

# nature

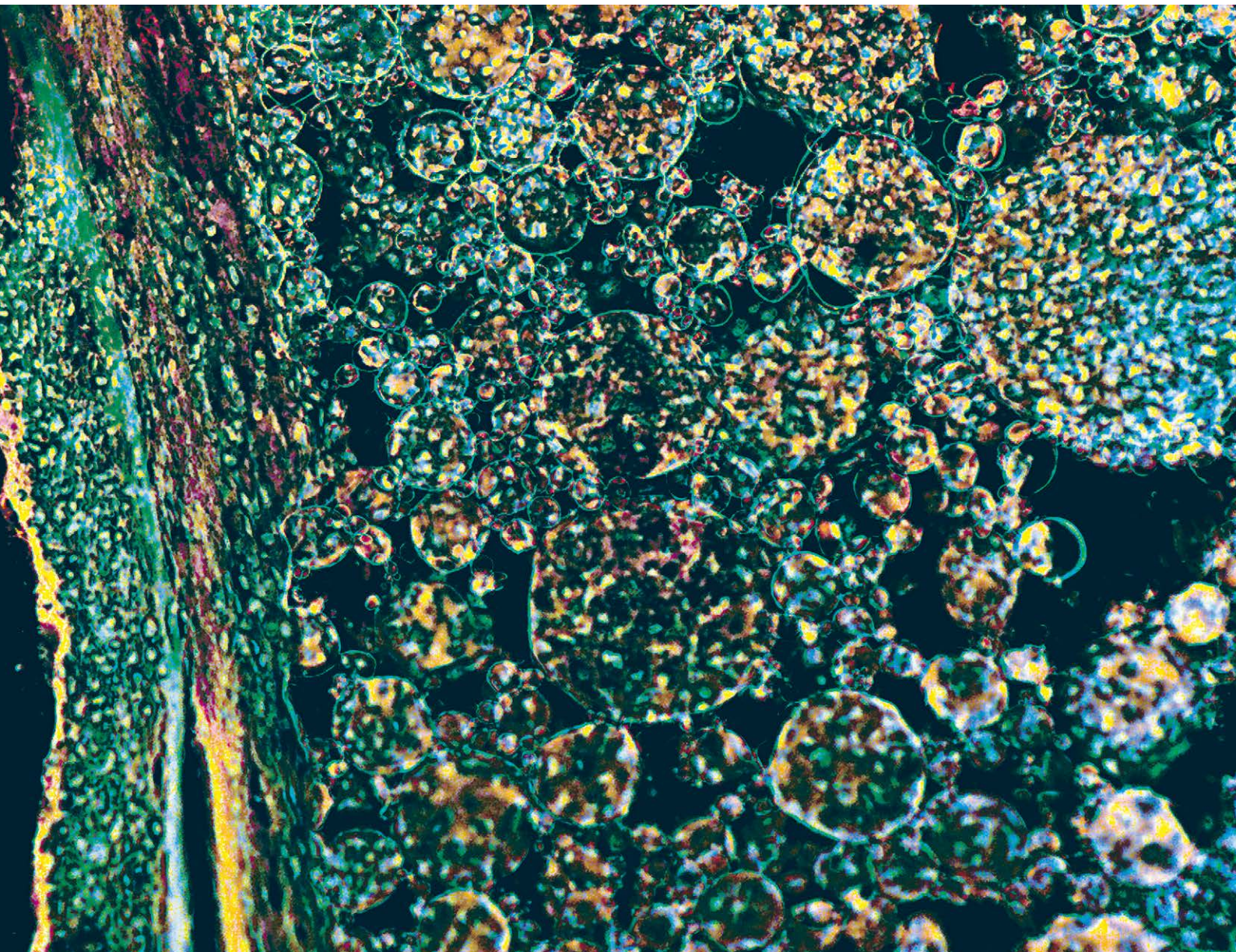
---

# REVIEWS

July 2020 volume 6 no. 1

[www.nature.com/reviews](http://www.nature.com/reviews)

## RHEUMATOLOGY



中文版 主 编 徐沪济 (清华大学临床医学院/海军军医大学长征医院)

副 主 编 孙凌云 (南京大学医学院附属鼓楼医院)

刘 毅 (四川大学华西医院)

戴 冽 (中山大学孙逸仙纪念医院)

董凌莉 (华中科技大学同济医学院附属同济医院)

朱 剑 (中国人民解放军总医院)

穆 荣 (北京大学第三医院)

李梦涛 (北京协和医院)

吴 歆 (海军军医大学长征医院)

顾 问 曾小峰 (北京协和医院)

张奉春 (北京协和医院)

栗占国 (北京大学人民医院)

鲍春德 (上海交通大学医学院附属仁济医院)

朱 平 (第四军医大学西京医院)

邹和建 (复旦大学华山医院)

赵 岩 (北京协和医院)

黄 烽 (中国人民解放军总医院)

黄慈波 (深圳大学附属华南医院)



## Advisory Board

**Gunnar B. J. Andersson**

Rush University Medical Center, USA

**Xenofon Baraliakos**

Rheumazentrum Ruhrgebiet, Germany

**Francis Berenbaum**

AP-HP Saint-Antoine Hospital, France

**Gerd-Rüdiger Burmester**

Humboldt University and Free University of Berlin, Germany

**Leslie J. Crofford**

Vanderbilt University Medical Center, USA

**Michael Doherty**

University of Nottingham, UK

**Gary S. Firestein**

University of California, San Diego, USA

**Sherine E. Gabriel**

Rutgers University, USA

**Steffen Gay**

University Hospital of Zürich, Switzerland

**Robert D. Inman**

University of Toronto, Canada

**David A. Isenberg**

University College London, UK

**Cees G. M. Kallenberg**

University of Groningen, Netherlands

**Ho-Youn Kim**

Catholic University of Korea, Republic of Korea

**Lars Klareskog**

Karolinska Institute/Karolinska University Hospital, Sweden

**Margreet Kloppenburg**

Leiden University Medical Center, The Netherlands

**Nancy E. Lane**

University of California School of Medicine, Davis, USA

**Chak-Sing Lau**

University of Hong Kong, Hong Kong

**Zhan-Guo Li**

Beijing University Medical School People's Hospital, China

**Matthew H. Liang**

Harvard University, USA

**Peter E. Lipsky**

Charlottesville, USA

**Professor Sir Ravinder N. Maini**

Imperial College London, UK

**Fiona McQueen**

University of Auckland, New Zealand

**Eric F. Morand**

Monash University, Australia

**Seza Ozen**

Hacettepe University, Turkey

**Janet Pope**

University of Western Ontario, Canada

**William Robinson**

Stanford University School of Medicine, USA

**Yehuda Shoenfeld**

Sheba Medical Center (affiliated with Tel Aviv University), Israel

**Josef S. Smolen**

Medical University of Vienna, Austria

**Rene Toes**

Leiden University Medical Center, The Netherlands

**Cornelia M. Weyand**

Stanford University School of Medicine, USA

**Kazuhiko Yamamoto**

University of Tokyo, Japan

## *Nature Reviews Rheumatology* Journal Editorial Team

**Chief Editor:**

Sarah Onuora

**Senior Editors:**

Joanna Collision, PhD; Jessica McHugh, PhD

**Senior Art Editor:**

Susanne Harris

**Production Editor:**

Fleur Stevens

**Proofreader:**

Emma Jobson

**Senior Editorial Assistant:**

Felicity Tournant

**Senior Production Controller:**

Brittany DeSalvo

---

## Editorial Board, Chinese Edition

Editor-in-Chief:

**Huji Xu**

School of Clinical Medicine Tsinghua University, Beijing; Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai

Associate Editors:

**Lingyun Sun**

Nanjing Drum Tower Hospital The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing

**Yi Liu**

West China Hospital, Sichuan University, Chengdu

**Lie Dai**

Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou

**Lingli Dong**

Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan

**Jian Zhu**

Chinese PLA General Hospital, Beijing

**Rong Mu**

Peking University Third Hospital, Beijing

**Mengtao Li**

Peking Union Medical College Hospital, Beijing

**Xin Wu**

Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai

Consultants:

**Xiaofeng Zeng**

Peking Union Medical College Hospital, Beijing

**Fengchun Zhang**

Peking Union Medical College Hospital, Beijing

**Zhanguo Li**

Peking University People's Hospital, Beijing

**Chunde Bao**

Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai

**Ping Zhu**

Xijing Hospital, Xi'an

**Hejian Zou**

Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai

**Yan Zhao**

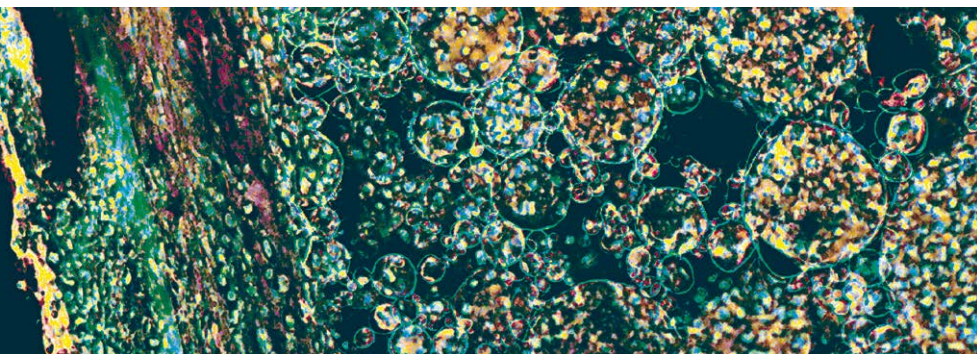
Peking Union Medical College Hospital, Beijing

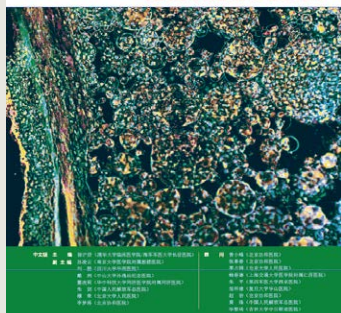
**Feng Huang**

Chinese PLA General Hospital, Beijing

**Cibo Huang**

Shenzhen University affiliated South China Hospital, Shenzhen





► **COVER:** The image shows an emulsion-templated bone tissue engineering scaffold implanted into an ex vivo chick femur defect model. The complete infiltration of chick bone cells through the interconnected pores of the biodegradable scaffold demonstrates the suitability of the scaffold for bone tissue engineering applications. Image supplied by Betül Aldemir Dikici, University of Sheffield, Sheffield, UK.

## YEAR IN REVIEW

- 1 克服炎症性关节炎中生物仿制药的使用障碍  
*Jonathan Kay*
- 3 下一代分析技术对滑膜组织结构的解析  
*Douglas J. Veale and Ursula Fearon*
- 5 风湿病学中的机器学习及临床应用  
*Aridaman Pandit and Timothy R. D. J. Radstake*
- 7 风湿病学中阿片类药物的安全使用  
*Seoyoung C. Kim and Daniel H. Solomon*
- 9 NETs在风湿病中大行其道  
*Gustaf Wigerblad and Mariana J. Kaplan*

## REVIEWS

- 11 肌纤维母细胞的凋亡逃避：纤维化疾病的标志  
*Boris Hinz and David Lagares*
- 32 甲氨喋呤及其在炎症性关节炎中的作用机制  
*Bruce N. Cronstein and Thomas M. Aune*
- 42 羟氯喹和氯喹的作用机制：风湿病中的应用  
*Eva Schrezenmeier and Thomas Dörner*
- 53 霉酚酸酯、硫唑嘌呤以及他克莫司在风湿病中的作用机制  
*Jasper C. A. Broen and Jacob M. van Laar*
- 65 遗传学和表观遗传学在骨关节炎中的相互调控作用  
*Sarah J. Rice, Frank Beier, David A. Young and John Loughlin*

## PERSPECTIVES

- 79 糖皮质激素治疗风湿病观点的趋同时代  
*Frank Buttgerit*

*Nature Reviews Rheumatology* (ISSN 1759-4790 [print]; 1759-4804 [online]) is published monthly by Springer Nature Limited, The Campus, 4 Crinan Street, London N1 9XW, UK. Airfreight and mailing in the USA by agent named WN Shipping USA, 156-15, 146th Avenue, 2nd Floor, Jamaica, NY 11434, USA. Periodicals postage paid at Brooklyn, NY 11256. US Postmaster: Send address changes to Springer Nature, WN Shipping USA, 156-15, 146th Avenue, 2nd Floor, Jamaica, NY 11434, USA. Printer and mailer: Printforce (Culemborg, The Netherlands).

Copyright © 2021 Springer Nature Limited. All rights reserved. For the actual version of record please always check the online version of the publication. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form (electronic or otherwise) without prior permission from [permissions@nature.com](mailto:permissions@nature.com).

## [www.nature.com/nrrheum](http://www.nature.com/nrrheum)

**COMPETING INTERESTS POLICY** Authors of articles in *Nature Reviews Rheumatology* are required to declare any competing interests. For details, please see [www.nature.com/authors/policies/competing.html](http://www.nature.com/authors/policies/competing.html)

**ORCID** We support the use of the persistent digital identifier ORCID to make content and researchers more discoverable and visible. For more information, go to <https://orcid.org/>

**ENHANCED PDFS** All email addresses and websites are live links in the online PDFs; bookmarks are also provided for easy navigation.

**ADVANCE ONLINE PUBLICATION** We operate an advance online publication (AOP) service for authors and readers to view the latest articles published online ahead of print.

**E-ALERT SIGN-UP** Get FREE monthly e-mail alerts to the content of this journal by registering online. Or sign up to receive the latest content as an RSS newsfeed by visiting [www.nature.com/nrrheum](http://www.nature.com/nrrheum)

**SUPPLEMENTARY INFORMATION** Articles may include online-only supplementary text or display items, which may be referenced separately from the article.

**2-YEAR IMPACT FACTOR 20.543**

**2-YEAR MEDIAN 15**

For more information on journal metrics, please see [www.nature.com/ngp\\_/company\\_info/journal\\_metrics.html](http://www.nature.com/ngp_/company_info/journal_metrics.html)

### EDITORIAL & PRODUCTION OFFICE

The Campus, 4 Crinan Street, London N1 9XW, UK  
Tel: +44 (0)20 7833 4000 | Email: [nrrheum@nature.com](mailto:nrrheum@nature.com)  
[www.nature.com/nrrheum](http://www.nature.com/nrrheum)

**CHIEF EDITOR** Sarah Onuora

**SENIOR EDITORS** Joanna Collison, PhD; Jessica McHugh, PhD

**SENIOR ART EDITOR** Susanne Harris

**PRODUCTION EDITOR** Joshua Perryman

**PROOFREADER** Emma Jobson

**SENIOR EDITORIAL ASSISTANT** Felicity Tournant

**PRODUCTION CONTROLLER** Natalie Smith

**CROSS-JOURNAL EDITORS** Katharine Wrighton (Team Leader), Claire Ashworth, Caroline Barranco, Rebecca Kelsey, Isobel Leake and Grant Otto (Seniors), Joseph Willson (Associate), Timothy Thomas (Locum Associate)

**MANAGING EDITOR** Liesbet Lieben

**EDITORIAL ADMINISTRATION MANAGER** Andrea Monica

**MANAGING PRODUCTION EDITOR** Jenna Johnston

**HEAD OF COPY EDITING** Paul Fletcher

**HEAD OF OFFICE ADMINISTRATION** Laura Lee

**HEAD OF PRODUCTION** Derna Brown

**ART DIRECTOR** Samantha Whitham

**CREATIVE DIRECTOR** Kelly Krause

**EDITORIAL DIRECTOR** Mina Razzak

**VP EDITORIAL, NATURE JOURNALS** Ritu Dhand

**PUBLISHING DIRECTOR, NATURE JOURNALS** Ruth Wilson

**VP NATURE RESEARCH & BMC** James Butcher

**CHIEF JOURNALS OFFICER** Alison Mitchell

**EDITOR-IN-CHIEF, NATURE JOURNALS** Magdalena Skipper

**CUSTOMER SERVICES** [www.nature.com/help](http://www.nature.com/help)

**PERSONAL SUBSCRIPTIONS** [subscriptions@nature.com](mailto:subscriptions@nature.com)

**REPRINTS** [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints)

**ADVERTISING & SPONSORSHIP** [www.nature.com/advertising](http://www.nature.com/advertising)

**INSTITUTIONAL LICENCES** [www.springernature.com/licensing](http://www.springernature.com/licensing)

**PRESS OFFICE** [press@nature.com](mailto:press@nature.com)

**MARKETING** [marketing@nature.com](mailto:marketing@nature.com)

### MANAGEMENT OFFICES

**SPRINGER NATURE LONDON** The Campus, 4 Crinan Street, London, N1 9XW, UK. Tel: +44 (0)20 7833 4000

**SPRINGER NATURE NEW YORK** One New York Plaza, Suite 4500, New York, NY 10004-1562, USA. Tel: +1 212 726 9200

**SPRINGER NATURE ASIA-PACIFIC** Shiroyama Trust Tower 5F, 4-3-1 Toranomon, Minato-Ku, Tokyo 105-6005 Japan. Tel: +81 3 4533 8050

A list of other offices can be found at [www.nature.com/ngp\\_/contact/offices.html](http://www.nature.com/ngp_/contact/offices.html)

### DISCLAIMER

The information and material contained in this publication is for educational, research and information purposes only, not to address any particular or individual requirements. While every care is taken to see that no inaccurate or misleading data, opinions or statements appear in this journal at time of publication, it is possible that such information and material may be incorrect or out of date (science and our understanding is constantly evolving) and hence should be considered as part of the wider scientific record and not be considered as a definitive standalone statement or as a substitute for appropriate professional judgment. You should independently check any information and material and use your own good judgment before doing or not doing anything on the basis of such information or material. To the fullest extent permitted by law, the journal publisher, employees, officers and agents accept no liability whatsoever for the reliance on the content or the consequences of any inaccurate or misleading data, opinion or statement. Readers are advised that the new methods and techniques involving drug usage and treatments described within any Springer Nature journal should only be followed in conjunction with the drug manufacturer's own published literature.

## THERAPY IN 2019

## 克服炎症性关节炎中生物仿制药的使用障碍

## Overcoming barriers to biosimilars in inflammatory arthritis

Jonathan Kay

生物仿制药可用于治疗炎症性疾病，患者可以从使用生物原研药转用其生物仿制药，从而节约成本，这已引起人们的关注。2019年发表的研究支持“非医学转换”具有有效性和安全性，并强调应以一种积极的态度向患者传达生物仿制药信息有益。

截至2019年12月，欧洲药品管理局已批准56种生物仿制药上市<sup>[1]</sup>，FDA<sup>[2]</sup>批准25种。其中包括阿达木单抗、依那西普和英夫利昔单抗的生物仿制药，这些药物可用于治疗类风湿关节炎（RA）、银屑病关节炎（PsA）、中轴型脊柱关节炎（axSpA）和其他炎症性疾病。为了授予某种候选生物仿制药上市许可，监管机构需要候选生物仿制药的分析数据，确保其与参考产品的结构和功能高度相似；以及证明两者间药代动力学参数和疗效同等；且安全性和免疫原性相当的临床数据。但是，即使从这些设计严谨的研究中获得了有利数据<sup>[3]</sup>，许多患者和医疗机构仍拒绝用低成本生物仿制药代替其参考产品。从2019年发表的数据来看，不论是来自随机对照试验（RCT）<sup>[4]</sup>，还是观察注册研究<sup>[5]</sup>，均表明这种从生物原研药向其生物仿制药的“非医学转换”，可以有效节约成本，并且不产生不良临床结局。2019年，人们在如何更有效地与患者沟通，了解他们在从生物原研药向其生物仿制药转换中所抱有的期望方面也取得进展<sup>[6]</sup>。

NOR-SWITCH<sup>[7]</sup>是唯一的前瞻性双盲RCT，其研究了这种从生物原研药转用其生物仿制药的非医学转换的结局：试验纳入438例患有RA、PsA和axSpA等六种炎症性疾病中一种疾病的患者，他们从使用英夫利昔单抗转用其生物仿制药CT-P13治疗。这项试验结果发表于2017年，表明就52周的疾病恶化程度而言，转用CT-P13治疗并不劣于继续使用英夫利昔单抗治疗。2019年，Goll等人<sup>[4]</sup>发表了NOR-SWITCH试验

的26周开放扩展研究结果，双盲试验中继续使用英夫利昔单抗治疗的216例患者中，183例（85%）转换为CT-P13治疗（“转换组”），而期间使用CT-P13治疗的222例患者中，197例（89%）继续使用CT-P13治疗（“维持组”）。在26周扩展研究阶段，疾病活动恶化作为主要终点，两组间达到主要终点的患者比例相当：维持组为17%，转换组为12%。如同52周双盲试验结果<sup>[7]</sup>，两组间药物谷浓度、不良事件发生率、输液反应发生率和抗药物抗体产生率相似<sup>[4]</sup>。因此，此前瞻性RCT研究<sup>[4]</sup>中，继续使用CT-P13治疗26周与从英夫利昔单抗转用CT-P13治疗26周相比，两组间未观察到安全性或有效性差异。

在丹麦，由于依那西普生物仿制药SB4的成本几乎是依那西普的一半，丹麦政府于2016年4月发布一项建议<sup>[8]</sup>，除非排除个别情况，所有接受依那西普治疗RA、PsA或axSpA患者应改用其生物仿制药。2019年，Glintborg等人<sup>[5]</sup>在一项“真实世界”观察性队列研究中报告了这种非医学转换的结局，该研究使用全国DANBIO注册系统。截至2016年4月，研究人员纳入2061例正在接受依那西普治疗的患者，其中1621例（79%）转用SB4治疗。他们比较了转用SB4治疗的患者和2061例中未转用SB4并继续使用依那西普治疗的440例（21%）患者，以及2363例生物仿制药上市前使用依那西普治疗的历史队列患者。在转用SB4治疗患者中，转换前3月和转换后3月两组间，疾病活动度或复发率没有临床相关差异。

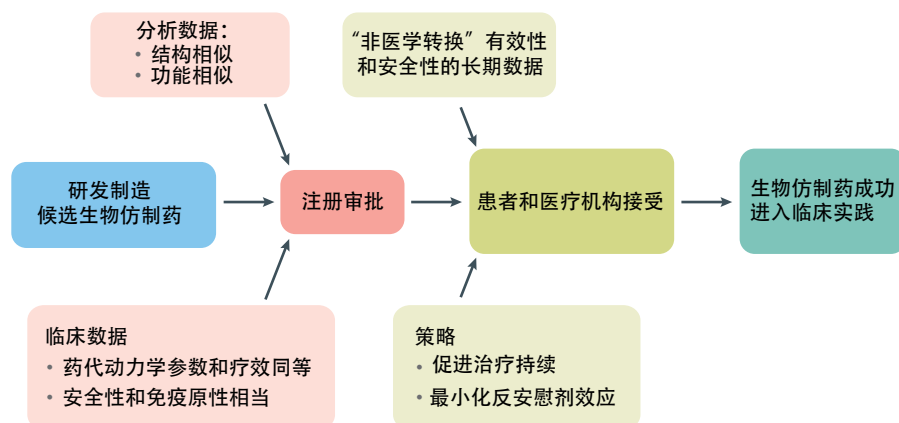
随后一年，退出治疗比例在转用SB4治疗的患者中为18%，小于继续用依那西普治疗的患者（33%）。1年矫正后的药物保留率在转用生物仿制药治疗的队列患者中为83%，略低于用依那西普治疗的历史队列患者（90%），但略高于同期继续依那西普治疗的队列患者（77%）。在转用SB4治疗的患者中，停用生物仿制药的主要原因是主观上的“缺乏疗效”，体现在患者总体评估的中位数增加，而关节肿胀数和血清C反应蛋白浓度这些客观指标并未明显增加。该研究表明<sup>[5]</sup>，反安慰剂效应，可伴随不受欢迎的药物使用而出现的不良症状，可能导致患者停用SB4。

BIO-SPAN是一项在荷兰进行的多中心、前瞻性研究，发表于2018年，评估了结构化沟通策略对RA、PsA或axSpA<sup>[9]</sup>患者继续使用生物仿制药SB4治疗的影响。在这项研究中，625例RA、PsA或axSpA患者同意进行开放转换，自愿从依那西普转用SB4治疗。风湿科和药剂科工作人员经

## 关键进展

- 从使用英夫利昔单抗转换为其生物仿制药CT-P13治疗，其安全性和有效性与继续使用英夫利昔单抗或其生物仿制药治疗相似<sup>[4]</sup>。
- 从使用依那西普到其生物仿制药SB4治疗<sup>[5]</sup>，这种“非医学转换”的前三个月和后三个月间疾病活动度和复发率没有差异。
- 以一种积极的态度向患者展示生物仿制药的相关信息，可以提高患者对生物仿制药的接受度，并促进患者持续使用生物仿制药<sup>[6]</sup>。





**图 1 生物仿制药成功应用临床的途径。** 在分析数据显示候选生物仿制药与其参考产品结构和功能相似，以及临床数据显示两者药代动力学参数和疗效同等、安全性和免疫原性相当的基础上，候选生物仿制药获得监管部门批准上市。收集“非医学转换”有效性和安全性的长期数据，并教育患者和医疗机构生物仿制药的益处，有助于提高临床实践中患者对生物仿制药的接受度。

过培训后，为患者提供生物仿制药相关咨 询，告知他们转用 SB4 是因为生物仿制药 具有较低的成本和注射部位反应发生率，并 讨论可能存在反安慰剂效应。通过这种干 预，6 个月粗保留率在转用 CT-P13 治疗组 为 90%，与 600 例用依那西普治疗的历史 队列患者（92%）相似。因此，实施良好 沟通策略似乎可以促进患者持续使用生物 仿制药。

以一种积极的态度向患者展示生物仿 制药的相关信息，可能会增加患者对这些药 物的接受度，从而鼓励患者转用生物仿制 药，并促进患者持续使用它们。2019 年， Gasteiger 等人<sup>[6]</sup>进行了一项研究，以评估 不同框架的生物仿制药说明对患者的认知及 其转用生物仿制药意愿的影响。在新西兰 进行的一项平行、四臂 RCT 研究中，纳入 96 例不同风湿病患者，随机向他们展示四种 生物仿制药相关说明视频中的一种。其中两 种说明视频对生物仿制药持积极态度，另两 种说明视频对生物仿制药持消极态度；积极 的和消极的框架说明中也

包括类比说明，便于相互比较。相比那些被 展示负面框架说明的患者，被展示积极框架 说明的患者认为生物仿制药将会更有效，并 且愿意转用生物仿制药的比例达到两倍多。 但是，相比仅向患者展示积极的框架说明， 在说明中加入类比形式并不能提高患者对生 物仿制药的认知。因此，旨在鼓励转用生物 仿制药治疗的任何结构化沟通策略中，强调 生物仿制药的潜在益处非常重要（图 1）。

随着更多有关转用生物仿制药治疗的 长期疗效和安全性的研究数据发表，患者和 医疗机构会更加放心使用生物仿制药。生物 仿制药代替生物原研药的主要优势是经济上 的，因此患者必须享有转用生物仿制药所节 约的成本。在公共卫生体系国家，如英国， 使用低成本生物仿制药可以确保更多患者 接受有效药物的治疗。但是，在大部分药品 费用由第三方支付方承担的国家，如美国，通 过使用生物仿制药代替生物原研药，个体患 者应以一种较低或免除共付额的形式获得减 少的财务负债。

Jonathan Kay

Division of Rheumatology, Department of Medicine, UMass Memorial Medical Center and University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA.

e-mail:jonathan.kay@umassmemorial.org

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0359-7>

参考文献

1. European Medicines Agency. Centrally authorised biosimilar medicines. EMA [https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field\\_ema\\_web\\_categories%253Aname\\_field/Human/ema\\_group\\_types/ema\\_medicine/field\\_ema\\_med\\_status/authorised-36/ema\\_medicine\\_types/field\\_ema\\_med\\_biosimilar/search\\_api\\_aggregation\\_ema\\_medicine\\_types/field\\_ema\\_med\\_biosimilar](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicine/field_ema_med_status/authorised-36/ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar/search_api_aggregation_ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar) (2019).
2. US Food & Drug Administration. Biosimilar product information. FDA <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-product-information> (2019).
3. Dorner, T. & Kay, J. Biosimilars in rheumatology: current perspectives and lessons learnt. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 713–724 (2015).
4. Goll, G. L. et al. Long-term efficacy and safety of biosimilar infliximab (CT-P13) after switching from originator infliximab: open-label extension of the NOR-SWITCH trial. *J. Intern. Med.* **285**, 653–669 (2019).
5. Glinborg, B. et al. To switch or not to switch: results of a nationwide guideline of mandatory switching from originator to biosimilar etanercept. One-year treatment outcomes in 2061 patients with inflammatory arthritis from the DANBIO registry. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 192–200 (2019).
6. Gasteiger, C. et al. The effects of message framing on patients' perceptions and willingness to change to a biosimilar in a hypothetical drug switch. *Arthritis Care Res.* <https://doi.org/10.1002/acr.24012> (2019).
7. Jørgensen, K. K. et al. Switching from originator infliximab to biosimilar CT-P13 compared with maintained treatment with originator infliximab (NOR-SWITCH): a 52-week, randomised, doubleblind, non-inferiority trial. *Lancet* **389**, 2304–2316 (2017).
8. Rådet for Anvendelse af Dyr Sygehusmedicin. RADS anbefaling vedrørende brug af biosimilært infliximab og etanercept [RADS recommendation regarding the use of biosimilar infliximab and etanercept]. *regioner.dk* <https://www.regioner.dk/media/3488/rads-notatom-anvendelsen-af-biosimilaere-juni-2016.pdf> (2016).
9. Tweehuysen, L. et al. Open-label, non-mandatory transitioning from originator etanercept to biosimilar SB4: six-month results from a controlled cohort study. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1408–1418 (2018).

利益冲突

J.K. has received research support (paid to the University of Massachusetts Medical School) from Gilead Sciences, Pfizer and UCB and has served as a consultant to Alvotech Suisse, Boehringer Ingelheim, Celltrion Healthcare, Horizon Therapeutics, Kolon TissueGene, Merck Sharp & Dohme, Mylan, Novartis, Pfizer, Samsung Bioepis, Sandoz and UCB.

