

梓醇干预PKM2/LDHA表达调控Th17细胞分化的机制研究^Δ

葛玉*,陈雪,王福荣,包宇杰,丁鹏,周玲玲[#](南京中医药大学药学院,南京 210023)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)01-0015-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.01.03



摘要 目的 研究梓醇通过干预丙酮酸激酶M2(PKM2)、乳酸脱氢酶A(LDHA)表达进而影响辅助性T细胞17(Th17)分化的机制。方法 从C57BL/6小鼠脾脏中分出naive CD4⁺T细胞,通过加入定向分化刺激剂诱导72 h使naive CD4⁺T细胞向Th17细胞分化。在诱导分化的同时,分别用0(定向对照)、20、40、80 μg/mL梓醇对细胞进行处理。采用流式细胞术检测细胞中Th17细胞分化比例,采用比色法检测细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平,采用实时荧光定量-逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测细胞中视黄酸相关孤儿受体γt(RORγt)、PKM2、LDHA mRNA表达情况,采用Western blot法检测细胞中PKM2、LDHA、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白表达情况。结果 与定向对照组比较,经20、40、80 μg/mL梓醇作用72 h后,细胞中Th17细胞分化比例分别降低了6.74%、8.41%、9.24%;细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平,细胞中PKM2、LDHA、RORγt mRNA表达水平以及细胞中PKM2、LDHA蛋白表达水平和STAT3磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。结论 梓醇可通过下调PKM2、LDHA表达来降低糖酵解水平,进而抑制Th17细胞分化。

关键词 梓醇;糖酵解;辅助性T细胞17;丙酮酸激酶M2;乳酸脱氢酶A

Mechanism of catalpol regulating Th17 cell differentiation by interfering PKM2/LDHA expression

GE Yu, CHEN Xue, WANG Furong, BAO Yujie, DING Peng, ZHOU Lingling (School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of catalpol affecting the differentiation of helper T cell 17 (Th17) by interfering the expressions of pyruvate kinase M2 (PKM2) and lactate dehydrogenase A (LDHA). **METHODS** The naive CD4⁺ T cells were selected from the spleen of C57BL/6 mice, and were differentiated into Th17 cells by adding directional differentiation stimulants for 72 hours. At the same time, the cells were treated with 0 (directed control), 20, 40 and 80 μg/mL catalpol. The flow cytometry was used to detect the proportion of Th17 cell differentiation in cells; the colorimetric method was adopted to detect the levels of pyruvate and lactate in cell culture supernatant; mRNA expressions of retinoid-related orphan nuclear receptor gamma t (RORγt), PKM2 and LDHA were detected by qRT-PCR method; Western blot was used to detect the expression levels of PKM2, LDHA, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) proteins in cells. **RESULTS** Compared with the directed control group, after 72 hours of treatment with 20, 40, 80 μg/mL catalpol, the differentiation ratio of Th17 cells were decreased by 6.74%, 8.41%, 9.24%, and the levels of pyruvate and lactate in the cell culture supernatant, the mRNA expressions of PKM2, LDHA and RORγt as well as the protein expressions of PKM2 and LDHA and the phosphorylation of STAT3 were significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Catalpol can reduce the glycolysis level by down-regulating the expressions of PKM2 and LDHA, thereby inhibiting the differentiation of Th17 cells.

KEYWORDS catalpol; glycolysis; helper T cell 17; pyruvate kinase M2; lactate dehydrogenase A

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为主的慢性自身免疫性疾病,也可伴有关

节外表现,多发于女性,在中国大陆地区的发病率为0.42%^[1]。至今,RA的病因尚未完全阐明,其病理机制仍在深入研究中。辅助性T细胞17(helper T cell 17, Th17)是CD4⁺T细胞的主要亚群之一,可介导组织和器官的慢性炎症和继发性衰竭^[2]。研究显示,Th17细胞会通过分泌炎症因子[如白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)]加剧炎症反应,其过度分化会促进多种慢性炎

^Δ基金项目 国家自然科学基金面上项目(No.82174306)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:免疫药理学。E-mail: 2380189936@qq.com

[#] 通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:免疫药理学、中药药理学。电话:025-5811933。E-mail:llzhou74@163.com

症性和自身免疫性疾病的发生发展,如多发性硬化症、炎症性肠病、RA等^[3-4]。Th17细胞在分化形成及功能执行过程中的代谢模式趋向于糖酵解,故抑制CD4⁺T细胞的糖酵解能有效减少Th17细胞的形成^[5]。

丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)是糖酵解最后一个步骤的限速酶,在糖酵解过程中起着重要的作用^[6]。研究显示,PKM2在活化的CD4⁺T细胞中显著上调,其是促炎性Th17细胞分化所必需的物质^[6]。乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)是糖酵解最后一个步骤中的关键酶,可催化丙酮酸转化为乳酸,而在RA期间,乳酸积累可抑制炎症免疫反应^[7]。

地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根,前者习称“鲜地黄”,后者习称“生地黄”。生地黄清热凉血、养阴生津,可用于治疗热入营血、热病伤阴、津伤便秘、阴虚发热等证。梓醇是生地黄中的主要活性成分,属于环烯醚萜苷类化合物,具有抗氧化、抗炎、调控葡萄糖稳态、改善糖代谢、抑制肿瘤能量代谢的功能^[8]。本课题组前期研究发现,梓醇可明显下调胶原诱导关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型小鼠Th17细胞的分化及分泌活性,改善Th17细胞异常分化,减少炎症因子分泌,进而改善CIA小鼠关节炎^[9]。该结果提示,梓醇可能通过介导Th17细胞的生成来缓解RA病情。此外,本课题组前期研究还发现,梓醇能够显著影响CD4⁺T细胞中糖酵解代谢产物水平^[10]。据此,本研究在前期研究基础上,拟进一步建立Th17细胞体外分化模型,探讨梓醇通过干预PKM2/LDHA表达影响Th17细胞糖酵解,从而调控细胞分化的可能机制,为发现RA等慢性复杂性疾病新的治疗策略提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Gallios分析型流式细胞仪购自美国Beckman公司;Roche LightCycler96型实时荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司;M200Pro型酶标仪购自瑞士Tecan公司;Bio-RAD ChemiDoc XRS+型成像系统购自美国Bio-Rad公司;Micro 21R型高速冷冻离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司;autoMACS Pro型全自动磁珠分选仪购自德国Miltenyi公司。

1.2 主要药品与试剂

梓醇对照品(批号J07GB150957,纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;小鼠naive CD4⁺T细胞分选试剂盒、MACS分选缓冲液、LS柱(批号分别为5221105782、7211100380、5220124006)均购自德国Miltenyi公司;通用型高灵敏度染料法定量PCR检测试剂

盒、预混液形式的高效RT-PCR试剂(批号分别为027E2232EA、7E703F3)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Leukocyte Activation Cocktail抗体(批号2026781)购自上海优宁维生物科技股份有限公司;BD细胞固定/渗透试剂、BD渗透/洗涤试剂、白细胞介素-17A-藻红蛋白(interleukin-17A-phycoerythrin, IL-17A-PE)抗体(批号分别为1361481、2028447、2017782)均购自美国BD Pharmingen公司;荧光素标记的CD4-FITC抗体(批号2410094)购自美国EB公司;丙酮酸测试盒、乳酸测试盒(批号分别为20230213、20230211)均购自南京建成生物工程研究所;兔源PKM2、磷酸化信号转导和转录激活因子3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)、STAT3单克隆抗体(批号分别为4053T、9145T、12640S)均购自美国CST公司;兔源LDHA单克隆抗体(批号00102198)购自美国Three Eagles公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号12w2944)购自美国Affinity Biosciences公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号234750512)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为6~8周龄的SPF级健康雄性C57BL/6小鼠,共10只,购自杭州医学院,实验动物生产许可证号为SCXK(浙)2019-0002。实验动物购入后在南京中医药大学实验动物中心饲养,饲养期间自由摄食、饮水,遵循自然昼夜节律。饲养中心室温为(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为40%~60%。南京中医药大学动物伦理委员会审核并批准了本研究所有动物实验操作,伦理编号为202103A010。

2 方法

2.1 小鼠naive CD4⁺T细胞分选

取健康C57BL/6小鼠,将其脱颈椎处死,置于预定量的75%乙醇中浸泡至少15 min。在无菌环境下解剖小鼠,取脾脏制备单个核细胞悬液,按照naive CD4⁺T细胞分选试剂盒说明书操作,依次加入MACS分选缓冲液、Biotin-Antibody Cocktail磁珠,于4 $^{\circ}$ C条件下避光孵育5 min。随后依次加入MACS分选缓冲液、Anti-Biotin磁珠、CD44磁珠,于4 $^{\circ}$ C条件下避光孵育10 min,每隔5 min吹弹1次。打开autoMACS全自动磁珠分选仪,设置阴性选择程序,将上述含免疫磁珠的细胞悬液加到LS柱中,收集柱下流出的液体。重复上述分选操作3次,合并分选液后离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清,用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基重悬并计数naive CD4⁺T细胞,调整细胞密度为(0.5~1) $\times 10^6$ 个/mL。

