

# 类风湿性关节炎

## 炎症因子DNA甲基化谱

付丽红 著

---

LEIFENGSHIXING GUANJIEYAN  
YANZHENG YINZI DNA JIAJIHUAPU

# 类风湿性关节炎

## 炎症因子DNA甲基化谱

付丽红 著

LEIFENGSHIXING GUANJIEYAN  
YANZHENG YINZI DNA JIAJIHUAPU

河北科学技术出版社

## 图书在版编目 ( C I P ) 数据

类风湿性关节炎炎症因子 DNA 甲基化谱 / 付丽红著  
· — 石家庄: 河北科学技术出版社, 2017. 6  
ISBN 978 - 7 - 5375 - 9058 - 7

I. ①类… II. ①付… III. ①类风湿性关节炎 - 表观遗传学 - 研究 IV. ①R593. 22

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 138009 号

## 类风湿性关节炎炎症因子 DNA 甲基化谱

付丽红 著

---

|      |                                      |
|------|--------------------------------------|
| 出版发行 | 河北科学技术出版社                            |
| 地 址  | 石家庄市友谊北大街 330 号 (邮编: 050061)         |
| 印 刷  | 河北新华第二印刷有限责任公司                       |
| 开 本  | 787 × 1092 1/16                      |
| 印 张  | 7.25                                 |
| 字 数  | 156 千字                               |
| 版 次  | 2017 年 6 月第 1 版<br>2017 年 6 月第 1 次印刷 |
| 定 价  | 20.00 元                              |

---

# 目 录

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| 引言 .....                       | ( 1 )  |
| 第一章 表观遗传学与自身免疫性疾病 .....        | ( 3 )  |
| 一、表观遗传学的产生和遗传学的发展 .....        | ( 3 )  |
| 二、表观遗传学机制 .....                | ( 4 )  |
| 三、表观遗传学与自身免疫性疾病的关系 .....       | ( 7 )  |
| 四、自身免疫性疾病表观遗传学研究展望 .....       | ( 11 ) |
| 第二章 类风湿性关节炎患者外周血炎症因子表达 .....   | ( 18 ) |
| 一、类风湿性关节炎炎症因子简介 .....          | ( 18 ) |
| 二、材料与方法 .....                  | ( 19 ) |
| 三、类风湿性关节炎患者外周血炎症因子表达 .....     | ( 25 ) |
| 四、类风湿性关节炎患者外周血炎症因子与疾病发展 .....  | ( 29 ) |
| 五、小结 .....                     | ( 32 ) |
| 第三章 类风湿性关节炎炎症因子基因甲基化状态 .....   | ( 35 ) |
| 一、类风湿性关节炎炎症因子与基因甲基化 .....      | ( 35 ) |
| 二、材料与方法 .....                  | ( 36 ) |
| 三、类风湿性关节炎炎症因子基因甲基化状态 .....     | ( 44 ) |
| 四、类风湿性关节炎炎症因子基因甲基化与疾病的发展 ..... | ( 48 ) |
| 五、小结 .....                     | ( 51 ) |

|     |                                            |       |
|-----|--------------------------------------------|-------|
| 第四章 | 5-氮杂胞苷对基因甲基化逆转及调节基因表达的机制 .....             | (54)  |
| 一、  | 5-氮杂胞苷与 DNA 甲基化 .....                      | (54)  |
| 二、  | 材料与方法 .....                                | (55)  |
| 三、  | 5-氮杂胞苷逆转 IL-10、IL-4 基因甲基化及调节<br>基因表达 ..... | (66)  |
| 四、  | 5-氮杂胞苷逆转基因甲基化与类风湿性关节炎治疗 .....              | (73)  |
| 五、  | 小结 .....                                   | (78)  |
| 第五章 | 同型半胱氨酸对炎症因子基因甲基化及表达的影响 .....               | (81)  |
| 一、  | 同型半胱氨酸与基因甲基化 .....                         | (81)  |
| 二、  | 材料与方法 .....                                | (82)  |
| 三、  | 同型半胱氨酸干扰炎症因子基因甲基化及调节基因表达 .....             | (89)  |
| 四、  | 同型半胱氨酸调节基因甲基化及表达与类风湿性关节炎<br>治疗 .....       | (95)  |
| 五、  | 小结 .....                                   | (97)  |
| 第六章 | DNA 甲基化的遗传学调查 .....                        | (99)  |
| 一、  | DNA 甲基化与遗传 .....                           | (99)  |
| 二、  | 材料与方法 .....                                | (100) |
| 三、  | 家系的 DNA 甲基化遗传 .....                        | (104) |
| 四、  | 类风湿性关节炎与 DNA 甲基化遗传 .....                   | (106) |
| 五、  | 小结 .....                                   | (108) |
| 结语  | .....                                      | (110) |

