分类号： 密级：

ＵＤＣ： 编号：

**学 位 论 文**

**β 肾上腺素受体信号对佐剂性关节炎大鼠树突细胞及成纤维样滑膜细胞的影响**

**The effects of β-adrenoceptor signal on dendritic cells and fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats.**

**吴华勋**

指导老师姓名 魏伟 教授 安徽医科大学临床药理研究所

抗炎免疫药物教育部重点实验室 申请学位级别 博 士 专 业 名 称 药 理 学 提交论文日期 2014-03 论文答辩日期 2014-05 学位授予单位和日期 安徽医科大学

答辩委员会主席 教授 评 阅 人 教授等

**2014 年 3 月**

**安徽医科大学**

**ANHUI MEDICAL UNIVERSITY**

**博 士 学 位 论 文**

论 文 题 目 β 肾上腺素受体信号对佐剂性关节炎大鼠树突细胞及成纤维样滑膜细胞的影响

**The effects of β-adrenoceptor signal on dendritic cells and fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats**

**作 者 姓 名** 吴华勋

**指 导 老 师** 魏 伟 教授

**学 科 专 业** 药理学

**研 究 方 向** 抗炎免疫药理学

**论文工作时间** 2012 年 5 月至 2014 年 1 月

本课题受国家自然科学基金(No. 81173075, 81330081, 81302784)，安徽省科技攻关重点项目（1301042098）、教育部博士点基金（20123420110003）；安徽省高校自然科学基金（KJ2011Z181，KJ2011Z180）资助；抗炎免疫药物安徽省工程技术研究中心，抗炎免疫药物教育部重点实验室的支持。

学位论文独创性声明

本人所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 日 期：

学位论文使用授权声明

本人完全了解安徽医科大学有关保留、使用学位论文的规定：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索， 有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。愿意将本人的学位论文提交《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》和《中国学位论文全文数据库》中全文发表，并可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版， 并同意编入 **CNKI**《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名： 导师签名：

日期： 日期：

目 录

[中文摘要](#_Toc686663010) 8

**[Abstract](#_Toc686663011)** 9

[前言](#_Toc686663012) 10

**[1](#_Toc686663013)** [实验材料](#_Toc686663013) 11

**[1.1](#_Toc686663014)** [动物](#_Toc686663014) 11

**[1.2](#_Toc686663015)** [药物与试剂](#_Toc686663015) 11

**[1.3](#_Toc686663016)** [仪器与设备](#_Toc686663016) 11

**[2](#_Toc686663017)** [实验方法](#_Toc686663017) 12

**[2.1](#_Toc686663018)****[DCs](#_Toc686663018)**[的分离与培养](#_Toc686663018)[[46]](#_Toc686663018)**[:](#_Toc686663018)** 12

**[2.2](#_Toc686663019)****[DCs](#_Toc686663019)**[的鉴定](#_Toc686663019) 12

**[2.2.1](#_Toc686663020)** [形态学鉴定](#_Toc686663020)**[:](#_Toc686663020)** 12

**[2.2.2](#_Toc686663021)** [流式细胞术对](#_Toc686663021)**[DCs](#_Toc686663021)**[细胞表型的鉴定](#_Toc686663021) 12

**[2.3](#_Toc686663022)** [对](#_Toc686663022)**[DCs](#_Toc686663022)**[的干预](#_Toc686663022) 12

**[2.4](#_Toc686663023)****[DCs](#_Toc686663023)**[的表型及功能检测](#_Toc686663023) 12

**[2.4.1](#_Toc686663024)** [骨髓源](#_Toc686663024)**[DCs](#_Toc686663024)**[表型的检测](#_Toc686663024) 12

**[2.4.2](#_Toc686663025)** [大鼠肠系膜淋巴结](#_Toc686663025)**[DCs](#_Toc686663025)**[表型的检测](#_Toc686663025) 12

[2.4.3](#_Toc686663026) **[DCs](#_Toc686663026)**[抗原摄取功能的检测](#_Toc686663026)[[47]](#_Toc686663026) 12

**[2.4.4](#_Toc686663027)****[DCs](#_Toc686663027)**[分泌](#_Toc686663027)**[IL-10](#_Toc686663027)**[水平的检测](#_Toc686663027) 13

[2.4.5 混合淋巴细胞反应（](#_Toc686663028)**[MLR](#_Toc686663028)**[）](#_Toc686663028)[[48]](#_Toc686663028) 13

[2.5 大鼠](#_Toc686663029)**[AA](#_Toc686663029)**[模型的制备](#_Toc686663029)[[49]](#_Toc686663029) 13

**[2.6](#_Toc686663030)** [实验分组及给药方法](#_Toc686663030) 13

[2.7 大鼠足爪肿胀度测定](#_Toc686663031)[[50]](#_Toc686663031) 13

[2.8 关节病理学观察[51]](#_Toc686663032) 13

**[2.9](#_Toc686663033)** [胸腺指数、脾脏指数的测定](#_Toc686663033) 13

[2.10 淋巴细胞增殖反应的检测](#_Toc686663034)[[52]](#_Toc686663034) 13

[2.11 大鼠](#_Toc686663035)**[FLS](#_Toc686663035)**[的分离培养](#_Toc686663035)[[53]](#_Toc686663035) 13

**[2.12](#_Toc686663036)****[FLS](#_Toc686663036)**[增殖、分泌功能的检测](#_Toc686663036) 13

**[2.12.1](#_Toc686663037)****[FLS](#_Toc686663037)**[增殖反应的测定](#_Toc686663037) 13

**[2.12.2](#_Toc686663038)****[FLS](#_Toc686663038)**[分泌细胞因子水平的检测](#_Toc686663038) 13

**[2.13](#_Toc686663039)****[FLS](#_Toc686663039)**[内](#_Toc686663039)**[cAMP](#_Toc686663039)**[水平的检测](#_Toc686663039) 13

**[2.14](#_Toc686663040)** [流式细胞术检测](#_Toc686663040)**[FLS](#_Toc686663040)**[细胞表面β](#_Toc686663040)**[2-AR](#_Toc686663040)**[的表达](#_Toc686663040) 13

**[2.15](#_Toc686663041)** [免疫组化法检测](#_Toc686663041)**[DCs](#_Toc686663041)**[和](#_Toc686663041)**[FLS](#_Toc686663041)**[上β](#_Toc686663041)**[2-AR](#_Toc686663041)**[的表达](#_Toc686663041) 14

**[2.15.1](#_Toc686663042)****[DCs](#_Toc686663042)**[细胞涂片的制作](#_Toc686663042) 14

**[2.15.2](#_Toc686663043)****[FLS](#_Toc686663043)**[细胞爬片的制作](#_Toc686663043) 14

**[2.15.3](#_Toc686663044)** [免疫组化的步骤](#_Toc686663044) 14

**[2.16](#_Toc686663045)** [免疫荧光法检测](#_Toc686663045)**[FLS](#_Toc686663045)**[细胞表面β](#_Toc686663045)**[2-AR](#_Toc686663045)**[的表达](#_Toc686663045) 14

**[2.16.1](#_Toc686663046)** [免疫荧光法](#_Toc686663046)**[FLS](#_Toc686663046)**[细胞的获取](#_Toc686663046) 14

**[2.16.2](#_Toc686663047)** [免疫荧光步骤](#_Toc686663047) 14

[2.17](#_Toc686663048) **[Western blot](#_Toc686663048)**[法检测β](#_Toc686663048)**[2-AR](#_Toc686663048)**[、](#_Toc686663048)**[GRK2](#_Toc686663048)**[、β](#_Toc686663048)**[-arrestin2](#_Toc686663048)**[、](#_Toc686663048)**[p-ERK](#_Toc686663048)**[的表达](#_Toc686663048)[[54]](#_Toc686663048) 14

**[2.17.1](#_Toc686663049)** [大鼠](#_Toc686663049)**[DCs](#_Toc686663049)**[样品的制备及蛋白质的提取](#_Toc686663049) 14

**[2.17.2](#_Toc686663050)** [大鼠](#_Toc686663050)**[FLS](#_Toc686663050)**[样品的制备及蛋白质的提取](#_Toc686663050) 14

**[2.17.3](#_Toc686663051)** [大鼠](#_Toc686663051)**[DCs](#_Toc686663051)**[和](#_Toc686663051)**[FLS](#_Toc686663051)**[胞膜蛋白的分离](#_Toc686663051) 14

**[2.17.4](#_Toc686663052)** [蛋白质样本的定量（](#_Toc686663052)**[Lowry](#_Toc686663052)**[法）](#_Toc686663052) 14

**[2.17.5](#_Toc686663053)****[western blot](#_Toc686663053)**[的操作步骤](#_Toc686663053) 15

**[2.18](#_Toc686663054)** [实时荧光定量](#_Toc686663054)**[PCR](#_Toc686663054)**[（](#_Toc686663054)**[QRT-PCR](#_Toc686663054)**[）法检测](#_Toc686663054)**[DCs](#_Toc686663054)**[上β](#_Toc686663054)**[2-AR mRNA](#_Toc686663054)**[、](#_Toc686663054)**[GRK2](#_Toc686663054)** 16

**[2.18.1](#_Toc686663055)** [细胞总](#_Toc686663055)**[RNA](#_Toc686663055)**[的提取](#_Toc686663055) 16

**[2.18.2](#_Toc686663056)** [样品中](#_Toc686663056)**[RNA](#_Toc686663056)**[逆转录为](#_Toc686663056)**[cDNA](#_Toc686663056)** 16

**[2.18.3](#_Toc686663057)** [大鼠骨髓源](#_Toc686663057)**[DCs](#_Toc686663057)**[β](#_Toc686663057)**[2-AR mRNA](#_Toc686663057)**[、](#_Toc686663057)**[GRK2 mRNA](#_Toc686663057)**[的引物](#_Toc686663057) 16

**[2.18.4](#_Toc686663058)****[QRT-PCR](#_Toc686663058)**[检测β](#_Toc686663058)**[2-AR mRNA](#_Toc686663058)**[和](#_Toc686663058)**[GRK2 mRNA](#_Toc686663058)**[的水平](#_Toc686663058) 16

[2.19 统计学分析](#_Toc686663059) 17

**[3](#_Toc686663060)** [实验结果](#_Toc686663060) 17

**[3.1](#_Toc686663061)** [β](#_Toc686663061)**[-AR](#_Toc686663061)**[信号对](#_Toc686663061)**[AA](#_Toc686663061)**[大鼠](#_Toc686663061)**[DCs](#_Toc686663061)**[功能的影响](#_Toc686663061) 17

**[3.1.1](#_Toc686663062)****[DCs](#_Toc686663062)**[的培养与鉴定](#_Toc686663062) 17

**[3.1.2](#_Toc686663063)****[ISO](#_Toc686663063)**[对](#_Toc686663063)**[DCs](#_Toc686663063)**[表型及功能的影响](#_Toc686663063) 17

**[3.1.3](#_Toc686663064)****[β-AR](#_Toc686663064)**[选择性拮抗剂对](#_Toc686663064)**[ISO](#_Toc686663064)**[处理的](#_Toc686663064)**[DCs](#_Toc686663064)**[表型及功能的影响](#_Toc686663064) 19

**[3.1.4](#_Toc686663065)** [β](#_Toc686663065)**[2-AR](#_Toc686663065)**[在](#_Toc686663065)**[AA](#_Toc686663065)**[大鼠骨髓源](#_Toc686663065)**[DCs](#_Toc686663065)**[中的表达分布](#_Toc686663065) 20

**[3.1.5](#_Toc686663066)** [β](#_Toc686663066)**[2-AR](#_Toc686663066)**[激动药灌胃对](#_Toc686663066)**[AA](#_Toc686663066)**[大鼠的影响](#_Toc686663066) 21

**[3.1.6](#_Toc686663067)****[AA](#_Toc686663067)**[大鼠骨髓源](#_Toc686663067)**[DCs](#_Toc686663067)**[对](#_Toc686663067)**[ISO](#_Toc686663067)**[反应的差异](#_Toc686663067) 26

**[3.1.7](#_Toc686663068)****[AA](#_Toc686663068)**[大鼠骨髓源](#_Toc686663068)**[DCs](#_Toc686663068)**[表型和胞膜β](#_Toc686663068)**[2-AR](#_Toc686663068)**[、](#_Toc686663068)**[GRK2](#_Toc686663068)**[及其](#_Toc686663068)**[mRNA](#_Toc686663068)**[在](#_Toc686663068)**[AA](#_Toc686663068)**[病程的变化](#_Toc686663068) 27

**[3.2](#_Toc686663069)** [β](#_Toc686663069)**[-AR](#_Toc686663069)**[信号对](#_Toc686663069)**[AA](#_Toc686663069)**[大鼠](#_Toc686663069)**[FLS](#_Toc686663069)**[功能的影响](#_Toc686663069) 29

**[3.2.1](#_Toc686663070)****[ISO](#_Toc686663070)**[对正常大鼠](#_Toc686663070)**[FLS](#_Toc686663070)**[增殖能力的影响](#_Toc686663070) 29

[3.2.2](#_Toc686663071) **[ISO](#_Toc686663071)**[对正常大鼠](#_Toc686663071)**[FLS](#_Toc686663071)**[分泌IL-1β、TNF-α、](#_Toc686663071)**[RANKL](#_Toc686663071)**[和](#_Toc686663071)**[OPG](#_Toc686663071)**[水平的影响正常大鼠FLS制备细胞悬液(5×10 6 cell/ml)，加至24孔培养板，每孔500μl，](#_Toc686663071) 29

**[3.2.3](#_Toc686663072)****[β-AR](#_Toc686663072)**[选择性拮抗剂对](#_Toc686663072)**[ISO](#_Toc686663072)**[处理的](#_Toc686663072)**[FLS](#_Toc686663072)**[增殖能力的影响](#_Toc686663072) 30

**[3.2.4](#_Toc686663073)****[ISO](#_Toc686663073)**[对正常和](#_Toc686663073)**[AA](#_Toc686663073)**[大鼠](#_Toc686663073)**[FLS](#_Toc686663073)**[增殖能力影响的差异](#_Toc686663073) 30

**[3.2.5](#_Toc686663074)** [β](#_Toc686663074)**[2-AR](#_Toc686663074)**[在正常和](#_Toc686663074)**[AA](#_Toc686663074)**[大鼠](#_Toc686663074)**[FLS](#_Toc686663074)**[的表达、分布](#_Toc686663074) 31

**[3.2.6](#_Toc686663075)** [流式细胞术检测](#_Toc686663075)**[ISO](#_Toc686663075)**[对正常及](#_Toc686663075)**[AA](#_Toc686663075)**[大鼠](#_Toc686663075)**[FLS](#_Toc686663075)**[表面β](#_Toc686663075)**[2-AR](#_Toc686663075)**[的表达](#_Toc686663075) 31

[3.2.7](#_Toc686663076) **[Western blot](#_Toc686663076)**[法检测](#_Toc686663076)**[AA](#_Toc686663076)**[大鼠](#_Toc686663076)**[FLS](#_Toc686663076)**[β](#_Toc686663076)**[2-AR](#_Toc686663076)**[、](#_Toc686663076)**[GRK2](#_Toc686663076)**[、](#_Toc686663076)**[β-arrestin2](#_Toc686663076)**[的变化正常或AA模型大鼠FLS 经超高速离心，胞浆、胞膜蛋白分离，Western blot](#_Toc686663076) 32

**[3.2.8](#_Toc686663077)** [ISO对正常及](#_Toc686663077)**[AA](#_Toc686663077)**[大鼠](#_Toc686663077)**[FLS cAMP](#_Toc686663077)**[水平的影响](#_Toc686663077) 33

**[3.2.9](#_Toc686663078)** [ISO对正常及](#_Toc686663078)**[AA](#_Toc686663078)**[大鼠](#_Toc686663078)**[FLS](#_Toc686663078)**[胞内](#_Toc686663078)**[p-ERK](#_Toc686663078)**[水平的影响](#_Toc686663078) 34

**[4.](#_Toc686663079)** [讨论](#_Toc686663079) 35

**[4.1](#_Toc686663080)****[DCs](#_Toc686663080)**[和](#_Toc686663080)**[FLS](#_Toc686663080)**[功能的异常参与了](#_Toc686663080)**[RA](#_Toc686663080)**[炎症免疫反应的病理过程](#_Toc686663080) 35

**[4.2](#_Toc686663081)** [β](#_Toc686663081)**[2-AR](#_Toc686663081)**[信号是调节](#_Toc686663081)**[DCs](#_Toc686663081)**[和](#_Toc686663081)**[FLS](#_Toc686663081)**[功能的重要信号通路](#_Toc686663081) 35

**[4.3](#_Toc686663082)** [β](#_Toc686663082)**[2-AR](#_Toc686663082)**[信号的异常是](#_Toc686663082)**[AA](#_Toc686663082)**[大鼠](#_Toc686663082)**[DCs](#_Toc686663082)**[和](#_Toc686663082)**[FLS](#_Toc686663082)**[功能改变的重要原因](#_Toc686663082) 36

[结 论](#_Toc686663083) 36

[本研究创新点](#_Toc686663084) 37

[下一步工作设想](#_Toc686663085) 37

[参考文献](#_Toc686663086) 37

[附录](#_Toc686663087) 41

[参考文献](#_Toc686663088) 45

英文缩略词表(Abbreviation)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全名 | 中文全名 |
| A | Absorbance | 吸光度 |
| AA | Adjuvant arthritis | 佐剂性关节炎 |
| AC | Adenylate cyclase | 腺苷酸环化酶 |
| Adr | Adrenaline | 肾上腺素 |
| AP | Ammonium persulfate | 过硫酸胺 |
| APC | Antigen-presenting cell | 抗原提呈细胞 |
| AR | Adrenergic receptors | 肾上腺素受体 |
| β2-AR | β2 adrenergic receptors | β2 肾上腺素受体 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| CA | Catecholamine | 儿茶酚胺 |
| cAMP | Cyclic adenosine monophosphate | 环磷酸腺苷 |
| CD | Cluster of differentiation | 白细胞分化抗原 |
| CFA | Complete Freund adjuvant | 完全弗氏佐剂 |
| ConA | Concanavalin A | 刀豆蛋白 A |
| DAB | Diaminobenzidin | 二氨基联苯氨 |
| DC | Dendritic cell | 树突状细胞 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附实验 |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase | 胞外信号调节激酶 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸[荧光素](http://baike.baidu.com/view/2062542.htm) |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| FLS | Fibroblast-like synoviocytes | 成纤维样滑膜细胞 |
| Gi | Inhibitory subunit of G protein | 抑制性 G 蛋白亚基 |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor | 粒-巨噬细胞集落刺激因子 |
| GPCRs | G-protein-coupled receptors | G 蛋白偶联受体 |
| GRK | G-protein-coupled receptor kinases | G 蛋白偶联受体激酶 |
| Gs | Stimulatory subunit of G protein | 激活性 G 蛋白亚基 |
| ig | Intragastric administration | 灌胃 |
| Ig | Immunoglobulin | 免疫球蛋白 |
| IL | Interleukin | 白细胞介素 |
| ISO | Isoproterenol | 异丙肾上腺素 |
| LPS | Lipopolysaccharide | 脂多糖 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | 丝裂原激活的蛋白激酶 |
| MHC | Major histocompatibility complex | 主要组织相容性复合体 |
| MLR | Mixed lymphocyte reaction | 混合淋巴细胞反应 |
| MTT | 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-  Diphenyl-tetrazolium bromide | 溴化 -3(4,5- 二甲基 -2- 噻  唑）-2,5-二苯基四氮唑 |
| NE | Noradrenaline | 去甲肾上腺素 |
| NF-κB | Nuclear factor-κB | 核转录因子-κB |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| PKA | Protein kinase A | 蛋白激酶 A |
| PKC | Protein kinase C | 蛋白激酶 C |
| PLC | Phospholipase | 磷脂酶 C |
| PMSF | Phenyl methyl sulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏氟乙烯 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| QRT-PCR | Real time fluorescent quantitation PCR | 实时荧光定量 PCR |
| RA | Rheumatoid arthritis | 类风湿关节炎 |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel  electrophoresis | 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺  凝胶电泳 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| Th | T helper | 辅助性 T 细胞 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor alpha | 肿瘤坏死因子 α |
| Tris | Tris (hydroxymethyl) aminomethane | 三甲羟基氨基甲烷 |

β肾上腺素受体信号对佐剂性关节炎大鼠树突细胞及成纤维样滑膜细胞的影响

研究生吴华勋

导 师 魏 伟 教授

（安徽医科大学临床药理研究所，抗炎免疫药物教育部重点实验室，合肥230032）

# 中文摘要

肾上腺素受体（AR）作为神经免疫调节的关键受体，可能参与了类风湿关节炎（RA）的发生、发展过程。树突细胞（DCs）作为功能强大的抗原提呈细胞，在调节免疫应答反应中起重要作用，可能在以下几个方面参与RA的发病机制：DCs能激活淋巴器官中MHC限制性自身免疫反应，诱导免疫应答；DCs浸润至滑膜和滑液中，关节局部内摄取、处理、提呈抗原，促使RA 迁延持续；

DCs、滑膜细胞、巨噬细胞一起产生炎性介质，进一步刺激产生RA的炎症免疫反应等。成纤维样滑膜细胞（FLS）是类风湿关节炎的主要效应细胞，其异常增殖，同时自身分泌的IL-1β、TNF-α和RANKL等炎性细胞因子加剧了局部的炎症反应。DCs和FLS均有AR的表达，均可能参与对RA的神经免疫调节，尤其是β-AR信号可能具有炎症免疫调节的作用。本课题采用佐剂性关节炎（AA）大鼠模型，运用流式细胞术、QRT-PCR、免疫荧光、免疫印迹等方法，通过观察β-AR激动药（ISO）对DCs和FLS功能的影响，探讨β-AR及其信号对DCs 和

FLS功能的调节作用，进一步研究该信号通路在AA大鼠DCs和FLS中的异常变化及部分机制，为揭示β-AR信号转导参与RA异常炎症免疫反应的病理机制提供实验依据。

**目的**：观察β-AR信号对大鼠DCs和FLS功能的调节作用，探讨AA大鼠DCs和FLS上β-AR信号的变化及对其功能的影响，为揭示β-AR信号转导参与RA异常炎症免疫反应的病理机制以及药物作用新靶点提供重要依据。

**方法：**

采用rIL-4、rGM-CSF刺激大鼠骨髓源细胞，诱导生成DCs；流式细胞术检测DCs表型CD80、CD86、MHC-Ⅱ的表达和抗原摄取功能，FLS表面β2-AR的表达采用FITC标记的二抗间标法检测，均以平均荧光强度表示表达的高低；MTT法检测FLS的增殖及混合淋巴细胞反应（MLR）中T细胞的增殖；ELISA法检测IL-1β、IL-10、TNF-α、RANKL、OPG和cAMP的水平；采用完全弗氏佐剂于大鼠足趾注射制得AA模型，β2-AR激动药灌胃给予，使用足爪仪测足爪容积计算足爪肿胀度，HE染色观察关节病理，胸腺、脾脏重量与体重的比值表示胸腺、脾脏指数；免疫组化法检测β2-AR在DCs和FLS上的分布；免疫荧光法检测β2-AR在FLS上的表达情况；Western blot法检测β2-AR、GRK2、β-arrestin2的膜表达和p-ERK的表达；QRT-PCR法检测β2-AR mRNA、GRK2 mRNA的表达。

**结果**：

1. β-AR信号对AA大鼠DCs功能的影响

β-AR激动药ISO能明显下调CD86、MHC-Ⅱ的表达，对CD80表达无明显影响；ISO能明显提高DCs的抗原摄取功能，升高IL-10的水平，抑制MLR。

ISO主要通过β1-AR信号下调CD86的表达，通过β2-AR信号影响MHC-Ⅱ的表达、影响抗原的摄取功能、产生对MLR的影响。β2 -AR激动药沙丁胺醇体内给药能显著下调AA大鼠肠系膜淋巴结DCs和骨髓源DCs表面MHC-II的表达，提高DCs的吞噬能力，但对CD80、CD86的表达无明显影响，与体外实验结果一致；β2 -AR激动药沙丁胺醇能明显降低AA大鼠足爪肿胀度，不同程度的改善关节的异常病理；能显著降低AA大鼠的胸腺、脾脏指数，抑制T淋巴细胞，但对B淋巴细胞增殖反应无明显影响。

