

## 吸烟对类风湿关节炎外周血芳香烃受体的影响

程琳<sup>1</sup> 钱龙<sup>2</sup> 李向培<sup>1</sup> 厉小梅<sup>1</sup> 汪国生<sup>1</sup>

**摘要** 目的 检测吸烟类风湿关节炎(RA)患者和健康者外周血单个核细胞(PBMCs)中芳香烃受体(AHR)、芳香烃受体抑制因子(AHRR)、细胞色素P4501A1(CYP1A1)的表达水平,探讨吸烟影响RA发生、发展的可能原因。方法 采用荧光定量PCR检测58例RA患者和30例健康者PBMCs中AHR、AHRR、CYP1A1 mRNA的相对表达量,分析吸烟对3者表达的影响。结果 RA吸烟组AHR、AHRR、CYP1A1 mRNA的表达明显高于非吸烟组( $P < 0.05$ ),而健康者吸烟组与非吸烟组AHR、AHRR、CYP1A1 mRNA的表达差异无统计学意义;RA吸烟者AHR mRNA的表达明显高于健康吸烟者( $P < 0.05$ ),而RA非吸烟者与健康非吸烟者之间差异无统计学意义。结论 RA中可能存在某种途径使AHR易被烟草化合物活化,进而致AHR、AHRR、CYP1A1 mRNA高表达,使香烟成为RA的危险因素。

**关键词** 关节炎; 类风湿; 吸烟; 芳香烃受体抑制因子; 细胞色素P450

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-1006-05

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以对称性多发性关节炎为主要表现的自身免疫性疾病,其发病率约1%<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明RA患者持续吸烟会导致更高的疾病活动性和更严重的致残性,而烟草中许多化合物是芳香烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AHR)高亲和力配体,可能参与AHR活化的信号途径。AHR在配体如二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)存在下,可影响细胞的发育分化,AHR功能的缺陷或者亢进都可导致免疫功能紊乱<sup>[3-4]</sup>。细胞色素P4501A1(cytochrome P4501A1, CYP1A1)是酶细胞色素P450家族成员,是目前研究最多的应答基因,AHRR是AHR抑制因子,是一种负反馈转录因子。AHR被香烟中

化学物如TCDD激活后,二者表达明显升高<sup>[2,5-6]</sup>。该实验通过检测单个核细胞(PBMCs)中AHR、AHRR及CYP1A1 mRNA的表达,分析吸烟对3者的影响,探讨吸烟影响RA发生发展的可能原因,为临床治疗RA提供线索。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** RA吸烟组:男14例,女15例,年龄29~72( $50.9 \pm 1.0$ )岁,病程0.5~30年;RA非吸烟组:男15例,女14例,年龄29~69( $47.5 \pm 7.7$ )岁,病程0.25~38年,均为2014年4月~2014年12月于安徽医科大学附属省立医院门诊和住院部就诊的未使用过来氟米特的患者,且当前仅使用甲氨蝶呤,两组间差异无统计学意义。RA诊断符合美国风湿病学会(ACR)1987年分类诊断标准。健康者吸烟组:男8例,女7例,年龄29~70( $48.8 \pm 0.9$ )岁;健康者非吸烟组:男8例,女7例,年龄28~71( $47.2 \pm 1.3$ )岁,健康者来源于我院同期体检中心。RA组与健康组中吸烟者均持续长期吸烟<sup>[2]</sup>,且为主动吸烟。为排除体内炎症因子过高可能对实验结果造成影响,患者无关节肿痛,血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)均为正常水平且DAS28 < 3.2。

**1.2 荧光定量PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测** 采集符合两组标准的静脉血5 ml于抗凝管中,用Ficoll-Hypaque密度梯度分离法加淋巴细胞分离液分离PBMCs。分离出的PBMCs加1 ml TRIzol吹打混匀提取总RNA,反转录获得cDNA。以cDNA为模板,SYBR Green RT-PCR检测外周血中AHR、AHRR、CYP1A1 mRNA的表达。其中按试剂盒内说明书建立PCR反应体系,总体积为20  $\mu$ l。反应条件:95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 循环40次。引物设计及合成:在NCBI数据库中查找人AHR、AHRR、CYP1A1基因整个序列,以 $\beta$ -actin作为内参基因。以Primer Ex. press 2.0软件设计扩增模板的引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成,见表1。数据通过使用 $\beta$ -actin参照基因作标准化处理得到

