

PAD4-siRNA 调控 T 细胞亚群缓解 CIA 小鼠的疾病进展

芦彦蓉¹, 赵 凯², 庞春艳¹(包头医学院第一附属医院¹ 中心实验室、² 风湿免疫科, 包头 014010)

摘要 目的 探讨肽基精氨酸脱亚氨酶 4(PAD4)的小干扰 RNA(siRNA)载体病毒和感染 PAD4-siRNA 病毒的小鼠脾细胞对胶原诱导关节炎(CIA)小鼠治疗效果和潜在作用机制。方法 实验分对照组、模型组、治疗 1 组、治疗 2 组,每组 7 只小鼠。对照组小鼠不做任何处理,其余 3 组小鼠构建 CIA 模型,模型组小鼠注射磷酸盐缓冲液(PBS),治疗 1 组的小鼠注射 PAD4-siRNA 病毒载体;治疗 2 组的小鼠注射含有 PAD4-siRNA 病毒载体的小鼠脾细胞,每周 1 次,共 8 周。实验结束后处死小鼠,检测小鼠脾脏中滤泡辅助 T(Tfh)细胞、滤泡调节 T(Tfr)细胞、1 型辅助 T(Th1)细胞和 CD4⁺IL-10⁺ T 细胞的变化;观察 CIA 小鼠关节和软骨的病理变化。结果 与对照组比较,模型组小鼠的脾脏 Tfh 和 Th1 细胞的比例增加($P < 0.05$),Tfr 和 CD4⁺IL-10⁺ T 细胞比例无明显变化;与模型组比较,Tfh 和 Th1 细胞在治疗 1 组和治疗 2 组的比例下降($P < 0.05$),Tfr 和 CD4⁺IL-10⁺ T 细胞的比例无明显变化。对照组小鼠关节面光滑,模型组小鼠关节有炎性细胞浸润、关节面粗糙、软骨受损的现象;PAD4-siRNA 作用后,治疗 1 组 CIA 小鼠后爪的关节炎细胞浸润减少、软骨破坏程度降低;治疗 2 组 CIA 小鼠前爪和后爪的炎细胞浸润现象有所减轻,软骨损伤程度也得到了缓解。结论 抑制 PAD4 基因的表达后,CIA 小鼠脾脏 Tfh 和 Th1 细胞的相对数量下降,小鼠后爪的关节和软骨损伤得到缓解;注射感染 PAD4-siRNA 病毒的小鼠脾细胞,可缓解 CIA 小鼠前爪的病理变化。PAD4-siRNA 可以通过调控小鼠脾脏 T 细胞亚群对 CIA 小鼠发挥潜在治疗价值。

关键词 类风湿关节炎;肽基精氨酸脱亚氨酶 4;小干扰 RNA;1 型辅助 T 细胞;滤泡辅助 T 细胞;胶原诱导关节炎小鼠

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0272-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.012

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病。研究显示 RA 患者外周血中 1 型辅助 T(T helper type 1, Th1)细胞的比例升高^[1],滤泡辅助 T(T follicular helper, Tfh)细胞的比例上升^[2],滤泡调节 T(T follicular regulatory, Tfr)细胞比例下降^[3],调控 T 细胞亚群为治疗 RA 提供一种新途径^[4]。肽基精氨酸脱亚氨酶 4(peptidyl arginine deaminase 4, PAD4)在 RA 的发病过程中扮演重要角色^[5-7]。研究^[8]发现,胶原诱导型关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠淋巴结和腹膜中的巨噬细胞与 RA 患者的滑膜活检均表达 PAD4,进而诱导自身抗体的形成,在 RA 的病程进展中起关键作用。

课题组前期研究^[9]发现, PAD4 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)可以逆转 Th17/Treg 不平衡,缓解关节淋巴细胞的浸润,但由于 siRNA

载体在体内的持续时间短,影响其效果。因此,该研究将感染 PAD4-siRNA 病毒的小鼠脾细胞注射入 CIA 小鼠体内,从小鼠脾脏中 T 细胞亚群和关节病理的改变这两个方面比较脾细胞介导的 siRNA 注射与传统的直接病毒注射在治疗 CIA 小鼠中的疗效差异,为 RA 的治疗提供一种新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂 60 只 6~8 周龄、体重 18~22 g 的雄性 SPF 级 DBA/1 小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。实验操作严格遵循《实验动物使用及保护条例》的相关要求,并已获得包头医学院第一附属医院动物伦理委员会的批准,批准号:临研伦理第 2024005 号。

