋白上样缓冲液	上海雅酶
蛋白酶抑制剂	上海雅酶
蛋白分子量标准品	上海雅酶
Tris/甘氨酸/SDS 电泳缓冲液	上海雅酶
0.22 μM 孔径的聚偏二氟乙烯（PVDF）膜	上海雅酶
Omni-Flash [™] 免冰浴快速转膜缓冲液	上海雅酶
TBST	上海雅酶
5%脱脂奶粉	上海雅酶
山羊抗小鼠或山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联二抗	上海雅酶
Tanon [™] High-sig ECL 化学发光底物	上海天能
Protein A/G 免疫(共)沉淀试剂盒	上海雅酶
蛋白酶抑制剂	上海雅酶
STAT3 Monoclonal Antibody (9D8)	Invitrogen
TNFAIP3 Monoclonal Antibody (59A426)	Invitrogen
CCK-8 试剂盒	碧云天生物技术有限公司
Elabscience [®] 活性氧荧光法测试盒	Elabscience
卡马西平	中国食品药品检定所（中国，北京）
内标卡马西平-D ₂ N ¹⁵	Chemsky International 公司

	(中国, 上海)
乙腈	Fisher Scientific
Jurkat 细胞	中国科学院上海细胞生物学研究所 (中国上海)
人源 Th17 细胞	上海细胞库
大肠杆菌 BL21 感受态细胞	全式金公司
大肠杆菌 DH5 α 感受态	全式金公司
HEK-293T	ATCC 细胞库
<i>TNFAIP3</i> Rabbit mAb	正能生物
IL-17A Polyclonal Antibody	Invitrogen
ROR gamma Monoclonal Antibody	Invitrogen
STAT3 Rabbit mAb	正能生物
Ubiquitin Monoclonal Antibody (Ubi-1)	Invitrogen
GAPDH Rabbit Polyclonal Antibody	上海雅酶生物医药
BV605-CD3mAb	BD Biosciences
BB515-CD4mAb	BD Biosciences
BV421-CD183mAb	BD Biosciences
PE-CD196mAb	BD Biosciences
荧光素酶检测试剂盒	Promega
Opti-MEM	Promega
PEI	Roche

2.1.2 主要仪器

设备名称	公司名称
BD FACSAria TM III 设备	美国 BD Biosciences 公司
Q-Trap 5500	美国 Applied Biosystems Sciex 公司
PCR 仪	美国 Thermo Fisher 公司
q-PCR 仪	美国 Agilent 公司

全波长分光光度计	美国 hermo Fisher 公司
台式离心机	美国 Thermo Fisher 公司
冷冻超高速离心机	美国 Thermo Fisher 公司
蛋白电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白湿转仪	美国 Bio-Rad 公司
水平核酸电泳仪	北京市六一仪器厂
超声破碎仪	美国 Thermo Fisher 公司
多功能成像系统	美国 Thermo Fisher 公司
干式恒温摇床	美国 Thermo Fisher 公司
生物安全柜	中国海尔公司，美国 Thermo Fisher 公司
CO2 细胞培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
FACS Fortessa 流式细胞仪	美国 BD 公司
高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
电热恒温水浴锅	美国 Thermo Fisher 公司
-80℃冰箱	美国 Thermo Fisher 公司
正置光学显微镜	日本 Olympus 公司
倒置光学显微镜	日本 Olympus 公司
脱色摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
纯水净化仪	英国 ELGA 公司
制冰机	日本 Panasonic 公司
体式显微镜	日本 Olympus 公司
蓝光切胶仪	美国 Thermo Fisher 公司
电子天平	美国 Thermo Fisher 公司
Promega20/20LUMINOMETER GLOMAX	美国 Promega

2.2 实验方法

2.2.1 研究对象入组及排除标准

我们通过吉林大学第一医院,招募收集了 756 例强直性脊柱炎患者以及 1001 例健康对照样本。病例组直性脊柱炎患者 756 例,诊断标准符合 2009 年国际脊柱关节炎评价工作组制定的中轴脊柱关节炎的分类(诊断)标准^[197],见表 2.1。完整详细的记录了患者的基本情况和临床诊断,包括:编号,姓名,性别,年龄,病例号,检验结果及主要诊断。健康对照组健康人群 1001 例,均为与病例组年龄和性别方面相匹配的健康体检人员,他们均无自身免疫性疾病,检查结果均无明显异常。该研究得到吉林大学第一医院伦理委员会的批准。

表2.1 2009年ASAS推荐的中轴型脊柱关节病(SpA)的分类标准

起病年龄<45 岁和腰背痛≥3 个月的患者,加上符合下述中 1 种标准:	
1.影像学提示骶髂关节炎加上≥1 个下述的 SpA 特征	
2.HLA-B27 阳性加上≥2 个下述的其他 SpA 特征	
影像学提示骶髂关节炎	MRI 提示骶髂关节活动性(急性)炎症,高度提示与 SpA 相关的骶髂关节炎或明确的骶髂关节炎影像学改变(根据 1984 年修订的纽约标准)。
SpA 特征包括	炎性背痛
	关节炎
	起止点炎(跟腱)
	眼葡萄膜炎
	指(趾)炎
	银屑病
	克罗恩病,溃疡性结肠炎
	对非甾体抗炎药(NSAIDs)反应良好
	SpA 家族史
	HLA-B27 阳性
	CRP 升高

本研究纳入了大多数来自中国北方汉族人群的 756 例强直性脊柱炎患者以及年龄和性别方面相匹配的 1001 例健康对照，样本年龄、性别等基本人口统计学和临床特征情况见表 2.2。年龄和性别在对照组和病例组之间没有明显差别，不具统计学差异（ $P>0.05$ ），病例组和对照组在年龄和性别方面匹配性良好。

表2.2 本研究纳入的强直性脊柱炎患者与健康对照的人口统计学和临床特征

	AS (n=756)	HC (n=1001)	P
性别（男性/女性）	608/148	834/167	0.237
年龄	28.56±8.25	28.12±7.98	0.312
BMI	21.78±4.25		
发病年龄	24.89±10.23		
病程	3.00（1.00, 8.00）		
HLA-B27 阳性（%）	478（63.25%）		
ESR（mm/h）	15.6（6.18, 31.26）	<15mm/h	
CRP（mg/L）	10.78（2.89, 31.25）	0-5mg/L	
WBC（ $10^9/L$ ）	8.98（6.25, 10.36）	$3.5-9.5 \times 10^9/L$	
BASDAI	2.00（0.60, 3.80）		
BASFI	0.90（0.00, 2.60）		

2.2.2 细胞的获取与培养

2.2.2.1 Jurkat 细胞的获取与培养

Jurkat细胞系是一种永生化的T淋巴细胞系。此细胞系最初来源于一名患有T细胞白血病的男孩的外周血中^[198]。Jurkat细胞系最常被用作原型T细胞系，用于研究T细胞的信号传导。本研究采用Jurkat细胞系作为体外模型研究A20对Th17分化的调控机制。

Jurkat 购自于中国科学院上海细胞生物研究所（中国上海）。此细胞系是悬浮细胞，因此将其培养于 RPMI-1640 培养基中。完全培养基中还包含 10%胎牛血清，100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素（由母液 100 倍稀释而成）。培

养条件为 37°C, 5% CO₂ 的细胞培养箱。细胞在培养过程中每 48 小时换液或传代一次, 以将细胞密度维持在 40-80% 之间。

2.2.2.2 Th17 细胞的获取与培养

人源 Th17 细胞购自上海细胞库, 此细胞株已在此前被成功用于 Th17 细胞的分泌功能研究^[199]。经厂家鉴定该株细胞中 Th17 细胞的纯度大于 80%。

该细胞株培养于 DMEM 高糖培养基中。完全培养基中还包含 10% 的 Gibco One-shot 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素 (由母液 100 倍稀释而成), 50 ng/mL 人重组 IL-6 细胞因子以及 20 ng/mL 人重组 TGF-β 细胞因子。其中 IL-6 和 TGF-β 细胞因子的加入可以维持 Th17 细胞的分化状态。其余细胞培养条件同 2.1.1 部分所述。经验证, 此细胞株可在上述培养条件下维持 Th17 分化特征多达 8 代左右。本研究用 10 μM MG132 处理 Th17 细胞以在 A20 过表达的情况下阻止 STAT3 的降解, 此外还用 GA3 处理 Th17 细胞以考察 GA3 对于 IL-17A 表达和分泌的影响。

2.2.3 流式细胞术分析总 T 细胞和 Th17 细胞中 A20 表达的方法

2.2.3.1 总 T 细胞的分离方法

(1) 外周血单个核细胞的获取

- (a) 取 10 mL 静脉血, 置于肝素处理过的抗凝管中, 轻柔颠倒混匀。
- (b) 用 ImmunoSep™ 细胞分选液等比例稀释血样。
- (c) 将 ImmunoSep™ 密度梯度细胞分离液装载到 SepTube™ 密度梯度离心管中。
- (d) 将 b 步骤中稀释好的样品缓慢加入 SepTube™ 密度梯度离心管中, 使样品与 ImmunoSep™ 密度梯度细胞分离液混合。
- (e) 室温下离心 10 分钟, 离心力为 1200 g。注意需要使用水平转子, 且不宜快速制动。
- (f) 将 SepTube™ 密度梯度离心管隔板上方的液体转移至新离心管中。
- (g) 向此液体中添加等体积的 ImmunoSep™ 细胞分选液, 室温下离心 8 分钟, 离心力为 300 g。

(h) 弃上清。

(i) 重复步骤 g 和 h。

(j) 将细胞团重悬，此细胞悬液既包含外周血单个核细胞。

(2) T 细胞分离

基于 ImunoSep™ Human T Cell Enrichment Kit 进行

(a) 用 ImunoSep™ 细胞分选液将上述外周血单个核细胞悬液中的细胞密度稀释为 1×10^8 个/mL。

(b) 将稀释后的悬液转移至 5 mL 流式管中，确保流式管中的细胞数不多于 2×10^8 个。

(c) 添加细胞悬液 1/4 体积的分选试剂 A，用移液器轻轻吸打混匀，之后室温静置 10 分钟。

(d) 用 ImunoSep™ 细胞分选液将总体积调整为 4 mL，上下颠倒混匀后室温下离心 5 分钟，离心力为 300 g。

(e) 弃上清，用 ImunoSep™ 细胞分选液重悬细胞团，并确保细胞悬液的体积与 b 步骤时的体积相等。

(f) 添加细胞悬液 1/4 体积的分选试剂 B，用移液器轻轻吸打混匀，之后室温静置 10 分钟。

(g) 用 ImunoSep™ 细胞分选液将总体积调整为 2.5 mL，用移液器轻轻吸打混匀。

(h) 将流式管插入分选磁极中，确保流式管管底接触到实验台台面，室温静置 5 分钟。

(i) 保持流式管在磁极中，快速将流式管中的上清液倒入 15 mL 灭菌离心管。此时 15 mL 离心管中即为高纯度人总 T 细胞。

2.2.3.2 Th17 细胞的分离方法

外周血单个核细胞的获取方法如 2.2.3.1 部分所示。Th17 细胞的分离基于 EasySep™ Human Th17 Cell Enrichment Kit II 进行。具体方法如下：

(a) 用 ImunoSep™ 细胞分选液将外周血单个核细胞悬液中的细胞密度稀释为 1×10^8 个/mL。

- (b) 将稀释后的悬液转移至 5 mL 流式管中，确保流式管中的细胞数不多于 2×10^8 个。
- (c) 添加 25 $\mu\text{L/mL}$ 的 CCR6 Positive Selection Cocktail，用移液器轻轻吸打混匀，之后室温静置 5 分钟。
- (d) 将 Releasable RapidSpheres™ 磁珠涡旋 30 秒。
- (e) 向细胞悬液中加入 200 $\mu\text{L/mL}$ 的 Releasable RapidSpheres™ 磁珠。上下颠倒混匀后室温下静置 5 分钟。
- (f) 用 ImunoSep™ 细胞分选液将总体积调整为 2.5 mL，用移液器轻轻吸打混匀。
- (g) 将流式管插入分选磁极中，确保流式管管底接触到实验台台面，室温静置 5 分钟。
- (h) 保持流式管在磁极中，快速将流式管中的上清液倒掉。
- (i) 将流式管从分选磁极中拔出，加入 ImunoSep™ 细胞分选液将细胞悬液的总体积调整为 2.5 mL，用移液器轻轻吸打混匀。
- (j) 将流式管插入分选磁极中，确保流式管管底接触到实验台台面，室温静置 5 分钟。
- (k) 保持流式管在磁极中，快速将流式管中的上清液倒掉。
- (l) 再次重复上述流程。
- (m) 将流式管从分选磁极中拔出，加入 ImunoSep™ 细胞分选液将细胞悬液的总体积调整为初始细胞悬液体积的一半，用移液器轻轻吸打混匀，此步骤需将所有残留在流式管管壁上的细胞收集到细胞悬液中。
- (n) 添加 200 $\mu\text{L/mL}$ 的 Release Buffer，轻弹管壁混匀后，室温静置 5 分钟。
- (o) 添加 100 $\mu\text{L/mL}$ 的 CD4+CXCR3- T Cell Pre-Enrichment Cocktail，轻弹管壁混匀后，室温静置 5 分钟。
- (p) 将 Dextran RapidSpheres™ 磁珠涡旋 30 秒。
- (q) 向 o 中细胞悬液添加 50 $\mu\text{L/mL}$ 的 Dextran RapidSpheres™ 磁珠，轻弹混匀。

(r) 立即用 ImunoSep™ 细胞分选液将上述混合物的总体积调整为 2.5 mL, 用移液器轻轻吸打混匀, 将流式管插入分选磁极中, 室温静置 5 分钟。

(s) 保持流式管在磁极中, 快速将流式管中的上清液倒入 15 mL 灭菌离心管。此时 15 mL 离心管中即为高纯度人 Th17 细胞。

2.2.3.3 用流式细胞术检测 A20 蛋白表达的方法

基于上述总T细胞和Th17细胞进行。具体步骤如下:

- (a) 将细胞悬液收集至15 mL离心管中, 4°C 500 g离心8分钟, 弃上清。
- (b) 加入500 μ L冰预冷的固定剂, 重悬细胞后孵育10分钟。
- (c) 4°C 500 g离心8分钟, 弃上清。
- (d) 加入1 mL磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞, 4°C 500 g离心8分钟, 弃上清。
- (e) 加入1 mL破膜剂, 孵育15分钟。
- (f) 4°C 500 g离心5分钟, 弃上清。
- (g) 先加入500 μ L流式染色缓冲液, 再加入5 μ g/mL的*TNFAIP3* Monoclonal Antibody, 轻弹并颠倒混匀后室温孵育1小时。
- (h) 4°C 500 g离心5分钟, 回收上清抗体溶液。
- (i) 加入1 mL破膜剂重悬细胞, 轻弹并颠倒混匀后4°C 500 g离心5分钟, 弃上清。
- (j) 先加入500 μ L流式染色缓冲液, 再加入1 μ L的FITC标记山羊抗小鼠IgG (H+L) 轻弹并颠倒混匀后室温避光孵育30分钟。
- (k) 4°C 500 g离心5分钟, 弃上清。
- (l) 加入500 μ L流式染色缓冲液重悬细胞, 轻弹并颠倒混匀后4°C 500 g离心5分钟, 弃上清。

加入200 μ L流式染色缓冲液重悬细胞, 用BD FACSAria™ III设备采集数据, 并使用FlowJo V10软件进行分析。

2.2.4 流式细胞术分析人外周血中 Th17 细胞比例的方法

(a) 每个样本管分别加入 200 μ L 抗凝全血(裂解红细胞后, 白细胞浓度达到 2×10^6 细胞/mL)。

(b) 向样本管中依次加入2.5 μ L CD3, 1.5 μ L CD4, 5 μ L CD183, 2.5 μ L CD196抗体（滴定抗体浓度已提前滴定），室温避光孵育15-30分钟。

(c) 取 10X 红细胞裂解液，按照体积 1(10X 红细胞裂解液): 9(dH₂O)，稀释。

(d) 每 200 μ L 全血加入 4mL 1X 红细胞裂解液，室温裂解 8-12min，至细胞悬液呈澄清透明状。

(e) 裂红后，500g，离心 5 分钟，洗涤细胞，离心后弃上清。

(f) 重复裂解红细胞步骤 1 次。

(g) 加入 2 mL Staining Buffer，500g，离心 5 分钟，洗涤细胞，离心后弃上清。

(h) 每管加入 500 μ L PBS 洗液，重悬过网，上机检测，用 BD FACS Aria™ III 设备采集数据，并使用 FlowJo V10 软件进行分析。

2.2.5 基因敲除/敲低与过表达方法

研中用到的A20过表达载体由丰晖生物合成，A20的siRNA套装购自锐博生物，A20的CRISPR敲除质粒购自Santa Cruz。

2.2.5.1 A20 过表达实验方案

采用RFect^{SP}悬浮细胞质粒DNA转染试剂将A20过表达载体转染入Th17细胞和Jurkat细胞中，具体流程如下：

(a) 转染前一天接种入六孔板并用2.5 mL完全培养基培养细胞，使细胞密度在转染时维持在50%左右。

(b) 将2 μ g质粒DNA与250 μ L不添加血清的培养基混合，轻弹混匀；同时将转染试剂与250 μ L不添加血清的培养基混合，室温孵育5分钟。

(c) 将上述质粒DNA稀释液和转染试剂混合在一起，轻弹混匀，室温孵育20分钟。

(d) 将上述混合液加入到细胞培养基中，轻轻晃动培养板以混匀。

(e) 培养细胞24小时后再次重复上述过程，继续培养细胞24小时后收取细胞进行后续实验。

2.2.5.2 A20 敲除实验方案

采用RFect^{SP}悬浮细胞质粒DNA转染试剂将A20的CRISPR敲除质粒转染入Jurkat细胞中，具体流程如下：

(a) 转染前一天接种入六孔板并用2.5 mL完全培养基培养细胞，使细胞密度在转染时维持在50%左右。

(b) 将1.5 μg 的A20/*TNFAIP3* CRISPR质粒和1.5 μg 的A20/*TNFAIP3* HDR质粒(h2)同时与250 μL 不添加血清的培养基混合，轻弹混匀；同时将转染试剂与250 μL 不添加血清的培养基混合，室温孵育5分钟。

(c) 将上述质粒DNA稀释液和转染试剂混合在一起，轻弹混匀，室温孵育20分钟。

(d) 将上述混合液加入到细胞培养基中，轻轻晃动培养板以混匀。

(e) 继续培养细胞，每48小时再次重复上述过程，重复三次，共培养细胞14天，然后收集细胞进行后续检测。

2.2.5.3 A20 敲低实验方案

采用RFect^{SP}悬浮细胞小核酸转染试剂将genOFF st-h-*TNFAIP3*_001-003转染入Th17细胞中，具体流程如下：

(a) 转染前一天接种入六孔板并用2.5 mL完全培养基培养细胞，使细胞密度在转染时维持在50%左右。

(b) 将genOFF st-h-*TNFAIP3*_001-003各30 pmol与250 μL 不添加血清的培养基混合，轻弹混匀；同时将转染试剂与250 μL 不添加血清的培养基混合，室温孵育5分钟。

(c) 将上述质粒DNA稀释液和转染试剂混合在一起，轻弹混匀，室温孵育20分钟。

(d) 将上述混合液加入到细胞培养基中，轻轻晃动培养板以混匀。

(e) 培养细胞24小时后再次重复上述过程，继续培养细胞48小时后收取细胞进行后续实验。

2.2.6 流式细胞术分析 Jurkat 细胞向 Th17 分化情况的方法

- (a) 将Jurkat细胞收集至1.5 mL离心管中，加入1 mL PBS重悬细胞，4°C 800 g离心5分钟，弃上清。
- (b) 加入500 μ L冰预冷的固定剂重悬细胞后孵育10分钟。
- (c) 4°C 800 g离心5分钟，弃上清。
- (d) 加入1 mL PBS重悬细胞，4°C 800 g离心5分钟，弃上清。
- (e) 先加入500 μ L流式染色缓冲液，再同时加入5 μ L的CD4 Monoclonal Antibody (RPA-T4), FITC, eBioscience™ 和5 μ L的CD196 (CCR6) Monoclonal Antibody (R6H1), APC, eBioscience™，轻弹并颠倒混匀后室温避光孵育1小时。
- (f) 4°C 800 g离心3分钟，弃上清。
- (g) 加入500 μ L流式染色缓冲液重悬细胞，轻弹并颠倒混匀后4°C 800 g离心3分钟，弃上清。
- (h) 加入300 μ L流式染色缓冲液重悬细胞，用BD FACSAria™ III设备(BD Biosciences, USA)采集数据，并使用FlowJo V10软件(Tree Star, USA)进行分析。

2.2.7 酶联免疫吸附试验（ELISA）测定 IL-17A 分泌水平的方法

基于Uncoated Human IL-17A (Interleukin 17A) ELISA Kit对血清和细胞培养基中的IL-17A浓度进行检测。具体步骤如下：

- (a) 对于血清中IL-17A浓度的测定，首先用促凝管收集5 mL受试者外周血，室温静置1小时后1000 g离心10分钟，取上层血清待用。
- (b) 对于细胞培养基中IL-17A浓度的测定，首先收集细胞，室温下800 g离心3分钟，取上清待用。
- (c) 将血清和细胞培养上清样本用标准品&样品稀释液稀释10倍作为待测样品。
- (d) 从冰箱中取出试剂盒，室温下放置30分钟，使试剂盒内试剂温度接近室温。
- (e) 将试剂盒中的浓缩洗涤液用超纯水稀释25倍，配置成洗涤工作液。
- (f) 将标准品粉末10,000 g离心1分钟，加入1 mL标准品&样品稀释液，将其配

制成1000 pg/mL的标准品工作液。

(g) 将1000 pg/mL的标准品工作液倍比稀释成500、250、125、62.5、31.25、15.63和0 pg/mL的工作液以建立标准曲线。

(h) 使用前15分钟,将浓缩生物素化抗体800 g离心1分钟,再用生物素化抗体稀释液将其稀释100倍。

(i) 使用前15分钟,将浓缩HRP酶结合物800 g离心1分钟,再用酶结合物稀释液将其稀释100倍。

(j) 在酶标板上设置标准孔、空白孔和样本孔,分别加入100 μ L的倍比稀释的标准品、标准品&样品稀释液和待测样品。

(k) 给酶标板覆膜, 37°C孵育1.5小时。

(l) 甩尽孔内液体。每个孔中加入100 μ L生物素化抗体工作液,给酶标板覆膜, 37°C孵育1小时。

(m) 甩尽孔内液体,在洁净的吸水纸上拍干。每孔加350 μ L洗涤工作液,浸泡1分钟,甩掉酶标板内的液体,在洁净的吸水纸上拍干。重复此步骤3次。

(n) 每孔加100 μ LHRP酶结合物工作液,给酶标板覆膜, 37°C孵育30分钟。

(o) 甩尽孔内液体,洗板5次,方法如步骤m所述。

(p) 每孔加90 μ L底物溶液,给酶标板覆膜, 37°C孵育20分钟。

(q) 每孔加90 μ L终止液,立即用Tecan Infinite M Nano酶标仪在450 nm波长下测定各孔光吸收值。

(r) 依据标准曲线计算各样品中IL-17A的浓度。

2.2.8 实时定量 PCR (qRT-PCR) 测定 IL-17A mRNA 表达水平的方法

2.2.8.1 总 RNA 提取

基于RNA提取试剂盒(纯化柱型)进行总RNA提取,具体步骤如下:

(a) 收集细胞,用1 mL冰预冷的PBS重悬细胞,4°C 800 g离心3分钟,弃上清。

(b) 用600 μ L裂解液重悬细胞团,室温静置5分钟。

(c) 将细胞裂解液转入gDNA去除柱,12,000g4°C离心30秒,丢弃gDNA去除

柱，保留滤液。

(d) 向滤液中加入等体积的70%乙醇，混匀后转入RNA纯化柱，12,000g4℃离心30秒，弃滤液。

(e) 向RNA纯化柱中加入500 μL Wash Buffer A，12,000g4℃离心30秒，弃滤液。

(f) 向RNA纯化柱中加入500 μL Wash Buffer B（用无水乙醇配制）12,000g4℃离心2分钟，弃滤液。

(g) 将RNA纯化柱插入新的无核酸酶1.5 mL离心管中，向柱中央加入50μL无核酸酶水，室温静置3分钟。

(h) 12,000g4℃离心2分钟，滤液即为RNA溶液。

(i) 立即用Thermo Scientific公司生产的NanoDrop分光光度计测定RNA溶液260 nm和280 nm处的吸光值。本研究所提取的RNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值均在1.9-2.0的范围内，说明质量良好。