2.2 Th17细胞分化模型的建立及分组处理

2.2.1 Th17细胞分化模型的建立

将分选后的naive CD4⁺ T细胞培养于含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,分别以 2×10^5 个/孔的密度接种于24孔板中[24孔板中应提前4 h包被终质量浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CD3抗体和抗CD28抗体(每孔总体积1 mL)]。实验设Th0组、Th24组、Th48组和Th72组,每组设3个复孔。Th24组、Th48组、Th72组每孔均分别加入定向分化刺激剂白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、IL-23、转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)至其终质量浓度分别为25、20、5 ng/mL,并于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂环境下分别培养24、48、72 h,以诱导naive CD4⁺ T细胞向Th17细胞分化;Th0组细胞不进行极化处理。采用流式细胞术检测naive CD4⁺ T细胞中Th17细胞分化比例。

2.2.2 梓醇给药后Th17细胞的分组及处理

将分选后的naive CD4⁺ T细胞培养于含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,分别以 2×10^5 个/孔的密度接种于24孔板中[24孔板中应提前4 h包被终质量浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CD3抗体和抗CD28抗体(每孔总体积1 mL)]。实验设对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和梓醇20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组(浓度参考文献[11]和本课题组前期预实验结果设置),每组设9个复孔。每孔分别加入定向分化刺激剂IL-6、IL-23、TGF- β 至其终质量浓度分别为25、20、5 ng/mL,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂环境下培养72 h。取每组的3个复孔,用于细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平和Th17细胞分化比例检测;另取每组的3个复孔,用于细胞中PKM2、LDHA、视黄酸相关孤儿受体 γt (retinoid-related orphan nuclear receptor gamma t, ROR γt) mRNA表达的检测;取各组剩下的3个复孔,用于细胞中PKM2、LDHA、STAT3、p-STAT3蛋白表达水平的检测。

2.3 Th17细胞分化比例检测

采用流式细胞术检测Th17细胞分化比例。分别取“2.2.1”“2.2.2”项下处理后细胞,按细胞量每孔分别加入Leukocyte Activation Cocktail抗体,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂环境下继续孵育4 h。收集细胞并用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)清洗1次。加入1 μL CD4-FITC抗体室温避光孵育30 min,以PBS清洗;加入1 mL BD细胞固定/渗透试剂室温避光孵育20 min后,用1 mL BD渗透/洗涤试剂清洗;加入2 μL IL-17A-PE流式抗体室温避光孵育40 min后,用1 mL BD渗透/洗涤试剂清洗;加入500 μL PBS重悬细胞(细胞密度为 2×10^5 个/mL),置于流式细胞仪上检测Th17细胞分化比例,并使用Flow Jo V10软件进行结果分析。

2.4 细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平检测

采用比色法检测细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平。取“2.2.2”项下处理后细胞,收集培养基的上清液,严格按相应试剂盒说明书操作,测定细胞培养上清液中糖酵解代谢产物丙酮酸、乳酸水平。

2.5 细胞中ROR γt 、PKM2、LDHA mRNA表达检测

采用实时荧光定量-逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测细胞中ROR γt 、PKM2、LDHA mRNA表达。取“2.2.2”项下处理后细胞,采用Trizol法提取细胞中总RNA,逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系(共20 μL)如下:ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.4 μL ,cDNA模板2 μL ,焦碳酸二乙酯水7.2 μL 。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因mRNA的表达量。引物序列采用Primer 5.0软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详细信息见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
LDHA	上游:CTGTGGCAGACTTGCGTGAGAG	156
	下游:TCACCTTCACAACATCCGAGATTCC	
ROR γt	上游:ACAAATTGAAGTATCCCTTGC	127
	下游:GGAGTAGGCCACATTACACTG	
PKM2	上游:TGTCTGGAGAAACAGCCAAG	105
	下游:CGAATAGCTGCAAGTGTGAGA	
GAPDH	上游:AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	123
	下游:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

