

蜂毒肽通过 Th1/Th2 途径对胶原诱导关节炎大鼠模型免疫调节的影响

贺守第^{1#}, 范钊坤^{4#}, 关 丽³, 黎德育¹, 杨平常², 刘志刚², 黄胜光^{1*}

1. 深圳市南山区人民医院 中医风湿科, 广东 深圳 518060

2. 深圳大学 过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518055

3. 深圳市罗湖区人民医院 风湿免疫科, 广东 深圳 518000

4. 浙江中医药大学附属第一医院 重症医学科, 浙江 杭州 310000

摘要: 目的 探讨蜂毒肽对胶原诱导关节炎大鼠模型免疫调节的影响。方法 成功建立胶原诱导关节炎大鼠模型, 随机分为模型组、蜂毒肽(0.5 mg/kg)组、甲氨蝶呤(1 mg/只)组, 每组6只, 另选取未造模大鼠为对照组; 造模第14天起, 隔日1次 ip 蜂毒肽, 每周1次 ip 甲氨蝶呤, 对照组、模型组 ip 等量生理盐水, 给药21 d。观察关节肿胀程度、进行关节炎指数(AI)评分; 给药结束后, 收集血清, ELISA法检测血清中免疫球蛋白G(IgG)、IgG1、IgG2a、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)水平; 分离大鼠脾脏, 提取淋巴细胞, 流式细胞术检测Th1、Th2细胞比例。结果 蜂毒肽组大鼠关节皮肤发红, 关节肿胀明显减轻; 与模型组比较, 蜂毒肽显著抑制AI评分($P < 0.05$); 显著降低血清中IgG、IgG2a、IFN- γ 浓度($P < 0.05$), 升高IgG1、IL-4浓度($P < 0.05$); 显著下调Th1细胞比例、Th1/Th2比值($P < 0.05$), 上调Th2细胞比例($P < 0.05$)。结论 蜂毒肽能通过调节Th1/Th2平衡抑制胶原诱导关节炎大鼠的炎症。

关键词: 蜂毒肽; Th1细胞; Th2细胞; 胶原诱导关节炎; 大鼠; 免疫

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)03-0444-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.03.011

Effect of immune regulation in collagen-induced arthritis rat model treated with melittin via Th1/Th2 pathway

HE Shoudi¹, FAN Zhaokun⁴, GUAN Li³, LI Deyu¹, YANG Pingchang², LIU Zhigang², HUANG Shengguang¹

1. Traditional Chinese Medicine Department of Rheumatism, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518060, China

2. Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

3. Department of Rheumatological Immunology, Luohu District people's Hospital, Shenzhen 518060, China

4. Department of intensive Medicine, the first affiliated Hospital of Zhejiang University of traditional Chinese Medicine, Hangzhou, 310000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of melittin on the immune regulation of arthritis rat model induced by collagen. **Methods** The arthritis rat model was successfully established and randomly divided into model group, melittin group and methotrexate group with six rats in each group. In addition, rats without modeling were selected as control group. After 14 d, the melittin were ip injected once every other day and methotrexate were ip given once a week for 21 d. The model group was given the same amount of normal saline, and the degree of joint swelling was observed and calculated. After drug administration, the serum was collected from rats, and the serum levels of IgG, IgG1, IgG2a, IFN- γ , and IL-4 were detected by ELISA. The spleen was isolated from rats and lymphocytes were extracted. The proportion of Th1 and Th2 cells was detected by flow cytometry. **Results** In the melittin group, there was redness in the joint skin, and the swelling of the joint was obviously alleviated. Compared with model group, melittin significantly inhibited joint swelling score ($P < 0.05$), reduced the concentrations of IgG, IgG2a, and IFN- γ in serum ($P < 0.05$), increased concentrations of IgG1 and IL-4 ($P < 0.05$), down-regulated the ratio of Th1 cells and the ratio of Th1/

收稿日期: 2018-06-18

基金项目: 国家自然科学基金(81271950); 深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20170307162827158, JCYJ20160429183052202); 深圳市卫生计生科研项目(201506091、201606050); 深圳市南山区科技项目(2015021、2015043、2015047、2017016)

#第一作者: 贺守第(1989-), 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为风湿免疫、中药。

范钊坤, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为中药、重症医学。

*通信作者: 黄胜光, 汉, 硕士, 研究方向为中医、风湿免疫。E-mail: helunkun@163.com Tel: 15013807112

Th2 ($P < 0.05$), and up-regulated the ratio of Th2 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Melittin can inhibit the inflammation in the collagen-induced arthritis by regulating Th1/Th2 balance.

