

基于Treg细胞功能的稳定性探讨解毒通络生津方对干燥综合征模型鼠免疫调节的作用

程丹丹, 李永明, 侯佳奇, 薛鸾*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

[摘要] 目的:观察不同剂量解毒通络生津方对干燥综合征模型NOD/Ltj小鼠血清白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及颌下腺叉头框转录因子P3(FoxP3)表达的影响,探讨解毒通络生津方对NOD/Ltj小鼠免疫调节的作用机制。方法:将30只8周龄NOD/Ltj小鼠随机分为模型组,解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹组共5组,12周龄开始每日分别灌服等量的生理盐水,含生药9、18、36 g·kg⁻¹的解毒通络生津方和60 mg·kg⁻¹的羟氯喹,同时选取6只ICR小鼠作为空白组,给予等量的生理盐水灌胃。实验期间记录各组小鼠第9、12、16周龄的日均饮水量、唾液流量,给药4周后摘取组织计算颌下腺指数、脾脏指数,苏木素-伊红(HE)染色观察颌下腺组织病理形态,Meso Scale Discovery(MSD)法检测小鼠血清IL-6、TNF- α 、IL-10水平,免疫组化检测颌下腺FoxP3的表达和分布,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠颌下腺FoxP3蛋白的表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠颌下腺FoxP3、TNF- α mRNA的表达。结果:与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠饮水量增多、唾液流量减少、颌下腺指数降低、颌下腺组织病理学评分升高,血清IL-6、TNF- α 表达升高,IL-10表达降低,颌下腺FoxP3蛋白表达降低,颌下腺FoxP3 mRNA表达降低、TNF- α mRNA表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组饮水量均明显减少,唾液流量均明显增加($P<0.05$),且中、高剂量组疗效更显著;解毒通络生津方中剂量组颌下腺指数升高($P<0.05$),解毒通络生津方高剂量组脾脏指数降低($P<0.05$);解毒通络生津方低、中、高剂量组颌下腺组织病理评分均降低($P<0.05$),高剂量组疗效更显著;解毒通络生津方低、中、高剂量组血清IL-6、TNF- α 表达均降低,IL-10表达升高,颌下腺TNF- α mRNA表达降低($P<0.05$);解毒通络生津方中、高剂量组颌下腺FoxP3蛋白表达升高,颌下腺FoxP3 mRNA表达升高($P<0.05$)。结论:解毒通络生津方可能通过促进FoxP3⁺调节性T细胞(Treg)功能的稳定,抑制炎症细胞因子的分泌,从而缓解干燥综合征全身免疫炎症的进展。

[关键词] 干燥综合征; 解毒通络生津方; 叉头框转录因子P3(FoxP3); 细胞因子; NOD/Ltj小鼠

[中图分类号] R242; R2-0; R2-031; R593; R24; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0119-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230992

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220619.2244.005.html>

[网络出版日期] 2022-06-20 14:44:59

Immunoregulatory Effect of Jiedu Tongluo Shengjin Prescription on Sjögren's Syndrome Mice Based on Stability of Treg Cells

CHENG Dandan, LI Yongming, HOU Jiaqi, XUE Luan*

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of different doses of Jiedu Tongluo Shengjin prescription (JTSP) on serum interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and forkhead box P3 (FoxP3) in submandibular gland of NOD/Ltj mice with Sjögren's syndrome, and to explore the mechanism of

[收稿日期] 2021-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573925)

[第一作者] 程丹丹, 硕士, 从事中医药干预风湿免疫疾病研究, E-mail: Cheng_hjx@163.com

[通信作者] * 薛鸾, 博士, 主任医师, 从事风湿免疫病的中西医结合诊治研究, E-mail: xelco@163.com

JTSP on immune regulation in NOD/Ltj mice. **Method:** Thirty NOD/Ltj mice (eight weeks old) were randomly divided into model group, JTSP low-dose group, JTSP medium-dose group, JTSP high-dose group and hydroxychloroquine group, and were administrated with normal saline, JTSP 9, 18, and 36 g·kg⁻¹, and hydroxychloroquine 60 mg·kg⁻¹ daily, respectively from the age of 12 weeks. Six ICR mice were given an equal amount of normal saline by gavage as the control group. During the experiment, daily water consumption and saliva secretion of mice at the age of 9, 12, 16 weeks were recorded. After 4 weeks of administration, submandibular gland and spleen tissues were dissected to calculate corresponding indexes. The pathological morphology of submandibular gland was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Meso Scale Discovery (MSD) and immunohistochemistry were employed to detect the serum levels of IL-6, TNF- α and IL-10, and the expression and distribution of FoxP3 in submandibular gland, respectively. The protein expression of FoxP3 in mouse submandibular gland was determined by Western blot, and the mRNA expressions of FoxP3 and TNF- α were determined by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the control group, the model group presented increased daily water consumption, decreased saliva secretion, lowered submandibular gland index, elevated pathological score of submandibular gland, up-regulated serum IL-6 and TNF- α and mRNA expression of TNF- α while down-regulated serum IL-10 and protein and mRNA expressions of FoxP3 in submandibular gland ($P<0.05$). Compared with the conditions in model group, daily water consumption in JTSP groups was reduced while saliva secretion was increased, especially in medium-dose and high-dose groups ($P<0.05$), and there was an increase in the submandibular gland index of JTSP medium-dose group ($P<0.05$) while a decrease in the spleen index of JTSP high-dose group ($P<0.05$). Additionally, JTSP groups had lower pathological score of submandibular gland than the model group ($P<0.05$), especially high-dose group, as well as lower serum IL-6 and TNF- α and mRNA expression of TNF- α while higher serum IL-10 ($P<0.05$). JTSP at medium and high doses up-regulated the protein and mRNA expressions of FoxP3 in submandibular gland ($P<0.05$). **Conclusion:** JTSP may inhibit the secretion of inflammatory cytokines by regulating the stability of FoxP3⁺ regulatory T (Treg) cells, thus alleviating the systemic immune inflammation in Sjögren's syndrome.

