

类风湿关节炎免疫学发病机制研究的最新进展*

周莹¹, 王子铭², 虞伟², 李晓军² (1. 江苏大学医学院, 江苏镇江 212013;
2. 东部战区总医院中心实验科, 南京 210002)

摘要: 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以对称性多关节炎为特征的慢性、进行性、侵袭性风湿免疫病。RA不仅自身免疫系统功能紊乱,也涉及心、肺、肾、神经和血管等多个系统,不同程度地影响着患者的健康和生活质量。该文探讨了RA免疫学发病机制研究的最新进展,以加深人们对疾病的认识,为RA的基础研究和临床治疗提供讨论的依据与新的方向。

关键词: 类风湿关节炎;瓜氨酸化修饰;自身免疫应答;破骨细胞

中图分类号: R593.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2019)01-157-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.01.041

New Advances in Immunology Research on the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis

ZHOU Ying¹, WANG Zi-ming², YU Wei², LI Xiao-jun²

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China; 2. Department of Central Laboratory, East Theater General Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive, invasive rheumatic immune disease characterized by symmetrical polyarthritis. RA not only has autonomic immune system dysfunction, but also involves multiple systems, such as heart, lung, kidney, nerve and blood vessels, which affect the health and quality of life of patients. This article discusses the new progress of immunology research on the pathogenesis of RA, in order to deepen the understanding of the disease, and to provide the basis and new direction for basic research and clinical treatment of RA.

Keywords: rheumatoid arthritis; citrullinate modification; autoimmune response; osteoclast

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性炎症反应与进行性骨损伤为特征的自身免疫性疾病。RA患者多表现有免疫系统功能紊乱,也可并发心、肺、肾、神经和血管等多个系统疾病^[1]。随着医疗水平的不断发展,RA患者的病情进展可通过正规的治疗得到缓解,但仍不能彻底治愈,因此,探索RA的发病机制对于精准治疗就显得非常重要。RA的发病机制十分复杂,迄今没有一个明确结论。一般认为是某种环境因素(如吸烟、微生物感染)作用于有一定遗传背景的人,刺激引发免疫病理反应所致。本文仅就RA发病有关免疫学机制研究的最新进展作一综述,以期为临床研究及治疗提供理论依据。

1 RA相关遗传因素 人类白细胞抗原(HLA)II类等位基因与RA之间的联系可追溯至组织和HLA分型的早期^[2]。但迄今对于RA发病机制,特别是与抗原特异性相关的主要组织相容性复合体(MHC)限制性免疫应答机制,仍缺乏更准确的解释。现有的普遍观点认为,在与RA相关HLA

II类等位基因的肽结合槽内,存在共同氨基酸序列(共享表位),为HLA II类分子参与致病提供了间接依据。更准确地说,HLA-DR β 链的70-74位点处5个氨基酸(QKRAA或QRRAA),形成了HLA II类分子的带正电荷的P4结合槽,该结合槽对于含精氨酸的肽是不利结合位点,而更容易结合瓜氨酸化修饰后的同一种肽,是RA的强易感因子^[3]。最近,Ohmura等^[4]提出了一种新的自身抗体产生机制:错误折叠的蛋白质与内质网中的HLA II类分子结合,被处理后呈现在细胞表面,这种错误折叠的蛋白质/HLA II类分子复合物可以刺激B细胞,诱导自身抗体产生。令人惊讶的是,RA易感人群HLA II类分子可以有效地结合IgG重链(IgGH),但与RA相关性差的人,其HLA II类分子则不能结合IgGH。因此,通过错误折叠的自身抗原与某些HLA II类分子的亲和力,可以判定患者对某些自身免疫病(如RA)的易感性。

2 蛋白质修饰

2.1 瓜氨酸化 瓜氨酸化是一种蛋白质翻译后的

* 基金项目:国家自然科学基金(81470071),国家临床重点专科建设项目(2014ZDZK003-1),江苏省临床医学科技专项(BL2014072),军区医药卫生科研重点专项(14ZX17)。

作者简介:周莹(1993—),女,硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学,E-mail:zhouying161006@126.com。

