

# Salubrinal 通过下调 Th1 和 Th17 比例缓解 CIA

李子健<sup>1,2</sup>, 张远腾<sup>1,2</sup>, 聂红<sup>1,2</sup>

(1. 上海交通大学医学院 基础医学院 免疫学与微生物学系 上海 200025; 2. 上海市免疫学研究所 上海 200025)

**摘要:** RA 是一种自身免疫性疾病, CD4<sup>+</sup>T 细胞在其发生发展中发挥重要作用。研究通过分析 CIA 小鼠 Salubrinal 治疗组和对照组脾脏致病性细胞的增殖, Th 亚群比例和相关转录因子表达的差异, 以及关节病变部位炎症细胞浸润和细胞因子的变化, 探索 Salubrinal 治疗 CIA 的作用机制。结果显示, Salubrinal 可以抑制脾脏中 II 型胶原反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖, 下调 Th1 和 Th17 比例以及转录因子 T-bet 和 p-STAT3 的表达, 抑制关节病变部位炎症细胞浸润和 IL-17 与 TNF- $\alpha$  的表达, 提示 Salubrinal 通过调节 Th1 和 Th17 比例以及对抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖的抑制治疗 CIA。本研究为 RA 的治疗提供了新思路。

**关键词:** Salubrinal; 胶原诱导性关节炎; CD4<sup>+</sup>T 细胞

中图分类号: R392.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)05-0353-08

RA 是一种自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。在我国发病率高达(0.28~0.45)%<sup>[2]</sup>, 吸烟、酗酒、肥胖和遗传都是 RA 的发病因素<sup>[3-4]</sup>。RA 主要表现为持续性的关节滑膜增生、滑膜炎症以及软骨和骨的破坏, 并导致不可逆转的关节畸形, 影响患者的劳动能力, 最终降低生活质量<sup>[5]</sup>。CIA 是 RA 的经典动物模型, RA 发病过程中, 固有免疫细胞和适应性免疫细胞均参与炎症级联反应以及软骨和骨的破坏<sup>[6]</sup>, 其中 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群的失衡在 RA 发生和发展中具有重要作用<sup>[7-8]</sup>。

小分子化合物 Salubrinal 作为真核转录起始因子 eIF-2 $\alpha$  的抑制剂, 抑制蛋白磷酸酶 1 的活性, 促进磷酸化 eIF-2 $\alpha$  介导的转录和翻译<sup>[9]</sup>。文献报道, Salubrinal 可以抑制胶原抗体诱导性关节炎(collagen antibody induced arthritis, CAIA)<sup>[10]</sup>, 但其对 T 细胞的作用机制并未阐明。文章主要研究 Salubrinal 对 CIA 小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞的作用, 旨在揭示 Salubrinal 的治疗新机制并为 RA 的临床治疗提供新的候选药物。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** C57BL/6 小鼠, 6 周龄, 雄性, 购于上海灵畅生物科技有限公司; DBA/1J 小鼠, 8~10 周龄, 雄性, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠饲养于上海交通大学医学院动物科学部无特定病原体环境内。

**1.2 主要试剂** Salubrinal, 购于 Selleck 公司; 牛 II 型胶原蛋白, 购于 Chondrex 公司; 完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)和不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA), 购于 Sigma-Aldrich 公司; 鼠 IL-6、IL-12、IL-2、IL-23、TGF- $\beta$ 1, 购于 PeproTech 公司; 抗鼠 CD3 抗体, 购于 BD 公司; 抗鼠 CD28、IFN- $\gamma$ 、IL-4、CD4-FITC、抗鼠 CD4-PerCP5.5、抗鼠 IFN- $\gamma$ -PE-Cy7、抗鼠 IL-13-PE、抗鼠 IL-17-PerCP5.5、抗鼠 Foxp3-APC、抗鼠 Ki-67-FITC、抗鼠 FVD-APC-Cy7 抗体以及抗鼠 T-bet 抗体, 购于 eBioscience 公司; CD4 分选试剂、Western blotting 显影液, 购于 Thermo Fisher Scientific 公司; FBS, 购于 Gibco 公司; 抗鼠  $\beta$ -actin 抗体, 购于爱必信(上海)生物科技有限公司; 抗鼠 STAT3、p-STAT3 抗体, 购于 CST 公司; CTG(CellTiter-Glo)发光法细胞活力检测试剂盒, 购于 Promega 公司。

收稿日期: 2019-01-27

基金项目: 国家自然科学基金(81671590, 81273307); 上海市卫计委课题(201640011)