[Keywords] Sjögren's syndrome; Jiedu Tongluo Shengjin prescription; forkhead box P3 (FoxP3); cytokines; NOD/Ltj mice

干燥综合征(SS)是常见的自身免疫性结缔组织病,好发于50岁以上女性,年龄和性别是其危险因素^[1]。一项荟萃分析显示,SS的年发病率为6.92/10万,患病率达60.82/10万^[2]。口干眼干、疲劳和关节痛是SS主要症状,严重影响生活质量及工作效率^[3]。超过1/3的SS患者可出现肺、肾、血液、神经系统等腺外系统累及,甚至并发淋巴瘤,增加死亡率^[4]。2019年,欧洲抗风湿联盟(EULAR)总结了过去16年的研究成果,给出了局部替代疗法、糖皮质激素、免疫抑制剂、生物疗法应用的总体建议^[5]。然而,这些治疗SS的药物均缺乏循证医学的依据,临床治疗决策的制定仍具挑战性^[6]。

调节性T细胞(Treg)是以叉头框转录因子P3(FoxP3)基因的稳定表达及免疫抑制功能为特征的CD4⁺T细胞谱系,具有维持免疫稳态和预防自身免疫的作用。FoxP3的表达和稳定性在维持Treg细胞

功能方面起着至关重要的作用^[7-8]。Treg细胞主要通过分泌白细胞介素(IL)-10、IL-35、转化生长因子- β (TGF- β)等抑炎细胞因子和抑制效应T细胞调节免疫反应,从机制上讲,Treg抑制能力减弱可能导致促炎细胞因子(IL-6、IL-17等)的产生增加^[9-10],并且在自身免疫炎症环境下,部分Treg细胞会失去FoxP3表达(Treg细胞的不稳定性),导致抑制能力下降,甚至获得效应T细胞表型^[11-12]。

SS属于中医“燥痹”范畴。中医通过辨证论治、个体化治疗可以有效改善患者的症状^[13]。近几年研究发现,中药方剂、单体在治疗SS方面有独特的优势^[14]。中药可以通过上调水通道蛋白、抑制唾液腺导管上皮细胞凋亡、抑制B淋巴细胞异常激活和调节辅助性T细胞亚群的平衡与活化等途径达到治疗SS的目的^[15]。20年来,课题组在临床实践中采用解毒通络生津法治疗SS,不断优化并创制了专病

专方——解毒通络生津方(授权专利号 ZL201410469242.5)。课题组前期的临床研究证实,解毒通络生津方能够有效治疗 SS,调节患者的免疫反应^[16-18],同时,动物实验发现解毒通络生津方可以延缓 SS 自发模型 NOD/Ltj 小鼠的颌下腺组织病理损伤^[19]。这些研究初步揭示了解毒通络生津方对 SS 的治疗作用,但其作用机制有待进一步探索。因此,本研究以 SS 模型鼠为观察对象,通过观察各组小鼠的饮水量、唾液流量及颌下腺组织病理学改变,评估解毒通络生津方对 SS 模型鼠唾液腺功能和腺体组织结构的保护作用。进一步以 Treg 细胞特征性转录因子 FoxP3 为观察焦点,运用免疫组化、蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)等方法分别对 FoxP3 在小鼠颌下腺组织中的表达进行检测,结合 Meso Scale Discovery(MSD)检测的炎症细胞因子 IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平和 Real-time PCR 检测的 TNF- α mRNA 的表达水平,探讨解毒通络生津方调节 SS 自身免疫炎症反应的潜在机制。

1 材料

1.1 药物 解毒通络生津方组成为白花蛇舌草 30 g、莪术 15 g、白芍 30 g、黄芪 30 g、当归 9 g、炙甘草 6 g,由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中药房提供(上海虹桥中药饮片有限公司,批号 20121107),经药剂科朱晓春主管药师鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关要求。实验前按照根据小鼠与成人表面积换算等效剂量^[20],计算所需浓度。以上药材加水浸没,浸泡后武火煮开,改文火煎煮 30 min,滤出药液,再次加水,煮开 30 min,过滤药液,将 2 次药汁混合,旋转蒸发器浓缩成含生药量 $3.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混悬液,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,蒸馏水稀释成所需浓度。硫酸羟氯喹片(上海上药中西制药有限公司,批号 201185, 0.1 g/片)。

1.2 动物 NOD/Ltj 小鼠 30 只,SPF 级,雌性,8 周龄;ICR 小鼠 6 只,雌性,8 周龄。均购自北京华康生物科技股份有限公司,实验动物合格证号 SCXK(京)2019-0008,所有实验动物饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心 SPF 屏障内(温度 $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 $40\% \sim 70\%$)。该实验通过了上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会批准(伦理批号 YYLAC-2021-104)。

1.3 实验试剂 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白

(Ig)G(美国 CST 公司,货号分别为 4970、7074);FoxP3 抗体(美国 Abcam 公司,货号 ab215206);蛋白 Marker(美国 Thermo 公司,货号 26616);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样蛋白缓冲液 $5\times$ 、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、SDS-PAGE 电泳液、Western 转膜液、BeyoECL Star 特超敏 ECL 化学发光试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术公司,货号分别为 P0010、P0015L、P0012A、P0014B、P0021B、P0018AS、C0105);MSD 试剂盒(美国 Meso Scale Discovery 公司,货号 K15048D);Ezb DNA/RNA/组织提取试剂盒(美国 EZBioscience 公司,货号 EZB-RN001-plus);Takara 反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(日本 Takara Bio 公司,货号分别为 RR420A、RR047A)。