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 CD4 抗体(CD4-FITC)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠 CXCR5 趋化因子受体 5(C-X-C motif chemokine receptor 5, CXCR5)抗体(CXCR5-PE)、抗小鼠的干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)抗体、藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的抗小鼠 FOXP3 抗体(FOXP3-APC)和抗小鼠的白细胞介素 10(interleukin, IL-10)抗体(货号:

2024-09-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560270)

作者简介:芦彦蓉,女,主管检验师;

庞春艳,女,主任检验师,硕士生导师,通信作者, E-mail:

pchy_fighting@163.com

3073208、2504406、4278606、3037291、2798402, 美国 eBioscience 公司), 一抗均为 1 : 100; 牛 II 型胶原蛋白和完全 Freund 佐剂(货号: 190229、190214, 美国 Chondrex 公司)。

1.2 siRNA 序列设计 针对小鼠 PAD4 cDNA(序列号: NM_011 061) 基因设计 1 段 siRNA 片段, 序列为 5-AAGCGAGTTATGGGTCCAAAT-3, 位于 PAD4 cDNA 序列的 1 167 ~ 1 187。构建腺病毒载体并制备病毒液, 之后将病毒感染人胚肾 HEK 293 细胞进行病毒滴度的滴定, PAD4-siRNA 的病毒滴度为 1×10^{10} PFU/ml, 由上海吉凯基因科技有限公司完成。

1.3 小鼠脾脏的分离与脾细胞的培养及病毒感染

将 DBA1 小鼠处死, 在无菌的状态下取小鼠脾脏, 在细胞培养皿中用 RPMI 1640 培养基进行洗涤; 将洗涤过的脾脏移入细胞筛, 注射器研磨; 将研磨好的脾脏移入 15 ml 离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 加入 1 ml 裂红素作用 10 min, 1 500 r/min 离心 7 min, 弃上清液; 再次加入 6 ml RPMI 1640 培养基吹起沉淀, 1 000 r/min 离心 4 min, 弃上清液; 加入 3 ml 完全培养基, 移入细胞培养皿中, 放入细胞培养箱, 37℃、5% CO₂ 培养。次日, 将 5 μl PAD4-siRNA 的病毒液感染脾细胞, 48 h 收集小鼠脾细胞, 注射入 CIA 小鼠。

1.4 实验分组 60 只 DBA/小鼠, 其中 7 只作为对照组不参与造模过程, 剩下的 53 只小鼠建立 CIA 模型, 注射后的 21 d, 关节评分 ≥ 4 分的小鼠有 21 只, 进行后续实验。本研究设计了 4 个不同的组别, 分别为对照组、模型组、治疗 1 组和治疗 2 组, 每组 7 只小鼠。对照组为未处理的 DBA/小鼠; 模型组为 CIA 小鼠, 注射磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS); 治疗 1 组为 CIA 小鼠尾静脉直接注射 PAD4-siRNA 病毒液 5 μl + 100 μl PBS; 治疗 2 组为小鼠尾静脉注射感染病毒液的脾细胞, 将 5×10^6 细胞溶于 100 μl PBS 后尾静脉注射至 CIA 小鼠体内, 每组小鼠每周注射 1 次, 共注射 8 次, 之后处死各组小鼠。

1.5 小鼠脾脏 T 细胞亚群的流式细胞术检测 处死小鼠, 取小鼠的脾脏研碎, 离心后裂红, 洗涤 2 次, 移入细胞培养皿中, 将 PMA/Ionomycin 和 BFA/Monensin 的复合物添加到细胞中, 在 37℃、5% CO₂ 的环境中培养 14 h。收集细胞, 加 BD Pharmingen™ Stain Buffer 1 ml 离心后弃上清液; 加 BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Fixation Buffer 200 μl, 4℃下避光 30 min, 离心后弃上清液; 加 BD Pharmingen™

Mouse Foxp3 Permeabilization Buffer 200 μl, 离心后弃上清液; 加 BD Pharmingen™ Mouse Foxp3 Permeabilization Buffer 200 μl, 37℃下避光 30 min, 离心后弃上清液; 加 BD Pharmingen™ Stain Buffer 500 μl, 离心后弃上清液, 加 BD Pharmingen™ Stain Buffer, 分装到流式管中, 每管 100 μl; Tfr 管加 CD4、CXCR5 抗体各 1 μl, Tfr 管加 CD4、CXCR5 和 FOXP3 抗体各 1 μl, Th1 管加 CD4 和 IFN-γ 抗体各 1 μl, 将 CD4 和 IL-10 抗体各 1 μl 分别加入到 CD4⁺ IL-10⁺ T 细胞管, 4℃避光 1 h, 1 300 r/min 离心 5 min, 去除培养液的上清液后, 向细胞沉淀中加入 500 μl 的 BD Pharmingen™ 染色缓冲液, 轻轻混悬以重新悬浮细胞沉淀, 随后上机检测。