# 引 言

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 属自身免疫性结缔组织病, 以慢性、炎症性、多关节受累为主要表现, 其特征为以大量 T 淋巴细胞浸润为主的慢性滑膜炎。RA 的病因尚未明, 但是 T 细胞在 RA 的发病机制中有重要作用。T 细胞对未知抗原应答而活化, 引发炎症介质的连锁释放, 激活了炎症因子网络, 造成 RA 全身及关节的炎症反应和损伤。

探究 RA 的发病因素和进展机制是研究 RA 的重要环节。有研究发现, 在 RA 病人的不同部位存在不同的 T 辅助 (T helper, Th) 细胞。早期 RA 的外周血中, Th1 细胞占优势; 随着病情的进展, Th2 细胞占优势; 而滑膜及滑液中 Th1 细胞占优势。有报告称活动期 RA 患者外周血中调节性 T 辅助细胞 (regulated T cell, Treg) 数量减少及血清和关节液中 IL-17 增高。在 GPI (glucose-6-phosphate isomerase) 诱导的关节炎模型小鼠体内中发现 Th1、Th17 细胞占优势。以上发现提示 RA 外周血和关节局部 Th1、Th2、Treg 和 Th17 细胞间存在的动态平衡及交互抑制作用被打破, 机体处于 Th1/Th2/Treg/Th17 其中一种或几种细胞占优势的漂移现象, 这可能是导致 RA 全身及关节局部炎症持续的原因之一。

目前研究表明, 在自身免疫性疾病, 免疫细胞的数量和功能都呈现出明显的失衡状态, 如类风湿性关节炎、多发性硬化病为 Th1 及 Th1 型细胞因子占优势, 系统性红斑狼疮为 Th2 及 Th2 型细胞因子占优势。CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞分化过程除受细胞外环境因素和细胞内遗传因素影响外, 表观遗传学是调控 Th 细胞亚群分化及功能表达的一个重要机制。

表观遗传学 (epigenetics) 研究转录前基因在染色质水平的结构修饰对基因功能的影响, 是指不发生 DNA 序列改变的、可遗传的基因表达改变, 包括两个方面的重要内容: ①DNA 甲基化; ②组蛋白修饰 (甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化和糖基化)。DNA 甲基化是各种表基因机制的最后表现形式。DNA 甲基化是指 DNA 分子中胞嘧啶 5 位碳原子上的甲基修饰, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC)。哺乳动物基因组中 5-mC 集中在二核苷酸胞嘧啶 (CpG) 结构中, 主要包括分散于 DNA 中的 CpG 位点和 GC 高度聚集的 CpG 岛, 其中 CpG 岛位于基因的 5' 端启动子区和第一外显子区, 其甲基化与基因失活密切相关。

异常的表现遗传可能导致肿瘤、自身免疫性疾病、衰老和神经精神异常等。在自身免疫性疾病相关研究中,国内外学者均发现在 RA 患者存在 T 细胞基因组 DNA 低甲基化,外周血同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平升高,RA 患者外周血单个核细胞和关节滑膜细胞中死亡受体 3(death receptor 3, DR3)启动子呈高甲基化状态,细胞凋亡受抑制。而关于 RA 患者体内 Th1、Th2、Treg、Th17 细胞相关细胞因子 DNA 甲基化调控机制尚无研究报道。

表观遗传学是不改变基因序列的修饰,相对基因治疗更安全,目前已有很多研究关于表基因治疗疾病的报道。应用甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-azaC)可以使甲基化的启动子去甲基化,启动基因转录;高浓度同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可以介导基因甲基化而抑制表达。阐明表基因现象和机制对诊断疾病、研制新药以及防止和治愈疾病都有重要意义。

基于以上论点,本书提出以下假说:在类风湿性关节炎发生、发展过程中,初次发病及不同病程阶段 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞亚群存在不同的失衡状态, DNA 甲基化是导致这种失衡的原因之一,是细胞因子是否表达的开关。本书首先介绍了处于不同病程阶段的类风湿性关节炎患者外周血单个核细胞 Th1 型细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 、Th2 型细胞因子如 IL-4 和 IL-10, Treg 型细胞因子 IL-10 和 Th17 型细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-17 的动态变化,及其甲基化状态与类风湿性关节炎的相关性,筛选对 RA 早期诊断具有借鉴意义的甲基化指标,进而对 5-azaC、Hcy 处理体外培养的类风湿性关节炎患者外周血单个核细胞炎症因子基因甲基化逆转和基因表达调节的作用,探讨了类风湿性关节炎发生发展过程中可能的表观遗传学机制,对早期诊断,评价病程发展、预后提供借鉴,为治疗寻找新的靶点提供依据。