2.6 细胞中PKM2、LDHA、STAT3、p-STAT3蛋白表达检测

采用Western blot法检测细胞中PKM2、LDHA、STAT3、p-STAT3蛋白表达情况。收集“2.2.2”项下处理后细胞,加入适量蛋白裂解液试剂(含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂)在冰上裂解30 min,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以12 000 r/min离心30 min,分离上清,采用BCA法检测上清液中总蛋白浓度,并将蛋白进行高温变性。取20 μg 变性蛋白进行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压150 V,电泳时间60 min)分离,电泳完成后转移至0.45 μm PVDF膜(转膜电流400 mA,转膜时间60 min)上,然后用5%牛血清白蛋白溶液室温封闭1 h;洗膜后分别加入PKM2、LDHA、STAT3、p-STAT3、 β -actin一抗(稀释度分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用TBST缓冲液洗膜3次,加入二抗(稀释度为1:20 000),室温孵育1 h;用TBST缓冲液洗膜3次,采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色系统检测目的蛋白的表达情况,采用Image Lab软件进行灰度

值分析。以目标蛋白与内参 β -actin蛋白条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达量,以p-STAT3与STAT3蛋白条带灰度值的比值表示STAT3的磷酸化水平,所有结果均以对照组为标准作归一化处理。

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件对结果进行统计分析和作图。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步的组间两两比较采用Dunnett's *t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 体外Th17细胞分化模型的构建情况

与Th0组[(2.53 ± 0.48)% , $n=3$]比较, Th24组、Th48组、Th72组细胞中Th17细胞分化比例[分别为(4.51 ± 0.68)%、(9.86 ± 0.56)%、(18.80 ± 0.70)% , $n=3$]均显著升高($P<0.05$),且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见图1。

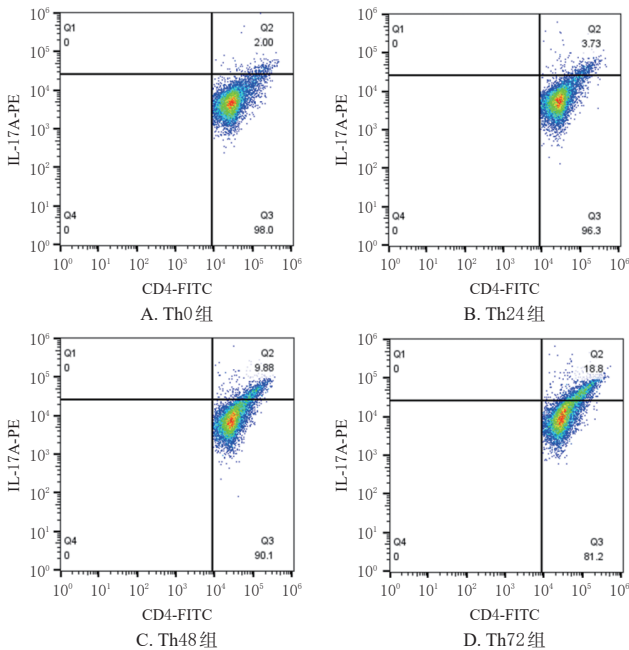


图1 体外诱导后细胞中Th17细胞分化比例检测的流式细胞图

3.2 梓醇对Th17细胞分化的影响

经处理72 h后,与对照组[(16.70 ± 1.41)% , $n=3$]比较,梓醇20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞中Th17细胞分化比例[(9.96 ± 1.33)%、(8.29 ± 1.07)%、(7.46 ± 1.31)% , $n=3$]均显著降低($P<0.05$),且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见图2。

3.3 梓醇对细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸的影响

经处理72 h后,与对照组比较,梓醇20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞培养上清液中丙酮酸、乳酸水平均显著降低($P<0.05$),且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见表2。

