

# 类风湿关节炎患者 I 类干扰素效应基因表达的应用价值

黄建军<sup>1</sup> 冯 钢<sup>1</sup> 李 志<sup>2</sup> 程 龙<sup>1</sup> 张 鹏<sup>1</sup> 李小宁<sup>1</sup> 浦 春<sup>1</sup>

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1. 检验科;2. 风湿免疫科 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 检测类风湿关节炎(RA)患者和正常对照组 I 类干扰素(IFN)效应基因 mRNA 的表达,探讨 IFN 在 RA 发病过程中的意义。方法:收集 32 例 RA 患者和健康体检人群,分为治疗前 RA 组、治疗后 RA 组和正常对照组,患者均为首次就诊或未使用改变病情抗风湿药,留取全血,采用 qPCR 方法检测 MXA、MXB、IFIT1、IFIT2、ISG15、HERC5、Ly6E、RSAD2、EPSTR1、IFI44L、IFI35 和 IFI6 基因 mRNA 的表达,检测血清抗 CCP 抗体和 RF,比较 mRNA 组间基因表达差异及与自身抗体水平相关性。结果:IFIT1、ISG15、HERC5、MXA、MXB、Ly6E 和 RSAD2 在治疗前 RA 患者组中的 mRNA 表达水平高于治疗后 RA 组( $P < 0.05$ )。IFIT2、ISG15、HERC5、MXA、MXB、Ly6E、RSAD2、EPSTR1 和 IFI35 在治疗前 RA 组中 mRNA 的表达水平均高于正常对照组( $P < 0.05$ )。ISG15、HERC5、RSAD2 在治疗后 RA 组中 mRNA 的表达水平均高于正常对照组( $P < 0.05$ )。IFI6、IFIT2、IFI35、ISG15、MXB、Ly6E、EPSTR1 和 MXA 的 mRNA 的表达水平与抗 CCP 抗体呈正相关性( $r = 0.354 \sim 0.667, P < 0.05$ )。IFI6、IFIT2、IFI35、MXB、Ly6E 和 MXA 的 mRNA 的表达水平与 RF 呈正相关( $r = 0.362 \sim 0.579, P < 0.05$ )。结论:RA 患者炎症细胞 IFN 效应基因 mRNA 表达升高,表明 IFN 可能是 RA 自身免疫反应的诱发因素。

**【关键词】**类风湿关节炎; I 类干扰素;MXA;ISG15;Ly6E

**【中图分类号】**R 593.22;R 979.12 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.03.014

## Clinical implications of type I interferon signature gene expression in patients with rheumatoid arthritis

HUANG Jianjun, FENG Gang, LI Zhi, CHENG Long, ZHANG Peng, LI Xiaoning, PU Chun

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the implications of type I Interferon (IFN) signature gene expression in patients with rheumatoid arthritis (RA) in different dates of disease. **Methods:** Blood samples were collected from 32 RA patients (first diagnosis without use of antirheumatic drugs) and healthy subjects. RA patients were divided into pre-RA treatment group and post-treatment group, and the healthy subjects were included in control group. Real-Time PCR (qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of MXA, MXB, IFIT1, IFIT2, ISG15, HERC5, Ly6E, RSAD2, EPSTR1 and IFI35 genes. Serum anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP) and rheumatoid factor (RF) concentrations were also measured to compare their correlation with expression of the signature genes described above. **Results:** The mRNA expression IFIT1, ISG15, HERC5, MXB, Ly6E and RSAD2 genes was higher in pre-treatment than post-medication in RA patients ( $P < 0.05$ ). Expression of IFIT2, ISG15, HERC5, MXA, MXB, Ly6E, RSAD2, EPSTR1 and IFI35 was significantly higher in patients in pre-RA treatment group than that of the controls ( $P < 0.05$ ), whereas mRNA expression in ISG15, HERC5 and RSAD2 was higher in patients following treatment than that of control group ( $P < 0.05$ ). Expression of MXA, MXB, IFIT2, ISG15, EPSTR1, IFI6, Ly6E and IFI35 genes was positively correlated with the serum level of anti-CCP ( $r = 0.354 - 0.667; P < 0.05$ ). Likewise, gene expression of IFI6, IFIT2, IFI35, MXB, Ly6E and MXA demonstrated a similar relationship with RF ( $r = 0.362 - 0.579, P < 0.05$ ). **Conclusion:** Up-regulated mRNA expression in the INF signature genes was seen RA patients, suggesting that INF may be precipitating factors in autoimmune response in patients with RA.