1.4 仪器 Meso QuickPlex SQ 120 型 MSD 超敏多因子电化学发光分析仪(美国 Meso Scale Discovery 公司);Synergy H1MF 型酶标仪(美国 Biotek 公司);POWERPAC HC 型蛋白垂直电泳系统、CHEMI DOC MP 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);BSA-124S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);H550S 型光学显微镜(日本 Nikon 公司);7500 型 Real-time PCR System(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 实验分组与给药 将 30 只 8 周龄 NOD 小鼠随机分为 5 组,每组 6 只,即模型组,解毒通络生津方低、中、高剂量组及羟氯喹组。另选 6 只同龄 ICR 小鼠作为空白组。适应性饲养。12 周龄开始每日定时灌胃 1 次,模型组灌服生理盐水,小鼠等效剂量按 60 kg 成人每日剂量 120 g 进行计算,解毒通络生津方低剂量组灌服含生药 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 混悬液、中剂量组灌服含生药 $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 混悬液、高剂量组灌服含生药 $36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 混悬液,羟氯喹组给药量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;空白组灌服生理盐水。每次 0.25 mL ,持续 4 周。

2.2 饮水量及唾液流量测定 分别测量 9 周、12 周、16 周各组小鼠日均饮水量。每日固定时间给小鼠准备饮用水并测量水量。该组小鼠当日饮水量等于前 1 d 所给水量(M_1)减去当日该组小鼠所剩水量(M_2),每组 6 只小鼠,则每只小鼠当日饮水量= $(M_1 - M_2)/6$ 。记录 9 周、12 周、16 周每日每只小鼠的平均饮水量。

实验期间分别于小鼠 9 周龄,12 周龄(开始给药前),16 周龄(给药 4 周后)采用棉球湿重法进行小鼠

唾液流量的测定。测量方法为采用1%~4%异氟烷吸入麻醉小鼠,观察小鼠呼吸,肌肉,眼睑、角膜反射情况确认进入麻醉状态,将预先电子分析天平称重的清洁干燥棉球(记质量为 $M_{干}$)置于小鼠口腔颌下腺导管开口处,等待5 min后取出棉球并称量(记质量为 $M_{湿}$),每只小鼠分泌唾液量为 $M_{湿}-M_{干}$ 。

2.3 器官指数测定 给药结束后,禁食不禁水12 h称小鼠体质量,麻醉后处死,分别摘取双侧颌下腺及脾脏,计算器官指数。颌下腺指数=双侧颌下腺质量(mg)/小鼠体质量(g);脾脏指数=脾脏质量(mg)/小鼠体质量(g)。

2.4 MSD法检测血清中细胞因子 采用摘眼球取血法获得的小鼠全血,以 $3\ 500\ r\cdot\min^{-1}$,离心12 min(离心半径30 cm),分离血清。血清中的细胞因子IL-6、IL-10、TNF- α 用MSD法^[21]进行检测。

2.5 HE染色观察颌下腺病理损伤程度 灌胃4周后处死小鼠,解剖摘取双侧颌下腺并称量,将颌下腺置于4%多聚甲醛中固定1 d,流水冲洗后自动脱水机脱水。浸蜡、包埋、连续切片,片厚5 μm 。62 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温箱烤片后脱蜡、染色。光镜下成像并扫描成电子图片观察其形态结构,并根据Chisholm-Mason组织学评分^[22]将各组小鼠病理损伤程度量化分析。评价标准见表1。

表1 SS模型小鼠颌下腺组织Chisholm-Mason病理学评价标准
Table 1 Grading method as developed by Chisholm and Mason

等级	每4 mm ² 淋巴细胞和浆细胞数量
0级	无浸润
1级	轻微浸润
2级	中度浸润或<1个病灶
3级	1个病灶
4级	>1个病灶

注:单个病灶中心是50个或50个以上淋巴细胞和组织细胞的集合体

2.6 免疫组化法检测颌下腺组织上FoxP3的表达及分布 颌下腺石蜡组织连续切片,常规脱蜡,水化,3%甲醇H₂O₂孵育15 min以灭活内源性过氧化物酶活性;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,5 min,3次;0.01 mol·L⁻¹柠檬酸钠修复液高温修复抗原;纯水、PBS洗涤,滴加封闭液,湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min封闭非特异性抗原;甩掉封闭液后滴加FoxP3(1:250)抗体置湿盒中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;第2天复温后再用PBS洗5 min,3次,去除标本外的PBS,滴加二抗(1:400),37 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温箱孵育30 min,PBS洗5 min,

3次,洗完甩干液体,切片放回湿盒,滴加DAB显色液,室温避光孵育数分钟,一级纯水终止显色。苏木素复染,水洗,脱水、透明、中性树胶封片。对照设置不加一抗为阴性对照。结果判定:棕黄或棕褐色颗粒判定为阳性。用Image J软件计算各组小鼠颌下腺组织FoxP3的阳性表达率作为量化结果。

2.7 Western blot检测颌下腺中Treg细胞相关转录因子FoxP3蛋白水平 取颌下腺,称重后加RIPA裂解、匀浆、提蛋白、制胶、电泳、转膜、5%BSA封闭,加一抗[兔单克隆抗体FoxP3(1:1 000)、兔单克隆抗体 β -actin(1:1 000)]4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜、PBST摇床漂洗40 min、二抗(1:10 000)常温摇床孵育40 min、PBST摇床漂洗40 min、显影。采集凝胶成像系统扫描曝光后的图像,用Image J软件进行光密度分析,以样品蛋白的灰度值与对应的内参蛋白 β -actin的灰度值比值作为该样品中目的蛋白的相对表达量。