ISO处理后的AA模型组骨髓源DCs对T细胞增殖的抑制作用明显低于正常组，Western blot法检测AA模型组大鼠骨髓源DCs胞膜中β2-AR表达明显下降。AA病程中研究发现，致炎后d21、d28，β2-AR的膜表达显著降低，GRK2的膜表达显著升高；基因水平显示，β2-AR mRNA、GRK2 mRNA无显著变化。

2. β-AR信号对AA大鼠FLS功能的影响

ISO能明显抑制FLS的增殖，抑制FLS分泌IL-1β、TNF-α和RANKL的水

平，促进OPG的分泌水平，其抑制增殖作用主要通过β2-AR信号发挥。β2 -AR

激动药沙丁胺醇体内给药能抑制FLS的增殖反应。

β2-AR在AA大鼠FLS胞膜的表达显著下降，ISO对其增殖的抑制作用明显降低，刺激后β2-AR的脱敏作用明显高于正常对照组。AA大鼠FLS胞膜中GRK2、β-arrestin2的表达显著升高。AA模型组cAMP水平明显降低，经ISO刺激后对照组和AA模型组cAMP水平均显著升高，但AA模型组cAMP水平显著低于对照组。AA模型组p-ERK水平显著增高，经ISO刺激，AA模型组p-ERK水平显著高于对照组；与未刺激组相比，ISO能显著升高AA模型组FLS p-ERK

的水平，对对照组无明显影响。**结论：**

1. β2-AR信号参与了对DCs和FLS功能的调节。

（1）β2-AR信号促进DCs的抗原摄取，抑制其抗原的提呈功能。

（2）β2-AR信号的激活可以抑制FLS增殖。

2. β2-AR信号在AA大鼠DCs和FLS中的异常改变是其对激动药反应存在差异的原因。

（1）AA大鼠DCs和FLS中β2-AR膜表达下降是其对激动药反应减弱的重要原因。

（2）AA大鼠GRK2、β-arrestin2转膜的增加，导致β2-AR脱敏的增强，可能是β2-AR膜表达下降主要原因。

（3）β-arrestin2转膜的增加，导致p-ERK表达的增高，也可能是AA大鼠FLS

对β-AR激动药反应减弱的原因。

**关键词：**佐剂性关节炎；肾上腺素受体；树突细胞；成纤维样滑膜细胞；脱敏

p-ERK

**The effects ofβ-adrenoceptor signal on dendritic cells and fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats**

Ph. D candidate: Huaxun Wu Preceptor: Prof. Wei Wei

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry, Hefei, 230032)

**Abstract**

Adrenergic receptors (AR), which are the key part of nerve immunity receptors, may be involved in the occurrence and development process of rheumatoid arthritis (RA). Dendritic cells (DCs) as a powerful antigen presenting cells, plays an important role in regulating the immune response. DCs may be involved in the pathogenesis of RA in the following several aspects: DCs can activate MHC restricted autoimmune

Reaction in the lymphatic organs, and induct immune response; DCs infiltrated into the

Synovial membrane and synovial fluid in the joints, and uptake, process and present antigen; DCs, FLS, macrophages produce inflammatory mediators, further stimulated the RA inflammatory immune response, etc. Fibroblast-like synoviocytes (FLS) is major effector cells of rheumatoid arthritis. Abnormal FLS proliferation and secretion of IL-1β, TNF-αand RANKL inflammatory cytokines, contributed to the local inflammatory response. AR are expressed on DCs and FLS, which are likely to participate in the neural immune regulation of RA, especially theβ-AR signal may have immunomodulatory effects. This subject adopts the model of adjuvant arthritis rats, and use flow cytometry, QRT-PCR, immunofluorescence, and western blot method, and discussed the effects ofβ-adrenoceptor signal on dendritic cell and fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats, which provide new clues to reveal the abnormal immune response pathogenesis of RA.

**Objective:** To observe the function ofβ-AR signal on rats DCs and FLS, and discussion on theβ-AR signal change of AA rats DCs and FLS and influence on its function, which reveal the mechanism ofβ-AR signal transduction involved in the pathogenesis of RA abnormal inflammatory immune response, and provide an important basis for new drug targets.

**Methods:**

Rat bone marrow cells were stimulated by rIL-4, rGM-CSF, which induced DCs; Using flow cytometry to detect DCs phenotypic CD80, CD86, MHC-Ⅱand antigen uptake function, and the expression ofβ2-AR on FLS; FLS and T cell proliferation of MLR was determined by MTT method; The levels of IL-1β, IL-10, TNF-α, RANKL,

OPG and cAMP was detected by ELISA; Making AA model by complete freund's adjuvant, paw swelling degree was measured by Paw Volume Meter, joint pathology were observed by HE dyeing; Detectingβ2-AR distribution on DCs and FLS by immunohistochemical method; The distribution ofβ2-AR on FLS was detected by immunofluorescence; The expression ofβ2-AR, GRK2, β-arrestin2 in the cell membrane and p-ERK were detected by Western blot. The expression of β2-AR

MRNA、GRK2 mRNA were detected by QRT-PCR.

**Results:**

1. The effects ofβ-adrenoceptor signal on DCs from AA rats

β-adrenergic agonists ISO obviously reduced the expression of CD86, MHC-Ⅱ, and does not affect the expression of CD80; ISO obviously increased the antigen uptake function of DCs and secreted levels of IL-10, and inhibited MLR. ISO affected the expression of CD86 mainly throughβ1-AR signal; ISO reduced the expression of

MHC-Ⅱ, influenced the antigen uptake function and MLR effect through the β2-AR

Signal. β2-AR agonist salbutamol intragastric administration can significantly lower the expression of MHC-II, and improve the antigen uptake function of DCs, but there was no significant effect on the expression of CD80 and CD86; salbutamol can significantly decreased the AA rat paw swelling degree, and improve abnormal joints pathology; significantly reduced the AA rat thymus index and spleen index, and inhibited the proliferation of T lymphocyte, but there was no significant effect on the

Proliferation of B lymphocyte.

The inhibition effect of ISO on T cell proliferation significantly lower in bone marrow DCs from AA model group than normal group; the expression ofβ2-AR in cell membrane obviously decreased in DCs from AA model rats by Western blot. The expression ofβ2-AR significantly decreased and the expression of GRK2 significantly increased on d21, d28; there were no significant change inβ2-AR mRNA and GRK2 mRNA.

2. The effects ofβ-adrenoceptor signal on FLS from AA rats

ISO can significantly inhibit FLS proliferation, inhibit the secretion of IL-1β, TNF-αand RANKL level, and promote the secretion of OPG levels; its effect of inhibition proliferation mainly through theβ2-AR signal. β2-AR agonist salbutamol intragastric administration can significantly inhibit FLS proliferation.

The expression ofβ2-AR in AA rats FLS cell membrane decreased significantly, desensitization effect is significantly higher than normal control group after stimulated by ISO. The expression of GRK2 andβ-arrestin2 in AA rats FLS cell membrane significantly increased. The cAMP levels significantly decreased in AA model group; cAMP levels were significantly increased in control group and AA model group after ISO stimulation, but the cAMP level were significantly lower in AA model group than the control group. p-ERK level increased significantly in AA model group FLS, p-ERK level is significantly higher in AA model group than the control group after ISO stimulation; ISO significantly increased the levels p-ERK in AA model FLS compared with no stimulation, and no obvious effect on the control group.

**Conclusion:**

1. β2-AR signal involved in the regulation of DCs and FLS.

The antigen uptake function and antigen presentation of DCs were mediated byβ2-AR signal; The inhibition effects on FLS proliferation mainly through β2-AR signal stimulated by ISO.

2. The abnormalities ofβ2-AR signal in AA rats DCs and FLS may be the reason why there are differences on the agonist.

The expression ofβ2-AR in membrane in AA rats DCs and FLS decreased, which may lead to the difference in reaction to the ISO; GRK2, β-arrestin2 transfer membrane increased, which resulted in the enhancement ofβ2-AR desensitization, and led to a decline in membrane expression ofβ2-AR. β-arrestin2 transfer membrane increased, which resulted in the enhancement of p-ERK, and led to a decline reaction to the ISO.

**Keywords:** adjuvant arthritis; Adrenergic receptors; Dendritic cells; Fibroblast-like synoviocytes; Desensitization; P-ERK

β肾上腺素受体信号对佐剂性关节炎大鼠树突细胞及成纤维样滑膜细胞的影响

前**言**

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的以关节组织中炎症细胞浸润，滑膜增生，血管翳的形成以及由此引发的软骨和骨的损伤为主要表现的系统性、自身免疫病[1]。

RA的病因目前尚不清楚，多种因素参与了RA的发病过程。临床和动物实验研究发现，心理社会因素是影响RA发生、发展的重要因素[2,3]。因父母离异、死亡等因素成长在单亲家庭中的青少年发生关节炎的几率明显高于对照组[4,5]；日常有较高应激水平的RA患者，一般有较差的预后，5年后的骨和软骨破坏情况更加严重[6]。心理社会因素包括慢性应激、抑郁焦虑等情绪因素，其最终效应都可以引起包括下丘脑一垂体一肾上腺轴，及交感神经系统的激活，导致肾上腺素（Adrenaline, Adr）、去甲肾上腺素（norepinephrine, NE）等儿茶酚胺类物质的分泌增加[ 7]。此外，寒冷、系统感染、免疫刺激、外来抗原等可能导致RA发病的因素也均可引起儿茶酚胺等分泌的增加[8, 9]。动物实验证实，使用实验性关节炎小鼠模型，于首次免疫前给予6-羟多巴胺行系统性交感神经切除术，减少儿茶酚胺等的分泌，结果显示小鼠炎症反应降低，提示儿茶酚胺可能参与了RA的病理过程，但其具体机制不清[10, 11]。

儿茶酚胺发挥效应主要通过肾上腺素受体(adrenergic receptors, AR). AR属于G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族，根据对特异性配基的亲和性、激动后信号转导机制、生物学效应的特点，AR分为α1-AR、α2-AR、β-AR[12]。α1-AR分为α1A，α1B，α1D亚型，其可激活细胞内多种信号转导途径，包括磷脂酶A-花生四烯酸信号系统、酪氨酸激酶磷酸化系统与腺苷酸环化酶

（AC）-cAMP信号系统等。α2-AR分为α2A，α2B，α2C亚型，其激活后与Gi/Go蛋白偶联主要抑制腺苷酸环化酶的活性，降低细胞内cAMP的水平，抑制蛋白激酶

A(PKA)对所调控的蛋白的磷酸化[13,14]。β-AR分为3个亚型，即β1-AR、β2-AR、

β3-AR，激活通过Gs蛋白刺激AC，导致细胞内cAMP水平增加，进一步激活

PKA, PKA催化底物蛋白磷酸化发挥效应。其中β2-AR在炎症反应细胞因子网络中发挥抗炎作用，可以抑制TNF-α产生，抑制白细胞黏附、降低毛细血管通透性等[15,16,17]。β2-AR激动药-间羟叔丁肾上腺素在体外能降低人外周血单核细胞

（PBMCs）IFN-γ的生成，而增加IL-4和IL-10的生成。这一效应主要是通过β2-AR减少APC IL-12的生成，从而阻止幼稚CD4 +向Th1细胞分化，Th2细胞增多，其生成IL-4和IL-10也增加[18]。与健康志愿者相比，RA患者PBMCs及滑液中淋巴细胞β2-AR表达下降，因此PBMCs体外使用NE，与正常组相比其抑制T细胞增殖和活化效应降低[19]。以上结果说明，β-AR信号与RA的病理机制密切相关，但其具体机制不清。

树突细胞(dendritic cell, DCs)是目前功能最强大的抗原提呈细胞(antigen- presenting cells, APC)，其抗原提呈能力远强于单核细胞、巨噬细胞和B细胞[20, 21, 22, 23]，在RA的发病机制中发挥重要作用。DCs可以有效地激活、诱导原始T细胞引发机体的免疫应答，DCs也参与维持机体的免疫耐受[24, 25]。表面缺乏MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子（CD40、CD80、CD86）的DCs可直接降低T细胞的免疫反应[26, 27]；还可分泌IL-10、TGF-β，抑制细胞因子和趋化因子分泌[28]；或诱导

Treg细胞的增殖、分化，增加Treg细胞的数量[29,30]。DCs可能在以下几个方面参与RA的发病机制：一，DCs能激活淋巴器官中MHC限制性自身免疫反应，诱导免疫应答的产生。二，DCs浸润至滑膜和滑液中，在关节局部内摄取、处理、提呈抗原，促使RA迁延持续。三，DCs、滑膜细胞、巨噬细胞一起产生炎性介质，进一步刺激产生RA的炎症免疫反应[31]。四，DCs可以促进RA并发症的产生，包括动脉粥样硬化的发生[32]。

DCs是机体免疫应答的始动者，其功能具体包括：抗原摄取能力，迁移能力，抗原的加工、提呈能力，细胞因子的分泌及刺激T细胞功能等。正常情况下体内绝大多数DCs（主要分布于非淋巴组织）是未成熟DCs(immature dendritic cell, iDC)，iDC激发混合淋巴细胞反应（mixed lymphocyte reaction, MLR）的能力较弱，但摄取抗原的能力较强，在体内维持免疫耐受性[33]；iDC获取抗原后迁移，逐渐分化为成熟DCs(mature dendritic cell, mDC)，mDC高表达MHC-Ⅱ分子和共刺激分子（CD80、CD86），同时激发MLR能力很强，促进Th细胞增殖和活

化，诱导正向免疫应答[34]。除了未成熟或半成熟状态可影响DCs介导的免疫应答类型，许多外源性细胞因子、化学介质和特定组织微环境也可刺激DCs，影响其免疫功能。作为最强大的抗原提呈细胞的DCs是否会受到β-AR激动药的调控，及其在RA发病过程中β-AR是否发生变化，发生何种变化？未见文献报道。

成纤维样滑膜细胞( fibroblast-like synoviocytes, FLS)是RA的主要效应细胞，其无限增生是RA的特征性病理表现，增生的滑膜可形成血管翳依附在软骨表面，引起软骨和骨组织破坏[35,36,37,38]。有文献报道，NE可促进FLS的增殖，其机制可能与α2-AR- Gi-PKC/MAPK信号通路的激活有关[39]。β-AR可激活通过

Gs蛋白刺激AC，导致细胞内cAMP水平增加，进一步激活PKA, PKA催化底物蛋白磷酸化发挥效应，其中cAMP与FLS的增殖和分泌功能密切相关[40,41]。β-AR信号是否参与了儿茶酚胺对FLS的调节作用，其作用如何？在RA发病过程中FLS上β-AR信号是否发生变化，发生了何种变化？

β-AR介导的信号通路可能受到G蛋白偶联受体激酶2(G-protein-coupled receptor kinases, GRK2)和β-arrestin 2的调节[42]。β-AR活化后会被GRK2磷酸化，而后β-arrestin 2转移至细胞膜与磷酸化的受体结合，使该受体与G蛋白脱偶联，从而促进β-AR内化和脱敏。在β-AR信号转导中，GRK2/β-arrestin2是β-AR信号转导的负性调控分子，将直接影响下游信号分子的效应[43]。本课题组已经研究发现，G蛋白-AC-cAMP信号通路介导了实验性关节炎大鼠FLS的异常增殖

[44]；在胶原性关节炎大鼠FLS中Gαi蛋白表达上调、Gαs蛋白表达下调[45]。在外周血单核细胞中，GRK介导的脱敏有可能导致了β-AR的下调，在RA的症状期，α-AR占上峰导致炎性因子分泌增加[43]。AA大鼠DCs和FLS上β-AR亚型及下游GRK2、β-arrestin2是否出现了异常改变，此改变与RA的病程或疾病活动性有何联系？

本研究通过观察β-AR激动药异丙肾上腺素（Isoprenaline, ISO）及其选择性的受体拮抗剂对大鼠DCs表型、抗原的摄取、细胞因子的分泌、刺激T细胞增殖及FLS的增殖和分泌功能等的影响，及β-AR信号在AA病程中的变化，并结合体内实验，采用流式细胞术、QRT-PCR、免疫荧光、免疫印迹等技术，探讨β-AR信号对AA大鼠DCs和FLS的调节作用及机制。以期明确β-AR及其信号对DCs和FLS功能的调节作用，阐明AA模型中DCs和FLS上β-AR信号的变

化与AA病程或疾病活动性的关系，为揭示β-AR信号转导参与RA异常炎症免疫反应的病理机制以及药物作用新靶点提供重要依据。

# **1** 实验材料

## **1.1** 动物

SD大鼠，雄性，体重150 g±20 g，购自安徽省实验动物中心，许可证号码：

SCXK（皖）2011-002。在光照周期12 h:12 h、恒温（24±2℃）环境中适应性饲养1周后实验。

## **1.2** 药物与试剂

重组大鼠白细胞介素4（r IL-4）：美国Pepretech 公司；

重组大鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(r GM-CSF)：美国Pepretech公司；

RPMI-1640: 美国Gibco公司;

DMEM：美国Gibco公司，加入青霉素G、链霉素1×10 5 IU/L；胰蛋白酶：碧云天生物技术研究所，4°C 保存，批号C0201；胎牛血清(FCS)：美国Hyclone公司；

红细胞裂解液：碧云天生物技术研究所；

大鼠淋巴细胞分离液：天津市灏洋生物制品科技有限责任公司；

PE标记的CD80、CD86、MHC-II及同型对照IgG: 美国Biolegend公司；

Alexa Fluor标记的CD103抗体：美国Biolegend公司；

FITC-Dextran (40kU): 美国Sigma公司；

FITC标记的羊抗兔二抗：购自美国Proteintech；

LPS: 美国Sigma公司；

刀豆素A (ConA)：美国Sigma公司产品，用DMEM培养液配置成1 mg/ml母液，经过滤除菌，于-20℃冰箱保存备用；

异丙肾上腺素（ISO）：上海禾丰制药有限公司，批号120402；CGP20712A: 美国Sigma公司，批号119K4600v；ICI118551: 美国Sigma公司，批号102M4619v；

兔抗大鼠β2-AR抗体：购自Abcam公司，批号ab36956；；

小鼠抗大鼠GRK2抗体：美国Santa cruz公司，批号sc-13143；兔抗大鼠β-arrestin2抗体：美国Santa cruz公司，批号sc-166935；兔抗大鼠p-ERK1/2抗体：Abcam公司，批号ab136929；

抗体稀释液：碧云天生物技术研究所；

兔超敏二步法免疫组化检测试剂：北京中衫金桥公司；

辣根过氧化酶标记的ft羊抗兔IgG 抗体：北京中衫金桥公司；辣根过氧化酶标记的ft羊抗小鼠IgG抗体：北京中衫金桥公司；防荧光淬灭封片剂和DAPI染料：碧云天生物技术研究所；

大鼠的IL-1β、IL-10、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF-α）、NF-κB配体的受体（receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL）、骨保护素

（osteoprotegerin, OPG）ELISA检测试剂盒：购自美国R&D公司；大鼠环磷酸腺苷(cAMP) ELISA试剂盒：上海慧颖生物科技有限公司；

TRIzol: 美国Invitrogen公司产品；

β2-AR mRNA、GRK2mRNA引物：上海生工生物工程股份有限公司；

cDNA逆转录试剂盒：购自美国Invitrogen公司产品；

GoTaq®qPCR Master Mix试剂盒：购自美国Promega公司；

DMSO：购自上海博蕴生物科技有限公司；

MTT：购自美国Sigma公司，以PBS配制成所需浓度，过滤除菌，现用现配；甲氨蝶呤片（MTX）：2.5 mg/片，购于上海信谊药厂有限公司，用0.5%羧甲基纤维素钠制成混悬剂灌胃给药，批号110106；

硫酸沙丁胺醇片( Salbutamol ): 2.4 mg/片，购于上海旭东海普药业有限公司，用

0.5%羧甲基纤维素钠制成混悬剂灌胃给药，批号120501；

四甲基乙二胺（N, N, N', N'-tetramethylenediamine, TEMED）、甘氨酸（glycosthene）、苯甲基磺酰氟(phenyl methyl sulfonyl fluoride, PMSF)、乙二胺四乙酸(ethylenediamine retra-acetic acid, EDTA)和Tween-20: 购于Sigma公司；

浓缩胶缓冲液(Upper stock or stacking buffer): 购于碧云天生物研究所；分离胶缓冲液(Lower stock or separating buffer): 购于碧云天生物研究所；

2×电泳加样缓冲液(2×Sample Buffer ): 取2g十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulphate, SDS), 5 ml巯基乙醇，10 ml甘油，1 mg溴酚蓝，25 ml浓缩胶缓冲液用双蒸水定容至50 ml；

电泳缓冲液：将Tris base3.0 g、甘氨酸14.4 g溶于400 ml双蒸水中，加入200 ml

甲醇，双蒸水定容至1.0 L；

10% SDS: 称取10 g SDS溶于100 ml双蒸水中，分装备用；

PMSF: 取1.74 mg PMSF溶于1 ml异丙醇中，配成10 mmol·l -1, 4℃保存备用；

10%过硫酸胺(ammonium persulfate, AP): 取1 g AP溶于10 ml双蒸水（现用现配）；PBS: Nacl 8.0 g、Na2HPO4·12H 2O 1.82 g、KH2PO4 0.2 g、Kcl 0.2 g溶于双蒸水中，调节溶液PH值至7.4，定容至1 L；

## **1.3** 仪器与设备

BioTek Elx×808酶标仪：美国BioTek公司；SW-CJ-1F超净工作台：苏净集团安泰公司；KDC-40超速离心机：科大创新中佳公司；2306-2型CO2培养箱：SHEL LAB公司；

FC500流式细胞仪：美国Beckman Coulter公司；IX-70荧光倒置显微镜：日本OLYMPUS公司；BX-50型正置显微镜：日本OLYMPUS公司；

GL20A全自动高速冷冻离心机：湖南仪器仪表总厂离心机厂；

-80℃超低温冰箱：青岛海尔公司；

HB-RO/05纯水机：杭州惠邦净水设备有限公司；

Sim-F140制冰机：SANYO公司；

DYY-6C 型电泳系统：北京六一公司；

ImageQuant LAS 4000荧光及化学发光成像系统：美国GE公司；

AA-200DS电子天平：Denver Instrument Company；

MYCYDER型PCR自动系列化分析仪：美国BIO-RAD公司；ABI Prism 7500型荧光定量PCR仪：美国Applied Biosystems公司; YLS-7B型足趾容积测量仪：ft东省医学科学院设备站。