Key words: Melittin; Th1; Th2; collagen induced arthritis; rats; immunity

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种常见的以滑膜慢性炎症和导致关节破坏为主要特点的慢性自身免疫性疾病,在全世界成年人中的患病率约为0.8%,与许多其他自身免疫性疾病相似,女性发病率高于男性^[1]。临床上,RA患者常常表现为关节肿胀、疼痛、僵硬、骨和软骨破坏及关节畸形,最终导致关节功能丧失^[2]。目前治疗RA的目的是减轻症状,防止关节破坏,维持关节功能,尽管目前有许多种方法治疗RA,但治疗疗效仍具有局限性和严重副作用。因此,开发和发现新的治疗药物具有重要意义。

T细胞免疫在RA的发生发展中起着重要的作用,Th1、Th2作为CD4⁺ Th细胞的2种重要亚型参与了RA关节炎整个发病过程。在RA发病过程中,自身抗原激活特异性T细胞并诱导Th1型反应,分泌干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,导致滑膜增生和炎症、关节软骨和关节结构损伤;而Th2型则分泌白细胞介素-4(IL-4)和IL-10,参与抑制RA小鼠自身免疫性炎症^[3]。因此,Th1/Th2的失衡是推动RA发生发展的关键因素。

目前中药治疗RA已经被证实^[4]。蜂毒是工蜂分泌的一种具有芳香气味的透明毒液,目前蜂毒已经在临床上运用在RA等关节炎病人来减轻疼痛和关节肿胀^[5]。蜂毒肽作为蜂毒的主要成分,约占蜂毒干质量的50%,目前研究发现,蜂毒肽能抑制人RA成纤维滑膜细胞及胶原诱导关节炎动物模型的基质金属蛋白酶-1、3(MMP-1、3)、TNF- α 的表达,抑制滑膜成纤维细胞的增殖和促进凋亡^[6-8]。而目前关于蜂毒肽对RA免疫调节方面研究较少。

1 材料

1.1 主要试剂

蜂毒肽(分子式 Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val - Leu-Thr-Thr-Thr-Gly-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂,质量分数98%,由北京中科亚光生物科技有限公司合成);甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)、牛II型胶原、完全弗氏佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's adjuvant, IFA),均购自美国sigma公司;流式抗体:Anti-Rat CD4-APC、Anti-Rat IFN- γ -FITC、Anti-Rat IL-4-PE(美国Biolegend公

司);抗大鼠IL-4、IFN- γ 血清ELISA试剂盒(北京四正柏公司);抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)、IgG1、IgG2a抗体(southernbiotech公司);小鼠淋巴细胞分离液(北京达科为生物技术有限公司);RPMI Medium 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);青霉素(美国Hyclone公司)。

1.2 主要仪器

流式细胞仪RACSCAlibur(美国BD biosciences公司);全波长酶标仪Multiskar(美国Thermo公司);二氧化碳细胞培养箱INC108(德国memmert公司)。

1.3 实验动物

健康SD雌性大鼠30只,SPF级,体质量150~180 g,购于广东省实验动物中心,合格证号:SYXK(粤)2014-0140,许可证编号NO.44007200010269;饲养于深圳大学医学部SPF实验动物中心。

2 方法

2.1 动物模型的建立与给药

建立胶原诱导关节炎大鼠模型,将II型牛胶原溶于0.01 mmol/L醋酸中,4℃混匀过夜,配置成4 mg/mL牛II型胶原溶液;再将牛II型胶原溶液与等体积的CFA充分混匀制成胶原溶液,反复混匀乳化油包水乳剂。将配制的牛II型胶原与等体积的IFA充分混匀制成胶原溶液,反复混匀乳化油包水乳剂。

将30只雌性大鼠随机分为对照组(6只)、模型组(24只),无菌条件下在模型组大鼠尾部1 cm处sc牛II型胶原与CFA乳剂150 μ L/只(含牛II型胶原0.3 mg/只),记为第1天,第10天再次注射牛II型胶原与IFA乳剂50 μ L/只(含牛II型胶原0.1 mg/只)。对照组6只大鼠用同样方法注入等量生理盐水。第14天统计关节肿胀评分(方法见“2.2”项),取关节评分大于4分的大鼠,随机分为模型组、蜂毒肽组、甲氨蝶呤组。根据既往文献研究^[9],设置蜂毒肽组剂量(0.5 mg/kg,溶于灭菌注射用水,ip,隔日1次),甲氨蝶呤组(1 mg/只,溶于灭菌注射用水,ip,1次/周),共给药21 d,模型组注射等量灭菌注射用水,给药结束后给予乙醚注射液麻醉,心脏穿刺取血,脱颈处死。