翻译: 葛莹莹 (北京大学人民医院)

审校: 穆 荣 (北京大学人民医院)

## SYNOVIAL TISSUE IN 2019

## 下一代分析技术对滑膜组织结构的解析

## Next-generation analysis of synovial tissue architecture

Douglas J. Veale 和 Ursula Fearon

滑膜是炎性关节炎主要的受累组织，如类风湿关节炎和银屑病关节炎等疾病。2019年，用于检测特定细胞亚群分子特征的新技术使我们对滑膜的结构有了新的理解，包括淋巴细胞聚集、巨噬细胞浸润和滑膜成纤维细胞亚群等方面。

2019年，在组织及单细胞水平上<sup>[4]</sup>，新技术的应用使得我们对滑膜中浸润的炎症细胞<sup>[2]</sup>及病理性驻留细胞亚群<sup>[3]</sup>有了新的认识<sup>[1]</sup>。部分发现和银屑病关节炎<sup>[2]</sup>及类风湿关节炎<sup>[3,4]</sup>的诊断、疾病活动度及预后评估有关，为我们绘制了下一代组织分析技术影响临床观念的蓝图（图1）。

早在上个世纪90年代，类风湿关节炎及银屑病关节炎中滑膜结构的差异就被描述过<sup>[5,6]</sup>，主要包括在类风湿关节炎滑膜中浸润的巨噬细胞更多，滑膜内层增生更加明显，而在银屑病关节炎中血管增生更明显<sup>[5,6]</sup>。在那时并没有认为两种疾病所浸润的T细胞及B细胞有不同，并且当时T细胞标志物及对T细胞亚群的了解都非常有限<sup>[7]</sup>。随后的研究发现，银屑病关节炎患者外周血中CD8<sup>+</sup>T细胞的数量普遍增加<sup>[8]</sup>，且关节液中产生IL-17A的CD8<sup>+</sup>细胞增加，但直到2019年Wade等人<sup>[2]</sup>的研究才从单细胞的水平上描述了银屑病关节炎滑膜组织中的细胞情况。

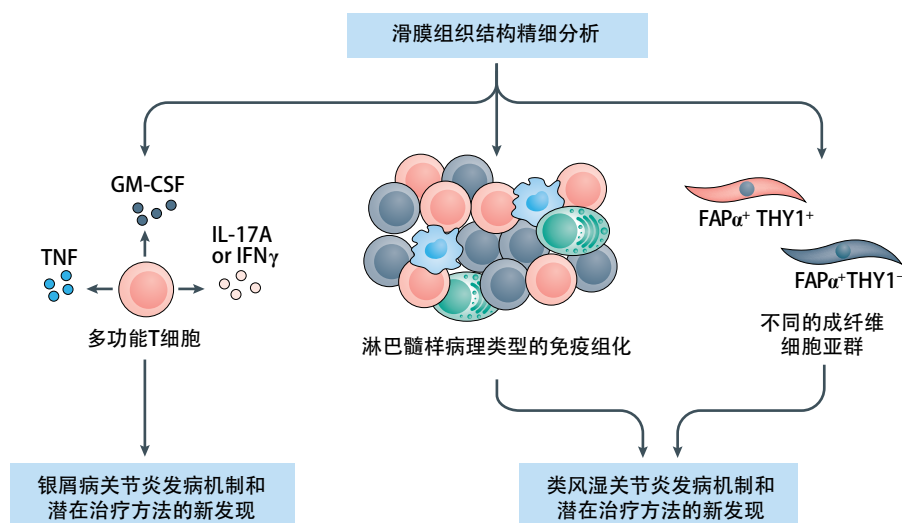
Wade等人<sup>[2]</sup>检测了从银屑病关节炎滑膜组织中分离出的T细胞，发现一种特殊的多功能T细胞亚群富集。这些CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>T细胞表达多种细胞因子，包括IL-17A、IFN $\gamma$ 、TNF和粒-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）。与产生单一细胞因子的T细胞不同，三阳性T细胞（表达GM-CSF、TNF和IL-17或IFN $\gamma$ ）的数量与银屑病关节炎疾病活动度评分（DAPSA）等临床疾病活动性评价指标呈正相关。此外，银屑病关节炎滑膜组织单细胞悬液体外培养中，

磷酸二酯酶4抑制剂（一种被批准用于治疗银屑病关节炎药物）可以抑制多功能T细胞（GM-CSF<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>），而对产生单一细胞因子的T细胞无影响。这项研究<sup>[2]</sup>首次详细报道了从银屑病关节炎滑膜组织分离出的T细胞单细胞分析得到的亚群表型特征，并证明上述多功能T细胞在组织炎症部位富集。这些T细胞与DAPSA评分和体外治疗的反应强相关，从而在银屑病关节炎中引入了可以同时阻断多条炎症途径的伴随治疗或辅助治疗的概念。

虽然对于滑膜中浸润的淋巴细胞及其分泌的细胞因子的研究已经为类风湿关节炎及银屑病关节炎许多成功的靶向治疗提供了依据，但是到目前为止，滑膜组织常驻细胞在炎症和损伤中的作用尚不清楚。2019年，

Croft等人<sup>[3]</sup>的一项研究提供了迄今为止对类风湿关节炎滑膜组织中成纤维细胞亚群最全面的分析。在这项研究中<sup>[3]</sup>，作者使用前沿技术，如质谱流式和单细胞RNA测序来研究人类风湿性关节炎滑膜组织中分离出的成纤维细胞，并在体外实验和在炎性关节炎小鼠模型中进行的体内实验中证实了他们的发现。

在一系列复杂但设计明确的研究中，Croft等人<sup>[3]</sup>描述了一个独特的成纤维细胞亚群，该亚群在类风湿关节炎患者中具有致病性。通过单细胞转录分析发现根据胸腺细胞抗原1（THY1）的表达情况可以将成纤维细胞活化蛋白- $\alpha$ （FAP $\alpha$ ）阳性的滑膜成纤维细胞分成两个独立的群体。FAP $\alpha$ <sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>成纤维细胞位于滑膜组织的亚内层，并表现



**图1 滑膜组织结构精细分析的进展。**在银屑病关节炎滑膜组织中，特定的致病的T细胞亚群可以产生促炎细胞因子组合，这些细胞因子的产生与疾病活动性评分相关，并可被磷酸二酯酶抑制剂4抑制。在类风湿关节炎滑膜中，基线病理类型可以预测那些12个月后有病情较重的患者，而滑膜成纤维细胞亚群具有特定的组织定位和非重叠的致病功能，可能成为新的治疗策略的靶点。FAP $\alpha$ ，成纤维细胞活化蛋白- $\alpha$ ；GM-CSF，粒-巨噬细胞集落刺激因子；THY1，胸腺细胞抗原1。

## 关键进展

- 单细胞分析发现, 银屑病关节炎患者滑膜组织中的多功能 T 细胞亚群可以产生多种促炎细胞因子, 并与疾病活动性有关<sup>[2]</sup>。
- 单细胞分析发现, 类风湿关节炎滑膜组织中具有不同致病作用的成纤维细胞亚型, 这表明选择性靶向这些细胞可能代表着一种新的治疗策略<sup>[3]</sup>。
- 早期关节炎的滑膜病理类型和 RNA 测序结果可以预测出需要生物 DMARDs 进行治疗的持续性侵蚀性类风湿关节炎<sup>[4]</sup>。

出免疫效应功能, 而  $FAP\alpha^+ THY1^-$  成纤维细胞仅位于滑膜组织的内层, 并与侵袭、破坏表型相关。这些成纤维细胞亚群在解剖位置上不同, 并且具有不重叠的细胞功能:  $FAP\alpha^+ THY1^-$  成纤维细胞对软骨和骨造成损伤, 而  $FAP\alpha^+ THY1^+$  成纤维细胞通过产生促炎的细胞因子和趋化因子来调节炎症。这些不同的功能在调节类风湿关节炎的炎症和组织损伤的细胞治疗产生重要的影响。Croft 等人<sup>[3]</sup>的发现表明在包括类风湿关节炎在内的多种疾病中, 选择性地去除或靶向间质细胞特定亚群的新疗法可能是合理的。

2019 年的另一项研究发现<sup>[4]</sup>, 类风湿关节炎诊断时的滑膜组织样本分析可以预测哪些患者需要在 12 个月时使用生物 DMARDs。Lliso-Ribera 等人<sup>[4]</sup>检测了 200 名符合 1987 年美国风湿病协会<sup>[9]</sup>和 2010 年美国风湿病学会 (ACR)-EULAR<sup>[10]</sup>类风湿关节炎分类标准的未经治疗的早期患者的滑膜组织, 以确定从未分化关节炎过渡到类风湿关节炎的预测因素。为此, 他们按照先前描述的类风湿关节炎病理类型 (寡免疫型、

弥漫性髓样型和淋巴髓样型), 根据滑膜结构的不同将样本分组, 并进行 RNA 测序来研究滑膜的基因特征, 他们发现在预测模型中纳入滑膜组织病理类型和分子分析结果, 比 1987 年的分类标准<sup>[9]</sup>提高了诊断的敏感性和特异性, 并能够预测此后需要生物治疗的患者, 而与病程无关。

迄今为止, Lliso-Ribera 等人<sup>[4]</sup>的研究是关于未分化关节炎及类风湿关节炎的临床表型、滑膜组织病理学和分子基因特征的最大的一项研究。他们的结果支持在类风湿关节炎患者的治疗决策中参考滑膜组织病理类型, RNA 测序的结果表明病理类型为淋巴髓样型的类风湿关节炎患者比其他病理类型的患者更有可能在接受生物 DMARDs 治疗。淋巴髓样型主要与介导 B 细胞活化、或调节 B 细胞功能的基因上调相关, 包括 *CD79A*、*CD38*、*IGJ*、*CXCL13*、*IRF4*、*CCL19*、*CD38*、*TNFA* 和 *IL6* 等。Lliso-Ribera 等人<sup>[4]</sup>提出, 有效治疗的“机会窗”可能比以前提出的更宽 (即为 12 个月, 而非 6 个月), 并且根据起病时的滑膜病理生物学亚型对患者进行分层, 可能会改变预后不良患者的治疗选择。不过虽然作者预测了类风湿关节炎患者在 12 个月时是正接受传统 DMARDs 还是生物 DMARDs 治疗, 但这些患者对治疗的反应目前尚不清楚。

总之, 2019 年的研究证明, 随着获得滑膜组织样本技术的更新<sup>[4]</sup>, 以及在单细胞水平上分析从滑膜组织中分离出的细胞亚群技术的快速进展<sup>[2,3]</sup>, 使我们能够在疾病早期对炎性关节炎患者进行分类和分层, 这将极大的推进精准医学的发展。

Douglas J. Veale<sup>1,2\*</sup> and Ursula Fearon<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>The Centre for Arthritis and Rheumatic Disease, St. Vincent's University Hospital, Dublin, Ireland.

<sup>2</sup>Department of Medicine, University College Dublin, Dublin, Ireland.

<sup>3</sup>Molecular Rheumatology, School of Medicine, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland.

\*e-mail:douglas.veale@ucd.ie

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0357-9>

## 参考文献

1. Orr, C. et al. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 463–475 (2017).
2. Wade, S. M. et al. Association of synovial tissue polyfunctional T cells with DAPSA in psoriatic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 350–354 (2019).
3. Croft, A. P. et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* **570**, 246–251 (2019).
4. Lliso-Ribera, G. et al. Synovial tissue signatures enhance clinical classification and prognostic/treatment response algorithms in early inflammatory arthritis and predict requirement for subsequent biological therapy: results from the pathobiology of early arthritis cohort (PEAC). *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1642–1652 (2019).
5. Veale, D. et al. Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 893–900 (1993).
6. Veale, D. J. & Fearon, U. The pathogenesis of psoriatic arthritis. *Lancet* **391**, 2273–2284 (2018).
7. Costello, P. J. et al. Psoriatic arthritis joint fluids are characterized by CD8 and CD4 T cell clonal expansions appear antigen driven. *J. Immunol.* **15**, 2878–2886 (2001).
8. Diani, M. et al. Increased frequency of activated CD8(+) T cell effectors in patients with psoriatic arthritis. *Sci. Rep.* **9**, 10870 (2019).
9. Arnett, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315–324 (1988).
10. Aletaha, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1580–1588 (2010).

## 利益冲突

The authors declare no competing interests.

翻译: 李 婷 (北京大学人民医院)

审校: 穆 荣 (北京大学人民医院)



## DATA ANALYSIS IN 2019

## 风湿病学中的机器学习及临床应用

## Machine learning in rheumatology approaches the clinic

Aridaman Pandit 和 Timothy R. D. J. Radstake

机器学习和高通量技术为风湿病患者的分类、诊断和治疗带来了希望，最终达到精准医学的目的。2019年的几项研究强调了在风湿病学中使用机器学习对患者进行分层和/或预测治疗反应的可行性和临床实用性。

临床研究中，大数据的增长和计算方法的进步为复杂疾病的研究开辟了新的途径。因此，风湿病学正在经历一场变革，在这场变革中，高通量技术和机器学习有望改善患者分类、促进早期诊断、并且预测患者药物疗效，最终达到精准医学的目的。可以合理地设想，在未来的十年或二十年内，临床诊断可能主要使用廉价、易用、小型化的高通量技术和精准的机器学习模型。尽管如此，机器学习在风湿病学中的应用依然受到一定的阻碍，这些阻碍主要与风湿病学的复杂性与异质性、队列规模较小和不同分子、临床因素的影响大小不同有关<sup>[1]</sup>。尽管如此，2019年仍见证了机器学习在风湿病学临床应用方面的若干个重大科学进展<sup>[2-4]</sup>。

对类风湿关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、幼年特发性关节炎和系统性硬化病这些风湿性疾病而言，每个患者的疾病表现、进展、表型和治疗反应都各不相同。这种异质性使得临床医生很难成功治疗患者、预测治疗结果并提供最佳护理。为了减少风湿性疾病的社会负担和改善患者的生活质量，决定给患者何种药物、多久疗程是十分重要的。但实际上，由于疾病的异质性和多种药物的可用性，不同的风湿性疾病都是使用试错法来发现哪种药物疗效好、不良反应少。显然，这并不是最理想的方法。

在 RA 患者中，对一线治疗反应不佳的患者通常会改用肿瘤坏死因子 (TNF) 抑制剂，比如阿达木单抗、依那西普和英夫利昔单抗。在过去的十年中，一些成功的研究强调了基因和表观遗传的生物标志物可以

用来预测 RA 患者的治疗反应。2019年，Kim 等人<sup>[2]</sup>通过整合 11 个不同的公开可用数据集，对 RA 患者滑膜转录组学图谱进行了荟萃分析，并将其与来自骨关节炎或健康人群的资料进行比较。使用无监督的机器学习方法 [非负矩阵分解 non-negative matrix factorization (NMF)] 在超过 11000 个基因中筛选，Kim 等人最终确定了 3 组 RA 患者<sup>[2]</sup>。这三组 RA 患者在几个关键、靶向的信号通路基因富集方面存在差异，包括核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、I 型和 II 型干扰素、TT 细胞受体、JAK-STAT 轴和 TNF。研究人员进一步表明，参与这些信号通路的某些基因激活的差异，可以高准确性地预测患者对英夫利昔单抗的治疗反应。因此，Kim 等人的研究强调，从受影响组织获得的转录组学图谱可以用于患者的分层，并预测治疗反应<sup>[2]</sup>。

考虑到预测 TNF 抑制剂治疗 RA 效果的需要，基因逆向工程评估与方法对话平台 (the Dialogue on Reverse Engineering Assessment and Methods, DREAM) 将这一挑战众包成了一项公开竞赛，DREAM 的目的是：通过预测 RA 有效者的挑战，来促进使用基因数据预测 TNF 抑制剂反应的方法发展和标准化<sup>[5]</sup>。这项挑战包括了来自欧洲的 13 个不同队列的大约 2700 名个体。

在 2019 年，Guan 等人<sup>[3]</sup>通过构建机器学习模型，预测患者 28 个关节疾病活动度评分 (DAS28) 的变化和对 TNF 抑制剂的反应 (阿达木单抗、依那西普、赛妥珠单抗和英夫利昔单抗)，最终赢得了这项挑战。作为

挑战的一部分，Guan 和同事训练了一个贝叶斯 [高斯过程回归 (GPR)] 的模型，该模型基于 1892 例患者的临床和基因学特征，并在另外 680 例患者的数据上进行了重复性测试。有趣的是，基线 DAS28 评分比基因生物标志物能更好地预测治疗反应<sup>[3]</sup>，而基因生物标志物提高了模型的预测准确性。因此，这项研究表明，基因上的异质性，加上强有力的临床评估，可以共同用于改良 RA 患者的治疗策略。

JIA 是一种涉及关节炎的异质性儿童疾病。在 2019 年，Eng 等人<sup>[4]</sup>利用关节受累模式的不同和机器学习方法 (稀疏约束的多层非负矩阵分解, sparse multilayer non-negative matrix factorization) 将 JIA 患者分为多组，并开发了一个模型来更好地预测 JIA 的病程<sup>[4]</sup>。为此，对 640 例未接受治疗的 JIA 患者进行了关节体检，并随访了五年。为了确定疾病病程是否会因受累关节的不同而有所差异，640 例患者根据受累关节的局部程度被进一步分为三组：局限型 (> 90%; n=395)，部分局限型 (60 ~ 90%，

## 关键进展

- 滑膜转录组学分析和基于机器学习方法可以为类风湿关节炎患者分亚群，并可引入预测 TNF 抑制剂治疗反应的模型<sup>[2]</sup>。
- 作为众包公开竞争的一部分，基于机器学习的模型可以预测疾病活动度的变化以及 RA 患者的治疗反应<sup>[3]</sup>。
- 通过对受累关节模式的分析和基于机器学习的方法，可以开发出可以预测幼年特发性关节炎患者病程的模型<sup>[4]</sup>。

n=124) 或扩大型 (< 60%, n=157)。此后, 使用多变量 COX 比例风险模型对各组受累关节归零的时间进行建模。有趣的是, 那些膝关节受累的患者中至少有一半在 6 个月后达到关节零受累, 而那些骨盆带、手腕、脚趾或脚踝受累患者中大多数都要 1 年时间才能达到这个终点<sup>[4]</sup>。主要累及手指或者被归为隐匿受累的患者对治疗最为抵抗, 因为这些患者分别在 18 个月或 > 3 年的时间才达到这个终点。这些结果在 119 例患者的独立复制队列中得到证实。综上所述, 这个研究强调了关节受累的位置对预后的重要性, 并证明了收集确切的关节数据, 将其与机器学习方法的结合有助于对 JIA 患者的治疗方案做出决定<sup>[4]</sup>。

总的说来, 这些论文表明, 对风湿性疾病患者临床和分子数据的收集, 随后通过计算建模技术对这些数据进行质证, 可以增强临床决策的能力<sup>[2-4]</sup> (图 1)。实时的患者队列或临床试验中有大量的被收集数据, 因此,

机器学习的临床应用在未来几年内可能会进一步增加, 并很快以精准医学的形式普及到常规的患者护理中<sup>[6]</sup>。为了实现精准医学在风湿性疾病上普及的未来, 临床数据应该面向更为广泛的研究群体<sup>[7,8]</sup>。DREAM: RA 反应者的预测挑战就是这种方法的一个重要例子<sup>[3]</sup>。这一挑战使得基准的大型临床和分子数据集的利用得以实行, 并使更多的研究团体可以开发和测试多种机器学习方法。测试机器学习和人工智能的基准方法应该在风湿病学研究中推广, 以获得高预测精度和可重复性的最佳模型<sup>[8]</sup>。这种方法对于获得有力、可复制的机器学习模型至关重要。这些模型可以提高风湿性疾病患者的生活质量, 并在最佳的时机, 为患者提供最佳疗程的最佳药物。

Aridaman Pandit\* and Timothy R. D. J. Radstake\*  
 Division Internal Medicine and Dermatology and  
 Centre for Translational Immunology, University  
 Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands.  
 e-mail: A.Pandit@umcutrecht.nl;  
 tradstake73@gmail.com

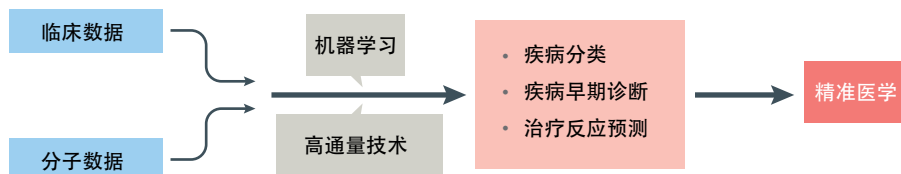


图 1 机器学习用于风湿疾病的精准医学。高通量技术和机器学习算法的进步使研究人员能够进行整合临床数据和分子数据以精准医学的形式进行常规的患者护理。

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0361-0>

参考文献

1. Sieberts, S. K. et al. Crowdsourced assessment of common genetic contribution to predicting anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* **7**, 12460 (2016).
2. Kim, K. J. et al. Compendium of synovial signatures identifies pathologic characteristics for predicting treatment response in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Immunol.* **202**, 1–10 (2019).
3. Guan, Y. et al. Machine learning to predict anti-TNF drug responses of rheumatoid arthritis patients by integrating clinical and genetic markers. *Arthritis Rheum.* **71**, 1987–1996 (2019).
4. Eng, S. W. M. et al. Patterns of joint involvement in juvenile idiopathic arthritis and prediction of disease course: a prospective study with multilayer non-negative matrix factorization. *PLoS Med.* **16**, e1002750 (2019).
5. Plenge, R. M. et al. Crowdsourcing genetic prediction of clinical utility in the Rheumatoid Arthritis Responder Challenge. *Nat. Genet.* **45**, 468–469 (2013).
6. Topol, E. J. High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nat. Med.* **25**, 44–56 (2019).
7. Kedra, J. et al. Current status of use of big data and artificial intelligence in RMDs: a systematic literature review informing EULAR recommendations. *RMD Open* **5**, e001004 (2019).
8. Gossec, L. et al. EULAR points to consider for the use of big data in rheumatic and musculoskeletal diseases. *Ann. Rheum. Dis.* <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215694> (2019).

致谢

The work of A.P. is supported by Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) (Grant number 016.Veni.178.027).

利益冲突

The authors declare no competing interests.

翻译: 蚁梓希 (北京大学人民医院)  
 审校: 穆 荣 (北京大学人民医院)

## PAIN IN 2019

## 风湿病学中阿片类药物的安全使用

## Towards defining the safer use of opioids in rheumatology

Seoyoung C. Kim 和 Daniel H. Solomon

风湿病患者普遍使用阿片类处方药物。2019 年的研究报告了类风湿关节炎及骨关节炎患者使用阿片类药物的趋势和安全性。风湿病学家必须优先考虑控制原发病。如果没有更好的长期安全性和有效性数据，阿片类药物的使用通常应该受到限制。

尽管证明阿片类药物对慢性非癌疼痛有效的证据有限，但其在风湿性疾病患者中的使用有所增加。一项 2018 年阿片类药物治疗慢性非癌性疼痛随机对照试验的荟萃分析显示，与安慰剂相比，使用阿片类药物的患者在疼痛和身体功能方面的改善在统计学上有显著性差异，但无临床差异<sup>[1]</sup>。2019 年的三项研究探索了类风湿关节炎或骨关节炎患者使用阿片类药物的趋势和安全性<sup>[2-4]</sup>。

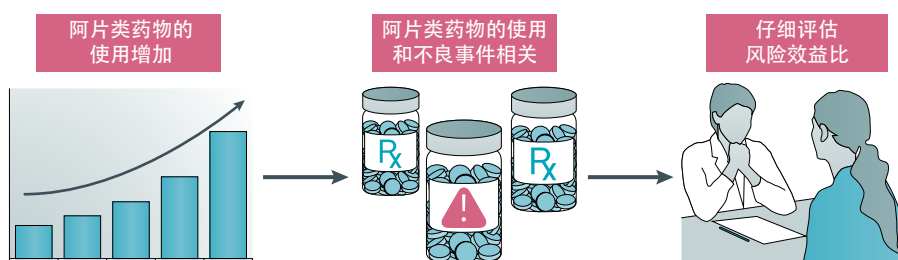
为了明确类风湿关节炎患者长期使用阿片类药物的概率及预测因素，Lee 等人<sup>[2]</sup>在美国 CORRONA 登记的类风湿关节炎患者中进行了一项队列研究，阿片类药物的长期使用率（定义为在  $\geq 2$  次连续研究访问期间报告的任何阿片类药物使用）从 2002 年的 7.4% 增加了一倍多，达到 2015 年的 16.9%。这一趋势与阿片类药物在普通人群中的流行有关，但也与越来越多生物或靶向合成 DMARDs 用于治疗类风湿关节炎治疗的时期一致。Corrona 登记的患者类风湿关节炎疾病活动度中度 [中位临床疾病活动度指数 (CDAI) 评分为 9.2]，40.4% 的患者使用生物制剂，27.1% 的患者使用糖皮质激素。长期使用阿片类药物的风险增加与患者基线特征相关，如剧烈疼痛 (HR 2.53; 95% 置信区间 2.19–2.92)，抗抑郁药使用 (HR 1.79; 95% 置信区间 1.64–1.92)，高疾病活动度 (HR 1.55; 95% 置信区间 1.30–1.84) 和严重残疾 (HR 1.45; 95% 置信区间 1.27–1.65)。随着大量有效的生物或靶向合成类风湿关节炎药物的出现，风湿病学家或临床医生应该通过更有针对性的治疗来更好地控制类风湿关节炎

疾病活动，从而减少类风湿关节炎患者使用慢性阿片类药物。然而，这项研究也强调了更好地管理非炎症性疼痛和抑郁的重要性。

使用阿片类药物在中度至重度膝关节或髌关节骨关节炎患者中也很常见。在过去十年中，人们为减少阿片类药物的使用，防止用药过量及阿片类药物相关的其他危害进行了许多努力，包括国家政策、治疗指南和指定措施。在一项对患有膝关节或髌关节骨关节炎的美国老年退伍军人（平均年龄 63 岁）的实验研究中，Trentalange 等人<sup>[3]</sup>研究发现，在 2013 年实施退伍军人健康管理局阿片类药物安全倡议 (OSI) 后，总镇痛药处方率下降了 30.6%，阿片类药物处方率下降了近一半 (47.8%)。观察到阿片类药物处方的减少部分与其他止痛药处方的增加有关，包括薄荷醇（含水杨酸盐和不含水杨酸盐）、辣椒素和局部麻醉剂，但不包括非甾体抗炎药。值得注意的是，Trentalange 等人没有发现患者报告的总体疼痛强度增加。这项研究支持规范阿片类药物处方倡议的有效性，并提示限制 OA 患者使用阿片类药物不会加重患者的疼痛。此外，一些研究表明术前使用阿片类药物对全关节置换术后的预后不利影

响。一项来自美国的 OA 患者（平均年龄 74 岁）队列研究显示，在全膝关节置换术 (TKR) 前一年，7.2% 的患者持续使用阿片类药物，51.0% 的患者间断使用阿片类药物<sup>[5]</sup>。住院死亡率、30 天死亡率和其他不良结局在持续用药者中比非用药者中更常见<sup>[5]</sup>。这项研究提出了一个问题，即减少术前阿片类药物的使用是否可以降低全膝关节置换术后并发症的发生率。尽管此研究的观察性设计使得难以确定持续阿片类药物使用者和非持续使用者之间基线特征的差异，或阿片类药物使用本身的差异在多大程度上可能导致长期阿片类药物使用者手术后预后更差，但术前阿片类药物的使用可能有助于预测骨关节炎患者全膝关节置换术不良预后的风险。

曲马多是一种  $\mu$ -阿片受体激动剂，广泛用于治疗急性和慢性疼痛，因为它通常被认为是一种弱阿片药物，具有相对较低的依赖性和其他副作用。此外，曲马多在 2013 年美国骨科医师学会指南中被强烈推荐，并在 2012 年美国风湿病学会指南中被推荐用于有症状的膝关节 OA<sup>[6,7]</sup>。值得注意的是，2019 年骨关节炎研究学会国际指南不推荐应用口服或透皮阿片类药物治疗骨关节炎<sup>[8]</sup>。



**图 1 2019 年阿片类药物使用趋势和安全性。** 在类风湿关节炎和骨关节炎患者中，阿片类药物的使用越来越多，并且具有潜在的危害。改变处方模式可以降低这些风险。



### 关键进展

- 在美国，类风湿关节炎患者阿片类药物的长期使用率从2002年的7.4%翻了一番，达到2015年的16.9%<sup>[2]</sup>。
- 基于指南的阿片类药物安全倡议的实施使得骨关节炎中阿片类药物处方率的降低，而患者报告的疼痛强度没有变化<sup>[3]</sup>。
- 与非甾体抗炎药相比，在患有骨关节炎的老年患者中，曲马多的使用与更高的死亡率相关<sup>[4]</sup>。

基于英国的队列研究，Zeng 等人<sup>[4]</sup>探索了曲马多在骨关节炎患者中的安全性。使用来自健康改善网络数据库的数据，他们纳入了88,902例骨关节炎患者，平均年龄为70.1岁（标准差为9.5岁）。与使用非甾体抗炎药（萘普生、双氯芬酸、塞来昔布或依托考昔）的患者相比，初始使用曲马多的患者通常年龄较大，肥胖比例较高，骨关节炎持续时间较长，共病数量较多。为了控制组间差异，初始使用非甾体抗炎药或可待因（另一种弱阿片类药物）治疗的患者与初始使用曲马多患者的比例设为1:1。在1年的随访期内，使用曲马多的患者的死亡率比使用非甾体抗炎药高1.7~2倍。而使用曲马多和可待因的患者死亡率相似。虽然曲马多可能增加死亡率的确切机制尚不清楚，但曲马多对血

清素能和去甲肾上腺素能神经传递具有独特作用，特别是同时使用酒精或其他中枢神经系统抑制剂时，可能导致严重的安全事件，包括低血糖、骨折和死亡<sup>[9,10]</sup>。Zeng 等人的研究强调了使用阿片类镇痛药物包括弱阿片类曲马多需谨慎，尽管曲马多的使用与死亡风险增加之间是否存在因果关系仍未明确。

总之，慢性阿片类药物使用在风湿性疾病患者中很常见，包括类风湿关节炎和骨关节炎。在此强调的2019年三项研究增加了我们对类风湿关节炎或骨关节炎患者阿片类药物的使用趋势和对潜在危害的理解。虽然阿片类药物可能是某些严重疼痛患者的唯一选择，这些患者其他止痛剂存在禁忌，临床医生应仔细评估患者的情况，讨论阿片类止痛药的潜在益处和风险，并提出控制疼痛的替代方法（例如，更好地控制RA疾病活动、抑郁或其他疼痛原因）。越来越多的患者应意识到阿片类药物的风险，应该积极参与到关节炎的整体治疗中，包括疼痛管理。（图1）

Seoyoung C. Kim \* and Daniel H. Solomon  
Division of Pharmacoepidemiology and  
Pharmacoeconomics and Division of Rheumatology,  
Inflammation and Immunity, Brigham and Women's  
Hospital and Harvard Medical School,  
Boston, MA, USA.

e-mail: sykim@bwh.harvard.edu

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0360-1>

### 参考文献

1. Busse, J. W. et al. Opioids for chronic noncancer pain: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **320**, 2448–2460 (2018).
2. Lee, Y. C. et al. Chronic opioid use in rheumatoid arthritis: prevalence and predictors. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 670–677 (2019).
3. Trentalange, M. et al. Analgesic prescribing trends in a national sample of older veterans with osteoarthritis: 2012–2017. *Pain* **160**, 1319–1326 (2019).
4. Zeng, C. et al. Association of tramadol with all-cause mortality among patients with osteoarthritis. *JAMA* **321**, 969–982 (2019).
5. Kim, S. C. et al. Association of preoperative opioid use with mortality and short-term safety outcomes after total knee replacement. *JAMA Netw. Open* **2**, e198061 (2019).
6. Hochberg, M. C. et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res.* **64**, 465–474 (2012).
7. Jevsevar, D. S. et al. The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on: treatment of osteoarthritis of the knee, 2nd edition. *J. Bone Joint Surg. (Am.)* **95**, 1885–1886 (2013).
8. Bannuru, R. R. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **27**, 1578–1589 (2019).
9. Fournier, J. P. et al. Tramadol use and the risk of hospitalization for hypoglycemia in patients with noncancer pain. *JAMA Intern. Med.* **175**, 186–193 (2015).
10. Vestergaard, P., Rejnmark, L. & Mosekilde, L. Fracture risk associated with the use of morphine and opiates. *J. Intern. Med.* **260**, 76–87 (2006).

### 致谢

S.C.K. is supported by NIH grants R01AR069557 and R01AR073314. D.H.S. is supported by NIH grants U01AR068043 and R01HL119718.

### 利益冲突

The authors declare no competing interests.

翻译：蔡如意（北京大学人民医院）  
审校：穆荣（北京大学人民医院）

# NETs 在风湿病中大行其道

## NETs spread ever wider in rheumatic diseases

Gustaf Wigerblad 和 Mariana J. Kaplan

慢性炎症过程中，中性粒细胞细胞外诱捕网 (NETs) 的形成和 / 或清除障碍很容易造成免疫失调以及器官损害。早在 2019 年，就有多篇研究表明一些自身免疫病易感基因可以引发 NETs 介导的炎症，并且进一步阐述了 NETs 在血管损伤和不稳定动脉粥样硬化斑块中的作用。

过去的十年里，很多研究都在强调中性粒细胞在各种疾病中的重要作用。NETs 是中性粒细胞的一种生命活动，即中性粒细胞向胞外释放出核酸、组蛋白和颗粒蛋白。正常情况下机体通过产生 NETs 抵御微生物的入侵，但在病理情况下，NETs 与癌症、动脉粥样硬化以及自身免疫病的发生息息相关<sup>[1]</sup>。NETs 的过度产生、清除障碍和 / 或其内容物 (蛋白质、核酸) 的修饰会引起免疫失调，自身抗原修饰和外化，以及组织损伤。尽管我们对 NETs 产生的分子机制有了更深入的了解，但仍有许多问题有待解决，包括 NETs 在慢性炎症中的具体作用，NETs 形成和清除所涉及的遗传、表观遗传因素和信号通路，以及如何通过药物要改善 NETs 的失调。

2019 年，在研究自身免疫<sup>[2]</sup>和自身炎症疾病<sup>[3]</sup>中 NETs 异常形成的遗传机制方面取得了一些进展。此外，“NETs 如何破坏血管系统”的新机械论观点，很大程度上加深了我们对中性粒细胞在动脉粥样硬化<sup>[4]</sup> (增加自身免疫病患者的发病率和死亡率的一种疾病) 中所起作用的理解 (图 1)。

肽精氨酸脱羧酶 4(PAD4) 对蛋白质的异常修饰已被证实与癌症、多发性硬化症和类风湿关节炎 (RA) 等多种疾病的发病机制有关。PAD4 在包括中性粒细胞在内的髓系细胞中高度表达，同时在实验条件下参与 NET 的形成<sup>[5]</sup>。PADI4 (编码 PAD4 蛋白的基因) 中单核苷酸的多态性对增加 RA 发病风险的影响尚不清楚<sup>[6]</sup>。Odqvist 等人<sup>[2]</sup>在 2019 年

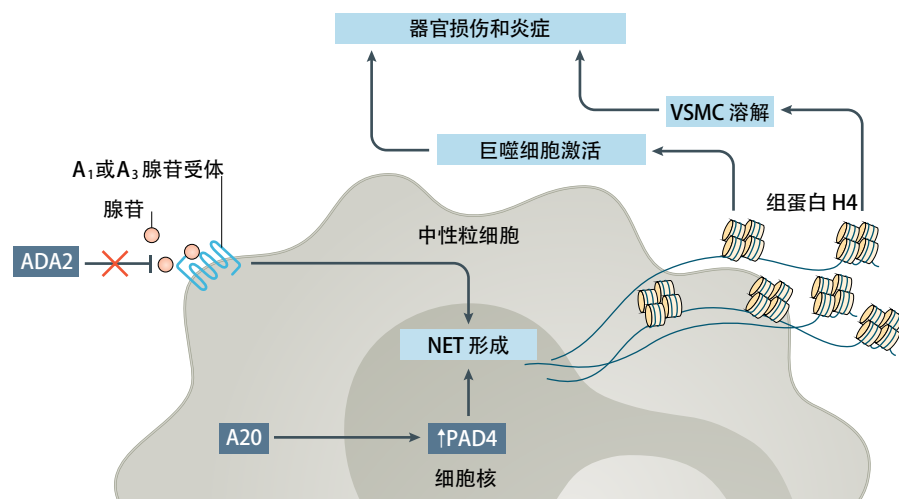
的一项研究中报道了 A20 蛋白的去泛素化酶 (DUB) 结构域、PADI4 基因的调控以及系统性红斑狼疮 (SLE) 的患病风险三者之间的遗传联系。A20 蛋白是转录因子 NF- $\kappa$ B 的负性调控因子，而之前的研究已证实 A20 蛋白 DUB 结构域的遗传变异会增加 RA 或 SLE 患病风险<sup>[2]</sup>。然而，Odqvist 等人<sup>[2]</sup>对携带某种 A20 变异基因的小鼠和人类髓系细胞做测验时，并未检测到异常的 NF- $\kappa$ B 信号。通过对 A20 DUB 结构域突变细胞的转录组进行分析，Odqvist 等人<sup>[2]</sup>发现：与野生型相比，A20 DUB 突变细胞中的 PADI4 表达上调，并且这种上调与 PAD4 酶活性增加有关，所以可以通过蛋白质瓜氨酸化来定量 PADI4 基因的表达。参了 A20 DUB 突变的中性粒细胞在收到刺激时会生成大量的 NETs。携带 A20DUB 突变体的 SLE 患者比没有该突变体的 SLE 患者更可能产生针对瓜氨酸蛋白的自身抗体，尽管该自身抗体通常被认为是 RA 所特有，而在 SLE 中罕见。总的来说，这些发现证实这一观念：某些增加自身免疫病患病风险的遗传突变可能通过调节中性粒细胞产生携带自身抗原 NETs 能力来发挥作用，至少在一定程度上是如此。先前的研究也支持这一观念，该研究表明：PTPN22 基因 (与自身免疫病患病风险增加相关) 的多态性可以调节 PAD4 活性、蛋白瓜氨酸化和 NETs 的形成<sup>[7]</sup>。

Carmona-Rivera 等人<sup>[3]</sup>在 2019 年的一项研究也揭示了炎症性疾病的遗传易感性和中性粒细胞形成 NETs 的能力之间的另一种