**【Key words】** rheumatoid arthritis; type I Interferons; MXA; ISG15; Ly6E

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 发病机制复杂,免疫细胞在多种细胞因子的联合作用下产生自身免疫倾向,多因素诱发自身免疫性疾病<sup>[1-2]</sup>。I 类干扰素 (Interferon, IFN) 能够诱发系统性红斑

狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 发病,在 RA 发病过程中的作用还有待深入研究,本研究以不同病程 RA 患者为研究对象,探讨 IFN 在 RA 发病机制中的作用。

收稿日期: 2017-10-17

作者简介: 黄建军 (1983-), 男, 主管检验师, 硕士, (电话) 15055778305, (电子信箱) 20142024@wnmc.edu.cn。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 ~ 2016 年弋矶山医院 32 例 RA 患者临床资料,所有患者经临床确诊并符合 2010 年欧盟/美国抗类风湿病学会修订标准<sup>[3]</sup>,均为首次就诊或未使用改变病情抗风湿药。男 7 例,女 25 例,年龄(47 ± 12.6)岁,RA 患者病情评价(DAS28 评分)(5.3 ± 1.7)分,住院时间(11 ± 3.6)d,治疗方法 DMARDs 单药或联合疗法。收集同期 32 例健康体检者为正常对照组,排除自身免疫性疾病、肿瘤和感染性疾病(HBV、HCV 和 HIV)患者,男 7 例,女 25 例,年龄(46 ± 10.4)岁。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 Takara RNAiso Blood 试剂盒提取外周血单个核细胞 mRNA,Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)试剂盒合成 cDNA,步骤参照试剂盒方案,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值均在 1.7 ~ 2.1 范围内。

1.3 qPCR 测定 引物和探针由 Invitrogen 公司设计并合成,使用 Premix Ex Taq™(Takara)qPCR 试剂盒,检测仪器为 Lightcycler480(Roche),反应体系 25 μL,内参基因为 HPRT。采用绝对定量法计算拷贝数,标准品制备方法:挑选若干 cDNA 含量高的样本进行靶基因和内参基因扩增实验,选择靶基因和内参基因 Ct 值均最小的标本为标准品,进行 3 倍梯度

稀释,原倍标本浓度设定为 27,则标准品浓度依次为 27、9、3、1,以此为 qPCR 标准品。

1.4 血清学标志物检测 采用 ELISA 法检测抗 CCP 抗体,试剂盒由上海科新生物提供,实验步骤参照说明书。同时检测患者其他血清学标志物如 C-反应蛋白(CRP)、类风湿因子(RF)等,方法采用免疫比浊法,检测平台为日立 7600 全自动生化分析仪。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。定量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数间比较采用随机区组设计的方差分析,多组间两两比较采用 SNK 法;采用 Pearson 相关分析检验数据相关性, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mRNA 表达分析

2.1.1 IFN 效应基因 免疫调节效应中受 IFN 调控的基因称为 IFN 效应基因,本研究主要检测了 I 类 IFN 效应基因 MXA、MXB、IFIT1、IFIT2、ISG15、HERC5、Ly6E、RSAD2、EPSTRL1、IFI44L、IFI35 和 IFI6 基因 mRNA 的表达,以 HPRT 为内参基因,各基因引物序列见表 1。

表 1 qPCR 各基因引物序列

基因	正向引物	反向引物
IFIT1	gat gta tta cca cat ggg cag a	tag cgg aag gga ttt gaa ag
IFIT2	atc ccc cat cgc tta tet ct	cca cct caa tta atc agg cac t
IFI44L	tgc taa gga gta tag cag atg acc ta	cca caa cat cac tct cac ttt aag a
ISG15	gag gca gcg aac tca tct tt	agc atc ttc acc gtc agg tc
MXA	atc cag cca cca ttc caa	caa caa gtt aaa tgg tat cac aga gc
MXB	ttc ttc aaa cac atc cat att tca	cag tgg taa gtc ttt ctg cca gt
EPSTRL1	ccg gag aaa tga gat aca aag aat	ggt gaa ccg gtt tag ctg tg
RSAD2	atg tga aag ccc aag gac ac	ttt ggt ttc aaa taa cac tga ttg a
HERC5	ctt cca gtg aaa gta tca tca agt g	cca gag caa aat get ttg att
Ly6E	atc ttc ttg cca gtg ctg ct	gct tca gga agt aca gat tgc
IFI6	tgc ttc tet tet ctg ctg caa	gct ctg cga gca ctt ttt ett
IFI35	caa aag gag cac acg atc aa	act caa ctg get gga cat cat
HPRT	tga cct tga ttt att ttg cat acc	cga gca aga cgt tca gtc ct