2016-03-23 接收

基金项目:中华医学会临床医学科专项基金-风湿病学发展与研究基金项目(编号:12040800380)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

<sup>2</sup>安徽医科大学第二附属医院风湿免疫科,合肥 230601

作者简介:程琳,女,硕士研究生;

钱龙,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: clahu2013@126.com

$\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = \text{待测基因 Ct} - \beta\text{-actin Ct}$ ) 病例样本基因相对于对照样本基因的量常用  $2^{-\Delta Ct}$  计算获得。  
( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{病例}} - \Delta Ct_{\text{对照}}$ )。

表1 引物序列

项目	引物序列(5'-3')
AHR	F: ATACCGAAGACCGAGCTGAAT
	R: CCAGCAGACACCTTAGACGAC
AHRR	F: CCTCCTCGGCTCTCCTTGTTTGG
	R: CTFTTGCCTTGAGTCCATCCTGTA
CYP1A1	F: CATCCCCACAGCACAACAAGAGA
	R: GCAGCAGGATAGCCAGGAAGAGAA
$\beta$ -actin	F: AACCCCTAAGGCCAACCCGTGAAAAG
	R: CGACCAGAGGCATACAGGGACAAC

**1.3 其他临床指标检测** 魏氏法测 ESR, 免疫散射比浊法测 CRP, ELISA 检测抗 CCP 抗体, 试剂购自欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司, 严格按试剂盒说明书进行操作。

**1.4 RA 活动性评分** 采用 DAS28<sup>[7]</sup> 评分 RA 疾病活动, 以 28 个关节计分, 包括双肩、双肘、双腕、双手掌指关节、双手近端指间关节、双膝关节。DAS28 =  $[0.56 \times \sqrt{\text{压痛关节数}} + 0.28 \times \sqrt{\text{肿胀关节数}} + 0.7 \times \ln(\text{ESR})] \times 1.08 + 0.16$ 。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 计量资料正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布以中位数(下四分位数, 上四分位数)表示; 两组间符合正态分布和方差齐性采用 *t* 检验, 不符合正态采用秩和检验; 变量间符合正态分布用 Pearson 相关分析, 变量间非正态分布用 Spearman 相关分析。

**2 结果**

**2.1 AHR mRNA 相对表达水平** RA 吸烟组 AHR mRNA 水平 [2.16(1.15, 3.22)] 显著高于 RA 非吸烟组 [1.02(0.56, 1.91)], 差异有统计学意义 ( $P = 0.003, Z = -3.747$ ); 健康者吸烟组 AHR mRNA 表达水平 [1.922(0.245, 4.460)] 与健康者非吸烟组 [1.118(0.671, 1.912)] 差异无统计学意义 ( $P = 0.254, Z = -1.141$ )。见图 1。

**2.2 AHRR mRNA 相对表达水平** RA 吸烟组 AHRR mRNA 表达水平 [1.684(0.808, 3.595)] 明显高于 RA 非吸烟组 [0.87(0.46, 1.93)], 差异有统计学意义 ( $P = 0.032, Z = -2.139$ ); 健康者吸烟组 AHRR mRNA 水平 [0.24(0.15, 0.46)] 与健康者非吸烟组 [1.12(0.67, 1.91)] 比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.899, Z = -0.154$ )。见图 2。