# **2** 实验方法

## **2.1** **DCs**的分离与培养[46]**:**

a. SD大鼠，麻醉后处死，0.1%新洁尔灭液中消毒5 min。

b. 超净台内无菌条件下完整取下股骨和胫骨。

c. 将股骨和胫骨连接处的肌肉剪断，75%酒精浸泡消毒3 min。

d. 剪去骨质两端，暴露骨髓腔，用5 ml注射器吸取PBS反复冲洗，直至骨髓腔发白。

e. 收集含骨髓腔细胞的冲洗液，2000 rpm×10 min，弃上清。

f. 离心管内加入红细胞裂解液，去除骨髓细胞中的红细胞，1500 rpm×10 min离心，弃上清。

g. PBS洗涤，离心，弃上清。

h. 根据骨髓细胞的数量，加入含有10%胎牛血清的1640，配成细胞悬液。

i. 配成的细胞悬液铺于6孔培养板，每只大鼠的骨髓细胞可铺一块6孔板。

j. 置于37℃、5%CO2培养箱培养3小时，使细胞贴壁。3小时后，倾去未贴壁细胞，PBS轻微洗涤。

k. 每孔加入含10%胎牛血清的1640培养液2 ml，内含GM-CSF（终浓度10

ng/ml）、IL-4 (终浓度10 ng/ml)，放入37℃、5%CO2培养箱培养。

l. 培养至第3、5天，隔日半量换液，弃去半量上清，重新加入含10%胎牛血清和GM-CSF(10 ng/ml)、IL-4(10 ng/ml)的1640培养基。

m. 培养至第7天，收集细胞上清液，-20℃保存，留做ELISA；吹打、收集粘附的细胞，采用流式细胞仪检测相关指标。

## **2.2** **DCs**的鉴定

### **2.2.1** 形态学鉴定**:**

细胞培养至第3天、6天、9天，分别镜下观察细胞是否具有成簇生长、突起、毛刺等树突细胞的特征。

### **2.2.2** 流式细胞术对**DCs**细胞表型的鉴定

细胞培养至第7天，轻轻吹打、收集粘附的细胞，2000 rpm×10 min, PBS

重悬，调整细胞数量5×10 6个/ml，加入流式管中，每管100μl。分别加入Alexa Fluor标记的CD103抗体及其同型对照抗体，4℃孵育30 min后，再加入300μl PBS重悬细胞，流式细胞仪检测。CD103 (OX-62)是大鼠DCs的特异性表面标志物，检测CD103+细胞的比例，鉴定DCs并确定相关培养条件。

## **2.3** 对**DCs**的干预

培养至第5天，根据分组需要对处理组细胞分别加入ISO（10-7、10-6、10-5

mol/L）或LPS（100 ng/ml）或β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6 mol/L）、

β2-AR选择性拮抗剂ICI 118551(10-6 mol/L)，48小时后收集DCs检测相关指标。

## **2.4** **DCs**的表型及功能检测

### **2.4.1** 骨髓源**DCs**表型的检测

细胞培养至第7天，轻轻吹打、收集粘附的细胞，2000 rpm×10 min, PBS重悬，调整细胞数量5×10 6个/ml，每管100μl。分别加入PE标记的CD80、CD86、MHC-II及同型对照IgG，4℃避光孵育30 min后，加入300μl PBS重悬细胞，流式细胞仪检测，以X轴平均荧光强度的变化表示DCs表型的表达。

### **2.4.2** 大鼠肠系膜淋巴结**DCs**表型的检测

取大鼠肠系膜淋巴结，置于纱网内包裹后研磨。将大鼠淋巴细胞分离液加入离心管中，然后按照细胞悬液与淋巴细胞分离液1: 2的比例，将研磨后的细胞悬液沿管壁缓缓加入含有淋巴细胞分离液的离心管中。400 g，离心15分钟，可见离心管中由上至下分为四层，使用吸管或微量移液器吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层于新的离心管中，使用PBS洗涤，充分混匀后以1800 rpm离心20 min, 弃上清，PBS 重悬，制备成淋巴细胞悬液（5×10 6/ml）。将制备的细胞悬液加入至流式管中，每管100μl。按照推荐浓度要求，分别加入Alexa Fluor标记的CD103抗体，PE标记的CD80、CD86、MHC-II及同型对照IgG，4℃，避光孵育30 min后，最后再加入300μl PBS重悬细胞，流式细胞仪检测，观察CD103阳性细胞门内PE标记的平均荧光强度的变化，表示肠系膜淋巴结DCs表面表型的表达。

### 2.4.3 **DCs**抗原摄取功能的检测[47]

细胞培养至第7天，轻轻吹打、收集粘附的细胞，2000 rpm×10 min, PBS重悬，调整细胞数量5×10 6个/ml，培养于1.5 ml EP管中，每管100μl，加入PBS稀释的FITC-Dextran（终浓度为1 mg/ml），置于37℃温育2 h后取出，PBS 洗

涤重悬于400μl PBS中，流式细胞仪检测。其他条件相同4℃孵育作为对照。以

X轴平均荧光强度的变化表示DCs的吞噬能力。

### **2.4.4** **DCs**分泌**IL-10**水平的检测

IL-10的检测采用ELISA法。培养至第7天的各组细胞，收集细胞培养上清，

-20℃保存，具体操作方法如下：

**标准品的配制**：取出标准品，6, 000 rpm离心30 s。取1 ml标本稀释液加入其中，并用微量移液器反复吹打，充分溶解混匀，得到标准品S7。取7个1.5 ml EP管，每管加入标本稀释液250μl。于S7管中吸取250μl置于S6，吹打混匀，从

S6管吸取250μl置于S5，以此类推，直至S1，S0只加标本稀释液。**操作步骤：**

a将各种试剂移至室温平衡30 min，备用。

b在板中设计好标准品孔和样品孔，分别加入标准品或待测样品各100μl，混匀，敷上板贴，37℃2 h。弃去板内液体，甩干。

c生物素标记物工作液100μl加至每孔，敷上板贴，37℃1 h。弃去孔内液体，洗板3次。

d 辣根过氧化物酶标记亲和素工作液加至每孔，37℃1 h。弃去孔内液体，洗板

5次。

e按顺序每孔加底物溶液90μl，37℃避光，15-30 min，后每孔加终止溶液50μl. f 5分钟后450 nm波长酶标仪测吸光度。

### 2.4.5 混合淋巴细胞反应（**MLR**）[48]

超净台内无菌取大鼠脾脏，制成单细胞悬液，用红细胞裂解液处理，以除去红细胞，2000 rpm/min离心10 min，弃上清，采用尼龙毛柱法，去除细胞悬液中的B淋巴细胞，用RPMI-1640培养液调整细胞浓度为2×10 6个/ml，作为反应细胞。分别以培养至第7天的各处理组DCs为刺激细胞，以25μg/ml的丝裂霉素C加入刺激细胞中，将其置于CO2细胞培养箱中培养30 min，灭活。将刺激细胞和反应细胞按不同比例混合，加入96孔板中，每组设3个复孔。CO2培养箱培养48 h。用MTT法分析DCs对T淋巴细胞的增殖能力的影响。预实验结果显示，刺激细胞和反应细胞（1:10）比例混合具有刺激T淋巴细胞增殖的能力。

## 2.5 大鼠**AA**模型的制备[49]

采用酒精棉球对每只大鼠右后足跖充分擦洗消毒，将10 mg/ml CFA吹打混匀，注射于右后足跖皮内0.1 ml致炎。正常组用生理盐水同法注射。致炎后d0、

d7、d14、d21、d28、d35分别取骨髓源细胞培养DCs，检测相关指标。

## **2.6** 实验分组及给药方法

于致炎后d15观察大鼠足爪及全身炎症情况，将造模成功的大鼠随机分为5组，即模型组、沙丁胺醇（0.75、1.5、3.0 mg/kg）、阳性对照MTX组（0.5 mg/kg），并设正常组，每组6只，共6组。沙丁胺醇（0.75、1.5、3.0 mg/kg）灌胃给药，1天1次，共给药14天；MTX组灌胃给药，3天1次，共5次。致炎后d0、d7、d14、

d21、d28、d35进行整体指标检测。d35处死大鼠，观察各项相关指标。以等量的羧甲基纤维素钠溶液给予正常组和模型组灌胃。

## 2.7 大鼠足爪肿胀度测定[50]

每只大鼠右后足跖皮内注射CFA造模前，使用足爪容积测量仪测量每只大鼠左后足（非致炎侧）容积，并于致炎后d7、d14、d21、d28、d35测量非致炎侧足爪容积，计算出继发侧足爪肿胀度（Δml=造模后足爪容积－造模前足爪容积）。

## 2.8 关节病理学观察[51]

取大鼠左后踝关节（非致炎侧），剔除周围的肌肉、肌腱等软组织后，将其浸于10%的福尔马林溶液中，HE染色，观察各组滑膜细胞增殖、细胞浸润、血管翳形成、炎症和骨质侵蚀等方面的情况，根据严重程度分为0-4级，0级为正常的踝关节，1级为正常滑膜偶见少量单核细胞浸润，2级为滑膜层数少量增加伴有散在的单核细胞浸润，3级为滑膜层数明显增加伴有大量单核细胞浸润，4级为严重的滑膜炎症伴有血管翳的生成，骨和软骨的破坏。

## **2.9** 胸腺指数、脾脏指数的测定

致炎后d35，大鼠处死前24h禁食，称体重后股动脉取血，后脱颈处死大鼠，无菌剥离胸腺和脾脏，分别称重（称重后留做增殖反应），以胸腺或脾脏的重量

（mg）与大鼠体重（g）的比值，表示胸腺指数或脾脏指数。

## 2.10 淋巴细胞增殖反应的检测[52]

超净台中无菌取大鼠胸腺和脾脏，用1640 培养液制备淋巴细胞悬液

（1×10 7/ml），根据分组设计铺设96孔培养板，每孔加入胸腺细胞悬液（终浓度

为5×10 6/ml）100μl及ConA（终浓度5 mg/L）或每孔加入脾细胞悬液（终浓度为5×10 6/ml）100 μl及LPS（终浓度4 mg/L），诱导T、B淋巴细胞增殖，终容积为200μl，设3个复孔，置37℃、5% CO2培养箱中培养48 h。终止培养前4 h各孔加入20μL MTT (5g·L-1)溶液继续培养，培养结束后2000 rpm离心10 min，弃上清，加入120μl DMSO，振荡，于酶标仪490 nm波长处测吸光度（absorbance，

A值）。以正常大鼠FLS为对照组，每组结果以复孔的均值表示。

## 2.11 大鼠**FLS**的分离培养[53]

各组大鼠处死后，置于0.1%新洁尔灭液中浸泡5 min，于膝关节正中纵行切开皮肤，分离肌肉，露出关节腔韧带，继续向下分离，可见平滑光亮的滑膜组织。用手术刀分离关节囊的滑膜层和纤维层，然后取出滑膜层组织。用同法采集另一侧膝关节滑膜层组织。无菌取滑膜组织，去除脂肪、纤维等，用D-Hank's液（无

Ca2+、Mg2+，含青霉素200 kU/L、链霉素200 mg/L）反复冲洗后剪成1~2 mm2小块，用弯头吸管吸取均匀排列于培养瓶（预先用含20%胎牛血清DMEM培养液湿润）的底壁，瓶底朝上，37℃、5%CO2培养箱中培养3 h，使其贴壁。再轻轻翻转培养瓶，使培养液刚刚覆盖组织块，每隔2~3天换一次培养液，观察到有大量成纤维细胞长出后轻轻去除组织块，继续培养，待细胞快长满时用0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代培养，取第3代细胞用于实验。

## **2.12** **FLS**增殖、分泌功能的检测

### **2.12.1** **FLS**增殖反应的测定

采用MTT法测增殖反应。各组大鼠原代滑膜细胞经0.25%胰蛋白酶消化后，用含20 %胎牛血清的DMEM培养液制备细胞悬液(5×10 6 cell·ml-1)，加至96 孔培养板。置于37℃、5 %CO2培养箱培养24 h。根据实验分组，分别加入ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）或β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-5 mol/L）、β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-5 mol/L），培养箱培养24 h、48 h。终止培养前4 h各孔加MTT (5 g·L-1)溶液20μL继续培养，培养结束后弃去上清液，加入DMSO

（100μl/孔），振荡3 min后于酶标仪490 nm波长处测吸光度（absorbance, A值）。以正常大鼠FLS为对照组，每组以复孔的均值表示其结果。预实验显示培养24 h后FLS增殖有明显变化。

### **2.12.2** **FLS**分泌细胞因子水平的检测

正常或AA模型大鼠FLS制备成悬液，以每孔2×10 5 cells密度接种于24孔培养板中，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L) 37℃、5% CO2培养箱中培养24 h使其贴壁，吸取培养细胞上清，ELISA法检测IL-1β、TNF-α、RANKL 和

OPG水平，具体操作按说明书进行。

## **2.13** **FLS**内**cAMP**水平的检测

正常或AA模型大鼠FLS制备成悬液，以每孔2×10 5 cells密度接种于24孔培养板中，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L) 37℃、5% CO2培养箱中培养24 h使其贴壁，培养结束后每孔加入1 ml 0.1 N的HCl终止反应，刮下孔底细胞，移入1.5 ml EP管中，进行超声破碎，4℃，1200 g，离心5 min取上清，-20℃保存。按照cAMP酶联免疫分析(ELISA)试剂盒测定说明书（上海慧颖生物科技有限公司提供）要求进行测定。

## **2.14** 流式细胞术检测**FLS**细胞表面β**2-AR**的表达

正常或AA模型大鼠FLS给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24 h后，

PBS洗涤细胞2次，用0.25%胰蛋白酶消化FLS, 2000 rpm离心10 min, PBS洗涤后离心去上清后，用含0.5 % BSA的PBS重悬细胞，加入兔源性抗β2-AR受体一抗（1:100），37°C 孵育60min, PBS洗涤、离心去上清，加FITC标记的羊抗兔二抗（1:250）37°C避光孵育30 min，纱网过滤后流式细胞仪（Beckman FC500）检测。用仅加入FITC标记的羊抗兔二抗孵育的FLS作为同型对照，去除非特异性染色后，比较平均荧光强度的变化。

## **2.15** 免疫组化法检测**DCs**和**FLS**上β**2-AR**的表达

### **2.15.1** **DCs**细胞涂片的制作

培养至第7天的各组细胞，轻轻吹打、收集粘附的细胞，2000 rpm×10 min ,

PBS重悬，调整细胞数量5×10 6个/ml。采用微量移液器吸取细胞悬液20μl涂于载玻片，取另一块边缘光滑的载玻片做推片。将其一端置于滴液前方，向后移动到接触滴液，使之均匀分散在推片与载片的接触处。然后使推片与载片呈30°- 40°角，向另一端平稳地推出，涂片推好后，使之自然干燥。

### **2.15.2** **FLS**细胞爬片的制作

正常或AA模型大鼠FLS用0.25%胰蛋白酶消化后，PBS洗涤，2000 rpm 离

心10 min，用含20%胎牛血清的DMEM培养基重悬，调整细胞密度为105/ml。将

75%酒精消毒过的盖玻片，PBS洗涤2次后，置于六孔培养板中。上述重悬后的

FLS铺于含有盖玻片的六孔板中，37°C，5% CO2培养箱中培养24 h，让其牢固贴于盖玻片上。

### **2.15.3** 免疫组化的步骤

a 4%的多聚甲醛滴于涂有DCs的载玻片上，固定细胞，15 min; PBS洗涤，

2 min×3 ;

b 0.5 % Txiton X-100处理，用于穿孔，作用20 min; PBS洗涤，2 min×3 ;

c 3 % H2O2去离子水孵育10 min，以阻断内源性过氧化物酶；PBS漂洗，2 min×3 ；

d血清封闭液，37°C，15 min；甩干；

e滴加PBS稀释的一抗（1:200），阴性对照用PBS代替一抗，37°C 1 -2 h或4°C过夜；PBS漂洗，2 min×3 ；

f滴加试剂1，室温或37°C 10 -20 min; PBS漂洗，2 min×3 ;

g滴加试剂2，室温或37°C 10 -20 min; PBS漂洗，2 min×3 ;

h应用DAB显色，镜下观察显色情况；自来水冲洗；

I苏木素复染，15-30 s；自来水冲洗；

j 70%(1 min) -80%(1 min) -95%(1 min) -无水乙醇（3 min×2）-二甲苯（1 min×2) 脱水；自来水冲洗；

k封片剂封片，镜下观察。

## **2.16** 免疫荧光法检测**FLS**细胞表面β**2-AR**的表达

### **2.16.1** 免疫荧光法**FLS**细胞的获取

正常或AA模型大鼠FLS用0.25%胰蛋白酶消化后，PBS洗涤，2000 rpm离心10 min，用含20%胎牛血清的DMEM培养基重悬，调整细胞密度为105/ml，铺于24孔培养板，37°C，5% CO2培养箱中培养24 h，让其牢固贴壁。

### **2.16.2** 免疫荧光步骤

a取出24孔培养板，用PBS洗涤2 min×3 ；

b 4%的多聚甲醛滴于孔内，15 min，用于FLS的固定；PBS洗涤，2 min×3 ；

c 0.5%Txiton X-100处理（穿孔）20 min; PBS洗涤，2 min×3；d 1%BSA封闭30 min；

e加入1%BSA稀释的β2-AR抗体（1:250）37°C 2 h或4°C过夜；PBS漂洗，2 min×3 ;

f加入1%BSA稀释的FITC标记的羊抗兔二抗（1:200）37°C 1 h，避光；PBS漂洗，2 min×3 ;

g 5μg/ml的DAPI染色2 min；

h 抗淬灭剂封片；荧光显微镜观察、拍照。

## 2.17 **Western blot**法检测β**2-AR**、**GRK2**、β**-arrestin2**、**p-ERK**的表达[54]

### **2.17.1** 大鼠**DCs**样品的制备及蛋白质的提取

于致炎后d0、d7、d14、d21、d28、d35分别处死AA模型大鼠，培养骨髓源DCs，细胞培养至第7天，轻轻吹打、收集粘附的细胞，PBS洗涤，2000 rpm×10 min，弃上清。根据收集到的DCs数量，加入细胞裂解液约200μl，-80℃冰箱反复冻融3次，4℃、14000 rpm离心15 min，取上清-80℃冻存待测。

### **2.17.2** 大鼠**FLS**样品的制备及蛋白质的提取

正常或AA模型大鼠FLS制备成悬液，以每孔4×10 5 cells密度接种于6孔培养板中，根据分组需要给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24 h后，PBS洗涤细胞2次后，每孔加入细胞裂解液100μl，用细胞刮刮下细胞，至-80℃冰箱反复冻融3次，4℃、14000 rpm离心15 min，取上清-80℃冻存。

### **2.17.3** 大鼠**DCs**和**FLS**胞膜蛋白的分离

将上述提取的标本，4℃、100, 000 rpm离心60 min，上清液装入EP管中为胞浆蛋白；管底沉淀物为胞膜蛋白，加入适量细胞裂解液反复冻融，-80℃冻存待测。

### **2.17.4** 蛋白质样本的定量（**Lowry**法）

（1）试剂的配制：

溶液A: a）Na2CO3 10 ml（Na2CO3 2.0g溶于0.1M NaOH中，定容至100 ml）；

b）1%五水硫酸铜（CuSO4·5H 2O）0.1 ml；

c）2%酒石酸钾钠（sodium potassium tartrate）0.1 ml；

溶液B: 酚试剂（稀释5倍）

标准蛋白：BSA（10 mg·ml -1），使用时采用0.9% NaCl稀释40倍。

2）将反复冻融、离心后取上清的蛋白样品稀释后按下表操作：

|  |
| --- |
| 测定管 标准管 空白管 |
| 标本（稀释 50 倍） 0.5 ml  标准蛋白（250µg ·ml -1） 0.5 ml  0.9% NaCl 0.5 ml  溶液 A 2.5 ml 2.5 ml 2.5 ml  混匀，室温 10min  溶液 B 0.25 ml 0.25 ml 0.25 ml |

（3）溶液B加入每管中后混匀，室温30 min，于紫外分光光度计500 nm处读取各管A500。

（4）计算标本中蛋白质的浓度：C＝A测定/A标准×250×50（µg.µl -1）

（5）上样标本制备：

将样品分别稀释至5.0µg.µl -1或合适的浓度，按4: 1的比例与5×蛋白电泳上样缓冲液混合，煮沸5 min, -20℃保存备用。

### **2.17.5** **western blot**的操作步骤

（1）丙稀酰胺凝胶配制：

①10%SDS－聚丙烯酰胺分离胶的配制：

|  |
| --- |
| 10%分离胶 5%浓缩胶 |
| Acr-Bis (ml) 7.50 1.00  分离/浓缩胶缓冲液(ml) 1.87 1.50  10% SDS(µl) 0.15 0.06  10% AP(µl) 0.15 0.06  TEMED (µl) 6 6 |

②配置好的分离胶混匀后缓缓加入玻璃凝胶板中。

③加入1 ml双蒸水，覆盖其界面，使界面平整，并防止空气中的氧气对凝胶聚合的抑制作用，室温下放置约30 min使之凝固。

④倾去分离胶上面的双蒸水，用滤纸吸干凝胶顶端残存的液体。

⑤配制5%的浓缩胶（见上表），加入玻璃凝胶板中，插入竖梳子，室温下静置30 min。

⑥待凝胶完全凝固后移去梳子。

（2）将凝胶板放入电泳槽中，内外槽中加入电泳缓冲液，分别用微量加样器加入5~20µl (30µg)的蛋白样品，根据目的蛋白的分子量加入合适的marker。

（3）接通电源，浓缩胶中电压设定为70 v，当进入分离胶后，电压调整为100 v，继续电泳直至上样缓冲液的前沿接近凝胶的底部，将电源断开。

（4）裁减PVDF膜至合适尺寸，甲醇浸泡后放入转移缓冲液中。裁减6张适中的滤纸，浸泡在转移缓冲液中。在转移电泳槽中加入预冷的转移缓冲液。

（5）把浸满缓冲液的海绵置于转移装置上，放滤纸3层，再依次放置PVDF膜、裁剪下的凝胶和3层滤纸，用试管赶去气泡，再放上海绵，然后固定。

（6）将该装置浸泡于电泳槽中，装满转移缓冲液，应将凝胶层靠于负极，PVDF膜侧靠近正极；

（7）打开电源开关，在200 mA电流下转移90 min，取出PVDF膜。

（8）将PVDF膜浸泡在5%脱脂奶粉/PBS中封闭，室温摇动2 h。

（9）将PVDF膜放入1: 1000稀释的一抗中，室温摇动2 h（或者4℃过夜）。

（10）用含0.05%Tween-20的PBS室温浸洗3次，每次10 min。

（11）将膜放入1: 50000稀释羊抗兔IgG-HRP 5%脱脂奶粉/PBS，室温摇动2 h。

（12）用含0.05%Tween-20的PBS洗涤3次，每次10 min，再用不含Tween-20

的PBS洗涤1次，10 min。

（13）将底物发光显色试剂按1: 1混和，均匀地涂抹在膜上检测蛋白分子量附近，置于ImageQuant LAS 4000荧光及化学发光成像系统中拍照。

（14）结果采用凝胶成像系统进行分析，以特异性条带的浓度与面积乘积为有效值，反映蛋白的表达水平。

## **2.18** 实时荧光定量**PCR**（**QRT-PCR**）法检测**DCs**上β**2-AR mRNA**、**GRK2**

**mRNA的表达**[55]

### **2.18.1** 细胞总**RNA**的提取

细胞培养至第7天，轻轻吹打、收集粘附的细胞，PBS洗涤，2000 rpm×10 min ,

弃上清。收集到的DCs，加入1 ml TRIZOL试剂裂解细胞，小心吹打，室温下

静置5 min，利于核酸蛋白复合体完全解离。每管中加入0.2 ml氯仿，手动剧烈

振荡管体15 sec，使之混匀，冰上静置2-3 min，4°C，12 000 g，离心10 min，离心后RNA全部被分配于上层无色的水相中，小心吸出上层约0.4-0.5 ml水相至DEPC水处理的去酶EP管中。每管中加入0.5 ml异丙醇，剧烈振荡管体15 sec，使之混匀，冰上静置2-3 min，4°C 12 000 g离心10 min, RNA沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块，弃上清。每管加入至少l ml的75%乙醇，清洗RNA沉淀。振荡，4℃7 500 g离心5 min，弃去上清，室温风干，沉淀物为总RNA。于每管中加入20μl DEPC水将沉淀充分溶解，取2μl溶解后的RNA稀释250倍，紫外分光光度计下检测A260和A280。一般A260/ A280比值是一种RNA纯度检测方法，在1.8~2.1之间，可以满足实验要求。RNA原液浓度=A260×稀释倍数×40（ng/μl），计算RNA的浓度。剩余RNA在-80°C 冰箱保存。

