

• 综 述 •

类风湿关节炎机制研究中分子改变及动物实验模型的作用及意义*

韩晓芳¹, 谭艳¹, 白瑞霞¹综述, 张嘉玲²审校

(1. 内蒙古自治区人民医院检验科, 内蒙古呼和浩特 010017;

2. 内蒙古医科大学临床医学研究中心, 内蒙古呼和浩特 010110)

关键词: 类风湿关节炎; 分子改变; 动物模型**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 033**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)16-2133-03

自身免疫性疾病是由机体自身产生的抗体或致敏淋巴细胞破坏, 损伤自身的组织和细胞成分导致组织损害和器官功能障碍的原发性免疫性疾病, 与遗传、环境因素密切相关。类风湿性关节炎是以滑膜、软骨和骨的一种慢性、炎性、系统性的自身免疫性疾病, 其发病机制仍不明确。为探讨 RA 病因的分子机制, 以寻找有效的治疗药物, 国内外学者进行了大量的研究发现, 在 RA 病程中自身抗体、炎症因子和自身抗原等分子的出现对疾病的诊断具有重要的参考价值。抗-CⅡ抗体和抗-G6PI 抗体诱发的动物关节炎实验模型的建立对明确 RA 发病的分子机制提供了良好的研究平台和研究手段。本文将从这些分子改变、动物实验模型两个方面阐述其在类风湿关节炎中的作用及意义。

1 类风湿关节炎中包含的分子改变及意义

1.1 细胞炎症与分子改变

类风湿性关节炎由抗原驱动及 T 细胞介导的自身免疫性疾病, 其病变关节包含多种细胞的炎症过程, 如淋巴细胞渗出、中性粒细胞和浆细胞浸润、成纤维细胞和滑膜细胞增生^[1-3]。这一炎症过程不仅局限于关节的肿胀、红斑和疼痛, 且包含多种炎症细胞的聚集浸润(如巨噬细胞、树突状细胞、成纤维样滑膜细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T 细胞和 B 细胞)、细胞表面分子的增加(如黏连蛋白、整联蛋白)、信号通路的改变(如 ZAP70, PIPN22, JAK 和 Stat1)、体液性介质(如抗体、趋化因子、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等)等分子改变参与并促进疾病的进展, 导致细胞外基质发生不可逆降解和关节结构的破坏^[4-8]。

1.2 分子改变临床应用及意义

B 细胞在类风湿性关节炎的发生过程中发挥重要作用, 通过细胞表面分子和分泌产物促进 RA 的发生。近年以 B 细胞为靶向的临床治疗, 如抗 CD-20 单克隆抗体、拮抗类风湿关节炎患者 B 细胞功能紊乱以及炎症因子和细胞因子分泌均取得了明显成效, 充分揭示了 B 细胞在 RA 自身免疫病理中的重要作用^[9]。自身免疫抗体的监测已成为 RA 诊断和病情转归判断的重要参考指标及诊断标准, 如预示疾病活动期类风湿因子(RFs)、抗瓜氨酸化蛋白抗体(CCP)因子浓度变化等。RF 在患者血清阳性率为 80%, 也常见于正常个体或其他慢性炎症性疾病的患者, 但 RF 已被广泛应用于 RA 的临床诊断^[10]。ACPAs 也在 RA 患者血清中具有特异性, 其在疾病的发生和诊断中具有重要意义^[11-12]。CⅡ蛋白及其抗体在 RA 发病机制中的作用逐渐引起人们的重视, 抗 CⅡ抗体在 RA 患者诊断中具有较高的特异性, 但抗 CⅡ抗体在疾病各期的水平差异依赖于临床检验中 CⅡ抗原的来源, 如来源于天然的 CⅡ抗原监测抗体的阳性率为 14%~48%, 变性的 CⅡ抗原则为 50%~87%^[13]。G6PI 是一种自身免疫性抗原, 与自身免疫性疾病密切相关^[14]。近年的研究证明, RA 患