作者简介: 李子健(1993-), 女, 硕士生, 主要从事自身免疫病发病机制的研究

通信作者: 聂红(E-mail: hnie0823@126.com)

### 1.3 实验方法

1.3.1 CIA模型的建立 将0.05 mol/mL冰醋酸3.33 mL加至10 mg牛Ⅱ型胶原干粉中,4℃搅拌,避光溶解过夜,配成3 mg/mLⅡ型胶原溶液。第0 d,取3 mg/mLⅡ型胶原溶液与等体积CFA混匀后乳化,皮下注射于DBA/1J小鼠尾根部2~3 cm处,每只小鼠注射150 μgⅡ型胶原,总体积100 μL;第21 d进行二次免疫,取3 mg/mLⅡ型胶原与等体积IFA混匀后乳化,皮下注射于DBA/1J小鼠尾根部2~3 cm处,每只小鼠注射75 μgⅡ型胶原,总体积50 μL。

1.3.2 Salubrinal 储存液制备及给药方法 将Salubrinal粉末溶于DMSO,制备成浓度为50 mmol/L的储存液。Salubrinal给药量为2 mg/kg(小鼠体质量25±1 g)。二次免疫后,将小鼠随机分成2组,即治疗组(Salubrinal组)和对照组(DMSO组)。治疗组每只小鼠给予腹腔注射50 μg Salubrinal,1次/d;对照组每日给予腹腔注射等体积稀释后的DMSO溶液。病情达到最高峰且两组评分有显著差异时(第37 d)处死小鼠进行后续实验。

1.3.3 细胞活性检测 制备C57BL/6小鼠脾脏单细胞悬液,以 $2 \times 10^5$ 个/孔铺于96孔圆底板,加入不同浓度Salubrinal处理。将培养板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,72 h后加入等体积CTG溶液,孵育10 min后放入多功能酶标仪测定发光值,计算不同浓度Salubrinal处理后脾脏细胞的活性。

1.3.4 淋巴细胞增殖实验 制备CIA小鼠脾脏单细胞悬液,以 $2 \times 10^5$ 个/孔铺于96孔圆底板,在1 μg/mL抗CD3和1 μg/mL抗CD28抗体或40 μg/mLⅡ型胶原刺激下,加入不同浓度Salubrinal共孵育。将培养板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,72 h后收集细胞,FACS缓冲液洗涤2次后用100 μL同种缓冲液重悬,根据实验要求用相应的荧光抗体以及Ki-67抗体染色,FCM检测,FlowJo软件分析。

1.3.5 FACS检测 收集细胞,加入PBS洗涤2次后,用50 μL PBS重悬细胞,加入抗鼠FVD-APC-Cy7和抗鼠CD4-PerCP5.5抗体,4℃避光染色30 min,PBS终止,310 ×g、4℃离心5 min,

弃上清。细胞洗涤2次后混匀,加入200 μL预先配置好的破膜固定液,室温避光孵育30 min。310 ×g、4℃离心5 min,弃上清;加入200 μL破膜缓冲液,310 ×g、4℃离心5 min。细胞洗涤2次后,加入相应荧光素标记的FACS抗体进行胞内因子染色,室温避光染色30 min;破膜缓冲液终止染色,310 ×g、4℃离心5 min,洗涤细胞2次。弃上清,加入2%多聚甲醛固定细胞,混匀后用BD Fortessa FCM检测,FlowJo软件分析。

1.3.6 Th分化实验 制备C57BL/6小鼠脾脏单细胞悬液,用免疫磁珠阴性分选出CD4<sup>+</sup>T细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/孔铺于96孔圆底板。分别给予Th1和Th17分化条件,同时加入不同浓度Salubrinal共孵育。将培养板置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,72 h后收集细胞,FACS检测细胞分化程度。Th1分化条件:抗CD3抗体(2 μg/mL)、抗CD28抗体(1 μg/mL)、抗IL-4抗体(10 μg/mL)、IL-2(10 ng/mL)、IL-12(10 ng/mL);Th17分化条件:抗CD3抗体(2 μg/mL)、抗CD28抗体(1 μg/mL)、抗IL-4抗体(10 μg/mL)、抗IFN-γ抗体(10 μg/mL)、IL-6(50 ng/mL)、TGF-β(1 ng/mL)、IL-23(50 ng/mL)。