2.8 Real-time PCR检测颌下腺中FoxP3、TNF- α mRNA水平 取颌下腺,称重后根据EZB试剂盒说明书按序加入Lysis Buffer、Buffer A等试剂,提取总RNA,运用超微量核酸蛋白测定仪检测RNA纯度(吸光度 A_{260}/A_{280} 为1.8~2.1的组织RNA纯度较高)并定量,根据Takara反转录试剂盒去除DNA反应,并进行反转录,设定条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却保存,后用Real-time PCR进行检测,设置PCR反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s,40个循环,以cDNA为模板,扩增目的基因。观察PCR产物的溶解曲线是否符合标准。采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 定量法得出各组mRNA表达水平。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
FoxP3	上游 CCCTTTCACCTATGCCACCCCTTATC	203
	下游 ACACTGCTCCCTTCTCGTCTC	
TNF- α	上游 CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC	347
	下游 TGACGGCAGAGAGGAGGTTGAC	
β -actin	上游 TGCTGTCCCTGTATGCCTCTGG	348
	下游 ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	

2.9 统计学分析 采用SPSS 26.0进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料符合正态分布,应用单因素方差分析(One-Way ANOVA);对计量资料进行方差齐性检验:方差齐时,组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD),方差不齐时,采用Dunnett's T3进行多重比较;若不符合正态分布,采用

Kruskal-Wallis检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠一般情况的影响 9~16周,空白组ICR小鼠的毛色、光泽度、精神状态、活动度及饮水量、唾液流量、进食量及体质量无显著变化。12周开始

NOD小鼠毛色逐渐发黄,光泽逐渐暗淡,并出现不同程度脱毛现象;13~14周,部分NOD小鼠精神狂躁,易激惹,尤以模型组小鼠显著;16周有个别NOD小鼠精神萎靡、倦怠少动。但8、10、12、14、16周NOD小鼠各组体质量差异无统计学意义。见表3。

表3 解毒通络生津方对各组小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	8周	10周	12周	14周	16周
空白组		32.92±1.04	34.63±1.01	36.61±1.47	38.85±1.53	38.24±1.33
模型组		17.83±0.28	19.42±0.38	20.33±0.27	22.05±0.69	19.36±1.10
解毒通络生津方低剂量组	9	17.58±0.40	19.51±0.37	20.73±0.41	21.49±0.41	19.28±0.34
解毒通络生津方中剂量组	18	18.17±0.56	19.68±0.56	20.15±0.41	19.99±0.51	18.34±0.65
解毒通络生津方高剂量组	36	17.58±0.30	19.73±0.31	20.20±0.35	18.98±0.45	18.05±0.55
羟氯喹组	0.06	17.33±0.28	19.06±0.33	19.08±0.77	20.49±0.37	19.57±0.19

3.2 对小鼠日均饮水量及唾液流量的影响 研究结果显示9、12、16周空白组ICR小鼠的日均饮水量基本不变。9周时空白组,模型组,解毒通络生津方低、中、高剂量组,羟氯喹组各组小鼠日均饮水量差异无统计学意义。12周,与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠日均饮水量明显增多($P < 0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹

组小鼠日均饮水量差异无统计学意义。16周,与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠日均饮水量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹组日均饮水量均明显降低($P < 0.05$);与解毒通络生津方低剂量组比较,解毒通络生津方中、高剂量组日均饮水量明显降低($P < 0.05$)。见表4。

表4 解毒通络生津方对各组小鼠每日饮水量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	9周	12周	16周
空白组		3.88±0.11	3.85±0.12	3.88±0.11
模型组		4.03±0.15	4.87±0.17 ¹⁾	12.09±0.37 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	3.76±0.42	4.84±0.18	4.46±0.13 ²⁾
解毒通络生津方中剂量组	18	3.90±0.38	4.78±0.22	3.92±0.10 ^{2,3)}
解毒通络生津方高剂量组	36	3.80±0.40	4.90±0.14	3.80±0.10 ^{2,3)}
羟氯喹组	0.06	3.81±0.32	4.83±0.19	3.88±0.09 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与解毒通络生津方比较³⁾ $P < 0.05$ (表5-表11同)

9周时,各组小鼠唾液流量差异无统计学意义。12周,与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠唾液流量明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹组唾液流量差异无统计学意义。16周,与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠唾液流量明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组与羟氯喹组小鼠唾液流量均明显增加($P < 0.05$);与解毒通络生津方低剂量组比较,解毒通络生津方中、高剂量组唾液流量明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表5。

3.3 对小鼠颌下腺指数、脾脏指数的影响 与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠颌下腺指数明显降低($P < 0.05$),脾脏指数差异无统计学意义。与模型组比较,解毒通络生津方中剂量组、羟氯喹组小鼠颌下腺指数明显升高($P < 0.05$),解毒通络生津方高剂量组小鼠脾脏指数降低($P < 0.05$)。见表6。

3.4 对小鼠血清细胞因子IL-6、TNF- α 、IL-10表达的影响 与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠血清细胞因子IL-6、TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$),IL-10水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹组小鼠IL-6、