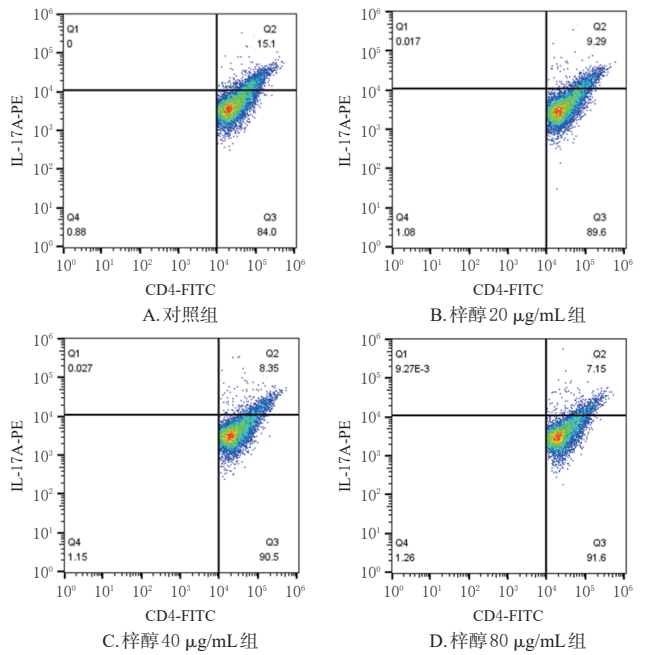


图2 梓醇处理后细胞中Th17细胞分化比例检测的流式细胞图

表2 各组细胞培养上清液中丙酮酸和乳酸水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	丙酮酸($\mu\text{mol/L}$)	乳酸(mmol/L)
对照组	0.114 ± 0.000	2.85 ± 0.03
梓醇20 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.109 ± 0.002 ^a	2.20 ± 0.02 ^a
梓醇40 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.105 ± 0.001 ^a	1.55 ± 0.05 ^a
梓醇80 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.099 ± 0.001 ^a	0.82 ± 0.02 ^a

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.4 梓醇对细胞中PKM2、LDHA、ROR γ t mRNA表达的影响

经处理72 h后,与对照组比较,梓醇20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞中PKM2、LDHA、ROR γ t mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$),且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见表3。

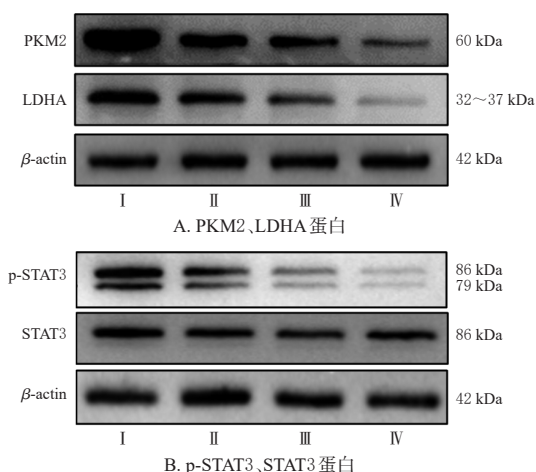
表3 各组细胞中PKM2、LDHA、ROR γ t mRNA表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PKM2 mRNA	LDHA mRNA	ROR γ t mRNA
对照组	1.01 ± 0.04	1.02 ± 0.04	1.03 ± 0.06
梓醇20 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.75 ± 0.03 ^a	0.76 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.02 ^a
梓醇40 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.65 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.03 ^a	0.60 ± 0.01 ^a
梓醇80 $\mu\text{g/mL}$ 组	0.52 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.08 ^a

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.5 梓醇对细胞中PKM2、LDHA、p-STAT3和STAT3蛋白表达的影响

经处理72 h后,与对照组比较,梓醇20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞中PKM2、LDHA蛋白表达水平及STAT3磷酸化水平均显著降低($P<0.05$),且具有一定的浓度依赖性趋势。结果见图3、表4。



I : 对照组; II : 梓醇20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; III : 梓醇40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; IV : 梓醇80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。

图3 各组细胞中PKM2、LDHA、p-STAT3和STAT3蛋白表达的电泳图

表4 各组细胞中PKM2、LDHA蛋白表达和STAT3磷酸化水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PKM2/ β -actin	LDHA/ β -actin	p-STAT3/STAT3
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
梓醇20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.76 \pm 0.06 ^a	0.80 \pm 0.03 ^a	0.66 \pm 0.09 ^a
梓醇40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.63 \pm 0.02 ^a	0.62 \pm 0.04 ^a	0.48 \pm 0.07 ^a
梓醇80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.53 \pm 0.03 ^a	0.39 \pm 0.05 ^a	0.37 \pm 0.05 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