2.2.8.2 反转录

基于TransScript®One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix将mRNA反转录为cDNA，具体步骤如下：

(a) 将上述RNA溶液的浓度稀释至1 μg/μL。

(b) 按照下表建立反转录反应体系：

表2.3 反转录反应体系

组分	体积 (μL)
总RNA溶液	1
Anchored Oligo (dT) ₁₈ Primer (0.5 μg/μL)	1
2×TS Reaction Mix	10
TransScript®RT/RI Enzyme Mix	1
无核酸酶水	7

(c) 将上述反应体系轻弹混匀，用PCR仪42℃孵育15分钟。

(d) 85℃加热5秒使TransScript® RT/RI失活。

(e) 将所得产物稀释5倍，用于后续的qRT-PCR反应。

2.2.8.3 qRT-PCR 反应

基于TransStart® Top Green qPCR SuperMix (+Dye I) 进行qRT-PCR反应，具体步骤如下：

(a) 按照下表建立qRT-PCR反应体系：

表2.4 qRT-PCR反应体系

组分	体积 (μL)
稀释后的cDNA样品	1
正向引物 (10 μM)	0.4
反向引物 (10 μM)	0.4
2× <i>TransScript</i> ® Top/Tip Green qPCR SuperMix	10
无核酸酶水	8.2

(b) 采用两步法PCR程序进行qRT-PCR反应，即一个循环的94℃ 30秒和40个循环的94℃ 5秒，60℃ 30秒（此步采集荧光信号）。

(c) 以人源*GAPDH*作为内参，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式评估靶基因mRNA相对水平。

(d) 本研究qRT-PCR实验所用的引物信息如下表所示：

表2.5 qRT-PCR反应所用引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')
Human <i>GAPDH</i> qF	TCATCAGCAATGCCTCCT
Human <i>GAPDH</i> qR	CATCACGCCACAGTTTCC
Human <i>IL17A</i> qF	CTGTCCCCATCCAGCAAGAG
Human <i>IL17A</i> qR	AGGCCACATGGTGGACAATC

2.2.9 免疫印记评估目标蛋白表达水平的方法

2.2.9.1 总蛋白提取

(a) 收集细胞，用1 mL冰预冷的PBS重悬细胞，4℃ 800 g离心3分钟，弃上清。

(b) 按每 10^6 个细胞100 μL的比例添加有1%蛋白酶抑制剂混合液（不含EDTA）

的RIPA裂解缓冲液重悬细胞团。冰上放置20分钟，每5分钟涡旋一次。

(c) 14,000g 4℃离心5分钟，上清即为总蛋白溶液。

2.2.9.2 总蛋白定量

采用Omni-Easy™即用型BCA蛋白定量试剂盒对提取到的总蛋白进行浓度测定。具体步骤如下：

(a) 首先计算所需显色工作液的总体积，按每个样品的复孔需200 μL试剂A和4 μL试剂B计算，并根据计算出的总体积配制显色工作液。

(b) 取20 μL标准品1-8和用冰预冷PBS稀释5倍的待测蛋白样品（设置三个重复）加入到96孔板中。

(c) 每个待测孔加入200 μL显色工作液，盖上孔板盖，37℃孵育30分钟。

(d) 用Tecan Infinite M Nano酶标仪在562 nm波长下测定各孔光吸收值。

(e) 依据标准品建立标准曲线，计算各样品的总蛋白浓度。

2.2.9.3 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

(a) 清洗制胶用的玻璃板，组装制胶模具。

(b) 首先采用Omni-Easy™一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒制备PAGE凝胶。本研究所用均为1 mm胶，因此下层胶配方为2.7 mL下层胶溶液、2.7 mL下层胶缓冲液和60 μL改良型促凝剂；上层胶配方为0.75 mL下层胶溶液、0.75 mL下层胶缓冲液和15 μL改良型促凝剂。

(c) 下层胶配好后先灌注入制胶模具中，灌注至胶界面距离模具短玻璃板上沿1.5 cm时停止，用移液器缓慢将上层胶灌注至下层胶之上，轻磕制胶模具，确保上下层胶之间的界面平整，放置梳子。

(d) 室温静置30分钟，拔除梳子。

(e) 向全蛋白样品中按1/4体积加入Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液（变性，还原型，5×）以及1×蛋白酶抑制剂，轻弹混匀并瞬时离心后，于98℃金属浴中加热8分钟，使蛋白质变性。

(f) 开始上样。每块胶的其中一个孔需要上10 μL蛋白分子量标准品。根据目标蛋白的丰度，每个孔上20-100 μg全蛋白样品。

(g) 向电泳槽中注入配制好的Tris/甘氨酸/SDS电泳缓冲液，恒压120 V开始电

泳,待前端蓝紫色条带迁移至上下层胶界面后将电压调至160 V,直至电泳结束。

2.2.9.4 转膜、封闭、抗体孵育与化学发光

(a) 将0.22 μM 孔径的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜置于无水甲醇中浸泡5分钟,同时将转膜所需的滤纸、转膜夹海绵垫等置于配制好的Omni-Flash™免冰浴快速转膜缓冲液中平衡5分钟。

(b) 依次将海绵垫、滤纸、PAGE胶、PVDF膜、滤纸、海绵垫放置到转膜夹的负极侧,形成“三明治”样。将转膜夹放入转膜槽中,恒流400 mA转膜35分钟。

(c) 将转印好的PVDF膜置于用1×TBST配制的5%脱脂奶粉溶液中室温封闭1小时。

(d) 用1×TBST洗膜三次,每次5分钟。

(e) 将PVDF膜置于用5%脱脂奶粉溶液配制的一抗溶液中,室温孵育2小时或4℃孵育过夜。

(f) 用1×TBST洗膜三次,每次5分钟。

(g) 将PVDF膜置于用5%脱脂奶粉溶液稀释5000倍的山羊抗小鼠或山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联二抗,室温孵育1小时。

(h) 用1×TBST洗膜三次,每次5分钟。

(i) 用Tanon™ High-sig ECL化学发光底物对目的蛋白进行化学发光显影。

(j) 用ImageJ v. 1.53进行免疫印迹条带灰度分析,从而对蛋白条带进行相对定量。

本研究中免疫印记实验所用抗体稀释倍数见下表2.6。

表2.6 免疫印记实验所用抗体信息

抗体名称	稀释倍数
<i>TNFAIP3</i> Rabbit mAb	1:1000
IL-17A Polyclonal Antibody	1:1000
ROR gamma Monoclonal Antibody	1:1000
STAT3 Rabbit mAb	1:500
Ubiquitin Monoclonal Antibody (Ubi-1)	1:500
GAPDH Rabbit Polyclonal Antibody	1:2000

2.2.10 免疫共沉淀 (Co-IP) 分析蛋白间相互作用或泛素化修饰的方法

采用经典Protein A/G免疫(共)沉淀试剂盒进行免疫共沉淀实验。详细步骤如下:

- (a) 收集细胞, 用1 mL冰预冷的PBS重悬细胞, 4°C 800 g离心3分钟, 弃上清。
- (b) 重复上述步骤。对细胞团称重, 按10 μ L/mg细胞团的比例加入裂解/漂洗缓冲液并加入1 $\times$ 蛋白酶抑制剂, 轻弹混匀, 冰上孵育20分钟。
- (c) 14,000g 4°C离心10分钟, 将上清转移至冰预冷的新离心管中。
- (d) 用2.7.2部分所述方法对上清裂解液进行蛋白定量。
- (e) 将含有200 μ g蛋白的上清裂解液转移至冰预冷的新离心管中, 加入5 μ g抗体, 混匀后置于翻转混合仪上4°C孵育过夜。本研究所用两种免疫沉淀抓取抗体为STAT3 Monoclonal Antibody (9D8)以及TNFAIP3 Monoclonal Antibody (59A426)。
- (f) 用移液器轻柔吸打Protein A/G磁珠, 随后取30 μ L磁珠悬液置于冰预冷的1.5 mL离心管中。
- (g) 向磁珠悬液中加入500 μ L裂解/漂洗缓冲液, 用移液器轻柔吹打混匀后, 在磁力架上静置2分钟, 随后吸弃上清。
- (h) 重复步骤g一次。
- (i) 用500 μ L步骤e中所得抗原-抗体混合液重悬磁珠, 混匀后置于翻转混合仪上4°C孵育过夜。
- (j) 在磁力架上静置2分钟, 随后吸弃上清。
- (k) 加入500 μ L裂解/漂洗缓冲液, 用移液器轻柔吹打混匀后, 在磁力架上静置2分钟, 随后吸弃上清。
- (l) 重复步骤k两次。
- (m) 加入100 μ L含有蛋白酶抑制剂的1 $\times$ Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液, 涡旋混匀。
- (n) 于98°C金属浴中加热8分钟, 冷却后在磁力架上静置2分钟, 随后收集上清, 进行免疫印记分析。

2.2.11 基因组 DNA 的提取方法

基于血液/组织 DNA 磁珠法提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取，具体步骤如下：

- (a) 取 200 μL 全血样品充分混匀后加入离心管中，取 20 μL 蛋白酶 K 加入血中。
- (b) 加入 200 μL 裂解液 BL。漩涡震荡混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min，中间涡旋振荡 2 次。
- (c) 孵育结束后瞬时离心，加入 450 μL 无水乙醇和 30 μL 磁珠 BC，漩涡震荡混匀，于翻转摇匀仪上 50 rpm 速度翻转 10 min，进行 DNA 吸附。
- (d) DNA 吸附之后，漩涡震荡混匀磁珠，将离心管置于磁力架上，静置磁力架磁吸至溶液澄清，弃去上清液。
- (e) 加 700 μL 洗涤液 BW1（已加乙醇），漩涡震荡 1min，将离心管置于磁力架上至溶液澄清，弃去上清液。
- (f) 加 700 μL 洗涤液 BW1（已加乙醇），按上个步骤洗涤一次。
- (g) 加 800 μL 80%乙醇溶液，按步骤 4 洗涤一次。
- (h) 将离心管置于磁力架上，室温开盖干燥 5-10 分钟至无乙醇残留。
- (i) 加入 50 μL 洗脱液 CE，充分混匀，在 56 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min 进行 DNA 洗脱，中间涡旋振荡混匀 1 次。
- (j) 洗脱结束后混匀磁珠，磁吸至溶液澄清，小心吸取上清，检测 DNA 浓度，存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.12 TaqMan 实时定量 PCR 法鉴定 SNP 位点的基因型

- (a) 按 2.2.11 基因组 DNA 提取方法提取样本全基因组 DNA。
- (b) 在 UCSC Genome Browser 找到 rs7749323 和 rs10499194 位点上下游 250 bp 基因组 DNA 序列，用 Primer Express 3.0.1 进行引物和探针的设计，信息如下表所示：

表2.7 rs7749323和rs10499194引物及探针信息

分类	序列 (5' -3')
rs7749323	
Forward primer	GAGATTCAGATTTAATTTGCCTAAGACA
Reverse primer	TCTAGAGTGGTAGACCATGGAATCC
probe 1	FAM-ATCGTGGATGGATG
probe 2	HEX-TGATCGTGGATGGGTGT
rs10499194	
Forward primer	GCTATCAGTTTCATTACCTAAGAAATAGAGAC
Reverse primer	CAACGGATAAGCAATCAGACCA
probe 1	FAM- AATGTGTTCAACCCTTT
probe 2	HEX- CAAATGTGTTTAACCCTTT

(c) 按照下表建立 TaqMan 实时定量 PCR 反应体系:

表2.8 TaqMan实时定量PCR反应体系

试剂	使用量
2×Taq Man Genotyping Master Mix	5.00μL
PCR Forward Primer (50μM)	0.18μL
PCR Reverse Primer (50μM)	0.18μL
Risk -Probe (10μM)	0.25μL
Non-risk-Probe (10μM)	0.25μL
Template gDNA (5μg/μL)	4.00μL
无核酸酶水	0.14μL

(d) 采用两步法 PCR 程序进行 qRT-PCR 反应, 即一个循环的 95℃ 30 秒和 40 个循环的 95℃ 5 秒, 60℃ 30 秒 (此步采集荧光信号)。

(e) 结果分析: X 轴、Y 轴分别为 HEX 和 FAM 荧光相对强度, 根据样品孔的两种荧光值可得到散点分布图 (如图 2.1)。如图 2.1 所示, rs10499194 位点绿色矩形框代表 C/C 基因型, 红色矩形框代表 C/T 基因型, 蓝色矩形框代表 T/T 基因型, 黄色矩形框代表未扩增出荧光的样品孔。

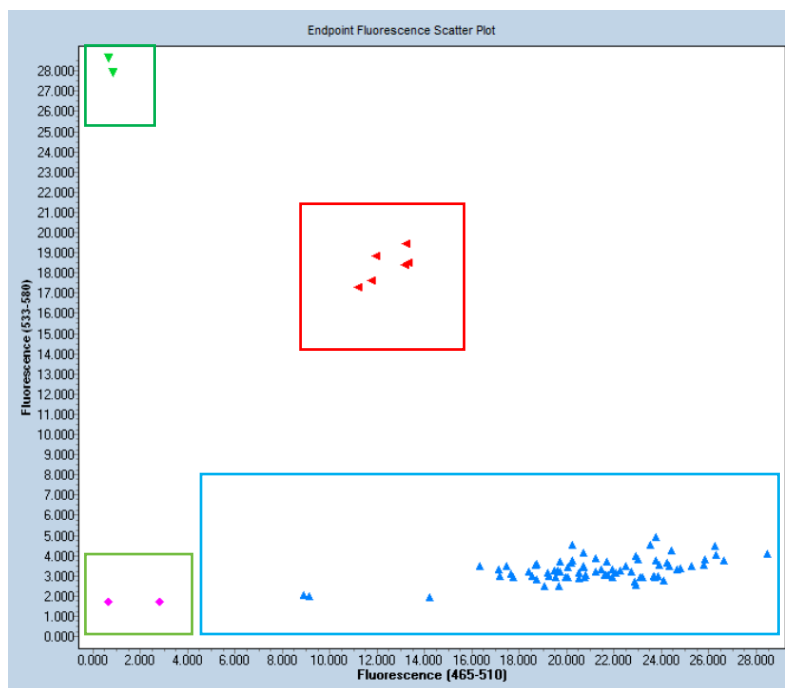


图2.1 双色荧光散点分布图

2.2.13 双荧光素报告基因法分析 *TNFAIP3* 单核苷酸多态性对其转录活性的影响

2.2.13.1 重组质粒的构建

设计引物扩增出 *TNFAIP3*-promotor 目的基因片段，然后对其和荧光素酶报告基因载体 pGL3 用 Hind III 和 Nco I 酶双酶切，构建 pGL3-*TNFAIP3*-promotor 重组质粒。

以携带 *TNFAIP3* 基因 rs7749323 位点突变 A/A 的强直性脊柱炎患者基因组 DNA 为模版，在 *TNFAIP3* 基因 rs7749323 位点上下游各 100 bp 左右设计引物，扩增出包含 rs7749323 位点 A/A 突变的目的 DNA 片段，用 KpnI 和 Sac I 酶双酶切目的 DNA 片段和 pGL3-*TNFAIP3*-promotor，将目的 DNA 片段插在重组质粒的 *TNFAIP3* 启动子之前，得到能反应 AS 患者 rs7749323 位点 A/A 基因型对 *TNFAIP3* 转录活性影响情况的重组质粒，并标记为 pGL3-A/A-*TNFAIP3*-promotor 重组质粒；同理构建了反应 AS 患者 rs7749323 位点 G/G 基因型对 *TNFAIP3* 转录活性影响的 pGL3-G/G-*TNFAIP3*-promotor 重组质粒。依照上述方法，用 Sac I 和 Xho I 双酶切获得反应 AS 患者 rs10499194 位点 C/C 和 T/T 基因型对 *TNFAIP3*

转录活性影响的 pGL3-C/C-*TNFAIP3*-promotor、pGL3-T/T-*TNFAIP3*-promotor 重组质粒。在 pGL3-*TNFAIP3*-promotor 质粒同样的位置插入一段无序序列作为对照，标记为 pGL3-control-*TNFAIP3*-promotor。其中 PCR 扩增引物信息如下表 2.8 所示：

表2.9 荧光素酶实验引物信息

分类	序列（5' -3' ）
rs7749323 位点	
EN-323-F	GTACTTCTCAACAAGATGACTAGTG
EN-323-R	CACGTTGATTTGAGAATGAAGCAG
rs10499194 位点	
EN-194-F	TCTAGTATGCTCATTACCCACCTTGAA
EN-194-R	GATAAGCAATCAGACCACACAGTT
<i>TNFAIP3</i> -Promoter	
TNFAIP3-Pro-F	CCCAAGCTTACATGACTCACCTCCCTGTGCAACGCAT
TNFAIP3-Pro-R	CATGCCATGGATCCATGTGGAAATCGCGGTGATGGGAACT

2.2.13.2 在 HEK-293T 中转染 2.2.13.1 中构建的 5 个重组质粒

在 HEK-293T 中转染重组质粒的具体步骤如下：

(a) 将细胞密度达 80%状态良好的 HEK-293T 细胞，经 PBS 清洗，胰酶消化后传代铺板，细胞密度为 1×10^5 个/ml。

(b) 24 h 后细胞贴壁，显微镜下观察状态，若状态良好，用 1×PBS 清洗细胞 2 次（注意清洗时要轻柔，以免将细胞吹起），给细胞换上新鲜的培养基（含 10%FBS）。

(c) 将 5 μg 的质粒和 15 μL PEI 分别加入 200 μL 的 Opti-MEM 涡旋混匀，室温静置 5 min。

(d) 将上述步骤的质粒和 PEI 混匀，室温放置 30 min，加入已换好培养液的细胞中。

(e) 以海肾荧光素酶基因(*renilla luciferase*, Rluc)作为共转染的对照即内参,分别与以上 5 种重组质粒共转染 HEK-293T 细胞。

(f) 37°C, 5%CO₂ 的培养箱培养 48 小时后, 荧光显微镜观察看转染效率后, 用 10 mL PBS 清洗 2 次, 胰酶消化, 收集细胞沉淀。

2.2.13.3 双荧光素酶基因检测方法

(a) 用双蒸水稀释 5×Lysis Buffer 至 1×Lysis Buffer, 先用现配。

(b) 每个样本管中加入 500 μL 1×Lysis Buffer, 在旋转仪上室温裂解 15min, 12000 rpm/min 离心 1min 后收集上清至新 EP 管中。

(c) 取上清液 20 μL 加入到另一干净的 EP 管中, 加入 100 μL 荧光素酶检测试剂 II (LAR II), 检测萤火虫荧光素酶的活性, 然后向检测管中加入 100 μL Stop & Glo 试剂, 猝灭上一级荧光并海参荧光素酶活性。

2.2.14 细胞活力检测方法

采用 CCK-8 试剂盒对 GA3 处理后 Th17 细胞的活力进行检测, 具体步骤如下:

(a) 将 10,000 个 Th17 细胞接种入 96 孔板, 每孔加 100 μL 培养基。

(b) 用相应浓度的 GA3 处理 48 小时后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 轻弹板沿混匀后继续培养细胞 2 小时。

(c) 用 Tecan Infinite M Nano 酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔光吸收值。

(d) 根据对照组和空白组吸光值计算处理组的相对吸光值, 即相对细胞活力。

2.2.15 细胞内活性氧水平检测方法

采用 Elabscience® 活性氧荧光法测试盒对 GA3 处理后 Th17 细胞内的活性氧积累水平进行检测, 具体步骤如下:

(a) 收集细胞, 用 1 mL 的 PBS 重悬细胞, 室温 800 g 离心 5 分钟, 弃上清。

(b) 用适量试剂一工作液重悬细胞, 使细胞悬液密度为 3×10^5 个/mL。

(c) 37°C, 避光孵育 1 小时, 每 10 分钟取出细胞悬液轻弹混匀一次。

(d) 室温 800 g 离心 10 分钟, 用不含血清的培养基按 a 步骤所述洗涤细胞 3 次。

(e) 最后一次用不含血清的培养基重悬细胞后, 用 Tecan Infinite M Nano 酶标

仪测定500 nm激发波长/520 nm发射波长条件下的荧光值。

(f) 根据对照组和空白组(无细胞)荧光值计算GA3处理组的相对活性氧积累水平。

2.2.16 利用 LC-MS³ 策略检测血液中药物浓度方法的构建

2.2.16.1 LC-MS³ 相关实验条件与参数设定

色谱系统由岛津UFLC XR系统组成, 该系统具有40°C柱温箱、4°C自动取样器和两个二元泵。使用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1×100 mm, 1.8 μm)分离卡马西平和卡马西平-D₂N¹⁵, 用溶剂A(0.1%甲酸水溶液)和溶剂B(0.1%甲酸乙腈溶液)进行梯度洗脱, 流速为0.25 mL/min。洗脱梯度为: 0-2.0分钟, 50%至50%溶剂B; 2.0-3.0分钟, 50%到65%溶剂B; 3.0-3.5分钟, 65%至75% 溶剂B; 3.5-4.0分钟, 75%至90%溶剂B; 4.0-4.5分钟, 90%到90%溶剂B; 4.5-4.6分钟, 90%到50%溶剂B; 4.6-7.0分钟, 50%到50%溶剂B。

串联质谱采用Q-Trap 5500的正离子模式电喷雾电离。在MS³模式下, 产物离子可以在一定条件下在离子阱中富集并且分裂成第二代产物离子-孙离子, 被检测器检测。监测卡马西平的离子对如下: m/z 237.0→220.0→192.0; 监测卡马西平-D₂N¹⁵的离子对如下: m/z 240.1→196.2→181.0。监测选择性孙离子的质量范围窗口为1.0 Da。采用1.0 μg/mL卡马西平标准溶液优化质谱条件。

2.2.16.2 校准品与质控样品的准备

卡马西平的储备溶液(1.00 mg/ml)用甲醇配置。将空白血浆加入储备溶液中, 得到0.50、1.00、2.00、5.00、10.0、15.0、30.0 μg/mL的标准系列溶液。用同样的方法, 制备了三个质控样品, 终浓度分别为1.00 μg/mL、5.00 μg/mL、15.0 μg/mL。用卡马西平-D₂N¹⁵的甲醇储备溶液(1.00 mg/ml)制备内标工作溶液, 用甲醇与水比例为50: 50(v/v)的甲醇水溶液将其稀释至10.0 μg/mL, 作为内标工作溶液。

2.2.16.3 待测样品准备

室温下在水浴锅中解冻冷冻的血浆样品。在1.5 mL EP管中一次加入5 μL血浆、5 μL内标工作溶液和1000 μL甲醇, 涡旋混匀1分钟, 并在4°C下以12000 rpm

的转速离心5分钟。取2 μL 的上清液注入LC-MS系统。

2.2.16.4 分析方法验证

LC-MS³分析方法的验证是基于美国食品和药品监督管理局的生物样品分析方法指导原则。采用6种不同的空白血浆样品、浓度-响应关系以及适当的加权方案和回归方程来考察该分析方法的选择性。以分析物峰面积比为基础,以 $1/x^2$ 为标准曲线权重指标,采用线性最小二乘回归法进行线性检验。方法确证采用三个分析批,每个分析批中有两条标准曲线和低中高三个浓度(每个浓度6个重复)的质控样品。通过分析质量控制样品验证分析方法日内和日间的精密度和准确度。