2.2 关节肿胀程度观察和评分

造模后开始每周观察和评估关节肿胀。关节炎指数(Arthritis Index, AI)评分按5级评分法评

价(0分:无红肿;1分:小趾关节红肿;2分:趾关节和足趾肿胀;3分:踝关节以下的足爪肿胀;4分:包括踝关节在内的全部足爪肿胀)。

2.3 标本采集及处理

心脏穿刺取血 5 mL, 4 °C 静置 30 min, 3 500 r/min 离心 10 min, 取血清, 放置 -80 °C 冰箱保存, 待测; 超净工作台分离出大鼠脾脏, 剪少量脾脏组织, 放入尼龙网中, 加入适量淋巴细胞分离液, 充分碾磨脾组织至无块状物, 尼龙网过滤, 加入 1640 培养基, 放入离心机 (20 °C, 800×g) 离心 30 min, 吸取单核细胞层, 培养基洗涤后, 待测。

2.4 血清 IgG、IgG1、IgG2a、IFN- γ 、IL-4 水平检测

采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 IgG、IgG1、IgG2a 水平: 以 10 mg/L 胶原蛋白于 4 °C 包被过夜, 用 3% BSA/PBS 于 37 °C 封闭 2 h; 以 1% BSA/PBST 稀释小鼠血清, 37 °C 孵育 2 h。洗板后, 加入二抗 HRP-兔抗大鼠 IgG、IgG1、IgG2a (1:1 500 稀释于 PBS), 37 °C 孵育 2 h, 经 TMB 显色后终止反应。采用全波长酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度 (A_{450}) 值。

采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 IFN- γ 、IL-4 水平, 具体操作根据试剂盒说明书进行。采用全波长酶标仪检测 450 nm 波长处 A_{450} 值, 绘制标准化曲线, 计算 IFN- γ 、IL-4 含量。

2.5 Th1、Th2 细胞检测

取分离好的脾脏单核细胞, 分管 1×10^8 /mL; 加入 cell stimulation cocktail, 细胞培养箱 (37 °C、5%CO₂) 孵育 16 h; 离心, 以 100 μ L 细胞悬液 (细胞数约 1×10^7 /管) 加入流式管中; 加入 Anti-Rat CD4-APC, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤离心后, 加入 IC Fixation Buffer, 室温孵育 20 min, 流式缓冲液洗涤; 再次加入固定/破膜工作液, 避光 4 °C 孵育 20 min, 加入 Permeabilization Buffer, 室温孵育 15 min, 加入 anti-rat-IL-4-PE、anti-rat-IFN- γ -FITC, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤离心后, 加入 1 mL 流式细胞缓冲液重

悬细胞, 上机检测并分析, 应用 Flowjo 7.6.1 软件分析数据。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

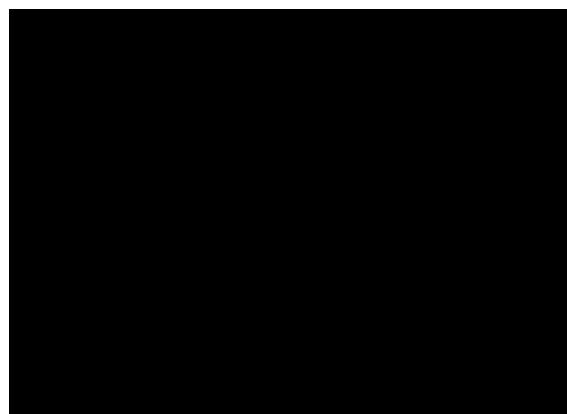
3 结果

3.1 关节肿胀观察

观察大鼠踝关节肿胀情况, 对照组: 皮肤无发红, 关节无肿胀; 模型组: 皮肤充血发红, 足趾及趾关节明显肿胀, 关节畸形; 蜂毒肽组: 皮肤发红, 足趾及趾关节轻度肿胀, 关节畸形; 甲氨蝶呤组: 皮肤无发红, 趾关节轻度肿胀, 关节畸形。

3.2 AI 评分

与模型组比较, 蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 AI 评分明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 1。