联系。腺苷脱氨酶 2 缺乏症 (DADA2) 是由 ADA2 (编码腺苷脱氨酶 2) 基因的功能缺失突变引起的，以严重的系统性血管炎和早发性卒中为特征<sup>[8]</sup>。ADA2 可以降低炎症部位的细胞外腺苷浓度，而 DADA2 患者通常伴有髓系细胞浸润的炎性血管病变。Carmona-Rivera 等人<sup>[3]</sup>在 DADA2 患者胃肠道受累部位获取的组织中发现了中性粒细胞产生 NETs 的证据，并可以说明体外 NETs 生成增加与细胞外腺苷浓度增加相关。腺苷对 NETs 生成增加的影响是通过与中性粒细胞上高亲和力的 A<sub>1</sub> 和 A<sub>3</sub> 腺苷受体结合而介导 NETs 生成的增加，而与低亲和力的 A<sub>2a</sub> 腺苷受体的结合则抑制 NETs 的形成。DADA2 的患者体内形成的 NETs 会促进炎症的发生，因为它们可以激活巨噬细胞中的 NF- $\kappa$ B 途径，进而促进了 TNF (肿瘤坏死因子) 的合成。由于肿瘤坏死因子抑制剂已被证明能有效治疗 DADA2<sup>[3]</sup>，这些发现表明

### 关键进展

- 系统性红斑狼疮 (SLE) 和类风湿性关节炎 (RA) 的遗传风险等位基因的功能上与肽基精氨酸脱氨酶表达增加和中性粒细胞胞外陷阱 (NETs) 形成增强相关<sup>[2]</sup>。
- 对腺苷脱氨酶 2 缺乏症 (DADA2 是一种单基因自身免疫病) 的观点将腺苷代谢与中性粒细胞活化、NETs 形成和致病性炎症级联联系起来<sup>[3]</sup>。
- 存在于 NETs 中的组蛋白 H4 与动脉粥样硬化斑块不稳定有关，而动脉粥样硬化斑块不稳定是类风湿关节炎和系统性红斑狼疮的重要合并症<sup>[4]</sup>。



**图 1 对 NETs 形成及其在疾病状态中的作用的最新观点。** A20 蛋白的遗传变异与自身免疫性疾病的患病风险增加有关，并且还上调中性粒细胞中肽基精氨酸脱亚胺酶 4 (PAD4) 的表达，从而增加中性粒细胞细胞外诱捕网 (NETs) 的形成<sup>[2]</sup>。腺苷脱亚胺酶 2 (ADA2) 缺乏的单基因因血管炎患者体内腺苷代谢失调，通过 A<sub>1</sub> 和 A<sub>3</sub> 腺苷受体导致 NETs 形成增加，并随后激活促炎巨噬细胞<sup>[3]</sup>。NETs 中的组蛋白 H4 导致血管平滑肌细胞 (VSMCs) 溶解，从而导致动脉组织损伤和斑块不稳定性<sup>[4]</sup>。ADA2，腺苷脱亚胺酶 2。

在 DADA2 的致病性炎症级联反应中，腺苷加剧了 NETs 生成的失调。另一篇 2019 年发表的文章支持了腺苷生物学失调与自身免疫和自身炎症的相关性，文章将腺苷通路、NETs 和抗磷脂综合征中的血栓事件联系起来<sup>[9]</sup>。总体而言，尽管这些研究<sup>[3,9]</sup>表明腺苷对中性粒细胞的影响是复杂的且根据不同情况而有所不同，但腺苷可能是炎症疾病中一个有望的药理调节靶点。Silvestre-Roig 等人在 2019 年发表的一篇文章中，对 NETs 在炎症和器官损伤中的作用的理解取得了另一个重要进展。NETs 以前被认为与动脉壁中的免疫反应失调和动脉粥样硬化的发生有关。

Silvestre-Roig 等人<sup>[4]</sup>将 NETs 内容物中的组蛋白与动脉粥样硬化病变（几种自身免疫性疾病的主要并发症，包括 SLE 和 RA）的失稳联系在一起。中性粒细胞能够直接影响动脉粥样硬化斑块中血管平滑肌细胞 (VSMCs) 的存活<sup>[10]</sup>，而 Silvestre-Roig 等人<sup>[4]</sup>认为这可能是破坏斑块稳定性和诱发急性冠状动脉综合征的关键环节。体内和体外研究

表明，血管平滑肌细胞通过趋化因子配体 7 (CCL7) 吸引中性粒细胞。反过来，中性粒细胞在血管内膜生成的 NETs 对血管平滑肌细胞有强烈的细胞毒性作用，从而加剧斑块的不稳定。NETs 的这种细胞毒性作用是由组蛋白 H4 介导的，组蛋白 H4 与血管平滑肌细胞结合，并在其细胞膜上形成孔洞。通过破坏 PAD4 或抑制组蛋白 H4 来阻断 NETs 的形成，可以恢复了高胆固醇血症小鼠中 VSMC 的活力，并增强了血管斑块的稳定性。这些发现<sup>[4]</sup>可以延伸到研究其他中性粒细胞介导的疾病，在这些疾病中，组蛋白可能会对其他靶细胞产生毒性作用。评估特异性的组蛋白翻译后修饰在细胞损伤过程中的作用非常重要，因为这种修饰通常存在于 NETs 中。

总的来说，2019 年的发现为哪些机制促进 NETs 形成以及这些机制如何在人类疾病中发挥作用这一谜题增添了新的线索。我们对炎症性疾病中中性粒细胞失调的遗传决定因素有了更深入的了解<sup>[2,3]</sup>，并揭示了其调节细胞功能的复杂方式（图 1）。此外，

NETs 在血管损伤中的致病作用（在腺苷和组蛋白中）已被更清晰的阐释<sup>[3,4]</sup>，在未来，可能有助于靶向治疗那些增加心血管疾病发生风险的复杂疾病。

Gustaf Wigerblad and Mariana J. Kaplan\*  
Systemic Autoimmunity Branch, Intramural Research Program, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.  
e-mail:mariana.kaplan@nih.gov

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0352-1>

## 参考文献

- Gupta, S. & Kaplan, M. J. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 402–413 (2016).
- Odqvist, L. et al. Genetic variations in A20 DUB domain provide a genetic link to citrullination and neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1363–1370 (2019).
- Carmona-Rivera, C. et al. Deficiency of adenosine deaminase 2 triggers adenosine-mediated NETosis and TNF production in patients with DADA2. *Blood* **134**, 395–406 (2019).
- Silvestre-Roig, C. et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature* **569**, 236–240 (2019).
- Wang, Y. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**, 205–213 (2009).
- Suzuki, A. et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid Nat. *Genet.* **34**, 395–402 (2003).
- Chang, H. H. et al. The W620 polymorphism in PTPN22 disrupts its interaction with peptidylarginine deiminase type 4 and enhances citrullination and NETosis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2323–2334 (2015).
- Zhou, Q. et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N. Engl. J. Med.* **370**, 911–920 (2014).
- Ali, A. A. et al. Adenosine receptor agonism protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Nat. Commun.* **10**, 1916 (2019).
- Knight, J. S. et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ. Res.* **114**, 947–956 (2014).

## 致谢

The work of the authors is supported financially by the Intramural Research Program at the US National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health (to M.J.K.) and by the Swedish Research Council (to G.W.).

## 利益冲突

The authors declare no competing interests.

翻译：袁显墩（北京大学人民医院）

审校：穆荣（北京大学人民医院）



# 肌纤维母细胞的凋亡逃避：纤维化疾病的标志

## Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases

Boris Hinz<sup>1</sup> 和 David Lagares<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

<sup>2</sup>Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Division of Rheumatology, Allergy and Immunology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

<sup>3</sup>Department of Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

<sup>4</sup>Fibrosis Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

\*e-mail: dlagares@mgh.harvard.edu

<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0324-5>

**摘要：**脏器纤维化是自身免疫性风湿性疾病（例如系统性硬化症）的致命性并发症。肌纤维母细胞可引起细胞外基质蛋白的过度合成、沉积和重构，形成瘢痕，从而导致纤维化。我们对肌纤维母细胞保持活化状态和调控细胞功能的机制已取得深入的了解。然而，我们对肌纤维母细胞如何在纤维化组织中持续存在的机制仍然知之甚少。肌纤维母细胞在纤维化微环境中促细胞存活的生物力学和生长因子信号诱导下，通过激活分子机制来逃避凋亡，最终获得衰老表型。越来越多的证据表明，肌纤维母细胞和衰老的肌纤维母细胞并非抗凋亡，而是由于细胞死亡信号通路的同步激活而启动凋亡程序。一旦存活途径被抑制，这些细胞将被推向凋亡。对凋亡启动的了解为更多通过阻断存活机制诱导肌纤维母细胞凋亡，促进衰老的肌纤维母细胞凋亡或促使肌纤维母细胞重新编程为瘢痕清除细胞的新的靶向治疗铺平了道路。这些新的治疗策略不仅可以阻止组织纤维化的进展，而且还有可能逆转已形成的纤维化和促进慢性损伤组织再生。

脏器纤维化是自身免疫性风湿性疾病的致命性并发症，例如系统性硬化症（也称作硬皮病）和类风湿关节炎<sup>[1-4]</sup>。在系统性硬化症和类风湿关节炎中，自身免疫反应导致的慢性炎症和组织损伤多发生于肺（主要是间质性肺病）和皮肤<sup>[1,2,4,5]</sup>。在世界范围内，间质性肺病在风湿性疾病相关的纤维化疾病患者中发病率和死亡率都很高，甚至已成为主要死亡原因<sup>[3,6]</sup>。间质性肺病的主要特征是肺组织进行性的瘢痕形成，严重破坏正常肺组织结构，导致呼吸衰竭甚至死亡<sup>[7]</sup>。SENSCIS 试验的阳性结果证明，尼达尼布作为一种应用于特发性肺纤维化（IPF）的抗纤维化药物，也可以应用于治疗系统性硬化症相关间质性肺病<sup>[8]</sup>。目前也有一些临床试验探究另一种 FDA 批准用于特发性肺纤维化的药物吡非尼酮，治疗系统性硬化症相关间质性肺病的有效性<sup>[9-12]</sup>。虽然这两种药物都能够延缓特发性肺纤维化的进展，但无法完全阻断疾病进程<sup>[8,13]</sup>。尽管已取得不少进展，但目前的药物治疗仍无法使已破坏的肺组织结构和功能获得逆转，而器官移植通常是唯一的治疗方法<sup>[14]</sup>。因此，更深入地了解自身免疫性风湿性疾病中导致脏器纤维化进展的病理生理机制，对于在细胞和分子水平寻找抑制纤维化、修复组织功能的新的治疗靶点至关重要。

风湿性疾病相关的纤维化疾病中，纤维生成细胞促进皮肤和肺组织的瘢痕过度形成。这些所谓的肌纤维母细胞是导致细胞外基质蛋白（ECM），尤其是胶原纤维过度合

成、沉积和重构的罪魁祸首<sup>[15,16]</sup>。尽管在过去的 40 年里，人们对促进不同前体细胞转化为肌纤维母细胞的分子机制的认识取得了很大进展<sup>[17]</sup>，但对促进其在纤维化疾病中存活和持续存在的机制却知之甚少。虽然肌纤维母细胞最初被认为是纤维母细胞分化的终末状态，但现在人们已经清晰地认识到肌纤维母细胞的表型是可塑和可逆的。因此在本综述中，我们用“活化”一词来描述肌纤维母细胞的表型转化。

本文就肌纤维母细胞保持活化状态、调控肌纤维母细胞功能和帮助肌纤维母细胞逃避凋亡等机制的研究进展作一综述，主要关注与风湿性疾病相关纤维化的发生、进展和持续有关的通路和过程。然而，纤维化的基本过程是普遍存在的，因此我们也对不同脏器系统的纤维化进行了举例。此外，我们还讨论了特异性诱导肌纤维母细胞凋亡或促使其失活的新的治疗策略，目的是将纤维母细胞重新编程为能够逆转纤维化损伤的瘢痕清除细胞。

### 纤维母细胞类型

术语“纤维母细胞”通常代表存在于软结缔组织中的能够产生胶原的一组异质性细胞群，包括间充质基质（或干）细胞<sup>[18]</sup>、周细胞<sup>[19]</sup>和不同表型的真纤维母细胞<sup>[20-23]</sup>。由于缺乏特异性的分子标记，这些细胞类型的表型特征是可变的，因此可以用纤维母细胞这个术语来描述一个组织

## 要点

- 脏器纤维化是系统性硬化症等自身免疫性风湿性疾病的致命并发症。
- 肌纤维母细胞是瘢痕形成细胞，在系统性硬化症中可导致细胞外基质蛋白的过度合成、沉积和重构。
- 肌纤维母细胞的持续活化引起组织过度纤维化和正常组织结构的破坏，导致脏器功能衰竭甚至死亡。
- 纤维化疾病中的生物力学和生物化学因素抑制了肌纤维母细胞的失活并协助其逃避凋亡，从而阻止肌纤维母细胞的死亡。
- 凋亡逃避导致肌纤维母细胞的持续活化和/或肌纤维母细胞向促纤维化或促炎的衰老表型分化，从而抑制纤维组织清除。
- 以肌纤维母细胞凋亡和将细胞重新编程为瘢痕清除细胞为靶点的新的治疗方法可以逆转已形成的纤维化。

中，在所有其他细胞都按照特有的标准进行分类后剩余的细胞。以下部分主要关注纤维母细胞和肌纤维母细胞这两类在多个方面都具有差异的细胞（表1）。肌纤维母细胞是一类重要的细胞，能够在正在修复的组织中协调和整合复杂的动态生化和生物物理因素，以恢复组织的完整性，甚至理想状态下恢复稳态。肌纤维母细胞通常不见于正常结缔组织。

**组织稳态中的纤维母细胞。**既往观点认为，正常组织中的纤维母细胞处于静止或休眠状态，这种观点的建立部分基于对细胞外基质（ECM）的作用是支撑细胞的“永久性脚手架”，只有在组织损伤或疾病状态下才会发生转化的误解。然而正常结缔组织的细胞外基质（ECM）是一种高度复杂和动态变化的结构，由其中的纤维母细胞不断地合成、清除和重构<sup>[24]</sup>。这些纤维母细胞的活动使得正常器官结构和功能能够适应不断变化的生理需求。例如，对于训练中的运动员，生理性的结缔组织重构使心脏能够抵抗增加的机械负荷，肺能够增加容量<sup>[25,26]</sup>。

为起到维持稳态的作用，纤维母细胞形成了多种复杂的正反馈和负反馈机制，使他们能够感知和响应细胞外基质生物力学状态、完整性和生化组成方面的变化。例如，基质金属蛋白酶（MMP）介导的降解过程削弱了细胞外基质，诱导纤维母细胞合成和沉积细胞外基质，分泌细胞外基质交联酶，例如赖氨酰氧化酶，使得细胞外基质机械性增强<sup>[27,28]</sup>。此外，细胞外基质在正常组织转化过程中定向产生细胞外基质纤维，有利于器官和组织的机械稳定性<sup>[29]</sup>。这些活动仿佛经过精细地计划，在生理状态下天衣无缝地发挥着作用。然而，在急性创伤状态下，慢性炎症和组织反复微损伤发生，纤维母细胞无法维持稳态，此时需要专门的修复细胞 - 肌纤维母细胞发挥作用。

**组织修复中的肌纤维母细胞。**由于组织炎症的存在，细胞外基质的生化和/或力学性质发生改变，使纤维母细胞失去维持稳态的能力，使其活化并转化为肌纤维母细胞表型<sup>[17]</sup>（图1a）。肌纤维母细胞与纤维母细胞的概念是否一样宽泛，目前仍存在争议<sup>[30,31]</sup>。然而，所有的肌纤维母细胞都与胶原纤维、收缩肌动蛋白 - 肌球蛋白束的形成和细胞外基质内收缩力的产生有着共同的联系<sup>[15,32]</sup>。此外，肌纤维母细胞常常以应力纤维中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白（ $\alpha$ -SMA）的表达为特征，使其表型拥有高度的收缩性<sup>[33]</sup>。目前尚无已知的特定细胞表面标志物可区别肌纤维母细胞和其他间充质细胞，定义具有不同生理修复功能的肌纤维母细胞亚群，或者区分“良好”的伤口愈合细胞和“不良”的促纤维化细胞<sup>[31]</sup>。然而单细胞测序显示，在表面之下，异质性的（肌）纤维母细胞群具有不同的基因表达和转录谱，并且在各脏器组织修复和纤维化过程中发生着动态变化<sup>[34-40]</sup>。尽管围绕单细胞测序和从t分布随机邻域嵌入（t-SNE）聚类图中获取的复杂数据进行了大量的研究，但需要牢记肌纤维母细胞的异质性和可塑性对于帮助机体应对不可预测的损伤非常重要。因此，尝试对肌纤维母细胞和纤维母细胞进行分类，可能得到与巨噬细胞领域的研究者一致的结论<sup>[41]</sup>——按功能分类细胞比用分子标记分类细胞更合理。肌纤维母细胞的异质性与功能的多样性有关，它既可以反映不同的肌纤维母细胞谱系和前体，也可以反映同一细胞类型的不同活化状态。值得注意的是，肌纤维母细胞可能来源于其他类型细胞，例如上皮细胞、内皮细胞、间充质干细胞、周细胞、前脂肪细胞和脂肪细胞<sup>[17]</sup>（图1a）。然而，肌纤维母细胞在组织修复或纤维化过程中是否转化为其他特殊功能的细胞尚不清楚。在多个脏器中均可找到肌纤维母细胞存在多个谱系的证据，包括肺<sup>[42-44]</sup>、心脏<sup>[25]</sup>、肾脏<sup>[45]</sup>、肝脏<sup>[46]</sup>、骨髓<sup>[47]</sup>和皮肤<sup>[48-50]</sup>。在小鼠背部皮肤中，两个真皮纤维母细胞群（网状和乳头状）来源于胚胎发育过程中第12天出现的一种常见的间充质祖细胞<sup>[51]</sup>（图1a）。值得注意的是，这两种亚型的纤维母细胞不仅在同一组织中的解剖学位置不同，而且在组织修复过程中发挥不同作用。基因追踪发现小鼠皮肤真皮的网状纤维母细胞首先会迁移到受伤部位，在此部位活化为产生胶原的 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌纤维母细胞。相反，乳头状肌纤维母细胞似乎在愈合过程中对后期新毛囊的形成至关重要，但是不产生 $\alpha$ -SMA<sup>[51]</sup>。其他谱系标志物，例如engrailed1和CD26，已经在小鼠模型中被用于证实至

表 1. 纤维母细胞和肌纤维母细胞的特征

特征	纤维母细胞	肌纤维母细胞	参考文献
分布	结缔组织中广泛存在	损伤组织、纤维化和肿瘤	299
形态	含有皮质肌动蛋白微丝的大、扁平 and 拉长的 (纺锤形) 细胞	含有收缩性肌动蛋白 - 肌球蛋白束, 具有特殊黏附结构的平滑肌样细胞	15
来源	中胚层	组织中的纤维母细胞、上皮细胞、内皮细胞、周细胞和间充质干细胞	17
功能	通过 ECM 蛋白和基质降解酶维持 ECM 稳态, 在组织修复过程中增殖并迁移到伤口床形成肉芽组织	在组织修复过程中产生大量 I 型胶原, 收缩创面边缘, 促进再上皮化和恢复组织完整性, 它们的持续存在促进纤维化和恶性肿瘤的发生	1,30,300
分子标记	波形蛋白 <sup>+</sup> α-SMA <sup>-</sup> 细胞分泌 ECM 蛋白, 产生 MMPs 和 TIMPs	纤维连接蛋白 ED-A <sup>+</sup> α-SMA <sup>+</sup> 细胞合成 I 型胶原并产生基质交联酶	98
增殖能力	高 (伤口愈合期间)	低	301
代谢活动	低	高 (有氧糖酵解)	168
生物力学活动	低	高 (高收缩力表型)	302
凋亡敏感性	低	高 (启动死亡)	86

ECM, 细胞外基质; fibronectin ED-A, 纤维连接蛋白外域 A; MMP, 基质金属蛋白酶; TIMP, 基质金属蛋白酶组织抑制物; α-SMA, α-平滑肌肌动蛋白

少两种不同的纤维母细胞群可促进皮肤发育<sup>[41]</sup>、伤口愈合和瘢痕形成<sup>[52]</sup>。相同或相似的纤维母细胞谱系是否对人类皮肤损伤的愈合有利和/或在系统性硬化症中促进纤维化, 目前尚不清楚。然而, 尽管使用了不同的遗传标记, 这种谱系追踪研究的一个共同结论是, 以特定的肌纤维母细胞前体细胞为治疗靶点, 有可能在不影响纤维母细胞群再生的情况下抑制纤维化进展。值得注意的是, 通过单细胞 mRNA 分析在滑膜中也发现了不同的纤维母细胞群, 这些细胞被认为在类风湿关节炎中起到不同的作用<sup>[53]</sup>。在保留骨和软骨的关节炎模型中, 滑膜下层里 Thy1<sup>+</sup> 纤维母细胞促进和维持炎症反应, 滑膜下层里的 Thy1<sup>-</sup> 纤维母细胞则起到降解骨和软骨细胞外基质的作用, 而不参与炎症反应<sup>[53]</sup>。

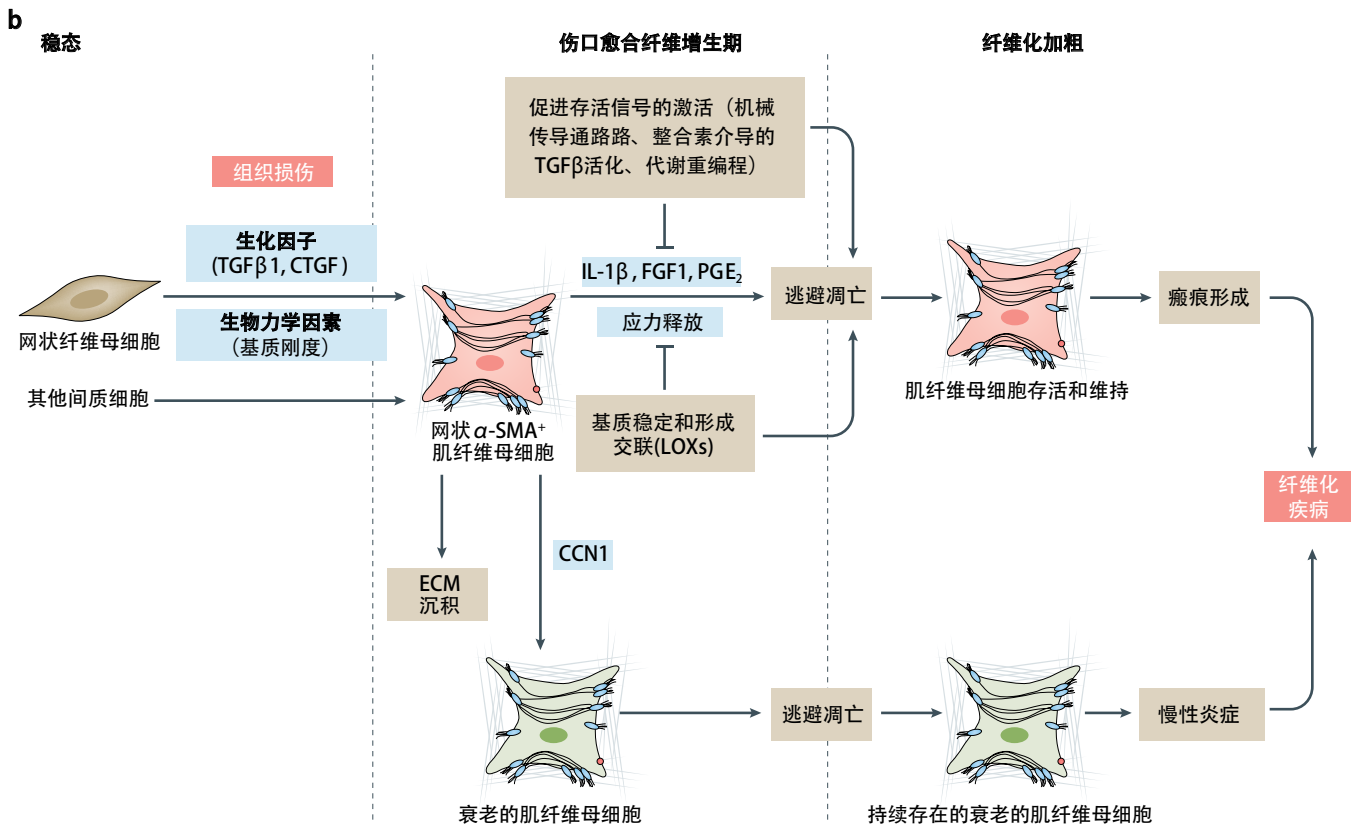
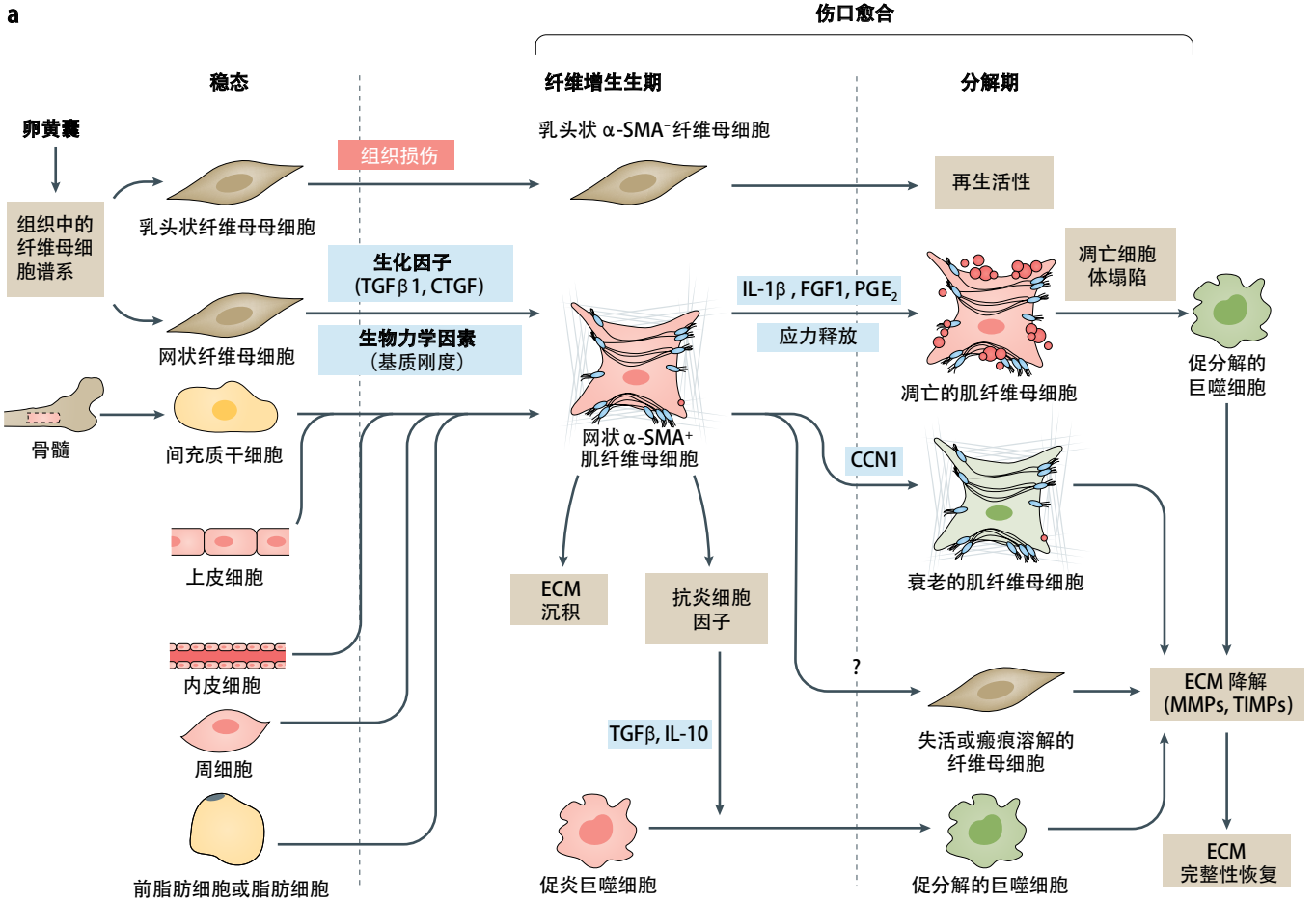
另一种不互相排斥的假说是肌纤维母细胞经历动态转变或存在多种成熟状态, 不同程度地影响正常和纤维化组织的修复<sup>[15,54-57]</sup>。“原肌纤维母细胞”一词的提出是为了强调纤维母细胞在完全“分化”为高度收缩性的 α-SMA<sup>+</sup> 肌纤维母细胞之前, 会先向具有 α-SMA<sup>-</sup> 应力纤维和收缩性相对较低的胶原合成表型转化<sup>[15]</sup>。在解释单个时间点从细胞培养、愈合组织和纤维化病变中获得的肌纤维母细胞表型和/或转录谱时, 必须考虑到这种表型转化, 而不是这些细胞的过去和未来。

对于高度活化的 α-SMA<sup>+</sup> 肌纤维母细胞在组织修复和纤维化后期的表型转化也曾有报道——这种现象被称为逆

转。例如, α-SMA<sup>+</sup> 肌纤维母细胞在皮肤愈合的清除期经历表型转化成为表达 p16INK4a (一种细胞周期调控蛋白) 的衰老肌纤维母细胞<sup>[58,59]</sup>。这种转化可将肌纤维母细胞活性从产生 ECM 转变为分解 ECM, 从而产生瘢痕清除细胞 (图 1a)。在四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型中, 通过单细胞示踪发现, 肌纤维母细胞在体内恢复到纤维母细胞样的非激活状态, 一旦器官损伤停止则开始清除纤维组织<sup>[60,61]</sup>。无论机制如何, 肌纤维母细胞停止分泌 ECM 和收缩活动被证明是清除组织纤维化的重要步骤<sup>[62,63]</sup>。

虽然促进肌纤维母细胞活化的分子机制已经得到了很好的研究, 但是对组织成功修复后肌纤维母细胞的失活途径了解较少。一旦组织恢复完整性, 肌纤维母细胞就可以获得几种不同的功能之一<sup>[17]</sup> (图 1a)。在组织处于稳态时, 肌纤维母细胞可以失活并恢复成低活性状态的纤维母细胞。或者它们可以承担与前体细胞不同特征的角色, 例如成为瘢痕清除细胞或衰老细胞。肌纤维母细胞也可以通过凋亡 (也称为程序性细胞死亡) 启动自我清除, 或重构超出修复需要的组织, 导致病理性瘢痕形成 (图 1b)。这些细胞的不同命运是如何决定的, 其中的细胞基质如何在时间和空间上进行调控, 目前仍不清楚。在下面的章节中, 我们将对促进肌纤维母细胞在完成组织修复的清除后仍持续存在, 尤其是如何逃避凋亡的相关因子和通路进行讨论。





**图1(见上页)肌纤维母细胞在组织修复和纤维化过程中的起源、功能和命运。**

**a.** 肌纤维母细胞活化是伤口愈合的重要因素。组织损伤时,纤维母细胞活化为肌纤维母细胞。在皮肤中,有着共同胚胎来源的两个真皮纤维母细胞群(网状和乳头状),在组织修复中起到不同作用。乳头状纤维母细胞不表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),主要参与毛囊等皮肤结构再生,而网状纤维母细胞通过生物力学(细胞外基质刚度)和转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、结缔组织生长因子(CTGF)等生化因子的作用,分化为产生胶原的 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>肌纤维母细胞。在特定条件和实验模型中,肌纤维母细胞也可由上皮细胞和上皮细胞分别经过上皮-间质转化或内皮-间质转化产生,也可由间充质干细胞、周细胞和前脂肪细胞或脂肪细胞转化产生。肌纤维母细胞的特点是ECM蛋白合成增加,通过表达 $\alpha$ -SMA使细胞成为收缩表型,促进伤口愈合。活化的肌纤维母细胞也会产生TGF- $\beta$ 、IL-10等抗炎细胞因子,从而使巨噬细胞向ECM分解表型转化。在伤口愈合和清除的过程中,肌纤维母细胞会转化为不同类型的细胞。肌纤维母细胞通过凋亡被清除,该过程由ECM软化(应力释放)或IL-1 $\beta$ 、纤维母细胞生长因子1(FGF1)和前列腺素E2(PGE<sub>2</sub>)等可溶性促凋亡因子诱导。或者它们可以通过CCN家族成员(CCN1)的作用而失活,成为瘢痕清除纤维母细胞或衰老表型,这些细胞类型均可与促进ECM分解的巨噬细胞共同参与ECM降解。**b.** 肌纤维母细胞和衰老的肌纤维母细胞同样可以逃避凋亡,在组织修复后进行重构,从而导致病理性瘢痕和纤维化疾病的进展。LOXs,赖氨酰氧化酶;MMPs,基质金属蛋白酶;TIMPs,基质金属蛋白酶组织抑制物。

**凋亡通路**

细胞凋亡是细胞在基因水平进行程序化自我破坏的生理过程<sup>[64-67]</sup>。在健康成年人的组织中,每天有50~700亿细胞通过凋亡清除,以平衡组织中细胞分裂的速度<sup>[68]</sup>。尽管持续破坏这么多细胞似乎是极其低效的,但凋亡是控制器官大小和功能稳态的重要机制,也是清除损伤或感染细胞,或控制开始不可控分裂细胞的主要细胞机制<sup>[69]</sup>。凋亡细胞的细胞和分子特征包括细胞皱缩、膜泡化、固缩,细胞在一个叫做出芽的过程中分解为凋亡小体<sup>[70]</sup>。凋亡小体随后被包括巨噬细胞在内的周围细胞吞噬<sup>[71]</sup>。重要的是,细胞胞葬作用与TNF等促炎因子的产生减少和转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、IL-10等抗炎因子产生增加有关(参考文献<sup>[72]</sup>)。

细胞凋亡是一个复杂的过程,由内在通路和外在通路两个相互联系的分子通路严密控制<sup>[65]</sup>(图2)。细胞凋亡的内在途径由细胞内的DNA损伤、氧化应激和原癌基因激活等死亡刺激所触发<sup>[65]</sup>,所有这些均通过线粒体外膜穿透(MOMP)启动细胞凋亡。因此内在途径也称为线粒体凋亡。MOMP是随着跨内线粒体膜的膜电位和pH梯度破坏而发生的,导致线粒体肿胀、外线粒体膜破裂和细胞色素c等促凋亡蛋白从膜间隙释放到细胞质。细胞色素c结合并激活凋亡蛋白酶活化因子1(APAF1),形成凋亡小体,介导caspase-9活化,最终通过caspase-3和caspase-7的活化导致细胞死亡。Caspase-9介导的效应蛋白caspase-3和caspase-7裂解和活化可被促存活的凋亡抑制因子(IAP)蛋白[例如X连锁IAP(XIAP)]所抑制,从而阻止细胞凋亡<sup>[67]</sup>。在这一固有通路中,一个细胞的凋亡阈值(其进