# 第一章 表观遗传学与自身免疫性疾病

人类基因组含有两类遗传信息：一类是传统意义上的遗传学信息，它提供了生命所必需的所有蛋白质合成的模板，现在研究的已比较深入；另一类被称为表观遗传学（epigenetics）信息，它提供了何时、何地 and 如何应用遗传学信息的指令，以确保基因适当地开关。它们既相区别又协同参与调节生命活动。随着人类基因组计划的完成，研究基因的功能成为目前生命科学关注的焦点，进入后基因组时代，表观遗传学将成为阐明基因组功能的关键研究领域之一。目前，表观遗传学已是许多生命科学中重要问题如转录调节、染色质结构、基因组完整性、肿瘤发生、自身免疫性疾病、胚胎发育与克隆技术等研究的前沿。在欧美和日本等国家近几年纷纷成立相应的研究机构和研究协会，表基因组学（epigenomics）已成为生命科学中的研究热点之一。

## 一、表观遗传学的产生和遗传学的发展

表观遗传学作为现代遗传学词汇，首先由 Waddington 于 1939 年提出，是研究基因型产生表型的过程，他提出在细胞分化过程中整套基因保持不变，而是不同基因开关的结果，也即没有基因组本身的改变，只有基因表达形式的差异，这已为 20 世纪 50 年代后的核移植等一系列实验所证实。20 世纪 80 年代以来，Holliday 对表观遗传学进行了不断探讨。他首先提出表观遗传学不仅在发育过程而且在成体阶段中，研究可遗传的基因表达改变，这些信息能够经有丝分裂和减数分裂在细胞和个体世代间传递，而不改变 DNA 序列。随着 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重建在基因表达调节中作用的逐渐阐明，Wolffe 于 1999 年对表观遗传学进行了精确定义：研究没有 DNA 序列变化的、可遗传的表达改变。这是一种非孟德尔遗传方式。

表观遗传学的产生丰富并发展了传统遗传学研究领域。基因是编码一种功能蛋白的 DNA 片段，表观遗传学决定了基因转录的开关及其表达方式，在基因实现其功能过程中表观遗传学调节起关键作用。人类基因组计划已经完成，只确定约 3 万 4 千多个基因，调控人类这样复杂有机体发育和生命的全过程，一个人所有的细胞都具有相同的全套基因，但实际上在一种组织细胞

中只有数千个基因有活性，因此维持细胞的正常功能，决定什么样的一组基因有功能，而另一组基因无功能，都是十分重要的。由此显示出“基因仅是编码蛋白质的 DNA 片段”概念的局限性，所以有学者提出应该将 DNA 序列延伸至该序列的表观遗传学修饰，这样基因的成分应包括 DNA 和组蛋白修饰及染色质改型，使基因组能够根据机体自身的遗传学和表观遗传学信息及内外环境，在适当的时间和空间，并以适宜方式表达，最终完成遗传性状的表达。同时在整个生命过程中，表观遗传学改变能使细胞对激素、生长因子等传递的环境信息，在不改变 DNA 序列的情况下做出反应。表观遗传学把遗传和环境结合起来，使基因组不仅具有稳定性，而且具有可塑性。

编码基因 DNA 仅占基因组 DNA 的 10%，其他大部分非编码 DNA 的功能尚不明了，这些成为“垃圾 DNA”，目前这些序列被认为是表观遗传学元件，具有调控基因表达的功能，成为今后表观遗传学的重要研究课题之一。

## 二、表观遗传学机制

表观遗传是以 DNA 和组蛋白修饰为基础的另一类遗传现象，称之为非孟德尔遗传，或没有 DNA 序列改变的核遗传，主要调节基因转录。

人类基因组 DNA 长约 3m，通过与组蛋白组装成染色质，分布于直径 6 $\mu$ m 左右的细胞核中，3 万多基因有条不紊地实现其功能，染色质结构就成为基因调节的关键因素。核小体是所有真核细胞染色质的基本单位，由四种组蛋白（H2A、H2B、H3、H4）各两个分子构成八聚体，核小体周围环绕着两圈长约 166bp 的 DNA，之间的连接 DNA 10 ~ 80bp。核小体间通过组蛋白 H1 连接，形成念珠状的染色质结构。核心组蛋白分子都有保守的 C 端折叠区，促成组蛋白之间和组蛋白与 DNA 的相互作用；同时组蛋白含有 N 端尾区，它们从核小体表面突出，可在特定氨基酸残基上进行各种酶促修饰，如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化和糖基化修饰。目前已比较清楚，DNA 的甲基化状态、组蛋白修饰和染色质改型参与了基因表达的调节。

### （一）DNA 甲基化与转录调节

DNA 甲基化是指胞嘧啶（C）5 - 位羟基的甲基化（5 - mC），是一种 DNA 复制后的酶促反应过程。是指生物体在 DNA 甲基转移酶（DNMT）的催化下，将 S - 腺苷甲硫氨酸分子上的甲基转移到 DNA 分子中胞嘧啶的 5 位碳原子上，形成 5 - 甲基胞嘧啶。随着甲基向 DNA 分子的引入，改变了 DNA 分子的构象，影响了 DNA 与蛋白质因子（如拓扑异构酶、RNA 聚合酶、阻抑蛋