测得的定量下限的准确度为 $\pm 20\%$,精密度为15%。通过比较标准溶液中分析物和内参的峰面积与提取后样品的峰面积来验证基质效应。回收率是通过比较质量控制样品的峰面积与提取后的空白血浆在一定浓度下的峰面积来确定的。质量控制样品在 -70°C 下保存14天,在 25°C 下解冻1小时,此为一个冻融循环。经过三次冻融循环后,我们验证了样品的稳定性。此外我们还对 4°C 条件下保存在自动进样器小瓶中6小时的分析物稳定性进行了检测。

2.2.16.5 卡马西平血药浓度监测

为了证明这种分析方法的适用性,选择接受卡马西平干预的癫痫患者作为本研究的受试者,分析他们的血浆样品卡马西平的浓度。每天早上服用卡马西平前采集患者血样。这项研究是由独立的伦理委员会批准的。所有受试者签署知情同意书。通过定量分析患者血浆样本中的卡马西平浓度来评价该方法的临床适用性。

2.2.17 数据处理与分析

实验数据分析使用Student's *t*检验和方差检验,*P*值小于0.05即认为差异显著。采用GraphPad Prism6.0 统计分析并绘制统计图,流式数据采用Flowjo分析数据并作图。采用Analysis1.6.3软件(Sciex, Concord, ON, Canada)、Microsoft 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)和MedCalc Version 15.2.2 (MedCalc software Ltd., Beijing, China)对数据进行采集、处理和图形展示。使用Bland-Altman分析和Passing-Bablok回归评估由质谱多反应监测和MS³策略检测到的卡

马西平浓度之间的一致性。如果多于67%的样本的差异在1.96倍标准差以内,则认为该检测的两种方法是一致的。卡马西平的血浆浓度分别根据质谱多反应监测和MS³数据计算。

第3章 结果与讨论

3.1 实验结果

3.1.1 强直性脊柱炎患者表现出炎症因子释放紊乱

强直性脊柱炎是一类免疫疾病，其发生发展与免疫细胞稳态失衡和炎症因子释放紊乱密切相关，我们首先采用酶联免疫吸附实验比较了强直性脊柱炎患者与健康对照血清中 Th 细胞相关细胞因子的浓度。如下图 3.1 所示，与健康对照相比，强直性脊柱炎患者血清中的 IL-17A ($p=0.0268$)、IFN γ ($p=0.0193$)、IL-2 ($p=0.0493$) 和 IL-6 等细胞因子的浓度显著升高，其中 IL-6 的差异极为显著 ($p<0.0001$)。血清 IL-10 的浓度略有升高，IL-4 的浓度降低，TNF- α 浓度升高，但这些指标的差异均未见明显差异。这些结果表明相比于健康对照，强直性脊柱炎患者的确发展出了炎症因子释放紊乱的现象。

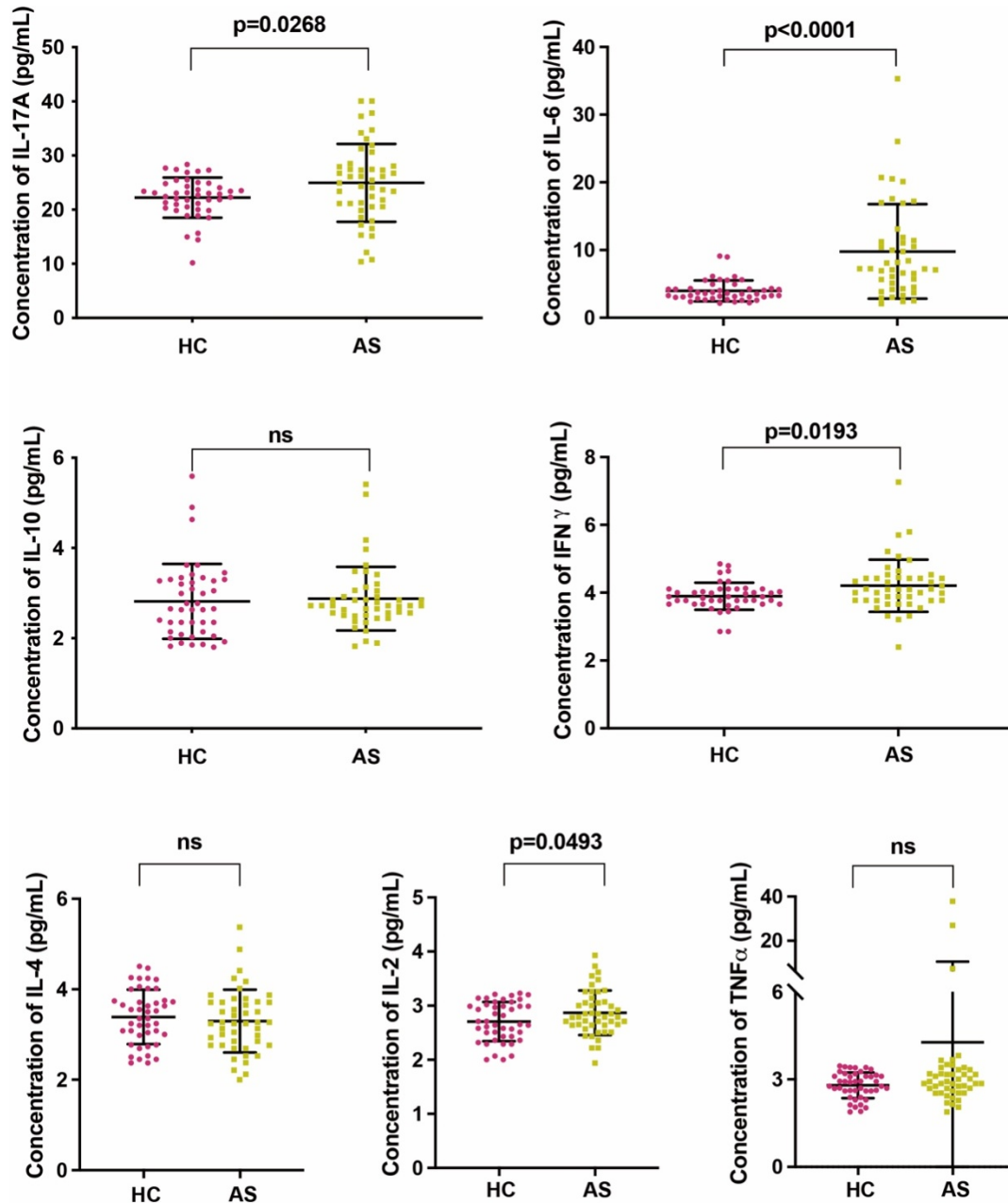


图 3.1 强直性脊柱炎患者（AS）和健康对照（HC）血清中 Th 相关细胞因子的浓度

Figure 3.1 Concentrations of Th-related cytokines in serum of patients with ankylosing spondylitis (AS) and healthy controls (HC)

Th-related cytokine concentrations in peripheral blood serum of patients with ankylosing spondylitis ($n=46$) and healthy controls ($n=44$) were detected by ELISA. Student's t test was used to compare the differences between the groups, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.2 强直性脊柱炎患者外周血中 Th17 细胞比例升高

从上文的介绍可以看出, Th17 细胞及其分泌的多种细胞因子, 特别是 IL-17, 在强直性脊柱炎发生发展的病理机制中扮演着重要的角色。我们已经发现了强直性脊柱炎患者血清中 IL-17A 的水平较健康对照而言显著增加, 那么这是否是由 Th17 细胞比例升高所导致的呢? 接下来, 我们采用流式细胞术分析了健康对照和强直性脊柱炎患者外周血中多种 Th 细胞的比例。如图 3.2 所示, 与健康对照相比, 强直性脊柱炎患者外周血中 Th17 细胞比例的确显著升高了 ($p=0.0076$)。此外我们还发现相比于健康对照, 强直性脊柱炎患者外周血中 Th1 和 Th2 细胞比例均略降低, 但 Th1/Th2 比值升高了。上述实验结果说明强直性脊柱炎患者血清中 IL-17A 浓度的升高的确是由 Th17 细胞比例增加所导致的。

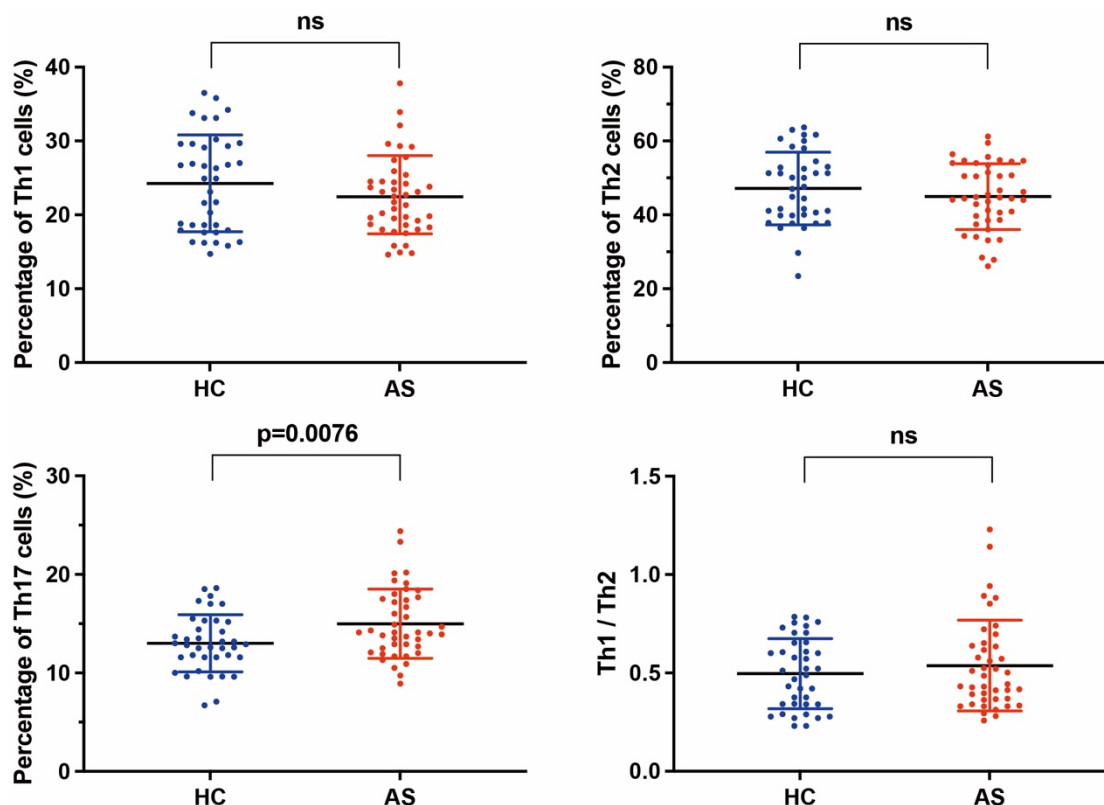


图 3.2 强直性脊柱炎患者 (AS) 和健康对照 (HC) 外周血中 Th 细胞的比例

Figure 3.2 Proportion of Th cells in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis (AS) and healthy controls (HC)

The proportion of Th cells in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis ($n=42$) and healthy controls ($n=38$) was analyzed by flow cytometry. Monoclonal antibodies CD3, CD4,

CD183 and CD196 were used to label and identify Th1, Th2 and Th17 cells. Data were collected by BD FACS AriaTMIII device and analyzed by FlowJo V10 software. Student's *t* test was used to compare the differences between the groups, *p* value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.3 强直性脊柱炎患者外周血 Th17 细胞中 A20 的表达降低

A20 与多种炎症相关疾病的发生有密切关系。那么, A20 是否与 Th17 细胞的分化以及强直性脊柱炎的发生相关呢? 为探寻 A20 在 Th17 分化及强直性脊柱炎发生发展中的作用, 我们用基于磁珠分选技术从健康人和强直性脊柱炎患者的外周血中分离出了总 T 细胞和 Th17 细胞, 并基于流式细胞术检测了总 T 细胞和 Th17 细胞中 A20 蛋白表达的情况。实验结果表明, 相比于健康对照, 强直性脊柱炎患者总 T 细胞中 A20 的蛋白表达并无显著变化, 但 Th17 细胞中 A20 的蛋白表达显著减少 ($p=0.0137$) (图 3.3)。

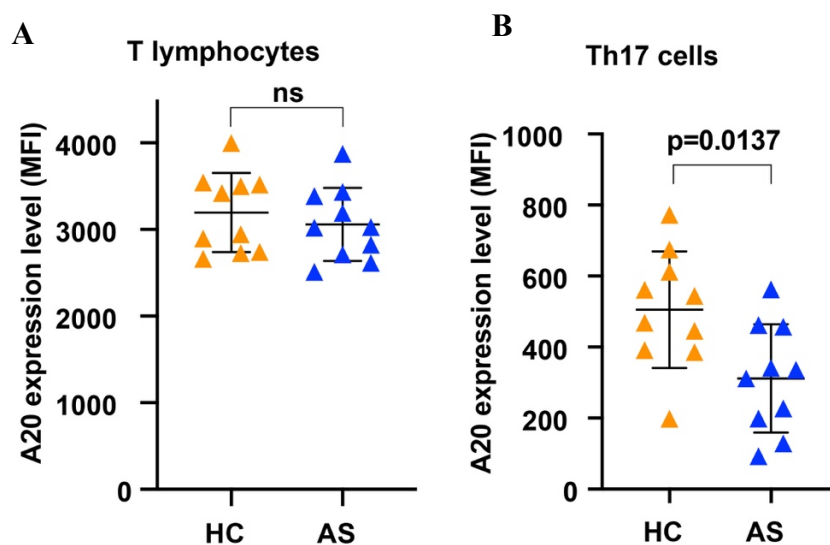


图 3.3 健康对照 (HC) 和强直性脊柱炎患者 (AS) 外周血总 T 细胞和 Th17 细胞中 A20 的表达水平

Figure 3.3 A20 expression levels in total T cells and Th17 cells in peripheral blood of healthy controls (HC) and ankylosing spondylitis patients (AS)

Total T cells and Th17 cells were isolated from peripheral blood of healthy controls ($n=10$) and ankylosing spondylitis patients ($n=10$) by magnetic bead-based sorting technique, and then the isolated total T cells and Th17 cells were labeled with A20 monoclonal antibody. The expression level of A20 protein (MFI) in total T cells and Th17 cells was determined by flow cytometry. (A) A20 expression level in total T cells of HC and AS and (B) A20 expression level in Th17 cells of

HC and AS. Data were collected by BD FACS AriaTMIII device and analyzed by FlowJo V10 software. Student's t test was used to compare the differences between the groups, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.4 A20 可负调控人外周血 Th17 细胞中 IL-17 的分泌和表达

上述实验结果表明强直性脊柱炎患者外周血中 Th17 细胞比例升高, IL-17 分泌增多, 且 Th17 细胞中的 A20 表达显著减少。那么, A20 是否能直接调控 IL-17 分泌、表达以及 Th17 细胞分化呢? 我们首先通过在人外周血来源的原代 Th17 细胞中敲低和过表达 A20 并考察 IL-17 分泌水平以及 mRNA 和蛋白表达的变化来探究 A20 是否可以调控 IL-17 的分泌和表达。如图 3.4 所示, 当在原代 Th17 细胞中过表达 A20 时, IL-17 的分泌量、mRNA 水平和蛋白丰度均显著减少。相反, 当在原代 Th17 细胞中利用 siRNA 技术敲低 A20 时, IL-17 的分泌量、mRNA 水平和蛋白丰度均显著增加。这些结果表明 A20 可负调控 IL-17 的分泌, 且这可能是通过在转录水平上抑制 IL-17 的表达来实现的。

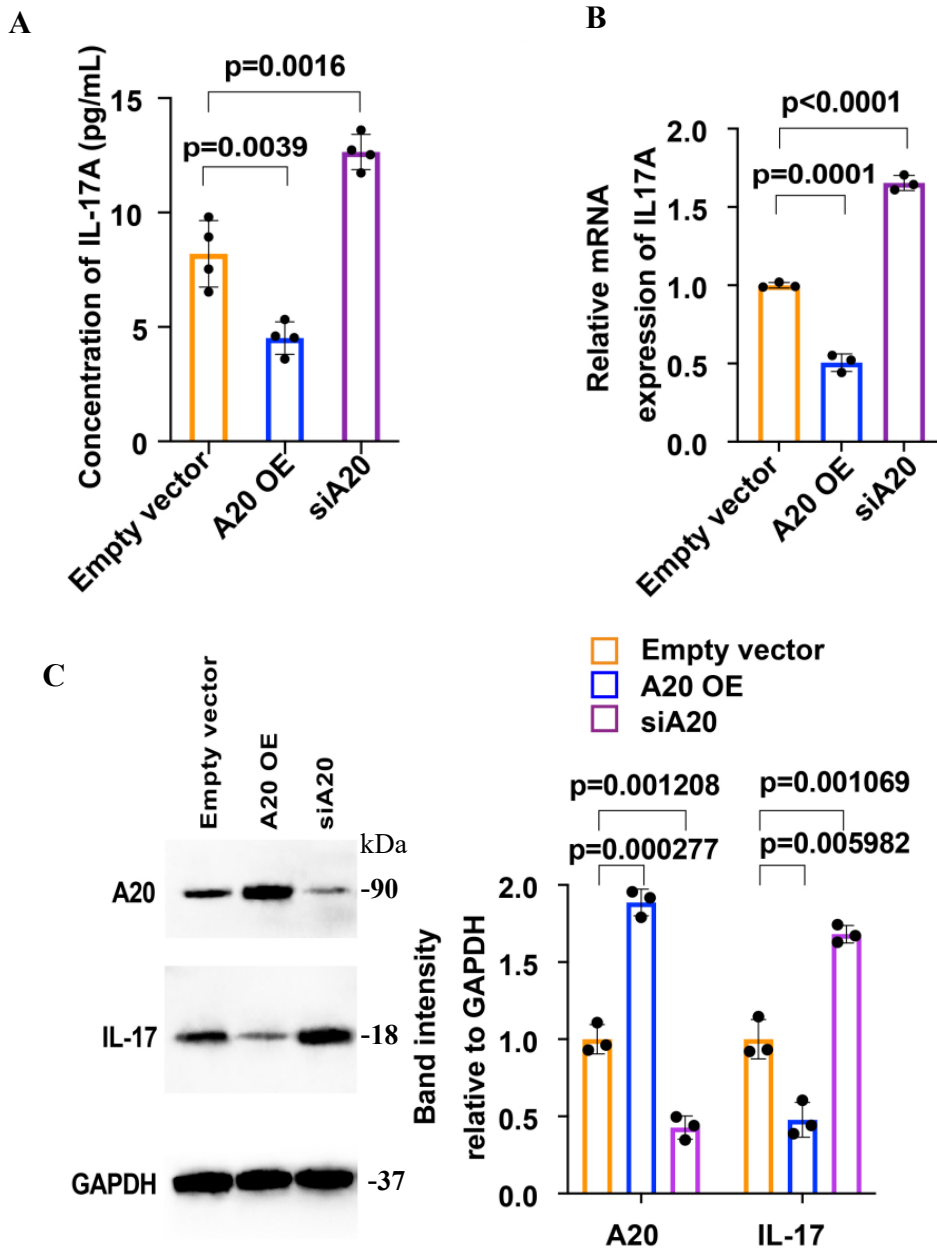


图 3.4 A20 可负调控人外周血 Th17 细胞中 IL-17 的分泌和表达

Figure 3.4 A20 can negatively regulate the secretion and expression of IL-17 in Th17 cells of human peripheral blood

A20 was knocked down and overexpressed in primary Th17 cells derived from human peripheral blood, and the changes of IL-17 secretion level (A), mRNA expression level (B) and protein expression level (C) were investigated. Empty A20 vector and overexpressed vector were transfected into Th17 cells using Rfect^{SP} plasmid DNA transfection reagent. genOFF st-h-TNFAIP3_001-003 was transfected into Th17 cells using Rfect^{SP} suspension cell small nucleic acid transfection reagent. Cells and media were collected to detect changes in IL-17 secretion levels and mRNA and protein expression levels. ANOVA test, $n=3$ or 4 biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.5 A20 可抑制 Th17 分化

IL-17 是 Th17 细胞的主要效应因子。我们在前一部分观察到 A20 可在 Th17 细胞中负调控 IL-17 的分泌和表达，那么，A20 是否还可以负调控 Th17 的分化呢？如前文所述，Jurkat 细胞系可被当作原型 T 细胞使用，是研究 T 细胞中分子调控机制的理想模型。因此，为了研究 A20 表达对 Th17 分化的影响，我们构建了 A20 敲除的 Jurkat 细胞株，并基于流式细胞术考察了 A20 敲除是否可诱导 Th17 分化。如图 3.5 所示，在未敲除 A20 时 Jurkat 细胞群中 CCR6+CD4+ 细胞的比例很低，而在 A20 敲除后，CCR6+CD4+ 细胞的比例显著上升 ($p=0.0006$)。CCR6+CD4+ 是 Th17 细胞的标志，因此这些结果说明 A20 敲除可促进 Jurkat 细胞向 Th17 方向分化。

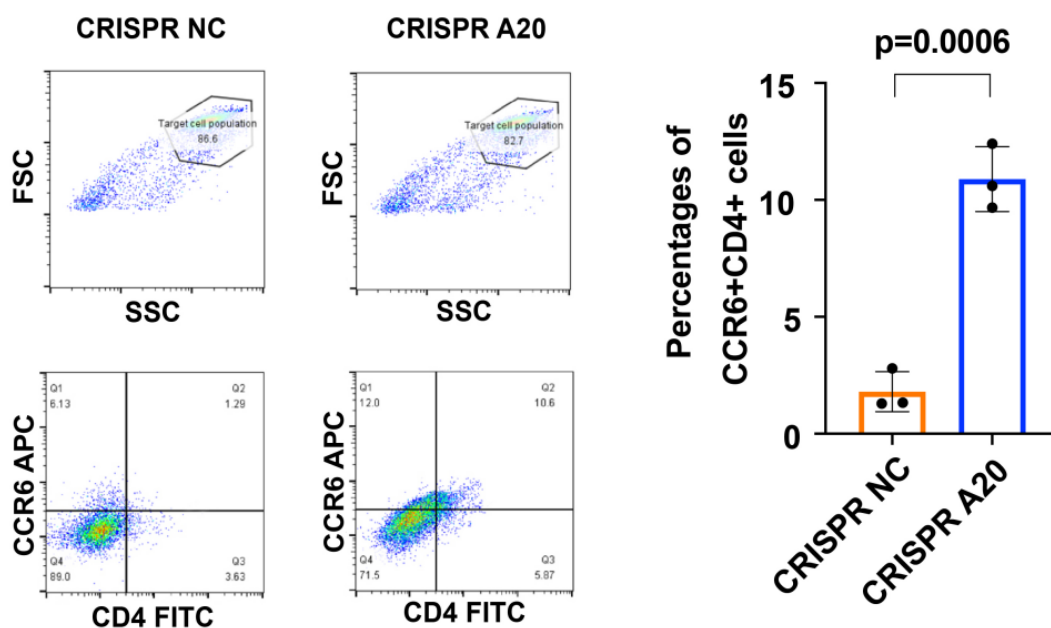


图 3.5 A20 敲除可促进 Jurkat 细胞向 Th17 方向分化

Figure 3.5 A20 knockout can promote the differentiation of Jurkat cells into Th17

The CRISPR knockout plasmid of A20 was transfected into Jurkat cells using Rfect^{SP} suspended cell plasmid DNA transfection reagent. Stable knockout strains were obtained after 14 days of cell culture. To investigate whether A20 knockout can induce Th17 differentiation, CD4 and CD196 (CCR6) monoclonal antibody markers were used to detect CD4+CCR6+ cells by flow cytometry. In this experiment, the data were collected by BD FACS AriaTM III device and analyzed by FlowJo V10 software. Student's t test was used to compare the differences between the

groups, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

随后我们检验了 A20 敲除对于 Jurkat 细胞 IL-17A 分泌和转录的影响, 发现相比于未敲除对照组, A20 敲除组 IL-17A 的 mRNA 表达水平 ($p<0.0001$) 以及 IL-17A 的分泌水平 ($p=0.0002$) 均显著上升 (图 3.6)。以上数据共同说明 A20 可抑制 IL-17A 水平以及 Th17 细胞分化。