入凋亡的可能性)是通过BCL-2家族不同膜蛋白之间在线粒体外膜上的动态相互作用来设定的。这些BCL-2蛋白按结构和功能分为效应蛋白、激活蛋白、促存活蛋白和致敏蛋白<sup>[64,65]</sup>。

每个BCL-2家族成员包含四个固定的BCL-2同源结构域中的一个或多个: BH1、BH2、BH3和BH4(参考文献<sup>[65]</sup>)。BCL相关X蛋白(BAX)和BCL-2同源拮抗剂/杀伤蛋白(BAK)在线粒体膜上形成孔道,通过MOMP启动凋亡的多结构域效应蛋白。这些效应蛋白受到仅含有BH-3的激活蛋白的严格调控,例如BCL-2样蛋白11(BCL2L11,也称作BIM)、p53上调凋亡调节蛋白(PUMA)和BH-3相互作用域死亡激动剂(BID)。激动蛋白和效应蛋白的结合可启动MOMP,而MOMP也可被BCL-2、BCL-X<sub>L</sub>、BCL-W、诱导髓系白血病细胞分化蛋白MCL1(MCL1)和BCL-2相关蛋白A1(BCL2A1,也称作BFL1)等可同时结合和抑制效应蛋白和激动蛋白的多结构域的促存活蛋白所抑制。如果另一组仅含有BH-3的致敏蛋白高度表达,细胞中的促存活蛋白亦可诱导MOMP。例如BCL-2相关死亡促进蛋白(BAD)、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯诱导蛋白1(PMAIP1,也称为NOXA)、凋亡harakiri激动蛋白(HRK)、PUMA(也是一种激活蛋白)、BCL-2相互作用杀伤蛋白(BIK)和BCL-2修饰因子(BMF)等致敏蛋白亦可通过抑制促存活蛋白和释放激活蛋白和效应蛋白启动MOMP,从而间接促进凋亡<sup>[73]</sup>。

凋亡的外源性死亡受体通路通过结合FAS配体(FASL)、TNF配体超家族成员10(TNFSF10,也称为TRAIL)和TNF等细胞外死亡配体的方式激活(图2)。典型的细胞表面死亡受体有FAS、TNF受体、死亡受体4(DR4)和DR5(参考文献<sup>[66]</sup>)。在这条通路中,促凋亡信号通过多蛋白死亡诱导信号复合物进行传导,其中适配体蛋白FAS相关死亡结构域(FADD)、TNF受体类型1相关DEATH结构域(TRADD)和调节IRE1依赖的衰变(RIDD)聚集后激活caspase-8和caspase-10。这两种caspase随后通过裂解和激活前caspase-3启动凋亡(图2)。

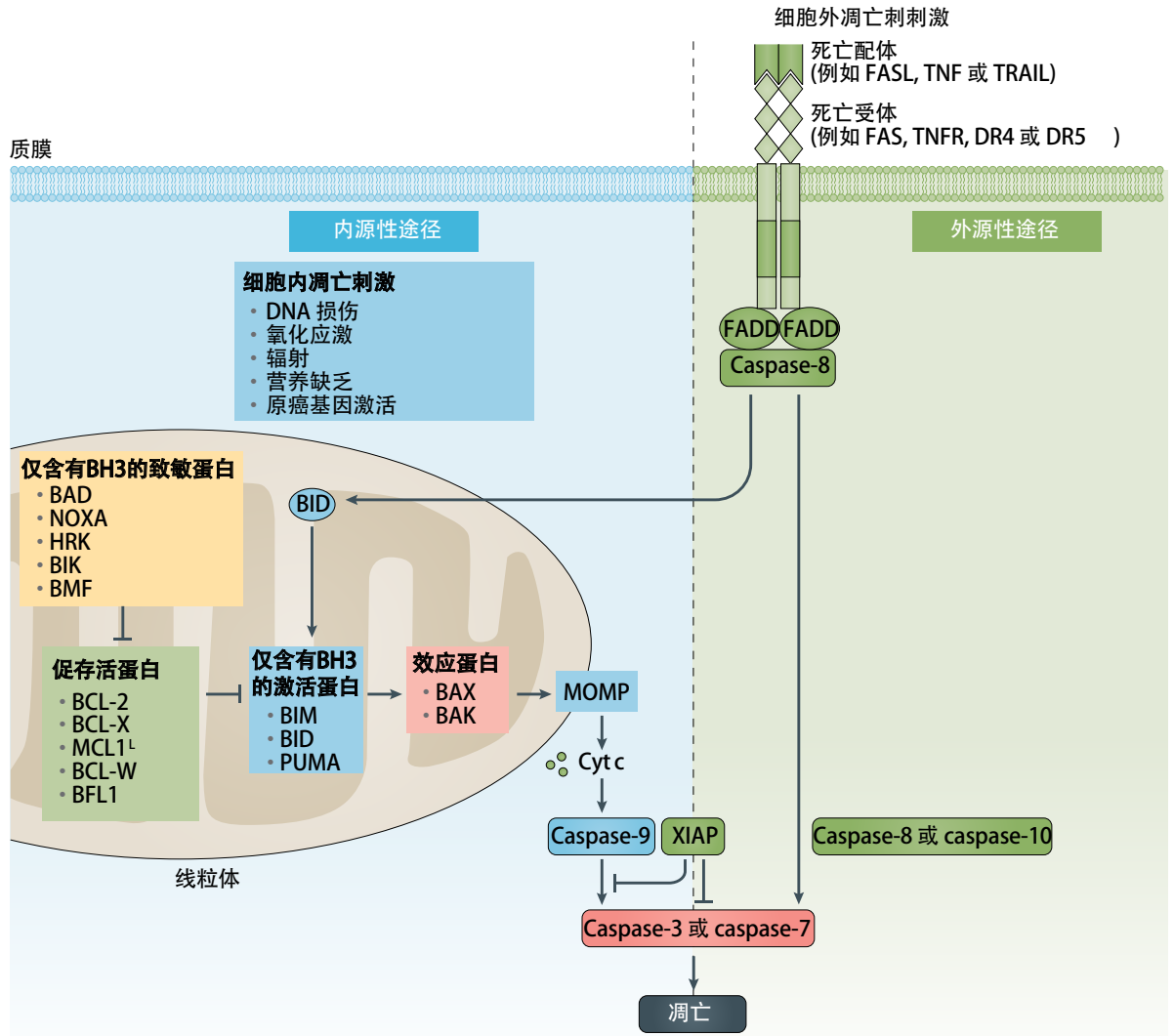
有趣的是,外源性和内源性凋亡通路也可通过BID<sup>[74]</sup>(一种可被外源性通路中caspase-8介导的水解酶裂解作用所激活的激活蛋白)进行交叉激活。一旦被裂解,截短的BID通过直接结合和激活线粒体膜中的效应蛋白BAX和BAK触发内源性凋亡通路。在下面的章节中,我们详细阐

述了在组织修复和纤维化过程中，肌纤维母细胞的内源性和外源性凋亡途径是如何调控的。

**肌纤维母细胞凋亡**

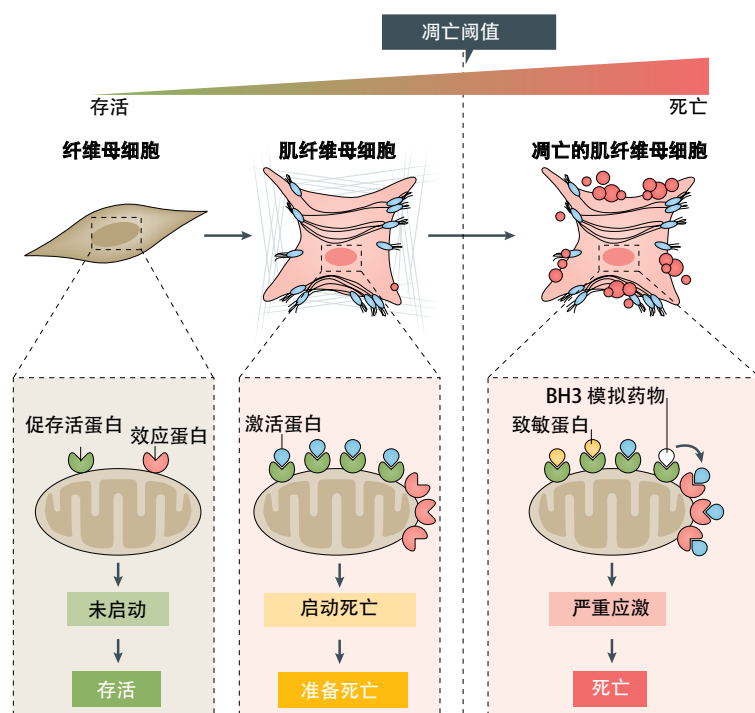
**组织修复中的肌纤维母细胞清除。**在 20 世纪 90 年代的一项重要研究中，Gabbiani 和同事提出，肌纤维母细胞

在完成组织修复后发生凋亡。他们证明在大鼠皮肤伤口完全愈合后，碎片化 DNA 在  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 细胞内积累， $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 凋亡小体在巨噬细胞的吞噬溶酶体中积累。此后的研究认为，活化的肌纤维母细胞对生长因子介导的通路“上瘾”，使其在组织修复的过程中能够存活，但是在“撤退”时促进凋亡。例如，TGF $\beta$ 1 或血小板源性生长因子 (PDGF)



**图 2 内源性和外源性凋亡通路。**肌细胞凋亡由两条截然不同但又相互联系的通路控制。内源性通路由细胞内死亡刺激触发，例如 DNA 损伤、辐射、营养缺乏、氧化应激或癌基因激活等，通过促进线粒体外膜通透 (MOMP) 以及细胞色素 c (cyt c) 依赖的 caspase-9 激活后的 caspase-3 和 caspase-7 的活化诱导凋亡。这条凋亡通路受到 BCL-2 家族蛋白的严格调控，根据其结构同源性和功能分为致敏蛋白、促存活蛋白、激活蛋白和效应蛋白。MOMP 受到效应蛋白 BCL 相关 X 蛋白 (BAX) 和 BCL-2 同源拮抗剂/杀伤蛋白 (BAK) 的同源异构体的调控，这些效应蛋白可被激活蛋白 BCL-2 样蛋白 11 (BCL2L11, 也称为 BIM)、p53 上调凋亡调节蛋白 (PUMA) 和 BH-3 相互作用域死亡激动剂 (BID) 所激活。BCL-2、BCL-XL、BCL-W、诱导髓系白血病细胞分化蛋白 MCL1 (MCL1) 和 BCL-2 相关蛋白 A1 (BCL2A1, 也称作 BFL1) 等促存活蛋白可与激活蛋白和效应蛋白结合和聚集，从而抑制其相互作用和对 MOMP 的诱导。致敏蛋白 [例如 BCL-2 相关死亡启动子 (BAD)、BCL-2 相互作用杀伤蛋白 (BIK)、BCL-2 调控因子 (BMF)、凋亡 harakiri 激活蛋白 (HRK) 和佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯诱导蛋白 1 (PMAIP1, 也称为 NOXA)] 是一类独特的通过结合和阻断促存活蛋白，释放已被结合的激动蛋白和效应蛋白，从而促进凋亡的蛋白。外源性通路通过 FAS 配体 (FASL)、TNF 和 TNF 配体超家族成员 10 (TNFSF10, 也称为 TRAIL) 等细胞外配体与细胞表面受体 FAS、TNF 受体 (TNFRs) 以及死亡受体 4 (DR4) 和 DR5 的结合而启动。该信号通过激活 caspase-8 和 caspase-10 的 FAS 相关死亡结构域 (FADD) 进行传导，最终通过裂解和激活前 caspase-3 和前 caspase-7 启动凋亡。BH3, BCL-2 同源结构域 3; XIAP, X 连锁凋亡蛋白抑制物。





**图3 肌纤维母细胞线粒体启动。**线粒体启动是指线粒体接近凋亡阈值，由促凋亡蛋白（效应蛋白、激活蛋白和致敏蛋白）和BCL-2家族蛋白中的促存活成员的相对表达决定。“未启动的”纤维母细胞表达少量激活蛋白和/或效应蛋白，导致抗凋亡表型。相反，致敏蛋白、激活蛋白和/或效应蛋白的高表达使得线粒体高度启动，最终触发细胞色素c介导的线粒体外膜穿透和凋亡。然而，一旦促存活机制被激活，即使肌纤维母细胞已处于高度启动状态也可以存活。在这种被称为“死亡启动”的状态下，细胞已作好死亡准备，此时依赖一种或多种促存活蛋白聚集促凋亡蛋白来保证存活。BCL-2同源结构域3（BH3）模拟药物可通过结合促存活蛋白，在已启动死亡程序的肌纤维母细胞中触发内源性凋亡通路，导致激活蛋白的释放，进而结合和激活效应蛋白。

等促存活的生长因子，在创面愈合炎症阶段的早期由血小板和巨噬细胞释放，在创面愈合过程中这些生长因子不断消耗可能潜在地诱导肌纤维母细胞凋亡<sup>[77,78]</sup>。

这种生长因子“依赖性”是限制肌纤维母细胞在创伤愈合过程中存活的可能的机制之一。另外，在组织修复后期释放的促凋亡细胞因子可能通过直接激活死亡信号通路或抑制促存活通路选择性诱导肌纤维母细胞凋亡，从而调节肌纤维母细胞内、外源性凋亡通路的激活。例如，纤维母细胞生长因子（FGF1）通过抑制促存活蛋白激酶B（PKB，也称为AKT）和相关局部粘附激酶（FAK）信号通路的磷酸化，诱导皮肤肉芽组织中活化的肌纤维母细胞发生caspase-3介导的凋亡，而相反地，FGF1在正常皮肤纤维母细胞中则不诱导凋亡<sup>[79,80]</sup>。同样，IL-1 $\beta$ 和肝生长因子（HGF）通过抑制FAK，诱导小鼠肺肌纤维母细胞caspase依赖性凋亡<sup>[77,81]</sup>。在肝脏中，肌纤维母细胞在肝再生过程中靶向凋亡，肝星形细胞上调促凋亡FAS受体并通过外源性凋亡迅速被清除<sup>[82,83]</sup>。总之，这些研究结果<sup>[77,81-83]</sup>

说明在伤口愈合的清除阶段，肌纤维母细胞的激活状态增加了凋亡的易感性。

**纤维化中肌纤维母细胞的凋亡逃避。**在自身免疫性疾病背景下，由生理性组织修复到病理性纤维化的转化涉及到抑制肌纤维母细胞活性终止的信号通路。与创伤愈合中的“同类”相比，本应在生理性组织修复结束时就消失的肌纤维母细胞在纤维化疾病中的持续存在，证明这些细胞具有抗凋亡的特性<sup>[84,85]</sup>。过去2年的研究表明，肌纤维母细胞在纤维化状态下实际上发生了自我破坏，而不是抗凋亡。肌纤维母细胞促凋亡倾向的分子基础似乎集中在这些细胞线粒体凋亡启动的增加<sup>[86,87]</sup>（图3）。线粒体启动是指线粒体接近凋亡阈值，由来自BCL-2家族的效应蛋白、激活蛋白、促存活和致敏蛋白的相对表达所控制<sup>[88-89]</sup>。重要的是，凋亡启动并不是由某一种促凋亡或抗凋亡蛋白的表达所决定，细胞存活也不是简单的“是”或“否”的问题。相反，细胞存活由复杂的分子调控机制决定，其中多个促凋亡和抗凋亡的BCL-2家族蛋白之间的相对平衡引导细胞存活或发生凋亡（图3）。例如，细胞毒性应激信号可通过转录和/或翻译后诱导仅含BH3的促凋亡蛋白，从而增加线粒体启动<sup>[73,89]</sup>。当线粒体启动足够高，超过凋亡阈值时，就会发生MOMP，随后发生凋亡。

然而，如果促存活机制被激活，细胞即使在高线粒体启动状态下依然能够存活。通常，高线粒体启动的细胞上调抗凋亡蛋白，使仅含BH3的促凋亡蛋白发生剪切，从而阻止MOMP的发生<sup>[91-93]</sup>。在肌纤维母细胞中，BCL-X<sub>L</sub>等抗凋亡BCL-2蛋白响应细胞外环境而上调，保证这些细胞在被诱导死亡的情况下仍能存活<sup>[86]</sup>。尽管如此，启动死亡程序的细胞成为依赖抗凋亡蛋白而存活的细胞，在治疗中抑制重要的促存活蛋白（例如，用所谓的BH-3模拟药物）可迅速诱导此类细胞凋亡<sup>[91]</sup>（图3）。在接下来的章节中，我们讨论在纤维化过程中，促进已启动死亡程序的肌纤维母细胞存活的分子机制。

### 肌纤维母细胞存活机制

已知在体外正常组织修复和脏器纤维化过程中，可激活肌纤维母细胞的因子逐渐增加，这在其他文章中已经得到综述<sup>[4,17,20,31,94-101]</sup>。在本综述中，我们关注的不仅是促进肌纤维母细胞激活，而且是促进存活功能的生物力学和生化因素。

**肌纤维母细胞存活的生物力学因素。**使肌纤维母细胞

启动死亡程序的一个关键因素是 ECM 通过形成纤维化而在自身周围产生的特殊生物力学状态。由于胶原过度沉积和肌纤维母细胞收缩的增强,纤维化的 ECM 比正常脏器 ECM 更加僵硬。在系统性硬化症中,硬化的纤维瘢痕组织的形成改变了皮肤、肾脏、心脏和肺的力学特性,从而直接影响脏器功能<sup>[102]</sup>。例如,硬化瘢痕组织的机械功能障碍降低心脏泵血功能,阻碍电传导活动。同样,肺组织的硬化不仅影响肺泡空间内正常的气体交换,还会降低肺组织的顺应性和肺容量<sup>[102]</sup>。组织硬化除了影响依赖其生物力学特性的器官功能外,还通过促进促纤维化 TGF $\beta$ 1 和肌纤维母细胞的生物力学激活,对纤维化产生持久的影响<sup>[26,103]</sup>。这种生物力学正反馈机制导致了恶性循环,使得纤维化持续发生<sup>[26,102,104-106]</sup>(图 4)。为支持 ECM 硬化程度的增加会导致纤维化进展这一观点,除这些结果外,在纤维化疾病背景下增加了生物力学方面的研究,揭示了重要的调控因素<sup>[102,103,107-110]</sup>(下方内容讨论)。

肌纤维母细胞的激活导致  $\alpha$ -SMA 的表达和收缩力的增加(图 4a)。在细胞内, $\alpha$ -SMA 的产生受 TGF $\beta$ 1 诱导的信号通过 TGF $\beta$  控制元件和 ACTA2 (编码  $\alpha$ -SMA) 启动子中的上游抗 decapen-taplegic 同源物 (SMAD) 结合原件控制<sup>[111]</sup>。细胞外,潜在前体复合物激活 TGF $\beta$ 1 的量既依赖于 ECM 的生物力学状态<sup>[112]</sup>,也依赖于结合潜伏 TGF $\beta$ 1 的整合素传递的细胞应力(参考文献<sup>[111-115]</sup>)。除压力依赖 TGF $\beta$ 1 激活的间接生物力学刺激外,ACTA2 启动子还含有可与心肌相关转录因子 (MRTFs) 和血清反应因子 (SRF) 结合的 Carg 盒结构,可正向调控 ACTA2 的转录<sup>[116]</sup>。MRTFs 由细胞质到细胞核的过程是由多聚体状态的肌动蛋白细胞骨架控制的(图 4a)。在低应激状态下的细胞中,MRTFs 与可利用的 G-肌动蛋白单体结合;在高应激状态下,G-肌动蛋白聚合成 F-肌动蛋白应力纤维并释放 MRTFs,这些 MRTFs 游走到细胞核,与 SRF 一起上调 ACTA2 转录<sup>[117-118]</sup>。此外,机械敏感性转录共激活蛋白 (YAP) 和含 PDZ 结合结构域 (TAZ) 的转录共激活蛋白可正向调节多种细胞类型向肌纤维母细胞分化<sup>[33,119-129]</sup>(图 4a)。

然而 ECM 硬化是一种促肌纤维母细胞的刺激,创伤愈合过程中细胞内和细胞外的应力释放导致收缩功能丧失,肌纤维母细胞活化减少<sup>[102-103]</sup>。事实上,已经有研究提出,在组织修复完成后,硬化瘢痕组织的清除和相应的应力释放是肌纤维母细胞终止活化和/或凋亡的重要信号。

例如,在体外,纤维母细胞所存在的胶原网格机械抑制的释放可诱导肌纤维母细胞凋亡<sup>[120-131]</sup>。在体内,将小鼠皮肤伤口的细胞外收缩释放同样可引起肌纤维母细胞凋亡,相反地,用夹板固定伤口抑制愈合组织的生物力学应力,可抑制肌纤维母细胞凋亡,在啮齿类动物中导致增生性瘢痕<sup>[132-134]</sup>。

将应力释放和肌纤维母细胞凋亡联系起来的分子通路尚不清楚,但可能与促存活机制传导途径的抑制相关。一旦机制传导途径收到抑制,应力激活的肌纤维母细胞在体外快速凋亡,整合素介导的应力感知和 FAK 介导的机械信号是硬化的 ECM 中肌纤维母细胞存活的重要组成部分<sup>[86,135]</sup>(图 4b)。相反,阻断依赖力的机械信号既不干扰纤维母细胞的静息功能,也不引起纤维母细胞在软性 ECM 上的凋亡,进一步证明肌纤维母细胞的细胞状态似乎是诱导这些细胞凋亡的主要因素。

ECM 硬化所激活的肌纤维母细胞通过凋亡激活蛋白 BIM 等死亡信号启动凋亡,BIM 的表达上调相应地需要 BCL-X<sub>L</sub> 等抗凋亡蛋白补充性地表达,以保证肌纤维母细胞存活和持续存在<sup>[86]</sup>。压力激活的肌纤维母细胞中 BCL-X<sub>L</sub> 的表达似乎是由 YAP 和 TAZ 控制的,其向细胞核内的转移受到整合素介导和 FAK 介导的机械传导通路的诱导<sup>[86]</sup>(图 4b)。纤维化皮肤中的皮肤肌纤维母细胞逃避凋亡是由机械调控的 FAK-YAP-TAZ-BCL-X<sub>L</sub> 通路所控制<sup>[86]</sup>,而肺纤维化中的肌纤维母细胞存活则是由 RHO 相关蛋白激酶 (ROCK) -MRTF-BCL-2 信号通路机械调控的<sup>[126]</sup>。此外,TGF- $\beta$ 1-ROCK-MRTF 信号通过增加 XIAP 浓度阻断线粒体凋亡<sup>[136-140]</sup>,从而直接抑制 caspase(图 4b)。这些研究<sup>[86,126]</sup>显示 ECM 压力诱导的生物力学信号通过上调特定的 BCL-2 家族促存活因子,促进已启动死亡程序的肌纤维母细胞存活。

除直接影响线粒体启动外,生物力学信号还通过间接机制促进肌纤维母细胞抗凋亡。ECM 压力诱导 miR-21 和 miR29a 等 miRNA 表达,通过增加 BCL-2 的表达和诱导 BAX 表达促进压力激活肌纤维母细胞的存活<sup>[134,139]</sup>(图 4b)。MiR-21 在多个脏器和纤维母细胞中被认为是促纤维化的<sup>[140-145]</sup>。奇怪的是,miR-21 还参与维持肌纤维母细胞的收缩表型,即使在被移动并暴露于软培养基数周后,这些肌纤维母细胞仍可在病理性瘢痕硬聚合物基质上被机械激活<sup>[134]</sup>。这种现象被称为“机械性记忆”<sup>[95]</sup>,未来对于机械启动和死亡启动如何协调的相关研究将会非常有趣。

**细胞外肌纤维母细胞存活因素。**TGF- $\beta$ 1 和血管活性肽内皮素 1 (ET1) 的自分泌通过激活 FAK-AKT 信号通路介导培养的 SSc 和 IPF 纤维母细胞抵抗凋亡<sup>[146-150]</sup>。在促肌纤维母细胞存活的过程中, FAK 的激活依赖  $\beta$ 1 整合素<sup>[77,135,137,149]</sup>。FAK 的激活需要在第 397 位酪氨酸进行自磷酸化, 这就为磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3K) 的 p85 调节亚基的 Src 同源 2 (SH2) 结构域创造了结合位点, 进而导致促存活的 PI3K-AKT 信号通路的激活<sup>[150-152]</sup>。另外, TGF- $\beta$ 1 在肺肌纤维母细胞中激活 AKT 可能是以 FAK 非依赖性、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 依赖性的方式发生的<sup>[153]</sup>。AKT 的激活导致致敏蛋白 BAD 的磷酸化和抑制<sup>[77,154,155]</sup>, 从而在外源性和内源性凋亡通路的交叉点抑制肌纤维母细胞的凋亡 (图 4b)。TGF- $\beta$ 1 介导的转录因子 ABL 的激活导致促存活蛋白 BCL-2 增加和效应蛋白 BAX 的减少<sup>[156]</sup>。此外, PDGF 可激活肿瘤相关肌纤维母细胞, 同时增加线粒体启动和对凋亡的敏感性<sup>[157]</sup>。同样地, 在肝脏中 PDGF 激活的肌纤维母细胞存活依赖于 BCL-X<sub>L</sub><sup>[158]</sup>, 表明该促存活蛋白在不同脏器中, 对于促进纤维生成的肌纤维母细胞存活都具有重要作用。综上所述, TGF- $\beta$ 1 和 PDGF 信号通过调控促存活蛋白 BCL-2 家族蛋白的转录直接抑制内源性线粒体途径, 导致肌纤维母细胞线粒体启动减少。

除了通过内源性凋亡途径调控肌纤维母细胞存活外, FAK 信号对于阻断外源性凋亡通路以应对促纤维化细胞因子也很重要<sup>[86,159]</sup>。TGF- $\beta$ 1 和 ET1 均通过抑制 FAS-FASL 信号阻断 SSc 和 IPF 中肌纤维母细胞凋亡的外源性通路<sup>[74,154,160-162]</sup>。FAS-FASL 通路在肌纤维母细胞中的促凋亡活性大多是通过酸性鞘磷脂酶的激活产生的神经酰胺所介导<sup>[163]</sup>。在 SSc 肌纤维母细胞中, 尽管 FAS 受体的表达水平与正常纤维母细胞相当, TGF- $\beta$ 1 的自分泌可抑制鞘磷脂酶, 从而保护这些细胞免受 FASL 诱导的凋亡<sup>[154,160,164]</sup> (图 4b)。在 IPF 肌纤维母细胞中, 对 FASL 诱导凋亡的敏感性也同样降低, 尽管通过不同的分子机制, 包括作为 FAS 剪切变体的可溶性 FAS 水平升高<sup>[162]</sup>, FASL 作为诱骗受体的功能和诱骗受体 3 的上调, 与 FASL 结合, 抑制 FASL 诱导的凋亡<sup>[165]</sup>。

此外, 纤维母细胞对 FASL 诱导的凋亡敏感性的降低可通过环氧合酶 -2 (COX2) 下调介导, 后者通常通过产生前列腺素 E2 (PGE<sub>2</sub>)<sup>[166]</sup> 促进纤维母细胞凋亡, 前列腺素 E2 是一种来源于花生四烯酸代谢的脂质介质。外源性

给予 PGE<sub>2</sub> 通过抑制 AKT 信号恢复纤维化肺中的肌纤维母细胞对 FASL 诱导凋亡的敏感性<sup>[166,167]</sup>。PGE<sub>2</sub> 治疗还可以抑制 caspase 抑制剂 XIAP, 从而增强 FASL 介导的肺肌纤维母细胞凋亡, 以证实 XIAP 在肌纤维母细胞逃避凋亡中的潜在作用机制<sup>[161,167]</sup>。有趣的是, 纤维化疾病中 ECM 的硬化与肌纤维母细胞共同参与正反馈循环, 抑制 COX2 表达和 PGE<sub>2</sub> 产生, 这说明纤维化生物力学微环境本身可能足以通过该途径促进肌纤维母细胞的存活<sup>[105]</sup>。因此, PGE<sub>2</sub> 产生减少和 / 或反应性降低有助于纤维化疾病中肌纤维母细胞的凋亡抵抗。

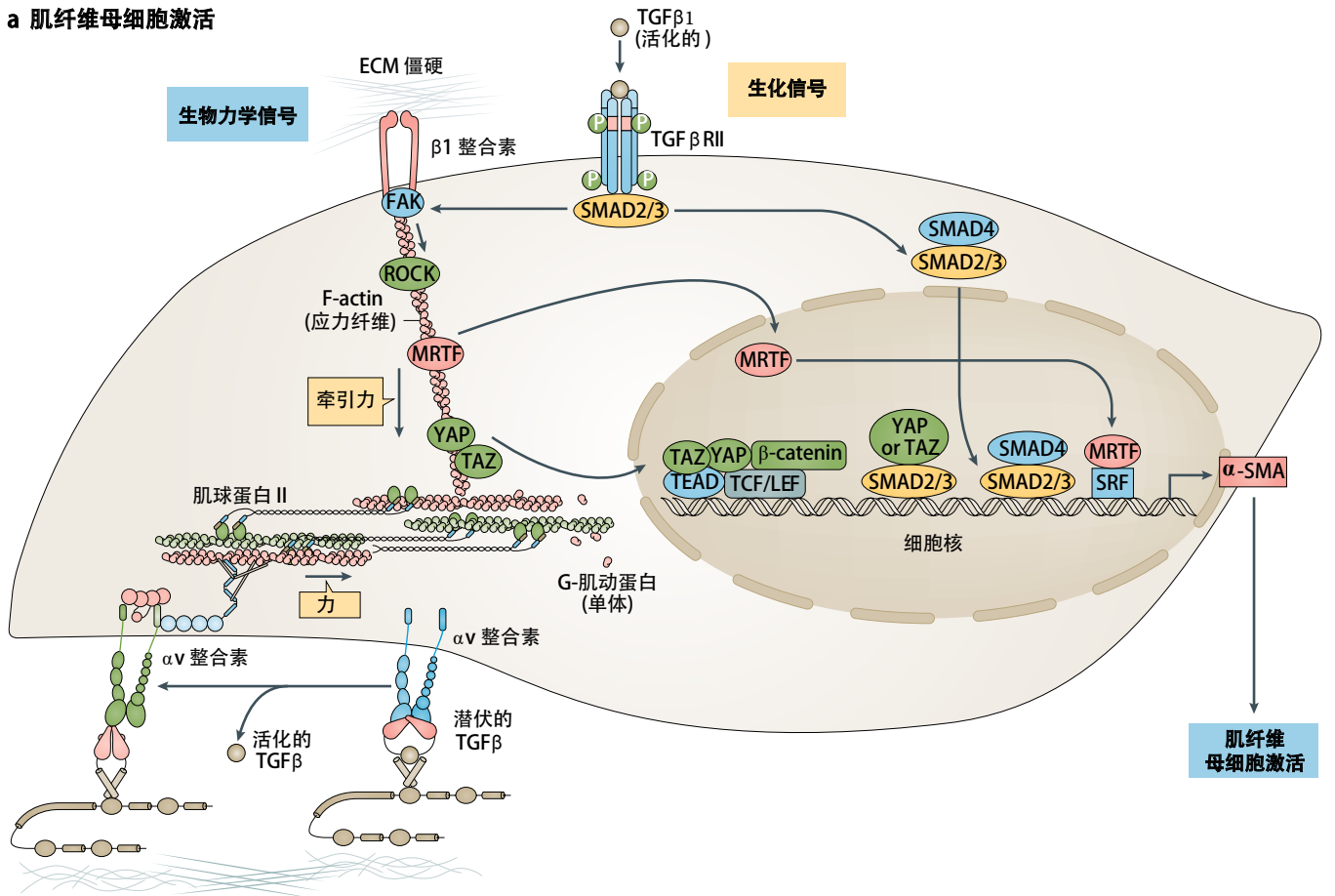
**细胞内肌纤维母细胞存活因素。**代谢重编程在肌纤维母细胞存活中的重要机制正逐渐被发现。肌纤维母细胞具有高代谢率, 其合成和 ECM 收缩都需要能量。值得注意的是, 尽管肌纤维母细胞的代谢重编程改变了其促存活的途径, 促进其持续存活<sup>[168]</sup>, 但通过代谢重编程促进肌纤维母细胞存活的分子机制尚不清楚。YAP-TAZ 活性也受到代谢和能量感知通路的控制<sup>[169]</sup>, 说明肌纤维母细胞的代谢状态和重编程可能调控了机械敏感性促存活通路的激活。

肌纤维母细胞通过诱导糖酵解和增加线粒体耗氧量维持能量来源, 说明肌纤维母细胞具有有氧糖酵解型<sup>[169]</sup>。在一项研究中<sup>[170]</sup>, 肌纤维母细胞的这种高能状态与 IPF 中纤维母细胞碎片化和线粒体受损有关, 这些线粒体可能通过不明机制增加这些细胞的线粒体启动。能量传感器 AMP- 激活蛋白激酶 (AMPK) 的失活加剧了肌纤维母细胞的线粒体功能障碍和代谢重编程。因此, 通过二甲双胍激活 AMPK 可恢复肌纤维母细胞对凋亡的敏感性, 说明线粒体的生物合成是诱导肌纤维母细胞凋亡的必要条件。更为重要的是, 在实验模型中二甲双胍通过促进肌纤维母细胞失活和 / 或凋亡可逆转已经形成的肺纤维化<sup>[170]</sup>。