白等)的结合。哺乳动物基因组中 5-甲基胞嘧啶的含量占总胞嘧啶的 2%~7%,并集中在二核苷酸胞嘧啶(CpG)结构中。CpG 位点以两种形式存在:一种为分散于 DNA 中,CpG 每 50~100bp 出现一个,其中约 70%的 CpG 位点中的胞嘧啶是甲基化的;另一种是 CpG 结构高度聚集在一起,即 CpG 岛,仅占总 DNA 的 1%~2%,长度为 0.2~2kb,位于基因的 5'端启动子区或延伸至第一外显子区。除 X 染色体基因、印记基因之外,通常情况下 CpG 岛不发生甲基化修饰。CpG 岛甲基化与基因的表达密切相关。CpG 岛甲基化可以抑制基因的表达,如在肿瘤发生机制中抑癌基因呈甲基化状态,导致抑癌基因失活。CpG 岛甲基化抑制基因表达的机制包括:①CpG 岛甲基化改变了 DNA 分子构象,导致某些重要基团的隐蔽,直接干扰转录因子与调控区 DNA 结合,但不是所有的基因转录因子结合位点都含有 CpG 岛。②甲基化的 CpG 与甲基化 CpG 结合区(DNA methyl-CpG binding domain,MBD)蛋白结合形成复合物,后者再募集组蛋白去乙酰酶(histone deacetylases,HDAC)形成复合物,结果使核心组蛋白尾区去乙酰化,形成更紧密的染色质结构,限制了转录因子到达它们结合部位的通道,从而抑制基因转录。在高等真核生物,DNA 甲基化可能参与基因的表达调控、发育调节、基因组印记和 X 染色体失活。

通常认为非 CpG 岛中的 CpG 甲基化与基因表达无关,而现在研究发现,在恶性淋巴瘤样细胞中 PAX7 基因非 CpG 岛异常甲基化,HeLa 细胞在一个细胞周期内 DNA 甲基化呈动态改变:G(0)期普遍低甲基化,G(1)期轻微甲基化,S 期甲基化程度升高,甲基化的这种动态变化同时发生在 CpG 岛和非 CpG 岛。

在不同组织或同一类型细胞的不同发育阶段,基因组 DNA 上 CpG 岛甲基化状态的差异构成基因组 DNA 甲基化谱,组织特异的 DNA 甲基化谱是哺乳动物基因组的一个显著特征。

## (二) 组蛋白密码

2000 年 Allis 等提出了“组蛋白密码(histone code)”假说,该假说包括三个方面的基本内容:①组蛋白 N 末端氨基酸残基的各种共价修饰(甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化和糖基化)具有位点特异性,各种修饰之间存在相互作用并能导致染色质结构发生改变。②不同的染色质结构域具有不同组蛋白修饰的组合。③不同的组蛋白修饰影响染色质相关蛋白与染色质的结合能力。其核心是众多的组蛋白修饰以协同或渐进的方式诱导特异的下游生物学功能。这一生物学功能通过下面途径实现:其一是组蛋白修饰可直接影响染

色质结构，其二是组蛋白修饰为其他蛋白提供新的作用层面。目前研究表明组蛋白乙酰化/脱乙酰化也是基因表达的重要调控方式。组蛋白乙酰化和去乙酰化处于动态平衡状态，分别受组蛋白乙酰转移酶（histone acetyltransferases, HAT）和组蛋白去乙酰酶（HDAC）调节。核心组蛋白的尾端部分乙酰化可以使核小体 DNA 暴露，利于转录因子结合，促进基因转录。组蛋白甲基化可以发生在赖氨酸和精氨酸位点。组蛋白不同位点的甲基化发挥不同的生物学功能，既可促进基因转录，亦可抑制基因转录。其中组蛋白 H3 赖氨酸 4（H3K4）可发生三甲基化，使基因转录活化。组蛋白 H3 赖氨酸 9（H3K9）发生三甲基化，使基因转录抑制。组蛋白低乙酰化可促进 DNA 甲基化，组蛋白乙酰化可抑制 DNA 甲基化。由此组蛋白乙酰化和 DNA 甲基化这两种分子机制相互协调，实现基因表达的精细调节。