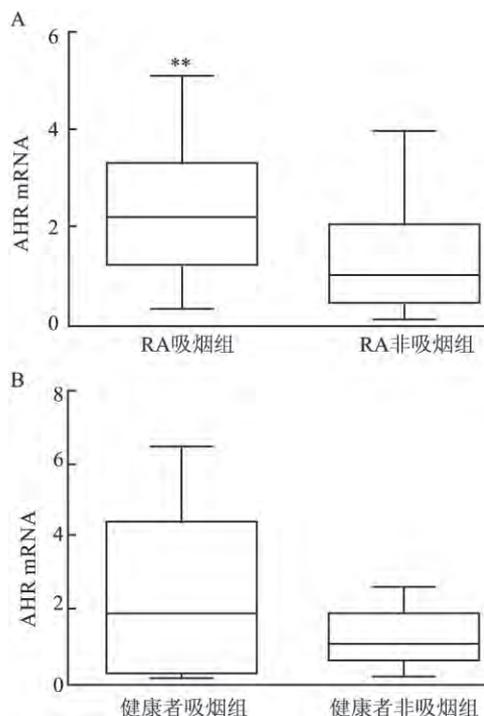


图1 AHR mRNA 相对表达量的比较

A: RA 吸烟组与 RA 非吸烟组; B: 健康者吸烟组与健康者非吸烟组; 与非吸烟组比较: \*  $P < 0.05$

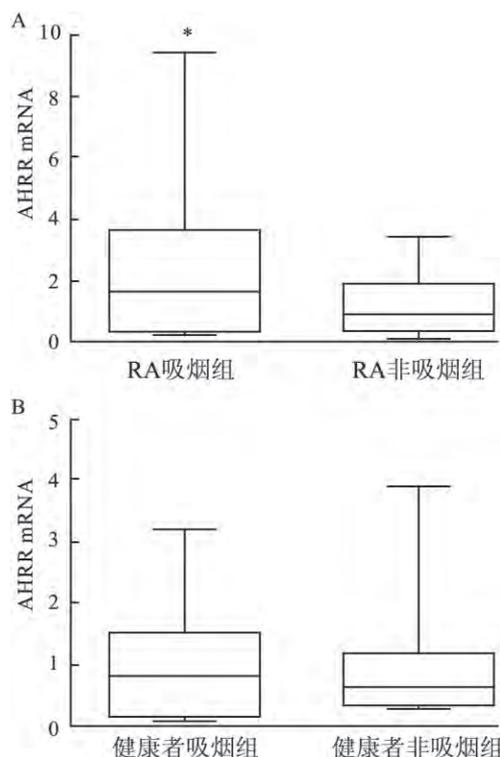


图2 AHRR 相对表达量的比较

A: RA 吸烟组与 RA 非吸烟组; B: 健康者吸烟组与健康者非吸烟组; 与非吸烟组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 CYP1A1 mRNA 相对表达水平** RA 吸烟组

CYP1A1 mRNA 表达水平 [1.12( 0.61 , 2.87) ] 高于 RA 非吸烟组 [0.75( 0.28 , 1.48) ], 差异有统计学意义 (  $P = 0.027$  ,  $Z = -2.207$  ); 健康者吸烟组 CYP1A1 mRNA 水平 [0.10( 0.01 , 0.42) ] 与健康者非吸烟组 [0.21( 0.09 , 0.28) ] 比较 , 差异无统计学意义 (  $P = 0.379$  ,  $Z = -0.923$  ) 。 见图 3 。

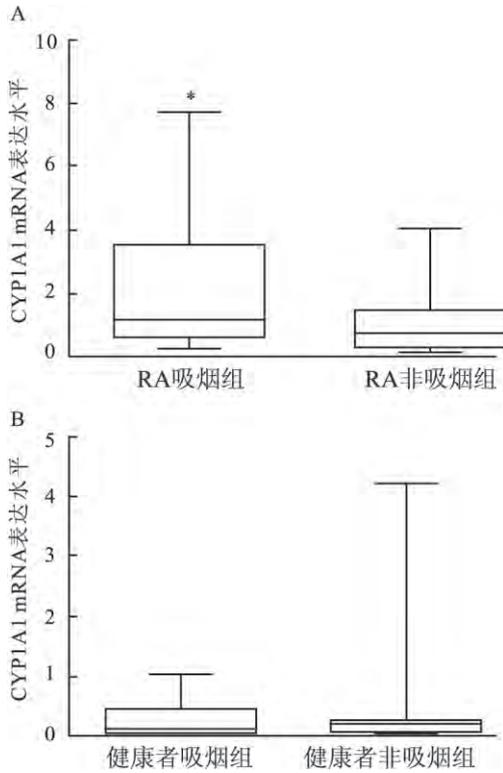


图3 CYP1A1 相对表达量的比较

A: RA 吸烟组与 RA 非吸烟组; B: 健康者吸烟组与健康者非吸烟组; 与非吸烟组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 AHR mRNA 表达量在组间的比较** RA 患者外周血 AHR mRNA 的表达 [1.55( 0.82 , 2.46) ] 明显高于健康者 [0.73( 0.18 , 1.91) ], 差异有统计学意义 (  $P = 0.005$  ,  $Z = -2.780$  ); RA 吸烟者 AHR mRNA 的表达 [2.23( 1.19 , 3.33) ] 高于健康吸烟者 [0.24( 0.080 , 3.13) ], 差异有统计学意义 (  $P = 0.014$  ,  $Z = -2.450$  ); 而 RA 非吸烟者 [1.03( 0.54 , 2.00) ] 与健康非吸烟者 [1.12( 0.67 , 1.91) ] 差异无统计学意义 (  $P = 0.939$  ,  $Z = -0.076$  ) 。 见图 4 。