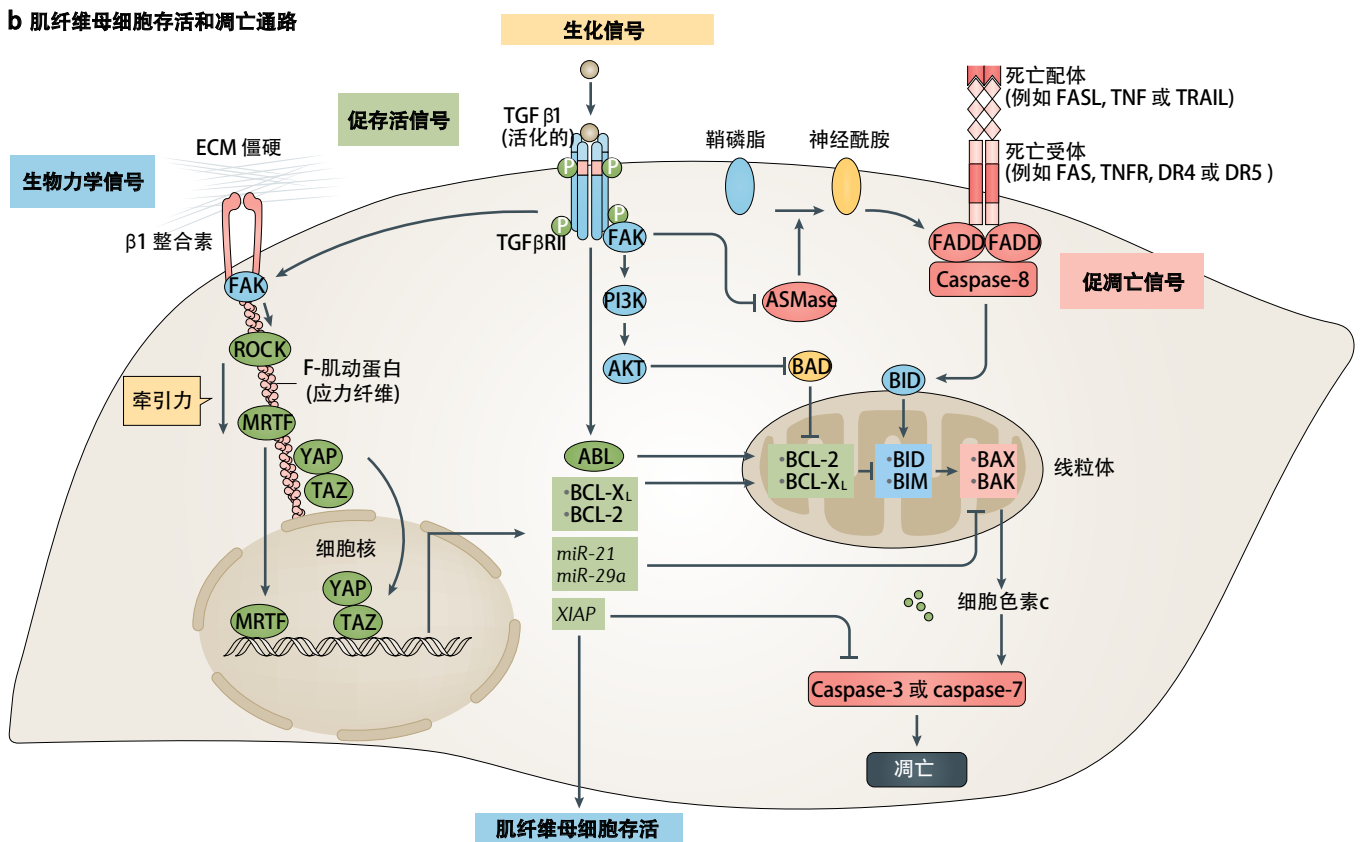
**肌纤维母细胞衰老。**肌纤维母细胞除逃避凋亡外, 还可以通过衰老而持续存在 (图 1)。越来越多的证据表明, 进展性纤维化可能是由于促纤维化的衰老肌纤维母细胞堆积所致, 这些肌纤维母细胞广泛存在于年龄相关性纤维化疾病中<sup>[171-173]</sup>。细胞衰老最早被定义为细胞周期停滞, 1965 年 Hayflick 首次在人类肺纤维母细胞中描述了这一概念 (参考文献<sup>[174]</sup>)。细胞衰老的主要功能是组织阻止细胞分裂, 作为对抗肿瘤发生的保护机制。衰老细胞通过增加细胞周期和肿瘤抑制因子的表达, 以应对过度的应激, 如端粒功能障碍 (复制性衰老)、癌基因激活和基因毒性



a 肌纤维母细胞激活



b 肌纤维母细胞存活和凋亡通路



**图4 (见上页) 肌纤维母细胞激活和存活的分子调控。** a. 肌纤维母细胞的激活是由生物力学和生化共同促进的。细胞外基质 (ECM) 应力诱导的生物力学信号直接控制  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 转录的机械性传导通路。这些通路包括整合素  $\beta$ 1-、局部粘附激酶 (FAK) 和 RHO 相关蛋白激酶 (ROCK), 以及纤维母细胞收缩力的增加。肌动蛋白活性增强导致心肌相关转录因子 (MRTF)、转录共激活因子 yes 相关蛋白 (YAP) 和含 PDZ 结合结构域 (TAZ) 的转录共激活因子, 这些共激活因子通过结合和激活其他转录因子, 例如血清反应因子 (SRF)、TEA 结构域家族成员 (TEAD)、T 细胞因子 / 淋巴增强因子结合因子 (TCF/LEF) 和  $\beta$ - 连环素, 从而调节  $\alpha$ -SMA 表达。ECM 应力和机械力还通过增强对纤维母细胞产生的牵引力的抵抗, 来调节潜伏转化生长因子  $\beta$ 1 的力依赖性活化。在这个机制中, 当  $\alpha$ v 整合素对机械牵引力产生反应时, 细胞外潜伏 TGF $\beta$ 1 [TGF $\beta$ 1 及其潜伏相关肽 (LAP)] 就会从潜伏 TGF $\beta$ 1 结合蛋白库中释放。一旦被激活, TGF $\beta$ 1 与 TGF $\beta$ 1 受体结合, 促进抗 decapen-taplegic 同源物 3 (SMAD3) 激活。活化的 SMAD3 与 SMAD4 结合并转移到细胞核, 在细胞核中结合纤维生成基因启动子中 SMAD 结合元件, 如 ACTA2 (编码  $\alpha$ -SMA)。肌纤维母细胞活化既受到 TGF $\beta$ -SMAD 通路的调控, 又受到整合素-FAK-ROCK-MRTF-YAP-TAZ 信号等生物力学通路的控制。

b. 活化的肌纤维母细胞线粒体中含有大量促凋亡因子, 这些因子促使细胞激活促存活机制以保证细胞存活。TGF $\beta$ 1 通过激活 ABL 信号通路直接抑制细胞凋亡的内在途径, 增加促存活蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 的含量。TGF $\beta$ 1 还通过 FAK-PI3K-AKT 信号通路抑制促凋亡蛋白 BCL-2 相关死亡启动子 (BAD), 阻断内源性凋亡途径。TGF $\beta$ 1 介导的 FAK 信号通路通过抑制鞘磷脂酶 (ASMase, 一种通过使鞘磷脂生成神经酰胺来控制 FAS 介导凋亡的酶) 来阻断外源性凋亡途径。生物力学信号同样通过 TGF $\beta$ -FAK-YAP1-TAZ-BCL-XL 和 TGF $\beta$ -ROCK-MRTF-BCL-2 通路抑制内源性途径。此外, ECM 应力诱导 microRNAs miR-21 和 miR-29a 的表达, 通过增加促存活 BCL-2 蛋白的表达, 促进肌纤维母细胞存活。ECM 应力和 TGF $\beta$ 1 也可通过增加直接 caspase 抑制剂 X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP) 的量来阻断细胞凋亡。AKT, 促存活蛋白激酶 B; BAK, BCL-2 同源拮抗剂 / 杀伤蛋白; BAX, BCL 相关 X 蛋白; BID, BH3 相互作用结构域死亡激动剂; BIM, BCL-2 相互作用死亡介质 (也称为 BCL2L11); PI3K, 磷脂酰肌醇 3 激酶; TGF $\beta$ RII, 转化生长因子  $\beta$  受体 II。

或氧化应激, 从而使细胞锁定在一个永久性的细胞周期阻滞中<sup>[175]</sup>。这些过程是通过衰老激活的信号通路来促进的, 包括细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p53、p16 和 p21 (参考文献<sup>[176,177]</sup>)。

由于衰老细胞最终也会被清除, 细胞衰老在概念上与凋亡相似, 尽管清除的机制并不相同。衰老细胞的特征是获得衰老相关的分泌表型<sup>[178]</sup>。这种表型受转录因子 NF- $\kappa$ B 信号的分子控制, 其特点是 IL-6、CC-趋化因子配体 2 (CCL2)、TGF $\beta$ 1 等促炎细胞因子和趋化因子的分泌, 共同触发一种促炎反应, 导致免疫细胞对衰老细胞的清除<sup>[179]</sup>。衰老相关的分泌蛋白质组还包括参与组织纤维化形成的促炎介质和生长因子 (如 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、各种 CCLs、TGF- $\beta$ 1、PDGF 和 IL-6), 参与 ECM 转化的蛋白 (如纤维连接蛋白、胶原和 MMPs) 和 ECM 蛋白<sup>[178,180]</sup>。衰老相关的 ECM 和细胞因子在小鼠修复和纤维化模型中都能在促炎免疫细胞和基质细胞中“扩散”衰老<sup>[177,181]</sup>。肌纤维母细胞衰老参与了伤口愈合、组织再生和纤维化的生理过程。在肝再生过程中, 已活化成为肌纤维母细胞的肝星形细胞转化为衰老表型, 有利于其被自然杀伤 (NK) 细胞清除, 抑制肝纤维化的进展<sup>[182]</sup>。同样地, 细胞基质蛋白 Ccn1 诱导肌纤维母细胞衰老, 通过诱导 MMPs 分泌

降解纤维瘢痕组织, 从而抑制皮肤和肝脏瘢痕形成<sup>[183,184]</sup>。

衰老的肌纤维母细胞也参与了肺纤维化的发生和进展<sup>[172,185-189]</sup>。在 IPF 患者中分离出的肺肌纤维母细胞中, p16 和 p21 以 TGF $\beta$ 1 依赖的方式上调, 似乎是通过建立促炎和促纤维化微环境来促进纤维化<sup>[190]</sup>。的确, 作为 DNA 损伤反应的一部分, IPF 肌纤维母细胞的细胞衰老可能收到端粒功能障碍的诱导<sup>[172]</sup>。在人纤维母细胞中, 端粒缩短触发 p53 介导的 p21 上调, 而 p16 表达的上调与端粒和 DNA 损伤无关<sup>[191]</sup>。另外, 抑制端粒酶表达可以促进  $\alpha$ -SMA 表达, 说明复制性衰老与肌纤维母细胞的表型获得有关<sup>[192-194]</sup>。相反, 端粒酶活性的增加促进了  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 纤维母细胞的增殖和存活<sup>[193]</sup>。因此, 缺乏端粒酶逆转录酶的小鼠可减少  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 纤维母细胞的增殖, 使其不受博来霉素的诱导而产生纤维化<sup>[192,195]</sup>。值得注意的是, 即使在没有端粒缩短的情况下, 肌纤维母细胞仍然会发生衰老<sup>[196]</sup>, 这说明在组织纤维化的病理表型背后, 除复制性衰老以外可能还有其他机制存在。例如肺纤维母细胞中的促衰老因子 Ccn1 被 TGF- $\beta$ 1 诱导, 说明非端粒依赖性机制也可以导致肌纤维母细胞获得衰老表型<sup>[196]</sup>。更为重要的是, 基因学方法已经被应用于清除小鼠肺和肾脏中的 p16<sup>+</sup> 衰老细胞, 从而缓解纤维化<sup>[197]</sup>。这些结果<sup>[197]</sup> 均支持使用选择性诱导衰老细胞死亡的药物 (抗衰老药物) 治疗脏器纤维化的观点<sup>[186,198,199]</sup>。但是必须注意的是, 衰老的 (肌) 纤维母细胞似乎在促进正常组织修复和抑制纤维化方面起到有益的作用<sup>[180]</sup>。例如, miR-34a 诱导肌成纤维细胞衰老, 抑制了小鼠疾病模型的肺纤维化<sup>[173]</sup>。如同以往的研究一样, 衰老干预治疗的成功还有待时日。

## 纤维化清除

抗纤维化治疗不一定能够有效恢复脏器功能, 因为纤维化的 ECM 含有促进肌纤维母细胞活化的生物力学和生化因素。为了恢复功能, 这种错构的和“疾病化”的 ECM 需要以调控的方式进行清除或替换为“健康的”ECM<sup>[63,200]</sup>。虽然最初被认为是不可逆转的<sup>[201]</sup>, 已形成的纤维化无论是在小鼠模型中还是在人类纤维化疾病模型中都可以消退——尤其是肝脏<sup>[202]</sup>。虽然肝脏在进入晚期肝硬化阶段时仍然无法治疗, 但有明确证据显示在肝硬化早期至中期, 治疗丙型肝炎病毒感染可使得肝纤维化自发逆转<sup>[203,204]</sup>; ECM 是此过程中的重要环节<sup>[205,206]</sup>。同样, 在酒精中毒、四氯化碳或胆管结扎引起的小鼠肝损伤模型中, 肝纤维化

可自发逆转<sup>[60,207,208]</sup>。在再生能力低于肝脏的脏器中纤维化也可以消退,例如肺<sup>[63,209]</sup>。在急性呼吸综合征患者体内,肺纤维化大量清除<sup>[210,211]</sup>,这一过程模仿了注射细菌壁糖诱导的急性肺损伤小鼠模型的生物学过程<sup>[212]</sup>。尽管在气管内注射博来霉素、石棉纤维或异硫氰酸荧光素等致纤维化损伤的小鼠模型中肺纤维化可迅速消退<sup>[209]</sup>,但IPF或SSc相关ILD患者的进展性肺纤维化在未经治疗的情况下似乎是不可逆的<sup>[213]</sup>。然而,SSc相关ILD随机对照临床试验显示有一类患者肺功能得到改善<sup>[214,215]</sup>,提示存在组织再生或已形成的纤维化消退。临床研究表明,SSc患者皮肤纤维化可自发消退,也可经过治疗后消退<sup>[216,217]</sup>。同样,皮下注射博来霉素诱导的小鼠皮肤纤维化在去除纤维化刺激后不久即消退<sup>[218]</sup>。总而言之,清除纤维化的能力可能是器官特异性的,取决于纤维化刺激的性质以及宿主特异性因素,包括遗传易感性、年龄、性别和免疫能力<sup>[96]</sup>。

纤维化清除的特点是ECM分解,恢复ECM的生物力学和生化特性。尽管已知肌纤维母细胞的靶向凋亡导致小鼠模型的纤维化清除,但调控肌纤维母细胞凋亡后ECM分解和纤维化清除的细胞和分子机制很大程度上仍然是未知的。巨噬细胞、纤维母细胞、NK细胞和中性粒细胞通过分泌MMPs参与损伤后ECM分解<sup>[219]</sup>。主要由交联的I型胶原纤维组成的纤维性瘢痕组织的分解,由胶原酶(MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13, MMP-14, MMP-15和MMP-16)启动,随后由明胶酶、MMP-2和MMP-9以及其他蛋白酶降解,如组织蛋白酶K<sup>[220-222]</sup>。降解后的胶原片段被包括纤维母细胞和巨噬细胞在内的各种类型的细胞所摄取<sup>[223]</sup>。在纤维母细胞中,胶原蛋白片段被C型甘露糖受体2(又称ENDO180)识别<sup>[224-227]</sup>,并以非吞噬作用促进胶原内化和溶酶体降解。另外,纤维母细胞在溶酶体降解前还可以通过 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 和 $\alpha 3\beta 1$ 整合素吞噬大的胶原颗粒<sup>[228-232]</sup>。

**活化的纤维母细胞转化为瘢痕清除细胞。**虽然已知有几种机制可以使肌纤维母细胞失活<sup>[63]</sup>,但对促进肌纤维母细胞在体外和体内转化为瘢痕清除细胞的潜在机制了解较少。事实上,形成瘢痕的肌纤维母细胞重编程为瘢痕清除细胞是生理组织修复过程中瘢痕清除的重要细胞机制(图1a)。纤维母细胞在YAP-TAZ抑制下获得ECM分解表型,这与纤溶酶、MMP-14和组织蛋白酶K等ECM降解酶表达增加有关<sup>[122,231,232]</sup>。支持纤维母细胞在体内分解纤维胶原中起重要作用的证据,来源于发现选择性缺失

*MMP14*的小鼠SSc样纤维化清除功能受损的研究(参考文献<sup>[231]</sup>)。此外,与野生型小鼠相比,组织蛋白酶K缺乏的小鼠肺纤维化程度增加,这与成纤维细胞胶原降解活性降低有关<sup>[232]</sup>。相反地,滑膜纤维母细胞组织蛋白酶K活性过度增加介导RA患者体内的病理性胶原降解<sup>[233]</sup>,这表明纤维母细胞ECM降解酶的时间和空间调控对实现组织稳态至关重要。同时,转录因子PU.1的表达会迅速引起促炎、促ECM降解纤维母细胞转化为形成瘢痕的促纤维化纤维母细胞<sup>[234]</sup>。在SSc小鼠模型中,抑制PU.1可重编程促纤维化的纤维母细胞,促进纤维化清除<sup>[234]</sup>,揭示了一种基于刺激瘢痕清除纤维母细胞的新型抗纤维化治疗策略。然而,从炎症、稳态和纤维化表型谱来评估人体促纤维化纤维母细胞可塑性仍待进一步研究。

#### **巨噬细胞在肌纤维母细胞存活和纤维化清除中的作用。**

虽然纤维母细胞可以吞噬胶原及其他ECM成分,但它们不是专门的吞噬细胞,反而是巨噬细胞在研究中被认为是瘢痕组织清除中专门的吞噬细胞。在巨噬细胞中,胶原蛋白降解产物的识别和内化受胞外桥联糖蛋白乳凝集素(又称MFGE8)的调控,通过其第一个盘状结构域介导胶原摄取和内吞<sup>[235]</sup>。因此,MFGE8缺陷小鼠在博来霉素致肺损伤后,由于巨噬细胞对胶原的清除和摄取存在严重缺陷,导致严重的肺纤维化<sup>[235]</sup>。同样地,胶原蛋白受体甘露糖受体C型1在小鼠稳态过程中参与修复相关巨噬细胞摄取胶原蛋白的过程<sup>[236]</sup>,然而其在纤维化中的作用还不清楚。

胶原蛋白的摄取和降解触发了一种调控机制,其中胶原蛋白的调理和内吞导致胶原降解酶的产生增加,形成ECM降解的正反馈循环<sup>[237]</sup>。然而这些抗纤维化ECM降解机制是否在纤维化清除过程中被重新激活尚不清楚。为证实这种可能,以往有研究表明,凋亡小体可诱导巨噬细胞ECM降解活性,从而促进体内肺或胆道纤维化实验模型中纤维化的降解<sup>[238,238]</sup>。此外尽管小鼠肺中的TNF并不直接针对肌纤维母细胞凋亡,但它仍然通过重新编程促纤维化的 $CD11c^+CD11b^{var}F4/80^+$ 巨噬细胞,使其具有促分解的表型,从而触发肺纤维化的清除<sup>[240]</sup>。因此调节巨噬细胞表型可能成为促进纤维化清除的新策略。其他研究表明, $CD11b^{hi}Ly6C^{lo}F4/80^{int}$ 巨噬细胞具有诱导肌纤维母细胞凋亡和在肝纤维化过程中分泌MMPs的能力,因而具有特别的治疗意义<sup>[241,242]</sup>。此外NK细胞通过促进肌纤维母细胞凋亡在清除肝纤维化中具有重要作用,表达细胞死亡配体TRAIL和FASL的NK细胞触发肝星形细胞凋亡的外源



性途径, 最终促进纤维化的清除<sup>[243,244]</sup>。总而言之, 纤维化的清除与促分解的巨噬细胞和 NK 细胞的激活有关, 它们促进 ECM 降解、胶原摄取和肌纤维母细胞的免疫清除。诱导肌纤维母细胞凋亡或免疫系统重编程的靶向治疗在体内可使这些机制重新激活。复杂的生物力学和生化巨噬细胞-肌纤维母细胞相互作用是否参与促进肌纤维母细胞和巨噬细胞的存活以及纤维化的清除, 这个结论将会非常有趣<sup>[31,245-247]</sup>。

### 逆转纤维化的策略

令人兴奋的是, 肌纤维母细胞和纤维化的研究进展催生了几种新的治疗方法, 并揭示了治疗纤维化疾病新的潜在靶点, 包括与 SSc 相关的靶点<sup>[1,30,94,248]</sup>。以肌纤维母细胞凋亡为靶点, 正逐渐成为逆转纤维化的新的治疗策略之一<sup>[86,126,185]</sup>。这一部分我们将讨论诱导肌纤维母细胞凋亡的新的治疗策略背后的分子机制(表 2)。这些策略不仅可能阻止器官纤维化的进展, 而且可能逆转已形成的纤维化。

**以生物力学信号为靶点的药物。**激活的纤维母细胞重塑 ECM 加剧组织硬化的进展, 进而为肌纤维母细胞的功能和表型提供生物力学反馈调控<sup>[103,249]</sup>。简单地说, 肌纤维母细胞通过其细胞骨架的机械感应和机械传导, 使其收缩力适应所承受的阻力(图 4a)。该机制的多个组成分子已被认为和证实为治疗靶点, 通过使肌纤维母细胞恢复到松弛状态或诱导其凋亡来中断纤维化循环<sup>[120,122-126,129,250-255]</sup>。

例如, 用特异性乙酰化四肽(Ac-EEED)直接抑制 $\alpha$ -SMA 应力纤维, 可在体外减少肌纤维母细胞收缩和下游的 COL1A1 转录<sup>[256]</sup>。使用小分子抑制剂或生物制剂对肌纤维母细胞整合素进行治疗性阻断, 可能通过降低 $\alpha$ v 整合素介导的 TGF $\beta$ 1 活化和干扰肌纤维母细胞的机械感知而产生双重效应<sup>[114,257-260]</sup>。抑制或敲除转录因子 MRTF-A 可在培养的细胞中抑制纤维生成和在体内抑制皮肤、肺、结肠和心脏纤维化的进展<sup>[253,261-263]</sup>。针对 TAZ 和 YAP 的靶向治疗可改善小鼠皮肤纤维化<sup>[264]</sup>。同样, 应用小分子药物抑制 FAK 和 ROCK 的机械传递途径可诱导肌纤维母细胞凋亡, 已在各种实验模型中被用于纤维化的治疗<sup>[126,135,147,152,265-271]</sup>(表 2)。

**以内源性凋亡通路为靶点的药物。**研究发现, 促纤维化肌纤维母细胞凋亡线粒体启动增加, 为这些细胞通过促凋亡途径在纤维化疾病中成为治疗靶点奠定了基础<sup>[86,87]</sup>。近年来的研究表明, 诱导肌纤维母细胞凋亡可以逆转疾病

模型小鼠的组织纤维化<sup>[86,126,160,185]</sup>, 该方法有望成为逆转纤维化疾病的一种新的治疗策略。BH3 模拟药物可通过靶向特异性促存活的 BCL-2 家族蛋白选择性地促进肌纤维母细胞内固有的凋亡途径。更为重要的是, 只有启动死亡程序的细胞以及线粒体中促凋亡蛋白含量增加的细胞才对这些药物敏感。

BH3 模拟药物是通过直接与促存活的 BCL-2 家族蛋白中浅而疏水的沟槽结构结合而抑制促存活蛋白与激活蛋白或效应蛋白<sup>[64,65]</sup>之间相互作用的小分子药物。个体间促存活 BCL-2 家族蛋白中这种疏水沟槽结构的差异, 对于针对特异性抗凋亡蛋白的选择性 BH3 模拟药物的设计和开发具有指导作用<sup>[65]</sup>。多种 BH3 模拟药物已经进入了临床前期研究, 目前有几个正在进行各种癌症的临床试验。ABT-737 和其口服类似物 ABT-263 (维奈托克) 通过亚纳米级亲和力结合和阻断 BCL-2、BCL-X<sub>L</sub> 和 BCL-W<sup>[272,273]</sup>。在 SSc 小鼠真皮纤维化模型中, ABT-263 可选择性诱导真皮纤维化区域的肌纤维母细胞凋亡, 从而逆转纤维化<sup>[86]</sup>。ABT-263 还促进 PDGF 活化的肝星形细胞<sup>[157,158]</sup>和衰老的肺纤维母细胞<sup>[274]</sup>凋亡, 在小鼠中 ABT-263 可逆转辐射诱导的肺纤维化<sup>[275]</sup>。同样地, BCL-X<sub>L</sub> 特异性 BH3 模拟药 A-1331852 通过促进肝肌纤维母细胞凋亡, 逆转 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠的胆汁性肝纤维化<sup>[276]</sup>。由于 BCL-X<sub>L</sub> 在促进肌纤维母细胞抗凋亡方面具有重要作用, 因此抑制 BCL-X<sub>L</sub> 可能成为 SSc 及其他纤维化疾病的有效治疗策略。

但 BH3 模拟药物的潜在不良影响需要被充分考虑。例如, 与完全分化的体细胞相比, 在体外的人类胚胎干细胞线粒体启动能力增强, 存活率降低<sup>[277]</sup>, 这种机制通过诱导受损干细胞凋亡来阻止基因突变的传播。虽然这些体外研究表明, BH3 模拟治疗可能会由于这些细胞的高凋亡倾向而破坏干细胞稳态的平衡, 但体内研究表明, BH3 模拟治疗通过诱导衰老的造血干细胞(HSCs)凋亡而神奇地使早衰的小鼠恢复活力<sup>[278]</sup>。因此, 线粒体启动似乎直接受干细胞衰老的调控, 事实上, 与衰老小鼠 HSC 相比, 年轻小鼠 HSC 的线粒体启动增加<sup>[279]</sup>。但在稳态和年龄相关性纤维化疾病中, 组织特异性干细胞中的线粒体启动是如何被调控的, BH3 模拟治疗可能在组织修复和纤维化疾病的背景下对干细胞生物学产生何种潜在影响尚需进一步研究。

BH3 模拟药物 ABT-263 引起可逆性剂量相关血小板减少的事实<sup>[273]</sup>也限制了其在血液科恶性肿瘤治疗中的应用,

表 2. 针对肌纤维母细胞的治疗策略

治疗	靶点	肌纤维母细胞效应	展示抗纤维化作用的小鼠模型	研发阶段	参考文献
<b>针对生物力学信号的药物</b>					
CWHM12	$\alpha$ V 整合素	抑制 TGF $\beta$ 活性	CCL4- 诱导肝纤维化; 博来霉素诱导肺纤维化	临床前期	115
阿比妥珠单抗	$\alpha$ V 整合素	抑制 TGF $\beta$ 活性	无试验	II 期	303
C8	$\alpha$ V $\beta$ 1 整合素	抑制 TGF $\beta$ 活性	博来霉素诱导肺纤维化; CCL4 诱导肝纤维化	临床前期	304
西仑吉肽	$\alpha$ V $\beta$ 3 和 $\alpha$ V $\beta$ 5 整合素	抑制机械传导	胆管结扎诱导肝纤维化	临床前期	305
6.3G9( STX-100 )	$\alpha$ V $\beta$ 6 整合素	抑制 TGF $\beta$ 活性	博来霉素诱导肺纤维化; 放射诱导肺纤维化; 胆管结扎诱导肝纤维化; DDC 诱导肝纤维化; Alport 小鼠模型 <i>Col4A3</i> <sup>-/-</sup>	II 期	306-311
PF-562, 271 ( VS-6062 )	FAK	抑制机械传导	博来霉素诱导肺纤维化; CCL4 诱导肝纤维化; 急性心肌梗死	临床前期	135,312
PF-573, 228	FAK	抑制机械传导	博来霉素诱导肺纤维化; 增生性皮肤病痕形成; 急性心肌梗死	临床前期	267,269, 313
TAE226	FAK	抑制机械传导	博来霉素诱导肺纤维化	临床前期	265
VS-4718	FAK	抑制机械传导	胰腺导管腺癌	II 期	266,314
法舒地尔 ( ROCK1 和 ROCK2 )	ROCK	抑制机械传导	缺氧诱导肺纤维化; 博来霉素诱导肺纤维化; 次氯酸诱导皮肤纤维化; UUO 诱导肾脏纤维化	临床前期	315-319
松弛素	ROCK	抑制机械传导	博来霉素诱导肺纤维化	III 期	271,320
KD025 ( ROCK2 )	ROCK	抑制机械传导	未试验	II 期	321
CCG-1423	MRTF-A 和 MRTF-B	抑制机械传导	腹膜纤维化模型	临床前期	322
CCG-203971	MRTF-A 和 MRTF-B	抑制机械传导	博来霉素诱导肺纤维化; 博来霉素诱导皮肤纤维化	临床前期	262,323
维替泊芬	YAP 和 TAZ	抑制机械传导	UUO 诱导肾脏纤维化	临床前期	324
富马酸二甲酯	YAP 和 TAZ	抑制机械传导	博来霉素诱导皮肤纤维化	I 期	264,325
Ac-EEED 肽	$\alpha$ -SMA	抑制机械传导	全层夹板皮肤伤口愈合模型	临床前期	256
<b>针对内源性凋亡途径的药</b>					
ABT-263 ( 维奈托克 )	BCL-X <sub>L</sub> , BCL-2 和 BCL-W	激活内源性凋亡途径	博来霉素诱导皮肤纤维化; 放射诱导肺纤维化	临床前期	86,275
A-1331852	BCL-X <sub>L</sub>	激活内源性凋亡途径	<i>Mdr2</i> <sup>-/-</sup> 啮齿类动物原发性硬化性胆管炎模型	临床前期	158
<b>针对外源性凋亡途径的药物</b>					
AT-406	XIAP	激活外源性凋亡通路	博来霉素诱导肺纤维化	临床前期	138
TLY012	TRAIL	激活外源性凋亡通路	博来霉素诱导皮肤纤维化; CCL4 诱导肝纤维化	临床前期	285,286
<b>针对衰老的药物</b>					
达沙替尼和槲皮素 双重治疗	多个激酶	激活凋亡通路	博来霉素诱导肺纤维化	I 期	186,326
ABT-263 和 A-1331852	BCL-X <sub>L</sub>	激活内源性凋亡通路	放射诱导肺纤维化; <i>Mdr2</i> <sup>-/-</sup> 啮齿类动物原发性硬化性胆管炎模型	临床前期	158,275
GKT137831	NOX4	激活凋亡途径	博来霉素诱导肺纤维化	II 期	185,327

$\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; CCL4, CC- 趋化因子配体 4; DDC, 3, 5- 二乙氧羰基-1, 4- 二氢三甲吡啶; FAK, 局部粘附激酶; HCIO, 次氯酸; MRTF, 心肌相关转录因子; NOX4, NADPH 氧化酶; ROCK, RHO 相关蛋白激酶; TAZ, 具有 PDZ 结合域的转录共激活因子; TGF $\beta$ , 转录生长因子  $\beta$ ; TRAIL, TNF 相关凋亡诱导配体 ( 也称为 TNFSF10 ); UUO, 单侧输尿管梗阻; XIAP, X 连锁 IAP; YAP, yes 相关蛋白。

说明要达到治疗疗效需要更高的剂量。慢性淋巴细胞白血病中 ABT-263 的靶蛋白是 BCL-2, 而不是 BCL-X<sub>L</sub>, 这促进了 BCL-2 特异性 BH3 模拟药物的研发, 如 ABT-199。ABT-199 不损伤血小板, 已被 FDA 批准用于治疗特定染色体异常的慢性淋巴细胞白血病患者<sup>[280,281]</sup>。重要的是, 实体肿瘤, 尤其是癌症相关纤维母细胞, 依靠 BCL-X<sub>L</sub> 存活, 而不是 BCL-2, 因此在促纤维增生肿瘤中应用 BCL-X<sub>L</sub> 特异性 BH3 模拟药物 (如 ABT-263) 靶向阻断 BCL-X<sub>L</sub> 将引起研究者持久的兴趣<sup>[282]</sup>。考虑到血小板减少的可逆性和导致血小板耗竭所需的高剂量 (100 mg/kg 以上), 血小板减少的风险似乎可以控制。

总的来说, 用 BH3 模拟药物靶向活化肌纤维母细胞的凋亡通路可逆转皮肤、肺和肝纤维化临床前模型中已形成的纤维化, 说明这些药物可能是一种选择性、安全和有效的逆转脏器纤维化的抗纤维化工具 (表 2)。然而, 证明 BH3 模拟药物在纤维化疾病中的有效性仍需更多的临床研究。

**以外源性凋亡通路为靶点的药物。**与受到越来越多证据支持的以肌纤维母细胞内源性凋亡途径为靶点的药物不同, 人们对以外源性途径为靶点控制肌纤维母细胞凋亡的潜能了解较少。先前的研究发现在促纤维化的纤维母细胞中, TNF 受体 I 和 II 的表达减少, 对 FASL 诱导和 TNF 诱导的凋亡敏感性降低<sup>[160-162,283,284]</sup>。尽管这些研究结果提示肌纤维母细胞的外源性凋亡途径通常会被抑制, 不能用于治疗干预, 但仍可通过激活 TRAIL 死亡受体途径触发外源性凋亡。在此机制中, TGFβ1 介导的肌纤维母细胞活化导致 TRAIL 受体 DR4 和 DR5 表达增加。因此, 重组 TRAIL 配体 TLY012 选择性地拮抗 DR4 和 DR5 诱导肌纤维母细胞凋亡, 逆转小鼠纤维化模型中已形成的肝和皮肤纤维化<sup>[285,286]</sup>, 凸显了通过激活外源性凋亡途径靶向诱导肌纤维母细胞凋亡的治疗潜力 (表 2)。

**以衰老为靶点的药物。**抗衰老药物被定义为能够通过以这些细胞中的促生存通路为靶点诱导衰老细胞凋亡的治疗药物<sup>[175,176,287,288]</sup>。第一类抗衰老药物包括达沙替尼和槲皮素<sup>[289]</sup>, 联合给药 (D+Q 治疗) 可改善纤维化模型小鼠的肺功能, 部分减轻肺纤维化<sup>[186,199,290]</sup>。此外, 槲皮素可以恢复 FASL 诱导的 IPF 中纤维母细胞凋亡敏感性的下降<sup>[291]</sup>, 说明抗衰老药物可能是治疗 IPF 及其他年龄相关性疾病的有效药物。值得注意的是, 人们对 D+Q 治疗的抗衰老活性背后的作用机制仍不清楚。达沙替尼是一种

ATP 竞争性抑制剂, 以包括 BCR-ABL、c-KIT、ephrin 受体、SRC、LYN 和 LCK 在内的多个激酶为靶点<sup>[292-294]</sup>, 而槲皮素是一种天然黄酮类化合物, 存在于多种食品中, 具有强大的抗氧化作用, 可调节 NF-κB 和 PI3K-AKT 通路<sup>[295,296]</sup>。几项研究也表明, D+Q 治疗仅能清除 30% 的衰老细胞<sup>[289]</sup>, 说明其针对的只是一个目前尚未确认的衰老细胞亚类。