表5 解毒通络生津方对各组小鼠唾液流量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

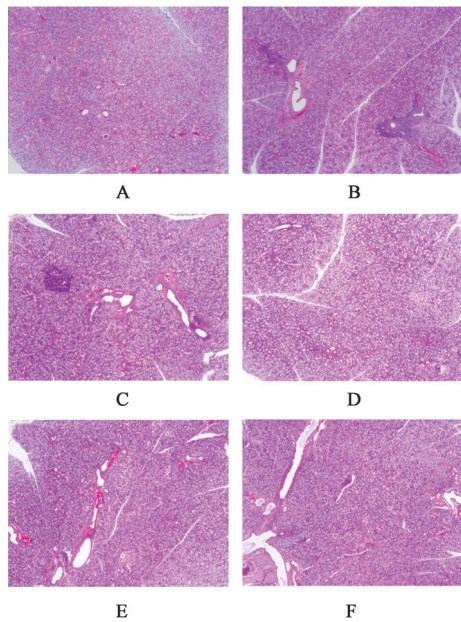
组别	剂量/g·kg ⁻¹	9周	12周	16周
空白组		21.37±2.23	21.13±3.04	23.97±2.59
模型组		20.32±2.10	7.55±2.38 ¹⁾	7.88±2.16 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	19.72±1.49	7.80±2.22	13.58±0.71 ²⁾
解毒通络生津方中剂量组	18	22.23±2.40	5.28±1.45	19.22±1.41 ^{2,3)}
解毒通络生津方高剂量组	36	23.25±3.37	3.42±0.90	20.18±1.19 ^{2,3)}
羟氯喹组	0.06	22.10±2.01	8.18±2.28	19.23±0.83 ^{2,3)}

表6 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺指数和脾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	颌下腺指数	脾脏指数
空白组		5.27±0.18	3.09±0.20
模型组		4.31±0.40 ¹⁾	3.51±0.23
解毒通络生津方低剂量组	9	4.95±0.20	3.31±0.16
解毒通络生津方中剂量组	18	5.15±0.21 ²⁾	3.13±0.18
解毒通络生津方高剂量组	36	4.89±0.21	2.55±0.28 ^{2,3)}
羟氯喹组	0.06	5.04±0.24 ²⁾	3.02±0.26

TNF- α 水平明显降低($P<0.05$),IL-10水平明显升高($P<0.05$)。见表7。

3.5 对小鼠颌下腺组织病理的影响 光镜下颌下腺病理观察结果显示,空白组ICR小鼠颌下腺腺泡大小均一,导管及腺泡结构完整,无淋巴细胞浸润。模型组颌下腺可见大量淋巴细胞浸润,形成多个淋巴细胞浸润灶,多分布于导管及血管周围。腺泡大小不一,个别腺体萎缩明显,且分叶之间的间隙增宽。解毒通络生津方各组及羟氯喹组小鼠的颌下腺病理形态学观察可见程度不一的淋巴细胞浸润灶及间质散在的淋巴细胞浸润,腺泡大小不一,未见明显的导管扩张、塌陷及腺泡结构破坏。见图1



注:A.空白组;B.模型组;C~E.解毒通络生津方低、中、高剂量组;F.羟氯喹组(图2和图3同)

图1 解毒通络生津方对各组颌下腺病理的影响(HE,×40)

Fig. 1 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on submandibular gland pathology of mice in each group (HE,×40)

3.6 对小鼠颌下腺组织病理评分的影响 各组小鼠颌下腺组织病理评分比较结果显示,与空白组ICR小鼠比较,模型组小鼠评分明显升高($P<0.05$);与模型组比较,解毒通络生津方中、高剂量组和羟氯喹组小鼠颌下腺组织病理评分均明显降低

表7 解毒通络生津方对各组小鼠血清细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-10水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-10
空白组		5.58±0.59	9.29±1.20	37.63±3.99
模型组		9.32±1.10 ¹⁾	34.84±5.65 ¹⁾	6.71±0.75 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	6.34±0.60 ²⁾	21.20±1.04 ²⁾	30.62±0.40 ²⁾
解毒通络生津方中剂量组	18	5.94±0.52 ²⁾	20.52±4.51 ²⁾	24.22±3.68 ²⁾
解毒通络生津方高剂量组	36	6.13±0.74 ²⁾	21.58±3.91 ²⁾	20.71±1.95 ²⁾
羟氯喹组	0.06	5.83±0.60 ²⁾	21.07±5.11 ²⁾	20.05±1.15 ²⁾

($P<0.05$)。与解毒通络生津方低剂量组比较,解毒通络生津方高剂量组和羟氯喹组评分评分明显降低($P<0.05$)。见表8。

表8 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺病理组织学评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on pathological sores of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	病理组织学评分/分
空白组		0.00±0.00
模型组		3.78±0.11 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	2.77±0.20
解毒通络生津方中剂量组	18	2.50±0.27 ²⁾
解毒通络生津方高剂量组	36	2.17±0.19 ^{2,3)}
羟氯喹组	0.06	2.11±0.31 ^{2,3)}

3.7 对小鼠颌下腺 FoxP3 蛋白的表达和分布的影响 免疫组化结果显示, FoxP3 蛋白表达于淋巴细胞细胞核上, 可见于细胞间质、淋巴细胞浸润灶中, 阳性表达呈棕褐色或棕黄色。从阳性面积百分比来看, 与空白组 ICR 小鼠比较, 模型组颌下腺 FoxP3 阳性面积百分比明显减少($P<0.05$); 与模型组比较, 解毒通络生津方中、高剂量组和羟氯喹组小鼠颌下腺 FoxP3 阳性面积百分比均明显上调($P<0.05$)。见表9和图2。

表9 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺 FoxP3 的阳性面积百分比的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 9 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on percentage of FoxP3 positive area in submandibular gland of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	阳性面积/%
空白组		1.14±0.14
模型组		0.11±0.00 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	0.18±0.02
解毒通络生津方中剂量组	18	0.36±0.04 ²⁾
解毒通络生津方高剂量组	36	0.49±0.08 ²⁾
羟氯喹组	0.06	0.76±0.05 ²⁾

3.8 对小鼠颌下腺 FoxP3 蛋白表达的影响 与空白组 ICR 小鼠比较, 模型组颌下腺 FoxP3 蛋白的表达明显减少($P<0.05$); 与模型组比较, 解毒通络生津方中、高剂量组和羟氯喹组小鼠颌下腺 FoxP3 蛋白的表达均明显上调($P<0.05$)。见图3和表10。