**2.5 AHRR mRNA 与 CYP1A1 mRNA 表达的相关性** RA 患者 AHRR mRNA 与 CYP1A1 mRNA 的表达呈正相关 (  $P = 0.013$  ,  $r_s = 0.363$  ) 。

**2.6 关于临床数据研究** 吸烟 RA 患者 AHR mRNA、AHRR mRNA 与 CYP1A1 mRNA 的表达与其临床相关参数均无相关性 , 见表 2 。

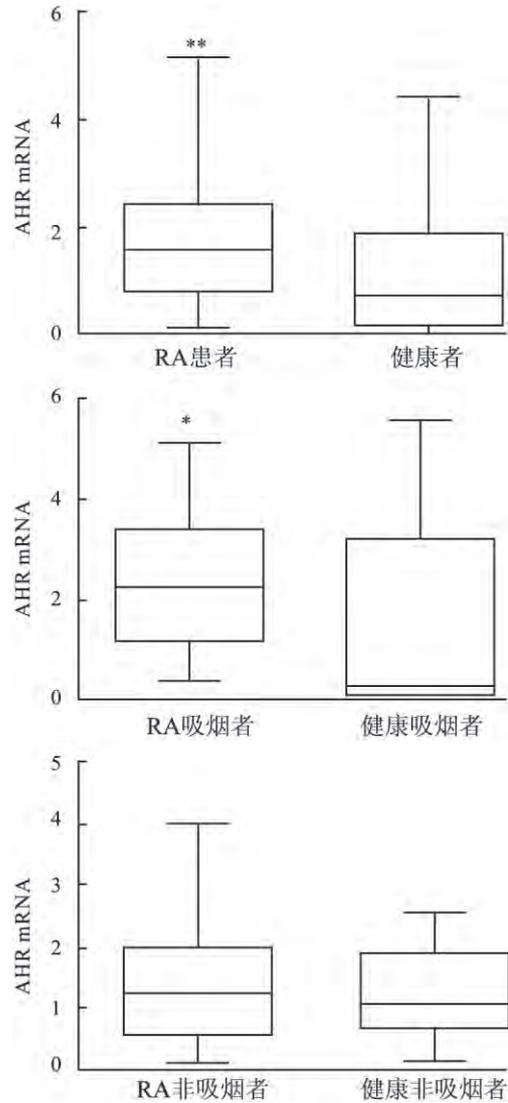


图4 AHR mRNA 相对表达量

两两比较: \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

表2 RA 吸烟者外周血 AHR mRNA、AHRR mRNA 和 CYP1A1 mRNA 相对表达和其临床指标相关性

临床指标	AHR		AHRR		CYP1A1	
	$r_s$ 值	P 值	$r_s$ 值	P 值	$r_s$ 值	P 值
RF	0.245	0.089	-0.108	0.468	0.225	0.125
抗 CCP	0.056	0.711	-0.116	0.441	0.070	0.963
病程	-0.329	0.125	0.265	0.222	-0.127	0.537
吸烟量	0.320	0.885	0.080	0.936	-0.930	0.653

### 3 讨论

RA 是一种慢性自身性免疫疾病 , 主要以破坏性多发性关节炎为主要表现 , 同时还可是有许多关节外表现 , 其确切的病因和发病机制仍不清楚 , 一般认为主要是多种环境因素和遗传因素共同作用的结