1.6 小鼠关节的病理改变 将实验小鼠前后爪的关节组织取出, 随后使用 4% 甲醛溶液进行固定处理, 接着进行石蜡包埋以保护组织结构, 将包埋后的组织切成薄片, 首先利用 HE 染色法对切片进行染色, 观察关节的病理性变化和细胞的浸润情况; 然后使用甲苯胺蓝染色法进一步观察关节软骨的形态变化。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。流式细胞术的实验结果通过单因素方差分析(ANOVA)来评估不同组之间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠骨组织中 PAD4 mRNA 的表达水平比较

与对照组比较, 模型组小鼠骨组织中 PAD4 mRNA 的表达水平升高($F = 18.64$, $P < 0.01$)。与模型组比较, PAD4-siRNA 作用后 PAD4 mRNA 的表达水平降低($F = 18.64$, 均 $P < 0.001$)。见图 1。

2.2 小鼠关节的 CT 结果和关节评分 模型组小鼠进行 CT 检查时发现, 关节表面不清晰, 同时伴有骨骼破坏的迹象。PAD4-siRNA 作用后关节面的界限基本清楚, 骨破坏程度减轻, 治疗 2 组小鼠关节面的界限与治疗 1 组相比更为清晰, 骨破坏减轻程度也更为明显。见图 2A。

在 PAD4-siRNA 治疗后 CIA 小鼠的关节评分显示出逐渐降低的趋势, 治疗 1 组和治疗 2 组小鼠第 3、4、5、6、7 和 8 周的关节评分与模型组小鼠比较差异有统计学意义($F = 5.05$, 均 $P < 0.05$; $F = 7.17$, 均 $P < 0.01$; $F = 19.89$, 均 $P < 0.001$; $F = 34.93$, 均 $P < 0.001$; $F = 67.36$, 均 $P < 0.001$; $F = 40.88$, 均 $P < 0.001$)。两个治疗组小鼠的关节评分比较差异无统计学意义, 其中, 治疗 2 组在关节评分上显示出

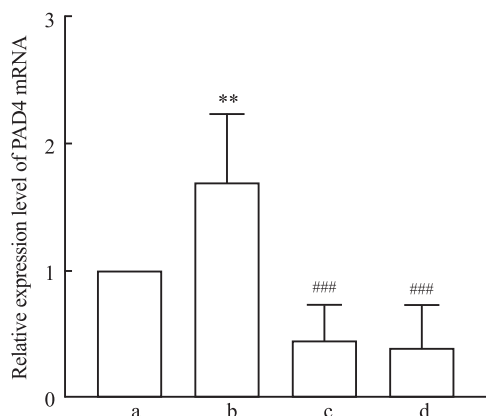


图1 CIA小鼠骨组织中PAD4 mRNA表达水平($n=7, \bar{x} \pm s$)

Fig.1 The expression levels of

PAD4 mRNA in bone tissue of CIA mice ($n=7, \bar{x} \pm s$)

a: Control group; b: Model group; c: Therapy group 1; d: Therapy group 2; ** $P < 0.01$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs Model group.

更低的数值。见图2B。

2.3 小鼠脾脏中 Tfh、Tfr、Th1 和 $CD4^+ IL-10^+$ T 细胞比例的变化 与对照组比较,模型组小鼠脾脏 Tfh 细胞数量增加($F = 10.72, P < 0.01$);与模型组比较,经 PAD4-siRNA 作用后治疗1组和治疗2组小鼠脾脏 Tfh 细胞的比例下降($F = 10.72$, 均 $P < 0.001$);治疗1组和治疗2组之间比较差异无统计学意义。Tfr 细胞比例在各组之间比较差异无统计学意义。见图3、4。

与对照组比较,模型组小鼠脾脏 Th1 细胞的数量增加($F = 6.64, P < 0.01$);与模型组比较,经 PAD4-siRNA 治疗后治疗1组和治疗2组小鼠脾脏 Th1 细胞的比例下降减少($F = 6.64$, 均 $P < 0.01$);治疗1组和治疗2组之间的 Th1 细胞比较差异无统计学意义,此外, $CD4^+ IL-10^+$ T 细胞的比例在所有实验组间的比较亦差异无统计学意义。见图5、6。