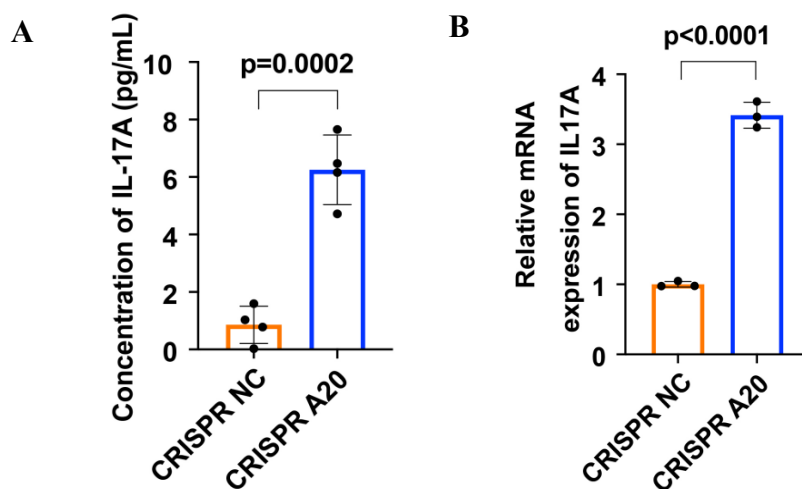


图 3.6 A20 敲除可增加 IL-17 的转录与分泌

Figure 3.6 A20 knockout can increase IL-17 transcription and secretion

(A) ELISA was used to detect IL-17A secretion level in medium of stable Jurkat cells with A20 knockout, $n=4$ biologically independent experiments. (B) Real-time qPCR was used to detect IL-17A mRNA expression level of stable Jurkat cells with A20 knockout, $n=3$ biologically independent experiments. Student's t test was used to compare the differences between the groups, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.6 STAT3 可能是 A20 调控 Th17 分化的关键转录因子

如前文所述, ROR γ t 和 STAT3 是在调控 Th17 分化中扮演最重要角色的两个转录因子。A20 并非转录因子, 其本身并不能调控基因的表达水平, 但它既有去泛素化酶活性又有泛素化酶活性和 E3 泛素连接酶活性。那么 A20 是否可通过调控 ROR γ t 和 STAT3 二者之一来调控 Th17 分化呢? 基于 A20 敲除的 Jurkat 细胞株以及 A20 瞬时过表达实验, 我们探究了 A20 敲除和过表达对 ROR γ t 和 STAT3 转录因子蛋白水平的影响。如图 3.7 所示, 相比于对照组, A20 敲除后 ROR γ t

($p=0.007067$)、STAT3 ($p=0.004191$) 和 IL-17 ($p=0.002414$) 的蛋白水平均显著上升。

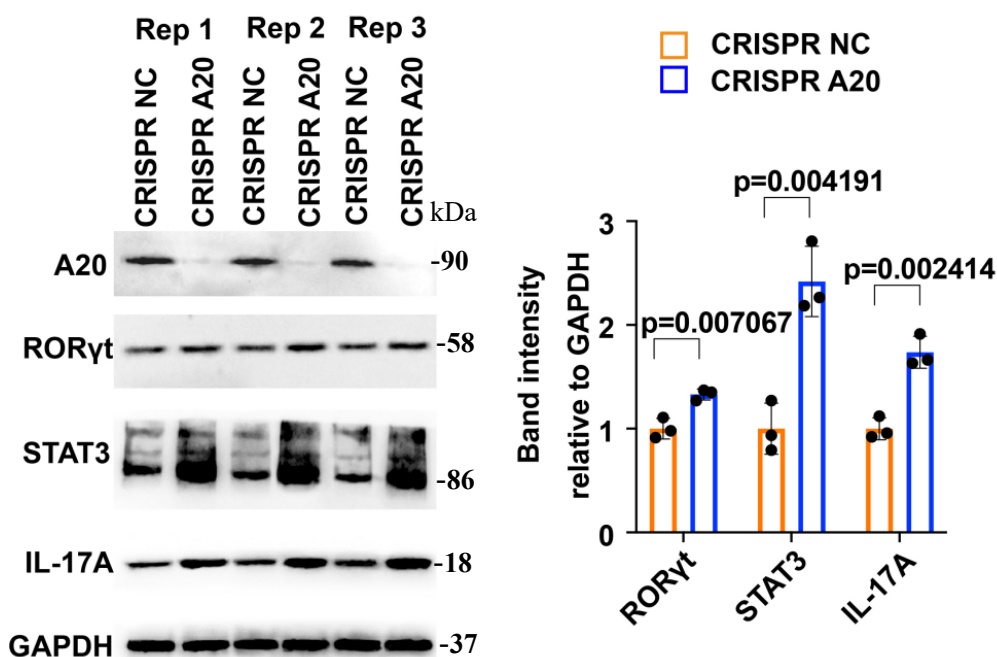


图 3.7 A20 敲除后 RORγt、STAT3 和 IL-17 的蛋白水平变化

Figure 3.7 Changes of RORγt, STAT3 and IL-17 protein levels after A20 knockout

The CRISPR knockout plasmid A20 was transfected into Jurkat cells using Rfect^{SP} suspended cell plasmid DNA transfection reagent, and the protein expression levels of ROR γ t, STAT3 and IL-17A were detected by Western Blot. Student's t test was used to compare the differences between the groups, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

然而 A20 过表达实验则显示, 相比于对照组, A20 过表达后 RORγt 的蛋白水平并无显著变化, 而 STAT3 ($p=0.009494$) 和 IL-17 ($p=0.001273$) 的蛋白水平则显著降低 (图 3.8)。这些结果说明 A20 并非是通过 RORγt 来调控 Th17 分化的, 而 STAT3 则可能是介导 A20 调控 Th17 分化的关键转录因子。

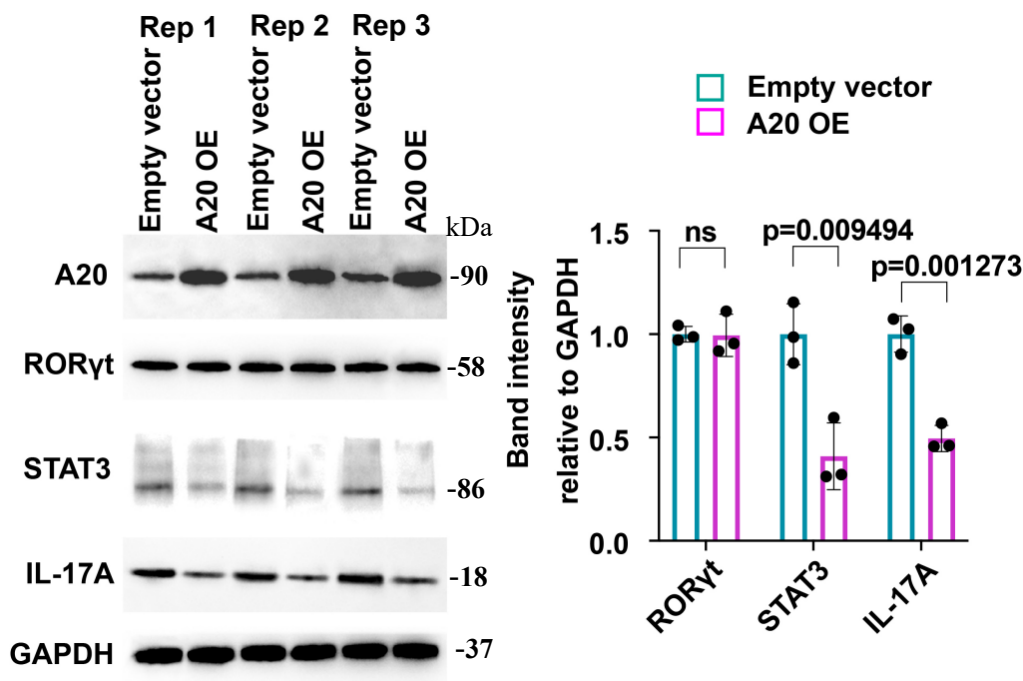


图 3.8 A20 过表达后 ROR γ t、STAT3 和 IL-17 的蛋白水平变化

Figure 3.8 Changes of ROR γ t, STAT3 and IL-17 protein levels after A20 overexpression

The empty A20 vector and overexpressed A20 vector were transfected into Jurkat cells using RFect^{SP} suspended cell plasmid DNA transfection reagent, and the protein expression levels of ROR γ t, STAT3 and IL-17A were detected by Western Blot. Student's t test was used to compare the differences between the groups, n=3 biologically independent experiments, *p* value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

3.1.7 A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解从而负调控

STAT3

接下来我们探究了 A20 是否可以调控 STAT3 的表达，如果可以，又是通过什么机制来实现的。如前文所述，A20 同时具备去泛素化酶和 E3 泛素连接酶的活性，而之前研究中我们又发现 A20 与 STAT3 的表达呈相反变化趋势。因此我们推测 A20 可通过其 E3 泛素连接酶活性介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解。E3 泛素连接酶介导靶蛋白降解的前提是二者需要存在蛋白间相互作用，因此我们首先通过免疫共沉淀实验考察了在 Th17 和 Jurkat 细胞中 A20 和 STAT3 之间是否存在相互作用。如图 3.9 所示，在 Th17 和 Jurkat 细胞中，在用 A20 作为抓

取抗体时能在免疫复合物中检测到 STAT3 的存在，而在用 STAT3 作为抓取抗体时同样能在免疫复合物中检测到 A20 的存在。这证明二者之间的确存在相互作用。

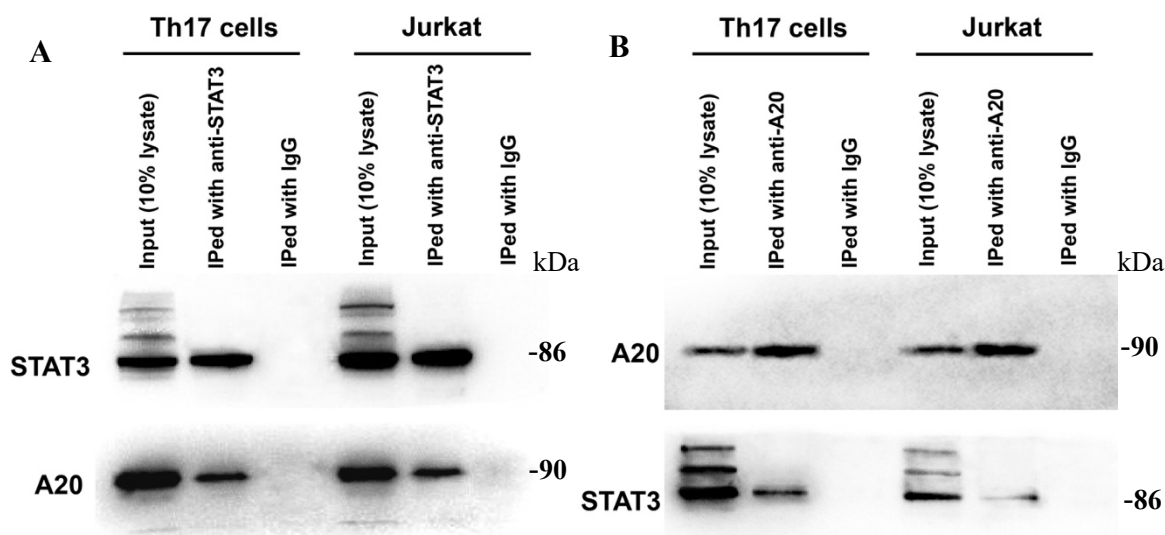


图 3.9 Th17 和 Jurkat 细胞中 A20 和 STAT3 之间的相互作用研究

Figure 3.9 Study of the interaction between A20 and STAT3 in Th17 and Jurkat cells

The interaction between A20 and STAT3 in Th17 and Jurkat cells was investigated by immunoprecipitation (Co-IP) assay. In Th17 and Jurkat cells, (A) STAT3 was detected in the immune complex when A20 was used as a fetching antibody. (B) The presence of A20 was also detected in the immune complex when STAT3 was used as a fetching antibody.

接下来我们考察了 A20 是否能够介导 STAT3 的泛素化。我们在 Th17 细胞中以 STAT3 为抓取蛋白，以泛素分子作为待测靶标，利用免疫共沉淀技术比较了 A20 过表达前后 STAT3 的泛素化情况。如图 3.10 所示，与空载对照组相比，过表达 A20 的 Th17 细胞中 STAT3 蛋白表达水平下降，但泛素化水平升高，即在 Th17 细胞中过表达 A20 可以增加 STAT3 泛素化。我们已经证明了 A20 和 STAT3 之间存在相互作用。因此可以得出结论：A20 能够介导 STAT3 的泛素化。

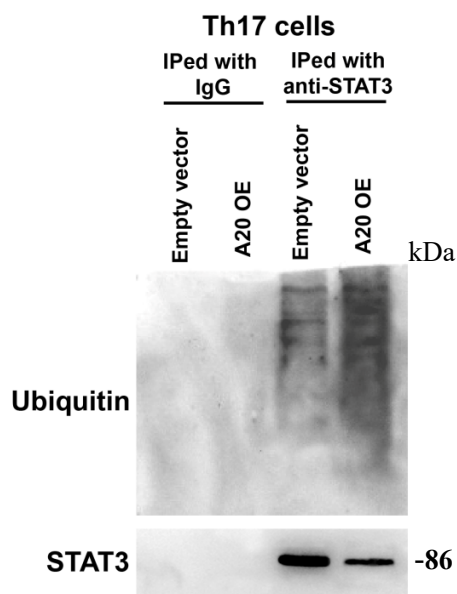


图 3.10 Th17 细胞中 A20 过表达可增加 STAT3 的泛素化

Figure 3.10 Overexpression of A20 in Th17 cells increases the ubiquitination of STAT3

In Th17 cells, STAT3 as grabber protein and ubiquitin molecule as target, the ubiquitination of STAT3 before and after A20 overexpression was compared by co-immunoprecipitation technique.

作为一种可调控蛋白表达水平的翻译后修饰机制,泛素化可引导底物蛋白被蛋白酶体所降解^[200]。那么, A20 介导的 STAT3 泛素化修饰是否会导致其被蛋白酶体降解呢? 我们用 MG132 这种蛋白酶体活性抑制剂处理了 A20 过表达的 Th17 细胞, 以考察蛋白酶体活性的抑制是否能够挽救 A20 过表达所引起的 STAT3 表达水平降低, 从而完善 A20 对于 STAT3 的调控机制。我们发现, 相比于转染空载质粒的对照组, A20 过表达的 Th17 细胞中 IL-17A ($p=0.00016$) 和 STAT3 ($p=0.0001$) 的表达均显著降低。在用 MG132 处理 A20 过表达的 Th17 细胞后, IL-17A 和 STAT3 的表达均提升到了与对照组相当甚至略高的水平(图 3.11)。

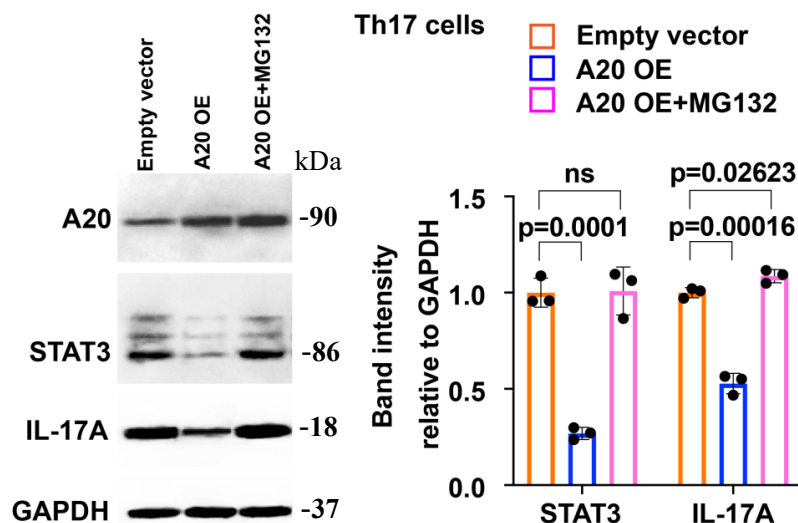


图 3.11 MG132 处理可挽救 A20 过表达引起的 STAT3 和 IL-17A 表达水平降低
Figure 3.11 MG132 treatment can save the decreased expression levels of STAT3 and IL-17A caused by A20 overexpression

In order to improve the regulation mechanism of A20 on STAT3, the A20-overexpressed Th17 cells were treated with MG132 proteasome activity inhibitor, and the expression levels of STAT3 and IL-17A were compared with the empty plasmid group of Th17 cells and the A20-overexpressed group. ANOVA test, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

随后我们又检测了在 A20 过表达的情况下加入 MG132 处理对 IL-17A 的转录和分泌是否同样有挽救作用。qRT-PCR 和 ELISA 实验结果表明, 与转染空载质粒的对照组相比, A20 过表达组 IL-17 的 mRNA 表达水平和 IL-17 的分泌水平均显著下降($p<0.0001$ 和 $p=0.0074$)(图 3.12)。而在过表达 A20 的同时用 MG132 处理则可使 IL-17 的 mRNA 表达水平和分泌水平均显著回升, 甚至显著高于对照组的水平($p=0.0044$ 和 $p=0.0012$)(图 3.12)。以上实验结果表明, 在 A20 过表达的情况下加入 MG132 处理对 IL-17A 的转录和分泌的确有挽救作用。

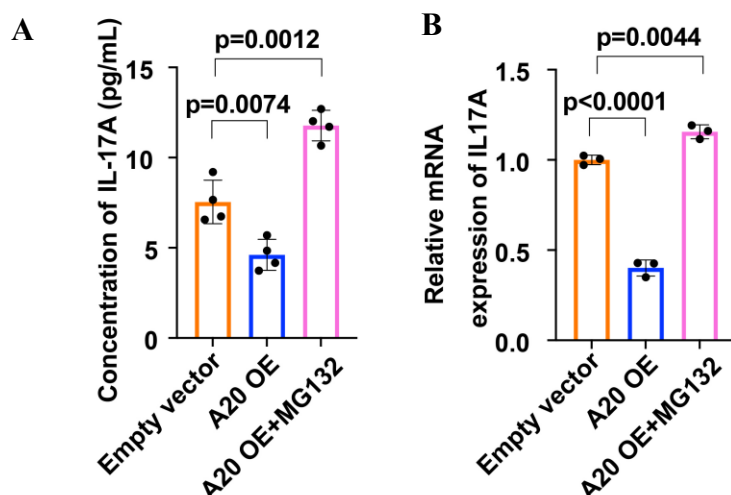


图 3.12 Th17 细胞过表达 A20 及过表达 A20 同时用 MG132 处理后 IL-17A 的 mRNA 表达水平及分泌水平

Figure 3.12 mRNA expression and secretion levels of IL-17A in Th17 cells after overexpression of A20 and overexpression of A20 with MG132 treatment

After MG132 proteasome activity inhibitor treatment of A20-overexpressed Th17 cells, compared with the empty plasmid group of Th17 cells and the A20-overexpressed group, (A) ELISA assay was performed to detect IL-17A secretion in the medium, which was independently repeated for 4 times; (B) The transcription of IL-17A in Th17 cells was detected by RT-qPCR assay, which was independently repeated 3 times. ANOVA test, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars denote SEM.

综合以上数据，我们得出结论：A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解从而负调控 STAT3。

3.1.8 *TNFAIP3* 基因单核苷酸多态性与 A20 表达之间的关联性研究

为了探究强直性脊柱炎患者 Th17 细胞中 A20 的表达是通过什么机制被抑制的，我们考察了 *TNFAIP3* 基因单核苷酸多态性和 A20 表达之间的关联。查阅文献后发现 rs7749323 位点突变会导致 *TNFAIP3* 基因及 A20 表达水平的降低，而 A20 的降低、rs10499194 多态性与强直性脊柱炎的风险降低有关^[201-202]，因此我们选用了 *TNFAIP3* 基因的两个 SNP 位点 rs7749323 和 rs10499194 位点进行研究，希望能探索出强直性脊柱炎患者中 A20 的表达被抑制的机制。

首先,我们用 rs7749323 和 rs10499194 这两个位点对 757 例强直性脊柱炎患者和 1001 例健康对照样本进行了基因分型检测,先探索一下 *TNFAIP3* 的 SNPs 与中国东北汉族人群强直性脊柱炎易感性的关系。众所周知,rs7749323 位点野生型等位基因是 G,突变型等位基因是 A (G>A); rs10499194 位点野生型等位基因是 C,突变型等位基因是 T (C>T)。

通过 TaqMan 探针鉴定 SNP 位点的基因型,756 例强直性脊柱炎患者和 1001 例健康对照样本的基因分型检测,结果如表 3.1 所示:1001 例健康对照样本中,rs7749323 位点 G/G 基因型 903 例,G/A 基因型 97 例,A/A 基因型 1 例;rs10499194 位点 C/C 基因型 934 例,C/T 基因型 64 例,T/T 基因型 3 例;756 例强直性脊柱炎患者中,rs7749323 位点 G/G 基因型 698 例,G/A 基因型 58 例,A/A 基因型 0 例;rs10499194 位点 C/C 基因型 690 例,C/T 基因型 63 例,T/T 基因型 3 例。

表 3.1 强直性脊柱炎患者 (AS) 与健康对照 (HC) 的基因型分布情况

rs7749323		G/G	G/A	A/A	总计
	HC	903	97	1	1001
	AS	698	58	0	756
rs10499194		C/C	C/T	T/T	总计
	HC	934	64	3	1001
	AS	690	63	3	756

rs7749323 位点的野生等位基因 G 在健康对照组和强直性脊柱炎患者中的基因频率分别为 95.07%和 96.16%,突变等位基因 A 在健康对照组和强直性脊柱炎患者中的基因频率分别为 4.95%和 3.84%,突变等位基因频率在两组间差异明显 ($P=0.00026$),具有统计学意义,如表 3.2 所示。rs10499194 位点的野生等位基因 C 在健康对照组和强直性脊柱炎患者中的基因频率分别为 96.50%和 95.44%,突变等位基因 T 在健康对照组和强直性脊柱炎患者中的基因频率分别为 3.50%和 4.56%,突变等位基因频率在两组间差异明显 ($P=0.009$),具有统计学意义。rs7749323 和 rs10499194 位点的突变等位基因频率在中国东北汉族人群强直性脊柱炎患者中偏低,仅为 3.84%和 4.56%,且对于 rs7749323 位点,强直性脊柱炎

患者的突变等位基因频率低于健康对照的突变等位基因频率;对于 rs10499194 位点, 强直性脊柱炎患者的突变等位基因频率高于健康对照的突变等位基因频率。

表 3.2 强直性脊柱炎患者 (AS) 与健康对照 (HC) 的突变等位基因频率

CHR	SNP	Pos(hg38)	Allele 1	Allele 2	MAF		OR	P
					HC	AS		
6	rs7749323	137909252	G	A	4.95%	3.84%	0.776	0.00026
6	rs10499194	137681500	C	T	3.50%	4.56%	1.305	0.00900

MAF, minor allele frequency, 最小等位基因频率; Allele 1 是野生型, Allele 2 是突变型;
OR, odds ratio

其次, 我们又用荧光素酶试验在细胞水平上研究了 rs7749323 和 rs10499194 位点等位基因的突变与 A20 表达之间的联系。为了在细胞水平研究探讨 rs7749323 和 rs10499194 位点的野生型和突变型 (rs7749323 位点的野生型 G/G 和突变型 A/A 与 rs10499194 位点的野生型 C/C 和突变型 T/T) 作为增强子区域, 对 *TNFAIP3* 基因的调控作用。因此设计在 *TNFAIP3* 启动子上游插入分别插入 G/G、A/A、C/C、T/T 构建 *TNFAIP3* 四种亚型的真核表达载体, 并将其分别转染到 HEK-293T 细胞中检测相对荧光素酶活性。

如图 3.13 所示, rs7749323 位点的突变型 A/A 比野生型 G/G 的相对荧光素酶活性明显降低, 有统计学意义 ($p=0.014$), 即 rs7749323 位点等位基因的突变降低了 A20 的表达水平。