果。在环境因素中烟草中多种化合物如卤代芳香烃类、TCDD、多环芳香烃类苯并二萘、BAP、3-MC 是 AHR 的强激动剂,通过结合 AHR 进而激活其经典信号通路或旁路途径,调节 T 细胞、B 细胞、DC 细胞、巨噬细胞等细胞的分化及炎性细胞因子的分泌,导致免疫疾病的产生包括 RA<sup>[8]</sup>。O'Donnell et al<sup>[9]</sup> 在斑马鱼活体内实验,表明 LEF 原型可抑制斑马鱼鱼鳍再生的作用;同时用 LEF 处理 WT Hep1c1c7 细胞,其应答基因 CYP1A1 表达明显上调,表明 LEF 是 AHR 配体且对 AHR 及其应答基因有影响。因此,本实验为排除 LEF 对 AHR 影响,选用的吸烟和非吸烟 RA 患者均未使用过 LEF。

AHR 的活化主要为经典途径,即在无配体条件下,AHR 与伴侣蛋白在胞质中保持无活性。在配体如香烟中化学物 TCDD 等存在时,AHR 与伴侣蛋白解离,与 TCDD 形成复合物,易位到细胞核,形成复合物结合到细胞核启动子区外源反应元件特殊 DNA 序列,调节下游基因如 CYP1A1、AHRR 的表达<sup>[10]</sup>。AHR 也可在配体存在下,通过诱导调节性 T 细胞的表达,激活转录因子 NF- $\kappa$ B,或者通过抑制产生 IL-17 的 Th17 细胞进而调控免疫系统疾病如 RA<sup>[11-12]</sup>。AHR 可能在配体作用下活化,激活下游基因,进而产生炎症反应和免疫疾病发生,也可在配体下抑制炎症产生,表明 AHR 有两面性。本实验主要探讨烟草中化合物作用于 AHR 产生免疫疾病如 RA 的过程的有关研究。

流行病学证明吸烟是 RA 的重要危险因素,同时证明 RA 患者持续吸烟会导致更严重的疾病过程。Tamaki et al<sup>[13]</sup> 用 3-MC 处理来自 RA 患者的成纤维细胞样滑膜细胞系 MH7A,检测到 AHR 应答基因 CYP1A1 mRNA 明显升高,同时在 RA 中起重要作用的促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  mRNA 也明显高表达,且该过程可被 AHR 拮抗剂萘黄酮所阻断,TCDD、BAP 处理 MH7A 系也得到与 3-MC 同样结果,表明烟草中多种化合物可激活 AHR,进而上调促炎细胞因子的表达,导致 RA 的发展。Brauze et al<sup>[14]</sup> 用 TCDD 处理大鼠,处理组中鼠肝脏中 AHR、AHRR 及 CYP1A1 的 mRNA 的表达水平明显高于对照组。Kazantseva et al<sup>[2]</sup> 提取吸烟和非吸烟 RA 患者滑膜,结果得出吸烟 RA 患者滑膜中 AHRR 和 CYP1A1 明显高于非吸烟者,表明香烟中许多化合物可能作用于 AHR,使其活化,进而致 AHRR 和 CYP1A1 高表达。基于以上研究,推断香烟中的多种化合物可能通过活化 AHR,使应答基因 CYP1A1 和 AHRR 高表

达,启动一系列信号通路,使各种促进因子的表达上调,进而促进 RA 的发生发展,成为其危险因素。

目前探讨吸烟为 RA 危险因素的可能原因的研究也越来越多,但尚缺乏外周血中相关研究。本实验首次通过检测 RA 吸烟患者与 RA 非吸烟患者外周血 AHR 及其应答基因 AHRR 和 CYP1A1 mRNA 的表达,通过分析比较结果,推测吸烟影响 RA 发生、发展的可能原因。本研究表明 RA 吸烟患者外周血 AHR、AHRR、CYP1A1 的 mRNA 表达显著高于非吸烟患者,与研究<sup>[8,13-14]</sup> 一致,提示吸烟可能通过上调 AHR 使其活化,其应答基因如 AHRR 和 CYP1A1 mRNA 高表达,进一步激活炎性信号通路,参与 RA 的发病机制,使得吸烟成为 RA 的危险因素。本实验表明 RA 患者外周血 AHR mRNA 的表达显著高于健康者,与研究<sup>[15]</sup> 一致,同时得出 RA 吸烟者 AHR mRNA 的表达明显高于健康吸烟者,而 RA 非吸烟者与健康非吸烟者之间差异无统计学意义,进一步说明香烟可能使 RA 外周血中 AHR 高表达。CYP1A1 与 AHRR 呈明显正相关性,与 Kazantseva et al<sup>[2]</sup> 在 RA 滑膜组织研究一致。RA 吸烟者外周血 AHR、CYP1A1、AHRR 的 mRNA 表达与患者 RF、抗 CCP、疾病病程及吸烟量无相关性,可能因为影响临床资料因素如感染、肥胖、基因遗传多态性及样本量大小等较多。