3.9 对颌下腺中 FoxP3、TNF- α mRNA 表达水平的影响 与空白组 ICR 小鼠比较, 模型组小鼠颌下腺 FoxP3 mRNA 表达明显降低($P<0.05$), TNF- α

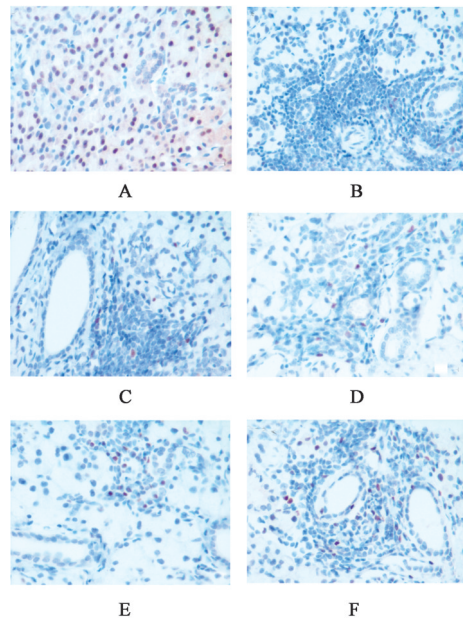


图2 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺中 FoxP3 的表达与分布的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on expression and distribution of FoxP3 in submandibular gland of mice in each group (IHC, $\times 400$)

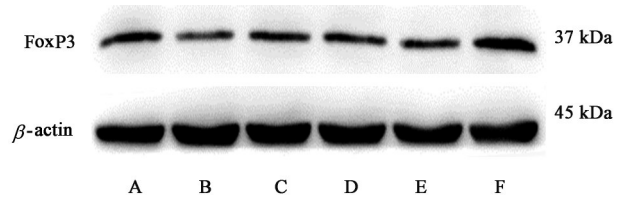


图3 各组小鼠颌下腺组织 FoxP3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of FoxP3 protein levels in submandibular gland of mice in each group

表10 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺 FoxP3 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on FoxP3 levels in submandibular gland of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	FoxP3/ β -actin
空白组		1.00±0.00
模型组		0.61±0.05 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	0.74±0.16
解毒通络生津方中剂量组	18	0.77±0.14 ²⁾
解毒通络生津方高剂量组	36	0.81±0.05 ²⁾
羟氯喹组	0.06	0.85±0.12 ²⁾

mRNA 表达明显升高($P<0.05$); 与模型组比较, 解毒通络生津方中、高剂量组 FoxP3 mRNA 表达明显升高($P<0.05$), 解毒通络生津方低、中、高剂量组和羟氯喹组 TNF- α mRNA 表达均明显降低($P<0.05$)。见表11。

表 11 解毒通络生津方对各组小鼠颌下腺 FoxP3、TNF- α mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of Jiedu Tongluo Shengjin prescription on FoxP3 and TNF- α mRNA in submandibular gland of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FoxP3	TNF- α
空白组		1.01±0.12	1.04±0.20
模型组		0.30±0.02 ¹⁾	16.52±0.98 ¹⁾
解毒通络生津方低剂量组	9	0.53±0.08	4.42±0.34 ²⁾
解毒通络生津方中剂量组	18	0.72±0.09 ²⁾	7.49±2.75 ²⁾
解毒通络生津方高剂量组	36	0.71±0.12 ²⁾	6.33±1.51 ²⁾
羟氯喹组	0.06	0.04±0.03	3.40±0.67 ²⁾

4 讨论

SS属于中医学“燥痹”范畴,燥邪损伤气血津液而致孔穴干燥,肌肤枯涩,肢体疼痛,甚则脏腑损害^[23]。燥痹的病机关键在于燥毒内犯致气血同病,“虚、毒、瘀”三者胶结为患^[24],养阴润燥兼活血、益气、清热为临床治疗常法^[25]。基于此拟定解毒通络生津方,方中以白芍为君,苦酸微寒而养血敛阴,配伍甘草酸甘化阴,配伍当归养血滋肝、清风润木,黄芪“补中气、培脾土”,使生血有源。四药相合,养肝血,补脾气,共奏养血生津之功。针对燥毒,方中使用白花蛇舌草,其性甘寒凉润避免了苦寒伤阴;针对瘀血,温通行滞之莪术配当归破血行瘀治疗血瘀诸症。全方集养血润燥、解毒清燥、祛瘀化燥之合功。该方可以改善SS模型鼠唾液腺功能,减少颌下腺组织病理损伤,减轻炎症反应^[19]。现代药理研究发现,白芍有效成分白芍总苷具有抗炎和免疫调节作用^[26],可以改善SS模型鼠的唾液流量、器官指数,减轻病理损伤和炎症反应^[27]。白花蛇舌草抗炎作用,可以抑制IL-6、TNF- α 等促炎因子的分泌^[28]。莪术可通过降低促炎因子及趋化因子的水平抑制NOD小鼠的炎症免疫反应、改善腺体分泌功能^[29]。

外分泌腺的炎症、结构破坏和功能障碍是SS主要病理基础。本研究中,SS自发模型NOD小鼠12周龄后唾液流量减少,饮水量明显增多。经解毒通络生津方灌胃治疗的NOD小鼠,其唾液流量较模型组有明显增加,且饮水量有下降趋势,并且其作用效果存在剂量依赖趋势,这表明解毒通络生津方能改善SS模型鼠的唾液腺分泌功能。同时与空白组相比,模型组颌下腺指数降低,颌下腺可见大量淋巴细胞浸润,腺泡大小不一,导管部分扩张塌陷,经解毒通络生津方治疗的NOD小鼠,颌下腺指数升高,颌下腺淋巴细胞浸润减少,腺泡导管结构未见