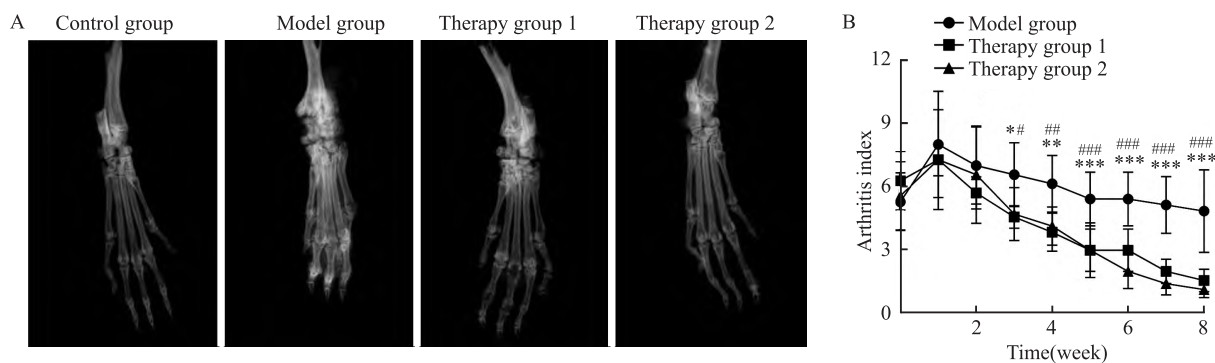


图2 小鼠关节的CT影像和关节评分

Fig.2 CT and joint scoring of CIA mice joints

A: Mice paw CT image; B: Mice arthritis index score; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Therapy group 1; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Therapy group 2.

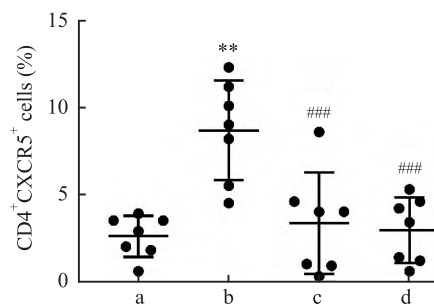
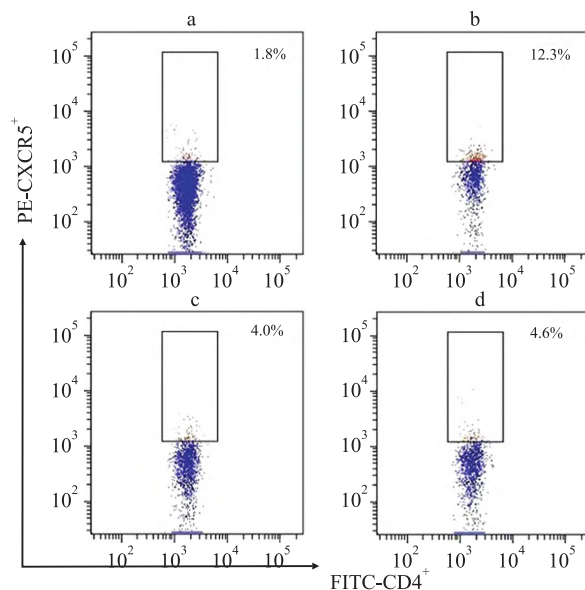


图3 小鼠脾脏中Tfh细胞的相对丰度

Fig.3 The relative abundance of Tfh cells in mice spleen

a: Control group; b: Model group; c: Therapy group 1; d: Therapy group 2; ** $P < 0.01$ vs Control group; ### $P < 0.001$ vs Model group.

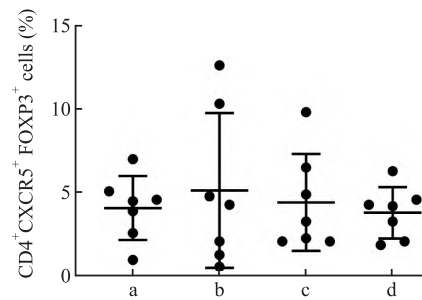
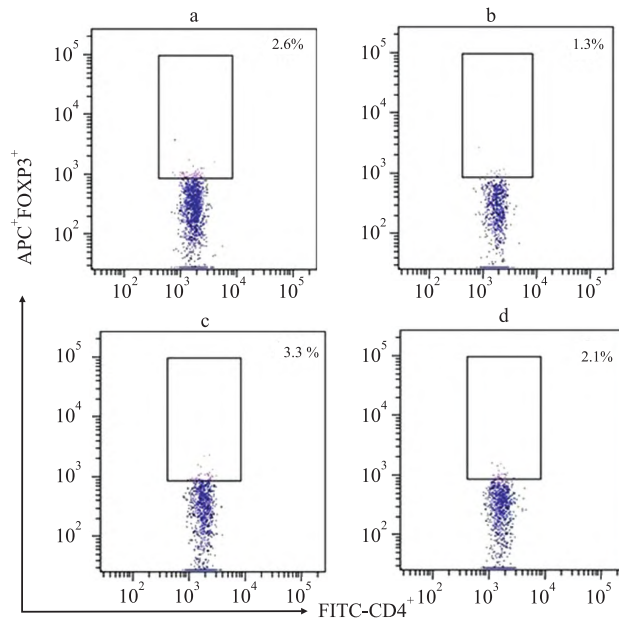


图4 小鼠脾脏中 Tfr 细胞的相对丰度

Fig.4 The relative abundance of Tfr cells in mice spleen

a: Control group; b: Model group; c: Therapy group 1; d: Therapy group 2.