者的血清及关节液中 G6PI 的浓度明显高于健康人群和其他风湿病患者, 尤其与 RA 活动期患者的关节肿胀及疼痛呈正相关。G6PI 在 RA 诊断中的特异性在 72.22%~99.51%, G6PI 也独立于 RF、CRP 和抗-CCP 抗体。G6PI 检测有可能成为一种特异性较高的新的标记物, 但其在 RA 病因中的分子调控机制尚未明确^[15-18]。

2 动物模型在类风湿关节炎中应用及意义

明确疾病机制是寻找有效治疗药物的先决条件。动物模型可为详细分析 RA 的早、中、晚各期发展中的分子改变提供了机会。尽管, 动物实验模型不完全与人类类风湿关节炎相同, 但众所周知 RA 不是一种单一疾病, 而是一类具有不同分子表型的综合征。因此, 动物模型仍是寻找疾病进展过程中常规病理及分子生物学改变的一种可靠的研究手段。

2.1 II 型胶原诱导的小鼠关节炎动物模型(CIA)

II 型胶原蛋白(CⅡ)是一种构成关节软骨的主要蛋白, 在 50% 的 RA 患者血清中存在抗 CⅡ自身抗体。以 CⅡ蛋白为主要成分配置的腐蚀性乳剂免疫小鼠后, 可诱发其产生自身免疫性关节炎。CIA 小鼠发病 I 期表现为滑膜表面有单核细胞浸润; II 期为软骨表面破坏; III 期是滑膜处的骨发生炎性病变; IV 期便出现严重的关节变形和骨破坏, 丧失完整的骨架结构, 出现骨新生, 关节强直, 与临床 RA 患者的疾病进展存在众多相似之处。关节炎发生的一个重要特征就是炎症细胞游走到关节处, 对自体组织进行免疫性攻击和破坏, 有趋化因子介导的巨噬细胞等炎症细胞浸润促进了关节炎向慢性期的发展。CIA 小鼠关节炎病理过程中, B 淋巴细胞和胶原蛋白是影响其病理的主要因素。活化 B 淋巴细胞产生特异性胶原蛋白抗体, 在关节部位与胶原蛋白结合形成免疫复合物从而活化补体系统产生免疫反应; 中性粒细胞和 T 淋巴细胞聚集至关节部位, 可进一步激发免疫活化, 产生细胞因子和免疫介质, 破坏骨和软骨结构^[19]。多种细胞因子的浓度变化与 CIA 关节炎疾病进程密切相关, 在关节炎初期即可出现白细胞介素(IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF-a)、干扰素-R 等浓度变化^[20]。IL-1 和 TNF-a 能促进软骨降解和骨的吸收, 诱导滑膜成纤维母细胞释放 PGE₂(PG)和胶原酶, 上调血管黏附分子的表达, 引起中性粒细胞和淋巴细胞浸润组织, 在 RA 患者外周血和关节处均能检测到高水平表达。CIA 小鼠滑膜液中 IL-6 浓度可反映局部炎症病变的强弱, IL-6 缺陷的小鼠对 CⅡ抗体反应降低, 关节内炎症细胞和组织损伤不明显, 不发生关节炎。IFN-R 是一种 Th1 型细胞因子, 通过增加 MHC-II 和黏附分子的表达, 促进抗原递呈活化巨噬细胞, 在 CIA 的发生发展中发挥重要作用。炎症因子的存在激活细胞内多个信号途径和相应的转录活化分子, 如 NF-KB、AP-1、MAPK 等。滑膜中 NF-KB 活化后调控 TNF-a、