体外联合使用抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激T细胞,模拟T细胞活化的双信号作用,是进行T细胞激活与扩增的最普遍的方法。IL-23对Th17细胞的生长、维持具有重要意义,IL-23受体在活化的Th17细胞中表达上调^[12]。而IL-6、TGF- β 是Th17分化的关键细胞因子;IL-6可通过STAT3信号通路促进Th17转录调节因子的表达,从而使CD4⁺T细胞定向分化为Th17谱系^[12]。因此,本研究在建立Th17细胞分化模型时,选择IL-6、IL-23以及低浓度的TGF- β 作为刺激因子。研究结果表明,培养72 h可使该模型中Th17细胞达到可观的分化比例,说明体外诱导Th17细胞定向分化模型造模成功,为后续实验研究确定了体外诱导Th17细胞分化、培养的条件。进一步分组实验显示,与对照组比较,梓醇20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞中Th17细胞分化比例显著降低,表明梓醇可抑制Th17细胞分化与分泌活性。上述结果与本课题组前期动物实验结果一致^[9],但其具体机制仍需探索。

丙酮酸激酶(pyruvate kinases, PKs)是葡萄糖代谢过程涉及的一个重要酶,其将腺苷二磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸不可逆转地催化为腺苷三磷酸和丙酮酸。在低氧环境下,丙酮酸被细胞质中的LDH发酵成乳酸,并将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleo-

tide, NADPH)转化为NAD⁺^[13]。由此可知,丙酮酸是糖酵解途径的目标产物,更是细胞代谢的枢纽物质;并且在缺氧的条件下会发酵生产终产物乳酸,完成糖酵解全过程。因此,丙酮酸和乳酸的水平可较好地反映细胞糖酵解水平。本研究发现,经梓醇处理72 h后,细胞中糖酵解产物丙酮酸、乳酸的分泌水平均降低,且具有一定的浓度依赖性趋势,这提示梓醇可下调Th17分化过程中的细胞糖酵解。

PKM2是PKs的一种同工酶,通常在增殖细胞和肿瘤细胞中过表达,主要功能是调节糖酵解和瓦氏效应(Warburg effect)^[9]。PKM2在活化的CD4⁺T细胞中的表达显著上调,这有助于糖酵解途径进入发酵和乳酸形成的方向^[14],是Th17细胞分化所必需的物质^[6]。以往研究显示,PKM2与Th17细胞分化呈正相关,沉默或药理抑制PKM2可减少细胞糖酵解和在体外向Th17细胞分化,而过表达PKM2可恢复Th17细胞分化^[15]。LDHA是LDH的一种亚基,负责将丙酮酸转化成乳酸,其在RA患者的滑膜组织中表达上调,诱导Th17细胞亚群极化;LDHA能催化糖酵解产物丙酮酸转化为乳酸,修复氧化还原平衡,对Th17细胞的致病性分化至关重要^[16]。在富乳酸环境中,效应细胞因子IL-17表达上调,Th17细胞效应功能增强。由于RA关节滑膜腔是一个相对缺氧的局部微环境,导致CD4⁺T细胞从氧化磷酸化向糖酵解的代谢转换,这也意味着滑膜腔内倾向于乳酸积累,进而诱导CD4⁺T细胞向致炎性的Th17细胞亚群持续分化,加重滑膜炎^[17]。通过调节PKM2介导的糖酵解抑制Th17细胞分化,以及通过抑制LDHA表达来降低糖酵解通量,从而减少病灶乳酸堆积可能是治疗RA这一类自身免疫性疾病的有效策略。本研究检测了梓醇对Th17细胞分化比例及细胞中PKM2、LDHA蛋白表达的影响,结果发现,不同质量浓度梓醇均可显著降低细胞中Th17细胞分化比例,并可下调细胞中PKM2、LDHA的表达,这提示梓醇抑制Th17细胞分化的作用可能是通过抑制PKM2和LDHA的表达来实现的。

STAT3信号对Th17细胞的发育至关重要。Th17细胞分化受IL-6/IL-23信号介导的STAT3磷酸化调控,STAT3激活(即STAT3发生磷酸化)可导致Th17特异性转录因子ROR γ t的表达;同时,ROR γ t在应答STAT3的过程中又会促进Th17细胞分化和细胞因子表达,进而诱导炎症发生^[18]。据文献报道,PKM2可促使STAT3发生磷酸化,进而诱导IL-17的表达,而IL-17是Th17细胞分泌的最重要的效应物^[19]。因此,本研究还检测了梓醇对细胞中STAT3磷酸化水平以及ROR γ t mRNA表达的影响,结果发现,梓醇下调了细胞中STAT3磷酸化水平