对衰老细胞存活和堆积的分子基础认识的进展, 推动了以促存活的 BCL-2 家族蛋白为靶点的新一代促进衰老细胞凋亡的抗衰老药物的研发。无论是何种因素诱导了 DNA 损伤 (DNA 损伤诱导的衰老、复制性衰老或癌基因诱导的衰老), 人纤维母细胞的衰老都依赖于 BCL-X<sub>L</sub> 和 BCL-W 的表达<sup>[274]</sup>。据此, 用 BH3 模拟物 ABT-737 阻断 BCL-X<sub>L</sub> 和 BCL-W, 可诱导小鼠肺 DNA 损伤后形成的衰老细胞凋亡<sup>[274]</sup>。BCL-X<sub>L</sub> 特异性模拟药物 A1331852 通过靶向诱导衰老胆管细胞凋亡, 减轻体内肝纤维化<sup>[158]</sup>。此外, ABT-263 在小鼠早衰模型中表现出强大的抗衰老活性<sup>[278,297]</sup>。综上所述, ABT-263 具有良好的抗衰老和抗纤维化作用, 说明该 BH3 模拟药物逆转脏器纤维化的作用可能是通过对衰老肌纤维母细胞的特异性“抗纤维 - 抗衰老”作用引起的。有趣的是, 超氧生成酶 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 在衰老的肺纤维母细胞中被诱导, 通过抑制 NOX4 靶向诱导衰老纤维母细胞凋亡, 从而逆转衰老小鼠的肺纤维化<sup>[185]</sup>。总体而言, 这些令人兴奋的临床前数据表明, 用抗纤维化 - 抗衰老药物靶向诱导衰老肌纤维母细胞凋亡对于逆转已形成的纤维化的具有潜在疗效。据此, 2019 年发表了第一项评价抗衰老药物对 IPF 疗效的非人类临床试验结果 (表 2)。在这项先探性研究中, 在纳入 14 例 IPF 患者的小型队列中, D+Q 治疗 3 周改善了患者病情 (通过 6 分钟步行试验和步行速度评估)<sup>[298]</sup>。尽管这些数据很有前景, 我们对结果的解读仍需谨慎, 并且还需要进一步的研究。

## 结论

器官纤维化是 SSc 的致死性结局, 是一种以瘢痕形成肌纤维母细胞持续活化为特征的自身免疫性风湿病。对促进和维持肌纤维母细胞活化的机制的深入研究揭示了新的治疗靶点, 并促使人们开发出有前景的治疗纤维化的第一代抗纤维化治疗—此前纤维化被认为是进行性的、不可逆的。因此, 基于临床前模型中显示出的延缓纤维化进展的能力, 越来越多的小分子和生物制剂已经进入 II 期临床试验阶段。然而, 抗纤维化的治疗并不一定能有效地恢复器



官功能，研究人员一直在研究清除纤维化的机制以及如何重新激活慢性损伤器官的再生能力，以尽力恢复纤维化器官的功能。

在已形成的纤维化中，肌纤维母细胞的持续存在而非活化，似乎是抑制组织再生的疾病机制。肌纤维母细胞通过激活促存活机制来应对来自纤维化微环境的生物力学和生长因子信号，从而逃避死亡。肌纤维母细胞的慢性激活最终可导致衰老表型的获得。此外，（衰老）肌纤维母细胞是由于细胞死亡信号通路的同步激活而启动凋亡，不是抗凋亡。对凋亡启动的认识，为通过阻断特异性促存活 BCL-2 家族蛋白来特异性触发肌纤维母细胞凋亡的研究铺平了道路。以机制为基础的治疗策略通过以生物力学信号为靶点降低促存活蛋白的表达以及 BH3 模拟药物和抗衰老药物直接抑制 BCL-2 家族蛋白的表达，诱导肌纤维母细胞凋亡，逆转小鼠疾病模型中已形成的纤维化。这些不断积

累的研究为第二代抗纤维化药物的发展奠定了基础，这些药物具有逆转已形成的纤维化和促进慢性损伤组织再生的潜力。

人类研究表明，在肝硬化和真皮 SSc 等纤维化疾病中，已形成的纤维化可以消退，这证明了人们最初对此类药物的热情是合理的。由于 ECM 降解是逆转纤维化过程中的重要事件，因此需要进一步努力了解在纤维化清除过程中控制 ECM 降解的细胞和分子机制。巨噬细胞等专门的吞噬细胞在 ECM 降解过程中对清除（衰老）肌纤维母细胞发挥重要作用。或者形成瘢痕的肌纤维母细胞可能被重新编程为瘢痕清除细胞，通过利用纤维母细胞合成和降解 ECM 的天然能力，促进 ECM 降解。未来对于促进纤维化清除机制的研究将增加我们对这一过程的分子和细胞层面的理解，为逆转脏器纤维化带来潜在的新的治疗策略。

在线发表于 2019 年 12 月 2 日

参考文献

- Ho, Y.Y., Lagares, D., Tager, A. M. & Kapoor, M. Fibrosis – a lethal component of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 390–402 (2014).
- Smolen, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **4**, 18001 (2018).
- Bongartz, T. et al. Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* **62**, 1583–1591 (2010).
- Allanore, Y. et al. Systemic sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **1**, 15002 (2015).
- Trojanowska, M. & Varga, J. In *Scleroderma* (eds Varga, J., Wigley, F., Allanore, Y. & Kuwana, M.) 261–280 (Springer, 2017).
- Steen, V. D. & Medsger, T. A. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 940–944 (2007).
- Wells, A. U. & Denton, C. P. Interstitial lung disease in connective tissue disease – mechanisms and management. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 728–739 (2014).
- Distler, O. et al. Nintedanib for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* **380**, 2518–2528 (2019).
- US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01933334> (2016).
- US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03068234> (2017).
- US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03856853> (2019).
- US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03221257> (2019).
- King, T. E. Jr. et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2083–2092 (2014).
- Kumar, A., Kapnadak, S. G., Girsig, R. E. & Raghu, G. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert. Rev. Respir. Med.* **12**, 375–385 (2018).
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
- van Caam, A., Vonk, M., vanden Hoogen, F., van Lent, P. & van der Kraan, P. Unraveling SSc pathophysiology: the myofibroblast. *Front. Immunol.* **9**, 2452 (2018).
- Hinz, B. et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* **170**, 1807–1816 (2007).
- Marangoni, R. G. et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1062–1073 (2015).
- Rajkumar, V. S. et al. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R1113–R1123 (2005).
- Philippeos, C. et al. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 811–825 (2018).
- Jiang, D. et al. Two succeeding fibroblastic lineages drive dermal development and the transition from regeneration to scarring. *Nat. Cell Biol.* **20**, 422–431 (2018).
- Harper, R. A. & Grove, G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro. *Science* **204**, 526–527 (1979).
- Sorrell, J. M. & Caplan, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* **117**, 667–675 (2004).
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 802–812 (2014).
- Tallquist, M. D. & Molkenin, J. D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 484–491 (2017).
- Hinz, B. & Suki, B. Does breathing amplify fibrosis? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 9–11 (2016).
- Lambert, C. A., Colige, A. C., Munaut, C., Lapiere, C. M. & Nusgens, B. V. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.* **20**, 397–408 (2001).
- Leung, D. Y., Glagov, S. & Mathews, M. B. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* **191**, 475–477 (1976).
- Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801 (2014).
- Hinz, B. Myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* **142**, 56–70 (2016).
- Pakshir, P. & Hinz, B. The big five in fibrosis: macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* **68**, 91–93 (2018).
- Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majno, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**, 549–550 (1971).
- Talele, N. P., Fradette, J., Davies, J. E., Kapus, A. & Hinz, B. Expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin determines the fate of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rep.* **4**, 1016–1030 (2015).
- Farbehi, N. et al. Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *eLife* **8**, e43882 (2019).
- Guerrero-Juarez, C. F. et al. Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. *Nat. Commun.* **10**, 650 (2019).
- Xie, T. et al. Single-cell deconvolution of fibroblast heterogeneity in mouse pulmonary fibrosis. *Cell Rep.* **22**, 3625–3640 (2018).
- Tabib, T., Morse, C., Wang, T., Chen, W. & Lafyatis, R. SFRP2/DPP4 and FMO1/LSP1 define major fibroblast populations in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 802–810 (2018).
- Peysner, R. et al. Defining the activated fibroblast population in lung fibrosis using single cell sequencing. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **61**, 74–85 (2019).
- Bartoschek, M. et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat. Commun.* **9**, 5150 (2018).
- Lambrechts, D. et al. Phenotype moulding of stromal cells in the lung tumour microenvironment. *Nat. Med.* **24**, 1277–1289 (2018).
- Murray, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
- Park, J. et al. The Tcf21 lineage constitutes the lung lipofibroblast population. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **316**, L872–L885 (2019).
- Li, R. et al. Pdgfra marks a cellular lineage with distinct contributions to myofibroblasts in lung maturation and

- injury response. *eLife* **7**, e36865 (2018).
44. Zepp, J. A. et al. Distinct mesenchymal lineages and niches promote epithelial self-renewal and myofibrogenesis in the lung. *Cell* **170**, 1134–1148 e1110 (2017).
  45. Falke, L. L., Gholizadeh, S., Goldschmeding, R., Kok, R. J. & Nguyen, T. Q. Diverse origins of the myofibroblast—implications for kidney fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 233–244 (2015).
  46. Affo, S., Yu, L. X. & Schwabe, R. F. The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **12**, 153–186 (2017).
  47. Schneider, R. K. et al. Gli1<sup>+</sup> mesenchymal stromal cells are a key driver of bone marrow fibrosis and an important cellular therapeutic target. *Cell Stem Cell* **20**, 785–800 e788 (2017).
  48. Di Carlo, S. E. & Peduto, L. The perivascular origin of pathological fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **128**, 54–63 (2018).
  49. Lynch, M. D. & Watt, F. M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 26–35 (2018).
  50. Liu, S., Herault, Y., Pavlovic, G. & Leask, A. Skin progenitor cells contribute to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 707–713 (2014).
  51. Driskell, R. R. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* **504**, 277–281 (2013).
  52. Rinkevich, Y. et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* **348**, aaa2151 (2015).
  53. Croft, A. P. et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* **570**, 246–251 (2019).
  54. Fu, X. et al. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J. Clin. Invest.* **128**, 2127–2143 (2018).
  55. Rognoni, E. et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol. Syst. Biol.* **14**, e8174 (2018).
  56. El Agha, E. et al. Two-way conversion between lipogenic and myogenic fibroblastic phenotypes marks the progression and resolution of lung fibrosis. *Cell Stem Cell* **20**, 261–273 e263 (2017).
  57. Sanchez-Iranzo, H. et al. Transient fibrosis resolves via fibroblast inactivation in the regenerating zebrafish heart. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 4188–4193 (2018).
  58. Jun, J. I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* **12**, 676–685 (2010).
  59. Demaria, M. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
  60. Kisseleva, T. et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9448–9453 (2012).
  61. Schuppan, D., Surabattula, R. & Wang, X. Y. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J. Hepatol.* **68**, 238–250 (2018).
  62. Jun, J. I. & Lau, L. F. Resolution of organ fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 97–107 (2018).
  63. Glasser, S. W. et al. Mechanisms of lung fibrosis resolution. *Am. J. Pathol.* **186**, 1066–1077 (2016).
  64. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59 (2008).
  65. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
  66. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
  67. Nagata, S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 489–517 (2018).
  68. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059–1070 (2010).
  69. Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 151–164 (2017).
  70. Saraste, A. & Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **45**, 528–537 (2000).
  71. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
  72. Morioka, S., Maueroeder, C. & Ravichandran, K. S. Living on the edge: efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology. *Immunity* **50**, 1149–1162 (2019).
  73. Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 175–193 (2019).
  74. Kantari, C. & Walczak, H. Caspase-8 and Bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 558–563 (2011).
  75. Darby, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* **63**, 21–29 (1990).
  76. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I. & Gabbiani, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.* **146**, 56–66 (1995).
  77. Zhang, H. Y. & Phan, S. H. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor  $\beta$ 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 658–665 (1999).
  78. Bostrom, H. et al. PDGF-A signalling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* **85**, 863–873 (1996).
  79. Ishiguro, S. et al. Basic fibroblast growth factor induces down-regulation of alpha-smooth muscle actin and reduction of myofibroblast areas in open skin wounds. *Wound Repair Regen.* **17**, 617–625 (2009).
  80. Ramos, C. et al. Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L871–L879 (2006).
  81. Mizuno, S., Matsumoto, K., Li, M. Y. & Nakamura, T. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J.* **19**, 580–582 (2005).
  82. Saile, B., Knittel, T., Matthes, N., Schott, P. & Ramadori, G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am. J. Pathol.* **151**, 1265–1272 (1997).
  83. Iredale, J. P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**, 538–549 (1998).
  84. Thannickal, V. J. & Horowitz, J. C. Evolving concepts of phenotype in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**, 350–356 (2006).
  85. Fattman, C. L. Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 379–385 (2008).
  86. Lagares, D. et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaa3765 (2017).
  87. Kuehl, T. & Lagares, D. BH3 mimetics as anti-fibrotic therapy: unleashing the mitochondrial pathway of apoptosis in myofibroblasts. *Matrix Biol.* **68–69**, 94–105 (2018).
  88. Del Gaizo Moore, V. et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* **117**, 112–121 (2007).
  89. Deng, J. et al. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic block to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* **12**, 171–185 (2007).
  90. Ryan, J. A., Brunelle, J. K. & Letai, A. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 12895–12900 (2010).
  91. Certo, M. et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**, 351–365 (2006).
  92. Ryan, J. A., Brunelle, J. K. & Letai, A. Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 12895–12900 (2010).
  93. Chonghaile, T. N. et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* **334**, 1129–1133 (2011).
  94. Volkmann, E. R. & Varga, J. Emerging targets of disease-modifying therapy for systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **15**, 208–224 (2019).
  95. Balestrini, J. L., Chaudhry, S., Sarrazy, V., Koehler, A. & Hinz, B. The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integr. Biol.* **4**, 410–421 (2012).
  96. Horowitz, J. C. & Thannickal, V. J. Mechanisms for the resolution of organ fibrosis. *Physiology* **34**, 43–55 (2019).
  97. Verrecchia, F. & Mauviel, A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3056–3062 (2007).
  98. Serini, G. et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J. Cell Biol.* **142**, 873–881 (1998).
  99. Leask, A. & Abraham, D. J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem. Cell Biol.* **81**, 355–363 (2003).
  100. Lagares, D. et al. ADAM10-mediated ephrin-B2 shedding promotes myofibroblast activation and organ fibrosis. *Nat. Med.* **23**, 1405–1415 (2017).
  101. Wu, B., Rockel, J. S., Lagares, D. & Kapoor, M. Ephrins and Eph receptor signalling in tissue repair and fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **21**, 23 (2019).
  102. Santos, A. & Lagares, D. Matrix stiffness: the conductor of organ fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **20**, 2 (2018).
  103. Hinz, B., McCulloch, C. A. & Coelho, N. M. Mechanical regulation of myofibroblast phenocconversion and collagen contraction. *Exp. Cell Res.* **379**, 119–128 (2019).
  104. Parker, M. W. et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J. Clin. Invest.* **124**, 1622–1635 (2014).
  105. Liu, F. et al. Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *J. Cell Biol.* **190**, 693–706 (2010).
  106. Hinz, B. Tissue stiffness, latent TGF-beta1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **11**, 120–126 (2009).
  107. Tschumperlin, D. J., Ligresti, G., Hilscher, M. B. & Shah, V. H. Mechanosensing and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 74–84 (2018).
  108. Herrera, J., Henke, C. A. & Bitterman, P. B. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 45–53 (2018).
  109. Burgess, J. K., Mauad, T., Tjin, G., Karlsson, J. C. & Westergren-Thorsson, G. The extracellular matrix – the under-recognized element in lung disease? *J. Pathol.* **240**, 397–409 (2016).
  110. Lampi, M. C. & Reinhart-King, C. A. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: from molecular mechanisms to clinical trials. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaa0475 (2018).
  111. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 526–537 (2007).
  112. Klingberg, F. et al. Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF-beta1 for activation. *J. Cell Biol.* **207**, 283–297 (2014).
  113. Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J. & Hinz, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **179**, 1311–1323 (2007).
  114. Reed, N. I. et al. The alpha beta 1 integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 288ra279 (2015).
  115. Henderson, N. C. et al. Targeting of alpha v integrin

- identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat. Med.* **19**, 1617–1624 (2013).
116. Zhao, X. H. et al. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signalling pathway. *J. Cell Sci.* **120**, 1801–1809 (2007).
  117. Speight, P., Kofler, M., Szasz, K. & Kapus, A. Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGFbeta-regulated Smad3. *Nat. Commun.* **7**, 11642 (2016).
  118. Varney, S. D. et al. Hic-5 is required for myofibroblast differentiation by regulating mechanically dependent MRTF-A nuclear accumulation. *J. Cell Sci.* **129**, 774–787 (2016).
  119. Calvo, F. et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**, 637–646 (2013).
  120. Speight, P., Nakano, H., Kelley, T. J., Hinz, B. & Kapus, A. Differential topical susceptibility to TGFbeta in intact and injured regions of the epithelium: key role in myofibroblast transition. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3326–3336 (2013).
  121. Piersma, B. et al. YAP1 is a driver of myofibroblast differentiation in normal and diseased fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **185**, 3326–3337 (2015).
  122. Liu, F. et al. Mechanosignalling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **308**, L344–L357 (2015).
  123. Piersma, B. et al. YAP1 is a driver of myofibroblast differentiation in normal and diseased fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **185**, 3326–3337 (2015).
  124. Szeto, S. G. et al. YAP/TAZ are mechanoregulators of TGFbeta-Smad signalling and renal fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 3117–3128 (2016).
  125. Chen, H. et al. Mechanosensing by the alpha6-integrin confers an invasive fibroblast phenotype and mediates lung fibrosis. *Nat. Commun.* **7**, 12564 (2016).
  126. Zhou, Y. et al. Inhibition of mechanosensitive signalling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1096–1108 (2013).
  127. Nardone, G. et al. YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat. Commun.* **8**, 15321 (2017).
  128. Sabra, H. et al. Beta1 integrin-dependent Rac/group I PAK signaling mediates YAP activation of Yes-associated protein 1 (YAP1) via NF2/merlin. *J. Biol. Chem.* **292**, 19179–19197 (2017).
  129. Martin, K. et al. PAK proteins and YAP-1 signalling downstream of integrin beta-1 in myofibroblasts promote liver fibrosis. *Nat. Commun.* **7**, 12502 (2016).
  130. Grinnell, F., Zhu, M., Carlson, M. A. & Abrams, J. M. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp. Cell Res.* **248**, 608–619 (1999).
  131. Niland, S. et al. Contraction-dependent apoptosis of normal dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 686–692 (2001).
  132. Carlson, M. A., Longaker, M. T. & Thompson, J. S. Wound splinting regulates granulation tissue survival. *J. Surg. Res.* **110**, 304–309 (2003).
  133. Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C. E., Chaponnier, C. & Gabbiani, C. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.* **159**, 1009–1020 (2001).
  134. Li, C. X. et al. MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells. *Nat. Mater.* **16**, 379–389 (2017).
  135. Lagares, D. et al. Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis. Rheum.* **64**, 1653–1664 (2012).
  136. Ajayi, I. O. et al. X-linked inhibitor of apoptosis regulates lung fibroblast resistance to Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 86–95 (2013).
  137. Horowitz, J. C. et al. Survivin expression induced by endothelin-1 promotes myofibroblast resistance to apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 158–169 (2012).
  138. Ashley, S. L. et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins protects from bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **54**, 482–492 (2016).
  139. Jafarinejad-Farsangi, S. et al. MicroRNA-29a induces apoptosis via increasing the Bax:Bcl-2 ratio in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* **48**, 369–378 (2015).
  140. Cavarretta, E. & Condorelli, G. miR-21 and cardiac fibrosis: another brick in the wall? *Eur. Heart J.* **36**, 2139–2141 (2015).
  141. Huang, Y., He, Y. & Li, J. MicroRNA-21: a central regulator of fibrotic diseases via various targets. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 2236–2242 (2015).
  142. Wang, T. et al. miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process. *Am. J. Pathol.* **181**, 1911–1920 (2012).
  143. Chen, Z., Dai, T., Chen, X., Tan, L. & Shi, C. Activation and regulation of the granulation tissue derived cells with stemness-related properties. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 85 (2015).
  144. Thum, T. & Lorenzen, J. M. Cardiac fibrosis revisited by microRNA therapeutics. *Circulation* **126**, 800–802 (2012).
  145. Chau, B. N. et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci. Transl. Med.* **4**, 121ra118 (2012).
  146. Jun, J. B. et al. Scleroderma fibroblasts demonstrate enhanced activation of Akt (protein kinase B) in situ. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 298–303 (2005).
  147. Lagares, D., Busniedego, O., Garcia-Fernandez, R. A., Lamas, S. & Rodriguez-Pascual, F. Adenoviral gene transfer of endothelin-1 in the lung induces pulmonary fibrosis through the activation of focal adhesion kinase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 834–842 (2012).
  148. Lagares, D. et al. Endothelin 1 contributes to the effect of transforming growth factor beta1 on wound repair and skin fibrosis. *Arthritis. Rheum.* **62**, 878–889 (2010).
  149. Kulasekaran, P. et al. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 484–493 (2009).
  150. Kulkarni, A. A. et al. PPAR-gamma ligands repress TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS ONE* **6**, e15909 (2011).
  151. Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J. & Henke, C. A. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta1 integrin viability signalling pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 33024–33034 (2004).
  152. Horowitz, J. C. et al. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal.* **19**, 761–771 (2007).
  153. Horowitz, J. C. et al. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 1359–1367 (2004).
  154. Jelaska, A. & Korn, J. H. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis. Rheum.* **43**, 2230–2239 (2000).
  155. Zhang, L., Zhou, F. & Ten Dijke, P. Signalling interplay between transforming growth factor-beta receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends. Biochem. Sci.* **38**, 612–620 (2013).
  156. Karimizadeh, E. et al. c-Abl silencing reduced the inhibitory effects of TGF-beta1 on apoptosis in systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* **405**, 169–176 (2015).
  157. Rizvi, S. et al. Platelet-derived growth factor primes cancer-associated fibroblasts for apoptosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 22835–22849 (2014).
  158. Moncsek, A. et al. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with B cell lymphoma-extra large inhibitors ameliorates fibrosis in multidrug resistance 2 gene knockout (Mdr2<sup>-/-</sup>) mice. *Hepatology* **67**, 247–259 (2018).
  159. Dodi, A. E. et al. Regulation of fibroblast Fas expression by soluble and mechanical pro-fibrotic stimuli. *Respir. Res.* **19**, 91 (2018).
  160. Santiago, B., Galindo, M., Rivero, M. & Pablos, J. L. Decreased susceptibility to fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis. Rheum.* **44**, 1667–1676 (2001).
  161. Tanaka, T. et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur. Respir. J.* **20**, 359–368 (2002).
  162. Buhling, F. et al. Altered expression of membrane-bound and soluble CD95/Fas contributes to the resistance of fibrotic lung fibroblasts to FasL induced apoptosis. *Respir. Res.* **6**, 37 (2005).
  163. Lin, T. et al. Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* **275**, 8657–8663 (2000).
  164. Samuel, G. H., Lenna, S., Bujor, A. M., Lafyatis, R. & Trojanowska, M. Acid sphingomyelinase deficiency contributes to resistance of scleroderma fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. *J. Dermatol. Sci.* **67**, 166–172 (2012).
  165. Im, J., Kim, K., Hergert, P. & Nho, R. S. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *J. Pathol.* **240**, 25–37 (2016).
  166. Huang, S. K. et al. Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J.* **23**, 4317–4326 (2009).
  167. Maher, T. M. et al. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **182**, 73–82 (2010).
  168. Bernard, K. et al. Metabolic reprogramming is required for myofibroblast contractility and differentiation. *J. Biol. Chem.* **290**, 25427–25438 (2015).
  169. Santinon, G., Pocaterra, A. & Dupont, S. Control of YAP/TAZ activity by metabolic and nutrient-sensing pathways. *Trends Cell Biol.* **26**, 289–299 (2016).
  170. Rangarajan, S. et al. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. *Nat. Med.* **24**, 1121–1127 (2018).
  171. Mora, A. L., Rojas, M., Pardo, A. & Selman, M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 755–772 (2017).
  172. Alvarez, D. et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **313**, L1164–L1173 (2017).
  173. Cui, H. et al. miR-34a inhibits lung fibrosis by inducing lung fibroblast senescence. *Am J Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 168–178 (2017).
  174. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
  175. Munoz-Espin, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).
  176. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in health and disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
  177. Bird, T. G. et al. TGFbeta inhibition restores a regenerative response in acute liver injury by suppressing paracrine senescence. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaan1230 (2018).
  178. Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtochka, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumour suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
  179. Chien, Y. et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* **25**, 2125–2136 (2011).
  180. Mavrogenatou, E., Pratsinis, H., Papadopoulou, A., Karamanos, N. K. & Kletsas, D. Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis. *Matrix Biol.* **75–76**, 27–42 (2019).
  181. Hiebert, P. et al. Nr2f2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matri-



- some. *Dev. Cell* **46**, 145–161 e110 (2018).
182. Krizhanovsky, V. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
  183. Kim, K. H., Chen, C. C., Monzon, R. I. & Lau, L. F. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **33**, 2078–2090 (2013).
  184. Jun, J.-I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* **12**, 676–685 (2010).
  185. Hecker, L. et al. Reversal of persistent fibrosis in ageing by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci. Transl. Med.* **6**, 231ra247 (2014).
  186. Schafer, M. J. et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* **8**, 14532 (2017).
  187. Schuliga, M. et al. Mitochondrial dysfunction contributes to the senescent phenotype of IPF lung fibroblasts. *J. Cell Mol. Med.* **22**, 5847–5861 (2018).
  188. Li, Y. et al. Hyaluronan synthase 2 regulates fibroblast senescence in pulmonary fibrosis. *Matrix Biol.* **55**, 35–48 (2016).
  189. Mora, A. L., Rojas, M., Pardo, A. & Selman, M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 755–772 (2017).
  190. Barnes, P. J., Baker, J. & Donnelly, L. E. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, 556–564 (2019).
  191. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).
  192. Liu, T. et al. Telomerase regulation of myofibroblast differentiation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 625–633 (2006).
  193. Liu, T., Nozaki, Y. & Phan, S. H. Regulation of telomerase activity in rat lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 534–540 (2002).
  194. Razdan, N., Vasilopoulos, T. & Herbig, U. Telomere dysfunction promotes transdifferentiation of human fibroblasts into myofibroblasts. *Ageing Cell* **17**, e12838 (2018).
  195. Liu, T. et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3800–3809 (2007).
  196. Kurundkar, A. R. et al. The matricellular protein CCN1 enhances TGF- $\beta$ 1/SMAD3-dependent profibrotic signalling in fibroblasts and contributes to fibrogenic responses to lung injury. *FASEB J.* **30**, 2135–2150 (2016).
  197. Braun, H. et al. Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1467–1473 (2012).
  198. Mailleux, A. A. & Crestani, B. Licence to kill senescent cells in idiopathic pulmonary fibrosis? *Eur. Respir. J.* **50**, 1701360 (2017).
  199. Lehmann, M. et al. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis *in vivo*. *Eur. Respir. J.* **50**, 1602367 (2017).
  200. Sand, J. M. et al. Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD. *Respir. Res.* **16**, 69 (2015).
  201. Rockey, D. C., Bell, P. D. & Hill, J. A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1138–1149 (2015).
  202. Drew, L. Tipping the balance. *Nature* **564**, S74–S75 (2018).
  203. Ellis, E. L. & Mann, D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J. Hepatol.* **56**, 1171–1180 (2012).
  204. Iredale, J. P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**, 538–549 (1998).
  205. van der Meer, A. J. & Berenguer, M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. *J. Hepatol.* **65**, S95–S108 (2016).
  206. Lee, Y. A. & Friedman, S. L. Reversal, maintenance or progression: what happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? *Antivir. Res.* **107**, 23–30 (2014).
  207. Iredale, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.* **117**, 539–548 (2007).
  208. Friedman, S. L. Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9230–9231 (2012).
  209. Moore, B. B. et al. Animal models of fibrotic lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 167–179 (2013).
  210. Marshall, R., Bellingan, G. & Laurent, G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. *Thorax* **53**, 815–817 (1998).
  211. Burnham, E. L., Janssen, W. J., Riches, D. W., Moss, M. & Downey, G. P. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur. Respir. J.* **43**, 276–285 (2014).
  212. Szarka, R. J., Wang, N., Gordon, L., Nation, P. N. & Smith, R. H. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J. Immunol. Methods* **202**, 49–57 (1997).
  213. Thannickal, V. J., Toews, G. B., White, E. S., Lynch, J. P. 3rd & Martinez, F. J. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Med.* **55**, 395–417 (2004).
  214. Zamora, A. C. et al. Use of mycophenolate mofetil to treat scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respir. Med.* **102**, 150–155 (2008).
  215. Gerbino, A. J., Goss, C. H. & Molitor, J. A. Effect of mycophenolate mofetil on pulmonary function in scleroderma-associated interstitial lung disease. *Chest* **133**, 455–460 (2008).
  216. Dobrota, R. et al. Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a EUSTAR analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1743–1748 (2016).
  217. Merkel, P. A. et al. Patterns and predictors of change in outcome measures in clinical trials in scleroderma: an individual patient meta-analysis of 629 subjects with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3420–3429 (2012).
  218. Beyer, C., Schett, G., Distler, O. & Distler, J. H. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* **62**, 2831–2844 (2010).
  219. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005058 (2011).
  220. Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174 (2002).
  221. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
  222. Fonovic, M. & Turk, B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2560–2570 (2014).
  223. McKleroy, W., Lee, T. H. & Atabai, K. Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **304**, L709–L721 (2013).
  224. Madsen, D. H. et al. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 27037–27045 (2007).
  225. Wienke, D., MacFadyen, J. R. & Isacke, C. M. Identification and characterization of the endocytic transmembrane glycoprotein Endo180 as a novel collagen receptor. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3592–3604 (2003).
  226. East, L. et al. A targeted deletion in the endocytic receptor gene Endo180 results in a defect in collagen uptake. *EMBO Rep.* **4**, 710–716 (2003).
  227. Engelholm, L. H. et al. uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion. *J. Cell Biol.* **160**, 1009–1015 (2003).
  228. Segal, G. et al. Involvement of actin filaments and integrins in the binding step in collagen phagocytosis by human fibroblasts. *J. Cell Sci.* **114**, 119–129 (2001).
  229. Arora, P. D., Manolson, M. F., Downey, G. P., Sodek, J. & McCulloch, C. A. A novel model system for characterization of phagosomal maturation, acidification, and intracellular collagen degradation in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 35432–35441 (2000).
  230. Lee, W., Sodek, J. & McCulloch, C. A. Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **168**, 695–704 (1996).
  231. Zigrino, P. et al. Fibroblast-derived MMP-14 regulates collagen homeostasis in adult skin. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1575–1583 (2016).
  232. Buhling, F. et al. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* **164**, 2203–2216 (2004).
  233. Hou, W. S. et al. Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am. J. Pathol.* **159**, 2167–2177 (2001).
  234. Wohlfahrt, T. et al. PU.1 controls fibroblast polarization and tissue fibrosis. *Nature* **566**, 344–349 (2019).
  235. Atabai, K. et al. Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *J. Clin. Invest.* **119**, 3713–3722 (2009).
  236. Madsen, D. H. et al. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J. Cell Biol.* **202**, 951–966 (2013).
  237. Borza, C. M. & Pozzi, A. Discoidin domain receptors in disease. *Matrix Biol.* **34**, 185–192 (2014).
  238. Yoon, Y. S. et al. PPAR $\gamma$  activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and fibrosis via regulation of efferocytosis and pro-resolving cytokines. *Mucosal Immunol.* **8**, 1031–1046 (2015).
  239. Popov, Y. et al. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G323–G334 (2010).
  240. Redente, E. F. et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 825–837 (2014).
  241. Imamura, M., Ogawa, T., Sasaguri, Y., Chayama, K. & Ueno, H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* **128**, 138–146 (2005).
  242. Mitchell, C. et al. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* **174**, 1766–1775 (2009).
  243. Glassner, A. et al. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab. Invest.* **92**, 967–977 (2012).
  244. Radaeva, S. et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* **130**, 435–452 (2006).
  245. Shook, B. A. et al. Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair. *Science* **362**, eaar2971 (2018).
  246. Lodyga, M. et al. Cadherin-11-mediated adhesion of macrophages to myofibroblasts establishes a profibrotic niche of active TGF- $\beta$ . *Sci. Signal.* **12**, eaao3469 (2019).
  247. Pakshir, P. et al. Dynamic fibroblast contractions attract remote macrophages in fibrillar collagen matrix. *Nat. Commun.* **10**, 1850 (2019).
  248. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **18**, 1028–1040 (2012).
  249. Van De Water, L., Varney, S. & Tomasek, J. J. Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring, and fibrosis: opportunities for new therapeutic