通讯作者:虞伟,博士,主任医师,硕士生导师,E-mail:yuwei211@126.com。

李晓军,博士,主任医师,博士生导师,E-mail:xiaojunli62@126.com,共同通讯作者。

修饰过程,指蛋白质肽链中的精氨酸残基在肽基精氨酸脱亚氨酶(peptidyl arginine deiminases, PADs)作用下转化为瓜氨酸残基。

瓜氨酸化修饰可改变氨基酸的总电荷和氢键结合力,影响该氨基酸与其他蛋白质在结构上的相互作用,并且在某些情况下改变蛋白质结构域。因此,瓜氨酸化修饰可以通过改变蛋白质一级、二级和三级结构,改变抗原加工、抗原提呈和免疫识别过程,从而增加抗原多态性^[3]。能够识别瓜氨酸化蛋白的所有抗体统称为抗瓜氨酸化蛋白抗体(anti-citrullinated proteins antibodies, ACPA)。在过去几年中,针对瓜氨酸化蛋白的自身抗体已经成为 RA 的主要研究对象,并列为 RA 的分类标准,作为早期诊断 RA 并预测疾病进展的血清学标志物。近年来,已经鉴定出了多种瓜氨酸化自身抗原,如纤维蛋白原、波形蛋白、纤连蛋白和 α -烯醇酶,并发现相应的自身抗体。

2.2 肽基精氨酸脱亚氨酶(PADs) 肽基精氨酸脱亚氨酶有五种同工酶,分别表达于不同组织。其中, PAD2 和 PAD4 在 RA 患者血液和滑膜组织中高表达,被认为是驱动 RA 患者自身抗原瓜氨酸化的主要因素。PAD2 主要在肌肉组织、中枢神经系统和造血细胞中表达,而 PAD4 是一种 Ca^{2+} 依赖性酶,可能与 RA 遗传易感性相关,主要分布于造血细胞(尤其是中性粒细胞的祖细胞)^[5~7]。除了组织表达差异, PAD2 具有细胞质分布特性,而 PAD4 主要存在于细胞核中^[8~9]。这些研究结果提示了不同 PAD 作用于不同细胞底物的可能性,不同自身抗体可能表明瓜氨酸化特异性 PAD 的活性。有趣的是, PAD4 自身有 10 个瓜氨酸化潜在位点,可在体外和表达 PAD4 的细胞中自动被瓜氨酸化,其中 372 和 374 位点的精氨酸可能是使酶失活的潜在靶标^[9]。但是, PAD4 在正常细胞内自动保持瓜氨酸化平衡的机制尚不明确,推测可能与体内 Ca^{2+} 浓度的变化有关;并且 RA 患者的 PAD4 如何耐受自身瓜氨酸化的机制也不十分清楚。此外, PAD3 主要分布于皮肤, Seaman 等^[10]发现抗 PAD3 抗体水平与关节侵蚀程度相关,且 PAD3 和 PAD4 之间交叉反应的抗体可能导致 PAD4 活性增加。因此,抗 PAD3 抗体可能是预测 RA 患者关节损伤的重要标志物。