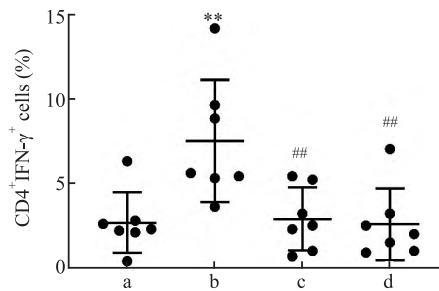
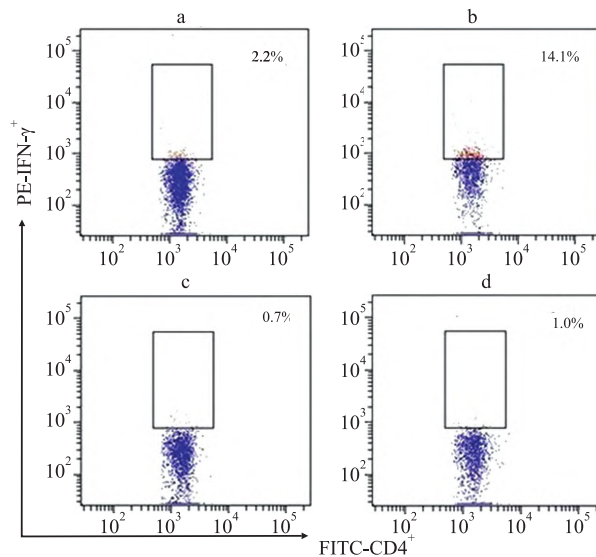


图5 小鼠脾脏中 Th1 细胞的相对丰度

Fig.5 The relative abundance of Th1 cells in mice spleen

a: Control group; b: Model group; c: Therapy group 1; d: Therapy group 2; * * $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs Model group.

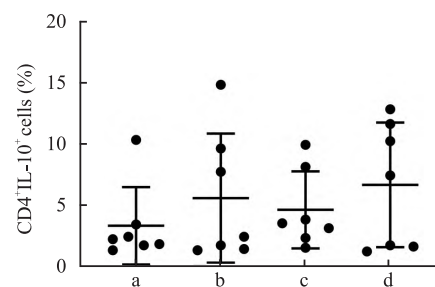
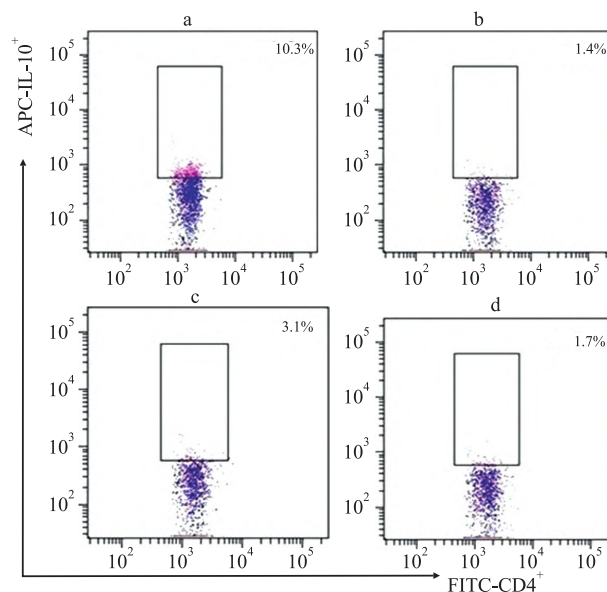


图6 小鼠脾脏中 CD4⁺IL-10⁺ T 细胞的相对丰度

Fig.6 The relative abundance of CD4⁺IL-10⁺ T cells in mice spleen

a: Control group; b: Model group; c: Therapy group 1; d: Therapy group 2.