明显破坏,这表明解毒通络生津方可以延缓SS模型鼠的组织病理损伤。

Treg细胞功能的稳定性有利于自身免疫反应的调节,在抑制SS自身免疫炎症方面发挥重要作用^[30]。Treg细胞的不稳定性会导致持续的组织损伤和唾液腺功能障碍^[31]。促炎细胞因子的释放可以抑制Treg细胞或促使效应细胞抵抗Treg细胞介导的抑制作用^[32],IL-6和TNF- α 的协同作用可能抵消Treg的抑制功能^[33]。

SS患者唾液、血清及唾液腺组织中IL-6、TNF- α 高表达,且与唾液腺炎症浸润程度、血沉和IgG水平存在正相关^[34-36]。TNF- α 是一种多效能的细胞因子,一方面可上调唾液腺细胞表面Fas、FasL的表达,促进腺上皮细胞的凋亡。另一方面,上调黏附分子的表达从而促进炎症细胞的归巢^[37]。ZHOU等^[38]实验发现,在雌性NOD鼠发病的起始阶段予以中和抗TNF- α 抗体,能显著改善唾液分泌,减少下颌下腺中T、B细胞的数量,增加下颌下腺中正常分泌唾液所需的紧密连接蛋白-1(Claudin-1)和水通道蛋白5的表达水平。实验研究发现,新生的NOD模型鼠施用抗TNF- α 可以显著增加CD4⁺CD25⁺T细胞的数量,延迟或避免疾病的发生。TNF- α 可能通过抑制Treg细胞的表达加剧NOD模型鼠疾病的进程^[39]。IL-6和低浓度的TGF- β 联合诱导并促进Th17细胞的分化,进一步诱导分泌IL-17、IL-6、IL-21、IL-23、TNF- α 和趋化因子等多种促炎细胞因子,参与疾病进程^[40]。在IL-1协同作用下,IL-6可以通过信号转导及转录激活因子3(STAT3)抑制FoxP3的转录^[30]。IL-6存在时,TGF- β_1 可下调FoxP3,促进维甲酸相关孤核受体- γ t(ROR- γ t)的表达并分泌IL-17,使初始T细胞向辅助性Th17细胞分化,缺乏IL-6,TGF- β_1 可促进FoxP3的合成,促进Treg细胞的分化^[40]。

CANO-ORTIZ等^[35]发现,SS患者的细胞因子IL-6和TNF- α 水平显著升高的同时FoxP3 mRNA的表达显著降低。消除CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的小鼠血清细胞因子TNF- α 、IL-6和 γ 干扰素(IFN- γ)的水平显著增加^[41]。厉小梅等^[42]研究表明,SS患者唇腺及外周血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞降低,B7-H4 Ig可以上调小鼠唾液腺及脾脏中CD4⁺FoxP3⁺T细胞水平,显著下调唾液腺TNF- α 的水平,减少NOD/Ltj小鼠唾液腺中的淋巴细胞浸润^[43]。课题组前期研究发现,中药复方解毒通络生津方可以上调脾脏FoxP3⁺Treg细胞的表达,减少炎

症因子IL-2的产生^[19]。本次研究发现,模型组小鼠促炎细胞因子IL-6、TNF- α 明显高于空白组,抑炎细胞因子IL-10明显低于空白组;与模型组相比,解毒通络生津方低、中、高剂量组小鼠的炎症细胞因子IL-6、TNF- α 均下降,抑炎细胞因子IL-10均升高,此结果与显微镜下观察的颌下腺病理组织学变化即炎症细胞浸润程度的实验结果相符。进一步研究显示,模型组小鼠颌下腺组织FoxP3蛋白和mRNA表达水平均低于空白组。经过治疗后,与模型组相比,解毒通络生津方低、中、高剂量组小鼠颌下腺的FoxP3蛋白和mRNA表达水平明显提高,表明解毒通络生津方可以上调SS模型小鼠FoxP3的表达,抑制炎症细胞因子的释放,发挥抗炎、调节免疫的作用。

综上所述,解毒通络生津方能够改善SS模型鼠唾液腺分泌功能,有效抑制颌下腺免疫损伤,其作用机制可能与上调FoxP3的表达,促进Treg细胞功能的稳定性,调节炎症细胞因子的分泌,从而抑制SS全身慢性炎症进展有关。接下来本课题组将对解毒通络生津方影响Treg细胞功能的稳定性的具体途径及分子机制进一步深入研究,为该方在临床上的应用奠定理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRITO-ZERÓN P, ACAR-DENIZLI N, ZEHER M, et al. Influence of geolocation and ethnicity on the phenotypic expression of primary Sjögren's syndrome at diagnosis in 8310 patients: A cross-sectional study from the Big Data Sjögren Project Consortium [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(6):1042-1050.

[2] QIN B, WANG J, YANG Z, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(11):1983-1989.

[3] MEIJER J M, MEINERS P M, HUDDLESTON SLATER J J, et al. Health-related quality of life, employment and disability in patients with Sjogren's syndrome [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48(9):1077-1082.

[4] SINGH A G, SINGH S, MATTESON E L. Rate, risk factors and causes of mortality in patients with Sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis of cohort studies [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55:450-460.

[5] RAMOS-CASALS M, BRITO-ZERÓN P,

BOMBARDIERI S, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(1):3-18.

[6] FOX R I, FOX C M, GOTTENBERG J E, et al. Treatment of Sjögren's syndrome: Current therapy and future directions [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60(5):2066-2074.

[7] DENG G, SONG X, FUJIMOTO S, et al. Foxp3 post-translational modifications and Treg suppressive activity [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2486.

[8] WAN Y Y, FLAVELL R A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression [J]. *Nature*, 2007, 445(7129):766-770.

[9] SAKAGUCHI S, WING K, ONISHI Y, et al. Regulatory T cells: How do they suppress immune responses? [J]. *Int Immunol*, 2009, 21:1105-1111.