3 RA 相关的免疫应答 在揭示瓜氨酸化自身抗原在 RA 中的致病性之后,越来越多的研究致力于发现自身免疫反应的特点和规律,以期实现对自身免疫过程进行调控。

3.1 T 细胞 目前,对瓜氨酸具有反应性的 CD4^+ T 细胞已被证实为部分 ACPA 的靶标。

James 等^[11]研究发现,健康受试者和 RA 患者的外周血中均可检测到瓜氨酸特异性 CD4^+ T 细胞,但与健康受试者相比, RA 患者的瓜氨酸特异性 CD4^+ T 细胞具有较高的检出频率,且大多数显示为 Th1 记忆表型。与此同时,在 RA 诊断后的前 5 年内,瓜氨酸特异性 CD4^+ T 细胞的检出频率最高,在服用生物制剂的患者中降低。这些发现为瓜氨酸特异性 CD4^+ T 细胞与 RA 的相关性提供了一定的理论依据,但 CD4^+ T 细胞活化及促进 RA 疾病进展的机制仍需进一步探究。正常情况下, T 细胞对自身抗原耐受,以避免自身免疫反应的发生,同时又必须对外来抗原具有反应性,以对抗感染。随后, Salmond 等^[12-13]的一项研究结果提示, PTPN22(编码酪氨酸磷酸酶)通过限制初始 T 细胞和效应 T 细胞的 T 细胞抗原受体(TCR)对自身抗原和弱激动抗原的信号传递,实现免疫耐受,且不阻碍对外来抗原的反应。但是,缺乏 PTPN22 的 T 细胞与弱激动抗原的抗原提呈细胞的结合增强,降低 T 细胞的激活阈值,促使 T 细胞活化及其炎性细胞因子的产生。这一结果解释了丧失功能的 PTPN22 等位基因可使效应 T 细胞或记忆 T 细胞群体扩增,促进人类发生自身免疫疾病的倾向。更为重要的是, PTPN22 相关等位基因与 HLA-DR 等位基因具有较强的基因与基因间相互作用,因此,对 PTPN22 的深入研究将进一步完善对 RA 发病机制的了解。此外,在 RA 患者中, CD4^+ T 细胞过度增殖,并分化为效应细胞,产生细胞因子,导致疾病发展。近期有研究指出,与健康人的 T 细胞相比, RA 患者的 T 细胞由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的上调,致使糖酵解过程产生缺陷。过量的 G6PD 使葡萄糖分流到磷酸戊糖途径中,导致 NADPH(还原形式的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)积累和活性氧(ROS)消耗,随着还原当量过剩, T 细胞不能有效地激活相关的氧化还原敏感性激酶,绕过 G2/M 细胞周期的调控关卡,最终过度增殖^[14]。除了对 CD4^+ T 细胞的研究,在 RA 患者血清鉴定出 T 细胞亚群中,过量的 Th17 细胞介导破骨细胞和滑膜新血管生成,参与 RA 骨侵蚀过程^[15]。研究表明:与健康对照组相比, RA 组患者 Th17 细胞数量增加,与疾病活动呈正相关,与 ACPA 和 RF 水平没有明显差异^[16]。当 RA 小鼠模型全身给予唾液酸结合 Ig 样凝集素-9(sialic acid-binding Ig-like lectin-9, Siglec-9)时, Th17 细胞分化减少且 Treg 细胞增殖,小鼠关节炎症反应和骨损伤得到改善^[17],这些结果证明 Th17 细胞等亚群失衡可能是 RA 疾病进展的重要因素。

3.2 中性粒细胞胞外捕获网 中性粒细胞胞外捕

获网(NETs)是一种强大的免疫防御机制,可以捕获并杀死细胞外细菌。免疫防御过程中,中性粒细胞排出颗粒复合物(NETs),其中存储含多种抗微生物酶的松散染色质,负电荷的染色质捕获细菌,利用酶杀死病原体^[18]。Khandpur等^[19]研究发现,与健康对照组和骨关节炎患者的中性粒细胞相比,在RA患者的循环中检测到高水平的NETs,且浸润滑膜组织、类风湿结节和皮肤;同时,具有高水平ACPA的RA患者的血清中NETs显著升高。这一研究成果表明,RA患者体内可能发生异常的NETs。巧合的是,NETs的形成需要两个主要的生化活动。首先,PTPN22酶的失活被认为是NETs产生的必要条件,这种酶失活可能参与了核包膜的拆除和NETs组件的混合^[20];其次,免疫荧光研究表明,NETs是由DNA和组蛋白等细胞内物质组成,而PAD4可作用于核小体的三种组蛋白,使其含有的精氨酸残基瓜氨酸化,阻止组蛋白甲基化和进一步转录,引起染色质解聚,是NETs形成的中心环节^[20-21],这就恰好解释了RA患者出现高水平NETs的机制。此外,NETs含有重要的PAD沉积物,促进瓜氨酸化产物的形成,血浆NETs水平对早期RA关节炎的诊断显示出高特异度(92%)和敏感度(91%),NETs已被提出作为RA诊断的一种新型标志物^[8]。