- intervention. *Adv. Wound Care* **2**, 122–141 (2013).
250. Herum, K. M., Lunde, I. G., McCulloch, A. D. & Christensen, G. The soft- and hard-heartedness of cardiac fibroblasts: mechanotransduction signalling pathways in fibrosis of the heart. *J. Clin. Med.* **6**, 53 (2017).
251. Follonier Castella, L., Gabbiani, G., McCulloch, C. A. & Hinz, B. Regulation of myofibroblast activities: calcium pullsome strings behind the scene. *Exp. Cell Res.* **316**, 2390–2401 (2010).
252. Htwe, S. S. et al. Role of ROCK isoforms in regulation of stiffness induced myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **56**, 772–783 (2017).
253. Shiwen, X. et al. A role of myocardin related transcription factor-A (MRTF-A) in scleroderma related fibrosis. *PLOS ONE* **10**, e0126015 (2015).
254. Velasquez, L. S. et al. Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 16850–16855 (2013).
255. Crider, B. J., Risinger, G. M. Jr., Haakma, C. J., Howard, E. W. & Tomasek, J. J. Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF- $\beta$ 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 2378–2385 (2011).
256. Hinz, B., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **157**, 657–663 (2002).
257. Schnitter, J., Bansal, R., Storm, G. & Prakash, J. Integrins in wound healing, fibrosis and tumour stroma: high potential targets for therapeutics and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **129**, 37–53 (2018).
258. Schulz, J. N. et al. New developments on skin fibrosis - Essential signals emanating from the extracellular matrix for the control of myofibroblasts. *Matrix Biol.* **68–69**, 522–532 (2018).
259. Murray, I. R. et al. AlphaV integrins on mesenchymal cells regulate skeletal and cardiac muscle fibrosis. *Nat. Commun.* **8**, 1118 (2017).
260. Hinz, B. It has to be the  $\alpha$ V: myofibroblast integrins activate latent TGF- $\beta$ 1. *Nat. Med.* **19**, 1567–1568 (2013).
261. Johnson, L. A. et al. Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF- $\beta$ -induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 154–165 (2014).
262. Sisson, T. H. et al. Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signalling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis. *Am. J. Pathol.* **185**, 969–986 (2015).
263. Penke, L. R., Huang, S. K., White, E. S. & Peters-Golden, M. Prostaglandin E2 inhibits  $\alpha$ -smooth muscle actin transcription during myofibroblast differentiation via distinct mechanisms of modulation of serum response factor and myocardin-related transcription factor-A. *J. Biol. Chem.* **289**, 17151–17162 (2014).
264. Toyama, T. et al. Therapeutic targeting of TAZ and YAP by dimethyl fumarate in systemic sclerosis fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 78–88 (2017).
265. Kinoshita, K. et al. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 536–543 (2013).
266. Jiang, H. et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat. Med.* **22**, 851–860 (2016).
267. Wong, V. W. et al. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signalling. *Nat. Med.* **18**, 148–152 (2011).
268. Zhao, X. K. et al. Focal adhesion kinase regulates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Sci. Rep.* **7**, 4032 (2017).
269. Zhang, J. et al. Targeted inhibition of focal adhesion kinase attenuates cardiac fibrosis and preserves heart function in adverse cardiac remodeling. *Sci. Rep.* **7**, 43146 (2017).
270. Bond, J. E. et al. Wound contraction is attenuated by fasudil inhibition of Rho-associated kinase. *Plast. Reconstr. Surg.* **128**, 438e–450e (2011).
271. Huang, X. et al. Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* **179**, 2751–2765 (2011).
272. Van Delft, M. F. et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**, 389–399 (2006).
273. Tse, C. et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 3421–3428 (2008).
274. Yosef, R. et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **7**, 1190 (2016).
275. Pan, J. et al. Inhibition of Bcl-2/xL with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses persistent pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **99**, 353–361 (2017).
276. Moncsek, A. et al. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with Bcl-xL inhibitors ameliorates fibrosis in Mdr2<sup>-/-</sup> mice. *Hepatology* **67**, 247–259 (2017).
277. Liu, J. C. et al. High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. *Cell Stem Cell* **13**, 483–491 (2013).
278. Chang, J. et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged haematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* **22**, 78–83 (2016).
279. Gutierrez-Martinez, P. et al. Diminished apoptotic priming and ATM signalling confer a survival advantage onto aged haematopoietic stem cells in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **20**, 413–421 (2018).
280. Souers, A. J. et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208 (2013).
281. Mullard, A. 2016 FDA drug approvals. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 73–76 (2017).
282. Mullard, A. Pioneering apoptosis-targeted cancer drug poised for FDA approval. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 147–149 (2016).
283. Vancheri, C. et al. Different expression of TNF- $\alpha$  receptors and prostaglandin E(2) production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 628–634 (2000).
284. Frankel, S. K. et al. TNF- $\alpha$  sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to Fas-induced apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 293–304 (2006).
285. Park, J. S. et al. Targeting of dermal myofibroblasts through death receptor 5 arrests fibrosis in mouse models of scleroderma. *Nat. Commun.* **10**, 1128 (2019).
286. Oh, Y. et al. Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells. *Hepatology* **64**, 209–223 (2016).
287. Ovadya, Y. & Krizhanovsky, V. Strategies targeting cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **128**, 1247–1254 (2018).
288. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of ageing. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
289. Zhu, Y. et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Ageing Cell* **14**, 644–658 (2015).
290. Sellares, J. & Rojas, M. Quercetin in idiopathic pulmonary fibrosis: another brick in the senolytic wall. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **60**, 3–4 (2018).
291. Hohmann, M. S., Habel, D. M., Coelho, A. L., Verri, W. A. Jr. & Hogaboam, C. M. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent IPF fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **60**, 28–40 (2018).
292. Das, J. et al. 2-Aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies towards the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* **49**, 6819–6832 (2006).
293. Li, J. et al. A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 291–299 (2010).
294. Han, L., Schuringa, J. J., Mulder, A. & Vellenga, E. Dasatinib impairs long-term expansion of leukemic progenitors in a subset of acute myeloid leukemia cases. *Ann. Haematol.* **89**, 861–871 (2010).
295. Russo, G. L. et al. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treat. Res.* **159**, 185–205 (2014).
296. Williams, R. J., Spencer, J. P. & Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 838–849 (2004).
297. Zhu, Y. et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Ageing Cell* **15**, 428–435 (2016).
298. Justice, J. N. et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* **40**, 554–563 (2019).
299. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonte, F. & Desmouliere, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Invest. Dermatol.* **7**, 301–311 (2014).
300. Gascard, P. & Tlsty, T. D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* **30**, 1002–1019 (2016).
301. Akamatsu, T. et al. Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**, 15 (2013).
302. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730–2741 (2001).
303. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02745145> (2019).
304. Song, K. H., Cho, S. J. & Song, J. Y. AlphaV beta1 integrin as a novel therapeutic target for tissue fibrosis. *Ann. Transl. Med.* **4**, 411 (2016).
305. Patsenker, E. et al. Pharmacological inhibition of integrin alphaV beta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* **50**, 1501–1511 (2009).
306. Horan, G. S. et al. Partial inhibition of integrin alpha(v) beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 56–65 (2008).
307. Wang, B. et al. Role of alphaV beta6 integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology* **46**, 1404–1412 (2007).
308. Peng, Z. W. et al. Integrin alphaV beta6 critically regulates hepatic progenitor cell function and promotes ductular reaction, fibrosis, and tumorigenesis. *Hepatology* **63**, 217–232 (2016).
309. Puthawala, K. et al. Inhibition of integrin alpha(v) beta6, an activator of latent transforming growth factor-beta, prevents radiation-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 82–90 (2008).
310. Hahm, K. et al. AlphaV beta6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. *Am. J. Pathol.* **170**, 110–125 (2007).
311. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01371305> (2018).
312. Fan, G. P. et al. Pharmacological inhibition of focal adhesion kinase attenuates cardiac fibrosis in mice cardiac fibroblast and post-myocardial-infarction models. *Cell Physiol. Biochem.* **37**, 515–526 (2015).
313. Zhao, X. K. et al. Focal adhesion kinase regulates fibroblast migration via integrin beta-1 and plays a central role in fibrosis. *Sci. Rep.* **6**, 19276 (2016).
314. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02758587> (2018).
315. Qi, X. J. et al. Fasudil, an inhibitor of Rho-associated coiled-coil kinase, attenuates hyperoxia-induced pulmonary fibrosis in neonatal rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 12140–12150 (2015).
316. Jiang, C. et al. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8293–8307 (2012).

317. Bei, Y. et al. RhoA/Rho-kinase activation promotes lung fibrosis in an animal model of systemic sclerosis. *Exp. Lung Res.* **42**, 44–55 (2016).
318. Baba, I., Egi, Y., Utsumi, H., Kakimoto, T. & Suzuki, K. Inhibitory effects of fasudil on renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Mol. Med. Rep.* **12**, 8010–8020 (2015).
319. Nagatoya, K. et al. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* **61**, 1684–1695 (2002).
320. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00704665> (2008).
321. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02688647> (2019).
322. Sakai, N. et al. LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation. *FASEB J.* **27**, 1830–1846 (2013).
323. Haak, A. J. et al. Targeting the myofibroblast genetic switch: inhibitors of myocardin-related transcription factor/serum response factor-regulated gene transcription prevent fibrosis in a murine model of skin injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **349**, 480–486 (2014).
324. Liang, M. et al. Yap/Taz deletion in Gli+ cell-derived myofibroblasts attenuates fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 3278–3290 (2017).

325. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02981082> (2019).
326. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02874989> (2019).
327. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03865927> (2019).

### 致谢

The research of B.H. is supported by the Canadian Institutes of Health Research (Foundation Grant 375597). D.L. gratefully acknowledges funding support from the NIH (grant R01 HL147059–01), the Start-up Package from Massachusetts General Hospital, the Scleroderma Foundation New Investigator Grant, the Scleroderma Research Foundation Investigator-Initiated Research Grant, the American Thoracic Society Foundation/Pulmonary Fibrosis Foundation Research Grant and Sponsored Research Grants from Boehringer Ingelheim, Indalo Therapeutics and Unity Biotechnology.

### 作者贡献

The authors contributed equally to all aspects of this article.

### 利益冲突

D.L. declares that he has received research funding from Boehringer Ingelheim, Indalo Therapeutics and Unity Biotechnology. D.L. also has a financial interest in Mediar Therapeutics, which is developing treatments for organ fibrosis. D.L.'s interests were reviewed and are managed by MGH and Partners HealthCare in accordance with their conflict of interest policies. B.H. declares no competing interests.

### 审稿人信息

*Nature Reviews Rheumatology* thanks V. Thannickal and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

### 出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© Springer Nature Limited 2019

翻译: 惠敏 (北京协和医院)

审校: 李梦涛 (北京协和医院)



# 甲氨喋呤及其在炎症性关节炎中的作用机制

## Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis

Bruce N. Cronstein<sup>1</sup> 和 Thomas M. Aune<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The New York University School of Medicine, New York, NY, USA.

<sup>2</sup>Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA.

\*email:bruce.cronstein@nyumc.org

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9>

**摘要：**尽管有许多生物制剂被用于类风湿关节炎（RA）及其他炎症性关节炎的治疗，但小剂量甲氨喋呤治疗仍然是RA治疗的金标准。甲氨喋呤通常是治疗RA、银屑病关节炎及其他炎症性关节炎的一线药物，且在RA治疗中可增强大多数生物制剂的作用。了解甲氨喋呤的作用机制对RA药物的合理使用和治疗新方案的设计具有指导意义。尽管甲氨喋呤是首批智能药物设计的例子之一，多种机制可能参与甲氨喋呤的抗炎作用，包括抑制嘌呤和嘧啶的合成、甲基化反应、NF- $\kappa$ B 转运入细胞核、JAK-STAT 通路介导的信号和一氧化氮的产生以及促进腺苷释放和某些长链非编码RNA的表达。

自20世纪80年代引入并广泛应用于类风湿关节炎（RA）的治疗以来，小剂量甲氨喋呤治疗在很大程度上改变了RA的治疗方法和治疗结局<sup>[1]</sup>。在看风湿科医生时，大多数RA患者一开始都会接受小剂量的甲氨喋呤治疗，并且许多患者不需要额外的治疗<sup>[2]</sup>。即使是对甲氨喋呤疗效反应不充分并接受生物制剂治疗的患者，由于生物制剂和甲氨喋呤合用疗效叠加和甲氨喋呤降低了患者对许多生物制剂的耐药可能，甲氨喋呤治疗通常也会继续进行<sup>[1]</sup>。此外，在RA患者中，小剂量甲氨喋呤治疗（伴或不伴生物治疗）与单纯生物制剂治疗相比，大关节置换率较低，这支持了低剂量甲氨喋呤治疗具有软骨保护作用的假设<sup>[3-5]</sup>。

甲氨喋呤在风湿性疾病治疗中的应用和疗效将随着对其药理作用和抗炎机制的深入了解而进一步提高。事实上，新近数据表明，适当的生物标志物可以确定谁将从甲氨喋呤治疗中获益最多。其中一些生物标志物可能反映了甲氨喋呤的作用机制。在这篇综述中，我们讨论了甲氨喋呤抑制炎症的药理学及代谢和细胞机制。我们也研究了甲氨喋呤诱导的一些众所周知的毒性作用。更好地了解甲氨喋呤的作用机制有助于制定更合适的治疗方案。本综述中讨论的机制虽然在RA中研究最多，但这些机制是普遍性的，也适用于其他形式的炎症性关节炎。

### 甲氨喋呤的药理学

无论小剂量口服或肠道外给药，甲氨喋呤的半衰期相对较短，约为6小时，18小时后在血清中检测不到药物残留<sup>[6]</sup>。由于肠道吸收甲氨喋呤的能力有限，口服甲氨喋呤

的生物利用度变化很大，单次口服剂量的最大吸收量小于25 mg<sup>[7]</sup>。甲氨喋呤以甲氨喋呤和7-羟甲氨喋呤（甲氨喋呤的主要代谢物）的形式经尿液排泄。20世纪80年代，甲氨喋呤首次被报道作为一种“前体药物”以多聚谷氨酸形式在组织中蓄积<sup>[8,9]</sup>。现在已知，甲氨喋呤单谷氨酸（药物的天然形式）在细胞内经历了一系列的谷氨酸多聚化，添加了不同数量的谷氨酸，组织中连续数周检测到甲氨喋呤多聚谷氨酸<sup>[8]</sup>（图1）。多聚谷氨酸化的甲氨喋呤是药物的活性形式，并且多聚谷氨酸化的甲氨喋呤作为多种酶抑制剂的效力不同于天然化合物的效力。多聚谷氨酸甲氨喋呤对催化嘌呤从头合成中最后一步的5-氨基咪唑-4-羧酰胺核糖核苷酸（AICAR）的甲酰基转移酶（ATIC）抑制作用最强烈；多聚谷氨酸甲氨喋呤作为ATIC的抑制剂比单谷氨酸甲氨喋呤强2000倍<sup>[9]</sup>。多聚谷氨酸甲氨喋呤还能抑制参与从头合成嘧啶和嘌呤的其他叶酸依赖酶（图2a）以及参与转甲基化反应和多胺合成的酶（图2c）。

### 假定的作用机制

甲氨喋呤最初被开发用来抑制DNA和RNA合成所需的嘌呤和嘧啶的从头合成，以及许多不同类型的恶性细胞和非恶性细胞的增殖（方框1）。虽然这种机制可能有助于解释甲氨喋呤抑制炎症的机制（图2a），其他作用机制也已经被假定，包括加强腺苷释放（图2b）、抑制一些细胞功能所需的转甲基化反应（图2c）、减少多胺累积（图2c）和一氧化氮合酶解偶联（图2d）。甲氨喋呤直接或间接地调节几乎所有参与炎症的细胞类型的功能，包括中性粒细胞、单核细胞、T细胞、B细胞、内皮细胞和成纤维

## 要点

- 多聚谷氨酸甲氨蝶呤抑制 5-氨基咪唑-4-羧酰胺核糖核苷酸 (AICAR) 的甲酰基转移酶 (ATIC), 导致 AICAR 在细胞内蓄积和腺苷释放增加; 腺苷与细胞表面受体结合, 抑制许多炎症和免疫反应。
- 甲氨蝶呤抑制二氢叶酸还原酶, 阻止二氢生物蝶呤 (BH2) 还原为四氢生物蝶呤 (BH4), 导致一氧化氮合酶解偶联, 增加 T 细胞对凋亡的敏感性, 从而降低免疫反应。
- 甲氨蝶呤通过增加腺苷的释放和腺苷受体 A2a 的激活以及抑制 BH2 向 BH4 的还原来抑制 NF- $\kappa$ B 的激活。
- 甲氨蝶呤可增加长链非编码 RNA p21 (lincRNA-p21) 的表达, 这是一种多功能长链非编码 RNA, 可直接或间接调节多种关键的免疫和炎症过程。
- 通过调节细胞特异性信号通路, 甲氨蝶呤抑制参与 RA 发病的主要细胞系的重要促炎特性, 包括 T 细胞、巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞样滑膜细胞。

细胞样滑膜细胞 (FLSs)。在本节中, 我们将讨论之前描述的甲氨蝶呤作用的分子机制, 并在相关的情况下, 讨论这些分子机制对参与炎症的各种细胞类型功能的影响。

## 代谢机制

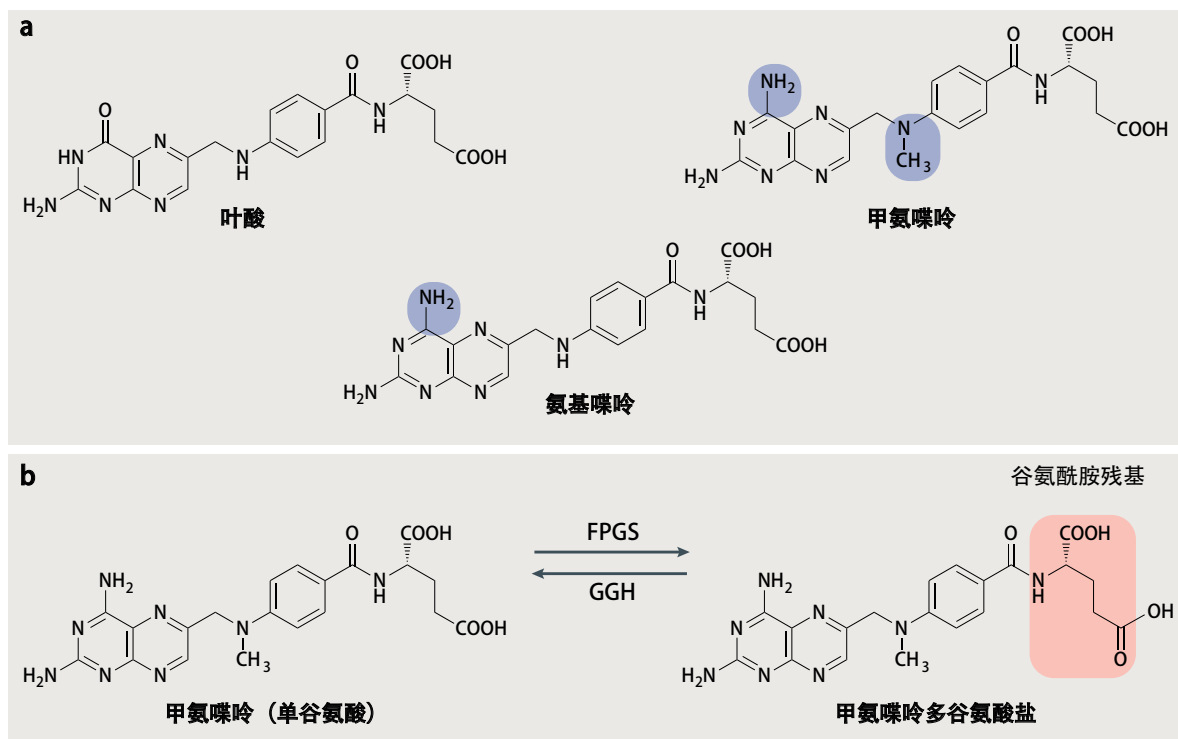
**嘌呤和嘧啶合成的抑制作用。**甲氨蝶呤的靶点是嘌呤和嘧啶 (RNA 和 DNA 的组成部分) 从头合成过程中关键的叶酸依赖酶步骤。需要前体细胞在骨髓中快速增殖的循环中的白细胞 (中性粒细胞和淋巴细胞) 数量减少, 通常发生在将甲氨蝶呤作为抗增殖药治疗癌症的患者中<sup>[10]</sup>。相比之下, 外周血白细胞计数的减少被认为是治疗炎症性疾病时甲氨蝶呤的毒性反应, 此时甲氨蝶呤的剂量比治疗恶性肿瘤的剂量低 100 到 1000 倍。服用叶酸或甚至亚叶酸 (使用甲氨蝶呤当天除外) 可预防甲氨蝶呤对风湿病患者的毒性作用<sup>[11-14]</sup>。虽然有报道称补充亚叶酸可导致服用甲氨蝶呤的患者 RA 症状发作<sup>[15-16]</sup>, 但一项 meta 分析并不支持在 RA 治疗中存在这种关联<sup>[17]</sup>。考虑到即使同时补充叶酸或亚叶酸阻止外周血白细胞计数减少的情况下, 甲氨蝶呤仍有效, 甲氨蝶呤的抗炎作用不太可能需要抑制细胞增殖。

**转甲基化反应的抑制。**多胺, 如精胺和亚精胺, 在 RA 患者的滑膜组织和滑液<sup>[18]</sup>、单个核细胞<sup>[19]</sup>和尿液中积累<sup>[20]</sup>。单核细胞可以将这些多胺水解成氨和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 它们作为细胞毒素, 可以损伤关节的细胞和组织<sup>[19,21,22]</sup>。甲氨蝶呤通过抑制二氢叶酸还原酶 (DHFR; 一种催化二氢叶酸还原为四氢叶酸的酶) 减少了甲基供体四氢叶酸和 5-甲基四氢叶酸, 减少了多胺的合成 (图 2c)。因此, 一种假

说是甲氨蝶呤通过抑制转甲基化反应, 随后多胺产量的减少导致下游氨和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的减少, 从而减少滑膜损伤。这一假说是直接转甲基化抑制剂 3-脱氮腺苷作为 RA 临床试验的基础; 然而, 虽然该药物有效地抑制了服用该药物患者细胞中的转甲基化反应, 但对 RA 的病程没有影响 (在其它文献综述<sup>[23]</sup>)。这一发现表明, 抑制转甲基化反应在甲氨蝶呤治疗炎症性疾病的整体抗炎作用中只占一小部分。

**腺苷释放。**如前所述, 甲氨蝶呤多聚谷氨酸可以有效地抑制 ATIC<sup>[9,24]</sup>, 而 AICAR 则在甲氨蝶呤治疗的小鼠的组织细胞内蓄积<sup>[25]</sup>。AICAR 抑制 AMP 脱氨酶和腺苷脱氨酶, 导致腺嘌呤核苷酸向胞外释放 (图 2b); 腺嘌呤核苷酸通过细胞表面的胞外核苷三磷酸脱磷酸酶 1 (CD39) 和胞外 5'-核苷酸酶 (CD73) 的作用转化为腺苷。腺苷是一系列受体 (腺苷受体 A<sub>1a</sub>、A<sub>2a</sub>、A<sub>2b</sub> 和 A<sub>3</sub>) 的强效刺激物, 这些受体对几乎所有的炎症细胞都具有强效的抑制作用 (见综述<sup>[26]</sup>和方框 2)。腺苷通过这些受体介导甲氨蝶呤抗炎作用的假说得到了小鼠研究的支持——在该研究中, 甲氨蝶呤增加腺苷向炎症组织的释放, 且甲氨蝶呤的抗炎作用可被选择性腺苷受体 A<sub>2a</sub> 拮抗剂逆转<sup>[25]</sup>。在随后的佐剂性关节炎大鼠研究中, 非选择性腺苷受体拮抗剂 (茶碱和咖啡因)<sup>[27]</sup> 逆转了甲氨蝶呤的抗炎作用。在 A<sub>2a</sub> 缺陷型小鼠、A<sub>3</sub> 缺陷型小鼠或 CD73 缺陷型小鼠中, 甲氨蝶呤不能起到抑炎作用, 这在动物模型中进一步证实了腺苷释放介导甲氨蝶呤抗炎的假说<sup>[28-30]</sup>。

证明腺苷介导甲氨蝶呤对炎症性疾病患者的抗炎作用更加困难。由于细胞可以快速吸收腺苷, 以及血浆中存在的腺苷脱氨酶能将腺苷代谢为肌苷, 因此测量体液中腺苷浓度时需要特殊处理。一项研究报告<sup>[31]</sup>表明, RA 患者在接受甲氨蝶呤治疗后由腺苷和双嘧达莫介导的血管舒张作用增加 (腺苷是有效的血管舒张剂, 而双嘧达莫可通过阻止细胞摄取腺苷, 从而增加细胞外腺苷水平, 起到血管舒张作用)。这一发现证实甲氨蝶呤治疗确实能增加体内腺苷的释放, 导致腺苷水平升高以及腺苷介导的血管流量增加。在一项随机的前瞻性研究中<sup>[32]</sup>, 摄入咖啡因 (一种非选择性腺苷受体拮抗剂) 可降低 RA 患者对甲氨蝶呤的疗效反应。然而, 在一项对接受长期甲氨蝶呤治疗的 RA 患者的大型回顾性研究<sup>[33]</sup>中, 咖啡因的摄入与甲氨蝶呤疗效反应差无关, 但该研究可能并未纳入那些在病程早期对甲氨蝶呤疗效反应差的 RA 患者的数据。最近, 越来越多的证



**图 1 叶酸、氨基蝶呤和甲氨蝶呤的分子结构。** **a** 氨基蝶呤和甲氨蝶呤 (以前称为氨甲蝶呤) 在结构上与叶酸高度相似。 **b** 在细胞内, 甲氨蝶呤单谷氨酸经历一系列的聚谷氨酰化反应后形成甲氨蝶呤多谷氨酸盐 [甲氨蝶呤 Glu (1-7)], 这是甲氨蝶呤的活性形式。在该过程中, 谷氨酰胺残基通过叶酰聚谷氨酰合酶 (FPGS) 的作用被添加至甲氨蝶呤的谷氨酸末端。该反应是可逆的, 逆反应由 γ-谷氨酰水解酶 (GGH) 介导。

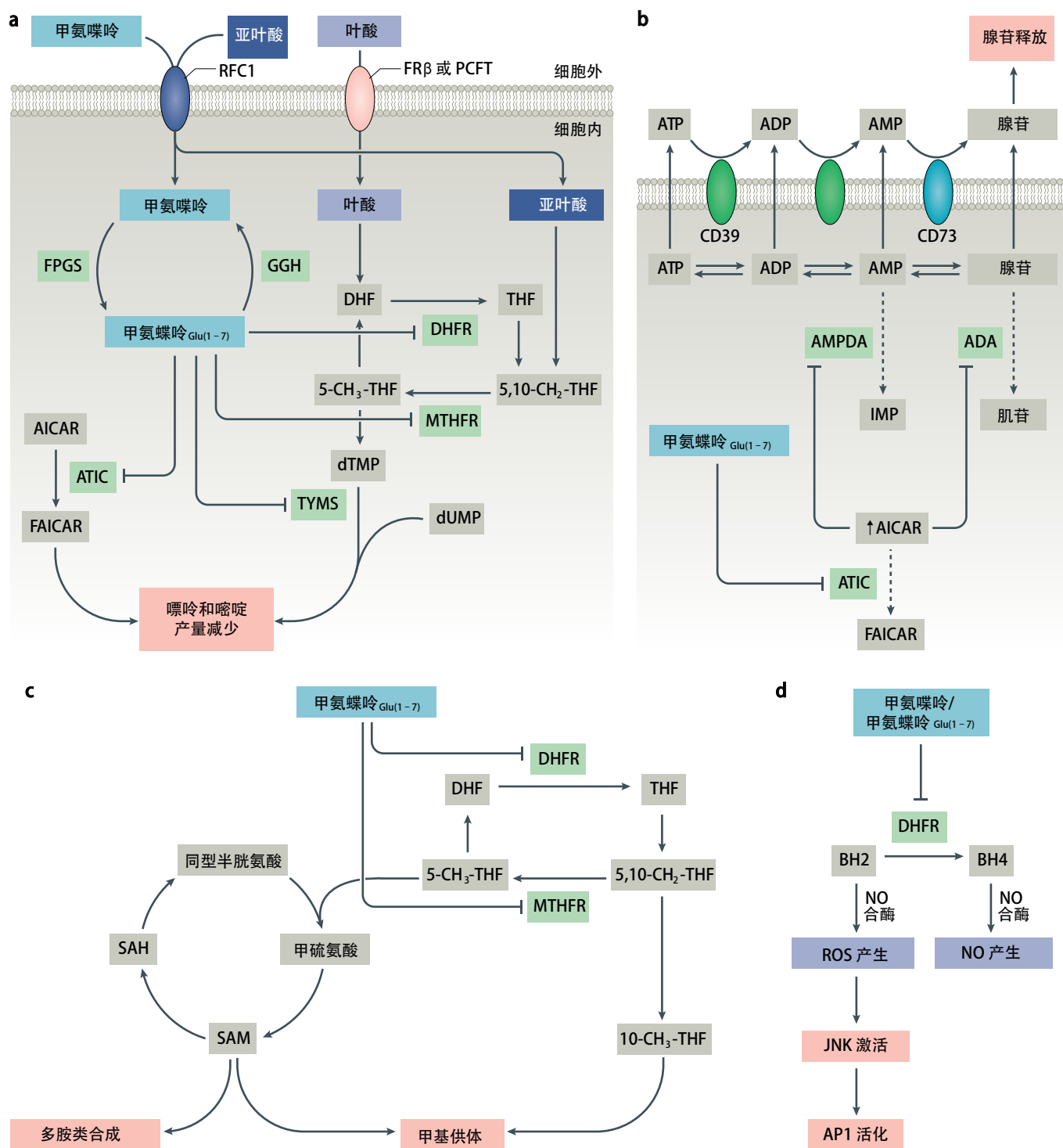
据表明, 腺苷的产生和释放是削弱调节性 T 细胞 ( $T_{reg}$ ) 免疫力和炎症的一种机制<sup>[26]</sup>, 因此腺苷受体拮抗剂在癌症治疗中的研究越来越多<sup>[34]</sup>。  $T_{reg}$  细胞通过 CD39 和 CD73 介导的 ATP 去磷酸化作用产生腺苷, 而一些数据表明, RA 患者  $T_{reg}$  细胞低表达 CD39 与甲氨蝶呤疗效反应差有关<sup>[35]</sup>。相似的是, 甲氨蝶呤还可导致 B 细胞腺苷释放增加, 通过 B 细胞活化因子 (BAFF) 依赖性途径导致针对治疗性单克隆抗体 (例如抗 TNF 抗体) 的免疫反应下降, 这是甲氨蝶呤联合抗 TNF 治疗的患者中甲氨蝶呤抑制抗药物抗体产生的机制<sup>[36]</sup>。

**一氧化氮合酶解偶联。** DHFR 除了催化二氢叶酸还原为四氢叶酸外, 还催化二氢生物蝶呤 (BH2) 还原为四氢生物蝶呤 (BH4)。甲氨蝶呤在相似浓度下可抑制二氢叶酸和 BH2 的还原 (图 2d)。BH4 是所有一氧化氮合酶 (催化 L-精氨酸产生一氧化氮的一类酶) 的重要辅酶。在缺乏 BH4 的情况下, 一氧化氮合酶催化底物产生活性氧如过氧化氢, 而不是一氧化氮, 这一过程称为“一氧化氮合酶解偶联”<sup>[37-39]</sup>。活性氧浓度的升高会激活 JUN-N 端激酶 (JNKs), 从而导致转录因子 JUN 的磷酸化增加以及

JUN-FOS 异二聚体激活蛋白 1 (AP1) 的转录活性增加。该转录因子是细胞凋亡以及许多其他过程的关键调节因子。AP1 激活导致其下游编码蛋白的基因如 (TP53, CDKN1A, CDKN1B, CHEK2, BCL3 和 HRK) 的转录, 这些蛋白可导致细胞周期停滞并增强细胞对凋亡的敏感性。HRK 编码一种名为 harakiri 的凋亡诱导蛋白, 它通过与凋亡抑制蛋白 BCL-2 和 BCL2L1 相互作用来促进细胞凋亡, 这解释了 T 细胞在甲氨蝶呤的刺激下对凋亡的敏感性增加的机制<sup>[40, 41]</sup>。在 T 细胞中, 主要促炎信号通路 TNF 刺激引起核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 转录活性上升也被甲氨蝶呤抑制, 这主要通过 JNK 依赖的 p53 上调引起<sup>[42]</sup>。

**LincRNA-21 的表达。** 新的数据表明 MTX 可调节一些长链非编码 RNA (lncRNA; lncRNA 的综述见参考文献<sup>[43]</sup>) 的表达。一个这样的例子是长链基因间非编码 RNA p21 (lincRNA-p21)<sup>[44]</sup> 由一个与 CDKN1A (编码 p21) 相邻的基因编码并因此被命名; 作为 DNA 损伤反应的一部分, p53 可诱导 LincRNA-p21 的表达。LincRNA-p21 通过抑制许多编码抑制凋亡蛋白的基因转录来调控 p53 介导的凋亡反应。因此, 在 p53 调节的 DNA 损伤或其他细胞应





**图 2 甲氨蝶呤调节的主要生物化学反应。** **a** 甲氨蝶呤通过还原叶酸载体 1 (RFC1) 被细胞吸收，并被叶酰聚谷氨酸合酶 (FPGS) 多谷氨酸化。甲氨蝶呤多谷氨酸盐在细胞内蓄积并抑制许多酶促反应，包括由二氢叶酸还原酶 (DHFR)、亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR)、胸苷酸合酶 (TYMS) 和 5-氨基咪唑-4-羧酰胺核苷酸 (AICAR) 转化酶 (ATIC) 介导的酶促反应，减少嘌呤和嘧啶的产生。**b** 甲氨蝶呤介导的 ATIC 抑制导致细胞内 AICAR 积累，由于 AMP 脱氨酶 (AMPDA) 和腺苷脱氨酶 (ADA) 活性降低，最终导致细胞外腺苷水平增加。**c** 甲氨蝶呤抑制多胺类的合成 [降低甲基供体 5-甲基四氢叶酸 (5-CH<sub>3</sub>-THF) 的浓度]。**d** 甲氨蝶呤对 DHFR 的抑制作用减少四氢生物蝶呤 (BH<sub>4</sub>) 的产生，从而减少一氧化氮 (NO) 的产生，并增加了活性氧 (ROS) 的产生，此过程称为“一氧化氮合酶解偶联”。增加的 JUN-N 端激酶 (JNK) 激活可上调激活蛋白 1 (AP1) 的活性并抑制 NF-κB 的激活 (图中未显示)。BH<sub>2</sub>, 双氢生物蝶呤; DHF, 二氢叶酸; dTMP, 脱氧胸苷一磷酸; dUMP, 脱氧尿苷单磷酸; FAICAR, 甲酰基 AICAR; FRβ, 叶酸受体-β; GGH, γ-谷氨酰水解酶; IMP, 肌苷一磷酸; PCFT, 质子耦联叶酸转运蛋白; SAH, S-腺苷同型半胱氨酸; SAM, S-腺苷甲硫氨酸; THF, 四氢叶酸。

激反应的两个中心通路中，lincRNA-p21 是正确诱导细胞凋亡所必需的，但似乎不影响细胞周期的调节<sup>[45]</sup>。缺氧也可诱导 LincRNA-p21 的表达并促进转录因子 HIF1 $\alpha$  的表达，HIF1 $\alpha$  是细胞对缺氧反应的一个重要介质并促进了 Warburg 效应<sup>[46]</sup>。在细胞质中，lincRNA-p21 的另一个功能是结合选择性靶 mRNA，以抑制它们向核糖体的募集和翻译成蛋白质<sup>[47]</sup>。因此，lincRNA-p21 是一个调控多种关键的生物过程的多功能 lincRNA。