1.3.7 HE染色 制备小鼠后肢膝关节石蜡切片,蒸馏水冲洗3~5 min,苏木精染色5 min后,蒸馏水洗涤。滴加氨水,润洗切片。蒸馏水冲洗干净后,分别用75%和95%酒精依次浸泡5 min,移入伊红染液染色2~3 min,乙醇浸泡后脱水,二甲苯透明。滴加中性树脂封片,在光学显微镜下观察染色结果。

1.3.8 Western blotting检测 100℃加热蛋白质3~5 min使其充分变性;冷却至室温后上样,100 V恒定电压电泳120 min;100 V恒定电压转膜60 min后,将其转入封闭液中,室温孵育1 h;一抗室温孵育2 h,TBST洗涤3次;二抗室温孵育1 h,TBST洗涤3次;加入显影液显影。ImageJ软件对条带进行灰度分析。

1.3.9 Real-time PCR检测 将抽提的RNA反转录为cDNA后,荧光染料掺入法检测基因相对表达量。配置10 μL反应体系,每个样本做3个复孔。95℃、30 s,1个循环;95℃、5 s,60℃、30 s,40个循环。根据CT值计算不同基因的相对

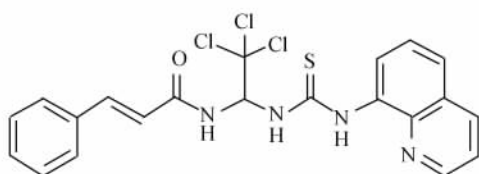
表达量： $\Delta CT = CT(\text{靶基因}) - CT(\beta\text{actin})$ ， $\text{Value} = 2^{-\Delta CT}$ 。引物序列见表1。

**1.4 统计学处理** 用 Student's *t* 检验分析组间差异。分别进行单因素方差分析和非配对 Student's *t* 检验。

表1 引物序列

基因		序列(5'→3')
$\beta\text{actin}$	前向	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT
	反向	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG
IL-17	前向	TGAAGGCAGCAGCGATCA
	反向	GGAAGTCCTTGGCCTCAGTGT
TNF- $\alpha$	前向	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	反向	GCTACGACGTGGGCTACAG

A



B

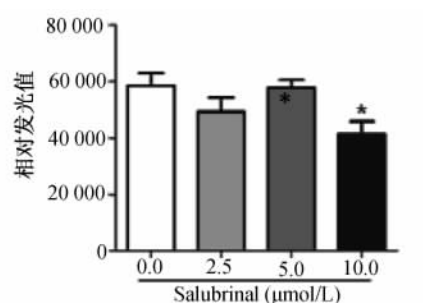


图1 Salubrinol 对小鼠脾脏细胞活性的影响

注：A. Salubrinol 结构式；B. 脾脏细胞活性。\*  $P < 0.05$

**2.2 Salubrinol 对小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群比例的影响** 为探索 Salubrinol 对小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群比例的影响，在抗 CD3/CD28 抗体刺激条件下，加入不同浓度 Salubrinol 与小鼠脾脏细胞共孵育，72 h 后用 FACS 检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群比例。结果显示，Salubrinol 下调脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 细胞和 IL-17<sup>+</sup> 细胞比例，对 IL-13<sup>+</sup> 细胞和 Foxp3<sup>+</sup> 细胞的比例无明显影响，提示 Salubrinol 具有选择性下调 Th1 和 Th17 比例的作用(图2)。

### 2.3 Salubrinol 治疗组小鼠膝关节炎症反应情况

上述体外实验结果提示 Salubrinol 可以降低 Th1 和 Th17 比例，而它们是 RA 的主要致病细胞，因此，研究建立 CIA 小鼠模型，探索 Salubrinol 对其的作用。参考 Hamamura 等<sup>[10]</sup> 的研究，Salubrinol 体内给药剂量为 2 mg/kg 时，可以减轻 CIA 小鼠的疾病严重程度。研究于第 21 d 起对治疗

## 2 实验结果

**2.1 Salubrinol 对小鼠脾脏细胞活性的影响** Salubrinol 是一种小分子化合物，其化学分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>C<sub>13</sub>N<sub>4</sub>OS，相对分子质量 479.81，化学结构如图 1A。为探索 Salubrinol 对脾脏细胞的作用，首先摸索其使用浓度。用不同浓度的 Salubrinol 与小鼠脾脏细胞共孵育，采用 CTG 发光法细胞活力检测试剂盒检测 Salubrinol 对脾脏细胞活性的影响。在浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  时，Salubrinol 对小鼠脾脏细胞活性无影响，而在 10  $\mu\text{mol/L}$  时对脾脏细胞产生明显影响 ( $P < 0.05$ )。