### **2.18.2** 样品中**RNA**逆转录为**cDNA**

（1）退火混合物的配制

RNA样品1μg（根据浓度计算）Random primer (20 uM) 1μl

加DEPC水至11μl

混合液在70℃水浴3min，降到37℃放置10 min。

（2）RT反应液

5×RT缓冲液4μl

dNTP混合液（2.5 mM）4μl

RNase Inhibitor 0.5μl

M-MulV Reverse Transcriptase 0.5μl

充分混匀后37℃恒温1 min

（3）将RT反应液加入到退火混合物中，37℃1 h，95℃5 min，即可得到cDNA

溶液。反应产物可用于扩增或-20℃冻存。

### **2.18.3** 大鼠骨髓源**DCs**β**2-AR mRNA**、**GRK2 mRNA**的引物

经查阅文献和相关软件设计β2-AR mRNA、GRK2 mRNA特异性引物。以上述方法逆转录的cDNA为模板，利用实时荧光定量PCR（real time fluorescent

quantitation PCR, QRT-PCR），检测β2-AR mRNA和GRK2 mRNA的表达水平。

**β2-AR mRNA和GRK2 mRNA的引物序列：**Generic primers: β2-AR(280bp) FORWARD: GTTGTGCGTCACAGCCAGCA REVERSE: AGATACGATAGAGGAAGCGA

Generic primers: GRK2(110bp) FORWARD: AGCGGCGATACTTCTACCTGTT REVERSE: CTGTGTCTCTTCCACCGACTG

Generic primers: GAPDH FORWARD: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC REVERSE: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

### **2.18.4** **QRT-PCR**检测β**2-AR mRNA**和**GRK2 mRNA**的水平

**（1）QRT-PCR反应体系如下：**

试剂数量

SYBR Green Master Mix 10μl

Primer Forward 0.5μl

Primer Reverse 0.5μl

样本cDNA 2μl

DEPC水7μl

总体积20μl

**（2）程序的设置：**

95°C 120 s

95°C 5 s

60°C 30 s 40 cycles

95°C 30 s

60°C 30 s

95°C 30 s

每个样本设置3个复孔，采用2 -△△CT的方法分析基因表达的相对差异。

## 2.19 统计学分析

实验数据以x±s表示，采用SSPS 13.0软件进行统计学处理。两组间比较采用t检验，多组间差异的比较采用单因素方差分析(ANOVA)，p<0.05有统计学差异。

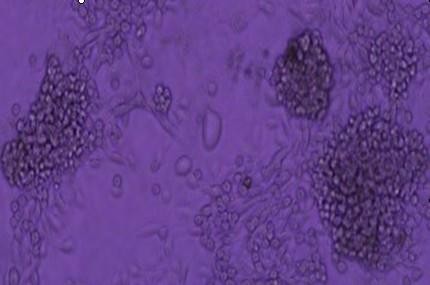
# **3** 实验结果

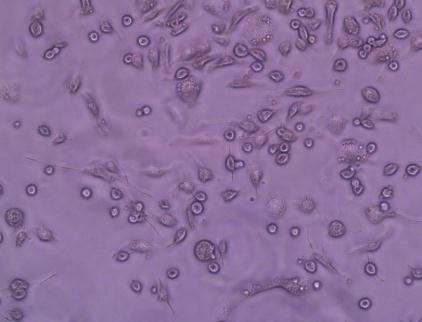
## **3.1** β**-AR**信号对**AA**大鼠**DCs**功能的影响

### **3.1.1** **DCs**的培养与鉴定

#### **3.1.1.1** **DCs**形态学的鉴定

大鼠骨髓细胞经r GM-CSF和r IL-4刺激，培养2-3 d后，细胞成簇生长。第5-6 d，很多细胞开始呈悬浮状，有些细胞可见突起，呈毛刺状。随着培养时间延长， 细胞体积增大， 至第9 d， 大量细胞有明显毛刺（图1）。







3d 6d 9d

（×200）

图1 DCs细胞形态学的变化

Fig 1 The Morphology of bone marrow-derived dendritic cells

#### **3.1.1.2** **DCs**的流式鉴定

收集培养至第7天的细胞，流式细胞仪检测大鼠DCs特异性标记物CD103，其阳性率为83.53%（图2）。



图2 CD103+ DC流式鉴定

Fig 2 CD103+ bone marrow-derived dendritic cells was identified by flow cytometer.

### **3.1.2** **ISO**对**DCs**表型及功能的影响

#### **3.1.2.1** **ISO**对**DCs**表面**CD80**、**CD86**、**MHC-**Ⅱ的影响

细胞培养第5天，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L)，48小时后流式细胞仪检测DCs表面CD80、CD86、MHC-Ⅱ的表达。与对照组相比，ISO（10-6、10-5 mol/L）组能明显下调CD86、MHC-Ⅱ的表达，对CD80无明显影响（图3、

4、5）。

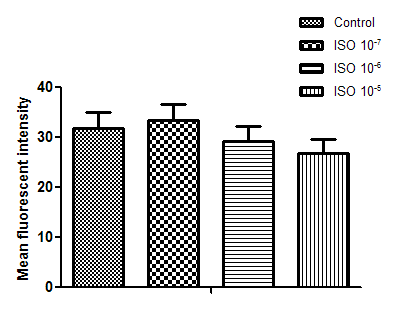
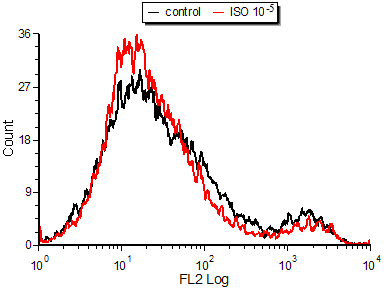


图 3 ISO对DCs表面CD80的影响( *x*±s，n=3)

Fig 3 The effects of ISO on the expression of CD80 on bone marrow-derived dendritic cells



图4 ISO对DCs表面CD86的影响( *x*±s，n=3)

Fig 4 The effects of ISO on the expression of CD86 on bone marrow-derived dendritic cells

#P <0.05, compared with control.



图 5 ISO对DCs表面MHC-Ⅱ的影响( *x*±s，n=3)

Fig 5 The effects of ISO on the expression of MHC-Ⅱon bone marrow-derived dendritic cells.

#P <0.05, compared with control.

#### **3.1.2.2** **ISO**对**DCs**抗原摄取功能的影响

细胞培养第5天，分别加入ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）和LPS(100 ng/ml)，48小时后收集DCs，加入稀释的FITC-Dextran (终浓度为1 mg/ml)，置于37℃温育90 min后取出，洗涤后重悬于400μl的PBS中，其他条件相同4℃温育作为阴性对照，流式细胞仪分析。与正常对照组相比，LPS刺激组DCs的抗原摄取能力明显降低，ISO（10-6、10-5 mol/L）能明显提高DCs的抗原摄取能力（图6）。



图 6 ISO对DCs抗原摄取功能的影响( *x*±s，n=3)

Fig 6 The effect of ISO on bone marrow-derived dendritic cells uptake function.

# P <0.05, # # P <0.01, compared with control.

#### **3.1.2.3** **ISO**对**DCs**分泌**IL-10**的影响

细胞培养第5天，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L)，48小时后收集上清，ELISA法检测IL-10的表达。与对照组相比，ISO（10-5 mol/L）组能明显升高IL-10的水平（图7）。



图 7 ISO对DCs分泌IL-10水平的影响( *x*±s，n=3)

Fig 7 The effect of ISO on IL-10 from bone marrow-derived dendritic cells

# P <0.05, compared with control.

#### **3.1.2.4** **ISO**对**DCs**混合淋巴细胞反应的影响

细胞培养第5天，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L)，48小时后收集DCs，以25μg/ml丝裂霉素C灭活，培养30min。处理后的DCs与T细胞按1: 10混合，加入96孔板中，MTT法分析DCs对T淋巴细胞的激活能力。与寡T细胞组相比，丝裂霉素C灭活后的DCs（DC-T）对T细胞增殖能力显著升高；与

（DC-T）组相比，ISO（10-5 mol/L）处理的DCs能明显抑制T细胞的增殖（图8）。

，



图8 ISO对DCs混合淋巴细胞反应的影响( *x*±s，n=6)

Fig 8 The effects of ISO on MLR of bone marrow-derived dendritic cells.

# P <0.05, compared with (T cells) group. \* P <0.05, compared with (DC-T) group.

### **3.1.3** **β-AR**选择性拮抗剂对**ISO**处理的**DCs**表型及功能的影响

#### 3.1.3.1 **β-AR**选择性拮抗剂对**ISO**处理的**DCs**表面**CD86**、**MHC-**Ⅱ的影响细胞培养第5天，在加入ISO（10-6 mol/L）前，分别加入β1-AR选择性拮抗

剂CGP20712A（10-6 mol/L）、β2-AR选择性拮抗剂ICI 118551(10-6 mol/L)，48小时后收集DCs，流式细胞仪检测。与对照组相比，ISO（10-6 mol/L）组能显著下调CD86的表达，β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6 mol/L）能恢复ISO(10-6

mol/L）的下调作用，β2-AR选择性拮抗剂ICI 118551（10-6 mol/L）无明显作用（图

9）。



图 9 选择性β-AR拮抗剂对ISO处理的DCs表面CD86的影响( *x*±s，n=3)

Fig 9 The effect of selectiveβ-adrenoceptor antagonist on DCs CD86 stimulated by ISO.

# P <0.05, compared with control, \*P <0.05, compared with ISO（10-6mol/L）.



与对照组相比，ISO（10-6 mol/L）组能显著下调MHC-Ⅱ的表达，β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-6 mol/L）能恢复ISO（10-6 mol/L）的下调作用，β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6 mol/L）无明显作用（图10）。

图10 选择性β-AR拮抗剂对ISO处理的DCs表面MHC-Ⅱ的影响( *x*±s，n=3)

Fig 10 The effect of selectiveβ-adrenoceptor antagonist on DCs MHC-Ⅱstimulated by ISO.

# P <0.05, compared with control, \*P <0.05, compared with ISO（10-6mol/L）.

#### **3.1.3.2** **β-AR**选择性拮抗剂对**ISO**处理的**DCs**抗原摄取功能的影响



细胞培养第5天，在加入ISO（10-6 mol/L）前，分别加入β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6 mol/L）、β2-AR选择性拮抗剂ICI118551(10-6 mol/L)，48小时后收集DCs，加入稀释的FITC-Dextran (终浓度为1 mg/ml)，流式细胞仪检测。与对照组相比，ISO（10-6 mol/L）能明显提高DCs的吞噬能力，β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-6 mol/L）能显著拮抗ISO（10-6 mol/L）对DCs吞噬能力的上调作用，β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6mol/L）无明显作用（图11 ）。

图11 选择性β-AR拮抗剂对ISO处理的DCs摄取抗原能力的影响( *x*±s，n=3)

Fig 11 The effect of selectiveβ-adrenoceptor antagonist on DCs uptake function stimulated by ISO

# # P <0.05, compared with control, \*P <0.05, compared with ISO(10-6mol/L)

#### **3.1.3.3** **β-AR**选择性拮抗剂对**ISO**处理的**DCs**混合淋巴细胞反应的影响

细胞培养第5天，在加入ISO（10-5 mol/L）前，分别加入β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-5 mol/L）、β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-5 mol/L），

48小时后收集DCs，经25 ug/ml丝裂霉素C灭活，与T细胞按1: 10混合，MTT法分析DCs对T淋巴细胞的激活能力。与（DC-T）组相比，ISO（10-5 mol/L）处理的DCs 能



明显抑制T 细

胞的增 殖 ，

β2-AR

选择性拮

抗 剂 ICI118551

（10-5 mol/L）能

显 著 拮抗 ISO

（10-5 mol/L）组

DCs 对 T 细 胞

的抑制作用，

β1-AR

抗 剂

CGP20712A（10-6 mol/L）无明显作用（图12）。

选择性拮

图12 选择性β-AR拮抗剂对ISO处理的DCs混合淋巴细胞反应的影响( *x*±s，n=6)

Fig 12 The effect of selectiveβ-adrenoceptor antagonist on MLR of bone marrow-derived dendritic cells

# P <0.05, compared with T group, \*P <0.05, compared with DC-T group，

∆P <0.05, compared with ISO(10-5mol/L)

### **3.1.4** β**2-AR**在**AA**大鼠骨髓源**DCs**中的表达分布

β2-AR信号参与调节DCs MHC-Ⅱ表达、抗原吞噬功能、MLR，采用免疫组化法验证其是否表达β2-AR。取正常及AA大鼠骨髓源细胞培养至第7天，收集

DCs，涂片，免疫组化法检测DCs中β2-AR的分布、表达。图中可见DCs呈圆形，有些细胞可见突起，呈毛刺状；β2-AR在正常及AA模型组均有表达，主要分布于胞膜和胞浆中（图13）。



Control

25 μm



AA

25 μm

**×400**

图13 β2 -AR在AA大鼠骨髓源DCs中的分布

Fig 13 The distribution ofβ2-AR in DC by immunohistochemistry.

### **3.1.5** β**2-AR**激动药灌胃对**AA**大鼠的影响

#### **3.1.5.1** β**2-AR**激动药灌胃对**AA**大鼠整体指标的影响

与正常组比较，致炎后d14开始，各组AA大鼠足爪肿胀度升高，并在d21达到峰值。与模型组相比，d35β2-AR激动药沙丁胺醇（Salbutamol）组（3.0 mg/kg）和MTX组（0.5 mg/kg）能明显降低AA大鼠足爪肿胀度，沙丁胺醇（0.75、1.5 mg/kg）

差异虽无显著性，但有降低肿胀度的趋势（图14. A）。

取大鼠非致炎侧踝关节，HE染色，拍照，观察比较各组滑膜细胞增殖、细胞浸润、血管翳形成、炎症和骨质侵蚀等方面的情况，根据严重程度分为0-4级，

0级为正常的踝关节，1级为正常滑膜偶见少量单核细胞浸润，2级为滑膜层数少量增加伴有散在的单核细胞浸润，3级为滑膜层数明显增加伴有大量单核细胞浸润，4级为严重的滑膜炎症伴有血管翳的生成，骨和软骨的破坏。图中可见正常组大鼠关节病理结构清晰，滑膜细胞1-2层，排列整齐，软骨完整，无血管翳形成、骨质侵蚀、炎性细胞浸润，病理分级为0级；AA模型大鼠关节可见滑膜细胞显著增生（3～8层），大量炎细胞浸润，血管翳形成，滑膜内血管增生，扩张充血，炎性滑膜组织侵犯软骨表面和软骨下骨，病理分级为4级；沙丁胺醇组

（0.75、1.5、3.0 mg/kg）和MTX组（0.5 mg/kg）可不同程度的改善以上病理变化，尤其是沙丁胺醇组（3.0 mg/kg）和MTX组（0.5 mg/kg）能明显抑制滑膜细胞的增生和炎性细胞的浸润，阻止骨和软骨的破坏，病理分级恢复为2 级（图



A

C

14. B)。

B

Control

3



AA model



图14 沙丁胺醇对AA大鼠整体指标的影响.

Fig 14 The effects of Salbutamol on general indicators of AA rats.

A. 沙丁胺醇对AA大鼠足爪肿胀度的影响( *x*±s, n=6). B. 沙丁胺醇对AA大鼠关节病理的影响（200×）. C. 沙丁胺醇对AA大鼠T、B淋巴细胞增殖的影响（*x*±s, n=6）. #P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

与对照组相比，ConA诱导的AA大鼠胸腺T淋巴细胞增殖反应和LPS诱导

的脾脏B淋巴细胞增殖反应均显著增高；与模型组相比，沙丁胺醇（3.0 mg/kg）能显著抑制T淋巴细胞的增殖反应，对B淋巴细胞增殖有下调作用，但无统计学意义；MTX组（0.5 mg/kg）能显著抑制T、B淋巴细胞的增殖（图14. C）。

与正常组相比，AA大鼠脾脏指数、胸腺指数均明显增加；与AA模型组相比，沙丁胺醇（1.5、3.0 mg/kg）和MTX（0.5 mg/kg）用药组能显著降低AA模型组的脾脏指数；沙丁胺醇组（0.75、1.5、3.0 mg/kg）和MTX组（0.5 mg/kg）用药组能显著降低AA模型组的胸腺指数（表1）。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Group | Dose (mg/kg) | 脾脏指数  （mg/g） | 胸腺指数  （mg/g） |
| Control AA  Salbutamol  MTX | -  - 0.75  1.50  3.0  0.50 | 3.40±0.44  4.28±0.27 #  3.94±0.19  3.53±0.33\*  3.13±0.56\*  3.40±0.34\* | 1.36±0.14  2.56±0.74 #  1.57±0.08\*  1.42±0.19\*\*  1.31±0.39\*\*  1.50±0.43\*\* |

表1沙丁胺醇对AA大鼠脾脏指数和胸腺指数的影响（*x*±s, n=6）Tab 1 The effects of Salbutamol on spleen index, thymus index of AA rats.

#*P*＜0.05 compared with control; \**P*＜0.05，\*\**P*＜0.01 compared with AA.

#### **3.1.5.2** β**2-AR**激动药灌胃对**AA**大鼠**FLS**增殖能力的影响

分离培养各组大鼠FLS, MTT法检测其增殖能力。与对照组相比，AA模型组大鼠FLS增殖能力显著增强；与模型组相比，β2-AR激动药沙丁胺醇（3.0 mg/kg）和MTX组（0.5 mg/kg）能显著抑制FLS的增殖能力（图15）。



图15 沙丁胺醇对AA大鼠FLS增殖能力的影响（*x*±s，n=6）Fig 15 The effects of Salbutamol on the proliferation of FLS from AA rats.

#P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model

#### 3.1.5.3 β**2-AR**激动药灌胃对**AA**大鼠骨髓源**DCs**表型和抗原摄取功能的影响收集第7天DCs细胞，流式细胞仪检测DCs表面CD80、CD86、MHC-II 表

达，以X轴平均荧光强度的变化表示。与对照组相比，AA模型组DCs CD80、CD86、MHC-II表达均显著升高；与模型组相比，沙丁胺醇（3.0 mg/kg）能显著下调DCs表面MHC-II的表达，但对CD80、CD86的表达无明显影响（图16, 17, 18）。

**40**

**0.4** #

**(A) n 0.3**

**o ti**

**a r**

**fe 0.2 i l**

**o r p**

**S 0.1 L F**

**0.0 Control AA m odel Salbuta**

**(0.75m g**



#

Normal Control AA Model Salbutamol (3.0mg/kg)

84 **35**

**Mean fluorescent intensity**

\*

\*

63 **30**

\*

Count

42 **25**

21 **20**

**m ol**

**ol** am **TX**

0 **/k1g5) (1C.5onmtrgol/kg) AA(3m.0odelg/kg) (0.5m g/kg)**

**Salbutam**

**Salbut**

**ol M**

100 101 102 103 104

FL2 Log

**Salbutamol (0.75mg/kg)**

Salbutamol **Salbutamol** (**1.5mg/kg**) **(3.0mg/kg)**

**MTX**

**(0.5mg/kg)**



图16 沙丁胺醇对AA大鼠DCs表面CD80的影响（*x*±s，n=3）

Fig 16 The effects of Salbutamol on the expression of CD80 on dendritic cells from AA rats.

#P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

Normal control AA Model salbutamol (3.0mg/kg)

107



80

53

Count

27

0

**120** # #

**110**

**100**

**ty**



**Mean fluorescent intensi**

**90**

**80**

**70**

**60** \*

**50**

**40**

**30**

**20**

**10**

**0**

100 101 102 103 104

FL2 Log

Control AA model **Salbutamol**

**(0.75mg/kg)**

Salbutamol **Salbutamol** (**1.5mg/kg**) **(3.0mg/kg)**

**MTX**

**(0.5mg/kg)**



图17 沙丁胺醇对AA大鼠DCs表面CD86的影响（*x*±s，n=3）

Fig 17 The effects of Salbutamol on the expression of CD86 on dendritic cells from AA rats.

# #P <0.01 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

Normal Control AA model Salbutmol (3.0mg/kg)

63

47





31

Count

16

0

100 101 102 103 10

4

FL2 Log



图18 沙丁胺醇对AA大鼠DCs表面MHC-Ⅱ的影响（*x*±s，n=3）

Fig 18 The effects of Salbutamol on the expression of MHC-Ⅱon dendritic cells from AA rats.

#P <0.01 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

细胞培养第7天收集DCs，加入稀释的FITC-Dextran (终浓度1 mg/ml)，孵育90 min后洗涤，相同条件下4℃作为对照，流式细胞仪检测。与正常对照组相

比，AA模型组吞噬能力显著降低；沙丁胺醇（0.75、1.5、3.0 mg/kg）和MTX

（0.5 mg/kg）能显著提高DCs的吞噬能力（图19）。



Control AA model

Salbutamol (3.0mg/kg)

58

43

29

Count

14

0

100 101 102 103 104

FL1 Log



图19 沙丁胺醇对AA大鼠DCs吞噬能力的影响（*x*±s，n=3）

Fig 19 The effects of Salbutamol on DCs uptake function from AA rats.

#P <0.01 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

#### **3.1.5.4** β**2-AR**激动药灌胃对**AA**大鼠肠系膜淋巴结**DCs**表型的影响

取各组大鼠肠系膜淋巴结，研磨后加入到淋巴细胞分离液中，离心，取环状乳白色淋巴细胞层，PBS洗涤，离心， 制备成淋巴细胞悬液（5×10 6/ml）。流式细胞仪检测，分别观察CD103阳性细胞门内CD80、CD86、MHC-II的平均荧光强度的变化，用以表示肠系膜淋巴结DCs表型的表达。与对照组相比，AA模型组

DCs表面CD80、CD86、MHC-II表达均显著升高；与模型组相比，沙丁胺醇（3.0

mg/kg）能显著下调DCs表面MHC-II的表达，但对CD80、CD86的表达无明显影响（图20, 21, 22）。



**80**

#

**70**

**60**

**Mean fluorescent intensity**

**50**

\*

**40**

**30**

**20**

**10**

**0**

**Control** AA **model Salbutamol**

**Salbutamol Salbutamol**

**MTX**

**(0.75mg/kg)**

**(1.5mg/kg)**

**(3.0mg/kg)**

**(0.5mg/kg)**

图20 沙丁胺醇对AA大鼠肠系膜淋巴结DCs表面CD80的影响（*x*±s，n=3）

Fig 20 The effects of Salbutamol on the expression of CD80 on DCs of lymph node from AA rats.



**150**

#

**100**

**50**

\*

**0**

**Control AA model**

**Salbutamol Salbutamol Salbutamol MTX**

**(0.75mg/kg) (1.5mg/kg) (3.0mg/kg) (0.5mg/kg)**

#P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

**Mean fluorescent intensity**

图21 沙丁胺醇对AA大鼠肠系膜淋巴结DCs表面CD86的影响（*x*±s，n=3）

Fig 21 The effects of Salbutamol on the expression of CD86 on DCs of lymph node from AA rats.



**500**

**400**

#

**300**

**200**

\*

\*

**100**

**0**

**Control**

**AA model Salbutamol Salbutamol Salbutamol**

**MTX**

**(0.75mg/kg) (1.5mg/kg) (3.0mg/kg) (0.5mg/kg)**

#P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

**Mean fluorescent intensity**

图22 沙丁胺醇对AA大鼠肠系膜淋巴结DCs表面MHC-Ⅱ的影响（*x*±s, n=3）

Fig 22 The effects of Salbutamol on the expression of MHC-Ⅱon DCs of lymph node from AA rats.

#P <0.05 compared with control; \*P <0.05 compared with AA Model.

### **3.1.6** **AA**大鼠骨髓源**DCs**对**ISO**反应的差异

取正常及AA大鼠骨髓源细胞培养至第5天，分别加入ISO(10-7、10-6、10-5 mol/L)，48小时后收集DCs，经25 ug/ml丝裂霉素C灭活，与T细胞按1: 10混合，MTT法分析正常及AA大鼠骨髓源DC对T淋巴细胞的激活能力。经ISO

（10-5 mol/L）刺激后，AA模型组骨髓源DCs其对T细胞增殖的抑制作用明显低于对照组，提示AA模型组骨髓源DCsβ2-AR及其信号较对照组减弱（图23）。

Normal AA



β2-AR

β-actin



图23 ISO对AA大鼠骨髓源DCs MLR中T细胞的抑制率（*x*±s, n=6）

Fig 23 The inhibition rate of ISO on MLR of bone marrow-derived d#endritic cells from AA rats.