和ROR γ t mRNA的表达。

综上所述,梓醇可通过调控PKM2、LDHA表达,下调糖酵解产物丙酮酸、乳酸水平,进而干预Th17细胞分化。本研究结果为梓醇在治疗Th17细胞介导的炎症性疾病中的应用提供了理论基础,为进一步的药物和机制研究提供了线索,也为临床上RA等自身免疫性疾病提供了新的治疗思路,但其具体作用机制仍需深入探讨。

参考文献

- [1] 童荣生. 生物制剂治疗类风湿关节炎合理用药中国专家共识[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(21): 2174-2184.
TONG R S. Chinese expert consensus on rational use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Chin J N Drugs, 2022, 31(21): 2174-2184.
- [2] PARK H, LI Z X, YANG X O, et al. A distinct lineage of CD4⁺ T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [3] YANG P, QIAN F Y, ZHANG M F, et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis[J]. J Leukoc Biol, 2019, 106(6): 1233-1240.
- [4] MILOVANOVIC J, ARSENIJEVIC A, STOJANOVIC B, et al. Interleukin-17 in chronic inflammatory neurological diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11: 947.
- [5] 庞文翼. PKM2调节糖酵解和细胞外基质沉积促进CTEPH血管重构的实验研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2021.
PANG W Y. PKM2 regulates glycolysis and extracellular matrix to promote CTEPH vascular remodeling[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2021.
- [6] CAI W W, YU Y, ZONG S Y, et al. Metabolic reprogramming as a key regulator in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Inflamm Res, 2020, 69(11): 1087-1101.
- [7] PUCINO V, BOMBARDIERI M, PITZALIS C, et al. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity[J]. Eur J Immunol, 2017, 47(1): 14-21.
- [8] 朱珏, 朱香梅, 石雨荷, 等. 地黄的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中药材, 2022, 45(5): 1273-1281.
ZHU J, ZHU X M, SHI Y H, et al. Research progress of *Rehmannia glutinosa* and prediction and analysis of its quality markers[J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(5): 1273-1281.
- [9] 钱飞亚, 杨培, 张明菲, 等. 滋肾通络方对胶原性关节炎小鼠Th17/Treg细胞分化及平衡的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 720-726.
QIAN F Y, YANG P, ZHANG M F, et al. Effect of ZishenTongluo formula on differentiation and balance of Th17/Treg cells in collagen-induced arthritis[J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(5): 720-726.
- [10] 申美玉, 荣秋妮, 狄昱希, 等. 梓醇调控miR-143-3p干预Th17糖酵解和细胞分化的机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(7): 1072-1081.
SHEN M Y, RONG Q N, DI Y X, et al. Mechanisms of catalpol inhibiting differentiation and glycolysis of Th17 cells through miR-143-3p[J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(7): 1072-1081.
- [11] WANG Z H, ZHAN-SHENG H. Catalpol inhibits migration and induces apoptosis in gastric cancer cells and in athymic nude mice[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1708-1719.
- [12] PENG H Y, WANG L Q, DAS J K, et al. Control of CD4⁺ T cells to restrain inflammatory diseases via eukaryotic elongation factor 2 kinase[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 415.
- [13] URBAŃSKA K, ORZECZOWSKI A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2085.
- [14] 雷明. 烟酰胺磷酸核糖转移酶和磷酸丙糖异构酶1在类风湿关节炎中的作用及机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2022.
LEI M. Research on the role and mechanism of nicotinamide phosphoribosyltransferase and triosephosphate isomerase 1 in rheumatoid arthritis[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2022.
- [15] SHEN M Y, WANG X, DI Y X, et al. Triptolide inhibits Th17 differentiation via controlling PKM2-mediated glycolysis in rheumatoid arthritis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(6): 838-849.
- [16] WANG G, SU Z H, LI H, et al. The role of metabolism in Th17 cell differentiation and autoimmune diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 103: 108450.
- [17] SHEN H X, SHI L Z. Metabolic regulation of T(H)17 cells [J]. Mol Immunol, 2019, 109: 81-87.
- [18] KUMAR R, THEISS A L, VENUPRASAD K. ROR γ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation [J]. Trends Immunol, 2021, 42(11): 1037-1050.
- [19] KIM H, LEE H J, SIM D Y, et al. The antitumor effect of cinnamaldehyde derivative CB-PIC in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of pyruvate and STAT3 signaling [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6461.
(收稿日期: 2023-07-15 修回日期: 2023-12-05)
(编辑: 林静)