2.4 小鼠关节的病理变化 在模型组小鼠中,观察到关节表面呈现粗糙不平、软骨组织损伤和炎细胞浸润以及骨骼侵蚀的现象增加,特别是在小鼠的前爪部位,炎细胞的浸润情况尤为显著,对关节软骨造成了破坏性影响;后爪以炎细胞浸润为主,对关节软骨有破坏作用,对骨骼有一定侵蚀作用。PAD4-siRNA 作用后,治疗1组和治疗2组小鼠后爪的关节软骨损伤和骨侵蚀的程度减轻,炎细胞浸润减少;治疗1组小鼠前爪关节的软骨损伤和骨骼侵蚀的情况并未得到缓解,炎细胞浸润程度同样未减轻,治疗2组小鼠前爪软骨损伤、骨破坏程度以及炎细胞浸润情况均减轻。见图7。

3 讨论

Jonsson et al^[5]检测早期 RA 患者 PAD4 的活性,发现42%的 RA 患者血清中 PAD4 活性为阳性,且抗瓜氨酸化蛋白抗体(anti-citrullinated peptide antibodies, ACPA)阳性组中 PAD4 的活性高于 ACPA 阴性组,经慢作用抗风湿药物治疗后 PAD4 的活性降低,这表明 PAD4 可能会成为一种治疗 RA 的靶点。因此,本研究将 PAD4-siRNA 尾静脉注射入 CIA 小鼠体内,发现 CIA 小鼠的关节评分逐渐降低,

这表明沉默 PAD4 的表达成为治疗 CIA 的一种方法。

Cao et al^[10]研究显示,在 RA 患者外周血中 Tfh 细胞比例升高的同时 Tfr 细胞比例呈现下降趋势,进而导致 Tfr 与 Tfh 细胞的比率下降,且 Tfr/Tfh 与红细胞沉降率、C 反应蛋白、类风湿因子、IgG 与 28 个关节疾病活动指数呈负相关,表明 Tfh 和 Tfr 细胞参与 RA 的发生和发展。研究发现,CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ Tfh 细胞在 RA 患者外周血和 CIA 小鼠脾细胞中的比例升高^[11], CD4⁺ CXCR5⁺ FOXP3⁺ ICOS⁺ Tfr 细胞在 RA 患者外周血中的比例呈现降低趋势^[12],这表明 Tfh 和 Tfr 细胞具有不同的表型标志。本研究观察到 CIA 小鼠的脾脏中 Tfh 细胞的相对数量上升。而 Tfr 细胞的相对数量未表现出显著的改变;进一步的研究显示,当 PAD4-siRNA 作用于 CIA 小鼠后,脾脏中 Tfh 细胞的比例下降,提示 PAD4-siRNA 沉默其表达对 CIA 小鼠脾细胞中 Tfh 细胞的比例具有调控作用,对 Tfr 细胞比例的调控并无明显差异。

Li et al^[1]检测了 95 例 RA 患者和 50 例健康对照者外周血中 Th1 细胞的比例,RA 患者的 Th1 细胞的比例升高。RA 患者关节滑液内的 Th1 细胞所

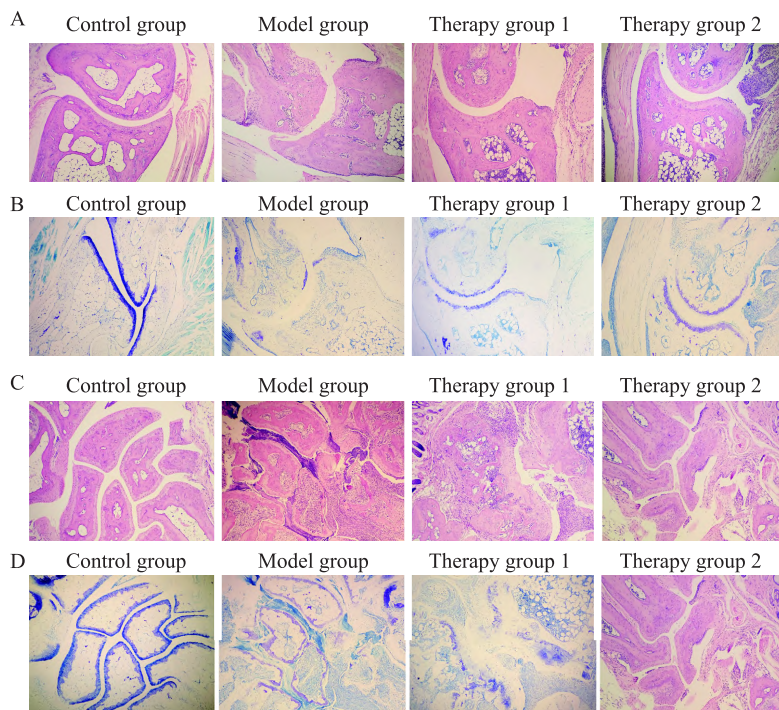


图7 小鼠关节的病理变化 ×10

Fig.7 The pathological changes in mice joints ×10

A: HE staining images of the front paws of mice; B: Toluidine blue staining images of the front paws of mice; C: HE staining images of the hind paws of mice; D: Toluidine blue staining images of the hind paws of mice.