3.3 活化的B细胞 B细胞在RA发病机制中的作用已研究和讨论了多年,主要集中在类风湿因子(rheumatoid factor, RF)和免疫复合物方面。目前,RF与ACPA已广泛应用于RA的临床诊断、病情监测及预后评估。近年来,B细胞靶向治疗的临床疗效突出了B细胞在炎性疾病中的致病潜力,探究产生RA特异性自身抗体的B细胞和浆细胞将对RA的临床治疗具有重要意义。最近,有研究对此提供了见解:记忆B细胞亚群富集于RA患者的关节和黏膜相关淋巴组织,以Fc样受体4(Fc receptor like 4, FcRL4)的表达区分记忆B细胞。研究人员从RA患者的滑液和组织中分离单个FcRL4⁺和FcRL4⁻B细胞,并鉴定其免疫球蛋白基因,从FcRL4⁺B细胞产生的重组抗体对瓜氨酸化自身抗原具有较高程度的反应性^[22]。FcRL4具有IgA受体的作用,其潜在的黏膜免疫功能,可能是RA患者黏膜和关节炎症的原因之一。鉴定B细胞亚群对RA疾病的靶向治疗可能具有指导性价值。

4 破骨细胞依赖性骨损伤 破骨细胞促进骨吸收,是骨骼生长及愈合过程中重要的一种骨髓细胞。破骨细胞过度活化,导致RA患者骨丢失与关节破坏的观点已被广泛接受,但破骨细胞活化机制

尚不明确。位于RA滑膜和骨界面处的多核破骨细胞附近不存在成骨细胞和骨细胞,可吸收骨组织;同时滑膜处的大量促炎症因子,通过激活NF- κ B诱导RANKL,有效促进破骨细胞成熟,导致骨侵蚀^[23]。另外,在RA疾病早期,PAD的活性增高使成熟破骨细胞中瓜氨酸化自身抗原表达增加,ACPA识别抗原,并激活破骨细胞分泌白介素8(IL-8),该分子可进一步促进破骨细胞发育和成熟,使破骨细胞激活进入一种类似正反馈的自我循环之中;IL-8通过与CXC趋化因子受体(CXCR1和CXCR2)结合激活感觉神经元,产生关节痛。与此同时,将ACPAs移植到小鼠中,可诱导由IL-8拮抗剂完全逆转的骨丢失^[24-25]。由此说明,IL-8很可能是RA破骨细胞活化的主要效应分子,探究这一途径可解释RA患者的骨关节损害倾向。

Tanaka等^[23]将来源于RA患者的滑膜细胞放在骨切片上培养,滑膜巨噬细胞分化的多核细胞表现出骨再吸收活性,表明RA滑膜组织为破骨细胞分化提供了有利的微环境^[26]。针对破骨细胞的研究,进一步加深了人们对于RA骨损伤的认识。

5 结语与展望 一直以来,RA治疗多采用抗代谢(如甲氨蝶呤)或免疫抑制方案,但由于药物副作用,患者服药依从性普遍偏低,致使病情不断反复甚至恶化。已有研究者利用现有理论探索PAD酶抑制剂、IL-8受体抑制剂、CXC趋化因子受体的变构抑制剂来减轻疾病病情或治愈RA的可能性。随着研究的不断深入,RA的发病机制有望得到进一步揭示,为RA的实验室诊断及临床治疗提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] DAS S, PADHAN P. An overview of the extraarticular involvement in rheumatoid arthritis and its management[J]. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 2017, 8(3): 81.
- [2] VANDER WOUDE D, CATRINA A I. HLA and anti-citrullinated protein antibodies: building blocks in RA[J]. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2015, 29(6): 692-705.
- [3] NGUYEN H, JAMES EA. Immune recognition of citrullinated epitopes[J]. Immunology, 2016, 149(2): 131-138.
- [4] OHMURA K, HIWA R, ARASE H. A new mechanism of autoantibody production: antigen presentation of misfolded protein by MHC class II[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2014, 37(6): 462-467.
- [5] 沈小辉, 喻伟, 杨菲. 类风湿关节炎患者滑膜抗环瓜氨酸肽表位表达与肽酰基精氨酸脱亚氨酶4基因的相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 26-29.