### （三）染色质结构重塑（remodeling）

真核生物 DNA 以核小体形式包装构成染色质，这就必然阻碍转录复合物与 DNA 的结合，此时需要改变染色质结构才能启动转录。这种从无转录活性的染色质构型改变为有转录活性的染色质构型称为染色质改型或重塑（remodeling）。主要涉及密集的染色质丝在核小体连接处发生松解造成染色质解压缩，从而暴露基因转录启动子区中的顺式作用元件，为反式作用蛋白（转录因子）与之结合提供了一种称为可接近性（accessibility）的状态。这一过程需要 ATP 提供能量，染色质改型复合物改变了染色质结构，其具体机制尚未阐明。拟南芥的研究中表明，DNA 甲基化首先是染色质改型，为 DNA 甲基转移酶接近 DNA 序列打开通道，同样组蛋白乙酰化和脱乙酰化也需要在染色质改型的前提下发生。可见，染色质改型似乎是 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化的前提条件，在哺乳动物是否也存在同样的方式尚待验证。

DNA 甲基化和组蛋白乙酰化之间存在相互作用。甲基化的启动子通过 MBD 蛋白，结合含组蛋白脱乙酰酶和染色质改型因子等大的蛋白复合物，赖氨酸残基脱乙酰基后使组蛋白带正电荷，再结合染色质改型因子，形成紧密的染色质，限制了转录因子复合物到达它们结合部位的通道，从而失去转录活性。还有研究表明，DNA 甲基化通过 MBD 蛋白募集组蛋白甲基酶（HMT），使组蛋白的赖氨酸 9 位发生三甲基化，随后募集染色质沉默子 HP1，它是染色质连接分子家族的成员，关系到基因沉默和超核小体的染色质结构的形成。这些实验证据似乎都得到这样的结论，DNA 甲基化是影响组蛋白修饰和染色质结构改型的关键因素。

通常，DNA 甲基化、组蛋白甲基化和染色质的压缩状态和 DNA 的不可接

近性，以及基因处于抑制和静息状态相关；而 DNA 的去甲基化、组蛋白的乙酰化和染色质松散状态，则与转录的启动、基因活化和行使功能有关。这意味着，不用改变基因本身的结构，而是改变基因转录的微环境条件就可以左右基因的活性：或者令其静息（silencing），或者使其激活。基因遗传调控机制一般涉及基因的突变，即序列改变。这也是表基因遗传与基因遗传机制调控基因表达的区别所在。

### 三、表观遗传学与自身免疫性疾病的关系

异常的表观遗传可能导致肿瘤、自身免疫性疾病、衰老和神经精神异常等。

自身免疫性疾病（autoimmune disease）是指自身免疫反应所导致的相应组织与器官的损伤或功能障碍，或因异常免疫反应而导致的全身性免疫炎症性疾病。包括系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus, SLE）、类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）、硬皮病（scleroderma, Sc）、干燥综合征（sjogren's syndrome, SS）、多发性肌炎（polymyositis, PM）和皮肌炎（dermatomyositis, DM）等。除受累器官与组织的不同，而有不同的临床表现外，它们都具有以下基本特征：①具有特异性自身抗原，并可测得高效价特异性自身抗体和/或对自身成分敏感的致病性淋巴细胞。②自身抗体和/或致敏淋巴细胞引致了靶组织或靶器官的病理损伤和功能障碍。③原发性自身免疫性疾病常表现为反复发作或慢性迁延的过程。④病情的起伏与转归与自身免疫反应强度密切相关。⑤具有复杂基因遗传倾向。关于自身免疫性疾病的病因及发病机制尚未阐明。现在随着表观遗传学的研究逐渐深入，在一些自身免疫性疾病中发现了表观遗传学现象，为自身免疫性疾病的研究开辟了新的领域。

#### （一）自身抗原的产生是形成自身免疫的前提

自身免疫性疾病是一大组异质性疾病，被认为是由淋巴细胞（T、B 淋巴细胞）识别自身抗原而导致的器官与组织损伤的结果。自身抗原及其特异性自身抗体是自身免疫病的特征，自身抗原应该是自身免疫疾病的先决条件。正常情况下机体 T、B 淋巴细胞不会产生对自身组织的识别反应，称作自身耐受，只有当自身耐受无能或自身抗原变异时，才会引起自身免疫反应。在正常人体内存在着大量自身反应性 T、B 淋巴细胞，但并未发生克隆扩增。当机体在受到外来病原微生物等刺激时，经巨噬细胞吞噬并经过处理后形成自身

抗原,也可以是体内生成的或机体固有的成分发生变异而获得免疫原性,诱导或激活自身反应性 B 细胞产生特异性自身抗体;激活或诱导自身反应性 T 细胞,释放致炎性细胞因子,导致了细胞免疫损伤;导致自身耐受失衡和自身反应性 T、B 细胞克隆扩增。实验表明,在初发期的干燥综合征,腮腺液里 La/SSB 抗原经翻译后修饰改变了抗原蛋白质构相,形成新的抗原,具有免疫原性,打破免疫耐受,导致自身免疫。RA 患者体内 IgG 分子 Fc 段两侧的糖链末端缺失一个或两个半乳糖,形成变性 IgG,激活人体免疫系统,产生自身抗体,但是形成变性 IgG 的原因尚不清楚。