# P <0.05, compared with control.

取正常及AA大鼠骨髓源细胞培养至第7天，收集DCs，经高速冷冻离心，胞浆、胞膜分离等处理后，Western blot法检测胞膜中β2-AR的表达。与对照组相比，AA模型组DCs胞膜中β2-AR的表达显著降低（图24）。

**60** Control

**The inhibition rate of T cell proliferation (%)**

AA model

**40**

#

**20**

**0**

**10-7** **10-6** **10-5**

图24 β2 -AR在AA大鼠骨髓源DCs胞膜中的表达（*x*±s, n=3）

Fig 24 The expression ofβ2-AR in DC by western blot. ( *x*±s, n=3)

# P <0.05, compared with control.

### **3.1.7** **AA**大鼠骨髓源**DCs**表型和胞膜β**2-AR**、**GRK2**及其**mRNA**在**AA**病程的变化

#### **3.1.7.1** **AA**大鼠骨髓源**DCs CD80**、**CD86**、**MHC-**Ⅱ在**AA**病程中的变化

AA模型大鼠于致炎后d0、d7、d14、d21、d28、d35分别取骨髓源细胞，培养至第7天收集DCs，流式细胞仪检测CD80、CD86、MHC-Ⅱ的表达，以AA模型组平均荧光强度值与对照组的比值，观察CD80、CD86、MHC-Ⅱ在AA病程中的变化。与d0的比值相比，CD80、CD86、MHC-Ⅱ在d21、d28比值显著升高

（图25）。



图25 CD80，CD86，MHC-Ⅱ在AA大鼠骨髓源DCs病程中的变化（*x*±s, n=3）Fig 25 The change of CD80, CD86, MHC-Ⅱin different course of AA rats.

# P <0.05, compared with d0.

#### **3.1.7.2** **AA**大鼠骨髓源**DCs**β**2-AR**、**GRK2**在**AA**病程中的变化

AA模型大鼠于致炎后d0、d7、d14、d21、d28分别取骨髓源细胞，培养至第7天收集DCs，经高速冷冻离心，胞浆、胞膜分离等处理后Western blot法检测胞膜中β2-AR、GRK2的表达。与d0相比，d21、d28β2-AR的表达显著降低，GRK2的表达显著升高（图26）。



d0 d7 d14 d21 d28

β2-AR

46

GRK2

β-actin

图26 β2 -AR, GRK2在AA大鼠骨髓源DCs胞膜中的变化（*x*±s, n=3）

Fig 26 The change ofβ2-AR, GRK2 in different course of AA rats DCs.

# P <0.05, compared with d0.

#### **3.1.7.3** **AA**大鼠骨髓源**DCs**β**2-AR mRNA**、**GRK2 mRNA**的变化

正常及AA模型大鼠于致炎后d35分别取骨髓源细胞，培养至第7天收集DCs，提取RNA，QRT-PCR检测β2-AR mRNA、GRK2 mRNA的变化。提取总RNA的纯度测定，A260/A280值均在1.8以上，纯度较高。与对照组相比，AA模型组DCsβ2-AR mRNA、GRK2 mRNA无显著变化（图27）。



图27 β2 -AR mRNA、GRK2 mRNA在AA大鼠骨髓源DCs中的变化（*x*±s, n=3）

Fig 27 The change ofβ2-AR mRNA、GRK2 mRNA in DCs of AA rats .

## **3.2** β**-AR**信号对**AA**大鼠**FLS**功能的影响

### **3.2.1** **ISO**对正常大鼠**FLS**增殖能力的影响

正常大鼠FLS制备细胞悬液(5×10 6 cell·ml -1)，加至96孔培养板，每孔100μl，细胞贴壁后给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24 h后，MTT法测FLS增殖反应。与对照组相比，ISO（10-6、10-5 mol/L）能明显抑制FLS的增殖能力

（图28）。



图28 ISO对正常大鼠FLS增殖能力的影响（*x*±s, n=6）

Fig 28 The effects of ISO on proliferation of FLS from control rats .

#*P*＜0.05 versus control group;

### 3.2.2 **ISO**对正常大鼠**FLS**分泌IL-1β、TNF-α、**RANKL**和**OPG**水平的影响正常大鼠FLS制备细胞悬液(5×10 6 cell/ml)，加至24孔培养板，每孔500μl，

细胞贴壁后给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24 h后，吸取培养细胞上清，ELISA法检测IL-1β、TNF-α、RANKL和OPG水平。与对照组相比，ISO（10-6、10-5 mol/L）能明显降低FLS分泌IL-1β的水平，ISO（10-5 mol/L）能明显降低FLS分泌TNF-α和RANKL的水平；ISO（10-6、10-5 mol/L）能明显升高FLS分泌OPG水平（表2）。

表2 ISO对正常大鼠FLS分泌IL-1β、TNF-α、RANKL、OPG的影响（*x*±s, n=6）Table 2 Effects of ISO on cytokine production IL-1β、TNF-α、RANKL、OPG.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Group** | **Concentration (mg/kg)** | **IL-1β**  **（pg/L）** | **TNF-α**  **（pg/L）** | **RANKL**  **（ng/ml）** | **OPG**  **（pg/ml）** |
| Control ISO | - 10-7  10-6  10-5 | 36.37±3.99  32.30±5.48  28.27±1.77 #  27.51±3.75 # | 9.33±2.80  7.88±0.80  7.65±1.32  6.60±0.80# | 1.25±0.05  1.24±0. 03  1.22±0.05  1.09±0. 03# | 16.87±2.84  21.23±3.81  30.19±3.94# #  33.81±5.55# # |

#*P*＜0.05，# #*P*＜0.01versus control group;

### **3.2.3** **β-AR**选择性拮抗剂对**ISO**处理的**FLS**增殖能力的影响

50

正常大鼠FLS制备细胞悬液（5×10 6 cell/ml），加至96孔培养板，每孔100μl，细胞贴壁后根据分组情况，在加入ISO（10-6 mol/L）前，分别加入β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A（10-6 mol/L）、β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-6 mol/L），刺激24 h后，MTT法测FLS增殖能力。与未加任何刺激的对照组相比ISO（10-6 mol/L）能显著抑制FLS的增殖，β2-AR选择性拮抗剂ICI118551（10-6 mol/L）能显著拮抗ISO（10-6 mol/L）对FLS的抑制作用，β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A

（10-6 mol/L）无明显影响（图29）。



图29 β-AR选择性拮抗剂对ISO处理的FLS增殖能力的影响（*x*±s, n=6）.

Fig 29 The effect of selectiveβ-adrenoceptor antagonist on FLS stimulated by ISO.

#*P*＜0.05，versus control group, \**P*＜0.05，versus ISO (10-6 mol/L) group;

### **3.2.4** **ISO**对正常和**AA**大鼠**FLS**增殖能力影响的差异

AA大鼠FLS制备细胞悬液(5×10 6 cell·ml -1)，加至96 孔培养板，每孔100μl，细胞贴壁后给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24h后，MTT法测FLS增殖反应。与对照组相比，ISO对FLS的增殖能力有一定下调作用，但差异无统计学意义（图30）。



51

图30 ISO对AA大鼠FLS增殖能力的影响（*x*±s, n=6）

Fig 30 The effects of ISO on proliferation of FLS from AA rats .

综合图28和图30的结果，计算出ISO对正常及AA大鼠FLS增殖抑制率的差异（图31）。结果显示，与ISO对对照组的增殖抑制率相比，ISO（10-6 mol/L）对AA大鼠FLS的增殖抑制率明显降低，提示AA大鼠FLS上β2-AR信号减弱。



图 31 ISO对正常及AA大鼠FLS增殖抑制率的差异（*x*±s, n=6）

Fig 31 The difference of FLS proliferation inhibition ratio between control and AA .

#*P*＜0.05*,* versus control group;

### **3.2.5** β**2-AR**在正常和**AA**大鼠**FLS**的表达、分布

#### **3.2.5.1** 免疫组化法检测β**2-AR**在正常和**AA**大鼠**FLS**的分布、表达

正常或AA模型大鼠FLS制作细胞爬片后，免疫组化法观察β2-AR在FLS中的表达、分布情况。图中显示，FLS成梭形分布，棕色表示β2-AR受体的表达；β2-AR在正常和AA大鼠FLS均有表达，主要在胞膜和胞浆中，胞核无明显表达



Control

（图32）。



AA

**×200**

图32 β2 -AR在正常及AA大鼠FLS中的分布

Fig 32 The distribution ofβ2-AR in FLS by immunohistochemistry.

#### **3.2.5.2** 免疫荧光法检测β**2-AR**在正常和**AA**大鼠**FLS**的分布、表达

正常或AA模型大鼠FLS制作细胞爬片后，用兔抗大鼠β2-AR一抗孵育FLS，再用FITC标记的ft羊抗兔二抗孵育，避光，加入少量DAPI用于细胞核染色，用荧光倒置显微镜记录扫描图像前，采用防荧光淬灭封片剂封片。图中显示，FLS成梭形分布，FITC绿色荧光表示β2-AR的表达，DAPI蓝色染色为细胞核，β2-AR在正常和AA大鼠FLS均有表达，主要分布在胞膜和胞浆中，胞核无明显表达

（图33）。



Control

AA

(FITC, ×400)

图33 β2 -AR在正常及AA大鼠FLS中的分布

Fig 33 The expression ofβ2-AR on FLS from normal and AA rats by immunofluorescence .

52

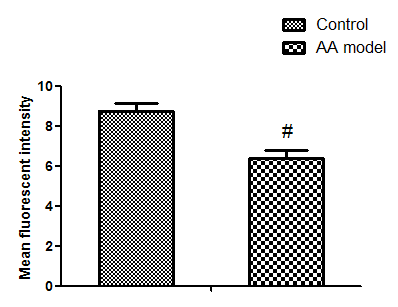


A

B

### **3.2.6** 流式细胞术检测**ISO**对正常及**AA**大鼠**FLS**表面β**2-AR**的表达

#### **3.2.6.1** 流式细胞术检测正常及**AA**大鼠**FLS**表面β**2-AR**的表达



正常或AA模型大鼠FLS PBS洗涤，胰酶消化后，离心，用含0.5 % BSA的PBS重悬细胞，加入兔源性抗β2-AR受体一抗（1:100），孵育，PBS洗涤，加FITC标记的羊抗兔二抗（1:250）避光孵育，纱网过滤后流式细胞仪（Beckman FC500）检测。用仅加入FITC标记的羊抗兔二抗孵育的FLS作为同型对照，去除非特异性染色后，比较平均荧光强度的变化。与对照组相比，AA大鼠FLS FITC平均荧光强度显著降低，提示AA大鼠FLSβ2-AR胞膜表达明显下降（图34）。

图34 流式细胞术检测β2-AR在正常及AA大鼠FLS中的表达（*x*±s, n=3）Fig 34 The expression ofβ2-adrenoceptor from normal and AA rats by flow cytometry .

#*P*＜0.05*,* versus control group;

#### 3.2.6.2 流式细胞术检测**ISO**对正常及**AA**大鼠**FLS**表面β**2-AR**影响的差异正常或AA模型大鼠FLS分别给予ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激24h

后，PBS洗涤，胰酶消化后，离心，用含0.5 % BSA的PBS重悬细胞，加入兔源性抗β2-AR受体一抗（1:100），孵育，PBS洗涤，加FITC标记的羊抗兔二抗

（1:250）避光孵育，用仅加入FITC标记的羊抗兔二抗孵育的FLS作为同型对照，流式细胞仪检测。去除非特异性染色后，比较平均荧光强度的变化。与未刺激组相比，正常组FLS和AA组FLS经ISO刺激后FITC平均荧光强度均显著下降（图35 A、B），提示刺激后由于脱敏作用β2-AR胞膜表达明显下降。

53

图35 流式细胞术检测ISO对正常(A)及AA大鼠(B) FLSβ2-AR表达的影响（*x*±s, n=3）

Fig 35 The effects of ISO on expression ofβ2-adrenoceptor from control and AA rats .

综合图35的结果，计算出ISO诱导正常及AA大鼠FLSβ2-AR胞膜表达的下调的差异，即对β2-AR脱敏作用的影响。结果显示，ISO诱导FLSβ2-AR的脱敏效应在AA模型组中显著高于对照组中（图36）。



图36 ISO对正常及AA大鼠FLSβ2-AR的胞膜表达下调作用的差异（*x*±s, n=3）Fig 36 The difference of FLSβ2-AR reduction rate stimulate by ISO between control and AA .

#*P*＜0.05*,* versus control group;

54

### 3.2.7 **Western blot**法检测**AA**大鼠**FLS**β**2-AR**、**GRK2**、**β-arrestin2**的变化正常或AA模型大鼠FLS 经超高速离心，胞浆、胞膜蛋白分离，Western blot

法检测胞膜蛋白β2-AR、GRK2、β-arrestin2的表达。与对照组相比，胞膜蛋白β2-AR表达显著降低，与流式结果一致；β2-AR负性调节蛋白GRK2、β-arrestin2在胞膜中表达显著升高（图37）。

Control AA model

β2-AR GRK 2

β-arrestin 2 β-actin

**200**

**density unit,% of beta-actin**

**150**

Control AA model

# #

# #



**100**

#

**50**

**0**

**2-AR** **GRK 2-arrestin 2**



图37 β2 -AR, GRK2、β-arrestin2在正常和AA大鼠FLS胞膜中的变化（*x*±s, n=3）

Fig 37 The change ofβ2-AR, GRK2、β-arrestin2 in FLS from control and AA rats .

# P <0.05, # # P <0.01 compared with control.

### **3.2.8** ISO对正常及**AA**大鼠**FLS cAMP**水平的影响

正常或AA模型大鼠FLS制备成悬液，以每孔2×10 5 cells密度接种于24孔培养板中，

分别加入ISO

（10-7 、

10-6、10-5

mol/L）培 养

24h，加入 1 ml

0.1 N 的 HCl

终 止 反 应，

55

刮下孔底细胞，移入1.5 ml EP管中，超声破碎，离心取上清，ELISA法检测cAMP

水平。与对照组相比，AA 模型组cAMP 水平明显降低；同等条件下对照组和

AA模型组FLS经ISO刺激，AA模型组cAMP水平显著低于对照组；与未刺激组相比，ISO（10-5 mol/L）能显著升高对照组和AA模型组FLS胞内cAMP的水平（图38）。

图38 ISO对正常及AA大鼠FLS胞内cAMP水平的影响（*x*±s, n=3）Fig 38 The cAMP level in FLS from control and AA rats stimulated by ISO.

#P <0.05, # # P <0.01 compared with control; \*P <0.05, \*\*P <0.01 compared with ISO (-).

### **3.2.9** ISO对正常及**AA**大鼠**FLS**胞内**p-ERK**水平的影响

综合**3.2.4**（图30）和**3.2.8**（图38）的结果，ISO（10-5 mol/L）能显著提高

AA大鼠FLS胞内cAMP的水平，但对FLS的增殖能力无明显抑制作用，与cAMP的水平不一致，推测由于胞膜β-arrestin2水平的增高，是否激活了与增殖密切相关的p-ERK水平的增加。

正常或AA模型大鼠FLS制备成悬液，以每孔4×10 5 cells密度接种于6孔培养板中，根据分组需要给予ISO（10-5mol/L）刺激24 h后，PBS洗涤细胞2次后，每孔加入细胞裂解液100μl，用细胞刮刮下细胞，反复冻融3次，离心，取上清Western blot法检测p-ERK。与对照组相比，AA模型组p-ERK水平明显增高；同等条件下对照组和AA模型组FLS经ISO（10-5 mol/L）刺激，AA模型组p-ERK 水平显著高于对照组；与未刺激组相比，ISO（10-5 mol/L）能显著升高

AA模型组FLS p-ERK的水平，对对照组无明显影响（图39）。

p-ERK

Control AA

Control ISO(10-5)

AA ISO(10-5)

β-actin

**250**

**density unit,% of beta-actin**

**200**

#

**150**

\* \*

# # Control

AA model



**100**

**50**

**0**

**ISO 10-5**



图 39 ISO对正常和AA大鼠FLS中p-ERK的影响（*x*±s, n=3）

Fig 39 The expression of p-ERK in FLS from AA rats stimulated by ISO

#P < 0.05 ,# # P < 0.01 compared with control; \*\*P < 0.01 compared with ISO (-).

# **4.** 讨论

## **4.1** **DCs**和**FLS**功能的异常参与了**RA**炎症免疫反应的病理过程

DCs是目前已知的功能最强的APC，在诱导机体初次免疫应答中起到关键的

作用，处于启动、维持和调控免疫应答的中心环节[56]。DCs可以有效地激活、诱导原始T细胞引发机体的免疫应答，也参与维持机体的免疫耐受。一般按照DCs的成熟度将其分为两个阶段，一是未成熟DCs (iDC)，二是成熟DCs (mDC)[57]。体内DCs大多数（主要位于非淋巴组织）处于未成熟状态，iDC迁移至淋巴器官的能力尚未形成，表面低表达MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子（CD40、CD80、CD86）的DCs可直接降低对T细胞的免疫反应，其诱导MLR能力较弱，具有较强的抗原摄取能力[58]；DCs还可分泌IL-10、TGF-β，抑制炎性细胞因子和趋化因子的分泌；或诱导Treg细胞的增殖、分化，增加Treg细胞的数量；主要维持体内的免疫耐受状态。当iDC摄取抗原或经炎性细胞因子刺激后开始迁移并开始出现新的特征，其高表达MHC-Ⅱ分子和共刺激分子（CD40、CD80、CD86），诱导MLR能力增强，抗原摄取能力减弱，促进免疫应答。除了未成熟或成熟状态可影响DCs介导的免疫应答类型，许多外源性细胞因子、化学介质和特定组织微环境也可刺激

DCs，影响其免疫功能，包括IL-10、TGF-β、TNF-α、GM-CSF、PGE2、免疫抑制剂等[59, 60, 61]。

RA是以关节滑膜的炎症为主要病理表现的系统性自身免疫病，FLS是RA的主要受累细胞，其异常增殖，同时自身分泌的IL-1β、TNF-α和RANKL等炎性细胞因子加剧了局部的炎症反应[62, 63]。RA的病因及发病机制尚未完全阐明，可能与自身抗原的大量产生，APC的增多，共刺激信号的增强密切相关。在RA的发病过程中，DCs作为功能强大的APC对自身抗原的异常摄取、加工处理、抗原提呈，可能是引起机体免疫系统紊乱的重要原因之一。

DCs和FLS可能通过以下途径参与RA的发病机制： DCs能激活淋巴器官中

MHC限制性自身免疫反应，诱导免疫应答；DCs浸润至滑膜和滑液中，关节局部内摄取、处理、提呈抗原，激活FLS，促使RA迁延持续；DCs、FLS一起产生炎性介质，进一步刺激产生RA的炎症反应；DCs也促进RA的并发症包括动脉粥样硬化等的发生。根据DCs的组织来源，可将其分为髓系和浆系DCs，其中髓系DCs具有很强的MLR能力，在产生及维持FLS炎症过程中发挥重要作用。临床研究发现，RA患者新鲜的滑液和滑膜组织中，髓样DCs明显高于正常组，并且DCs分化更为成熟，高表达MHC-Ⅱ分子和黏附分子[64]。这些异常变化可能与RA滑膜中存在较多可诱导DCs分化，增强APC功能的细胞因子，包括GM-CSF、TNF-a和IL-1

有关[65]。

本实验研究发现，AA大鼠骨髓源DCs表面MHC-Ⅱ和共刺激分子（CD80、

CD86）在致炎后d21、d28显著升高，提示AA大鼠DCs较正常大鼠成熟度升高，其对自身抗原提呈的能力增强，促进免疫反应能力增高，可能是引起AA大鼠机体免疫系统紊乱的重要原因之一。DCs处于启动免疫应答的中心环节，在诱导机体初次免疫应答中起到关键作用，是RA早期启动免疫反应的主要细胞之一，而本实验中骨髓源DCs表面分子在致炎后d21、d28才显著升高，可能与AA症状期出现以后才影响到骨髓干细胞有关。

## **4.2** β**2-AR**信号是调节**DCs**和**FLS**功能的重要信号通路

β2-AR主要偶联Gs蛋白，该受体的活化能激活AC，升高cAMP的水平，进一步激活PKA而发挥效应，如抑制白细胞黏附、降低毛细血管通透性等。β2-AR的激活可以抑制很多炎症反应，如在自身免疫性心肌炎中，β2-AR信号通过调节T细胞的功能发挥抑制作用[66]。那么β2-AR信号是否对DCs和FLS的功能具有调节作用呢？

DCs表面存在多种AR的表达，包括α1B、α2A、α2B、α2C、β1、β2等。Adr和NE等神经递质，可由β-AR信号参与DCs细胞迁移功能的调控，可能通过调控CCR7和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)发挥作用。在银屑病、特应性皮炎等慢性炎症免疫性疾病中，β-AR信号途径参与了DCs由外周皮肤至淋巴结迁移以及免疫功能的调控[67]。在对DCs的研究中，我们采用β肾上腺素受体激动剂ISO（10-7、10-6、10-5 mol/L）刺激正常大鼠骨髓源DCs，分别观察了其对DCs表型CD80、CD86、MHC-Ⅱ及其抗原摄取功能、IL-10分泌功能、MLR的影响。结果发现，ISO能明显下调

CD86、MHC-Ⅱ的表达，对CD80表达无明显影响；能明显提高DCs的抗原摄取功能，升高IL-10的水平，抑制MLR。分别经β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A和β2-AR选择性拮抗剂ICI118551处理后，结果显示ISO主要通过β1-AR信号下调CD86的表达；通过β2-AR信号影响MHC-Ⅱ的表达、影响抗原的摄取功能、产生对MLR的影响。

DCs摄取抗原的能力与其成熟状态密切相关，未成熟的DCs有较强的抗原摄取能力，当其摄取抗原后迁移，并趋于成熟，具有较强的提呈抗原的能力，DCs的发展过程是从抗原摄取型向抗原提呈型的转变。本实验研究发现，ISO主要通

过β2-AR信号促进抗原摄取能力的提高，表现出抑制DCs成熟的功能，起到促进

DCs免疫耐受的作用。 CD80、CD86分子属于B7家族的调节分子，二者基因有26%的同源性，都

可与T细胞表面受体CD28或CTLA-4结合，诱导T细胞的活化[68]。在哮喘模型中发现CD80倾向于诱导Th细胞向Th1分化，CD86分子则倾向于向Th2分化，二者作用存在一定差异[69]。在B细胞的研究中发现，NE能上调CD86的表达，与本实验中ISO通过β1-AR信号下调DCs表面CD86的表达结果相反，可能与NE作为α-AR激动剂激活α-AR通路有关[70]。

MHC-II分子是APC将抗原提呈给CD4+ Th的关键分子，另外T细胞的选择、免疫耐受的诱导同样受MHC-II分子的影响。临床研究发现，RA FLS和自身免疫性肾炎系膜细胞等自身免疫病均高表达MHC-II分子，这可能是自身免疫病重要的病理机制[71, 72]。因此，降低MHC-II分子的表达或活性，是降低炎症免疫反应，促进免疫耐受的研究方向。ISO通过β2-AR信号可明显下调MHC-Ⅱ的表达，进而可能抑制抗原提呈的过程，起到促进免疫耐受的作用。此外，ISO处理的DCs对T淋巴细胞的增殖具有明显的抑制作用，其作用的发挥主要通过β2-AR信号通路实现，降低了DCs对T淋巴细胞的激活作用。