组小鼠每日腹腔注射 2 mg/kg Salubrinol 至发病高峰期(第 37 d)，发现 Salubrinol 可以减轻 CIA 小鼠后爪的肿胀程度(图 3A)。于疾病高峰期处死两组 CIA 小鼠，对其后肢膝关节进行 HE 染色。结果显示，对照组小鼠膝关节滑膜处有大量炎症细胞浸润；而 Salubrinol 组虽有细胞浸润，但数量显著少于对照组(图 3B)。因此，注射 Salubrinol 可明显减轻 CIA 小鼠膝关节处的炎症反应。为进一步探索 Salubrinol 对 CIA 小鼠病灶部位炎症因子水平的影响，取疾病高峰期两组 CIA 小鼠后肢脚爪研磨，提取 RNA，Real-time PCR 检测 CIA 小鼠病变部位炎症因子的表达量。结果显示，Salubrinol 治疗组小鼠脚爪中 IL-17 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量明显低于对照组 (IL-17,  $P = 0.011$ ; TNF- $\alpha$ ,  $P = 0.051$ ) (图 3C)。由此 Salubrinol 治疗组小鼠关节病变部位炎症反应减轻。

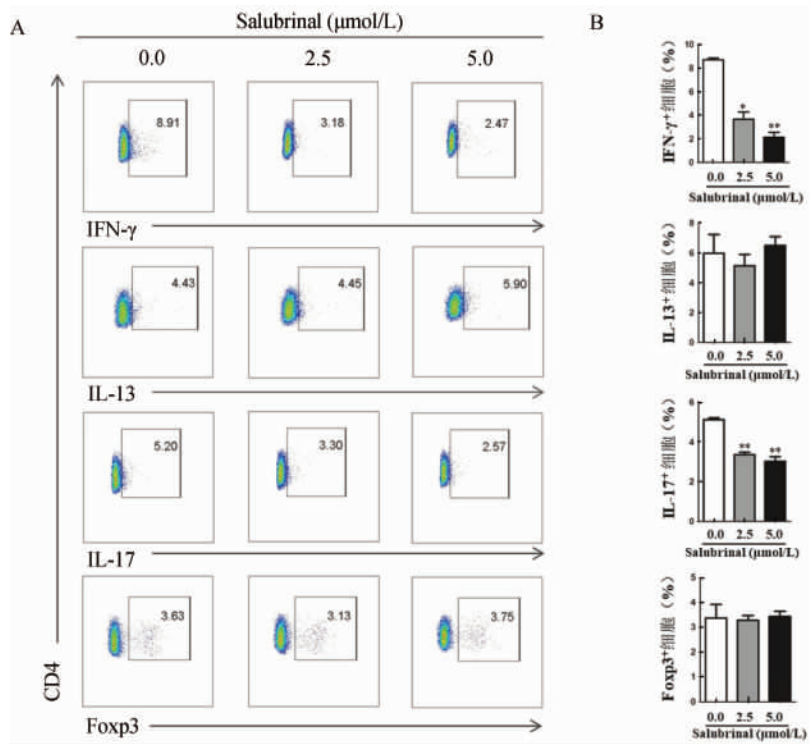


图2 Salubrinal 调节 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群比例

注：A. 小鼠脾脏中 Th 亚群比例的 FACS 代表图；B. 小鼠脾脏中 Th 亚群比例的统计图。\**P* < 0.01, \*\**P* < 0.001

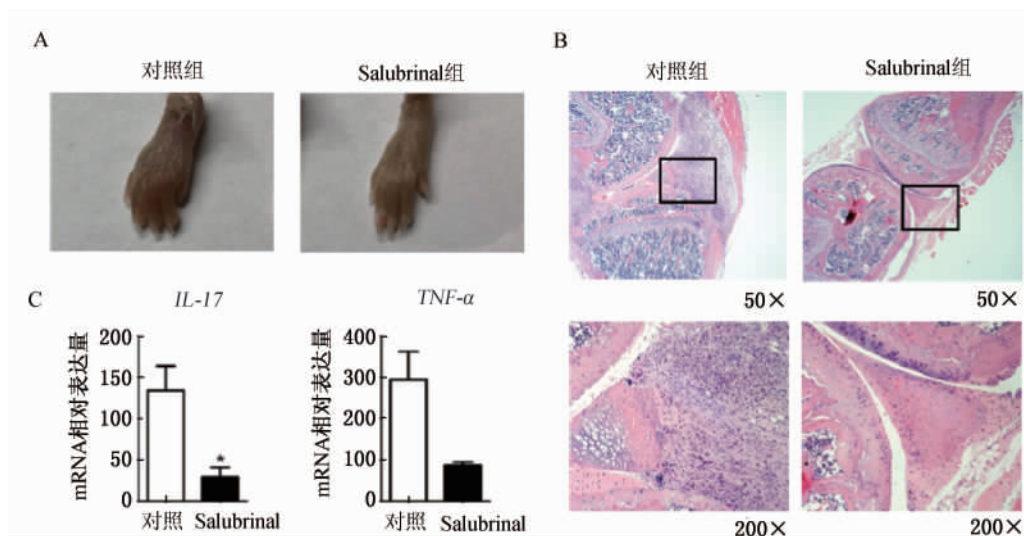


图3 Salubrinal 治疗组小鼠病情及病灶部位炎症细胞浸润和炎症因子表达情况

注：A. 两组小鼠后爪肿胀程度；B. HE 染色示小鼠膝关节炎症细胞浸润情况，下图为上图方框处的放大；C. Real-time PCR 检测小鼠脚爪炎症因子 mRNA 的表达量。\**P* < 0.05

**2.4 Salubrinal 对小鼠脾脏 II 型胶原反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖能力的影响** 前期实验结果显示, Sa-lubrinal 可减轻 CIA 小鼠病灶部位的炎症反应。为探索机制, 在疾病高峰期处死 CIA 小鼠, 分离脾脏单细胞悬液后, 分别在抗 CD3 和抗 CD28 抗体或 II 型胶原刺激条件下培养, 通过 Ki-67 水平分析

两组脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖情况。