占比例高于其在外周血中的比例^[13]。研究^[14]发现,经过灭活处理的益生菌可提高 CIA 小鼠腹股沟淋巴结 CD4⁺IL-10⁺T 细胞的相对数量,可能治疗 CIA 小鼠的疾病具有潜在的疗效,也暗示了 RA 的发病机制可能与 Th1 细胞以及 CD4⁺IL-10⁺T 细胞的相互作用密切相关。

在本研究的 CIA 小鼠模型中,脾脏的 Th1 细胞比例有所增加。然而,对于 CD4⁺IL-10⁺T 细胞的比例存在一定差异,在 CIA 模型组小鼠中,有升高也有降低。这种不一致性导致与对照组比较,差异无统计学意义,这表明 Th1 细胞可能与 CIA 小鼠的发病过程有关,而 CD4⁺IL-10⁺T 细胞在 RA 中的具体作用仍需进一步探究。当 PAD4-siRNA 作用于 CIA 小鼠后,发现脾脏中 Th1 细胞比例有所下降,而 CD4⁺IL-10⁺T 细胞的比例变化不显著。这表明 PAD4-siRNA 通过抑制其表达,对 CIA 小鼠脾脏内 Th1 细胞的数量产生了一定的影响,对 CD4⁺IL-10⁺T 细胞的影响不明显。

本研究的发现进一步揭示了 PAD4-siRNA 可使 CIA 小鼠的关节面粗糙度降低,关节软骨破坏和骨侵蚀的现象有所缓解,同时炎细胞的浸润也有所减少。从关节改变的程度来看,治疗 2 组显示出更为明显的疗效,而治疗 1 组针对小鼠的前爪的影响微乎其微。这些结果表明,PAD4-siRNA 的确可以作为一种治疗 RA 的策略,通过延长 siRNA 在体内的持续作用时间,可能实现更好的治疗效果。故此推测,如果使用间充质干细胞为介质将 PAD4-siRNA 运输到体内,可能对 RA 会起到双重治疗效果。这一假设需要在未来的研究中进一步探索和验证。

综上所述,通过细胞为介质将 PAD4-siRNA 运输到体内,可以有效地延长 PAD4 mRNA 沉默期,通过调节免疫细胞的活性和减少关节损伤,来改善 RA 患者的病情和生活质量。因此,这种细胞介导的 siRNA 输送方法可能为 RA 的治疗提供一种新的策略,当然,这些发现仍需在未来的研究中进一步进行验证其机制和有效性。

参考文献

- [1] Li Y, Yang W, Wang F. The relationship of blood CDC42 level with Th1 cells, Th17 cells, inflammation markers, disease risk/activity, and treatment efficacy of rheumatoid arthritis[J]. *Ir J Med Sci*, 2022, 191(5): 2155–61. doi:10.1007/s11845-021-02858-y.
- [2] Xu T, Yan T, Li P. Interleukin-29 regulates T follicular helper cells by repressing BCL6 in rheumatoid arthritis patients[J]. *Clin Rheumatol*, 2020, 39(12): 3797–804. doi:10.1007/s10067-020-05151-y.
- [3] Liu C, Wang D, Lu S, et al. Increased circulating follicular Treg cells are associated with lower levels of autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis in stable remission[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(5): 711–21. doi:10.1002/art.40430.
- [4] Niu Q, Huang Z C, Wu X J, et al. Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 200. doi:10.1186/s13075-018-1690-0.
- [5] Jonsson M K, Kantyka T, Falkowski K, et al. Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) activity in early rheumatoid arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2020, 49(2): 87–95. doi:10.1080/03009742.2019.1641216.
- [6] Yahagi A, Saika T, Hirano H, et al. IL-6-PAD4 axis in the earliest phase of arthritis in knock-in gp130F759 mice, a model for rheumatoid arthritis[J]. *RMD Open*, 2019, 5(2): e000853. doi:10.1136/rmdopen-2018-000853.
- [7] Auger I, Balandraud N, Massy E, et al. Peptidylarginine deiminase autoimmunity and the development of anti-citrullinated protein antibody in rheumatoid arthritis: the hapten-carrier model[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(6): 903–11. doi:10.1002/art.41189.
- [8] El Shikh M E M, El Sayed R, Nerviani A, et al. Extracellular traps and PAD4 released by macrophages induce citrullination and auto-antibody production in autoimmune arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2019, 105: 102297. doi:10.1016/j.jaut.2019.06.008.
- [9] 宋国婧. 肽基精氨酸脱亚胺酶 4 的小干扰 RNA 载体对胶原诱导关节炎小鼠的治疗作用[D]. 包头: 内蒙古科技大学包头医学院, 2019. doi:10.27227/d.cnki.gbtyc.2019.000011.
- [9] Song G J. Therapeutic effect of small interfering RNA vector of peptidyl arginine deiminase 4 on collagen-induced arthritis in mice[D]. Baotou: Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, 2019.
- [10] Cao G, Wang P, Cui Z, et al. An imbalance between blood CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺Tfr cells and CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells may contribute to the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Mol Immunol*, 2020, 125: 1–8. doi:10.1016/j.molimm.2020.06.003.
- [11] Cao G, Chi S, Wang X, et al. CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺T follicular helper cells play a pivotal role in the development of rheumatoid arthritis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3032–40. doi:10.12659/MSM.914868.
- [12] 王佩佩, 池淑红, 王雪梅, 等. 滤泡调节性 T 细胞减少与类风湿性关节炎发生和发展相关[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(2): 152–7.
- [12] Wang P P, Chi S H, Wang X M, et al. Reduction of follicular regulatory T cells is associated with occurrence and development of rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2021, 37(2): 152–7.
- [13] Aldridge J, Ekwall A H, Mark L, et al. T helper cells in synovial