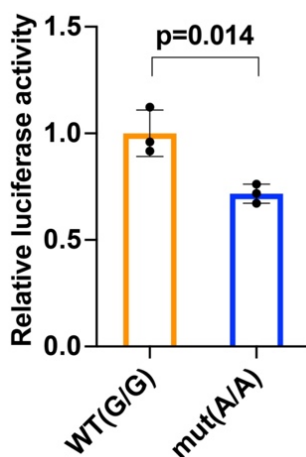


图 3.13 rs7749323 位点的野生型 G/G 和突变型 A/A 对 *TNFAIP3* 基因的调控作用

Figure 3.13 Regulation of TNFAIP3 gene by wild type G/G and mutant A/A at rs7749323

The eukaryotic expression vector of TNFAIP3 subtype was constructed by inserting G/G and A/A into the upstream of the *TNFAIP3* promoter, respectively, and transfected into HEK-293T cells to detect the relative luciferase activity. Student's t test was used to compare the differences between the groups, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

如图 3.14 所示, rs10499194 位点的突变型 T/T 比野生型 C/C 的相对荧光素酶活性显著升高, 有统计学意义 ($p=0.0035$), 即 rs10499194 位点等位基因的突变增高了 A20 的表达水平。

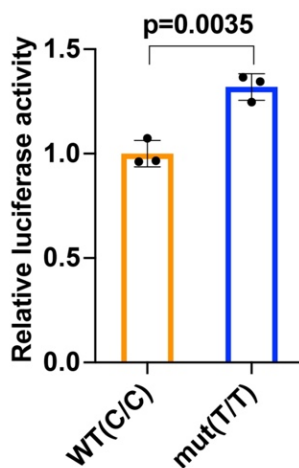


图 3.14 rs10499194 位点的野生型 C/C 和突变型 T/T 对 *TNFAIP3* 基因的调控作用

Figure 3.14 Regulation of TNFAIP3 gene by wild-type C/C and mutant T/T at rs10499194

The eukaryotic expression vector of TNFAIP3 subtype was constructed by inserting C/C and T/T into the upstream of the *TNFAIP3* promoter, respectively, and transfected into HEK-293T cells to detect the relative luciferase activity. Student's t test was used to compare the differences between the groups, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

最后, 因为荧光素酶实验只是构建了一个体外模型, 并不是真实在体内发生的情况, 所以我们用强直性脊柱炎患者和健康对照样本对体外荧光素酶试验结果进行了验证。应用实时定量 PCR 实验检测了 74 例健康对照和 78 例强直性脊柱炎患者 PBMC 中 *TNFAIP3* 的 mRNA 表达水平, 如图 3.15 所示, 分析发现强直

性脊柱炎患者组 *TNFAIP3* 的 mRNA 表达水平显著低于健康对照组 *TNFAIP3* 的 mRNA 表达水平, 具有统计学意义 ($p=0.0011$)。

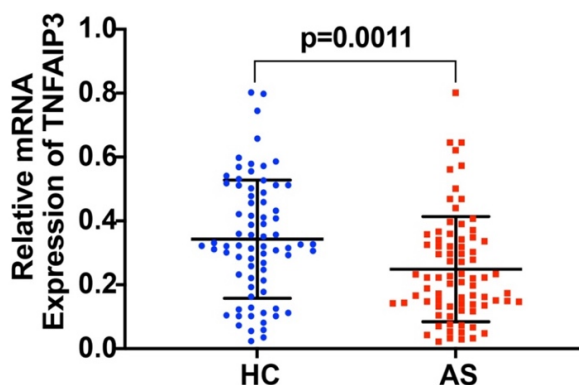


图 3.15 健康对照 (HC) 和强直性脊柱炎患者 (AS) *TNFAIP3* 的 mRNA 表达水平

Figure 3.15 mRNA expression levels of *TNFAIP3* in healthy controls (HC) and ankylosing spondylitis patients (AS)

The mRNA expression level of *TNFAIP3* in PBMC of 74 healthy controls and 78 patients with ankylosing spondylitis was detected by real-time qPCR. Student's t test was used to compare the differences between the groups, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

随后又对这 78 例 AS 患者进行了 rs7749323 和 rs10499194 位点的基因分型检测, 其中 78 例 AS 患者中 rs7749323 位点基因型分布为 71 例 G/G, 7 例 G/A; rs10499194 位点基因型分布为 68 例 C/C, 8 例 C/T, 2 例 T/T。如图 3.16 所示, 把 rs7749323 位点按 G/G、G/A 基因型分组比较发现, AS 患者携带 G/A 基因型的个体 *TNFAIP3* mRNA 表达稍高于携带 G/G 基因型的 AS 个体, 但 $P>0.05$ 没有统计学意义。

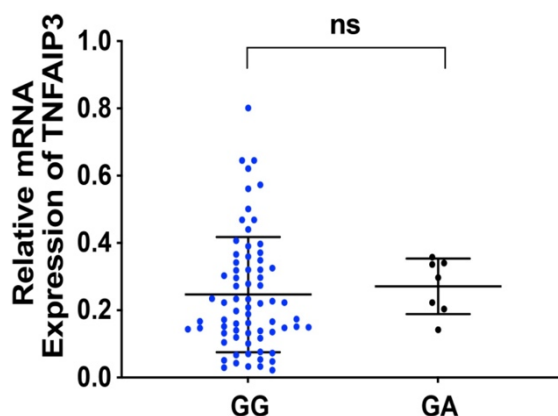


图 3.16 强直性脊柱炎患者 *TNFAIP3* mRNA 表达水平与 rs7749323 基因型的关系

Figure 3.16 Relationship between *TNFAIP3* mRNA expression level and rs7749323 genotype in patients with ankylosing spondylitis

The rs7749323 locus was genotyping detected in 78 patients with AS, and the rs7749323 locus genotype distribution was 71 G/G and 7 G/A. Then the *TNFAIP3* mRNA expression level of individual patients with different genotypes of AS was compared. Student's t test was used to compare the differences between the groups, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

如图 3.17 所示,把 rs10499194 位点按 C/C、C/T、T/T 基因型分组比较发现,AS 患者携带 C/T 和 T/T 基因型的个体 *TNFAIP3* mRNA 表达略高于携带 C/C 基因型的 AS 个体,纯合子突变 T/T 基因型的个体比纯合子突变 T/T 基因型的个体 *TNFAIP3* 的 mRNA 表达水平更高一点,但所有 $P>0.05$,都没有统计学意义。

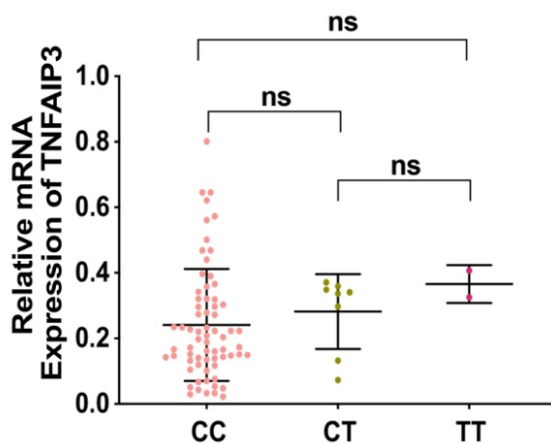


图 3.17 强直性脊柱炎患者 *TNFAIP3* mRNA 表达水平与 rs10499194 基因型的关系

Figure 3.17 Relationship between TNFAIP3 mRNA expression level and rs10499194 genotype in patients with ankylosing spondylitis

The rs10499194 locus was genotyping detected in 78 patients with AS, and the rs10499194 locus genotype distribution was 68 C/C, 8 C/T and 2 T/T. Then the *TNFAIP3* mRNA expression level of individual patients with different genotypes of AS was compared. ANOVA test, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars donate SEM.

综上所述, 虽然 rs7749323 和 rs10499194 位点等位基因突变在体外细胞水平上表现出了对 A20 表达水平的调控作用, 但用 AS 患者和健康对照样本验证后, 发现 rs7749323 和 rs10499194 位点等位基因突变对 A20 的表达水平未见明显差异, 需要进一步收集 SNPs 突变的患者样本, 扩大样本数量分析 SNPs 与 *TNFAIP3* 转录活性之间的关系。

3.1.9 GA3 可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分泌

如前文所述, GA3 可以在人呼吸道上皮细胞中诱导 A20 的表达从而发挥抗炎效果。那么, GA3 是否也同样可以诱导 Th17 细胞中 A20 的表达, 从而通过对 STAT3 的调控来抑制 IL-17A 的表达和分泌呢? 为回答以上问题, 我们用 25 和 50 μ M 两种浓度的 GA3 对 Th17 细胞进行处理, 然后考察 STAT3 和 IL-17A 的蛋白水平、IL-17A 的转录水平以及 IL-17 分泌水平的变化。如图 3.18 所示, 两种浓度的 GA3 均可显著增加 A20 蛋白水平 ($p=0.000309$ 和 $p=0.001698$), 并降低 Th17 细胞中 STAT3 的蛋白水平 ($p=0.00231$ 和 $p=0.001889$)、IL-17A 的蛋白水平 ($p=0.004893$ 和 $p=0.003854$)、IL-17A 的转录水平 (p 值均 <0.0001) 和 IL-17A 的分泌水平 ($p=0.049$ 和 $p=0.0001$)。此外, 高浓度 GA3 对于 IL-17A 的转录水平和分泌水平的调控效果要比低浓度 GA3 更为显著 ($p=0.0006$ 和 $p=0.0019$) (图 3.18)。这些结果说明 GA3 可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分泌。

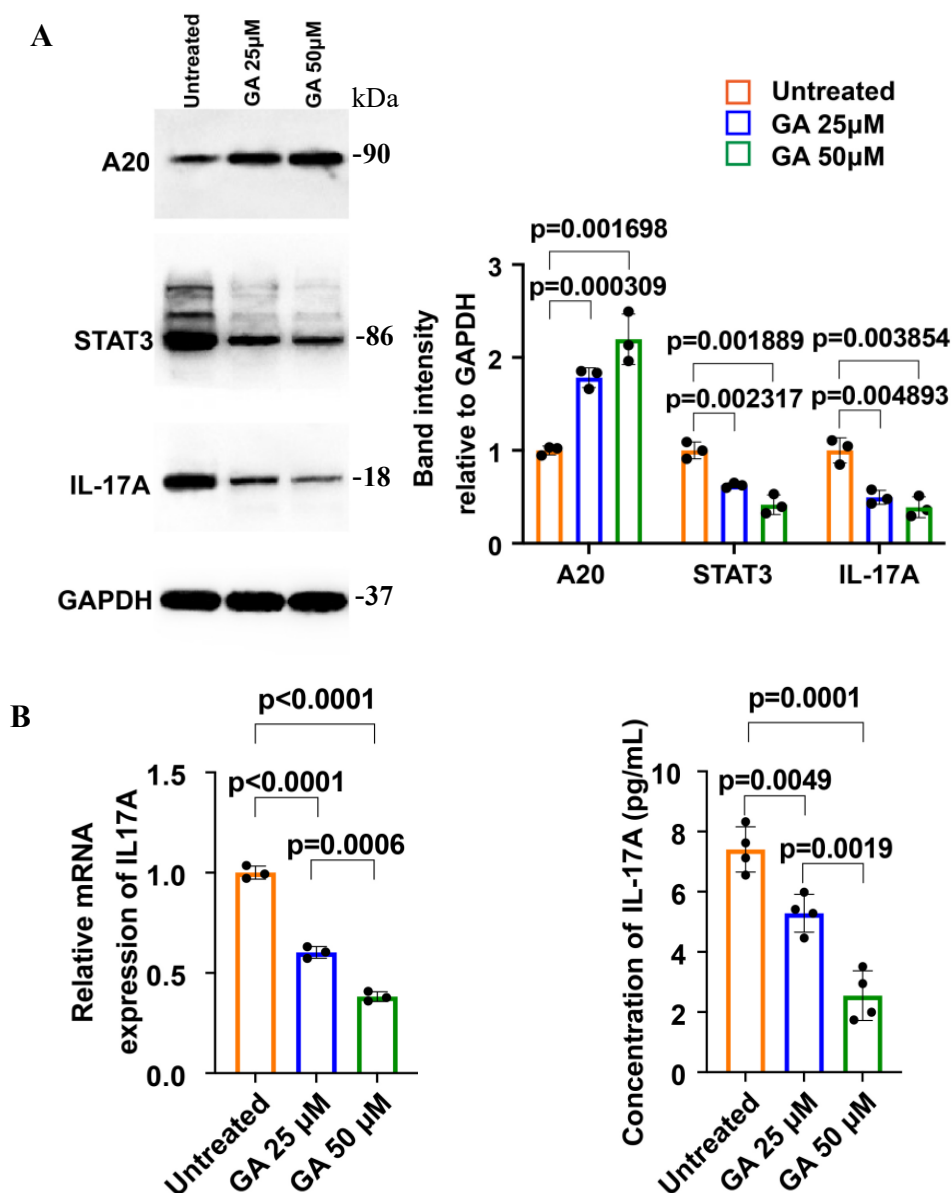


图 3.18 两种浓度 GA3 处理对 Th17 细胞中 STAT3 和 IL-17A 的蛋白水平、IL-17A 的转录水平以及 IL-17A 分泌水平的影响

Figure 3.18 Effects of GA3 treatment on the protein levels of STAT3 and IL-17A, the transcription level of IL-17A and the secretion level of IL-17A in Th17 cells

Th17 cells were treated with GA3 concentrations of 25 μ M and 50 μ M, and then the changes of (A) STAT3 and IL-17A protein levels and (B) IL-17A transcription levels and IL-17 secretion levels were investigated. ANOVA test, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars denote SEM.

3.1.10 GA3 处理并未导致 Th17 细胞活力下降或活性氧积累

既然 GA3 可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分泌，那么它是否可以作为一种治疗强直性脊柱炎的新药物呢？如前文所述，已有多项研究发现 GA3 可诱导活性氧的产生，从而在体内实验导致毒性效应。关于药物有效性和毒性的探讨需要在特定的药物剂量下进行。因此我们考察了在本研究所使用的处理浓度下，GA3 是否可引起 Th17 细胞活力下降或活性氧积累。如图 3.19 所示，在 25 和 50 μ M 两种可以抑制 IL-17A 表达和释放的浓度下，GA3 并未引起 Th17 细胞活力下降或活性氧积累。这些结果说明 GA3 有可能在不引起毒性效应的浓度下在强直性脊柱炎的治疗中发挥作用。

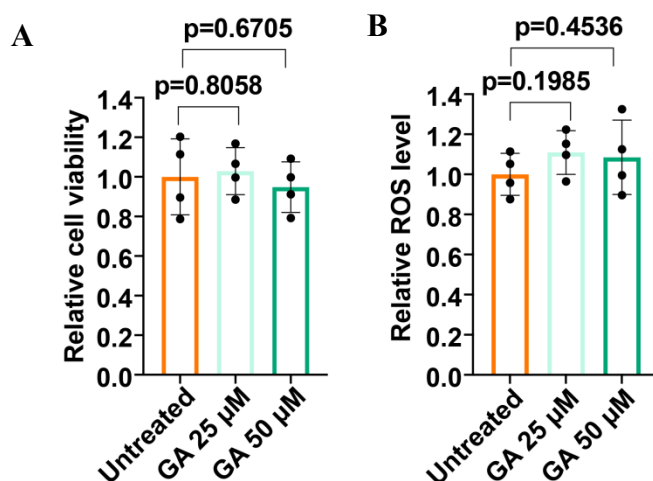


图 3.19 两种浓度 GA3 处理对 Th17 细胞活力与活性氧积累的影响

Figure 3.19 Effects of GA3 treatment on Th17 cell viability and ROS accumulation

Th17 cells were treated with GA3 at two concentrations of 25 μ M and 50 μ M to detect (A) Th17 cell viability and (B) ROS accumulation. ANOVA test, $n=3$ biologically independent experiments, p value less than 0.05 was considered significant. Error bars denote SEM.

3.1.11 建立基于 LC-MS³ 策略测定血液药物浓度的技术手段

上述研究发现 GA3 可以抑制 Th17 细胞分泌 IL-17A 细胞因子，作为治疗强直性脊柱炎的潜在新药，我们需要对 GA3 进行药代动力学研究，其中测定血药

浓度就是一个关键内容。由于 GA3 并未被用于任何疾病的临床治疗, 因此我们选择临床上使用比较普遍, 用于治疗癫痫病和神经性疼痛的卡马西平作为待测物进行了概念验证实验, 并且成功建立了基于 LC-MS³ 测定血液药物浓度的技术手段。

首先我们建立并优化了液相色谱和质谱条件, 以及样品处理条件。

选择 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1×100 mm, 1.8 μm) 进行色谱分离, 因为该色谱柱对卡马西平和卡马西平-D₂N¹⁵ 具有良好的峰形和保留行为。采用高有机相梯度洗脱能有效减少残留, 对消除基质效应有积极作用。在优化的液相色谱条件下, 二者的保留时间均为 3.25 分钟。对于 LC-MS³ 方法, 卡马西平和卡马西平-D₂N¹⁵ 的代表性色谱图如图 3.20 所示, 表明两者几乎不受人血浆中内源性物质的影响。此外, 对于空白血浆样品, 没有观察到卡马西平和卡马西平-D₂N¹⁵ 的响应增强, 这表明残留可以忽略不计, 并且 MS 通道之间没有干扰。

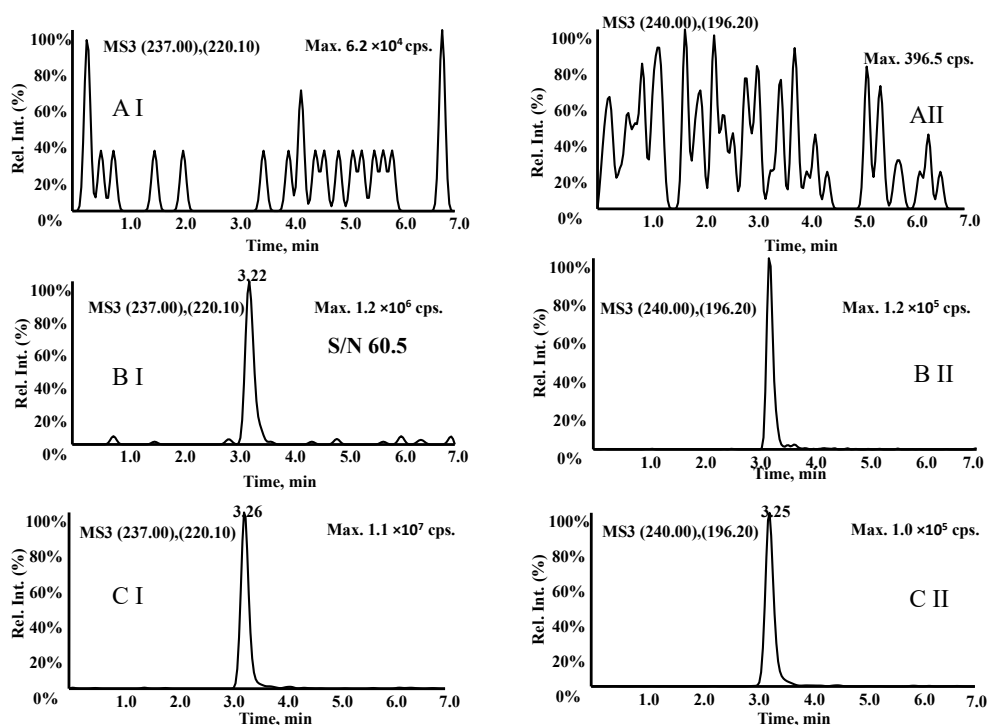


图 3.20 卡马西平(I)和卡马西平-D₂N¹⁵(II)的代表性 LC-MS³ 色谱图

Figure 3.20 Representative LC-MS³ chromatograms of carbamazepine (I) and carbamazepin-D₂N¹⁵ (II)

(A) Blank plasma; (B) LLOQ samples (carbamazepine, 0.50 μg/mL; Carbamazepin-D₂N¹⁵, 10.0 μg/mL); (C) Blood samples from patients with epilepsy after oral carbamazepine

卡马西平和卡马西平- D_2N^{15} 的 MS2 和 MS3 质谱图如图 3.21 所示, 由于卡马西平和卡马西平- D_2N^{15} 都是含氮化学物质, 在正离子模式下响应较高。在中等分辨率 MRM 采集中, 卡马西平的定量分析采用的离子对为 m/z 237.0 $\rightarrow$ 220.1, 卡马西平- D_2N^{15} 的定量分析采用的离子对为 m/z 240.0 $\rightarrow$ 196.2 (图 3.21 A 和 B)。在 MS3 模式下, 对于卡马西平, m/z 220.1 的产物离子进一步碎裂成 m/z 192.2、165.1 的第二代产物离子。而对于卡马西平- D_2N^{15} , m/z 196.2 处的产物离子进一步碎裂成 m/z 181.2、167.2 的第二代产物离子。孙离子监测模式如下: 卡马西平, m/z 237.0 $\rightarrow$ 220.1 $\rightarrow$ 192.2; 卡马西平- D_2N^{15} , m/z 240.1 $\rightarrow$ 196.2 $\rightarrow$ 181.2。孙离子选择提取的窗口质量范围为 1.0 Da。

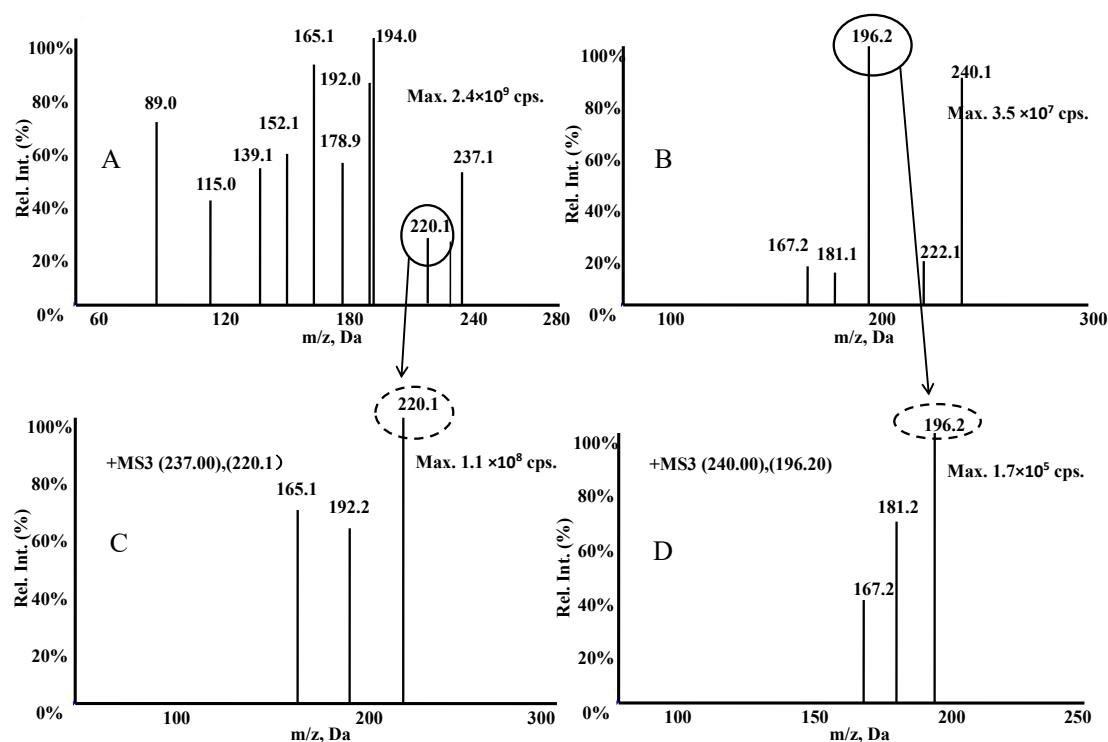


图 3.21 卡马西平和卡马西平- D_2N^{15} (B, D) 的 MS2 和 MS3 质谱图

Figure 3.21 MS2 and MS3 mass spectra of Caramazepine (A, C) and Caramazepine- D_2N^{15} (B, D)