在对FLS的研究中，我们首先在正常大鼠中观察了ISO对其FLS增殖能力、分泌细胞因子能力的影响，结果显示，ISO能明显抑制FLS的增殖功能，抑制FLS分泌IL-1β、TNF-α和RANKL的水平，促进OPG的分泌水平。ISO对FLS增殖能力的影响是通过何种受体发挥作用的？为此，实验中分别加入β1-AR选择性拮抗剂CGP20712A、β2-AR选择性拮抗剂ICI118551，证实了β2-AR信号在ISO抑制FLS增殖中起主要作用。β2-AR是否在FLS中存在表达及其具体分布情况如何？我们进一步通过免疫组化和免疫荧光的方式证实了β2-AR在正常和AA大鼠FLS均有表达，主要表达在胞膜和胞浆中，胞核无明显表达。β2-AR信号通路调节作用的发挥主要通过第二信使cAMP的水平实现，其与细胞的增殖密切相关。cAMP能抑制很多种类细胞的增殖作用，如NIH3T3细胞株和Rat-1细胞株等[73]。本实验研究发现，ISO刺激正常大鼠FLS后，cAMP水平显著升高，增殖能力显著降低，与在其他细胞株上的结果一致。

体外实验的结果提示，β2-AR信号可以通过促进DCs抗原的摄取，抑制抗原

的提呈，抑制FLS的增殖等过程进而发挥抑制免疫反应，促进免疫耐受的作用。那么，采用β2-AR选择性激动药沙丁胺醇灌胃给予AA大鼠是否能通过调节DCs和FLS的功能发挥对其的影响呢？沙丁胺醇具有广谱的免疫调节活性，与其在T淋巴细胞和巨噬细胞等免疫细胞上β2-AR的广泛表达有关，该信号偶联Gs蛋白，可上调免疫细胞内cAMP的水平，进而影响其免疫功能。另外，β2-AR的激活可以抑制单核细胞和巨噬细胞IL-12 的产生，促进IL-10 的产生，产生抗炎作用

[74,75,76]. 许多临床和动物实验研究表明，沙丁胺醇对一些自身免疫病具有明显的

改善作用。随机、双盲、对照的临床试验中研究发现，沙丁胺醇联合醋酸格拉替雷能有效改善多发性硬化患者的临床症状，并具有良好的耐受性[77, 78, 79]。在心肌炎动物模型中，沙丁胺醇能有效缓解心肌炎的炎性症状，主要通过抑制淋巴器官中特异性T淋巴细胞的活化，调节Th1/Th2细胞因子的平衡发挥作用[80, 81]。

我们采用AA大鼠作为实验动物模型，沙丁胺醇（0.75、1.5、3.0 mg/kg）及

阳性对照MTX组（0.5 mg/kg）灌胃给药。我们检测了DCs的相关指标发现，沙丁胺醇能显著下调DCs表面MHC-II的表达，提高DCs的吞噬能力，但对CD80、

CD86的表达无明显影响，与体外实验结果相一致。有文献报道，沙丁胺醇体内给药能通过抑制DCs MHC-Ⅰ类分子与CD8+T细胞的抗原提呈过程，发挥对小鼠免疫功能的影响，并推测β2-AR 激动药将成为调节免疫系统功能的新的途径

[82]. MHC-II类分子主要表达于B细胞、单核-[巨噬细胞](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E5%AE%B8%E3%84%A5%E6%AB%96%E7%BC%81%E5%97%9A%E5%84%AA&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)和DCs等APC上，在[免疫应答](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E9%8D%8F%E5%B6%87%E6%9F%85%E6%90%B4%E6%97%82%E7%93%9F&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)的始动阶段将经过处理的抗原片段提呈给CD4+T细胞[83,84]。MHC-II类分子主要参与外源性抗原的提呈，也可提呈内源性抗原，可能参与了RA自身抗原的提呈过程[85]。在免疫应答中，是协调[免疫细胞](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E9%8D%8F%E5%B6%87%E6%9F%85%E7%BC%81%E5%97%9A%E5%84%AA&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)间的相互作用，调控[体液免疫](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E6%B5%A3%E6%92%B4%E6%81%AB%E9%8D%8F%E5%B6%87%E6%9F%85&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)和[细胞免疫](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E7%BC%81%E5%97%9A%E5%84%AA%E9%8D%8F%E5%B6%87%E6%9F%85&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)应答的关键分子[86, 87]。沙丁胺醇通过抑制MHC-II分子的表达，可以降低其自身抗原向CD4+ T细胞的提呈，减少免疫应答的产生。沙丁胺醇可以提高DCs抗原的摄取能力，抑制抗原的提呈，那么对大鼠AA的整体指标是否有改善作用呢？我们观察了沙丁胺醇对足爪肿胀度、关节病理、脏器指数、淋巴细胞增殖反应等整体指标的影响。结果显示，沙丁胺醇能明显降低AA大鼠足爪肿胀度，可不同程度的改善关节的异常病理变化，抑制滑膜细胞的增生和炎性细胞的浸润，阻止骨和软骨的破坏；能显著降低AA模型大鼠的胸腺、脾脏指数，显著抑制T淋巴细胞的增殖反应，但对B淋巴细胞增殖反应无明显影响。

本实验通过研究ISO及其选择性拮抗剂对正常大鼠骨髓源DCs功能和FLS增殖能力的影响，并通过β2-AR激动药灌胃观察对AA大鼠的影响，揭示了β2-AR信号通过促进DCs抗原的摄取，抑制抗原的提呈，抑制FLS的增殖等过程进而发挥抑制免疫反应，促进免疫耐受的作用。

## **4.3** β**2-AR**信号的异常是**AA**大鼠**DCs**和**FLS**功能改变的重要原因

与正常对照组相比，AA大鼠DCs或FLS对β-AR激动药的反应是否存在差异？该差异是否由β2-AR信号的异常而导致？

在对DCs的研究中，我们通过比较正常及AA模型大鼠骨髓源DCs对ISO处理后反应的差异，试图了解AA大鼠DCs上β-AR信号的异常变化，结果显示AA模型组骨髓源DCs其对T细胞增殖的抑制作用明显低于正常组，提示AA模型组骨髓源DCs β2-AR及其信号较正常组减弱。有文献报道，与健康志愿者相比，RA患者

PBMCs，特别是B细胞和CD8+T细胞上β2-AR表达明显下降；RA患者滑液淋巴细胞中β2-AR的密度也显著降低[19]。AA模型大鼠DCs上β2-AR是否也发生了变化？经免疫组化和Western blot法检测AA模型组大鼠骨髓源DCs胞膜中β2-AR表达明显下降。本实验在研究ISO及其选择性拮抗剂对正常大鼠骨髓源DCs表型和功能的影响时发现，β2-AR信号通路通过调节DCs抗原的摄取、提呈等过程影响

DCs的功能，发挥抑制免疫反应，促进免疫耐受的作用，是维持机体DCs免疫平衡的重要信号通路。β2-AR在DCs胞膜中表达的下降，可能会减弱儿茶酚胺类神经递质通过β2-AR信号发挥的抑制免疫反应作用，降低其发挥的免疫耐受作用，影响DCs的免疫功能，进而加剧RA的炎症免疫反应，导致进一步的免疫功能紊乱。

在对FLS的研究中，我们继续观察了ISO对AA大鼠FLS的增殖能力的影响，结果提示ISO对AA大鼠FLS有一定下调作用，但差异无统计学意义。β2-AR激动药整体给药能显著抑制FLS的增殖能力，而体外实验ISO通过β2-AR对AA模型大鼠FLS无明显影响，可能与体内给药时，β2-AR激动药通过对DCs等免疫细胞的综合效应发挥对FLS的影响。对比ISO对正常及AA大鼠FLS增殖抑制率的差异发现，ISO对AA大鼠FLS增殖的抑制作用明显降低，提示AA大鼠

FLS上β2-AR信号减弱。进一步通过流式细胞术检测发现，AA大鼠FLSβ2-AR

胞膜表达明显下降。正常组FLS和AA组FLS经ISO刺激后由于脱敏作用β2-AR

胞膜表达均明显下降；对比ISO诱导正常及AA大鼠FLSβ2-AR脱敏作用的差异发现，AA大鼠FLSβ2-AR受ISO刺激后的脱敏作用明显高于正常对照组。

以上的实验结果提示，AA大鼠DCs和FLS胞膜中β2-AR脱敏增加，胞膜表达下降，这是否与脱敏作用密切相关的负性调节蛋白GRK2、β-arrestin2转膜增加有关呢？GRK2、β-arrestin2是β-AR脱敏典型的负性调节蛋白。β-AR被配体激活后，会被GRK2在丝、苏氨酸位点快速磷酸化，磷酸化的β-AR与转移至胞膜的β-arrestin2结合，使该受体与G蛋白脱偶联，从而促进β-AR的内化和脱敏，通过脱敏β-AR，终止G蛋白介导的下游信号，如影响cAMP的水平[88, 89]。

GRK水平或活性的异常在药物成瘾、恶性肿瘤、精神疾病、囊肿性纤维化和心脏疾病中发挥重要的作用[90,91,92]。在心脏疾病的研究中发现，GRK活性的调节能有效恢复心力衰竭中心脏的功能，为GPCR异常调节性疾病提供了一条重要的治疗策略[93]。本课题组前期研究发现，G蛋白-AC-cAMP信号通路介导了实验性关节炎大鼠FLS的异常增殖；在胶原性关节炎大鼠FLS中Gαi蛋白表达上调、

Gαs蛋白表达下调，GRK2的表达发生了异常改变，与病程发展有相关性。

本实验在首先发现AA模型大鼠骨髓源DCsβ2-AR胞膜表达下降的基础上，又进一步检测了影响其脱敏的负性调节蛋白GRK2在病程中的变化情况。结果显示，致炎后d21、d28，β2-AR的胞膜表达显著降低，GRK2的胞膜表达显著升高；基因水平显示，AA模型组DCsβ2-AR mRNA、GRK2 mRNA无显著变化。以上结果提示，胞膜中β2-AR的下降可能与负性调节蛋白GRK2转膜增加有关。在对FLS的研究中，我们采用Western blot法检测了胞膜中β2-AR、GRK2和β-arrestin2的表达情况，结果显示，AA大鼠FLS胞膜中β2-AR表达显著降低，与流式结果一致；β2-AR负性调节蛋白GRK2、β-arrestin2在胞膜中表达显著升高。β2-AR信号下游的第二信使cAMP水平是影响FLS功能的关键信号分子，其表达情况如何？实验结果发现，AA模型组cAMP水平明显低于对照组；经ISO刺激后对照组和AA模型组cAMP水平均显著升高，但AA模型组cAMP水平均显著低于对照组。

根据以上结果我们推测，AA大鼠GRK2、β-arrestin2转膜增加，使胞膜β2-AR表达下降，同时在配体刺激后，β2-AR脱敏程度升高，使得其胞膜表达的降低程度明显低于对照组；β2-AR信号减弱，抑制了cAMP水平的升高，从而发挥了对

DCs和FLS功能的影响。GRK2、β-arrestin2的转膜增加可能与炎症反应中各种刺激因子的升高引起机体保护性转膜亢进有关，但其在AA疾病状态下的异常改变具体通过何种机制，受何种信号分子调节尚不清楚，有待于进一步的实验研究揭示其具体机制，为GRK和β-arrestin成为治疗或改善GPCR异常调节性疾病的新靶点提供实验和理论依据。

另外，临床研究发现，与健康志愿者相比，RA患者的血浆中AR激动剂儿茶酚胺类物质明显升高，可能与其交感神经系统和下丘脑-垂体-肾上腺素轴异常有关[94]。结合本实验的结果，DCs和FLS中β2-AR信号减弱，儿茶酚胺类神经递质通过该受体发挥促进免疫耐受的能力下降，通过AR其他信号促进免疫应答的能力增强，这可能是导致应激状态后RA症状加剧的原因之一。

实验结果中，值得我们注意的是从ISO对AA大鼠FLS胞内cAMP水平和增殖能力之间的关系发现，ISO能显著提高AA大鼠FLS胞内cAMP的水平，但对FLS的增殖能力虽有部分下调但无明显抑制作用，即增殖的结果与cAMP的水平不完全一致，推测由于胞膜GRK2、β-arrestin2水平的增高，是否激活了与增殖密切相关的p-ERK的水平呢？ERK属于丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）家族成员，是细胞信号转导的重要分子，能将多种胞外信号（如细胞因子）传递至胞核，从而激活核转录因子，调节细胞的功能。ERK活化后即成为p-ERK，可进入胞核，在细胞的生长、发育、增殖和分化中发挥重要作用[95,96,97]。β-arrestin2作为支架蛋白可以活化Raf-MEK-ERK信号级联，虽然此种活化可以不依赖于β-arrestin2与受体的结合，但需要β-arrestin2的转膜[98,99,100]。本实验经Western blot法检测发现，与对照组相比，AA模型组p-ERK水平明显增高，与文献报道相一致；同等条件下对照组和AA模型组FLS经ISO刺激，AA模型组p-ERK水平显著高于对照组；与未刺激组相比，ISO能显著升高AA模型组FLS p-ERK的水平，对对照组无明显影响。以上结果提示，AA大鼠FLS经ISO刺激后更容易引起p-ERK水平的升高，从而减弱了ISO对FLS的抑制增殖作用。由此我们推测，AA状态下GRK2、β-arrestin2转膜的增加，促进了ERK的活化，即p-ERK水平的升高，鉴于其促增殖的作用，从而可能减弱了ISO的抑制作用。

因此，综合本实验以上结果，靶向于调节GRK2、β-arrestin2的转膜过程，上调β2-AR胞膜的表达，恢复GPCR信号通路的正常转导，可能是治疗RA等自身免

疫病异常信号转导的新策略。

结 论

1. β2-AR信号参与了对DCs和FLS功能的调节。

（1）β2-AR信号可以通过促进DCs抗原的摄取，抑制抗原的提呈，抑制MLR等过程影响DCs的功能。

（2）β2-AR信号的激活可以抑制FLS的增殖。

2. β2-AR信号在AA大鼠DCs和FLS中的异常是其对激动药反应存在差异的原因。

（1）AA大鼠DCs和FLS中β2-AR膜表达下降是其对激动药反应减弱的重要原因。

（2）AA大鼠GRK2、β-arrestin2转膜的增加，导致β2-AR脱敏的增强，可能是β2-AR膜表达下降主要原因。

（3）β-arrestin2转膜的增加，导致p-ERK表达的增高，也可能是AA大鼠FLS

对β-AR激动药反应减弱的原因。

# 本研究创新点

1. 首次发现了β2-AR在AA大鼠DCs和FLS胞膜上表达下降，揭示了AA病理

条件下β2-AR信号的异常变化。

2. 探讨了AA病理条件下GRK2、β-arrestin2转膜的增加可能是β2-AR胞膜表达降低，β2-AR信号异常的重要原因，以上内容未见文献报道。

3. AA病理条件下β2-AR信号的异常可能是影响DCs抗原摄取、提呈能力及FLS

功能异常的重要原因，以上内容未见文献报道。

# 下一步工作设想

1. 进一步探讨DCs上β2-AR信号通过何种机制调节抗原的摄取和MHC-II分子的表达。

2. 进一步研究β2-AR信号对DCs和FLS细胞之间相互作用的影响。

3. 深入探讨AA疾病状态下GRK2、β-arrestin2转膜增加的具体机制。

4. 寻找作用于转膜过程靶点的新药物，恢复β2-AR信号的正常功能。

参考文献

[1]. Tanaka Y. Pathological mechanisms in rheumatoid arthritis. Nihon Rinsho. 2013; 71(7): 1147-52.

[[2]. Grekhov RA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Grekhov%20RA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23480004) [Kharchenko SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kharchenko%20SA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23480004), [Suleĭmanova GP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sule%3Fmanova%20GP%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23480004), [Aleksandrov AV,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Aleksandrov%20AV%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23480004) [ZborovskiĭAB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zborovski%3F%20AB%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23480004).

Rheumatoid arthritis: psychosomatic aspects. [Ter Arkh.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480004) 2012;84(12):125-30.

[3]. Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014; 53C: 23-34.

[4]. Neufeld KM, Karunanayake CP, Maenz LY, Rosenberg AM. [Stressful life events antedating chronic childhood arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950190) J Rheumatol. 2013; 40(10): 1756-65.

[5]. Sil S, Lynch-Jordan A, Ting TV, Peugh J, Noll J, Kashikar-Zuck S. Influence of family environment on long-term psychosocial functioning of adolescents with juvenile fibromyalgia. Arthritis Care Res (Hoboken). 2013; 65(6): 903-9.

[6]. Capellino S, Straub RH. Neuroendocrine immune pathways in chronic arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2008; 22(2): 285-97.

[[7]. Scantamburlo G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Scantamburlo%20G%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22891473) [Scheen AJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Scheen%20AJ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22891473). Role of psychosocial stress in complex diseases. [Rev Med Liege.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891473) 2012; 67(5-6): 234-42.

[8]. Waldburger JM, Firestein GS. Regulation of Peripheral Inflammation by the Central Nervous System. Curr Rheumatol Rep. 2010; 12: 370-8.

[9]. Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. Journal of Leukocyte Biology. 2006; 79: 1093-1104.

[10]. Harle P, Mobius D, Carr DJ, Scholmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen- induced arthritis. Arthritis Rheum. 2005; 52: 1305-13.

[11]. Lorton D, Lubahn C, Sweeney S, Major A, Lindquist CA, Schaller J, Washington C, Bellinger DL. Differences in the injury sprouting response of splenic noradrenergic nerves in Lewis rats with adjuvant-induced arthritis compared with rats treated with 6-hydroxydopamine. Brain Behav Immun. 2009; 23(2): 276-85.

[[12]. Padro CJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Padro%20CJ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24486056), [Sanders VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sanders%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24486056). Neuroendocrine regulation of inflammation. [Semin Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486056) 2014 Jan 30. [Epub ahead of print]

[13]. Maslov LN, Hedrick JP, Krylatov AV, Lishmanov AIu, Barzakh EI, Naryzhnaia NV, Zhang I, Portnichenko AG, Podoksenov IuK. Receptor and signalling mechanisms

Of antiarrhythmic effects of ischemic pre-conditioning. [Ross Fiziol Zh Im I M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789436) [Sechenova.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789436) 2013;99(3):320-38.

[14]. Cotecchia S. Theα1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. J Recept Signal Transduct Res. 2010; 30(6): 410-9.

[15]. Zhu W, Woo AY, Zhang Y, Cao CM, Xiao RP. β-adrenergic receptor subtype signaling in the heart: from bench to the bedside. Curr Top Membr. 2011; 67: 191-204.

[16]. ChottováDM, Slavíko váJ. Adrenergic regulation of the mammalian heart. Cesk Fysiol. 2011; 60(1): 14-9.

[[17]. Ciccarelli M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ciccarelli%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24106479), [Santulli G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Santulli%20G%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24106479), [Pascale V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pascale%20V%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24106479) [Trimarco B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Trimarco%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24106479), [Iaccarino G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Iaccarino%20G%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24106479). Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease. [Front Physiol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106479) 2013; 4: 265.

[18]. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. Pharmacol Rev. 2001; 53(4): 487-525.

[19]. Straub RH, Härle P. Sympathetic Neurotransmitters in Joint Inflammation. Rheum Dis Clin N Am. 2005; 31: 43-59

[20]. Qiao SW, Iversen R, Ráki M, Sollid LM. The adaptive immune response in celiac disease. Semin Immunopathol. 2012; 34(4): 523-40.

[[21]. Calderon B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Calderon%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22178549) [Unanue ER](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Unanue%20ER%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22178549). Antigen presentation events in autoimmune diabetes. [Curr Opin Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178549) 2012; 24(1): 119-28.

[[22]. Xu W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xu%20W%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24432021), [Banchereau J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Banchereau%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24432021). The Antigen Presenting Cells Instruct Plasma Cell Differentiation. Front Immunol. 2014; 4: 504.

[23]. Rodríguez -Fernández JL. [Antigen presentation by dendritic cells in rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23574520) Curr Top Med Chem. 2013; 13(6): 712-9.

[24]. Zhao Y, Zhang A, Du H, Guo S, Ning B, Yang S. Tolerogenic dendritic cells and rheumatoid arthritis: current status and perspectives. Rheumatol Int. 2012; 32(4): 837-44

[25]. Albani S, Koffeman EC, Prakken B. Induction of immune tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7(5): 272-81.

[[26]. Apostolopoulos V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Apostolopoulos%20V%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24228179), [Thalhammer T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thalhammer%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24228179) [Tzakos AG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tzakos%20AG%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24228179), [Stojanovska L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stojanovska%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24228179). Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. [J Drug Deliv.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228179) 2013; 2013: 869718.

[[27]. Steinman RM.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Steinman%20RM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22136168) Decisions about dendritic cells: past, present, and future. [Annu Rev Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136168) 2012; 30: 1-22.

[[28]. Gordon JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gordon%20JR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24550907), [Ma Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ma%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24550907) [Churchman L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Churchman%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24550907) [Gordon SA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gordon%20SA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24550907), [Dawicki W.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dawicki%20W%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24550907) Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases. [Front Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550907) 2014; 5: 7.

[29]. Li G, Kim YJ, Broxmeyer HE. Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high) -IL-12 absent dendritic cells with tolerogenic potential. J Immunol. 2005; 174: 4706-17.

[30]. Taams LS, Akbar AN. Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Curr Top Microbiol Immunol. 2005; 293: 115-31.

[31]. Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, Thomas R. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. Arthritis Res Ther. 2005; 7(2): R230-40.

[32]. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. Arthritis Res Ther. 2007; 9(4): 219.

[33]. Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. Immunity. 2008; 29: 362-71.

[34]. Murphy SP, Porrett PM, Turka LA. Innate immunity in transplant tolerance and rejection. Immunol Rev. 2011; 241: 39-48.

[35]. Leech MT, Morand EF. Fibroblasts and synovial immunity. [Curr Opin Pharmacol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611654) 2013; 13(4): 565-9.

[36]. Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. 2011; 23(3): 233-40.

[37]. Cooles FA, Isaacs JD. [Pathophysiology of rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427580) Curr Opin Rheumatol. 2011; 23(3): 233-40.

[38]. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. Nat Rev Rheumatol. 2013; 9(1): 24-33.

[39]. Mishima K, Otani H, Tanabe T, Kawasaki H, Oshiro A, Saito N, Ogawa R, Inagaki C. [Molecular mechanisms for alpha2-adrenoceptor-mediated regulation of synoviocyte populations.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325013) Jpn J Pharmacol. 2001; 85(3): 214-26.

[40]. Dou Y, Tong B, Wei Z, Li Y, Xia Y, Dai Y. [Scopoletin suppresses IL-6 production from fibroblast-like synoviocytes of adjuvant arthritis rats induced by IL-1βstimulation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455774) Int Immunopharmacol. 2013; 17(4): 1037-43.

[41]. Jia XY, Chang Y, Sun XJ, Wu HX, Wang C, Xu HM, Zhang L, Zhang LL, Zheng YQ, Song LH, Wei W. Total glucosides of paeony inhibit the proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the regulation of G proteins in rats with collagen-induced arthritis. Int Immunopharmacol. 2014; 18(1): 1-6.

[[42]. Homan KT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Homan%20KT%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23151001), [Glukhova A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Glukhova%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23151001), [Tesmer JJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tesmer%20JJ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23151001). Regulation of G protein-coupled receptor kinases by phospholipids. [Curr Med Chem.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151001) 2013; 20(1): 39-46.

[43]. Lymperopoulos A. GRK2 andβ-arrestins in cardiovascular disease: Something old, something new. Am J Cardiovasc Dis. 2011; 1(2): 126-37.

[44]. Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of glucosides of chaenomeles speciosa on collagen-induced arthritis in rats. Int Immunopharmacol. 2003; 3: 593-608.

[45]. Zhang LL, Wei W, Wang NP, Wang QT, Chen JY, Chen Y, Wu H, Hu XY. Paeoniflorin suppresses inflammatory mediator production and regulates G protein-coupled signaling in fibroblast-like synoviocytes of collagen induced arthritic rats. Inflamm Res. 2008; 57: 388-95.

[46]. 方航荣, 陈丽红, 邱明链, 刘景丰, 黄爱民. 大鼠骨髓来源树突状细胞的体外培养与鉴定. ft西医科大学学报. 2010; 41 ( 8): 740-4.