与模型组比较: * $P < 0.05$ # $P < 0.01$
* $P < 0.05$ # $P < 0.01$ vs model group

图 1 AI 评分 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 AI score ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 血清 IgG、IgG1、IgG2a 水平比较

通过 ELISA 法检测血清中特异性 IgG、IgG1、IgG2a 的 A 值, 与对照组比较, 模型组中 IgG、IgG1、IgG2a 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 IgG、IgG2a 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 IgG1 显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清 IgG、IgG1、IgG2a 的 A 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison of A values of serum IgG, IgG1 and IgG2a in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	A 值		
		IgG	IgG1	IgG2a
对照	—	0.72±0.05	0.39±0.08	0.56±0.13
模型	—	3.32±0.23*	1.23±0.32*	1.92±0.21*
蜂毒肽	0.5 mg·g ⁻¹	1.92±0.12#	1.99±0.23#	1.13±0.16#
甲氨蝶呤	1 mg·只 ⁻¹	1.32±0.21#	2.12±0.16#	1.02±0.24#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

3.4 大鼠血清 IFN- γ 、IL-4 浓度比较

通过 ELISA 法检测血清 IFN- γ 、IL-4 浓度,与对照组比较,模型组 IFN- γ 、IL-4 浓度显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.05);与模型组比较,蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 IFN- γ 浓度显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 IL-4 浓度显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.5 大鼠脾细胞 Th1、Th2 细胞比较

如图 3 所示,通过流式细胞术检测脾细胞 Th1、Th2 细胞比例,以 IFN- γ 、IL-4 分别为 Th1、Th2 细胞标志物。与对照组比较,模型组 Th1、Th2 细胞比例显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.05);与模型组比较,蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 Th1 细胞比例显著降低 ($P < 0.05$);蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 Th2 细胞比例显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。计算脾细胞 Th1/Th2 比值,与对

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 2 血清 IFN- γ 、IL-4 浓度检测 ($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Concentration detection of serum IFN- γ and IL-4 ($\pm s$, $n = 6$)

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 3 大鼠脾细胞 Th1、Th2 细胞检测 ($\pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Detection of Th1 and Th2 cells in rat splenocytes ($\pm s$, $n = 6$)

照组比较,模型组 Th1/Th2 比值显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,蜂毒肽组、甲氨蝶呤组 Th1/Th2 比值降低($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IFN- α ,介导细胞和局部炎症有关的免疫应答,辅助抗体生成,参与机体的细胞免疫;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 等,主要功能为刺激 B 细胞增殖并产生免疫球蛋白抗体,参与机体的体液免疫过程^[3]。在 RA 中 Th1 活性增强被定义为产生 IFN- γ ,而 Th2 细胞活性下降被定义为产生 IL-4^[5]。而在 RA 中,Th1/Th2 比例失衡通过细胞间的接触,促进巨噬细胞和树突状细胞的活性和细胞因子的分泌^[10],使炎症持续存在,最终导致关节功能受损。因此,针对 Th1 和 Th2 及其细胞因子反应是延缓 RA 致病过程的一种治疗策略。

本研究观察了蜂毒肽对胶原诱导关节炎治疗的效果,发现蜂毒肽、甲氨蝶呤能减少大鼠 AI 肿胀程度及评分来减轻炎症。甲氨蝶呤片作为类风湿关节炎最经典药物,目前仍是 RA 治疗基础用药。因此治疗疗效观察结果提示,蜂毒肽可用于治疗 RA。以往的研究表明,蜂毒肽能抑制 MMP-1、3 和 TNF- α 的表达,抑制滑膜成纤维细胞的增殖和促进凋亡^[6-8]。而 Th1/Th2 失衡是自身免疫性 RA 的主要免疫学机制,本研究观察了蜂毒肽对 Th1 和 Th2 细胞的影响,以及血清中 IFN- γ 和 IL-4 在大鼠模型中的表达。与模型组比较,蜂毒肽明显降低了大鼠 Th1 细胞比例、Th1/Th2,同时可提高大鼠血清抗炎因子 IL-4 水平,降低 IFN- γ 水平,说明蜂毒肽在 RA 中能抑制 Th1 细胞,促进 Th1/Th2 向 Th2 发展,从而达到治疗 RA 目的。近年来研究发现,机体发生免疫应答所产生的抗体受 Th1、Th2 细胞因子的调控,并与特异性抗体 IgG 亚类的表达水平相关。Th1 细胞可以诱导 B 细胞产生 IgM、IgG2a、IgA 等,而 IFN- γ 可抑制 IgG1 和 IgE 的产生;Th2 可刺激 B 细胞产生 IgG1,而 IL-4 可抑制 IgG2a 的产生^[11]。通过检测血清中 IgG 抗体,发现治疗后蜂毒肽能抑制总 IgG 的水平,说明蜂毒肽抑制胶原诱导关节炎模型的整体免疫反应,与 RA 免疫亢进相符合。同时本研究发现,血清中 IgG2a 水平降低,而 IgG1 水平上升,间接证明蜂毒肽能通过上调 Th2、下调 Th1 治疗 RA。