(A, C) represates for carbamazepine; (B, D) stands for Carmazepin- D_2N^{15}

选用甲醇沉淀蛋白质进行样品处理,此方法具有方便、简单的优点。将内标溶液(5 μL)和甲醇(1000 μL)加入5 μL 血浆中以沉淀蛋白质。结果发现,蛋白质沉淀样品之后可以得到较好的灵敏度和对称的色谱峰,卡马西平或卡马西平- D_2N^{15} 的分析不受基质效应的影响。

然后我们对该方法的准确度、精密度、选择性、线性范围、定量下限等参数进行了验证。消耗样品体积为5 μL , LLOQ 为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。日内、日间精密度为8.23%,准确度在98.26%~102.92%之间。

卡马西平的线性范围为0.50-30 g/mL ,典型回归方程为 $y=17.4x+1.52$ ($r^2=0.9973$)。所有浓度的精密度均小于2.92%,日内和日间准确度的变异系数均小于8.23%。如表3.3所示,卡马西平- D_2N^{15} 的回收率为98.9-110.2%,卡马西平的回收率在研究的浓度范围内具有重现性。

表 3.3 卡马西平在血浆中的绝对回收率 (数据为平均值标准差 $n=3$)

	回收率(%)		
	低浓度质控	中浓度质控	高浓度质控
卡马西平	100.7 $\pm$ 9.20	110.5 $\pm$ 7.00	110.2 $\pm$ 4.00

对于基质效应,3个水平QC样品的实际浓度占标示浓度的百分比分别为:94.3 $\pm$ 8.66%(低)、107.7 $\pm$ 6.83%(中)、112.5 $\pm$ 4.11%(高)。

卡马西平的稳定性数据如表3.4所示,卡马西平的浓度在所有试验条件下都保持在标示浓度的100 $\pm$ 7.23%,表明卡马西平在实验条件下稳定。

表 3.4 卡马西平的稳定性 (数据为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$)

化合物	标称浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	长期 (-70 $^{\circ}\text{C}$)	短期	反复冻融	样品处理后
卡马西平	1.0	99.9 $\pm$ 3.77	105.0 $\pm$ 2.65	98.0 $\pm$ 5.75	101.5 $\pm$ 7.21
	5.0	96.4 $\pm$ 1.51	101.5 $\pm$ 7.23	100.4 $\pm$ 5.25	91.6 $\pm$ 3.52
	15	94.4 $\pm$ 2.52	98.4 $\pm$ 3.67	94.9 $\pm$ 3.01	89.3 $\pm$ 0.67

最后我们将 LC-MS³ 方法与 LC-MRM 方法进行了比较, 并且将该方法应用于卡马西平治疗后癫痫患者血药浓度的监测。卡马西平 MRM 为 m/z 237.0 $\rightarrow$ 220.1, 卡马西平- D₂N¹⁵MRM 为 m/z 240.1 $\rightarrow$ 196.2。0.50 $\mu\text{g/mL}$ 卡马西平的 LC-MRM 色谱图见图 3.22 B I, LC-MS³ 色谱图见图 3.20 B I。0.50 $\mu\text{g/mL}$ 卡马西平的 MS2 采集峰高为 1449.5 cps, 信噪比为 19.6, 而 MS3 采集峰高为 1.2e6 cps, 信噪比为 60.5, MS3 显示出更高的灵敏度和信噪比。

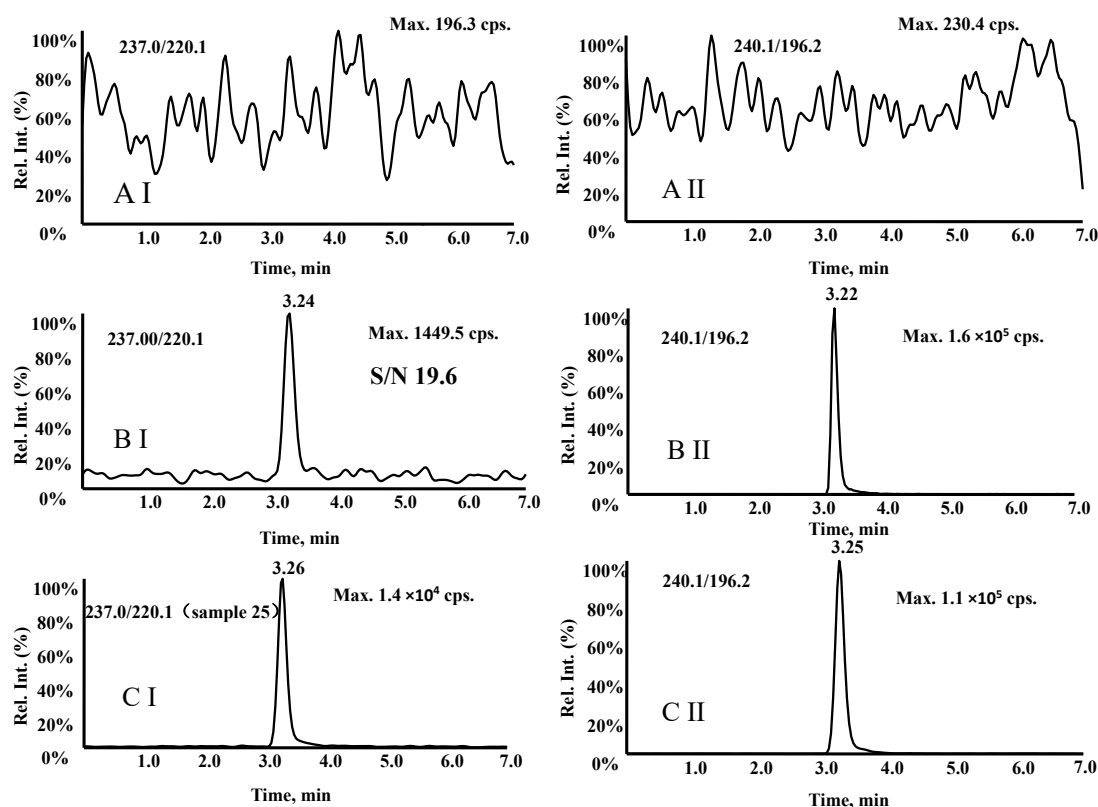


图 3.22 卡马西平(I)和卡马西平-D₂N¹⁵(II)的代表性 LC-MRM 色谱图

Figure 3.22 Representative LC-MRM chromatograms of carbamazepine (I) and carbamazepin-D₂N¹⁵ (II)

(A) Blank plasma; (B) LLOQ samples (carbamazepine, 0.50 $\mu\text{g/mL}$; Carbamazepin-D₂N¹⁵, 10.0 $\mu\text{g/mL}$); (C) Blood samples from patients with epilepsy after oral carbamazepine

使用经验证的 LC-MS³ 方法对 34 名接受卡马西平治疗(100-1100mg/天)的患者进行血药浓度监测, 两种方法检测的卡马西平浓度见表 3.5 和图 3.23。

表 3.5 LC-MRM 和 LC-MS³ 测定 34 例患者的卡马西平药物浓度

样品 ID	年龄	性别	MRM	MS3	%
样本 1	74	女	6.39	6.67	95.8
样本 2	34	女	8.06	7.56	106.6
样本 3	40	男	2.03	2.33	87.1
样本 4	29	男	1.06	1.2	88.3
样本 5	23	男	11.1	11.4	97.4
样本 6	61	男	12.1	13.1	92.4
样本 7	34	女	13.8	15.2	90.8
样本 8	37	女	14.8	15.4	96.1
样本 9	30	男	5.87	6.67	88.0
样本 10	33	女	7.31	8.34	87.6
样本 11	27	男	2.1	2.44	86.1
样本 12	29	男	2.05	2.16	94.9
样本 13	25	男	5.36	5.94	90.2
样本 14	57	女	14.9	16.6	89.8
样本 15	23	男	6.47	7.33	88.3
样本 16	30	女	7.84	8.51	92.1
样本 17	34	男	6.13	7.05	87.0
样本 18	23	女	6.5	7.5	86.7
样本 19	33	女	7.46	7.97	93.6
样本 20	39	女	2.21	2.32	95.3
样本 21	9	男	1.19	1.13	105.3
样本 22	14	男	10.6	12	88.3
样本 23	58	女	12.7	13.1	96.9
样本 24	20	女	5.27	5.92	89.0
样本 25	40	女	6.24	6.77	92.2
样本 26	36	男	7.72	8	96.5
样本 27	29	女	10.4	11.3	92.0
样本 28	39	女	12.3	13.2	93.2
样本 29	52	男	14.8	15.1	98.0
样本 30	19	女	6.54	7.1	92.1
样本 31	25	女	8.05	8.44	95.4
样本 32	20	男	6.70	7.48	89.6
样本 33	38	女	7.58	8.23	92.1
样本 34	29	男	4.82	4.88	98.8
平均值			7.60	8.19	
SD			4.01	4.25	

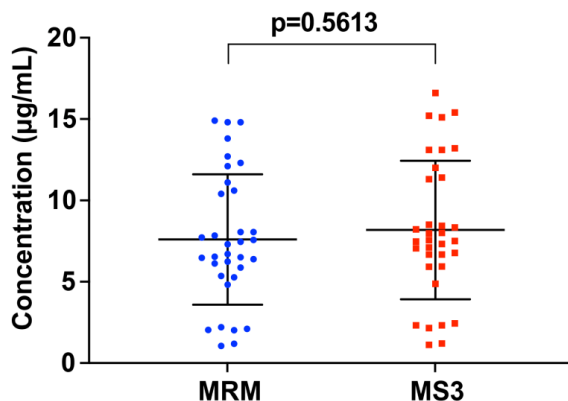


图 3.23 LC-MS³ 和 LC-MRM 定量分析 34 份患者样本中的卡马西平浓度

Figure 3.23 Quantitative analysis of carbamazepine concentrations in 34 patient samples by LC-MS³ and LC-MRM

The validated LC-MS³ method was used to monitor the blood concentration of 34 patients treated with carbamazepine (100-1100mg/ day), and the accuracy of LC-MS³ and LC-MRM methods for detection of blood concentration was compared.

血浆浓度测量结果与估计值的比较如图 3.23 和图 3.24 所示, 将 Passing-Bablok 用于回归分析, 结果显示数据具有很强的一致性, 没有恒定偏差和比例偏差(如图 3.24 所示), 其中 $y = -0.105109$ (95% CI, -0.3767 至 0.1084) + 0.934783 (95% CI, 0.9059 至 0.9757) x 。

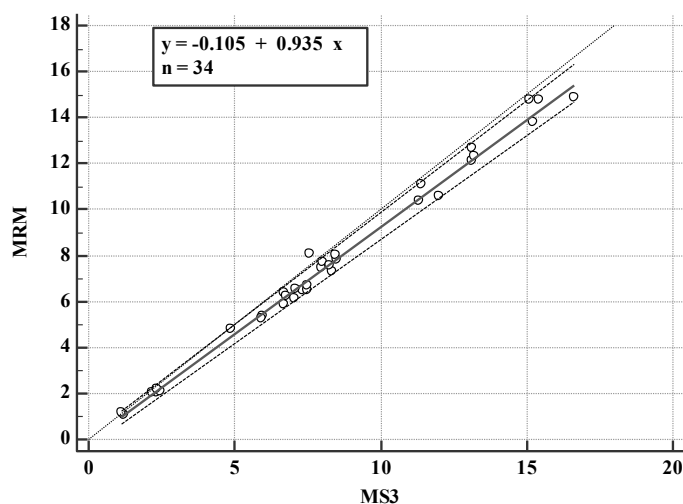


图 3.24 LC-MRM 和 LC-MS³ 测定的患者样本中卡马西平浓度的比较

Figure 3.24 Comparison of carbamazepine concentrations in patient samples measured by LC-MRM and LC-MS³

The solid black line was the pass-Bablok regression, which showed strong data consistency without constant bias and proportional bias, and $y = -0.105109 + 0.934783 x$

Bland-Altman 图显示 LC-MRM 和 LC-MS³ 方法之间的差异为- 7.7% (95% LoA, - 17.9-2.6%)。虚线之间的圆点表示样品对在 ± 1.96 SD 的可接受范围内, 如图 3.25 所示, 卡马西平差异均匀分布在均值的两侧, 只有 2/34 的值 (5.88%) 没有落在可信区间; 其中 94.1% 的卡马西平样品对应的最大浓度偏差为 1.96SD, 因此 LC-MS³ 分析方法的可靠性与 LC-MRM 是一致的。建立的 LC-MS³ 方法具有灵敏度高、信噪比高、消耗样品量小 (5 μ L) 等优点。

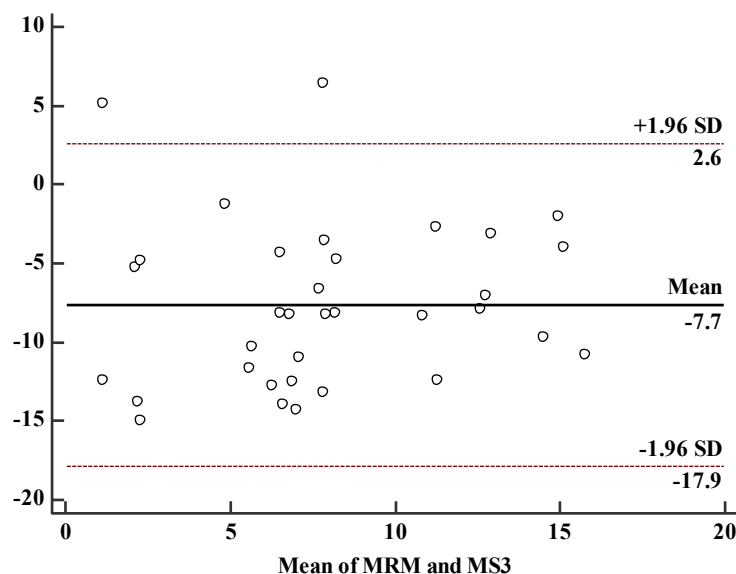


图 3.25 卡马西平测量的 Bland-Altman 图说明了 MRM 和 MS3 之间的差异

Figure 3.25 Bland-Altman plot of carbamazepine measurements illustrates the difference between MRM and MS3

The Bland-Altman plot showed that the difference between LC-MRM and LC-MS³ methods is -7.7%, and the dots between the dashed lines indicated that the sample pairs were within the acceptable range of ± 1.96 SD, carbamazepine differences were evenly distributed on both sides of the mean, and only 2/34 values (5.88%) do not fall within the confidence interval; 94.1% of carbamazepine samples had a maximum concentration deviation of 1.96SD.

验证结果数据表明, 本研究所建立的 LC-MS³ 方法可以用于定量分析人血浆中卡马西平的浓度, 同时应用于临床血药浓度监测。本研究首次将 LC-MS³ 应用于人血浆中卡马西平浓度的定量检测, 为 LC-MS³ 应用于生物样品中化合物的定量分析提供了依据和证据。

3.2 讨论

本研究中,我们证明了 A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解抑制其表达,从而抑制 Th17 分化以及 IL-17 细胞因子的表达和分泌(如图 3.26)。

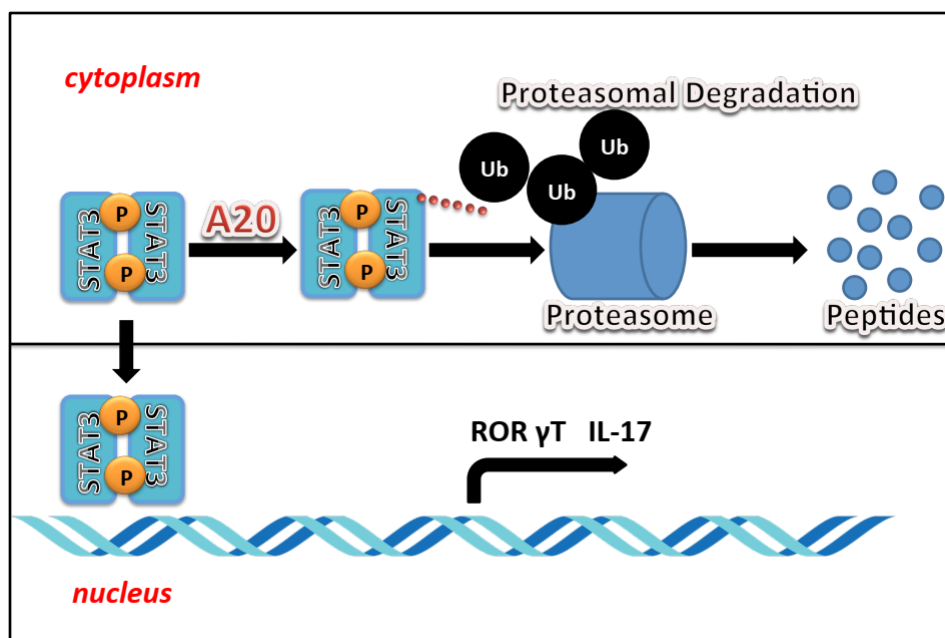


图 3.26 A20 通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解抑制 IL-17 的表达

Figure 3.26 A20 inhibits IL-17 expression by mediating ubiquitination and proteasome degradation of STAT3

The schematic showed that A20 inhibited the expression of STAT3 by mediating its ubiquitination and proteasome degradation, thereby inhibiting Th17 differentiation and IL-17 cytokine expression and secretion

此前很多文献报道 A20 有抗炎功能,但多数研究认为 A20 是通过抑制 NF- κ B 的表达或通路活性来发挥其抗炎功能的。如前文所述, A20 去泛素化酶活性的第一个底物是 RIP1。当 TNF 受体被激活时, RIP1 可在第 63 位赖氨酸 63 被 E3 泛素连接酶 cIAP1 和 cIAP2 多泛素化^[148]。A20 则可通过其去泛素化酶的活性去除这些 K63 连接的聚泛素链,阻止 RIP1 与 NF- κ B 重要调节因子(NF- κ B essential modulator, *NEMO*)相互作用。随后, A20 还可以介导 RIP1 的 K48 位连接聚泛素链,使其被蛋白酶体降解^[203],而 RIP1 在 NF- κ B 的激活中扮演着重要作用^[204]。通过这种方式, A20 通过先去泛素化再泛素化介导的 RIP1 降解,从而

抑制 TNF 诱导的 NF- κ B 信号通路。A20 还可分别通过去泛素化 TRAF6 和 RIP2 来抑制由 TLR4 和 NOD2 所触发的 NF- κ B 信号通路^[205-206]。此外, A20 也是 T 细胞和 B 细胞诱导的 NF- κ B 信号通路的关键抑制剂, 可凭借其去泛素化酶活性移除 MALT1 蛋白 K63 位的多泛素化链, 从而抑制 MALT1 作为 NF- κ B 激活支架蛋白的活性^[207]。本研究是首次发现 A20 可通过调控 STAT3 的表达来抑制炎症细胞的分化和炎症因子的表达, 因此, 本研究阐明了一种 A20 发挥抗炎作用的新机制。

除了在 Th17 分化中扮演重要角色外, STAT3 还有多种重要的生物学功能。例如, 研究者发现, 在超过 50% 的人类癌症中均能观察到 STAT3 酪氨酸的持续磷酸化, 包括白血病、淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肺癌等, 说明这些癌症的发生发展很可能与 STAT3 的激活有关^[208]。通常情况下, STAT3 在癌症中的异常激活源于其自身的功能获得性突变或上游调节因子的持续激活, 包括细胞因子和生长因子受体、它们的同源配体以及非受体酪氨酸激酶等。例如, IL-6 是许多癌症中 STAT3 异常激活的驱动因素。IL-6/IL-6Ra 信号通路 with 多种癌症的肿瘤进展相关, 包括乳腺癌、肺癌和前列腺癌等, 而这些癌症的进展又与患者的不良预后相关^[209-211]。此外, IL-6 信号通路还可与其他 IL-6 家族细胞因子 (如 IL-11) 一起调节一系列炎症以及炎症相关肿瘤的发生。例如, IL-6 和 IL-11 介导的 STAT3 激活会诱发肠道慢性炎症, 影响肠上皮细胞更新, 从而导致对胃癌的易感性增加^[212]。既然 STAT3 的高活性与多种炎症和癌症的发生发展相关, 而本研究又发现 A20 可通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解而下调其表达且 GA3 可通过上调 A20 的表达降低 STAT3 的蛋白水平, 那么, 是否可以以本研究所建立的 A20-STAT3 调控轴作为靶点, 以 GA3 为药物治疗这些 STAT3 相关疾病呢? 在继续利用动物实验验证本研究所阐明的机制和 GA3 对强直性脊柱炎的预防和治疗效果之后, 我们将以本研究作为基础和契机, 探索利用 GA3 治疗其它 STAT3 相关疾病的可能性。

TNFAIP3 的单核苷酸多态性已被证明与多种疾病的发生发展有关。既然 A20 可以通过调控 STAT3 的表达来调控 Th17 细胞的分化和 IL-17 的表达与分泌, 那 *TNFAIP3* 的单核苷酸多态性是否也与强直性脊柱炎的发生发展有关呢? 在本研

究中,我们初步探索了 *TNFAIP3* 的单核苷酸多态性与中国东北汉族人群强直性脊柱炎易感性的关系以及 *TNFAIP3* 基因 rs7749323 和 rs10499194 位点的突变对 A20 表达水平的影响,结果显示 rs7749323 和 rs10499194 位点的突变等位基因频率在中国东北汉族人群强直性脊柱炎患者中偏低,仅为 3.84%和 4.56%,且 AS 患者 rs7749323 位点的突变等位基因频率低于健康对照组,AS 患者 rs10499194 位点的突变等位基因频率高于健康对照组。然而遗憾的是 rs7749323 和 rs10499194 位点等位基因的突变对 A20 的表达水平未见明显差异。导致这样结果的原因有很多,首先可能是 rs7749323 和 rs10499194 位点的突变等位基因频率在中国东北地区强直性脊柱炎患者中较低,仅为 3.84%和 4.56%,在 A20 表达水平与 SNPs 基因型的关系实验中 AS 患者的样本量偏低(仅为 78 例),需要进一步收集 SNPs 突变的患者样本;其次也有可能是这些已经报道的 SNPs 在中国东北地区的强直性脊柱炎患者群中不具有功能性,与西方强直性脊柱炎患者人群的机制不同。尽管 SNPs 结果未见明显差异,与其他人群的单核苷酸多态性分析结果不一致,这也从另一个角度说明了中国东北强直性脊柱炎患者的炎症致病机制的特异性,为未来研发针对中国尤其东北强直性脊柱炎患者的有效药物和剂量提供了参考,同时也要求我们继续收集 SNPs 突变的病例,继续分析不同单核苷酸多态性,以求找到中国东北地区患者中特异性的 SNPs 突变位点,进一步研究阐明 *TNFAIP3* 基因单核苷酸多态性与强直性脊柱炎发生发展之间的联系。

赤霉素 GA3 是一种重要的植物激素。本研究发现 GA3 可以通过 A20-STAT3 调控轴来抑制 IL-17A 的表达和分泌,因此提出了利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的进一步研究设想。事实上这已不是第一次利用植物激素治疗人类疾病的探索。例如脱落酸可通过调控胰岛素释放和葡萄糖摄取来影响葡萄糖稳态,因此与 2 型糖尿病和妊娠期糖尿病有关^[213]。既然如此,摄入富含脱落酸的饮食是否能够在某种程度上缓解糖尿病呢?答案是肯定的。Magnone 等人的研究表明,增加富含脱落酸水果的摄入可增强葡萄糖耐受性并缓解胰岛素血症^[214]除了能够调控胰岛素释放和葡萄糖摄取之外,脱落酸还被认为具有促炎作用^[215]。已知有多种刺激和诱导人粒细胞产生脱落酸,进而增加免疫细胞中 cAMP^[216-217]。有趣的是,脱落酸类似物可抵消这种 cAMP 增加,从而被作为抗炎症药物使用^[218]。然而,目前