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2011MS1146)。

作者简介: 韩晓芳, 女, 主任检验医师, 主要从事临床免疫方面的研究。

IL-1、iNOS、COX-2 等表达,抑制 T 细胞中 NF-KB 的活化能有效削弱 CIA 的进展^[21-22]。以上的研究结果表明,C II 蛋白诱发小鼠关节炎模型是一种稳定的、高发病率的小鼠关节炎实验动物模型,且在 CIA 模型中的分子改变业已在 RA 患者血清和关节液中得到证实。同时,在实际工作中 CIA 动物模型具有很好的可操作性和可重复性,为深入研究 RA 病理机制和评价药物疗效提供了一个良好的平台。

2.2 T 细胞受体转基因小鼠模型(K/BxN 小鼠模型) K/BxN 小鼠来自于 KRN-T 细胞受体转基因小鼠与 NOD 小鼠杂交后代。在出生 4~5 周后 K/BxN 小鼠自发产生一种与 RA 非常相似的侵袭性关节炎^[23]。在 K/BxN 小鼠自发性关节炎早期产生高浓度的抗 G6PI 抗体,在病变关节腔内特别是软骨表面 G6PI 蛋白表达明显增加,同时伴有 IgG、补体和 G6PI 沉积^[23-27]。近年来对 G6PI 导致 RA 的体内外实验已进行了大量研究,其自身反应的 T 淋巴细胞通过抗原呈递细胞在 MHC-II 类分子 I-Ag7 上的表达,激活 B 细胞产生特异性抗 G6PI 抗体,抗 G6PI 抗体介导关节炎的发生已形成共识^[24-25]。同时,国内外多项研究表明 G6PI 对 RA 诊断具有较高的特异性,但 G6PI 的致病机制以及在人类 RA 中的作用尚未明确^[14,28-29]。因此,K/BxN 小鼠模型为 G6PI 在 RA 致病机制的研究中提供较好的体内实验平台。

3 结语及展望

RA 是一种以关节滑膜慢性炎症病变为主的致畸性自身免疫性疾病,早期诊断、早期应用药物缓解病情,可减少骨关节破坏,改善 RA 预后尤为重要。目前在 RA 诊断标准中,实验室诊断指标的特异性缺乏。因此,寻找新的具有特异性的 RA 早期诊断指标仍是目前研究的热点问题,深入研究 RA 进展中特异性抗体、抗原等分子的多态性改变将是发现新的具有高度特异、敏感诊断指标的重要途径。