[[47]. Song Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Song%20Q%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953), [Meng Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Meng%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953) [Wang Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953) [Li M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953), Zhang J, [Xin S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xin%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953), [Wang L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953) [Shan F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shan%20F%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24095953). Maturation inside and outside bone marrow dendritic cells (BMDCs) modulated by interferon-α(IFN-α). [Int Immunopharmacol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095953) 2013; 17(3): 843-9.

[[48]. Li H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Liu L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Tao Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tao%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Zhao P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhao%20P%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086), [Wang F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20F%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Huai L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huai%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Zhi D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhi%20D%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Liu J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086), [Li G,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20G%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Dang C,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dang%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086) [Xu Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xu%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24216086). Effects of polysaccharides from Pholiota nameko on maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. [Int J Biol Macromol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24216086) 2014; 63: 188-97.

[49]. 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 黄蓓, 吴育晶, 汪庆童, 常艳, 张运芳, 周爱武,

刘丽华, 张玲玲, 魏伟. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标.中国免疫学杂志. 2012;28(5):453-7.

[[50]. Song YY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Song%20YY%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21351587) [Li Y,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21351587) [Zhang HQ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20HQ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21351587). Therapeutic effect of syringin on adjuvant arthritis in rats and its mechanisms. [Yao Xue Xue Bao.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=yao%2BXue%2BXue%2BBao.%2B2010%3B%2B45(8)%3A1006-11) 2010; 45(8): 1006-11.

[51]. Wang D, Chang Y, Wu Y, Zhang L, Yan S, Xie G, Qin Q, Jin J, Wang W, Fang J, Wei W. [Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155990) Clin Exp Immunol. 2011; 163(2): 225-34.

[52]. 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学（第4版）. 北京: 人民卫生出版社,

2010; 1264-5

[53]. 缪成贵, 杨剑婷, 何华奇, 马世堂, 周国梁, 高敏, 刘健. 白头翁皂苷调控RA模型大鼠FLS SFRP2表达. 中国中药杂志. 2013; 38(12): 1977-81.

[54].魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学（第4版）. 北京: 人民卫生出版社,

2010; 336-9.

[55]. 刘小荣, 张笠, 王勇平. 实时荧光定量PCR技术的理论研究及其医学应用. 中国组织工程研究与临床康复. 2010; 14(2): 329-32.

[56]. Chijioke O, Münz C. [Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273539) Front Immunol. 2013; 4: 365.

[57]. Yin W, Ouyang S, Li Y, Xiao B, Yang H. Immature dendritic cell-derived exosomes: a promise subcellular vaccine for autoimmunity. [Inflammation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956173) 2013; 36(1): 232-40.

[58]. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. Front Immunol. 2013; 4: 438.

[59]. Remes Lenicov F, Rodriguez Rodrigues C, SabattéJ, Cabrini M, Jancic C, Ostrowski M, Merlotti A, Gonzalez H, Alonso A, Pasqualini RA, Davio C, Geffner J, Ceballos A. Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. J Immunol. 2012; 189(10): 4777-86.

[60]. Lu M, Dawicki W, Zhang X, Huang H, Nayyar A, Gordon JR. Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma. Allergy. 2011; 66(5): 612-20.

[61]. Schmidt LM, Belvisi MG, Bode KA, Bauer J, Schmidt C, Suchy MT, Tsikas D, Scheuerer J, Lasitschka F, Gröne HJ, Dalpke AH. Bronchial epithelial cell -derived prostaglandin E2 dampens the reactivity of dendritic cells. J Immunol. 2011; 186(4): 2095-105.

[62]. Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. [Molecular targets of rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473901) Inflamm Allergy Drug Targets. 2008; 7(1): 53-66.

[63]. Wu H, Chen J, Wang Q, Jia X, Song S, Yuan P, Liu K, Liu L, Zhang Y, Zhou A, Wei W. Ginsenoside metabolite compound K attenuates inflammatory responses of adjuvant-induced arthritis rats. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014; 36(2): 124-9.

[64]. Santiago-Schwarz F, Anand P, Liu S, Carsons SE. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. J Immunol. 2001; 167(3): 1758-68.

[65]. Yi HJ, Lu GX. Adherent and non-adherent dendritic cells are equivalently qualified in GM-CSF, IL-4 and TNF-αculture system. Cell Immunol. 2012; 277(1-2): 44-8.

[66]. Nishii M, Inomata T, Niwano H, [Takehana H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takehana%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771) [Takeuchi I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takeuchi%20I%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771) [Nakano H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nakano%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771) [Shinagawa H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shinagawa%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771) [Naruke T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Naruke%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771) [Koitabashi T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koitabashi%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771), [Nakahata J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nakahata%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771), [Izumi T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Izumi%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16908771). Beta2-Adrenergic agonists suppress rat autoimmune myocarditis: potential role of beta2-adrenergic stimulants as new therapeutic agents for myocarditis. [Circulation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=(Autoimmune%20Myocarditis)%20AND%20(%E5%B0%BE2-adrenergic%20receptor)) 2006; 114(9): 936-44.

[67]. Yanagawa Y, Matsumoto M, Togashi H. Enhanced dendritic cell antigen uptake via alpha2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline. J Immunol. 2010; 185(10): 5762-8.

[68]. Azuma M, Ito D, Yagita H, et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. Nature. 1993; 366: 76-9.

[[69]. Lindell DM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lindell%20DM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18769622), [Berlin AA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berlin%20AA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18769622) [Schaller MA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schaller%20MA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18769622), [Lukacs NW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lukacs%20NW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18769622). B cell antigen presentation

Promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. [PLoS One.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769622) 2008;3(9):e3129.

[[70]. Podojil JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Podojil%20JR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15797507), [Sanders VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sanders%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15797507). CD86 and beta2-adrenergic receptor stimulation regulate B-cell activity cooperatively. Trends Immunol. 2005; 26(4): 180-5.

[71]. Rupanagudi KV, Kulkarni OP, Lichtnekert J, Darisipudi MN, Mulay SR, Schott B, Gruner S, Haap W, Hartmann G, Anders HJ. Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming. [Ann Rheum Dis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300027) 2013 Dec 3. [Epub ahead of print]

[72]. Sarkar S, Fox DA. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. Front Biosci. 2005; 10: 656-65.

[73]. Wu HX, Chen JY, Wang QT, Sun WY, Liu LH, Zhang LL, Wei W. Expression and function ofβ-arrestin 2 stimulated by IL-1βin human fibroblast-like synoviocytes and the effect of paeoniflorin. Int Immunopharmacol. 2012; 12: 701-6.

[74]. Mizuno K, Takahashi HK, Iwagaki H, Katsuno G, Kamurul HA, Ohtani S, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes. Immunol Lett. 2005; 101(2): 168-72.

[75]. Itoh CE, Kizaki T, Hitomi Y, Hanawa T, Kamiya S, Ookawara T, Suzuki K, Izawa T, Saitoh D, Haga S, Ohno H. Down-regulation of beta2-adrenergic receptor expression by exercise training increases IL-12production by macrophages following LPS stimulation. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 322(3): 979-84.

[76]. Eijkelkamp N, Cobelens PM, Sanders VM, Heijnen CJ, Kavelaars A. [Tissue specific effects of the beta 2-adrenergic agonist salbutamol on LPS-induced IFN-gamma, IL-10 and TGF-beta responses in vivo.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081243) J Neuroimmunol. 2004; 150(1-2): 3-9.

[77]. Khoury SJ, Healy BC, Kivisäkk P, Viglietta V, Egorova S, Guttmann CR, Wedgwood JF, Hafler DA, Weiner HL, Buckle G, Cook S, Reddy S. [A randomized controlled double-masked trial of albuterol add-on therapy in patients with multiple](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837847)

[Sclerosis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837847) Arch Neurol. 2010;67(9):1055-61.

[78]. Axelrod S, Bielory L. [Beta2-agonists and paresthesias in multiple sclerosis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17225731) Ann Allergy Asthma Immunol. 2007; 98(1): 100.

[79]. Makhlouf K, Weiner HL, Khoury SJ. [Potential of beta2-adrenoceptor agonists as add-on therapy for multiple sclerosis: focus on salbutamol (albuterol).](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772115) CNS Drugs. 2002; 16(1): 1-8.

[80]. Nishii M, Inomata T, Niwano H, Takehana H, Takeuchi I, Nakano H, Shinagawa H, Naruke T, Koitabashi T, Nakahata J, Izumi T. Beta2-Adrenergic agonists suppress rat autoimmune myocarditis: potential role of beta2-adrenergic stimulants as new therapeutic agents for myocarditis. Circulation. 2006; 114(9): 936-44.

[81]. Yamaguchi T, Soma T, Takaku Y, Nakagome K, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. [Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523061) Int Arch Allergy Immunol. 2010; 152 Suppl 1: 32-40.

[[82]. HervéJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Herv%E8%8C%85%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) [Dubreil L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dubreil%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) [Tardif V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tardif%20V%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) [Terme M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Terme%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) [Pogu S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pogu%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884), [Anegon I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Anegon%20I%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884), [Rozec B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rozec%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) [Gauthier C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gauthier%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884), [Bach JM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bach%20JM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884), [Blancou P.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Blancou%20P%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23420884) β2-Adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. [J Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%E5%B0%BE2-Adrenoreceptor%2Bagonist%2Binhibits%2Bantigen%2Bcross-presentation%2Bby%2Bdendritic%2Bcells) 2013; 190(7): 3163-71.

[[83]. Gowthaman U](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gowthaman%20U%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24434326), [Rai PK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rai%20PK%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24434326), [Zeng W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zeng%20W%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24434326), [Jackson DC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jackson%20DC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24434326), [Agrewala JN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Agrewala%20JN%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24434326). Lipidated promiscuous peptide augments the expression of MHC-II molecules on dendritic cells and activates T cells. [Indian J Med Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434326) 2013; 138(5): 744-8.

[84]. Ishikawa R, Kajikawa M, Ishido S. [Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cells.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370470) Int Immunol. 2014; 26(5): 283-9.

[85]. Friese MA, Jones EY, Fugger L. [MHC II molecules in inflammatory diseases: interplay of qualities and quantities.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139566) Trends Immunol. 2005; 26(11): 559-61.

[86]. Andersson IE, Andersson CD, Batsalova T, Dzhambazov B, Holmdahl R, [Kihlberg J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kihlberg%20J%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21423632), [Linusson A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Linusson%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21423632). Design of glycopeptides used to investigate class II MHC binding and T-cell responses associated with autoimmune arthritis. [PLoS One.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423632) 2011; 6(3): e17881.

[87]. Friese MA, Jones EY, Fugger L. [MHC II molecules in inflammatory diseases:](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139566)

[Interplay of qualities and quantities.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139566) Trends Immunol. 2005;26(11):559-61.

[88]. Han SO, Kommaddi RP, Shenoy SK. Distinct roles forβ-arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins inβ2 adrenergic receptortrafficking. EMBO Rep. 2013; 14(2): 164-71.

[89]. Zhang P, He X, Tan J, Zhou X, Zou L. [β-arrestin2 mediatesβ-2 adrenergic receptor signaling inducing prostate cancer cell progression.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833475) Oncol Rep. 2011; 26(6): 1471-7

[[90]. Bruchas MR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bruchas%20MR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20401607), [Chavkin C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chavkin%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20401607). Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. Psychopharmacology (Berl). 2010; 210(2): 137-47.

[91]. Penela P, Murga C, Ribas C, Lafarga V, Mayor F JR. [The complex G protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590581)-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. Br J Pharmacol. 2010; 160(4): 821-32.

[92]. Suo WZ, Li L. Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease. Scientific World Journal. 2010; 10: 1667-78.

[93]. Belmonte SL, Blaxall BC. [G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778435) Circ Res. 2011; 109(3): 309-19.

[94]. Huyser B, Parker JC. Stress and rheumatoid arthritis: an integrative review. Arthritis Care Res. 1998; 11(2): 135-45.

[95]. Zhang B, Gu Y. Low expression of ERK signaling pathway affecting proliferation, cell cycle arrest and apoptosis of human gastric HGC-27 cells line. Mol Biol Rep. 2014 Feb 20. [Epub ahead of print]

[96]. Chen H, Cheng ZY, Pan Y, Wang Z, Liu Y, Zhang JQ. [RASAL1 influences the proliferation and invasion of gastric cancer cells by regulating the RAS/ERK signaling pathway.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531877) Hum Cell. 2014 Feb 15. [Epub ahead of print]

[97]. Teo ZL, McQueen-Miscamble L, Turner K, Martinez G, Madakashira B, Dedhar S, Robinson ML, de Iongh RU. [Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation anddifferentiation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472646) Exp Eye Res. 2014; 121: 130-42.

[98]. Sun WY, Song Y, Hu SS, Wang QT, Wu HX, Chen JY, Wei W. Depletion of

β-arrestin2 in hepatic stellate cells reduces cell proliferation via ERK pathway. J Cell Biochem. 2013;114(5):1153-62.

[99]. Kim YH, Lee SJ, Seo KW, Bae JU, Park SY, Kim EK, Bae SS, Kim JH, Kim CD. PAF enhances MMP-2 production in rat aortic VSMCs via aβ-arrestin2-dependent ERK signaling pathway. J Lipid Res. 2013; 54(10): 2678-86.

[100]. Qi S, Xin Y, Qi Z, Xu Y, Diao Y, Lan L, Luo L, Yin Z. [HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction withβ-arrestin2.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24308965) Cell Signal. 2014; 26(3): 594-602.

附**录**

**1个人简历**

姓名：吴华勋

出生年月：1978年10月籍贯：ft东微ft

专业：药理学

主要学习及工作经历：

1998年9月～2003年7月安徽医科大学临床医学系就读；

2003年9月～2005年7月安徽医科大学第一临床学院思想政治辅导员；

2005年9月～2008年6月安徽医科大学攻读药理学硕士学位，

获药理学硕士学位，导师：魏伟教授

2005年9月～至今安徽医科大学临床药理研究所工作；

2011年9月～至今安徽医科大学攻读药理学博士学位，

导师：魏伟教授

**2. 在读期间参与科研情况**

**2.1发表论文**

(1) **Wu HX**, Chen JY, Wang QT, Sun WY, Liu LH, Zhang LL, Wei W. Expression and function ofβ-arrestin 2 stimulated by IL-1βin human fibroblast-like synoviocytes and the effect of paeoniflorin. Int Immunopharmacol. 2012; 12:701-6.

(2) **Wu H**, Chen J, Wang Q, Jia X, Song S, Yuan P, Liu K, Liu L, Zhang Y, Zhou A, Wei W. Ginsenoside metabolite compound K attenuates inflammatory responses of adjuvant-induced arthritis rats. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014;36(2): 124-9.

(3) **Wu HX**, Chen JY, Yuan PF, Song SS, Wang QT, Jia XY, Wei W. Reduced

β2-adrenergic receptor signaling in dendritic cells involved in the abnormal immune response of adjuvant arthritis. J Immunol. (submitted)

(4) Wang C, Yuan J, **Wu HX(共同第一作者)**，Chang Y, Wang QT, Wu YJ, Liu LH, Wei W. Paeoniflorin inhibits inflammatory responses in mice with allergic contact dermatitis by regulating the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Inflamm Res. 2013;62(12):1035-44.

（5）**吴华勋，**魏伟.改善病情抗风湿药和生物制剂在类风湿关节炎临床应用中的新认识.临床合理用药.2014;7(2B):176-7.

（6）**吴华勋**，陈镜宇，汪庆童，孙妩弋，常艳，吴育晶，张玲玲，魏伟.白芍总苷对胶原性关节炎大鼠滑膜β-arrestins的影响与其抑制滑膜细胞增殖的关系. 中国药理学通报，2012; 28(7)：934-7.

（7）**吴华勋**，魏伟. Th22细胞在炎症性疾病中的研究进展.免疫学志,2012; 28(9)：816-9.

（8）**吴华勋**，陈镜宇，汪庆童，吴育晶，宋姗姗，黄蓓，常艳，张玲玲，魏伟. 重组人肿瘤坏死因子受体融合蛋白体外对佐剂性关节炎大鼠T淋巴细胞功能的影响.安徽医科大学学报，2012;47(11)：1324-8.

2.2参与课题情况

(1)国家自然科学基金项目《肾上腺素受体及其信号对胶原性关节炎小鼠树突细胞的调节作用及机制》（2014年-2016年, 编号81302784）（Ⅱ类，主持）

（2）安徽高等学校省级自然科学基金《TRAF6—NF-κB通路在痛风性关节炎大鼠滑膜细胞中的作用及IL-1Ra的影响》（2011年-2013年, 编号KJ2011Z181）（Ⅳ类，主持）

（3）国家自然科学基金项目《β-arrestin2调控腺苷A2A受体信号通路在甲氨蝶呤抑制关节滑膜炎中的作用》（2013年-2015年, 编号81202541）（Ⅱ类，第二）

（4）国家自然科学基金项目《芍药苷-6-氧-苯磺酸酯在大鼠体内代谢及其活性代谢产物的研究》（2014年-2016年, 编号81302845）（Ⅱ类，第二）

（5）安徽省自然科学基金《β-arrestin2在人滑膜细胞前列腺素受体2脱敏和内吞中的作用及分子机制》（2012年~2013年, 编号1208085QH146）（Ⅲ类，第二）

（6）安徽高等学校省级自然科学研究重点基金《芍药苷-6-O-乙酸酯的合成及其抗炎免疫调节活性研究》（2012年-2015年, 编号KJ2013A158）（Ⅲ类，第二）

（7）安徽高等学校省级自然科学研究基金《G蛋白偶联受体激酶2对类风湿关节炎T淋巴细胞功能的影响及芍药苷的作用》（2011年-2013年, 编号KJ2011Z180）（Ⅳ类，第二）

（8）高等学校省级优秀青年人才基金《酪氨酸激酶在TNF-α调节前列腺素E2

受体脱敏中的作用及机制》（2012 年-2014 年, 编号2012SQRL268）（Ⅳ类，第二）

（9）国家自然基金重点项目：新型活性单体芍药苷-6-氧-苯磺酸酯在类风湿关节炎免疫应答与炎症中的调控作用（2014年-2016年, 编号81330081）（Ⅰ类，第八）

（10）国家自然基金项目《B细胞刺激因子BAFF-R、BCMA和TACI介导信号和相互关系在胶原性关节炎发病中作用及受体抑制剂对其的影响》(2012年-2014年, 编号81173075)（Ⅱ类，第五）

（11）教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目《IgD对类风湿关节炎患者淋巴细胞活化的影响及IgD受体样融合蛋白的作用》(2013年~2015年, 20123420110003) (Ⅱ类，第七)

（12）国家自然基金《B淋巴细胞刺激因子通过其受体介导实验性关节炎的病理机制及TACI-Ig的治疗作用》(2010年~2013年, 编号30973543)（Ⅱ类，第八）

**2.3参加会议情况**

2011年10月参加安徽省药理学会第六届三次学术年会；

2012年9月参加安徽省药理学会第六届四次学术年会；

2012年10月参加中国药理学会临床药理专业委员会学术年会；

2013年7月参加亚太药理学会议；

2013年12月参加安徽省药理学会第七届一次学术年会；

**2.4获奖情况**

2012年获得首届“博士研究生国家奖学金”。

致**谢**

时光悄然飞逝，三年的博士生涯即将结束；回首三年的求学历程，在各位师长、同事、亲友的支持帮助下，虽不免辛苦却收获颇丰。

最衷心的感谢献给我的导师魏伟教授！

师恩如海，师训铭心。进入药理研究所这个大家庭近10年来，自己在工作、学业上的每一点进步，都离不开恩师的谆谆教诲和亲切关怀。我心存无限感激，却鉴于平时不善言辞，借此机会献上最诚挚的谢意和祝福。感谢您在科研道路上的精心指导，您严谨的治学态度、慎密的学术思维、开拓创新的学术视野和对科研事业矢志不渝的追求精神，是我们终生学习的楷模；感谢您在生活上的亲切关怀，您高尚的师德、开阔的胸襟，为我们如何为人处世指明了方向。您拥有的人格魅力让我深深敬佩，在这里祝您永远健康快乐！

进入药理研究所近10年来，深切体会到了这个大家庭的温馨与和睦、积极与上进，这是一个团结向上、朝气蓬勃的团队，这是一个严肃不失活泼、继承不失创新的团队，为生活、工作在这样一个优秀的团体里感到无尚的骄傲。

衷心感谢吴成义老师在工作、生活上的关心和支持！吴老师热情开朗的性格，幽默诙谐的言语，乐观豁达的态度，乐于助人的风格，使我深表敬佩；对其给予的热情帮助深表谢意。

衷心感谢课题组陈镜宇老师，几年来课题能顺利开展离不开她的密切配合与无私帮助；她不计个人得失的大局意识，团结协作的良好素质使我铭记在心。

在三年的博士学业中，药理研究所周爱武老师、张运芳老师、严尚学老师、张玲玲老师、路景涛老师、刘丽华老师、邝荔香老师、洪玲老师、萧峰老师、常艳老师、孙妩弋老师、汪庆童老师、吴育晶老师，黄琼老师，王春老师，马旸老师均予以了积极的帮助，在此一并表示感谢。

感谢硕士研究生袁平凡、宋莎莎、芮贝贝、任淑珍、刘亢亢、李培培、付静静等，在我需要你们协助时，总是能热情的伸出援手，对于实验的辛苦与繁琐，毫无怨言，在这里衷心的对你们说声“谢谢”。

感谢安徽医科大学病理科杨峰老师、赵文娣老师在病理技术方面给予的支持；感谢安徽医科大学动物实验中心黄德武主任和吕伟老师对动物实验方面的帮助。

感谢我的母亲和爱人对自己学业和工作的理解与鼎力支持，你们是我前进中坚实的后盾；虽然陪你们的时间少了，但你们从无怨言，一如既往的关心与支持是我最大的欣慰。

科研无止境，课题中的不足和浅显之处将是自己继续前行，不断探索的方向。

今后将继续加强创新思维的培养、实验技能的提高，课题的深入研究，以实际行动回报各位师长、朋友、家人的关心与帮助。

**综述**

**肾上腺素受体及其信号在类风湿关节炎中的研究进展**

**[摘要]：**类风湿关节炎（RA）的真正病因尚未阐明，但精神神经因素参与了RA

的发病过程，其通过影响下丘脑-垂体-肾上腺素轴，交感神经系统参与对RA的调节。肾上腺素受体（AR）是其发挥神经免疫调节的关键受体，可能参与了RA的发生、发展过程。本综述从AR的分型及特征，AR及其配体在RA中的表达和功能，AR对RA的关键免疫细胞T、B淋巴细胞的调节等方面，做一综述，以期了解AR及其信号在RA中的研究进展。

类风湿关节炎（Rheumatoid arthritis, RA）是一种免疫系统介导的炎症性疾病，全世界范围内大约有1%的发病率[1]。RA的特征性病变是滑膜的炎症，及由此导致的骨和软骨的破坏[2, 3]。虽然目前RA的真正病因尚未阐明，但几方面的因素可能参与了RA的发病过程，包括遗传因素、慢性感染、应激等[4, 5, 6]。

应激目前被认为是RA的重要风险因素，应激系统的激活将影响下丘脑-垂体-肾上腺素轴，交感神经系统，二者能直接影响免疫系统，参与对RA的调节[7]。下丘脑-垂体-肾上腺素轴和交感神经系统主要通过分泌肾上腺素（adrenaline, Adr）和去甲肾上腺素（Norepinephrine, NE）等儿茶酚胺类物质发挥对免疫系统的调节，其受体为肾上腺素受体(adrenergic receptors, AR)[8,9]. AR是实现RA的神经免疫调节的关键受体，可能参与了RA的发生、发展过程[10]，现将AR及其信号在RA中的研究进展做一综述。

**1. AR的分型及特征**

AR属于G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族，根据对特异性配体的亲和力、激动后信号转导机制、生物学效应的特点，AR分为α1-AR、α2-AR、β-AR，每种受体又可分为三种亚型，如下图1所示。其中α1-AR偶联Gq蛋白，可激活包括磷脂酶A-花生四烯酸信号系统、酪氨酸激酶磷酸化系统与腺苷酸环化酶(AC) -cAMP信号通路等细胞内多条信号转导途径[11]。α2-AR与Gi/Go蛋白偶联，其激活后主要抑制AC的活性，降低细胞内cAMP的水平，抑制蛋白激酶A(PKA)对所调控的蛋白的磷酸化[12]。β-AR激活通过Gs蛋白刺激AC，导致细胞内cAMP水平增加，进一步激活PKA，PKA催化底物蛋白磷酸化发挥效应[13,14]。β1-AR主要分布于心血管系统中，激活后通过Gs蛋白刺激AC，导致细胞内cAMP水平增加，进一步激活PKA，PKA催化底物蛋白磷酸化发挥效应，调节包括舒张反应、正性变时、正性变力和能量代谢等功能。β2-AR在炎症反应中发挥抗炎作

83

用，抑制TNF-α激活，抑制白细胞黏附、降低毛细血管通透性等[15]。β3-AR信号传导途径目前尚存在疑问，也可以与Gi蛋白偶联，通过一氧化氮合酶(NOS)途径发挥作用[16]。



图1 肾上腺素受体的分型

From [www. iuphar. org/](http://www.iuphar.org/)

**2. AR配体在RA的表达及功能**

NE是AR在体内最重要的配体，主要由交感神经激活后分泌，其对AR的作用具有明显的浓度依赖性。NE浓度在10-5 M-10-6 M具有明显的免疫抑制作用[17]，可抑制巨噬细胞TNF-α的分泌，抑制中性粒细胞，NK细胞的功能[18]。NE的免疫刺激和免疫抑制效应具有明显的浓度差异[19]，如图2。NE浓度低于10-7 M时，体现出免疫刺激的效应，高于10-7 M时，具有明显的免疫抑制效应，两种效应的差异与其是否激活β-AR有关。

与健康志愿者相比，RA患者血浆中儿茶酚胺水平明显升高，NE/AD的比值下降，提示肾上腺髓质分泌的亢进[20]。然而，儿茶酚胺的水平受到精神神经系统的即时调节，可能与患者的精神状态也有着密切的关系。



图2 NE免疫反应的剂量效应曲线

摘自Straub RH等, Arthritis Rheum. 2005;52(1):16-26.