也有关于脱落酸缓解肥胖^[219]、炎性肠病^[220]和流感感染^[221]所引发炎症的报道。除了脱落酸之外,水杨酸和包括阿司匹林在内的水杨酸衍生物也被认为可以调节葡萄糖代谢^[222]。值得注意的是,水杨酸可防止 AMP 活化蛋白激酶失活,而 AMP 活化蛋白激酶是治疗 2 型糖尿病的药物靶点^[223]。这些研究表明水杨酸盐有希望作为糖尿病的治疗药物。在本研究中我们初步探索了利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性。虽然初步的结果表明 GA3 可在不引起 Th17 细胞活力下降和活性氧积累的情况下抑制 IL-17A 的表达和分泌,但考虑到已有多项研究报道了 GA3 的细胞和机体毒性,我们后续将构建强直性脊柱炎小鼠模型,在评价 GA3 治疗小鼠强直性脊柱炎效果和生物安全性的同时也对我们建立的 A20-STAT3 调控轴进行体内验证,从而进一步提升本研究的严谨性和临床价值。

除了用小鼠模型考察 GA3 治疗强直性脊柱炎的疗效和安全性之外,我们还将临床前实验中依据其药代动力学指标优化其用法用量。在药代动力学研究中,一个关键的内容就是测定血药浓度。因此,我们在本研究中还对测定血液中药浓度的方法进行了优化改进,从而为评估利用 GA3 治疗强直性脊柱炎的可能性打下技术基础。具体而言,我们首次尝试了使用基于 Qtrap 串联质谱仪的 MS³ 策略监测血药浓度,并以临床上用于治疗癫痫病和神经性疼痛的卡马西平作为待测物进行了概念验证实验,对此方法的精确性、稳定性和选择性进行了详细评估。结果表明,本研究所开发的 LC-MS³ 方法具有灵敏度高、信噪比高、所需样品量小等优点,可以定量人血浆中卡马西平的浓度,实现临床血药浓度监测。

综上,本研究针对强直性脊柱炎的发病机制和治疗药物进行了初步探索,并对治疗药物的药代动力学研究方法进行了改良,取得了一定的成果。本研究将为关于强直性脊柱炎的基础和临床前研究提供新的思路和技术手段。

第4章 结论

1. 强直性脊柱炎患者表现出炎症因子释放紊乱现象, 并且外周血中 Th17 细胞比例升高、IL-17 分泌增多、Th17 细胞中的 A20 表达显著减少
2. A20 可负调控人外周血 Th17 细胞中 IL-17 的分泌和表达, 并抑制 Th17 分化
3. STAT3 可能是介导 A20 调控 Th17 分化的关键转录因子, A20 通过介导 STAT3 的泛素化-蛋白酶体降解从而负调控 STAT3。
4. GA3 可通过 A20-STAT3 调控轴调控 IL-17A 的表达和分泌, 并且 GA3 处理并未导致 Th17 细胞活力下降或活性氧积累
5. 基于 LC-MS³ 策略测定血液药物浓度的方法具有灵敏度高、信噪比高、所需样品量小等优点, 是一种高效的临床血药浓度监测方法

参考文献

- [1] Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007 Apr 21;369(9570):1379-1390.
- [2] Dagfinrud H, Kvien TK, Hagen KB. The Cochrane review of physiotherapy interventions for ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2005 Oct;32(10):1899-906.
- [3] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Apr;53(4):650-7.
- [4] Montoya J, Matta NB, Suchon P, Guzian MC, Lambert NC, Mattei JP, Guis S, Breban M, Roudier J, Balandraud N. Patients with ankylosing spondylitis have been breast fed less often than healthy controls: a case-control retrospective study. *Ann Rheum Dis*. 2016 May;75(5):879-82.
- [5] Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC); Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, Pointon JJ, Jin R, Zhou X. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):123-7.
- [6] Lin Z, Bei JX, Shen M, Li Q, Liao Z, Zhang Y, Lv Q, Wei Q, Low HQ, Guo YM, Cao S, Yang M, Hu Z, Xu M, Wang X, Wei Y, Li L, Li C, Li T. A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):73-7.
- [7] Cauli A, Piga M, Floris A, Mathieu A. Current perspective on the role of the interleukin-23/interleukin-17 axis in inflammation and disease (chronic arthritis and psoriasis). *Immunotargets Ther*. 2015 Oct 1;4:185-90.
- [8] Ruiz de Morales JMG, Puig L, Daudén E, Cañete JD, Pablos JL, Martín AO, Juanatey CG, Adán A, Montalbán X, Borrueal N, Ortí G, Holgado-Martín E, García-Vidal C, Vizcaya-Morales C, Martín-Vázquez V, González-Gay MÁ. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev*. 2020 Jan;19(1):102429.
- [9] Lau MC, Keith P, Costello ME, Bradbury LA, Hollis KA, Thomas R, Thomas GP, Brown MA, Kenna TJ. Genetic association of ankylosing spondylitis with TBX21 influences T-bet and pro-inflammatory cytokine expression in humans and SKG mice as a model of spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):261-269.
- [10] Chisălău BA, Crînguș LI, Vreju FA, Pârvănescu CD, Firulescu SC, Dinescu ȘC, Ciobanu DA, Tica AA, Sandu RE, Siloși I, Boldeanu MV, Poenariu IS,

- Ungureanu AM, Boldeanu L, Bărbulescu AL. New insights into IL-17/IL-23 signaling in ankylosing spondylitis (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct;20(4):3493-3497.
- [11] Jethwa H, Bowness P. The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment. *Clin Exp Immunol*. 2016 Jan;183(1):30-6.
- [12] Tan ZY, Bealgey KW, Fang Y, Gong YM, Bao S. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):733-5.
- [13] Hwang MC, Ridley L, Reveille JD. Ankylosing spondylitis risk factors: a systematic literature review. *Clin Rheumatol*. 2021 Aug;40(8):3079-3093.
- [14] Chisălău BA, Crînguș LI, Vreju FA, Pârvănescu CD, Firulescu SC, Dinescu ȘC, Ciobanu DA, Tica AA, Sandu RE, Siloși I, Boldeanu MV, Poenariu IS, Ungureanu AM, Boldeanu L, Bărbulescu AL. New insights into IL-17/IL-23 signaling in ankylosing spondylitis (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct;20(4):3493-3497.
- [15] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- [16] Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):991-9.
- [17] Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):991-9.
- [18] Romand X, Liu X, Rahman MA, Bhuyan ZA, Douillard C, Kedia RA, Stone N, Roest D, Chew ZH, Cameron AJ, Rehaume LM, Bozon A, Habib M, Armitage CW, Nguyen MVC, Favier B, Beagley K, Maurin M, Gaudin P, Thomas R, Wells TJ, Baillet A. Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor-Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol*. 2021 Jul;73(7):1200-1210.
- [19] Kenna TJ, Davidson SI, Duan R, Bradbury LA, McFarlane J, Smith M, Weedon H, Street S, Thomas R, Thomas GP, Brown MA. Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2012 May;64(5):1420-9.

- [20] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- [21] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.
- [22] Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):5969-72.
- [23] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
- [24] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jul 17;454(7202):350-2.
- [25] Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56.
- [26] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):29-39.
- [27] Rapaport AS, Ouyang W. TRIMming TGF-β signals in Th17 cells. *J Exp Med*. 2018 Jul 2;215(7):1775-1776.
- [28] Chang D, Xing Q, Su Y, Zhao X, Xu W, Wang X, Dong C. The Conserved Non-coding Sequences CNS6 and CNS9 Control Cytokine-Induced Rorc Transcription during T Helper 17 Cell Differentiation. *Immunity*. 2020 Sep 15;53(3):614-626.e4.
- [29] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):480-3.
- [30] Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):484-487.

- [31] Zhao C, Chu Y, Liang Z, Zhang B, Wang X, Jing X, Hao M, Wang Y, An J, Zhang X, Sun L, Chen J. Low dose of IL-2 combined with rapamycin restores and maintains the long-term balance of Th17/Treg cells in refractory SLE patients. *BMC Immunol.* 2019 Sep 4;20(1):32.
- [32] Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):967-74.
- [33] Revu S, Wu J, Henkel M, Rittenhouse N, Menk A, Delgoffe GM, Poholek AC, McGeachy MJ. IL-23 and IL-1 β Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation. *Cell Rep.* 2018 Mar 6;22(10):2642-2653.
- [34] Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinsteinfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol.* 2012 Oct;13(10):991-9.
- [35] Jain R, Chen Y, Kanno Y, Joyce-Shaikh B, Vahedi G, Hirahara K, Blumenschein WM, Sukumar S, Haines CJ, Sadekova S, McClanahan TK, McGeachy MJ, O'Shea JJ, Cua DJ. Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity.* 2016 Jan 19;44(1):131-142.
- [36] Egeberg A, Gisondi P, Carrascosa JM, Warren RB, Mrowietz U. The role of the interleukin-23/Th17 pathway in cardiometabolic comorbidity associated with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Aug;34(8):1695-1706.
- [37] Wendling D, Aubin F, Verhoeven F, Prati C. IL-23/Th17 targeted therapies in SAPHO syndrome. A case series. *Joint Bone Spine.* 2017 Dec;84(6):733-735.
- [38] Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 2009 Apr 17;30(4):576-87.
- [39] Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A, Iwakura Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J Immunol.* 2014 Feb 15;192(4):1449-58.
- [40] Mailer RK, Joly AL, Liu S, Elias S, Tegner J, Andersson J. IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci Rep.* 2015 Oct 6;5:14674.
- [41] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2

- signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):371-81.
- [42] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):371-81.
- [43] Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):247-54.
- [44] Kim HS, Jang SW, Lee W, Kim K, Sohn H, Hwang SS, Lee GR. PTEN drives Th17 cell differentiation by preventing IL-2 production. *J Exp Med*. 2017 Nov 6;214(11):3381-3398.
- [45] Zhao C, Chu Y, Liang Z, Zhang B, Wang X, Jing X, Hao M, Wang Y, An J, Zhang X, Sun L, Chen J. Low dose of IL-2 combined with rapamycin restores and maintains the long-term balance of Th17/Treg cells in refractory SLE patients. *BMC Immunol*. 2019 Sep 4;20(1):32.
- [46] Luo J, Ming B, Zhang C, Deng X, Li P, Wei Z, Xia Y, Jiang K, Ye H, Ma W, Liu Z, Li H, Yang XP, Dong L. IL-2 Inhibition of Th17 Generation Rather Than Induction of Treg Cells Is Impaired in Primary Sjögren's Syndrome Patients. *Front Immunol*. 2018 Aug 13;9:1755.
- [47] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
- [48] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41.
- [49] Cooney LA, Towery K, Endres J, Fox DA. Sensitivity and resistance to regulation by IL-4 during Th17 maturation. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4440-50.
- [50] Guenova E, Skabytska Y, Hoetzenecker W, Weindl G, Sauer K, Tham M, Kim KW, Park JH, Seo JH, Ignatova D, Cozzio A, Levesque MP, Volz T, Köberle M, Kaesler S, Thomas P, Mailhammer R, Ghoreschi K, Schäkel K, Amarov B, Eichner M, Schaller M, Clark RA, Röcken M, Biedermann T. IL-4 abrogates

- T(H)17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 17;112(7):2163-8.
- [51] Dai Q, Li Y, Yu H, Wang X. Suppression of Th1 and Th17 Responses and Induction of Treg Responses by IL-18-Expressing Plasmid Gene Combined with IL-4 on Collagen-Induced Arthritis. *Biomed Res Int*. 2018 May 8;2018:5164715.
- [52] Barik S, Ellis JS, Cascio JA, Miller MM, Ukah TK, Cattin-Roy AN, Zaghoulani H. IL-4/IL-13 Heteroreceptor Influences Th17 Cell Conversion and Sensitivity to Regulatory T Cell Suppression To Restrain Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2017 Oct 1;199(7):2236-2248.
- [53] Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1380-9.
- [54] Sakkas LI, Mavropoulos A, Perricone C, Bogdanos DP. IL-35: a new immunomodulator in autoimmune rheumatic diseases. *Immunol Res*. 2018 Jun;66(3):305-312.
- [55] Wang RX, Yu CR, Mahdi RM, Egwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2012 Oct 19;287(43):36012-21.
- [56] Liu X, Zhang YR, Cai C, Ni XQ, Zhu Q, Ren JL, Chen Y, Zhang LS, Xue CD, Zhao J, Qi YF, Yu YR. Taurine Alleviates Schistosoma-Induced Liver Injury by Inhibiting the TXNIP/NLRP3 Inflammasome Signal Pathway and Pyroptosis. *Infect Immun*. 2019 Nov 18;87(12):e00732-19.
- [57] Xie F, Hu Q, Cai Q, Yao R, Ouyang S. IL-35 Inhibited Th17 Response in Children with Allergic Rhinitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2020;82(1):47-52.
- [58] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.
- [59] Kathania M, Khare P, Zeng M, Cantarel B, Zhang H, Ueno H, Venuprasad K. Itch inhibits IL-17-mediated colon inflammation and tumorigenesis by ROR γ ubiquitination. *Nat Immunol*. 2016 Aug;17(8):997-1004.
- [60] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jul 17;454(7202):350-2.

- [61] Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56.
- [62] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):29-39.
- [63] Castro G, Liu X, Ngo K, De Leon-Tabaldo A, Zhao S, Luna-Roman R, Yu J, Cao T, Kuhn R, Wilkinson P, Herman K, Nelen MI, Blevitt J, Xue X, Fourie A, Fung-Leung WP. ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12(8):e0181868.
- [64] Chisălău BA, Crînguș LI, Vreju FA, Pârvănescu CD, Firulescu SC, Dinescu ȘC, Ciobanu DA, Tica AA, Sandu RE, Siloși I, Boldeanu MV, Poenariu IS, Ungureanu AM, Boldeanu L, Bărbulescu AL. New insights into IL-17/IL-23 signaling in ankylosing spondylitis (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct;20(4):3493-3497.
- [65] Chisălău BA, Crînguș LI, Vreju FA, Pârvănescu CD, Firulescu SC, Dinescu ȘC, Ciobanu DA, Tica AA, Sandu RE, Siloși I, Boldeanu MV, Poenariu IS, Ungureanu AM, Boldeanu L, Bărbulescu AL. New insights into IL-17/IL-23 signaling in ankylosing spondylitis (Review). *Exp Ther Med*. 2020 Oct;20(4):3493-3497.
- [66] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337-48.
- [67] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):480-3.
- [68] Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4313-7.
- [69] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):371-81.

- [70] Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*. 2007 Mar 30;282(13):9358-9363.
- [71] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 2008 Jul 17;454(7202):350-2.
- [72] Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56.
- [73] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337-48.
- [74] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):480-3.
- [75] Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4313-7.
- [76] Cho JJ, Xu Z, Parthasarathy U, Drashansky TT, Helm EY, Zuniga AN, Lorentsen KJ, Mansouri S, Cho JY, Edelmann MJ, Duong DM, Gehring T, Seeholzer T, Krappmann D, Uddin MN, Califano D, Wang RL, Jin L, Li H, Lv D, Zhou D, Zhou L, Avram D. Hectd3 promotes pathogenic Th17 lineage through Stat3 activation and Malt1 signaling in neuroinflammation. *Nat Commun*. 2019 Feb 11;10(1):701.
- [77] Zhang S, Zhang G, Wan YY. SKI and SMAD4 are essential for IL-21-induced Th17 differentiation. *Mol Immunol*. 2019 Oct;114:260-268.
- [78] Zhang YS, Xin DE, Wang Z, Song X, Sun Y, Zou QC, Yue J, Zhang C, Zhang JM, Liu Z, Zhang X, Zhao TC, Su B, Chin YE. STAT4 activation by leukemia inhibitory factor confers a therapeutic effect on intestinal inflammation. *EMBO J*. 2019 Mar 15;38(6):e99595.
- [79] Hu CM, Jang SY, Fanzo JC, Pernis AB. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49238-46.
- [80] Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med*. 2002 Apr 15;195(8):1003-12.

- [81] Mudter J, Yu J, Zufferey C, Brüstle A, Wirtz S, Weigmann B, Hoffman A, Schenk M, Galle PR, Lehr HA, Mueller C, Lohoff M, Neurath MF. IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ t-dependent Th17 colitis in vivo. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jun;17(6):1343-58.
- [82] Huber M, Brüstle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, Mahiny A, von Löw E, Lohoff M. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20846-51.
- [83] Lee J, Zhang J, Chung YJ, Kim JH, Kook CM, González-Navajas JM, Herdman DS, Nürnberg B, Insel PA, Corr M, Mo JH, Tao A, Yasuda K, Rifkin IR, Broide DH, Sciammas R, Webster NJ, Raz E. Inhibition of IRF4 in dendritic cells by PRR-independent and -dependent signals inhibit Th2 and promote Th17 responses. *Elife*. 2020 Feb 4;9:e49416.
- [84] Echlin DR, Tae HJ, Mitin N, Taparowsky EJ. B-ATF functions as a negative regulator of AP-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by Ras and Fos. *Oncogene*. 2000 Mar 30;19(14):1752-63.
- [85] Martinez GJ, Dong C. BATF: bringing (in) another Th17-regulating factor. *J Mol Cell Biol*. 2009 Dec;1(2):66-8.
- [86] Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, Kang SG, Liao J, Logan MR, Kim CH, Taparowsky EJ. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):933-42.
- [87] Pham D, Moseley CE, Gao M, Savic D, Winstead CJ, Sun M, Kee BL, Myers RM, Weaver CT, Hatton RD. Batf pioneers the Reorganization of Chromatin in Developing Effector T Cells via Ets1-Dependent Recruitment of Ctcf. *Cell Rep*. 2019 Oct 29;29(5):1203-1220.e7.
- [88] Park SH, Rhee J, Kim SK, Kang JA, Kwak JS, Son YO, Choi WS, Park SG, Chun JS. BATF regulates collagen-induced arthritis by regulating T helper cell differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2018 Aug 2;20(1):161.
- [89] Zhao C, Chu Y, Liang Z, Zhang B, Wang X, Jing X, Hao M, Wang Y, An J, Zhang X, Sun L, Chen J. Low dose of IL-2 combined with rapamycin restores and maintains the long-term balance of Th17/Treg cells in refractory SLE patients. *BMC Immunol*. 2019 Sep 4;20(1):32.
- [90] Li P, Spolski R, Liao W, Wang L, Murphy TL, Murphy KM, Leonard WJ. BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature*. 2012 Oct 25;490(7421):543-6.
- [91] Akbay EA, Koyama S, Liu Y, Dries R, Bufe LE, Silkes M, Alam MM, Magee DM, Jones R, Jinushi M, Kulkarni M, Carretero J, Wang X, Warner-Hatten T,

- Cavanaugh JD, Osa A, Kumanogoh A, Freeman GJ, Awad MM, Christiani DC, Bueno R, Hammerman PS, Dranoff G, Wong KK. Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *J Thorac Oncol.* 2017 Aug;12(8):1268-1279.
- [92] Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci Rep.* 2017 Dec 12;7(1):17402.
- [93] Hasan Z, Koizumi SI, Sasaki D, Yamada H, Arakaki N, Fujihara Y, Okitsu S, Shirahata H, Ishikawa H. JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun.* 2017 May 30;8:15628.
- [94] Martinez GJ, Zhang Z, Chung Y, Reynolds JM, Lin X, Jetten AM, Feng XH, Dong C. Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35283-6.
- [95] Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):842-55.
- [96] Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, Tanaka S, Chung Y, Liu T, Robertson E, Lin X, Feng XH, Dong C. Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells. *J Biol Chem.* 2010 Sep 17;285(38):29039-43.
- [97] Tanaka S, Jiang Y, Martinez GJ, Tanaka K, Yan X, Kurosaki T, Kaartinen V, Feng XH, Tian Q, Wang X, Dong C. Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J Exp Med.* 2018 Jul 2;215(7):1853-1868.
- [98] Nalbant A, Eskier D. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function. *Front Biosci (Elite Ed).* 2016 Jun 1;8(3):427-35.
- [99] Zhang S, Zhang G, Wan YY. SKI and SMAD4 are essential for IL-21-induced Th17 differentiation. *Mol Immunol.* 2019 Oct;114:260-268.
- [100] Zhang YS, Xin DE, Wang Z, Song X, Sun Y, Zou QC, Yue J, Zhang C, Zhang JM, Liu Z, Zhang X, Zhao TC, Su B, Chin YE. STAT4 activation by leukemia inhibitory factor confers a therapeutic effect on intestinal inflammation. *EMBO J.* 2019 Mar 15;38(6):e99595.
- [101] McWilliams IL, Rajbhandari R, Nozell S, Benveniste E, Harrington LE. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. *J Neuroinflammation.* 2015 Jun 30;12:128.

- [102] Lee PW, Smith AJ, Yang Y, Selhorst AJ, Liu Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity. *JCI Insight*. 2017 Sep 7;2(17):e91663.
- [103] Fu Y, Wang J, Panangipalli G, Ulrich BJ, Koh B, Xu C, Kharwadkar R, Chu X, Wang Y, Gao H, Wu W, Sun J, Tepper RS, Zhou B, Janga SC, Yang K, Kaplan MH. STAT5 promotes accessibility and is required for BATF-mediated plasticity at the Il9 locus. *Nat Commun*. 2020 Sep 28;11(1):4882.
- [104] Zheng Y, Wang Z, Deng L, Zhang G, Yuan X, Huang L, Xu W, Shen L. Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2015 Mar;157(1):65-77.
- [105] Zhao P, Li J, Tian Y, Mao J, Liu X, Feng S, Li J, Bian Q, Ji H, Zhang L. Restoring Th17/Treg balance via modulation of STAT3 and STAT5 activation contributes to the amelioration of chronic obstructive pulmonary disease by BufeiYishen formula. *J Ethnopharmacol*. 2018 May 10;217:152-162.
- [106] Zhang YS, Xin DE, Wang Z, Song X, Sun Y, Zou QC, Yue J, Zhang C, Zhang JM, Liu Z, Zhang X, Zhao TC, Su B, Chin YE. STAT4 activation by leukemia inhibitory factor confers a therapeutic effect on intestinal inflammation. *EMBO J*. 2019 Mar 15;38(6):e99595.
- [107] Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W; Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2003 Nov;48(11):3230-6.
- [108] van der Heijde D, Dijkmans B, Geusens P, Sieper J, DeWoody K, Williamson P, Braun J; Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study Group. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum*. 2005 Feb;52(2):582-91.
- [109] van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, Dougados M, Reveille JD, Wong RL, Kupper H, Davis JC Jr; ATLAS Study Group. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2006 Jul;54(7):2136-46.
- [110] Bao C, Huang F, Khan MA, Fei K, Wu Z, Han C, Hsia EC. Safety and efficacy of golimumab in Chinese patients with active ankylosing spondylitis: 1-year results of a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Sep;53(9):1654-63.

- [111] De Keyser F, Van den Bosch F, Mielants H. Anti-TNF-alpha therapy in ankylosing spondylitis. *Cytokine*. 2006 Mar 7;33(5):294-8.
- [112] Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, Dubreuil M, Yu D, Khan MA, Haroon N, Borenstein D, Wang R, Biehl A, Fang MA, Louie G, Majithia V, Ng B, Bigham R, Pianin M, Shah AA, Sullivan N, Turgunbaev M, Oristaglio J, Turner A, Maksymowych WP, Caplan L. 2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019 Oct;71(10):1285-1299.
- [113] Karmacharya P, Duarte-Garcia A, Dubreuil M, Murad MH, Shahukhal R, Shrestha P, Myasoedova E, Crowson CS, Wright K, Davis JM 3rd. Effect of Therapy on Radiographic Progression in Axial Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2020 May;72(5):733-749.
- [114] Ko JM, Gottlieb AB, Kerbleski JF. Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: a review and analysis of 127 cases. *J Dermatolog Treat*. 2009;20(2):100-8.
- [115] Alivernini S, Pugliese D, Tolusso B, Bui L, Petricca L, Guidi L, Mirone L, Rapaccini GL, Federico F, Ferraccioli G, Armuzzi A, Gremese E. Paradoxical arthritis occurring during anti-TNF in patients with inflammatory bowel disease: histological and immunological features of a complex synovitis. *RMD Open*. 2018 Apr 9;4(1):e000667.
- [116] McGonagle D, Watad A, Sharif K, Bridgewood C. Why Inhibition of IL-23 Lacked Efficacy in Ankylosing Spondylitis. *Front Immunol*. 2021 Mar 19;12:614255.
- [117] Lee YH. Comparative Efficacy and Safety of Janus Kinase Inhibitors and Secukinumab in Patients with Active Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmacology*. 2022;107(11-12):537-544.
- [118] Deodhar A, Gensler LS, Sieper J, Clark M, Calderon C, Wang Y, Zhou Y, Leu JH, Campbell K, Sweet K, Harrison DD, Hsia EC, van der Heijde D. Three Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies Evaluating the Efficacy and Safety of Ustekinumab in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Feb;71(2):258-270.
- [119] Kavanaugh A, Puig L, Gottlieb AB, Ritchlin C, You Y, Li S, Song M, Randazzo B, Rahman P, McInnes IB. Efficacy and safety of ustekinumab in psoriatic arthritis patients with peripheral arthritis and physician-reported spondylitis: post-hoc analyses from two phase III, multicentre, double-blind, placebo-controlled studies (PSUMMIT-1/PSUMMIT-2). *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov;75(11):1984-1988.