结果显示, 在抗 CD3 和抗 CD28 抗体的刺激下, 治疗组和对照组脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖无显著差异, 但在 II 型胶原刺激条件下治疗组 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖明显减少, 提示体内给予 Salubrinal 可明显抑制 II 型胶原反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖, 初步揭示 Salubrinal 对 CIA 的治疗机制(图 4)。

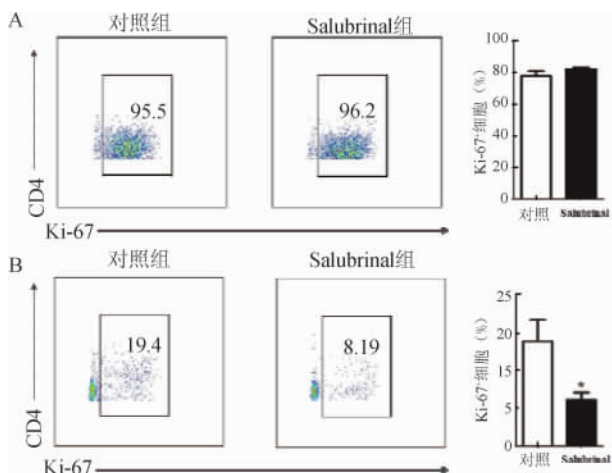


图4 Salubrinal抑制Ⅱ型胶原反应性CD4<sup>+</sup>T细胞增殖

注：取疾病高峰期两组小鼠脾脏单细胞悬液，分别用抗CD3和抗CD28抗体(A)或Ⅱ型胶原(B)刺激，FACS检测CD4<sup>+</sup>T细胞中Ki-67<sup>+</sup>细胞比例，分析两组脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖情况。\*P < 0.05

### 2.5 Salubrinal对小鼠脾脏Th1和Th17比例的影响

体外实验显示Salubrinal具有选择性下调Th1和Th17比例的作用。进一步分析Salubrinal治疗对CIA小鼠脾脏Th亚群比例的影响。结果显示，Salubrinal治疗组小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>细胞中IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>细胞和IL-17<sup>+</sup>细胞比例显著下降，推测Salubrinal通过下调Th1和Th17比例达到缓解CIA的作用(图5)。

### 2.6 Salubrinal对小鼠脾脏Th1和Th17相关转录因子表达的影响

由上述实验结果推测Salubrinal通过选择性下调Th1和Th17比例达到缓解CIA

的作用。进一步分析Salubrinal对脾脏Th1和Th17转录因子的作用。在疾病高峰期处死两组CIA小鼠，制备脾脏单细胞悬液；用Ⅱ型胶原刺激24h后，收集细胞，裂解蛋白，Western blotting检测Th1和Th17相关转录因子的表达情况。结果显示，Salubrinal治疗可以降低Ⅱ型胶原反应性脾脏细胞中T-bet和p-STAT3蛋白的表达水平(图6)。