**3. AR在RA中的表达和功能**

适应性免疫细胞主要表达β2-AR，而固有免疫系统细胞除表达β2-AR外，还表达α1- AR和α2-AR，分别刺激巨噬细胞表面的各受体亚型，能引发不同的功能效应[21, 22]。巨噬细胞的活化能通过其表面α2-AR的刺激来实现，而β2-AR信号的激活能明显抑制巨噬细胞的活性。例如，在脓毒血症的后期，β2-AR的上调能明显抑制大鼠肝脏枯否细胞的功能，导致免疫抑制功能的产生[23]。很多AR亚型参与了RA病理机制过程，研究较多为β2-AR、α1- AR和α2-AR。

**（1）β2-AR在RA中的表达和功能**

β2-AR普遍表达在人和啮齿类动物的固有和适应性免疫细胞中[24]。与健康志愿者相比，RA患者外周血单核细胞(PBMCs)，特别是B细胞和CD8+T细胞上β2-AR表达明显下降[25]；RA患者滑液淋巴细胞中β2-AR的密度也显著降低[26]。因此，与健康志愿者相比，RA患者外周血PBMCs对NE刺激的反应性明显降低，如经NE处理后，其抑制T细胞增殖、活化和抑制细胞因子分泌的能力均明显下降[27]。在系统性、多关节型青少年RA患者中，经β2-AR激动剂刺激后，其cAMP水平未见明显升高，提示了其神经免疫反应的缺陷。

在对AA模型大鼠的研究中发现，在致炎前给予β2-AR激动剂可导致症状的进一步恶化，而给予β2-AR拮抗剂能显著降低关节的损伤，缓解症状；进一步的研究发现，在症状出现后给予β2-AR激动剂也可明显降低疾病的严重程度。以上结果说明，在RA的病程中β2-AR具有时间依赖的免疫调节效应[28]。

**（2）α-AR在RA中的表达和功能**

α-AR亚型在关节炎中的角色尚不清楚。正常情况下，α-AR表达于固有免疫细胞中，如α1-AR表达于自然杀伤细胞中，α2-AR表达于自然杀伤细胞、单核细胞和巨噬细胞中[29]。然而在体外研究中发现，使用β2-AR激动剂刺激正常单核细胞能诱导α1-AR的表达[30]。处于高疾病活动状态的RA患者，儿茶酚胺对PBMCs的作用主要通过激活α1-AR信号实现，而β2-AR在PBMCs中的密度明显下降。在青少年特发性关节炎患者淋巴细胞中α1-AR的表达上调，而在健康自愿者中较少表达，该受体的激活能诱导IL-6水平的升高。在成纤维样滑膜细胞中（fibroblast-like synoviocytes, FLS）α2-AR的激活，能明显促进FLS的增殖，促进细胞因子、蛋白酶等炎性因子的分泌，导致免疫细胞的募集，骨和软骨的破坏[31, 32]。以上的发现提示，在RA后期的慢性炎症阶段，α-AR的作用开始占据优势，β-AR的作用开始减弱，出现了β到α-AR的转变[33]。

通过实验性关节炎动物体内实验研究α-AR的功能，不同阶段给药得出了不同的结果。在疾病的不同时期使用非特异性α-AR拮抗药，对症状的影响完全不同，如在致炎前给药，非特异性α-AR拮抗药能显著恶化疾病的症状；症状出现后给药，能显著降低疾病的严重程度。然而，在致炎前使用选择性α1-AR拮抗药对实验性关节炎无明显影响，使用选择性α2-AR拮抗药能明显增加SD大鼠实验性关节炎的严重程度。因此，在致炎前给予非特异性α-AR拮抗药能显著恶化疾病的症状可能是通过对α2-AR的作用实现的。鉴于此，在致炎前进一步采用了α2-AR激动药，发现其能明显改善关节炎的炎性症状；而α1-AR激动药对实验性关节炎的影响尚未见文献报道[10]。

各AR激动药或拮抗药对实验性关节炎的影响见下表[10]。

表AR激动剂或拮抗剂对实验性关节炎的影响

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 干预药物 | 动物模型类型 | 干预时间 | 效应 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| α1-AR 拮抗剂哌唑嗪  α2-AR 激动剂可乐定  α-AR 激动剂去甲肾上腺素  α2-AR 拮抗剂育亨宾α-AR 拮抗剂酚妥拉明α-AR 拮抗剂酚妥拉明α-AR 拮抗剂酚苄明β1-AR 拮抗剂美托洛尔β2-AR 激动剂特布他林β2-AR 激动剂特布他林β2-AR 激动剂沙丁胺醇β2-AR 拮抗剂布托沙明  β-AR 激动剂异丙肾上腺素  β-AR 拮抗剂普萘洛尔 | AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠CIA 小鼠AA 大鼠AA 大鼠AA 大鼠 | 致炎前致炎前致炎前致炎前致炎时症状期致炎前致炎前致炎时症状期症状期致炎前致炎前致炎前 | 无 效  [34,35]  改善症状[35] 改善症状[35] 恶化症状[35] 恶化症状[28] 改善症状[28] 无效[36]  无 效 [36] 恶化症状[28] 改善症状[28] 改善症状[37] 改善症状[36]  无效[35]  改善症状[36] |

在对实验性关节炎动物使用AR激动药或拮抗药时，以上实验结果出现了完全不同的效应，这也许是由给药的时间决定的，AR在RA病程中具有时间依赖性的免疫调节作用，究其原因可能与不同时期参与的主要细胞不同有关。有学者根据RA病程中症状的出现与否，将RA分为两期，即无症状期和症状期。不同时期参与调节RA的细胞不同，如在无症状期主要是巨噬细胞、树突细胞、T细胞和B细胞等，在症状期主要为内皮细胞，成纤维细胞、骨细胞、软骨细胞、干细胞等[19,38]。AR对不同细胞的调节作用存在差异，这可能是其对RA的影响具有时间依赖性的原因。

**4. AR可能通过对T、B淋巴细胞等免疫细胞的调节参与RA的病理过程**

尽管RA的确切病因及发病机制尚不清楚，但T细胞介导的细胞免疫和B细胞介导的体液免疫功能紊乱在RA的发生、发展中起重要作用[39, 40]。因此，对T、B淋巴细胞的调节将直接影响RA的病程。B淋巴细胞表面β2-AR的表达是CD4+T细胞的2倍，CD4+T中Th0细胞经证实表达β2-AR m RNA, Th1细胞对β2-AR 激

动剂产生反应，但目前仍未探测到Th2上存在β2-AR的表达[41, 42]。

β2-AR激动剂可明显抑制CD4+T的增殖，降低IL-2的表达[43, 44]。在人T细胞中，β2-AR的激活可以抑制NF-κB的活化[45]。Th1细胞在NE作用下能产生更多的IFN-γ，但不影响Th1细胞的数量；NE对Th2细胞无明显效应[46, 47]。对RA患者T细胞亚群的分析可知，RA是Th1细胞偏倚且高表达IFN-γ为特征的病理过程[48]。综合以上信息可以推测，AR在Th0、Th1细胞中的激活，可以影响RA的进程。有学者还发现，β2-AR在RA患者Th0、Th1细胞中结构和表达的改变，提升了其对NE的反应性[49]。

分泌抗体是B细胞重要的功能之一，AR通过影响抗体的产生，可参与对B细胞的调节[50]。有研究报道，使用NE或β2-AR激动剂可以改变特异性抗体产生的水平，如在哮喘患者中单独使用β2-AR激动剂可以增加血清IgG的水平，但不影响其他抗体的产生，如IgE[51,52]. NE通过激活β2-AR信号，可以影响依赖

Th2细胞的抗体的产生，如IgG1，鉴于Th2细胞上没有β2-AR的表达，可以推测

NE直接通过靶向影响B细胞而发挥对抗体分泌的影响[53]。

此外，AR信号还广泛表达在树突细胞、巨噬细胞等免疫细胞中[54, 55]，通过对这些免疫细胞的调节，也发挥了对RA免疫应答反应的影响。

**5.小结**

AR作为联系神经系统与免疫系统的重要受体，可能参与了对RA的调节。很多实验研究了AR激动剂或拮抗剂对实验性关节炎动物的影响，证实了AR 在

RA中存在的作用，但具体机制尚未阐明，需要进一步的实验探讨，为AR在RA

病理机制中的作用和新的药物靶点的发现提供实验和理论依据。

参考文献

[1]. Nishimoril M, Ozaki S, Noguch M, Nieda T, Satoh T, Nakatani K, Nakajima T. Assessment of disease activity of rheumatoid arthritis by ultrasonography. Rinsho Byori. 2013; 61(9): 860-7.

[2]. Radenska-Lopovok SG. Cell and cytokine markers in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. Arkh Patol. 2013; 75(5): 58-62.

[3]. Danoff JR, Moss G, Liabaud B, Geller JA. [Total knee arthroplasty considerations in rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151549) Autoimmune Dis. 2013; 2013: 185340.

[4]. Iwata M, Ota KT, Duman RS. [The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261775) Brain Behav Immun. 2013; 31: 105-14.

[5]. Grekhov RA, Kharchenko SA, Suleĭmanova GP, Aleksandrov AV, ZborovskiĭAB. [Rheumatoid arthritis: psychosomatic aspects.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480004) Ter Arkh. 2012; 84(12): 125-30.

[6]. Rampton DS. The influence of stress on the development and severity of immune-mediated diseases. J Rheumatol Suppl. 2011; 88: 43-7.

[7]. Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. [Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468642) Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014; 53C: 23-34.

[8]. Kvetnansky R, Lu X, Ziegler MG. [Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054153) Adv Pharmacol. 2013; 68: 359-97.

[9]. Meier T, Noll-Hussong M. [The Role of Stress Axes in Cancer Incidence and Proliferation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446186) Psychother Psychosom Med Psychol. 2014 Jan 20. [Epub ahead of print]

[10]. Koopman FA, Stoof SP, Straub RH, Van Maanen MA, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. Mol Med. 2011; 17(9-10): 937-48.

[11]. Cotecchia S. Theα1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. J Recept Signal Transduct Res. 2010; 30(6): 410-9.

[12]. Cottingham C, Wang Q. [α2 adrenergic receptor dysregulation in depressive disorders: implications for the neurobiology of depression and antidepressant therapy.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910678) Neurosci Biobehav Rev. 2012; 36(10): 2214-25.

[13]. Calvert JW, Lefer DJ. [Role ofβ-adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817796) Physiology (Bethesda). 2013; 28(4): 216-24.

[14]. Zhu W, Woo AY, Zhang Y, Cao CM, Xiao RP. β-adrenergic receptor subtype signaling in the heart: from bench to the bedside. Curr Top Membr. 2011; 67: 191-204.

[15]. Sanders VM. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yetBrainBehavImmun. 2012; 26(2): 195-200.

[16]. Babol K, Błasiak J. [Beta3-adrenergic receptor.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209345) Postepy Biochem. 2005; 51(1): 80-7.

[[17]. Spengler RN,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Spengler%20RN%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8144901) [Chensue SW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chensue%20SW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8144901), [Giacherio DA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Giacherio%20DA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8144901) [Blenk N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Blenk%20N%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8144901), [Kunkel SL.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kunkel%20SL%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8144901) Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. [J Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Endogenous%2Bnorepinephrine%2Bregulates%2Btumor%2Bnecrosis%2Bfactor-) 1994; 152(6): 3024-31.

[18]. Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grässel S. [Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042746) Arthritis Rheum. 2012; 64(3): 729-39.

[19]. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. [How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641084) Arthritis Rheum. 2005; 52(1): 16-26.

[[20]. Lechin F,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lechin%20F%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [van der Dijs B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=van%20der%20Dijs%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [Lechin A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lechin%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [Orozco B,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Orozco%20B%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [Lechin M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lechin%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [Báez S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=B%E8%B0%A9ez%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062), [Rada I,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rada%20I%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) [León G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Le%E8%B4%B8n%20G%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062), [Acosta E.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Acosta%20E%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7996062) Plasma neurotransmitters and cortisol in chronic illness: role of stress. J Med. 1994; 25(3-4): 181-92.

[[21]. Nance DM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nance%20DM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17467231)1, [Sanders VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sanders%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17467231). Autonomic innervation and regulation of the immune system. [Brain Behav Immun.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nance%2BDM%2C%2BSanders%2BVM) 2007; 21(6): 736-45.

[22]. Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S, Molinaro C, Lubahn C, Lorton D. [Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308299) Cell Immunol. 2008; 252 (1-2): 27-56.

[23]. Wang SP, Li G. The progression ofβ-adrenergic modulation in sepsis. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2011; 23(8): 505-8.

[24]. Padro CJ, Sanders VM. [Neuroendocrine regulation of inflammation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486056) Semin Immunol. 2014 Jan 30. [Epub ahead of print]

[25]. Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ. [Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral bloodmononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094932) FASEB J. 1999; 13(6): 715-25.

[[26]. Baerwald CG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Baerwald%20CG%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586)1, [Laufenberg M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Laufenberg%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586), [Specht T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Specht%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586), [von Wichert P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=von%20Wichert%20P%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586), [Burmester GR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Burmester%20GR%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586), [Krause A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Krause%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9448586). Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. [Br J Rheumatol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Impaired%2Bsympathetic%2Binfluence%2Bon%2Bthe%2Bimmune%2Bresponse%2Bin%2Bpatients%2Bwith%2Brheumatoid%2Barthritis%2Bdue%2Bto%2Blymphocyte%2Bsubset-specific%2Bmodulation%2Bof%2Bbeta%2B2-adrenergic%2Breceptors) 1997; 36(12): 1262-9.

[27]. Wahle M, Neumann RP, Moritz F, Krause A, Buttgereit F, Baerwald CG. Beta2-adrenergic receptors mediate the differential effects of catecholamines on cytokine production of PBMC. J Interferon Cytokine Res. 2005; 25(7): 384-94.

[28]. Lubahn CL, Schaller JA, Bellinger DL, Sweeney S, [Lorton D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lorton%20D%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15331127). The importance of timing of adrenergic drug delivery in relation to the induction and onset of adjuvant-induced arthritis. Brain Behav Immun. 2004; 18(6): 563-71.

[29]. Grisanti LA, Woster AP, Dahlman J, Sauter ER, Combs CK, Porter JE. [α1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571945) J Pharmacol Exp Ther. 2011; 338(2): 648-57.

[[30]. Rouppe van der Voort C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rouppe%20van%20der%20Voort%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10229127)1, [Kavelaars A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kavelaars%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10229127), [van de Pol M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=van%20de%20Pol%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10229127), [Heijnen CJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Heijnen%20CJ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10229127). Neuroendocrine mediators up-regulate alpha1b- and alpha1d-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. [J Neuroimmunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=up-regulate%2Balpha1b-%2Band%2Balpha1d%2Badrenergic%2Breceptor) 1999; 95(1-2): 165-73.

[31]. Straub RH, Härle P. [Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639055) Rheum Dis Clin North Am. 2005; 31(1): 43-59,

[[32]. Mishima K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mishima%20K%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013), [Otani H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Otani%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013) [Tanabe T,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tanabe%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013) [Kawasaki H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kawasaki%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013), [Oshiro A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oshiro%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013) [Saito N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Saito%20N%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013), [Ogawa R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ogawa%20R%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013), [Inagaki C.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Inagaki%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11325013) Molecular mechanisms for alpha2-adrenoceptor-mediated regulation of synoviocyte populations. [Jpn J Pharmacol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=(fibroblast-like%2Bsynoviocytes)%2BAND%2Badrenergic%2Breceptors) 2001; 85(3): 214-26.

[[33]. Lorton D,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lorton%20D%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774) [Bellinger DL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bellinger%20DL%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774) [Schaller JA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schaller%20JA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774), [Shewmaker E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shewmaker%20E%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774), [Osredkar T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Osredkar%20T%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774), [Lubahn C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lubahn%20C%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24194774). Altered sympathetic-to-immune cell signaling viaβ2-adrenergic receptors in adjuvant arthritis. [Clin Dev Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194774) 2013; 2013: 764395.

[34]. Coderre TJ, Basbaum AI, Dallman MF, Helms C, Levine JD. Epinephrine exacerbates arthritis by an action at presynapticβ2-adrenoceptors. Neuroscience. 1990; 34(2): 521-3.

[35]. Coderre TJ, Basbaum AI, Helms C, Levine JD. High-dose epinephrine acts at alpha2-adrenoceptors to suppress experimental arthritis. Brain Res. 1991; 544(2): 325-8.

[36]. Levine JD, Coderre TJ, Helms C, Basbaum AI. Beta 2-adrenergic mechanisms in experimental arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(2): 4553-6.

[37]. Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, [Feldmann M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Feldmann%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10229875) The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. J. Immunol. 1999; 162(10): 6278-83.

[38]. Harle P, Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous system stimulates collagen-induced arthritis (CIA) in the induction phase and inhibits CIA in the late effector phase in DBA-1 mice. Arthritis Rheum. 2003; 48: S350.

[[39]. Tanaka Y.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tanaka%20Y%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23961659) Pathological mechanisms in rheumatoid arthritis. [Nihon Rinsho.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23961659) 2013; 71(7): 1147-52.

[40]. Scher JU. [B-cell therapies for rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259629) Bull NYU Hosp Jt Dis. 2012; 70(3): 200-3.

[41]. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. Pharmacol Rev. 2001; 53(4): 487-525.

[[42]. Swanson MA,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Swanson%20MA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11123297) [Lee WT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lee%20WT%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11123297), [Sanders VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sanders%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11123297). IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. [J Immunol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=IFN-%2B%2B%2Bproduction%2Bby%2BTh1%2Bcells%2Bgenerated%2Bfrom%2Bnaive%2BCD4() 2001; 166(1): 232-40.

[[43]. Wahle M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wahle%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023), [Stachetzki U](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stachetzki%20U%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023), [Krause A,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Krause%20A%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023) [Pierer M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pierer%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023), [Häntzschel H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=H%3Fntzschel%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023), [Baerwald CG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Baerwald%20CG%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11884023). Regulation of beta2-adrenergic receptors on CD4 and CD8 positive lymphocytes by cytokines in vitro. [Cytokine.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884023) 2001; 16(6): 205-9.

[44]. Loza MJ, Foster S, Peters SP, Penn RB. Beta-agonists modulate T-cell functions

Via direct actions on type 1 and type 2 cells. Blood. 2006;107(5):2052-60.

[45]. Kizaki T, Izawa T, Sakurai T, Haga S, Taniguchi N, Tajiri H, Watanabe K, Day NK, Toba K, Ohno H. Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappa Bactivation through beta-arrestin 2. Immunology. 2008; 124(3): 348-56.

[46]. Martino M, Rocchi G, Escelsior A, Fornaro M. [Immunomodulation Mechanism of Antidepressants: Interactions between Serotonin/NorepinephrineBalance and Th1/Th2 Balance.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204981) Curr Neuropharmacol. 2012; 10(2): 97-123.

[47]. Hou N, Zhang X, Zhao L, Zhao X, Li Z, Song T, Huang C. [A novel chronic stress](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036270)-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 439(4): 471-6.

[[48]. Guereschi MG,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guereschi%20MG%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577) [Araujo LP,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Araujo%20LP%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577) [Maricato JT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Maricato%20JT%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577), [Takenaka MC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Takenaka%20MC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577), [Nascimento VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nascimento%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577), [Vivanco BC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vivanco%20BC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577) [Reis VO,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reis%20VO%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577) [Keller AC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Keller%20AC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577), [Brum PC,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brum%20PC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577) [Basso AS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Basso%20AS%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23436577). Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. Eur J Immunol. 2013; 43(4): 1001-12.

[49]. Xu BY, Arlehag L, Rantapää-Dahlquist SB, Lefvert AK. beta2 Adrenoceptor gene single nucleotide polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis in northern Sweden. Ann Rheum Dis. 2005; 64(5): 773-6.

[50]. Bossaller L, Rothe A. [Monoclonal antibody treatments for rheumatoid arthritis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789825) Expert Opin Biol Ther. 2013; 13(9): 1257-72.

[[51]. Zhang JH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20JH%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601), [Hu CW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hu%20CW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601), [Zhu YZ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhu%20YZ%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601) [Liu SM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20SM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601), [Bai CS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bai%20CS%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601), [Han YF,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Han%20YF%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601) [Xia SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xia%20SL%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601) [Li YF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20YF%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23775601). Effects of norepinephrine on immune functions of cultured splenic lymphocytes exposed to aluminum trichloride. [Biol Trace Elem Res.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775601) 2013; 154(2): 275-80.

[[52]. Yu X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yu%20X%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180) [Stavrakis S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Stavrakis%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Hill MA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hill%20MA%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Huang S,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180) [Reim S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reim%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Li H,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20H%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180) [Khan M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Khan%20M%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Hamlett S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hamlett%20S%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Cunningham MW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cunningham%20MW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180), [Kem DC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kem%20DC%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22130180). Autoantibody activation of beta-adrenergic and muscarinic receptors contributes to an" autoimmune" orthostatic hypotension. [J Am Soc Hypertens.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130180) 2012; 6(1): 40-7.

[[53]. Kin NW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kin%20NW%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16531560), [Sanders VM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sanders%20VM%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16531560). It takes nerve to tell T and B cells what to do. [J Leukoc Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=It%2Btakes%2Bnerve%2Bto%2Btell%2BT%2Band%2BB%2Bcells%2Bwhat%2Bto%2Bdo) 2006; 79(6): 1093-104.

[54]. Botta F, Maestroni GJ. Adrenergic modulation of dendritic cell cancer vaccine in a mouse model: role of dendritic cell maturation. J Immunother. 2008; 31(3): 263-70.

[55]. Yang JH, Lee EO, Kim SE, Suh YH, Chong YH. Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid-βpeptide via action atβ-adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. Exp Neurol. 2012; 236(2): 199-206.