目前临床使用蜂毒治疗 RA 主要治疗方式是蜂蛰疗法,然而天然蜂毒具有很强的溶血活性,易引起患者的溶血性贫血;此外蜂毒还含有能引起过敏反应的透明质酸磷脂酶^[12]。目前既往研究未报道

关于蜂毒肽引起上述副作用,本研究发现,蜂毒肽能降低胶原诱导关节炎大鼠中促炎 T 细胞 Th1 反应,增强抗炎 T 细胞 Th2 反应,既往研究表明蜂毒肽能有效的抑制 RA 炎症,说明蜂毒肽可能在临床上为 RA 开发新的治疗方法提供有价值的药物。目前在研究 RA T 细胞免疫中,Th17/Treg 细胞在调节 Th1/Th2 起重要作用^[13],接下来将进一步研究蜂毒肽是否能调节 Th17/Treg 细胞的反应。甲氨蝶呤片是治疗 RA 的经典药物,但甲氨蝶呤常引起胃肠道反应、肺间质病变等副作用,临床需要改用其他较弱的免疫抑制剂。且在控制严重的 RA 中,甲氨蝶呤也需要联合其他免疫抑制剂如来氟米特、羟氯喹等。虽然本研究发现蜂毒肽效果不如甲氨蝶呤,但蜂毒肽也许能替代其他免疫抑制剂治疗或者联合甲氨蝶呤治疗 RA,这也是下一步探究方向。

蜂毒肽通过下调 Th1、上调 Th2 细胞调节 Th1/Th2 平衡,抑制胶原诱导关节炎大鼠模型炎症反应,本研究为蜂毒肽治疗 RA 提供新理论机制,为临床上 RA 治疗提供新的药物。

参考文献

- [1] Alamanos Y, Drosos A A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(3): 130-136.
- [2] Manivel V A, Sohrabian A, Wick M C, et al. Anti-type II collagen immune complex-induced granulocyte reactivity is associated with joint erosions in RA patients with anti-collagen antibodies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 8.
- [3] Lubberts E. Role of T lymphocytes in the development of rheumatoid arthritis. Implications for treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(2): 142-146.
- [4] Cameron M, Gagnier J J, Little C V, et al. Evidence of effectiveness of herbal medicinal products in the treatment of arthritis. Part 2: Rheumatoid arthritis [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(12): 1647-1662.
- [5] Dolhain R J, van der Heiden A N, ter Haar N T, et al. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(12): 1961-1969.
- [6] Li J H, Ke T, He C, et al. The anti-arthritis effects of synthetic melittin on the complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(6): 1039-1049.
- [7] Kim S K, Park K Y, Yoon W C, et al. Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF- κ B and STAT3 activation and Bcl-2

- expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(5): 471-477.
- [8] Nah S S, Ha E, Mun S H, et al. Effects of melittin on the production of matrix metalloproteinase-1 and -3 in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106(1): 162-166.
- [9] Li J H, Ke T, He C, et al. The anti-arthritic effects of synthetic melittin on the complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(6): 1039-1049.
- [10] van Roon J A, van Roy J L, Duits A, et al. Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T helper-1 activation is inhibited by interleukin-4 [J]. *Ann Rheum Dis*, 1995, 54(10): 836-840.
- [11] Lefranc G, Chaabani H, Van Loghem E, et al. Simultaneous absence of the human IgG1, IgG2, IgG4 and IgA1 subclasses: immunological and immunogenetical considerations [J]. *Eur J Immunol*, 1983, 13(3): 240-244.
- [12] Somerfield S D, Stach J L, Mraz C, et al. Bee venom melittin blocks neutrophil O_2 production [J]. *Inflammation*, 1986, 10(2): 175-182.
- [13] Chen L N, Wang C H, Leng N, et al. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th_1/Th_2 , $Th_{17}/Treg$ imbalance in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(4): 596-605.