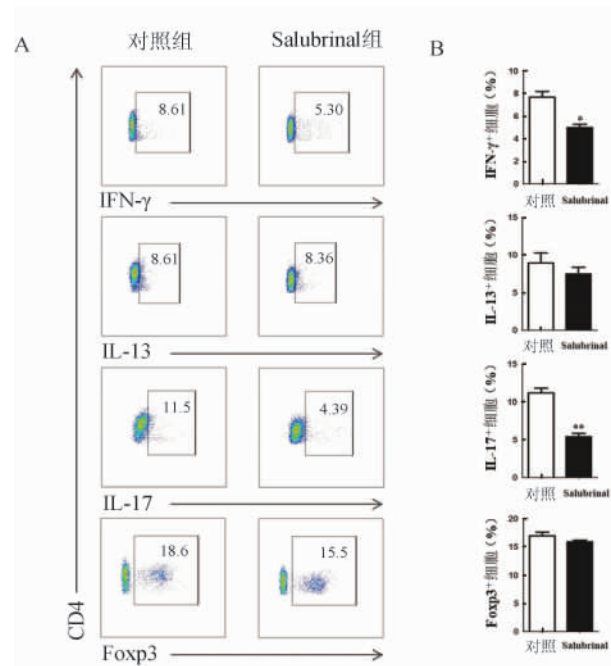


图5 Salubrinal下调CIA小鼠脾脏Th1和Th17比例

注：A. 小鼠脾脏Th亚群比例的FACS代表图；B. 小鼠脾脏Th亚群比例的统计图。\*P < 0.01, \*\*P < 0.001

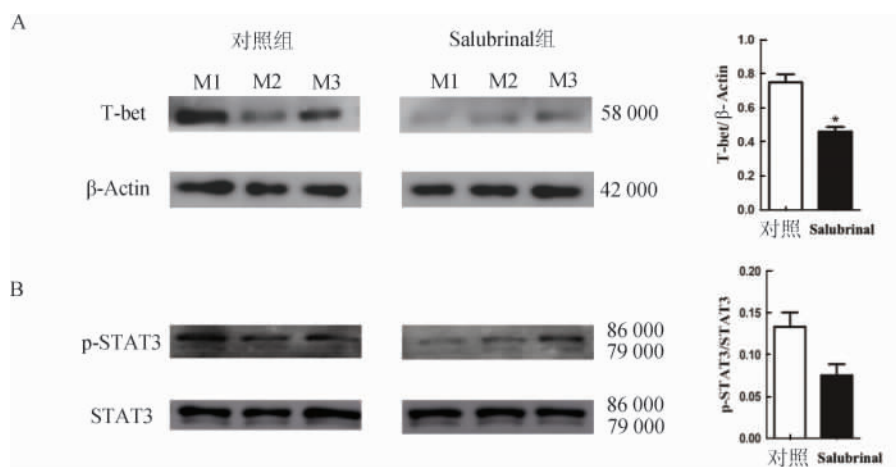


图6 Salubrinal治疗组小鼠脾脏细胞转录因子T-bet和p-STAT3的表达情况

注：A. 脾脏细胞T-bet蛋白表达(左)及条带灰度统计分析(右)；B. 脾脏细胞p-STAT3蛋白表达(左)及条带灰度统计分析(右)。\*P < 0.01

**2.7 Salubrinal对Th1和Th17分化的影响** 分选小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞,分别给予Th1或Th17分化条件,同时在分化体系中加入不同浓度的Salubrinal,分析其对Th1和Th17分化过程的影响。