- [120] Romand X, Liu X, Rahman MA, Bhuyan ZA, Douillard C, Kedia RA, Stone N, Roest D, Chew ZH, Cameron AJ, Rehaume LM, Bozon A, Habib M, Armitage CW, Nguyen MVC, Favier B, Beagley K, Maurin M, Gaudin P, Thomas R, Wells TJ, Baillet A. Mediation of Interleukin-23 and Tumor Necrosis Factor-Driven Reactive Arthritis by Chlamydia-Infected Macrophages in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol*. 2021 Jul;73(7):1200-1210.
- [121] Savage L, Goodfield M, Horton L, Watad A, Hensor E, Emery P, Wakefield R, Wittmann M, McGonagle D. Regression of Peripheral Subclinical Enthesopathy in Therapy-Naïve Patients Treated With Ustekinumab for Moderate-to-Severe Chronic Plaque Psoriasis: A Fifty-Two-Week, Prospective, Open-Label Feasibility Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019 Apr;71(4):626-631.
- [122] Deodhar A, Helliwell PS, Boehncke WH, Kollmeier AP, Hsia EC, Subramanian RA, Xu XL, Sheng S, Agarwal P, Zhou B, Zhuang Y, Ritchlin CT; DISCOVER-1 Study Group. Guselkumab in patients with active psoriatic arthritis who were biologic-naïve or had previously received TNF α inhibitor treatment (DISCOVER-1): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2020 Apr 4;395(10230):1115-1125.
- [123] Blair HA. Secukinumab: A Review in Ankylosing Spondylitis. *Drugs*. 2019 Mar;79(4):433-443.
- [124] Deodhar A, Blanco R, Dokoupilová E, Hall S, Kameda H, Kivitz AJ, Poddubnyy D, van de Sande M, Wiksten AS, Porter BO, Richards HB, Haemmerle S, Braun J. Improvement of Signs and Symptoms of Nonradiographic Axial Spondyloarthritis in Patients Treated With Secukinumab: Primary Results of a Randomized, Placebo-Controlled Phase III Study. *Arthritis Rheumatol*. 2021 Jan;73(1):110-120.
- [125] van Mens LJJ, van de Sande MGH, Menegatti S, Chen S, Blijdorp ICJ, de Jong HM, Fluri IA, Latuhihin TE, van Kuijk AWR, Rogge L, Yeremenko NG, Baeten DLP. Brief Report: Interleukin-17 Blockade With Secukinumab in Peripheral Spondyloarthritis Impacts Synovial Immunopathology Without Compromising Systemic Immune Responses. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Dec;70(12):1994-2002.
- [126] Mease PJ, Smolen JS, Behrens F, Nash P, Liu Leage S, Li L, Tahir H, Gooderham M, Krishnan E, Liu-Seifert H, Emery P, Pillai SG, Helliwell PS; SPIRIT H2H study group. A head-to-head comparison of the efficacy and safety of ixekizumab and adalimumab in biological-naïve patients with active psoriatic arthritis: 24-week results of a randomised, open-label, blinded-assessor trial. *Ann Rheum Dis*. 2020 Jan;79(1):123-131.

- [127] Chandran V, van der Heijde D, Fleischmann RM, Lespessailles E, Helliwell PS, Kameda H, Burgos-Vargas R, Erickson JS, Rathmann SS, Sprabery AT, Birt JA, Shuler CL, Gallo G. Ixekizumab treatment of biologic-naïve patients with active psoriatic arthritis: 3-year results from a phase III clinical trial (SPIRIT-P1). *Rheumatology (Oxford)*. 2020 Oct 1;59(10):2774-2784.
- [128] Hohenberger M, Cardwell LA, Oussedik E, Feldman SR. Interleukin-17 inhibition: role in psoriasis and inflammatory bowel disease. *J Dermatolog Treat*. 2018 Feb;29(1):13-18.
- [129] Kammüller M, Tsai TF, Griffiths CE, Kapoor N, Kolattukudy PE, Brees D, Chibout SD, Safi J Jr, Fox T. Inhibition of IL-17A by secukinumab shows no evidence of increased *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Transl Immunology*. 2017 Aug 25;6(8):e152.
- [130] Wei JC, Kim TH, Kishimoto M, Ogusu N, Jeong H, Kobayashi S; 4827-006 study group. Efficacy and safety of brodalumab, an anti-IL17RA monoclonal antibody, in patients with axial spondyloarthritis: 16-week results from a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Ann Rheum Dis*. 2021 Aug;80(8):1014-1021.
- [131] Kim TH, Kishimoto M, Wei JC, Jeong H, Nozaki A, Kobayashi S. Brodalumab, an anti-interleukin-17 receptor A monoclonal antibody, in axial spondyloarthritis: 68-week results from a phase 3 study. *Rheumatology (Oxford)*. 2023 May 2;62(5):1851-1859.
- [132] van der Heijde D, Gensler LS, Deodhar A, Baraliakos X, Poddubnyy D, Kivitz A, Farmer MK, Baeten D, Goldammer N, Coarse J, Oortgiesen M, Dougados M. Dual neutralisation of interleukin-17A and interleukin-17F with bimekizumab in patients with active ankylosing spondylitis: results from a 48-week phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Ann Rheum Dis*. 2020 May;79(5):595-604.
- [133] van der Heijde D, Baraliakos X, Sieper J, Deodhar A, Inman RD, Kameda H, Zeng X, Sui Y, Bu X, Pangan AL, Wung P, Song IH. Efficacy and safety of upadacitinib for active ankylosing spondylitis refractory to biological therapy: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Ann Rheum Dis*. 2022 Nov;81(11):1515-1523.
- [134] Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Dec;16(12):843-862.
- [135] Deodhar A, Sliwinska-Stanczyk P, Xu H, Baraliakos X, Gensler LS, Fleishaker D, Wang L, Wu J, Menon S, Wang C, Dina O, Fallon L, Kanik KS, van der Heijde D. Tofacitinib for the treatment of ankylosing spondylitis: a phase III,

- randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. 2021 Aug;80(8):1004-1013.
- [136] Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1052-60.
- [137] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):694-9.
- [138] Bosanac I, Wertz IE, Pan B, Yu C, Kusam S, Lam C, Phu L, Phung Q, Maurer B, Arnott D, Kirkpatrick DS, Dixit VM, Hymowitz SG. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF- κ B signaling. *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):548-57.
- [139] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1135-9.
- [140] Evans PC, Ovaa H, Hamon M, Kilshaw PJ, Hamm S, Bauer S, Ploegh HL, Smith TS. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem J*. 2004 Mar 15;378(Pt 3):727-34.
- [141] Bosanac I, Wertz IE, Pan B, Yu C, Kusam S, Lam C, Phu L, Phung Q, Maurer B, Arnott D, Kirkpatrick DS, Dixit VM, Hymowitz SG. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF- κ B signaling. *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):548-57.
- [142] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):694-9.
- [143] Bosanac I, Wertz IE, Pan B, Yu C, Kusam S, Lam C, Phu L, Phung Q, Maurer B, Arnott D, Kirkpatrick DS, Dixit VM, Hymowitz SG. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF- κ B signaling. *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):548-57.
- [144] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1135-9.
- [145] Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-

- p>modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses.
- Nat Immunol.*
- 2004 Oct;5(10):1052-60.
- [146] Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA, Ma A. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med.* 2008 Feb 18;205(2):451-64.
 - [147] Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):351-61.
 - [148] Ea CK, Sun L, Inoue J, Chen ZJ. TIFA activates IkappaB kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 26;101(43):15318-23.
 - [149] Gao L, Coope H, Grant S, Ma A, Ley SC, Harhaj EW. ABIN1 protein cooperates with TAX1BP1 and A20 proteins to inhibit antiviral signaling. *J Biol Chem.* 2011 Oct 21;286(42):36592-602.
 - [150] Tavares RM, Turer EE, Liu CL, Advincula R, Scapini P, Rhee L, Barrera J, Lowell CA, Utz PJ, Malynn BA, Ma A. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):181-91.
 - [151] Chu Y, Vahl JC, Kumar D, Heger K, Bertossi A, Wójtowicz E, Soberon V, Schenten D, Mack B, Reutelshöfer M, Beyaert R, Amann K, van Loo G, Schmidt-Supprian M. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood.* 2011 Feb 17;117(7):2227-36.
 - [152] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science.* 2010 Feb 26;327(5969):1135-9.
 - [153] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science.* 2010 Feb 26;327(5969):1135-9.
 - [154] Iwai K. Diverse ubiquitin signaling in NF-κB activation. *Trends Cell Biol.* 2012 Jul;22(7):355-64.
 - [155] Walczak H, Iwai K, Dikic I. Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains. *BMC Biol.* 2012 Mar 15;10:23.
 - [156] Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell.* 2009 May 15;137(4):721-35.

- [157] Song XT, Evel-Kabler K, Shen L, Rollins L, Huang XF, Chen SY. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):258-65.
- [158] Sun B, Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6228-44.
- [159] El-Kashef DH, Serrya MS. Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acute liver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice. *Life Sci*. 2019 Jul 1;228:266-273.
- [160] Yang J, Hu X, Wu M, Ma Y, Zhang X, Chen M, Yuan Y, Han R, Liu R, Guan S, Deng J, Xu S, Gao X, Xu S, Shuai Z, Jiang S, Guan S, Chen L, Pan F. TNFAIP3 genetic polymorphisms reduce ankylosing spondylitis risk in Eastern Chinese Han population. *Sci Rep*. 2019 Jul 15;9(1):10209.
- [161] Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):991-9.
- [162] Adrianto I, Wen F, Templeton A, Wiley G, King JB, Lessard CJ, Bates JS, Hu Y, Kelly JA, Kaufman KM, Guthridge JM, Alarcón-Riquelme ME. Association of a functional variant downstream of TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):253-8.
- [163] Wang S, Wen F, Wiley GB, Kinter MT, Gaffney PM. An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the TNFAIP3 promoter to influence A20 expression. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003750.
- [164] Kim SK, Choe JY, Bae J, Chae SC, Park DJ, Kwak SG, Lee SS. TNFAIP3 gene polymorphisms associated with differential susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Korean population. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jun;53(6):1009-13.
- [165] Wang S, Wen F, Wiley GB, Kinter MT, Gaffney PM. An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the TNFAIP3 promoter to influence A20 expression. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003750.
- [166] Adrianto I, Wen F, Templeton A, Wiley G, King JB, Lessard CJ, Bates JS, Hu Y, Kelly JA, Kaufman KM, Guthridge JM, Alarcón-Riquelme ME. Association of a functional variant downstream of TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):253-8.
- [167] Wang S, Wen F, Wiley GB, Kinter MT, Gaffney PM. An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the

- TNFAIP3 promoter to influence A20 expression. PLoS Genet. 2013;9(9):e1003750.
- [168] Wang S, Wen F, Tessneer KL, Gaffney PM. TALEN-mediated enhancer knockout influences TNFAIP3 gene expression and mimics a molecular phenotype associated with systemic lupus erythematosus. Genes Immun. 2016 Apr;17(3):165-70.
- [169] Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. J Exp Biol. 2014 Jan 1;217(Pt 1):67-75.
- [170] Hedden P. The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. Plant Cell Physiol. 2020 Dec 23;61(11):1832-1849.
- [171] Takehara S, Sakuraba S, Mikami B, Yoshida H, Yoshimura H, Itoh A, Endo M, Watanabe N, Nagae T, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M. A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin. Nat Commun. 2020 May 1;11(1):2143.
- [172] Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. J Exp Biol. 2014 Jan 1;217(Pt 1):67-75.
- [173] Hedden P. The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. Plant Cell Physiol. 2020 Dec 23;61(11):1832-1849.
- [174] Reihill JA, Malcomson B, Bertelsen A, Cheung S, Czerwiec A, Barsden R, Elborn JS, Dürkop H, Hirsch B, Ennis M, Kelly C, Schock BC. Induction of the inflammatory regulator A20 by gibberellic acid in airway epithelial cells. Br J Pharmacol. 2016 Feb;173(4):778-89.
- [175] Davis RH, Maro NP. Aloe vera and gibberellin. Anti-inflammatory activity in diabetes. J Am Podiatr Med Assoc. 1989 Jan;79(1):24-6.
- [176] Toner P, Nelson D, Rao JR, Ennis M, Moore JE, Schock B. Antimicrobial properties of phytohormone (gibberellins) against phytopathogens and clinical pathogens. Access Microbiol. 2021 Oct 20;3(10):000278.
- [177] Nani BD, Rosalen PL, Lazarini JG, de CássiaOrlandiSardi J, Romário-Silva D, de Araújo LP, Dos Reis MSB, Breseghello I, Cunha TM, de Alencar SM, da Silveira NJF, Franchin M. A Study on the Anti-NF- κ B, Anti-*Candida*, and Antioxidant Activities of Two Natural Plant Hormones: Gibberellin A4 and A7. Pharmaceutics. 2022 Jun 25;14(7):1347.
- [178] Celik I, Tuluçe Y, Isik I. Evaluation of toxicity of abscisic acid and gibberellic acid in rats: 50 days drinking water study. J Enzyme Inhib Med Chem. 2007 Apr;22(2):219-26.

- [179] Ali S, Moselhy WA, Mohamed HM, Nabil TM, Abo El-Ela FI, Abdou K. Ameliorative effects of Dictyotadichotoma on hepatotoxicity induced by gibberellic acid in albino rats. *Toxicol Res*. 2022 Feb 11;38(3):379-392.
- [180] Vildanova M, Vishnyakova P, Saidova A, Konduktorova V, Onishchenko G, Smirnova E. Gibberellic Acid Initiates ER Stress and Activation of Differentiation in Cultured Human Immortalized Keratinocytes HaCaT and Epidermoid Carcinoma Cells A431. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 30;13(11):1813.
- [181] Descoeur J, Dupuy AM, Bargnoux AS, Cristol JP, Mathieu O. Comparison of four immunoassays to an HPLC method for the therapeutic drug monitoring of methotrexate: Influence of the hydroxylated metabolite levels and impact on clinical threshold. *J Oncol Pharm Pract*. 2022 Jan;28(1):55-63.
- [182] Afonso J, de Sousa HT, Rosa I, Carvalho J, Dias CC, Magro F. Therapeutic drug monitoring of CT-P13: a comparison of four different immunoassays. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017 Sep;10(9):661-671.
- [183] Shipkova M, Petrova DT, Rosler AE, Orth M, Engelmayer J, Wieland E, Brandhorst G, Oellerich M. Comparability and imprecision of 8 frequently used commercially available immunoassays for therapeutic drug monitoring. *TherDrugMonit*. 2014 Aug;36(4):433-41.
- [184] Haver VM, Audino N, Burris S, Nelson M. Four fluorescence polarization immunoassays for therapeutic drug monitoring evaluated. *Clin Chem*. 1989 Jan;35(1):138-40.
- [185] Blecka LJ, Jackson GJ. Immunoassays in therapeutic drug monitoring. *Clin Lab Med*. 1987 Jun;7(2):357-70.
- [186] Marks V. New developments in immunoassays for therapeutic drug monitoring. *Antibiot Chemother (1971)*. 1979;26:16-26.
- [187] Carrà A, Guidolin V, Dator RP, Upadhyaya P, Kassie F, Villalta PW, Balbo S. Targeted High Resolution LC/MS3 Adductomics Method for the Characterization of Endogenous DNA Damage. *Front Chem*. 2019 Oct 24;7:658.
- [188] Richards KH, Monk R, Renko K, Rathmann D, Rijntjes E, Köhrle J. A combined LC-MS/MS and LC-MS3 multi-method for the quantification of iodothyronines in human blood serum. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Aug;411(21):5605-5616.
- [189] Ren T, Zhang Z, Fawcett JP, Sun D, Gu J. Micro-solid phase extraction and LC-MS3 for the determination of triptorelin in rat plasma and application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2019 Mar 20;166:13-19.

- [190] Dziadosz M, Klintschar M, Teske J. Imatinib quantification in human serum with LC-MS3 as an effective way of protein kinase inhibitor analysis in biological matrices. *Drug Metab Pers Ther.* 2017 Sep 26;32(3):147-150.
- [191] Dziadosz M. The application of multiple analyte adduct formation in the LC-MS3 analysis of valproic acid in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 Jan 1;1040:159-161.
- [192] Quinete N, Bertram J, Reska M, Lang J, Kraus T. Highly selective and automated online SPE LC-MS3 method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta.* 2015 Mar;134:310-316.
- [193] Szeitz A, Nguyen TA, Riggs KW, Rurak D. A validated assay to quantitate serotonin in lamb plasma using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: applications with LC/MS3. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Aug;406(20):5055-9.
- [194] Sanda M, Pompach P, Benicky J, Goldman R. LC-MS3 quantification of O-glycopeptides in human serum. *Electrophoresis.* 2013 Aug;34(16):2342-9.
- [195] Inoue T, Tatemori S, Muranaka N, Hirahara Y, Homma S, Nakane T, Takano A, Nomi Y, Otsuka Y. The identification of vitamin E homologues in medicinal plant samples using ESI(+)-LC-MS3. *J Agric Food Chem.* 2012 Sep 26;60(38):9581-8.
- [196] Smith JC, Hou W, Whitehead SN, Ethier M, Bennett SA, Figeys D. Identification of lysophosphatidylcholine (LPC) and platelet activating factor (PAF) from PC12 cells and mouse cortex using liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry (LC/MS3). *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008 Nov;22(22):3579-87.
- [197] Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, Brandt J, Braun J, Burgos-Vargas R, Dougados M, Hermann KG, Landewé R, Maksymowych W, van der Heijde D. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68 Suppl 2:ii1-44.
- [198] Valle-Reyes S, Valencia-Cruz G, Liñan-Rico L, Pottosin I, Dobrovinskaya O. Differential Activity of Voltage- and Ca^{2+} -Dependent Potassium Channels in Leukemic T Cell Lines: Jurkat Cells Represent an Exceptional Case. *Front Physiol.* 2018 May 9;9:499.
- [199] Song M, Wang Y, Zhou P, Wang J, Xu H, Zheng J. MicroRNA-361-5p Aggravates Acute Pancreatitis by Promoting Interleukin-17A Secretion *via* Impairment of Nuclear Factor κ B-Dependent Hes1 Downregulation. *J Med Chem.* 2021 Nov 25;64(22):16541-16552.

- [200] Pla-Prats C, Thomä NH. Quality control of protein complex assembly by the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* 2022 Aug;32(8):696-706.
- [201] Wang S, Wen F, Wiley GB, Kinter MT, Gaffney PM. An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the *TNFAIP3* promoter to influence A20 expression. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003750.
- [202] Yang J, Hu X, Wu M, Ma Y, Zhang X, Chen M, Yuan Y, Han R, Liu R, Guan S, Deng J, Xu S, Gao X, Xu S, Shuai Z, Jiang S, Guan S, Chen L, Pan F. *TNFAIP3* genetic polymorphisms reduce ankylosing spondylitis risk in Eastern Chinese Han population. *Sci Rep.* 2019 Jul 15;9(1):10209.
- [203] Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.* 2004 Aug 5;430(7000):694-9.
- [204] Bertrand MJ, Vandenabeele P. RIP1's function in NF-kappaB activation: from master actor to onlooker. *Cell Death Differ.* 2010 Mar;17(3):379-80.
- [205] Hitotsumatsu O, Ahmad RC, Tavares R, Wang M, Philpott D, Turer EE, Lee BL, Shiffin N, Advincula R, Malynn BA, Werts C, Ma A. The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):381-90.
- [206] Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):1052-60.
- [207] Düwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloos B, Ferch U, Darnay BG, Ruland J, Marynen P, Krappmann D. A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol.* 2009 Jun 15;182(12):7718-28.
- [208] Guanizo AC, Fernando CD, Garama DJ, Gough DJ. STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors.* 2018 Apr;36(1-2):1-14.
- [209] Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, Murai M. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2702-6.
- [210] Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jul 20;103(14):1112-22.

- [211] Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, Bonafè M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3988-4002.
- [212] Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, Matthews VB, Armes J, Bhathal PS, Hughes NR, Marcusson EG, Karras JG, Na S, Sedgwick JD, Hertzog PJ, Jenkins BJ. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1727-38.
- [213] Ameri P, Bruzzzone S, Mannino E, Sociali G, Andraghetti G, Salis A, Ponta ML, Briatore L, Adami GF, Ferraiolo A, Venturini PL, Maggi D, Cordera R, Murialdo G, Zocchi E. Impaired increase of plasma abscisic Acid in response to oral glucose load in type 2 diabetes and in gestational diabetes. *PLoS One*. 2015 Feb 27;10(2):e0115992.
- [214] Magnone M, Ameri P, Salis A, Andraghetti G, Emionite L, Murialdo G, De Flora A, Zocchi E. Microgram amounts of abscisic acid in fruit extracts improve glucose tolerance and reduce insulinemia in rats and in humans. *FASEB J*. 2015 Dec;29(12):4783-93.
- [215] Fresia C, Vigliarolo T, Guida L, Booz V, Bruzzzone S, Sturla L, Di Bona M, Pesce M, Usai C, De Flora A, Zocchi E. G-protein coupling and nuclear translocation of the human abscisic acid receptor LANCL2. *Sci Rep*. 2016 May 25;6:26658.
- [216] Fresia C, Vigliarolo T, Guida L, Booz V, Bruzzzone S, Sturla L, Di Bona M, Pesce M, Usai C, De Flora A, Zocchi E. G-protein coupling and nuclear translocation of the human abscisic acid receptor LANCL2. *Sci Rep*. 2016 May 25;6:26658.
- [217] Bellotti M, Salis A, Grozio A, Damonte G, Vigliarolo T, Galatini A, Zocchi E, Benatti U, Millo E. Synthesis, structural characterization and effect on human granulocyte intracellular cAMP levels of abscisic acid analogs. *Bioorg Med Chem*. 2015 Jan 1;23(1):22-32.
- [218] Bellotti M, Salis A, Grozio A, Damonte G, Vigliarolo T, Galatini A, Zocchi E, Benatti U, Millo E. Synthesis, structural characterization and effect on human granulocyte intracellular cAMP levels of abscisic acid analogs. *Bioorg Med Chem*. 2015 Jan 1;23(1):22-32.
- [219] Guri AJ, Hontecillas R, Si H, Liu D, Bassaganya-Riera J. Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets. *Clin Nutr*. 2007 Feb;26(1):107-16.

- [220] Guri AJ, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Absciscic acid ameliorates experimental IBD by downregulating cellular adhesion molecule expression and suppressing immune cell infiltration. *Clin Nutr*. 2010 Dec;29(6):824-31.
- [221] Hontecillas R, Roberts PC, Carbo A, Vives C, Horne WT, Genis S, Velayudhan B, Bassaganya-Riera J. Dietary absciscic acid ameliorates influenza-virus-associated disease and pulmonary immunopathology through a PPAR γ -dependent mechanism. *J NutrBiochem*. 2013 Jun;24(6):1019-27.
- [222] Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Chen YD, Tipton L, Staten MA, Shoelson SE; Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes Study Team. Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2013 Jul 2;159(1):1-12.
- [223] Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, Schertzer JD, Chevtzoff C, Walker KJ, Peggie MW, Zibrova D, Green KA, Mustard KJ, Kemp BE, Sakamoto K, Steinberg GR, Hardie DG. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science*. 2012 May 18;336(6083):918-22.