## (二) 免疫细胞紊乱与表观遗传学调节

在正常情况下,机体各种免疫细胞在数量与功能之间保持着严密的动态平衡。如 T 抑制细胞 (Ts) 与 T 辅助细胞 (Th) 之间, Th1 与 Th2 之间, Ts 与 Th17 之间, Th 与 B 细胞之间等都具有相辅相成的作用,以维持机体内环境的相对稳定。在自身免疫性疾病,免疫细胞的数量和功能都呈现出明显的失衡状态,如类风湿性关节炎、多发性硬化病为 Th1 及 Th1 型细胞因子占优势,在葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase, GPI) 诱导的关节炎模型小鼠体内发现 Th1、Th17 细胞占优势, Kohno M 等采用定量 PCR 检测到 RA 患者 PBMC 中 IL-17 表达较健康对照组显著升高, Kim 等研究发现 RA 患者血清和滑液中 Th17 型细胞因子 IL-17 升高,并且滑膜组织和滑液中 Th17 细胞积聚。IL-17 可与其他多种致炎因子如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  发挥协同作用,加重炎症反应及骨质破坏。关于调节性 T 辅助细胞 (regulated T cell, Treg) 在 RA 患者体内的数量存在争议。有研究发现,处于活动期的 RA 患者外周血中 Treg 细胞数量增加,但其抑制 CD4<sup>+</sup> 效应 T 细胞对抗原特异性反应的功能严重削弱,因而产生 Th1 细胞驱动的损伤性自身免疫应答。RA 患者关节滑液中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞较外周血显著升高,而 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg 细胞在 RA 患者外周血显著低于健康人外周血。有研究发现, RA 患者外周血和健康人外周血中 Treg 细胞无显著差异,认为调节性 T 细胞对于类风湿性关节炎的发病和病情判断无重要意义,之所以得出不同的结论,可能与所选择的 RA 患者所处的病程不同有关。系统性红斑狼疮为 Th2 及 Th2 型细胞因子占优势,由此开启各种基因表达的表观遗传学调控,包括某些辅助激活因子亦受表观遗传学调控。

表观遗传学在 T 细胞亚群分化过程中发挥重要调节作用,已有研究表明,表观遗传学是调控 CD4<sup>+</sup> T 细胞向不同细胞亚群分化的一个重要机制。如 IFN- $\gamma$  基因启动子区在 Th2 细胞高甲基化,而在 Th1 细胞呈去甲基化,且在

Th1 细胞 IFN- $\gamma$  基因区组蛋白呈乙酰化状态, 这些都使得 IFN- $\gamma$  在 Th1 细胞中表达而在 Th2 细胞中不表达。Lee GR 和 Takaaki Kaneko 等研究发现, 在人 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th1、Th2 分化过程中存在广泛的染色质结构重塑, Th1 型细胞因子 (IFN- $\gamma$ ) 和 Th2 型细胞因子 (IL-4/IL-5/IL-13/RAD50) 启动子区以及保守非编码区 (conserved noncoding sequence, CNS) 存在甲基化和组蛋白 H3 赖氨酸残基 Lys9/Lys4 的乙酰化, 保障了 Th1、Th2 细胞分别分泌相应的细胞因子发挥免疫调节功能。Askar M 等报道在诱导小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞向 Th17 细胞分化时, IL-17A/F 启动子区存在组蛋白 H3 Lys9 乙酰化和 Lys4 高甲基化, 提供了 Th17 细胞分化受表观遗传学调控的依据。信号分子 STAT4 转录也受 DNA 甲基化调控。Sin-Hyeog Im 等研究发现, Th1 和 Th2 细胞在 IL-10 基因启动子区染色质凝集状态不同, 干扰 IL-10 基因启动子区和转录因子的结合, 从而影响 IL-10 基因转录。这些发现说明, DNA 甲基化和组蛋白修饰是 Th 细胞向不同亚群细胞分化时的关键因素, 制约着是否分化、何时分化。