[10] DANIKOWSKI K M, JAYARAMAN S, PRABHAKAR B S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1):117.

[11] DOMINGUEZ-VILLAR M, HAFLER D A. Regulatory T cells in autoimmune disease. [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7):665-673.

[12] BAILEY-BUCKTROUT S L, MARTINEZ-LLORELLA M, ZHOU X, et al. Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response [J]. *Immunity*, 2013, 39(5):949-962.

[13] HOU J Q, XUE L. Challenges in Treatment of primary Sjögren's syndrome and opportunities for Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(7):483-485.

[14] LIU J, ZHOU H, LI Y, et al. Meta-analysis of the efficacy in treatment of primary sjögren's syndrome: Traditional Chinese Medicine vs Western Medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(5):596-605.

[15] WEI S J, HE Q M, ZHANG Q, et al. Traditional Chinese medicine is a useful and promising alternative strategy for treatment of Sjogren's syndrome: A review [J]. *J Integr Med*, 2021, 19(3):191-202.

[16] LI B, HOU J, YANG Y, et al. Effectiveness of traditional Chinese medicine compound JieDuTongLuoShengJin granules treatment in primary Sjögren's syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017:1315432.

[17] 杨月, 侯佳奇, 李国陵, 等. PD-1及其配体在原发性干燥综合征患者唇腺中的表达及临床意义 [J]. *临床与*

- 病理杂志, 2017, 37(3):456-461.
- [18] 王丹, 赵浩, 薛鸾, 等. 解毒通络生津颗粒联合羟基氯喹对原发性干燥综合征患者血液流变学及血清IgG、IgA、CRP水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(18):3471-3475.
- [19] 李永明, 陈玥颖, 侯佳奇, 等. 解毒通络生津方调控FoxP3⁺Treg细胞治疗干燥综合征模型NOD/Ltj小鼠的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6):125-130.
- [20] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1069-1072.
- [21] 高恩惠, 张瑞霞, 黄应峰, 等. 定量检测人血清中可溶性PD-L1蛋白浓度的方法开发及验证[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(15):1374-1380.
- [22] AOUN G, NASSEH I, BERBERI A. Evaluation of the oral component of Sjögren's syndrome: An overview [J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2016, 6(4):278-284.
- [23] 路志正, 焦树德. 实用中医风湿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:269-270.
- [24] 欧永胜, 陆静安, 薛鸾. 薛鸾运用解毒通络生津法治疗干燥综合征经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(3):394-396.
- [25] 吴子华, 黄子玮, 陈嘉琪, 等. 化湿润燥方治疗原发性干燥综合征的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20231593.
- [26] WANG C, YUAN J, WU H X, et al. Total glucosides of paeony inhibit the inflammatory responses of mice with allergic contact dermatitis by restoring the balanced secretion of pro-/anti-inflammatory cytokines [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2):325-334.
- [27] LI B, LIU G, LIU R, et al. Total glucosides of paeony (TGP) alleviates Sjogren's syndrome through inhibiting inflammatory responses in mice [J]. Phytomedicine, 2020, 71:153203.
- [28] YE J H, LIU M H, ZHANG X L, et al. Chemical profiles and protective effect of Hedyotis Diffusa Willd in lipopolysaccharide-induced renal inflammation mice [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11):27252-27269.
- [29] 孟云. 中药药术对干燥综合征模型NOD/Ltj小鼠颌下腺炎症的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [30] ALUNNO A, PETRILLO M G, NOCENTINI G, et al. Characterization of a new regulatory CD4⁺ T cell subset in primary Sjögren's syndrome [J]. Rheumatology (Oxford), 2013, 52(8):1387-1396.
- [31] KATSIFIS G E, MOUTSOPOULOS N M, WAHL S M. T lymphocytes in Sjögren's syndrome: Contributors to and regulators of pathophysiology [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2007, 32(3):252-264.
- [32] GHOSH S, ROY K, RAJALINGAM R, et al. Cytokines in the generation and function of regulatory T cell subsets in leishmaniasis [J]. Cytokine, 2021, 147:155266.
- [33] KORN T, REDDY J, GAO W, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation [J]. Nat Med, 2007, 13(4):423-431.
- [34] ZHOU X, BAILEY-BUCKTROUT S L, JEKER L T, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo* [J]. Nat Immunol, 2009, 10(9):1000-1007.
- [35] CANO-ORTIZ A, LABORDA-ILLANES A, PLAZA-ANDRADES I, et al. Connection between the gut microbiome, systemic inflammation, gut permeability and FOXP3 expression in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22):8733.
- [36] JIN F, HU H, XU M, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for autoimmune diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9:2381.
- [37] 刘蕾. 细胞因子在干燥综合征中作用研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41(22):2855-2859.
- [38] ZHOU J, KAWAI T, YU Q. Pathogenic role of endogenous TNF- α in the development of Sjögren's-like sialadenitis and secretory dysfunction in non-obese diabetic mice [J]. Lab Invest, 2017, 97(4):458-467.
- [39] WU AVA J, HUA HONG, MUNSON SIBYL HET al. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4⁺CD25⁺T cell levels in NOD mice. [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99:12287-92.
- [40] SANDQUIST I, KOLLS J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells [J]. F1000Res, 2018, 7:205.
- [41] JIN F, HU H, XU M, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for autoimmune diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9:2381.
- [42] 厉小梅, 李向培, 钱龙, 等. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在干燥综合征患者外周血和唇腺组织的表达[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(15):1034-1037.
- [43] ZHENG X, WANG Q, YUAN X, et al. B7-H4 inhibits the development of primary Sjögren's syndrome by regulating treg differentiation in NOD/Ltj mice [J]. J Immunol Res, 2020, 2020:4896727.

[责任编辑 王鑫]