2.1.2 mRNA 表达 RA 组患者 IFIT1、ISG15、HERC5、MXA、MXB、Ly6E 和 RSAD2 的 mRNA 表达水平治疗前均高于治疗后( $P < 0.05$ ),治疗前 RA 组的 IFIT2、ISG15、HERC5、MXA、MXB、Ly6E、RSAD2、EPSTRL1 和 IFI35 的 mRNA 表达水平均高于正常对照组( $P < 0.05$ ),治疗后 RA 组的 ISG15、HERC5、RSAD2 的 mRNA 表达水平均高于正常对照组( $P <$

0.05),其他差异无统计学意义,见表 2。

2.2 抗 CCP 抗体和 RF 与 IFN 效应基因相关性

由于正常对照组抗 CCP 抗体和 RF 水平接近 0,所以本研究仅分析了治疗前 RA 组患者的相关性。IFI6、IFIT2、IFI35、MXB、Ly6E、和 MXA 的 mRNA 表达水平与治疗前 RA 组患者外周血 RF 水平呈正相关性( $r = 0.362 \sim 0.579, P < 0.05$ ),IFI6、IFIT2、

IFI35、ISG15、MXB、Ly6E、EPSTRII 和 MXA mRNA 表达水平与治疗前 RA 组患者外周血抗 CCP 抗体水平

呈正相关性( $r = 0.354 \sim 0.667, P < 0.05$ ) ,见表 3。

表 2 qPCR mRNA 表达水平组间比较

基因	治疗前 RA 组	治疗后 RA 组	正常对照组	F	P
IFIT1	4.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	3.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.9 ± 1.3 <sup>ab</sup>	4.078	0.022
IFIT2	3.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.9 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.750	0.005
ISG15	8.6 ± 3.5 <sup>c</sup>	6.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.4 <sup>a</sup>	23.452	0.000
HERC5	6.0 ± 1.7 <sup>c</sup>	5.1 ± 1.5 <sup>b</sup>	3.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	31.463	0.000
MXA	6.4 ± 3.0 <sup>b</sup>	5.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	4.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.134	0.009
MXB	5.0 ± 1.8 <sup>b</sup>	4.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	3.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	4.066	0.022
Ly6E	3.6 ± 1.6 <sup>b</sup>	2.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.512	0.003
RSAD2	3.3 ± 1.4 <sup>c</sup>	2.6 ± 1.0 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.355	0.000
EPSTRII	5.1 ± 2.3 <sup>b</sup>	4.5 ± 2.0 <sup>ba</sup>	3.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	3.405	0.040
IFI44L	2.5 ± 0.8	2.1 ± 0.8	2.3 ± 0.7	2.215	0.118
IFI6	4.4 ± 1.9	3.9 ± 1.9	3.8 ± 1.4	1.427	0.248
IFI35	5.0 ± 1.9 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.7 <sup>ab</sup>	3.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	3.725	0.030

注:多组间两两比较 符号完全不同表示  $P < 0.05$ 。

表 3 抗 CCP 抗体和 RF 与效应基因 mRNA 表达水平相关性

	mRNA 表达水平											
	IFI44L	IFI6	IFIT1	IFIT2	IFI35	ISG15	MXB	Ly6E	RSAD2	HERC5	EPSTRII	MXA
抗 CCP	0.295	0.635	-0.167	0.428	0.667	0.376	0.354	0.650	0.193	0.182	0.512	0.619
	0.102	0.000	0.360	0.015	0.000	0.034	0.047	0.000	0.289	0.319	0.003	0.000
RF	0.057	0.501	-0.001	0.362	0.521	0.298	0.412	0.579	0.182	0.149	0.340	0.510
	0.755	0.004	0.996	0.042	0.002	0.098	0.019	0.001	0.318	0.415	0.057	0.003

注:①上层数据为相关系数  $r$ ,下层为双尾  $P$  值。②为了减小治疗对抗体和基因表达水平的影响,本研究只分析治疗前 RA 组患者指标间相关性  $\rho = 32$ 。