参考文献

- Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, et al. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases[J]. *Immunol Lett*, 2012, 145(1/2):62-67.
- Robak T, Robak E. Tyrosine kinase inhibitors as potential drugs for B-cell lymphoid malignancies and autoimmune disorders[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(7):921-947.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6):223.
- Jøger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation[J]. *Scand J Immunol*, 2010, 72(3):173-184.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(1):485-517.
- Doreau A, Belot A, Bastid J, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7):778-785.
- Vaddi K, Luchi M. JAK inhibition for the treatment of rheumatoid arthritis: a new era in oral DMARD therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(7):961-973.
- Yoshida S, Arakawa F, Higuchi F, et al. Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5[J]. *Scand J Rheumatol*, 2012, 41(3):170-179.
- Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5):1390-1400.
- Roll P, Muhammad K, Schumann M, et al. RF positivity has substantial influence on the peripheral memory B-cell compartment and its modulation by TNF inhibition[J]. *Scand J Rheumatol*, 2012, 41(3):180-185.
- Toes RE, vander Woude D. ACPA(anti-citrullinated protein antibodies)and rheumatoid arthritis[J]. *Acta Reumatol Port*, 2011, 36(1):205-207.
- Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, et al. Baseline anti-citrullinated peptide antibody(ACPA) titers and serum interleukin-6(IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis(ERA)[J]. *Rheumatol Int*, 2013, 33(2):451-456.
- Carnrot C, Prokopec KE, Rsbo K, et al. Marginal zone B cells are naturally reactive to collagen type II and are involved in the initiation of the immune response in collagen-induced arthritis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(4):296-304.
- Schaller M, Stohl W, Benoit V, et al. Patients with inflammatory arthritic diseases harbor elevated serum and synovial fluid levels of free and immune-complexed glucose-6-phosphate isomerase (G6PI)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(2):838-845.
- Schaller M, Stohl W, Tan SM, et al. Raised levels of anti-glucose-6-phosphate isomerase IgG in serum and synovial fluid from patients with inflammatory arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(5):743-749.
- Fan LY, Zong M, Wang Q, et al. Diagnostic value of glucose-6-phosphate isomerase in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23/24):2049-2053.
- 鲍春德, 叶萍, 陈晓翔, 等. 血清中 6-磷酸葡萄糖异构酶抗原升高在类风湿关节炎中的意义探讨[J]. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9(5):277-279.
- Chen J, Wang L, Qin L, et al. Diagnostic value of glucose-6-phosphate isomerase in rheumatoid arthritis patients: systematic review[J]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2010, 27(1):157-164.
- Park JD, Lee SI, Kim AR, et al. The effect of human placental extract on rheumatoid arthritis in an animal model[J]. *Ann Rehabil Med*, 2012, 36(2):197-206.
- Szarka E, Neer Z, Balogh P, et al. Exacerbation of collagen induced arthritis by Fcγ receptor targeted collagen peptide due to enhanced inflammatory chemokine and cytokine production[J]. *Biologics*, 2012, 6(1):101-115.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, et al. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(5):1034-1045.
- Kim HS, Kim AR, Lee JM, et al. A mixture of Trachelospermum caulis and Moutan cortex radices extracts suppresses collagen-induced arthritis in mice by inhibiting NF-κB and AP-1[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(3):420-429.
- Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity[J]. *Cell*, 1996, 87(5):811-822.
- Basu D, Horvath S, Matsumoto I, et al. Molecular basis for recognition of an arthritic peptide and a foreign epitope on distinct

MHC molecules by a single TCR[J]. J Immunol, 2000, 164(11): 5788-5796.

- [25] Wipke BT, Wang Z, Kim J, et al. Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography[J]. Nat Immunol, 2002, 3(4): 366-372.
- [26] Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, et al. Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis; a critical role for immune complexes[J]. J Immunol, 2004, 172(12): 7694-7702.
- [27] Kyburz D, Carson DA, Corr M. The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN

mouse model of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(11): 2571-2577.

- [28] 陈锋, 江训良, 谢小兵, 等. 血清葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)与自身免疫性疾病(AID)相关性研究[J]. 实用预防医学, 2009, 16(1): 235-237.
- [29] 董建一, 王福金, 王靖宇. 类风湿关节炎中葡萄糖-6-磷酸异构酶诊断的应用价值[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(11): 2092-2094.

(收稿日期: 2013-01-28)

• 综 述 •

辩证分析基因检测

乔维洲¹, 徐维家¹, 孙福伯^{2△}综述, 王永安¹审校

(1. 大连市中心医院, 辽宁大连 116033; 2. 大连医科大学, 辽宁大连 116044)

关键词: 基因检测; 预防医学; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)16-2135-03

随着人类基因组计划测序工作的完成, 基因检测服务这一新兴行业逐渐发展起来, 基因检测服务可以在一定程度上预知疾病风险, 达到控制和延缓疾病发生及延长寿命的目的, 它的出现与人们日益提高的健康需要相适应, 而且在基因诊断、治疗、生物制药和科研等领域展示了其广阔的应用前景^[1]。但与此同时, 也有关基因检测不和谐的声音。比如随之出现的社会伦理和法律等新问题。笔者从哲学思维的角度, 通过举例从不同方面分析当前形势下的基因检测。并对其今后的发展和应用提出建议。