近年来表基因遗传在自身免疫性疾病的发病机制研究中也显示其重要性, 主要集中在以下几方面。

### 1 关于基因组整体甲基化水平的研究

有研究发现, 系统性红斑狼疮患者基因组 DNA 低甲基化, 并与关节炎、白细胞减少及血沉增快等临床表现相关。国内外学者研究均发现, 在 RA 患者存在基因组 DNA 低甲基化, 外周血同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平升高, 增加了基因组 DNA 的不稳定性, 通过影响某些基因甲基化状态致使其异常表达, 在 RA 的发生发展中发挥作用。有作者提出自身免疫病的发生伴随着表观遗传学抑制功能的削弱, 以及由此引起的染色质损伤。在 SLE 还观察了 DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B, 甲基化特异性结合蛋白 MBD2 和 MBD4 的表达, 发现 SLE 患者外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞基因组甲基化水平显著低于健康对照组, 定量 PCR 检测到 CD4<sup>+</sup>T 细胞 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B mRNA 表达高于健康对照组, 但是无统计学差异, MBD2 和 MBD4 mRNA 表达高于健康对照组具有统计学差异。与其他作者观察到的结果不甚相同, 如 Deng 等和 Ogasawara H 等检测到 RA 患者单个核细胞或总 T 细胞中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B mRNA 表达低于健康对照组, 而该实验分离的是 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 亦未使用植物凝血素 (phytohemagglutinin) 及 IL-2 刺激细胞, 更能够反映体内状态。这些都是从基因组整体甲基化水平探讨与自身免疫性疾病发生的关系。

### 2 特定基因甲基化状态的研究

在自身免疫性疾病研究中发现, T 细胞基因组整体低甲基化, 同时伴有

特定 DNA 序列的高甲基化。2006 年 3 月日本学者 Takami N 等研究发现, RA 患者外周血单个核细胞和关节滑膜细胞中死亡受体 3 (death receptor 3, DR3) 启动子区呈高甲基化状态, 抑制滑膜细胞中细胞凋亡, 使滑膜细胞增殖与凋亡之间平衡失调, 导致滑膜组织增生。Fli1 (friend leukaemia integration 1) 是一种新发现的存在于免疫细胞、纤维原细胞、内皮细胞中的转录因子, 可抑制胶原基因功能。在硬皮病的研究中发现, 启动子区异常高甲基化, 采用甲基转移酶抑制剂、组蛋白脱乙酰化酶抑制剂可恢复 Fli1 基因表达, 使硬皮病纤维原细胞中胶原合成减少。SLE 血浆 DNA p16 基因启动子区呈高甲基化状态, 从此揭开了特定基因甲基化在自身免疫性疾病发病机制中研究的序幕。但是基因组 DNA 普遍低甲基化与特异位点发生的 DNA 异常高甲基化, 这种不均衡现象的原因是什么, 二者之间有无相互关联? 目前研究表明, DNMT 的表达水平与特定基因甲基化之间并无相关性, DNMT 更倾向于在基因组整体水平调节甲基化, 基因组甲基化与特殊位点甲基化分别通过不同的机制来调节。

### 3 关于自身免疫性疾病发病的性别易感性

很多自身免疫性疾病女性更易感, 如 SLE、RA 等, 为什么会有这种性别倾向? 除了激素水平的差异导致的易感性不同, 现在表观遗传学亦给出了合理的解释。在女性体内含有两条 X 染色体, 其中一条随机发生失活并伴随 DNA 甲基化, 假设女性 SLE 患者失活的那一条 X 染色去甲基化, 使某些基因过表达, 对 SLE 更易感。CD40LG 是由 X 染色体编码的 B 细胞刺激分子, Lu Q 等对 T 细胞基因组经亚硫酸氢盐处理后测序, 发现男性体内 CD40LG 是未甲基化的, 女性甲基化和未甲基化并存。DNA 甲基转移酶抑制剂 5 - Azacytidine 使 CD40LG 去甲基化后, 男性 CD4<sup>+</sup>T 细胞 CD40LG 表达量没有改变, 而女性表达成倍升高。这说明 T 细胞 X 染色体脱甲基之发生在女性 SLE 患者, 可使 CD40LG 表达升高, 增加对 SLE 的易感性。除 CD40LG 之外, 也可能还有其他 X 染色体上的基因脱甲基过表达, 导致 SLE 发病风险升高, 这仍待进一步研究。

### 4 在疾病动物模型实验中发现新的组蛋白修饰位点

Garcia BA 等在建立的 SLE MRL - lpr/lpr 小鼠模型中, 采用同位素示踪结合质谱分析, 发现除组蛋白 H3 赖氨酸 4 (H3 K4) 外全身位点特异性的组蛋白高甲基化和组蛋白 H3、H4 的脱乙酰化, 鉴定了 H3 K18 和 H4 K31 甲基化、H4 K31 乙酰化位点。体内给予组蛋白脱乙酰化酶抑制剂 (trichostatin A, TSA), 纠正 MRL - lpr/lpr 小鼠组蛋白 H3、H4 的低乙酰化状态, 可以改善 SLE 的症状, 在组蛋白密码和疾病表型之间建立了直接联系。

## 5 线粒体 DNA 与炎症

Collins LV 等报道线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 由于其 CpG 岛未甲基化状态和氧化特性, 具有潜在的导致炎症发生的能力。他们通过纯化人和小鼠的 mtDNA, 在小鼠关节腔内注射可诱导成关节炎; 而人和小鼠的核 DNA 均不能诱导关节炎。这种 mtDNA 诱导的关节炎既不是 B 细胞也不是通过 T 细胞依赖的, 而是通过单核巨噬细胞介导的。mtDNA 可诱导 NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) 活性升高, 使 TNF- $\alpha$  生成增加。在类风湿性关节炎病人关节滑膜液里检测到游离的 mtDNA, 所以内生性 mtDNA 可能介导了炎症反应。