### 3 讨论

IFN 主要由活化的浆细胞样树突状细胞合成分泌<sup>[4]</sup>,具有广谱抗病毒和免疫调节功能。IFN 与 SLE 炎性病变的反复发作及慢性化有关<sup>[5]</sup>,有报道 IFN 生物学效应相关基因在 RA 患者人群中有高水平表达,认为 RA 自身免疫的发病与 IFN 效应基因表达相关<sup>[6]</sup>。慢性病毒感染可能是 RA 发病的触发因素,发病机制可能与病毒感染产生的抗原交叉反应相关<sup>[7]</sup>。我们检测了 IFN 抗病毒效应基因 MXA 和 MXB 的表达水平, MXA 蛋白抗病毒谱广泛,通过水解核糖蛋白体中的核衣壳裂解病毒,释放出病毒核酸被胞质中的核酸内切酶降解<sup>[8]</sup>,MXB 功能不详。MXA mRNA 表达水平在治疗前 RA 升高,治疗后降低,与对照组处于同一水平;MXB mRNA 表达水平在正常对照、治疗后和治疗前 RA 组呈现逐渐上升的趋势,表明 MXA 和 MXB 的表达与 RA 的病情相关,表达增高与病情加重相关。IFIT1 和 IFIT2 主要功能是抑制病毒复制<sup>[9]</sup>,参与调控非折叠蛋白

反应和细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。ISG15 和 HERC5 能通过泛素化反应清除细胞局部无效蛋白分子,促进 IFN 效应基因的表达<sup>[12-13]</sup>。IFI6 和 IFI35 参与淋巴细胞凋亡调节<sup>[14]</sup>,EPSTRII 与上皮细胞转化相关,IFI44L 参与 IFN 诱导的多种生物学功能如抗病毒、抑制增殖活性等<sup>[15]</sup>。IFI6 可以通过抑制细胞凋亡蛋白酶 3 和细胞凋亡蛋白酶 9 来抑制细胞凋亡,IFI35 作用机制不详<sup>[16]</sup>。RA 以关节局部组织炎症细胞浸润和 B 淋巴细胞持续分泌自身抗体为特征,炎症细胞和 B 淋巴细胞凋亡受阻将加重 RA 的炎症反应,使病情持续反复。我们的研究发现,IFIT1 和 IFIT2 的 mRNA 在治疗前 RA 组增高,表明 RA 患者由 IFIT1 和 IFIT2 控制的基因转录水平的调控更加活跃,与 IFN 相关的转录调控在 RA 发病过程中可能起重要作用。随着病情活跃度的升高,ISG15 和 HERC5 mRNA 表达也增高;以上结果表明 IFN 效应基因的生物学活性随着 RA 病情活动度加重而增强。我们的研究结果显示 INF 更倾向于通过诱导 IFI35 蛋白来抑制

巨噬细胞、成纤维细胞和上皮细胞的凋亡进而影响 RA 病情,但 IFN 效应基因的作用机制有待进一步研究。

Ly6E 和 RSAD2 是 B 淋巴细胞增殖和扩增的重要调节基因<sup>[17]</sup>,通过 TGF-β 介导调节 B 淋巴细胞增殖,RSAD2 促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,进而诱导和调节 B 淋巴细胞活化和自身抗体分泌<sup>[18]</sup>。Ly6E 和 RSAD2 在治疗前 RA 组的表达水平高于治疗后 RA 组和对照组,表明 RA 患者由 IFN 诱导的 Th2 辅助细胞和 B 淋巴细胞活性增强,加重体液型自身免疫反应对机体的损伤。

为了进一步明确 INF 的效应与自身抗体产生的关系,我们分析了 IFN 效应基因与抗 CCP 抗体和 RF 之间的关联性。结果显示,多个基因(IFI6、IFI35、ISG15、EPSTRI1、Ly6E、IFIT2、MXA 和 MXB) mRNA 表达与 RA 自身抗体水平呈正相关,表明 IFI6、IFI35、ISG15、EPSTRI1、Ly6E、IFIT2 和 MXA 的表达可能促进 RA 自身抗体的产生。与我们的结果相反,Cantaert 等<sup>[19]</sup>在 RA 患者中的研究认为 INF 对自身抗体的产生没有作用。Cantaert 的 RA 患者经过阿达木单抗治疗,近期有研究证实阿达木单抗能够改变 INF 对中性粒细胞的作用<sup>[20]</sup>,所以有理由认为其他炎症细胞也有可能因阿达木单抗药物影响 INF 的生物学效应,相关结果还需进一步证实。

本研究为 IFN 效应基因在 RA 发病过程中的作用提供了一定的证据,多种效应基因的表达在 RA 人群中升高,并且表达升高与自身抗体的产生有正相关性。

【参考文献】

[1] SCOTT DL,WOLFE F,HUIZINGA TW. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet 2010,376(9746):1094-1108.