1 基因检测概述

随着人类基因组计划测序工作的完成^[2], 人们对基因与疾病关系的认识更加深入, 并由此衍生出一种新的健康服务项目——基因检测。它是通过血液、其他体液或细胞对 DNA 进行检测的技术, 提取被检测者脱落的口腔黏膜细胞或其他组织细胞, 扩增其基因信息后, 通过特定设备检测受试者细胞中 DNA 分子信息, 并分析其中的各种基因, 从而使人们能了解自己的基因信息, 预知身体患疾病的风险, 并通过改善自己的生活环境和生活习惯, 避免或延缓疾病的发生^[3]。基因检测可以诊断疾病, 也可用于疾病风险的预测^[4-5], 疾病诊断是用基因检测技术检测引起遗传性疾病的突变基因; 疾病风险的预测即预测性基因检测, 是利用基因检测技术在疾病发生之前发现疾病发生的风险, 从而提早预防或采取有效的干预措施。然而, 基因检测作为一个新事物, 在预测疾病的同时本身也存在一定风险, 且人们对其不甚了解, 再加上网络上出现一些负面报道更无形中歪曲和误导了科学的真实性。目前基因检测这个行业存在鱼龙混杂现象, 也有人质疑其商业操作模式。这些问题都将极大地限制基因检测服务技术的发展。

自然界的一切归根到底是辩证地而不是形而上学发生的, 辩证法的规律是自然界的实在的发展规律。无论是现实的还是虚拟的, 任何事物的发展都要遵循这一规律。在医学领域中, 有关人体生命的本质和过程, 疾病发生和发展的特点, 医学的性质、功能及其活动规律等问题, 同样也属于自然辩证法的研究范畴。一个民族想要站在科学的最高峰, 就一刻也不能没

有理论思维^[6]。所以应当运用哲学中的辩证法观点去看待基因检测问题。

2 基因检测的辩证分析

2.1 积极态度 基因检测的存在可以产生积极的作用, 它的普及将意味着“个人医疗时代”的到来。医生可以根据检测信息为患者设计个性化医疗方案。比如根据肺癌患者体内的 EGFR 基因是否发生突变而选择不同药物, 不仅可以减轻药物的不良反应, 还可以降低费用。另外通过基因检测得知个体内的“易感基因”, 指导健康的生活。所谓易感基因是和特定疾病具有阳性关联的基因或等位基因, 在适宜的环境刺激下能够编码遗传性疾病或获得疾病易感性。肝癌全基因组关联研究发现了 1p36. 22 UBE4B-KIF1B-PGD 是一个全新的肝癌易感基因区域, 为肝癌发生的遗传病因和分子机制提供了一条新的线索, 有望解析肝癌发生与发展的机制, 为新药的研发提供理论依据和候选生物靶标^[7]。随着基因测序技术的不断进步, 更多疾病的易感基因将被发现, 这将极大地有利于人类对疾病的控制, 为医疗和保健养生提供参考和依据。可见, 基因检测对人类的积极作用是值得肯定的。

2.2 消极态度

2.2.1 增加受试者的心理负担 基因检测作为一项新兴的疾病预测技术, 在主动预防疾病的同时也带来一些风险。这种风险主要表现为某些受检者一旦知道自己基因存在问题, 就背上了思想包袱, 陷入恐慌之中, 产生心理焦虑甚至引发抑郁。例如, 曾经有两位女性受检者通过基因检测, 发现带有乳腺癌基因, 受检者当即要求手术治疗, 提前切除乳腺, 防止癌症发生, 这样的做法就未免有些极端。实际上只要注意生活方式并合理用药, 就可以阻止基因的促癌作用。再如, 2007 年沃森博士拿到人类第一份个人版的基因组图谱后就表示他不想分析一种将会导致阿尔茨海默病的 ApoE 基因, 以免知道这一结果而对自己产生负面的影响^[8]。

2.2.2 歧视问题^[9] 随着基因检测的开展, 对于那些所谓的“非正常基因”携带者所产生的基因歧视现象也随之产生^[10]。就像过去年代里社会、种族和妇女权利等种种问题奋争一样,