fluid of patients with rheumatoid arthritis primarily have a Th1 and a CXCR3⁺Th2 phenotype[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 245. doi:10.1186/s13075-020-02349-y.

regulatory immunity to attenuate subsequent experimental autoimmune arthritis[J]. *Immunol Lett*, 2019, 216: 89-96. doi:10.1016/j.imlet.2019.10.009.

[14] Jia H, Ren S, Wang X. Heat-killed probiotic regulates the body's

PAD4-siRNA alleviates disease progression of collagen-induced arthritis mice by regulating T cells subpopulation

Lu Yanrong¹, Zhao Kai², Pang Chunyan¹

(¹Central Laboratory, ²Dept of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010)

Abstract **Objective** To investigate the therapeutic effects of a small interfering RNA (siRNA) vector targeting peptidyl arginine deaminase 4 (PAD4) and splenocytes infected with a PAD4-siRNA virus, on collagen-induced arthritis (CIA) mice, and to elucidate the underlying mechanisms. **Methods** The experiment mice were divided into four groups: control group, model group, therapy group 1 and therapy group 2, with 7 mice in each group. Control group mice were not treated. Initially, collagen-induced arthritis (CIA) mice model were established using bovine type II collagen. Model group mice were injected by PBS buffer. Therapy group 1 mice were injected of PAD4-siRNA virus solution into the tail vein of the CIA mice, while therapy group 2 mice were injected of splenocytes infected with PAD4-siRNA virus via the same route. These injections were carried out once a week for a total of eight weeks. Subsequently, the alterations in T follicular helper (Tfh), T follicular regulatory (Tfr), T helper 1 (Th1), and CD4⁺IL-10⁺ T cells in the splenocytes of the mice were analyzed. Additionally, the pathological changes in the articular cartilage of the mice joints were detected. **Results** Comparison with control group, mice of model group exhibited a significant increase in the proportions of Tfh and Th1 cells in the spleen ($P < 0.05$), while the proportions of Tfr and CD4⁺IL-10⁺ T cells remained unchanged. Comparison with model group, therapy group 1 and therapy group 2 demonstrated a significant decrease in the proportions of Tfh and Th1 cells ($P < 0.05$), with no changes were observed in the proportions of Tfr and CD4⁺IL-10⁺ T cells. Additionally, the articular surface in the mice of control group was smooth, whereas model group showed signs of inflammatory cell infiltration, rough articular surface, and cartilage destruction. Following treatment with PAD4-siRNA, the infiltration of inflammatory cells and cartilage destruction in the hind paws of CIA mice in therapy group 1 were reduced. However, no reduction was observed in the infiltration of inflammatory cells and cartilage destruction in the front paws of CIA mice. In contrast, therapy group 2 exhibited a reduction in the infiltration of inflammatory cells and cartilage destruction in both the front and hind paws of CIA mice. **Conclusion** Gene silencing of PAD4 expression can decrease the proportion of Tfh and Th1 cells, leading to an amelioration of pathological changes in joints and cartilage of hind paws. Furthermore, the therapeutic efficacy is observed in the front paws of CIA mice, and PAD4-siRNA plays a role on CIA mice by regulating T cells subpopulation of splenocytes.

Key words rheumatoid arthritis; peptidyl arginine deaminase 4; small interfering RNA; type 1 helper T cells; follicular helper T cells; collagen induced arthritis mice

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81560270)

Corresponding author Pang Chunyan, E-mail: pchy_fighting@163.com