综上所述,RA 中可能存在某种途径使外周血 PBMCs 中 AHR 易被活化,导致 AHR 及其下游基因 CYP1A1 和 AHRR mRNA 高表达,进而激活炎性信号途径,参与 RA 的发病机制,成为 RA 的危险因素,而 AHR 可能为临床治疗 RA 提供更多途径。

## 参考文献

- [1] Nguyen N T, Nakahama T, Kishimoto T, et al. Aryl hydrocarbon receptor and experimental autoimmune arthritis [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(6): 637-44.
- [2] Kazantseva M G, Highton J, Stamp L K, et al. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther* 2012, 14(5): R208.
- [3] Hanieh H. Toward understanding the role of Aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends [J]. *Biomed Res Int*, 2014: 520763.
- [4] Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology [J]. *Biol Chem*, 2010, 391(11): 1235-48.
- [5] Watson J D, Prokopec S D, Smith A B, et al. TCDD dysregulation of 13 AHR-target genes in rat liver [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(3): 445-54.

- [6] Manfredsdottir V F, Vikingsdottir T, Jonsson T, et al. The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(6): 734–40.
- [7] Prevoo M L, Van't Hof M A, Kuper H H, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38: 44–8.
- [8] Nguyen N T, Hanieh H, Nakahama T, et al. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses [J]. *Int Immunol*, 2013, 25(6): 335–43.
- [9] O'Donnell E F, Saili K S, Koch D C, et al. The Anti-inflammatory drug leflunomide is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13128.
- [10] Guyot E, Chevallerier A, Barouki R, et al. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmacotoxicological implications [J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(9–10): 479–86.
- [11] Quintana F J. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response [J]. *Immunology*, 2013, 138(3): 183–9.
- [12] Kobayashi S, Okamoto H, Iwamoto T, et al. A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(9): 1317–22.
- [13] Tamaki A, Hayashi H, Nakajima H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line *via* aryl hydrocarbon receptor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(3): 407–10.
- [14] Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, et al. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AHR, AHRR, ARNT, Hif1 $\alpha$ , CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 167(3): 212–20.
- [15] 谭悦, 钱龙, 李向培, 等. 芳香烃受体在类风湿关节炎患者外周血单个核细胞内的表达及意义 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2014, 34(1): 51–6.

## Effect of smoking on peripheral blood aryl hydrocarbon receptor of rheumatoid arthritis

Cheng Lin<sup>1</sup>, Qian Long<sup>2</sup>, Li Xiangpei<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Rheumatology and Immunology Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001;

<sup>2</sup> Dept of Rheumatology and Immunology Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To explore the possible reasons of the influence about smoking on rheumatoid arthritis (RA) through detecting the mRNA levels of aryl hydrocarbon receptor (AHR), its response gene cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and the repressor AHRR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of both patients and healthy controls. **Methods** Real-time PCR was used to assess the expression of peripheral blood AHR, AHRR, CYP1A1 from 58 patients with RA and 30 healthy subjects, then effects of smoking on the expression of AHR, AHRR and CYP1A1 were analyzed. **Results** The expressions of AHR, AHRR and CYP1A1 at mRNA level were significantly higher in patients who were smoking than those who were non-smokers ( $P < 0.05$ ). However, there were no statistically significant differences between smoking healthy subjects and nonsmoking controls. Furthermore, we concluded that the expression of AHR was obviously increased in smoking RA patients than that in smoking healthy controls ( $P < 0.05$ ), and no significant differences were found between nonsmoking patients and nonsmoking healthy subjects. **Conclusion** Smoking is involved in the pathogenesis of RA and then becomes a risk factor which may influence the expression of AHR, AHRR, CYP1A1 in PBMCs from patients with RA.

**Key words** arthritis, rheumatoid; smoking; aryl hydrocarbon receptor repressor; cytochrome P4501A1