[2] CHRISTMANN RB,SAMPAIO-BARROS P,STIFANO G,et al. Association of interferon-and transforming growth factor beta-regulated genes and macrophage activation with systemic sclerosis-related progressive lung fibrosis [J]. Arthritis Rheumatol,2014,66(3):714-725.

[3] ALETAHA D,NEOGI T,SILMAN AJ,et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria:an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative [J]. Arthritis Rheum 2010,62(9):2569-2581.

[4] CAO W,LIU YJ. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells[J]. Curr Opin Immunol 2007,19(1):24-30.

[5] BLOMBERG S,ELORANTA ML,CEDERBLAD B. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Lupus 2001,10(7):484-490.

[6] VAN DER POWW KRAAN TC,WIJBRANDTS CA,VAN BAARS-EN LG,et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic

profiling of peripheral blood cells:assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients [J]. Ann Rheum Dis, 2007,66(8):1008-1014.

[7] WESTERGAARD MW,DRABORG AH,TROELSEN L,et al. Iso-types of Epstein-Barr virus antibodies in rheumatoid arthritis:association with rheumatoid factors and citrulline dependent antibodies [J]. Biomed Res Int 2015(2015):472174.

[8] HALLER O,STAEHELI P,SCHWEMMLE M,et al. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity [J]. Trends Microbiol 2015,23(3):154-163.

[9] ZHOU X,MICHAL JJ,ZHANG L,et al. Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense [J]. Int J Biol Sci 2013,9(2):200-208.

[10] CLAVARINO G,ADRIOUACH S,QUESADA JL,et al. Unfolded protein response gene GADD34 is overexpressed in rheumatoid arthritis and related to the presence of circulating anti-citrullinated protein antibodies [J]. Autoimmunity 2016,49(3):172-178.

[11] LAI KC,CHANG KW,LIU CJ,et al. IFN induced protein with tetra-ricopeptide repeats 2 inhibits migration activity and increases survival of oral squamous cell carcinoma [J]. Mol Cancer Res, 2008,6(9):1431-1439.

[12] FENSTERL V,SEN GC. The ISG56/IFIT1 gene family [J]. J Interferon Cytokine Res 2011,31(1):71-78.

[13] ZHANG L,HAPON MB,GOYENECHE AA,et al. Mifepristone increases mRNA translation rate, triggers the unfolded protein response, increases autophagic flux, and kills ovarian cancer cells in combination with proteasome or lysosome inhibitors [J]. Mol Oncol 2016,10(7):1099-1117.

[14] YANG W,TAN J,LIU R,et al. Interferon-gamma upregulates expression of IFP35 gene in HeLa cells via interferon regulatory factor-1 [J]. PLoS One 2012,7(12):e50932.

[15] CHERIYATH V,GLASER KB,WARING JF,et al. G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells [J]. J Clin Invest 2007,117(10):3107.

[16] QI Y,LI Y,ZHANG Y,et al. IFI6 inhibits apoptosis via mitochondrial dependent pathway in dengue virus 2 infected vascular endothelial cells [J]. PLoS One 2015,10(8):e0132743.

[17] 汤建平,顾越英,沈南,等. 干扰素诱导表达的淋巴细胞抗原 6 复合体 E 和干扰素诱导蛋白 1 基因与系统性红斑狼疮患者病情活动性的关系 [J]. 中华医学杂志,2004,84(14):1157-1160.

[18] ALHOSSINY M,LUO L,FRAZIER WR,et al. Ly6E/K signaling to TGFbeta promotes breast cancer progression, immune escape, and drug resistance [J]. Cancer Res 2016,76(11):3376-3386.

[19] CANTAERT T,VAN BAARSEN LG,WIJBRANDTS CA,et al. Type I interferons have no major influence on humoral autoimmunity in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology 2010,49(1):156-166.

[20] WRIGHT HL,THOMAS HB,MOOTS RJ,et al. Interferon gene expression signature in rheumatoid arthritis neutrophils correlates with a good response to TNFi therapy [J]. Rheumatology 2015,54(1):188-193.