结果显示,在体外CD3/CD28抗体和细胞因子诱导的分化体系中,不同浓度Salubrinal均不影响Th1和Th17的分化(图7)。

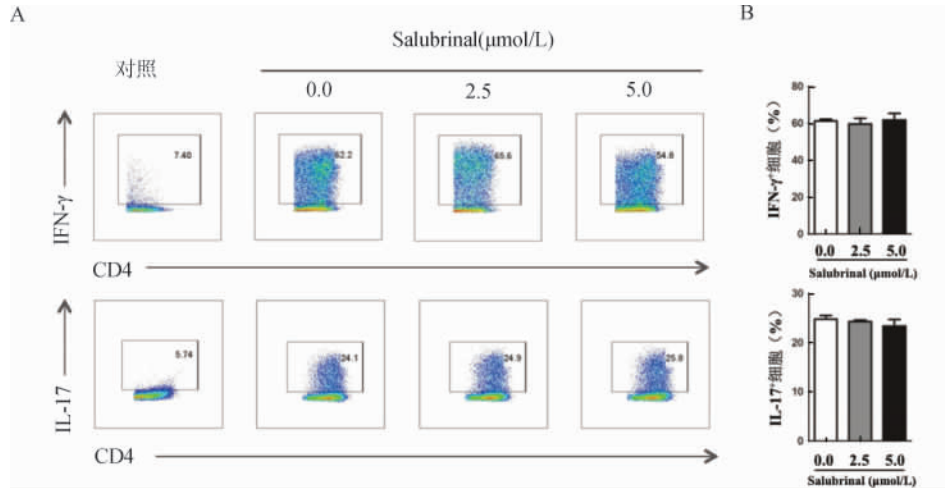


图7 Salubrinal对小鼠脾脏Th1和Th17分化的影响

注: A. 小鼠脾脏Th1和Th17分化的FACS代表图; B. 小鼠脾脏Th1和Th17分化的统计图

### 3 讨论

目前,RA治疗药物的探索多集中于两个方面:生物制剂和小分子药物。生物制剂一般为抗体类药物,主要针对在RA关节微环境中发挥重要作用的细胞因子,如TNF-α、IL-1和IL-6,疗效在(60~70)%。抗体类药物往往需要静脉给药,而小分子药物可以口服,因此后者在临床上的使用更加广泛。国内治疗RA的小分子药物主要有托法替尼和艾拉莫德。那么,对于传统药物或者生物制剂反应差的RA患者,是否还有其他小分子药物可以替代治疗显得尤为重要。

文献报道,RA的易感性与滑膜组织T细胞浸润、HLA密切相关<sup>[11]</sup>,其中CD4<sup>+</sup>T细胞亚群失衡在RA发病中具有重要作用<sup>[12]</sup>。Th1和Th17是RA的主要致病细胞。Th1被认为在RA炎症中发挥主导作用,大多数滑膜浸润CD4<sup>+</sup>T细胞表达IFN-γ,它可以激活巨噬细胞,诱导TNF-α分泌,促进炎症的发生<sup>[13]</sup>。研究发现,RA患者外周血中Th17数量高于健康人<sup>[14]</sup>。在CIA模型中,Th17和其分泌的IL-17也表现出与疾病进程很强的相关性,IL-17缺乏的小鼠表现出对RA的抗性<sup>[15]</sup>。此外,IL-17通过上调细胞表面RANKL诱导破骨相关基因表达并影响破骨细胞的功能<sup>[16]</sup>。由此可见CD4<sup>+</sup>T细胞亚群的失衡在RA发病过程

中发挥重要作用。

关于小分子化合物Salubrinal对RA治疗的作用,仅一篇文献报道它可以减轻CAIA小鼠的临床症状<sup>[10]</sup>,但其作用机制并未完全阐明。研究表明,Salubrinal可以减轻骨破坏,对关节软骨具有保护作用<sup>[17]</sup>。Salubrinal可以通过对破骨细胞和成骨细胞分化的调节,治疗骨质疏松症<sup>[18]</sup>,提示了其骨骼组织的有益影响。但目前未见Salubrinal在RA中对CD4<sup>+</sup>T细胞作用机制的报道。

课题组体外实验发现,Salubrinal可以调节小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞亚群的比例。为探索Salubrinal对CIA小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞的影响,研究建立了小鼠CIA模型。实验发现Salubrinal可减轻CIA小鼠病灶部位的炎症细胞浸润,下调炎症因子IL-17和TNF-α的mRNA表达水平,提示Salubrinal可以减轻CIA小鼠的炎症反应。进一步研究发现Salubrinal可以特异性抑制II型胶原反应性CD4<sup>+</sup>T细胞增殖。此外,Salubrinal可以下调脾脏细胞中Th1和Th17的比例,并下调相关转录因子的表达。因此,作者推测Salubrinal可能通过抑制II型胶原反应性CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖,下调Th1和Th17的比例而减轻炎症,缓解CIA严重程度。

在Th1和Th17体外诱导分化体系中,实验结果显示Salubrinal对Th1和Th17分化无影响;而



体内实验结果显示 Salubrinal 治疗能降低脾脏细胞中 Th1 和 Th17 比例。这是因为体内给药 Salubrinal 可能影响多种细胞的功能,通过多种途径下调 Th1 和 Th17 比例。另外,实验发现 Salubrinal 抑制 II 型胶原反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖,而抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖是自身免疫病发生的重要机制。因此,研究者推测 Salubrinal 可用于所有 Th1 和 Th17 介导的自身免疫病的治疗。对此研究者会进一步用实验证实。