- SHEN Xiaohui, YU Wei, YANG Fei. Relation analysis of synovial anti-citrullinated epitope peptide expression and peptidyl arginine deiminase 4 gene in the rheumatoid arthritis patient [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(3): 26-29.
- [6] VALESINI G, GERARDI M C, IANNUCCELLI C, et al. Citrullination and autoimmunity [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2015, 14(6): 490-497.
- [7] ZHOU Yebin, AN Lingling, CHAERKADY R, et al. Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 15228.
- [8] WONG S L, WAGNER D D. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging [J]. *The FASEB Journal*, 2018: <https://doi.org/10.1096/fi.201800691R>.
- [9] DAMGAARD D, SENOLT L, NIELSEN C H. Increased levels of peptidylarginine deiminase 2 in synovial fluid from anti-CCP-positive rheumatoid arthritis patients: Association with disease activity and inflammatory markers [J]. *Rheumatology*, 2016, 55(5): 918-927.
- [10] SEAMAN A, DARRAH E, INFANTINO M, et al. Anti-peptidyl-arginine deaminase 3 (PAD3) antibodies as a promising marker to measure joint damage in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2016, 15(7): 776-780.
- [11] JAMES E A, RIECK M, PIEPER J, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy [J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2014, 66(7): 1712-1722.
- [12] SALMOND R J, BROWNLIE R J, MORRISON V L, et al. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals [J]. *Nature Immunology*, 2014, 15(9): 875-883.
- [13] BROWNLIE R J, ZAMOYSKA R, SALMOND R J. Regulation of autoimmune and anti-tumour T-cell responses by PTPN 22 [J]. *Immunology*, 2018, 154(3): 377-382.
- [14] YANG Zhen, SHEN Yi, OISHI H, et al. Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic T cell effector functions in rheumatoid arthritis [J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(331): 331ra38.
- [15] MA Ailing, YANG Yongya, WANG Qiu-yang, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6): 3615-3622.
- [16] BAZZAZI H, AGHAEI M, MEMARIAN A, et al. Th1-Th17 ratio as a new insight in rheumatoid arthritis disease [J]. *Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology*, 2018, 17(1): 68-77.
- [17] WANG Xiaoyuan, LIU Dan, NING Yaxin, et al. Siglec-9 is upregulated in rheumatoid arthritis and suppresses collagen-induced arthritis through reciprocal regulation of Th17-/Treg-cell differentiation [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2017, 85(6): 433-440.
- [18] MASTRANGELO A, COLASANTI T, BARBATI C, et al. The role of posttranslational protein modifications in rheumatological diseases: focus on rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015: 712490.
- [19] KHANDPUR R, CARMONA-Rivera C, VIVEKANANDAN-GIRI A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(178): 178ra40.
- [20] VERMEREN S, MILES K, CHU J Y, et al. PTPN22 is a critical regulator of Fcγ receptor-mediated neutrophil activation [J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(12): 4771-4779.
- [21] CECCHI I, DE LA ROSA I A, MENEGATTI E, et al. Neutrophils: novel key players in rheumatoid arthritis. Current and future therapeutic targets [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2018, 17(11): 1138-1149.
- [22] TANAKA Y, OHIRA T. Mechanisms and therapeutic targets for bone damage in rheumatoid arthritis, in particular the RANK-RANKL system [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2018, 40: 110-119.
- [23] AMARA K, CLAY E, YEO L, et al. B cells expressing the IgA receptor FcRL4 participate in the autoimmune response in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2017, 81: 34-43.
- [24] KRISHNAMURTHY A, JOSHUA V, HENSVOLD A H, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016, 75(4): 721-729.
- [25] WIGERBLAD G, BAS DB, FERNADES-CERQUEIRA C, et al. Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016, 75(4): 730-738.
- [26] TANAKA S. Emerging anti-osteoclast therapy for rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Orthopaedic Science*, 2018, 23(5): 717-721.