## 四、自身免疫性疾病表观遗传学研究展望

目前大多自身免疫性疾病的病因不明, 发病机制研究仍处于探索阶段。表观遗传学在自身免疫性疾病发病机制中的研究日趋增多和深入, 关于自身抗原的产生机制、T 细胞激活和克隆扩增、免疫细胞数量和功能紊乱等方面的研究已初见成效, 免疫系统被认为是一个解析表观遗传学调控机制的良好模型, 而且免疫细胞的分化及功能表达和表观遗传学的联系甚密, 深入研究自身免疫反应的产生和维持, 细胞行为的攻击性和外周免疫耐受的破坏, 细胞增殖与凋亡的失衡, T 细胞亚群间比例失衡等, 以阐明自身免疫性疾病的发生发展机制。表观遗传学调控并不具有抗原特异性, 但其作用的靶点, 却可以是特定细胞类型的特定基因座位, 及其在特定时空下的表现, 这反映了另一种层次的调节途径, 也许会有助于发展新型免疫干预手段。

长期以来还有一些遗传学现象困扰着遗传学家, 在 DNA 甲基化和组蛋白修饰及染色质改型的机制中尚有很多疑难问题有待解决, 结合自身免疫性疾病的研究, 必然涉及这些表观遗传学机制, 将会促进表观遗传学向更深入、更广阔的领域发展。

由于病因不明, 针对自身免疫性疾病的治疗多为对症, 以改善症状为目的。目前临床上针对自身免疫性疾病治疗的药物制剂主要包括非甾体抗炎药、免疫抑制剂、糖皮质激素等, 副作用均较大; 生物制剂以其药理作用选择性强及毒副作用小等优点受到关注, 在致炎细胞因子拮抗剂、黏附因子拮抗剂、抑制自身免疫 T 细胞等方面取得一些成效, 但作用短暂需持续给药; DNA 疫苗也有尝试, 其毒性小, 药效长, 但进入细胞效率低和细胞内表达不易控制, 裸露 DNA 可能造成严重后果。表观遗传学是不改变 DNA 序列、可逆的基因组修饰, 在疾病治疗方面凸现其优点。目前已有很多研究关于疾病表基因组

疗的报道。体外细胞实验研究应用甲基转移酶抑制剂 5 - azaC 可以逆转系统性红斑狼疮 T 细胞 IL - 4、IL - 6 启动子甲基化, 促进其转录。组蛋白去乙酰化抑制剂, 目前已研究包括短链脂肪酸等在内的多种化合物, 它们能抑制体外肿瘤细胞或动物模型中瘤细胞的增殖, 或诱导细胞分化和凋亡。组蛋白去乙酰化抑制剂 FK228 可以促进自身抗体介导 (autoantibody - mediated, AMA) 类风湿性关节炎 DBA/1 小鼠 p16、p21 表达的报道。反义 RNA 作为抑制因子是一种新兴的治疗方法, 如选择性地耗竭 DNA 甲基转移酶 DNMT1 mRNA, 使 DNMT1 酶活性降低, 使原来沉默的基因恢复活性, 这在理论上有可能避免基因组广泛的脱甲基化引起的明显毒性反应。有实验表明, DNA 甲基化酶抑制剂和组蛋白去乙酰化抑制剂联用可增加或恢复某些基因表达, 而单独用药却不能。目前将表基因试剂联用在体外和动物试验中都取得了较好效果, 某些在国外已经进入一期或二期临床试验。如用 DNA 甲基转移酶抑制剂治疗的疾病包括  $\beta$  - 地中海贫血、镰状细胞血症、白血病、肺癌、子宫颈癌、结直肠癌、卵巢癌、头颈恶性黑色素瘤及 AIDS 等, 目前治疗效果最好的是慢性粒细胞白血病和急性髓性白血病。由于临床治疗病例较少, 观察到的临床疗效比传统治疗效果较差, 主要的副作用有恶心、呕吐、腹泻和骨髓抑制等, 仍处于小剂量、短期用药阶段; 5 - azaC 和 5 - Aza - 2' - deoxycytidine 通过以伪代谢物身份替代胞嘧啶掺入 DNA 和/或 RNA, 具有潜在的致机体突变效应, 所以期待合成更小的细胞毒性药物来替代, 或者设计包含 DNA 甲基转移酶抑制剂的小 “decoy” DNAs 作为治疗药物。阐明表基因现象和机制对诊断疾病, 研制新药以及防止和治愈疾病都有重要意义。随着研究的不断深入, 我们期待表观遗传学在防治自身免疫性疾病方面获得新的突破。