综上所述,在 CIA 小鼠中,Salubrinal 可以抑制 II 型胶原反应性 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖,下调 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1 和 IL-17<sup>+</sup> Th17 的比例,提示 Salubrinal 可以通过降低炎症细胞比例治疗 RA。研究 Salubrinal 对抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞的作用将有助于更好地阐明 Salubrinal 在 RA 发生发展过程中的作用,为拓展 RA 的治疗方案提供新思路。

#### 参考文献

- [1] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [2] Xu CH, Wang XR, Mu R, *et al.* Societal costs of rheumatoid arthritis in China: A hospital-based cross-sectional study[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2014, 66(4): 523-531.
- [3] Wasén C, Turkkila M, Bossios A, *et al.* Smoking activates cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and causes survivin release in rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2017, 78: 101-110.
- [4] Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: Predisposition and transition to clinical synovitis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(10): 573-586.
- [5] Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(5): 364-371.
- [6] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [7] Bankhurst AD, Husby G, Williams RC Jr. Predominance of T cells in the lymphocytic infiltrates of synovial tissues in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1976, 19(3): 555-562.
- [8] Penatti A, Facciotti F, De Matteis RA, *et al.* Differences in serum and synovial CD4<sup>+</sup> T cells and cytokine profiles to stratify patients with inflammatory osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 103.
- [9] Boyce M, Bryant KF, Jousse C, *et al.* A selective inhibitor of eIF2 alpha dephosphorylation protects cells from ER stress [J]. *Science*, 2005, 307(5711): 935-939.
- [10] Hamamura K, Nishimura A, Chen A, *et al.* Salubrinal acts as a Dusp2 inhibitor and suppresses inflammation in anti-collagen antibody-induced arthritis[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(4): 828-835.
- [11] Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, *et al.* The contribution of HLA to rheumatoid arthritis[J]. *Clin Genet*, 1989, 36(3): 178-182.
- [12] Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: Update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(9): 1560-1569.
- [13] Kim KN, Watanabe S, Ma Y, *et al.* Viral IL-10 and soluble TNF receptor act synergistically to inhibit collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene transfer[J]. *J Immunol*, 2000, 164(3): 1576-1581.
- [14] Leipe J, Grunke M, Dechant C, *et al.* Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 2876-2885.
- [15] Nakae S, Nambu A, Sudo K, *et al.* Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 6173-6177.
- [16] Kikuta J, Wada Y, Kowada T, *et al.* Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 866-873.
- [17] Hamamura K, Nishimura A, Iino T, *et al.* Chondroprotective effects of Salubrinal in a mouse model of osteoarthritis [J]. *Bone Joint Res*, 2015, 4(5): 84-92.
- [18] He L, Lee J, Jang JH, *et al.* Osteoporosis regulation by salubrinal through eIF2 alpha mediated differentiation of osteoclast and osteoblast[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(2): 552-560.

## Salubrinal relieves CIA by down-regulating the proportion of Th1 and Th17

LI Zi-jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuan-teng<sup>1,2</sup>, NIE Hong<sup>1,2</sup> (1. *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, College of Basic Medical Science, Department of Immunology and Microbiology, Shanghai 200025, China*; 2. *Shanghai Institute of Immunology, Shanghai 200025, China*)

**Abstract:** RA is an autoimmune disease. CD4<sup>+</sup>T cell plays an important role in the development of RA. In this study, we explore the mechanism of Salubrinal in the treatment of CIA mice by analyzing the proliferation of pathogenicity cells, the propor-

tion of Th subsets and the mRNA expression of related transcriptional factors in spleen cells, and the inflammatory cell infiltration and cytokine expression in the joint lesions. The results showed that Salubrinal could inhibit the proliferation of spleen collagen III-reactive CD4<sup>+</sup> T cells, down-regulate the proportion of Th1 and Th17, as well as the expression of transcriptional factors T-bet and p-STAT3. Salubrinal could also decrease the inflammatory cell infiltration and the expression of cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  in the articular lesions. Our results indicate that Salubrinal has the function of treating CIA by regulating the proportion of Th1 and Th17 and inhibiting the proliferation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. This study provides a new idea for the treatment of RA.

**Key words:** salubrinal; collagen-induced arthritis; CD4<sup>+</sup> T cell