RA 患者的 p53 和 lincRNA-p21 循环水平降低，而在 MTX 治疗期间可恢复到健康个体的水平<sup>[48]</sup>。在 T 细胞中，MTX 诱导 lincRNA-p21 的表达（图 3a）。T 细胞中 MTX 诱导的 lincRNA-p21 表达不是一氧化氮合酶解偶联或腺苷释放和腺苷受体激活的结果，而是依赖于 DNA 损伤前哨 DNA 依赖蛋白激酶（DNA-PK）的激活。MTX 如何激活 DNA-PK 尚不清楚，但抑制 DNA-PK 可以明显抑制 MTX 介导的 lincRNA-p21 表达<sup>[48]</sup>。在 T 细胞中，lincRNA-p21 可抑制 NF- $\kappa$ B 的活性但似乎不针对编码 NF- $\kappa$ B 关键组件的 RELA 和 NFKB1 基因，或破坏导致 NF- $\kappa$ B 活化的细胞内信号通路。准确地说，lincRNA-p21 与 RELA mRNA 结合以抑制其翻译，从而减少对 TNF 等外部炎症刺激介导的转录激活的 NF- $\kappa$ B 数量。与此想法一致，与未接受 MTX 治疗的 RA 患者相比，接受 MTX 治疗的 RA 患者 NF- $\kappa$ B 亚单位 p65（由 RELA 编码）的水平显著降低。这样，诱

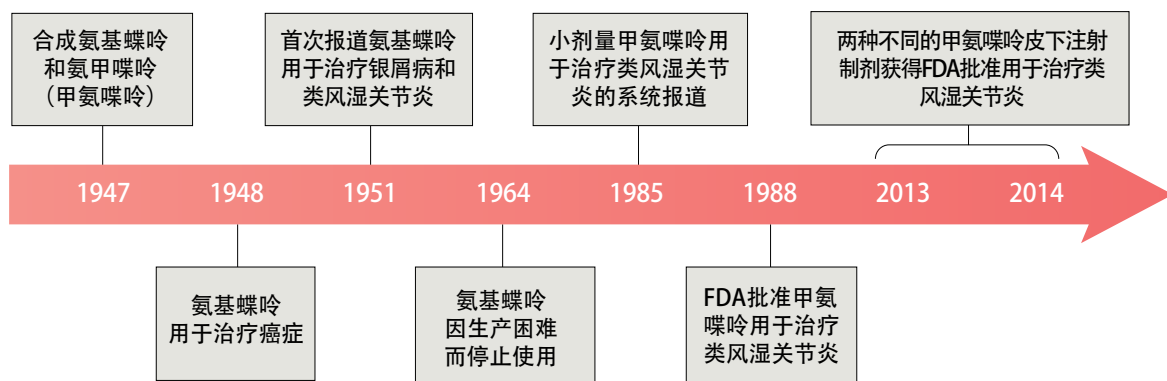
导 LincRNA-p21 表达也可能有助于 MTX 治疗 RA 的疗效。

**抑制 JAK-STAT 信号途径。** 白细胞介素 -6 (IL-6) 和其他刺激可激活关键的信号系统通过受体相关的 Janus 激酶 (JAKs) 诱导信号转导分子和转录激活因子 (STAT) 的蛋白磷酸化，从而促进多种炎症信号的产生<sup>[49]</sup>。在高通量筛选数据的基础上，发现在果蝇细胞和人巨噬细胞系中，MTX 及其类似物氨基蝶呤可以通过 JAK1-STAT3 和 JAK2-STAT5 转录途径抑制信号传递<sup>[50,51]</sup>。并且由于叶酸不能逆转 MTX 对 STAT5 磷酸化的抑制作用，敲除多种叶酸依赖的酶也不影响 MTX 对 STAT5 磷酸化的抑制作用，表明这种抑制作用不依赖于叶酸<sup>[50,51]</sup>。目前尚不清楚 MTX 对这些细胞的治疗是直接抑制 JAK 介导的 STAT3 和 STAT5 的磷酸化还是涉及其他细胞内因素，因为 MTX 的作用仅在整个细胞中检测。本文作者注意到，经 MTX 治疗的外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞、B 细胞和单核细胞中的 STAT 磷酸化仅被中度抑制，表明 MTX 能抑制患者的 JAK-STAT 信号传导但并不能完全阻断这种炎症信号传导途径。

**抑制 NF- $\kappa$ B 信号途径。** NF- $\kappa$ B 的活化和核转位在炎症和多种组织和细胞类型的炎症改变中起着核心作用。如前所述，腺苷被认为介导了 MTX 的许多抗炎作用（图 2b），包括直接抑制多种细胞类型和组织中的 NF- $\kappa$ B 活化，

**方框 1 甲氨蝶呤的发展**

甲氨蝶呤（以前称为氨甲蝶呤）及其类似物氨基蝶呤是智能药物设计的首批产品。甲氨蝶呤是由哈佛大学的生物化学家 Yellapragada Subbarow 基于其与叶酸的结构相似性（图 1）和抑制叶酸依赖性酶的能力而研发用于治疗癌症的。1948 年大剂量的这些药物首次用于治疗白血病和其他恶性肿瘤，1951 年化疗剂量的氨基蝶呤首次用于治疗类风湿关节炎（RA）<sup>[100]</sup>。由于生产困难，氨基蝶呤最终退出市场，只剩下甲氨蝶呤。在 20 世纪 60 年代到 70 年代，小剂量甲氨蝶呤被越来越多地用于治疗严重的银屑病，并且其用途已扩展到 RA。在 20 世纪 80 年代中期，成功地对甲氨蝶呤治疗 RA 患者进行严格的研究试验<sup>[101-103]</sup>，随后在 1988 年获得 FDA 许可用于治疗 RA 患者<sup>[45]</sup>。自从最初获得批准以来，甲氨蝶呤的使用增加了，医生也愿意使用更高、更有效的药物剂量。更重要的是，由于认识到药物的口服生物利用度非常有限，因此在 2013 年到 2014 年开发并批准了两种不同的胃肠外（皮下）剂型药物用于治疗风湿性疾病<sup>[104,105]</sup>。



## 方框 2 腺苷对炎症细胞的影响<sup>[26]</sup>

### 中性粒细胞

- 抑制氧化剂生成
- 抑制黏附和募集
- 抑制中性粒细胞胞外诱捕网的形成

### 巨噬细胞

- 增加 M1 到 M2 的转化
- 抑制细胞因子的表达
- 抑制破骨细胞的分化

### T 细胞

- 抑制 T 细胞受体触发的激活
- 抑制激活诱导的细胞死亡
- 抑制 FAS-FASL 介导的细胞死亡
- 增加调节性 T 细胞 (T<sub>reg</sub>) 的分化
- 介导 T<sub>reg</sub> 细胞介导的 T 细胞增殖抑制

### 内皮细胞

- 增加屏障的完整性
- 抑制水肿形成

### 成纤维样滑膜细胞

- 抑制基质金属蛋白酶的产生

如单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞<sup>[52-61]</sup>。此外，如前所述，MTX 还可以通过减少 T 细胞中 RELA 的表达（通过促进 lincRNA-p21 的表达）和促进 BH4 的消耗和 JNK 的激活来抑制 NF-κB 的激活（图 3a）。一项全基因组关联研究发现 TNFAIP3（编码 A20，NF-κB 活化的关键抑制物）的单核苷酸多态性与炎症性关节炎患者对 MTX 的疗效反应有关<sup>[62]</sup>。最近，研究人员发现只有粒-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）而不是其他刺激物所刺激的巨噬细胞可通过胸腺苷酸合酶介导和 p53 介导的机制对 MTX 治疗产生反应<sup>[63]</sup>，GM-CSF 刺激的巨噬细胞对 MTX 的应答可上调 A20<sup>[64]</sup>，使其更具“耐受性”。因此，MTX 治疗抑制 NF-κB 的活化和下游炎症的表达有多种机制。其中一些机制似乎仅限于特定的细胞类型（如 T 细胞和 GM-CSF 刺激的巨噬细胞中 lincRNA-p21 和 A20 的诱导），而腺苷影响多种细胞类型中 NF-κB 的激活。

### 细胞机制

**对 T 细胞的影响。** RA 患者的 T 细胞对细胞周期检查点信号和凋亡有抵抗作用<sup>[31, 32]</sup>。RA 中编码细胞周期检查点程序和凋亡关键蛋白的基因的表达和功能降低。接受 MTX 治疗的 RA 患者的这些基因表达水平恢复到正常或健康对照水平<sup>[40, 41]</sup>。这类基因的例子包括 Tp53、CDKN1A、CDKN1B 和 CHEK2。在 T 细胞中，这些基因是由

亚微摩尔浓度的 MTX 直接诱导的，与 RA 患者实现治疗效果的浓度类似，因此支持 MTX 的检查点重新编程可能有助于其治疗效果的观点。在这种情况下，MTX 不会直接诱导 T 细胞周期阻滞或凋亡。相反，MTX 显著增加 T 细胞对凋亡的敏感性（图 3a）。因此，MTX 治疗可能逆转已知的 RA 中 T 细胞对凋亡的抵抗。

此外，促炎性转录因子 NF-κB 在 RA 患者的 T 细胞中具有持续的活性，并且在接受 MTX 治疗的 RA 患者中这种慢性活性得到纠正<sup>[65]</sup>（如前所述）（图 3a）。MTX 介导的对 RA 中 T 细胞慢性活性 NF-κB 的抑制可能是由于 MTX 能够诱导 p53 表达，一种具有抗炎特性的转录因子的<sup>[66-79]</sup>，或诱导 lincRNA-p21，两者都降低或抑制 NF-κB 活性。

**对成纤维样滑膜细胞的影响。** FLSs 也参与 RA 的发病机制，NF-κB 在 RA 的这些细胞中被高度激活<sup>[74, 80]</sup>。FLSs 高 NF-κB 活性被认为有助于其增殖、血管生成和其他炎症特性<sup>[80]</sup>。MTX 抑制 FLSs 的 NF-κB 活性。然而，MTX 不通过 BH4 损耗和一氧化氮合酶解偶联抑制 FLSs 中的 NF-κB 活性。相反，MTX 刺激的腺苷释放和随后的腺苷受体激活似乎抑制了 FLSs 高基础水平的 NF-κB 活性（图 3b）。T 细胞和 FLSs 对 MTX 反应的差异似乎是因为一氧化氮合酶水平不同，T 细胞具有高水平的一氧化氮合酶活性，从而使一氧化氮合酶解偶联途径占优势，而 FLSs 具有低水平的一氧化氮合酶活性，从而使腺苷-腺苷受体途径占主导地位。因此，MTX 也抑制 FLSs 中 NF-κB 的活性，这可能促进其治疗 RA 的效果。

**对单核细胞的影响。** MTX 的作用也在单核细胞系中进行了检测<sup>[81]</sup>。与 T 细胞和 FLSs 相比，单核细胞在 MTX 作用下发生凋亡。此外，MTX 诱导单核细胞系中促炎细胞因子的表达剂量依赖性增加，包括 IL-1、TNF 和 IL-6<sup>[81]</sup>。MTX 诱导的这些促炎细胞因子似乎是由于抑制二氢叶酸还原为四氢叶酸，而不是抑制 BH2 还原为 BH4 和一氧化氮合酶“解偶联”或促进腺苷受体信号传导（图 3c）。这种效应可能具有临床意义，并可能有助于解释 MTX 的一些不良反应，包括粘膜炎和肺炎，可能是由这些促炎细胞因子介导的。

腺苷也通过刺激腺苷受体调节单核细胞功能，因此 MTX 可能通过促进其他细胞释放腺苷间接影响单核细



胞。腺苷与人外周血单核细胞腺苷受体 A1 的结合刺激多核巨细胞的形成<sup>[82]</sup>。此外，腺苷与单核细胞上腺苷受体 A<sub>2a</sub> 和 A<sub>3</sub> 的结合抑制 TNF 和 IL-6 的合成和释放，并促进炎症 M1 单核细胞向抗炎 M2 单核细胞的转化（其他文献综述<sup>[26]</sup>）。

**甲氨喋呤的毒性作用**

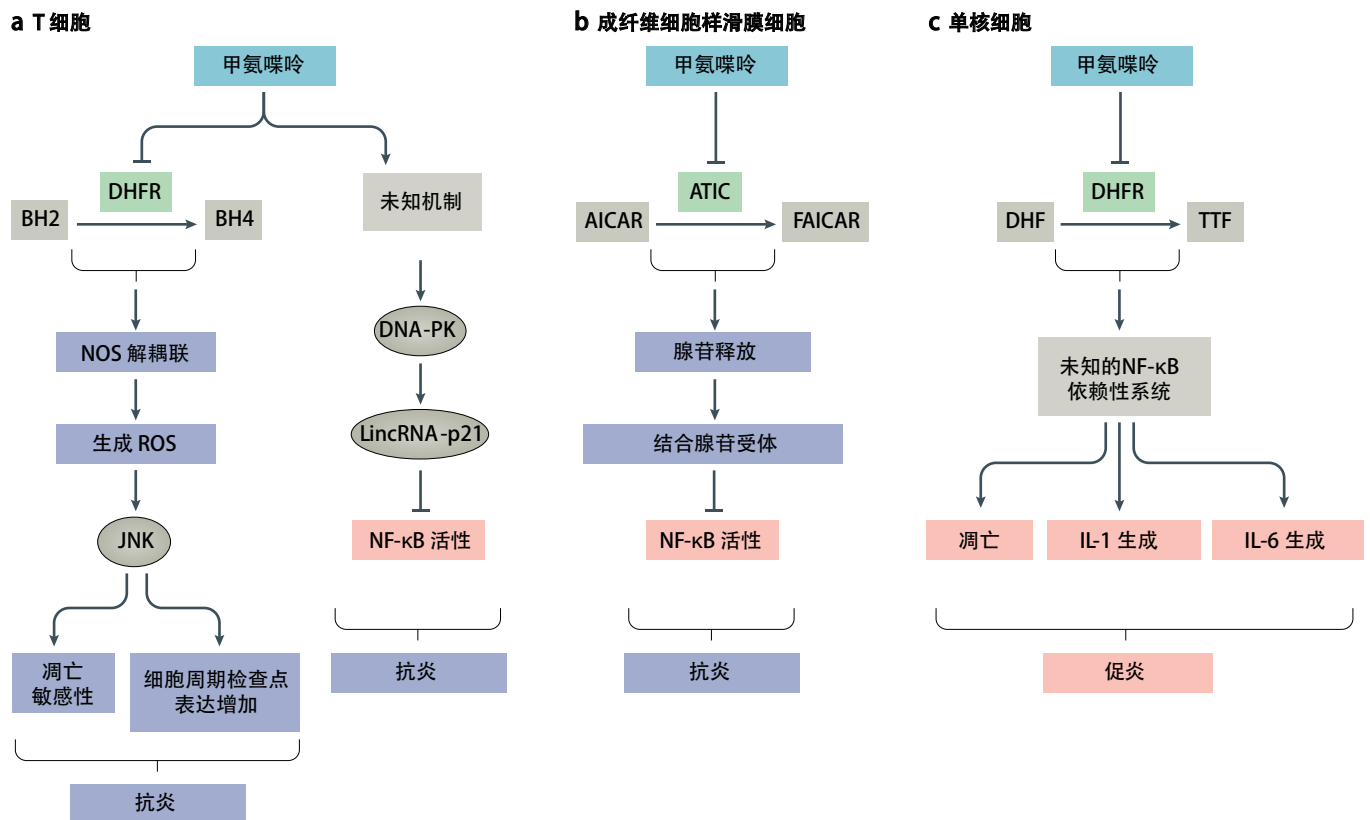
很明显，长期小剂量甲氨喋呤治疗的许多毒性作用是由药物的抗叶酸作用引起的。这些毒性作用包括外周血白细胞计数减少、口腔炎和脱发，可能是由于 MTX 介导的细胞增殖受抑制所致。由于 MTX 和叶酸在细胞摄取上竞争同一转运蛋白，因此同时服用叶酸或亚叶酸（服用 MTX 当天除外）可防止这些毒性作用。相比之下，MTX 的许多毒性作用可能是由 MTX 介导的腺苷释放引起的。在这些与腺苷相关的毒性作用包括有许多患者在服用 MTX 当天感到疲劳（腺苷在大脑中释放并与中枢神经系

统的腺苷受体结合，促进睡眠<sup>[83-85]</sup>）、类风湿性结节病<sup>[82]</sup>和肝纤维化<sup>[86,87]</sup>。

**治疗启示**

MTX 仍然是治疗 RA 和其他风湿性疾病最常用的药物。由于口服 MTX 的生物利用度有限，许多患者可能通过胃肠外 MTX 给药或在一天内分剂量给药来获得更好的药物反应，而不是单日口服一次。已证明叶酸可以预防与 MTX 治疗相关的许多毒性作用而不影响治疗效果，这导致大多数临床医生将叶酸与 MTX 一起开处方，并降低了 MTX 相关不良反应的发生率<sup>[12,13,88,89]</sup>。

目前几乎所有的炎性关节炎患者都在没有禁忌症的情况下首先给予 MTX 治疗，如果患者没有应答则给他们开具另一种治疗方法，通常与 MTX 联合使用<sup>[2]</sup>。由于并非所有患者都对 MTX 有应答，因此若能够预测哪些患者最有可能对 MTX 有反应，将有助于更有效地为患者开出正



**图 3 甲氨喋呤治疗类风湿关节炎的细胞特异性机制。** MTX 在不同细胞系中的作用取决于每种特定细胞类型的代谢。**a** 在 T 细胞中，MTX 抑制二氢叶酸还原酶（DHFR）介导的二氢生物蝶呤（BH2）还原为四氢生物蝶呤（BH4），导致一氧化氮合酶（NOS）解耦联和活性氧（ROS）生成增加。ROS 激活 JUN N-末端激酶（JNK），激活 JNK 诱导编码蛋白的基因，调控细胞凋亡和细胞周期进程的敏感性。在 T 细胞中，MTX 也通过未知的机制激活 DNA 依赖性蛋白激酶（DNA-PK），导致长链基因间非编码 RNA p21（lincRNA-p21）的诱导。lincRNA-p21 抑制 RELA mRNA 的翻译，从而降低促炎症转录因子核因子-κB（NF-κB）的水平，抑制炎症。**b** 成纤维样滑膜细胞中，MTX 也抑制 NF-κB 活性，但这种作用的实现是通过抑制 5-氨基咪唑-4-羧胺核苷酸（AICAR）转甲酰酶（ATIC），增加腺苷释放和激活同一细胞上的腺苷受体，导致 NF-κB 的抑制及随后的抗炎作用。**c** 在单核细胞中，MTX 可通过一种未知的 NF-κB 依赖机制促进细胞凋亡和增加促炎细胞因子的表达，这种机制可能通过抑制 DHFR 介导的二氢叶酸（DHF）还原为四氢叶酸（TTF）而发生。FAICAR，甲酰化 AICAR。

### 方框 3 甲氨蝶呤应答不佳的预测因素

- 高 DAS28 (参考文献<sup>[93, 95]</sup>) 或低 DAS28 (参考文献<sup>[94]</sup>) (结果冲突)
- 高健康评估问卷 (HAQ) 评分<sup>[93, 94]</sup>
- 高 BMI<sup>[93]</sup>
- 医院焦虑和抑郁量表得分高<sup>[94]</sup>
- 压痛关节计数多<sup>[94]</sup>
- 红细胞叶酸水平低<sup>[93]</sup>
- *ABCB1* 和 *ABCC3* 单核苷酸多态性<sup>[93]</sup>
- 类风湿因子阴性<sup>[94]</sup>
- 目前吸烟者<sup>[95]</sup>
- 不饮酒<sup>[95]</sup>

确的治疗处方,以降低疾病活动和减少对潜在毒性药物的不必要暴露。包括本综述中讨论的一些标记物 (TNFAIP3) 在内的 MTX 应答遗传标记物被寄予了很大的希望,但迄今为止,没有任何影响因素或生物标记物被明确证实能用来预测。候选基因研究和全基因组关联研究都已确定了与 MTX 良好反应相关的多种潜在遗传变异,尽管这些关联在其他人群中测试时似乎不可重复<sup>[90, 91]</sup>。最近,一项对 RA 患者全血转录组数据的机器学习分析显示出参与多种炎症途径基因 (最显著的是参与 I 型干扰素反应的基因) 的表达对 MTX 反应的潜在预测价值;然而,将所有测量的基因转录物纳入模型比只将干扰素途径的基因转录物纳入模型具有更好的预测价值<sup>[92]</sup>。其他研究试图确定预测 MTX 反应的临床和实验室标记物 (方框 3),尽管这些研究确定的标记物似乎不是恒定的<sup>[93-95]</sup>,可能是因为使用了不同的终点。

### 结论

对 MTX 治疗活性的分子基础的研究表明 MTX 激活了多种通路,这些通路都有助于抑制 RA 的炎症反应。潜在的生化机制包括抑制 ATIC (导致腺苷释放增加,腺苷

通过与细胞表面受体的相互作用抑制炎症和免疫功能);抑制 DHFR 和减少 BH2 到 BH4 的还原 (导致一氧化氮合酶的解偶联和活性氧的产生增加) 和 JNK 激活;增加 *lincRNA-p21* 表达,这是一种减少多种免疫和炎症反应的 *lincRNA*;以及直接和间接 (腺苷介导) 抑制通过 NF- $\kappa$ B 和 JAK-STAT 通路的信号传递,这是炎症和免疫反应的关键启动子。MTX 的许多作用似乎是细胞类型特异性的。在 T 细胞中,主要通路包括增加对凋亡的敏感性和抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。此外,MTX 促进  $T_{reg}$  细胞通过分泌腺苷抑制 T 细胞活性,而腺苷本身促进  $T_{reg}$  细胞分化从而抑制炎症。其中许多体外效应也发生在正在接受 MTX 治疗的 RA 患者中。

MTX 在 RA 中的各种作用机制产生的一个假说是 MTX 调节对“危险信号”的反应。RA 被认为是由对自身抗原的适应性免疫反应引起的,在寻找此类抗原的过程中涉及到瓜氨酸肽,其在 RA 中的水平增加<sup>[96, 97]</sup>。对外来抗原的适应性免疫反应通常被认为既需要危险信号来激活固有免疫反应,也需要外来抗原来刺激适应性免疫反应<sup>[98, 99]</sup>。通过改变腺苷的浓度,MTX 改变对这些抗原危险信号的反应。此外,负责维持适当细胞功能的细胞周期检查点和 DNA 修复机制也抑制促炎症通路,MTX 调节这些修复机制。因此,我们推测在 RA 中引发固有免疫反应的危险信号也可能是由这种缺陷修复机制产生的内部信号,而不是外部信号,并可能最终导致持续的慢性炎症循环。MTX 直接靶向这一内部危险信号,除了抑制过度活跃的免疫和炎症反应,也可能有助于其在 RA 中的治疗效果。

显然,迄今为止所描述的所有机制都将有助于 MTX 治疗 RA 的效果。对 MTX 非叶酸依赖的抗炎机制的深入了解已显著降低了该药物的临床毒性并增加了其在 RA 治疗中的应用。

在线发表于 2020 年 2 月 17 日

### 参考文献

- Weinblatt, M. E. Methotrexate: who would have predicted its importance in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* **20**, 103 (2018).
- Singh, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* **68**, 1–25 (2016).
- Aaltonen, K. J. et al. Do biologic drugs affect the need for and outcome of joint replacements in patients with rheumatoid arthritis? A register-based study. *Semin. Arthritis Rheum.* **43**, 55–62 (2013).
- Asai, S. et al. Effects of concomitant methotrexate on large joint replacement in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors: a multicenter retrospective cohort study in Japan. *Arthritis Care Res.* **67**, 1363–1370 (2015).
- Asai, S. et al. Concomitant methotrexate protects against total knee arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors. *J. Rheumatol.* **42**, 2255–2260 (2015).
- Herman, R. A., Veng-Pedersen, P., Hoffman, J., Koehnke, R. & Furst, D. E. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J. Pharm. Sci.* **78**, 165–171 (1989).
- Schiff, M. H. & Sadowski, P. Oral to subcutaneous methotrexate dose-conversion strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **37**, 213–218 (2017).
- Kremer, J. M., Galivan, J., Streckfuss, A. & Kamen, B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* **29**, 832–835 (1986).
- Chabner, B. A. et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest.* **76**, 907–912 (1985).
- Steffen, J. A. & Stolzmann, W. M. Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. I. Variability of S plus G2 periods of first generation cells. *Exp. Cell Res.* **56**, 453–460 (1969).
- Morgan, S. L., Baggott, J. E., Lee, J. Y. & Alarcon, G. S. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during long-term, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J.*

- Rheumatol.* **25**, 441–446 (1998).
12. Morgan, S.L. et al. Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Int. Med.* **121**, 833–841 (1994).
  13. Morgan, S.L. et al. The effect of folic acid supplementation on the toxicity of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**, 9–18 (1990).
  14. Shiroky, J.B. et al. Low-dose methotrexate with leucovorin (folic acid) in the management of rheumatoid arthritis. Results of a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **36**, 795–803 (1993).
  15. Shea, B. Folic acid or folinic acid for reducing side effects of methotrexate for people with rheumatoid arthritis. *J. Evid. Based Med.* **6**, 202–203 (2013).
  16. Joyce, D.A., Will, R.K., Hoffman, D.M., Laing, B. & Blackburn, S.J. Exacerbation of rheumatoid arthritis in patients treated with methotrexate after administration of folinic acid. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 913–914 (1991).
  17. Tishler, M., Caspi, D., Fishel, B. & Yaron, M. The effects of leucovorin (folinic acid) on methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **31**, 906–908 (1988).
  18. Yukioka, K. et al. Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **19**, 689–692 (1992).
  19. Neshler, G. & Moore, T.L. The in vitro effects of methotrexate on peripheral blood mononuclear cells. Modulation by methyl donors and spermidine. *Arthritis Rheum.* **33**, 954–959 (1990).
  20. Furumitsu, Y. et al. Levels of urinary polyamines in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **20**, 1661–1665 (1993).
  21. Neshler, G., Osborn, T.G. & Moore, T.L. In vitro effects of methotrexate on polyamine levels in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **14**, 395–399 (1996).
  22. Neshler, G., Moore, T.L. & Dornier, R.W. In vitro effects of methotrexate on peripheral blood monocytes: modulation by folinic acid and S-adenosylmethionine. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 637–641 (1991).
  23. Chan, E.S. & Cronstein, B.N. Methotrexate—how does it really work? *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 175–178 (2010).
  24. Allegra, C.J., Drake, J.C., Jolivet, J. & Chabner, B.A. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 4881–4885 (1985).
  25. Cronstein, B.N., Naime, D. & Ostad, E. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Invest.* **92**, 2675–2682 (1993).
  26. Cronstein, B.N. & Sitkovsky, M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 41–51 (2017).
  27. Montesinos, M.C. et al. Reversal of the anti-inflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the anti-inflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 656–663 (2000).
  28. Montesinos, M.C. et al. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* **56**, 1440–1445 (2007).
  29. Montesinos, M.C., Desai, A. & Cronstein, B.N. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R53 (2006).
  30. Montesinos, M.C. et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* **48**, 240–247 (2003).
  31. Riksen, N.P. et al. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 465–470 (2006).
  32. Neshler, G., Mates, M. & Zevin, S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 571–572 (2003).
  33. Benito-Garcia, E. et al. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **33**, 1275–1281 (2006).
  34. Allard, D., Turcotte, M. & Stagg, J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 333–339 (2017).
  35. Peres, R.S. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 2509–2514 (2015).
  36. Bitoun, S. et al. Methotrexate and BAFF interaction prevents immunization against TNF inhibitors. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 1463–1470 (2018).
  37. Chalupsky, K. & Cai, H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 9056–9061 (2005).
  38. Crabtree, M.J., Tatham, A.L., Hale, A.B., Alp, N.J. & Channon, K.M. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling—relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J. Biol. Chem.* **284**, 28128–28136 (2009).
  39. Sugiyama, T., Levy, B.D. & Michel, T. Tetrahydrobiopterin recycling, a key determinant of endothelial nitric-oxide synthase-dependent signaling pathways in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 12691–12700 (2009).
  40. Spurlock, C.F. et al. Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by JNK. *Arthritis Rheum.* **63**, 2606–2616 (2011).
  41. Spurlock, C.F., Tossberg, J.T., Fuchs, H.A., Olsen, N.J. & Aune, T.M. Methotrexate increases expression of cell cycle checkpoint genes via JNK activation. *Arthritis Rheum.* **64**, 1780–1789 (2012).
  42. Spurlock, C.F. et al. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* **54**, 178–187 (2015).
  43. Rinn, J.L. & Chang, H.Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
  44. Huarte, M. et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* **142**, 409–419 (2010).
  45. Weinblatt, M.E. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **124**, 16–25 (2013).
  46. Yang, F., Zhang, H.F., Mei, Y.D. & Wu, M. Reciprocal regulation of HIF-1 $\alpha$  and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect. *Mol. Cell* **53**, 88–100 (2014).
  47. Yoon, J.H. et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol. Cell* **47**, 648–655 (2012).
  48. Spurlock, C.F., Tossberg, J.T., Matlock, B.K., Olsen, N.J. & Aune, T.M. Methotrexate inhibits NF- $\kappa$ B activity via long intergenic (noncoding) RNA-p21 induction. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2947–2957 (2014).
  49. Malemud, C.J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **10**, 117–127 (2018).
  50. Gremese, E., Alivernini, S., Toluoso, B., Zeidler, M.P. & Ferraccioli, G. JAK inhibition by methotrexate (and csDMARDs) may explain clinical efficacy as monotherapy and combination therapy. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 1063–1068 (2019).
  51. Thomas, S. et al. Methotrexate is a JAK/STAT pathway inhibitor. *PLoS One* **10**, e0130078 (2015).
  52. Hassani, S.M., Dinarvand, P. & Rezaie, A.R. Adenosine regulates the proinflammatory signaling function of thrombin in endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **229**, 1292–1300 (2014).
  53. Yang, J. et al. Adenosine increases LPS-induced nuclear factor kappa B activation in smooth muscle cells via an intracellular mechanism and modulates it via actions on adenosine receptors. *Acta Physiol.* **210**, 590–599 (2014).
  54. Mediero, A., Perez-Aso, M. & Cronstein, B.N. Activation of adenosine A2A receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NF- $\kappa$ B nuclear translocation. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1372–1388 (2013).
  55. Tang, L.M. et al. Activation of adenosine A2A receptor attenuates inflammatory response in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Transpl. Proc.* **42**, 1915–1920 (2010).
  56. Di Paola, R. et al. Adenosine A2A receptor-selective stimulation reduces signaling pathways involved in the development of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* **33**, 541–551 (2010).
  57. Ramanathan, M., Pinhal-Enfield, G., Hao, I. & Leibovich, S.J. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter. *Mol. Biol. Cell* **18**, 14–23 (2007).
  58. Zerneck, A. et al. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* **113**, 2120–2127 (2006).
  59. Sands, W.A., Martin, A.F., Strong, E.W. & Palmer, T.M. Specific inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent inflammatory responses by cell type-specific mechanisms upon A2A adenosine receptor gene transfer. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1147–1159 (2004).
  60. Lukashov, D., Ohta, A., Apasov, S., Chen, J.F. & Sitkovsky, M. Cutting edge: physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J. Immunol.* **173**, 21–24 (2004).
  61. Bshesh, K. et al. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 1027–1036 (2002).
  62. Plant, D. et al. A genetic marker at the OLG1/3/TNFAIP3 locus associates with methotrexate continuation in early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk arthritis register. *Pharmacogenomics J.* **12**, 128–133 (2012).
  63. Muncio, C. et al. Methotrexate selectively targets human proinflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 2157–2165 (2016).
  64. Muncio, C. et al. Methotrexate limits inflammation through an A20-dependent cross-tolerance mechanism. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 752–759 (2018).
  65. Spurlock, C.F. III et al. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* **54**, 178–187 (2015).
  66. Vousden, K.H. & Prives, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**, 413–431 (2009).
  67. Kang, C. et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* **349**, aaa5612 (2015).
  68. Cooks, T. et al. Mutant p53 prolongs NF- $\kappa$ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* **23**, 634–646 (2013).
  69. Menendez, D., Shatz, M. & Resnick, M.A. Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 85–92 (2013).
  70. Cooks, T., Harris, C.C. & Oren, M. Caught in the cross fire: p53 in inflammation. *Carcinogenesis* **35**, 1680–1690 (2014).
  71. Takatori, H., Kawashima, H., Suzuki, K. & Nakajima, H. Role of p53 in systemic autoimmune diseases. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 509–516 (2014).
  72. Rackov, G. et al. p21 mediates macrophage reprogramming through regulation of p50-p50 NF- $\kappa$ B and IFN- $\beta$ . *J. Clin. Invest.* **126**, 3089–3103 (2016).
  73. Wu, Z.H., Shi, Y.L., Tibbetts, R.S. & Miyamoto, S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF- $\kappa$ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* **311**, 1141–1146 (2006).
  74. Zhang, T. et al. p53 predominantly regulates IL-6 produc-



- tion and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 271 (2016).
75. McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429–442 (2007).
  76. Zheng, S. J., Lamhamedi-Cherradi, S. E., Wang, P., Xu, L. Y. & Chen, Y. H. Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function. *Diabetes* **54**, 1423–1428 (2005).
  77. Okuda, Y., Okuda, M. & Bernard, C. C. A. Regulatory role of p53 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **135**, 29–37 (2003).
  78. Kawashima, H. et al. Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. *J. Immunol.* **191**, 3614–3623 (2013).
  79. Munoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 741–750 (2016).
  80. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–255 (2010).
  81. Olsen, N. J., Spurlock, C. F. & Aune, T. M. Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R17 (2014).
  82. Merrill, J. T. et al. Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40**, 1308–1315 (1997).
  83. Chagoya de Sanchez, V. et al. Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat—possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. *Brain Res.* **612**, 115–121 (1993).
  84. Chagoya de Sanchez, V. Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 339–355 (1995).
  85. Chagoya de Sanchez, V. et al. Temporal variations of adenosine metabolism in human blood. *Chronobiol. Int.* **13**, 163–177 (1996).
  86. Chan, E. S. et al. Adenosine A2A receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 1144–1155 (2006).
  87. Che, J., Chan, E. S. & Cronstein, B. N. Adenosine A2A receptor occupancy stimulates collagen expression by hepatic stellate cells via pathways involving protein kinase A, Src, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling cascade or p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1626–1636 (2007).
  88. Morgan, S. L., Baggott, J. E., Koopman, W. J., Krumdieck, C. L. & Alarcon, G. S. Folate supplementation and methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 315–316 (1993).
  89. Alarcon, G. S. & Morgan, S. L. Guidelines for folate supplementation in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: comment on the guidelines for monitoring drug therapy. *Arthritis Rheum.* **40**, 391 (1997).
  90. Roszkiewicz, J. & Smolewska, E. In the pursuit of methotrexate treatment response biomarker in Juvenile idiopathic arthritis — are we getting closer to personalised medicine? *Curr. Rheumatol. Rep.* **19**, 19 (2017).
  91. Taylor, J. C. et al. Genome-wide association study of response to methotrexate in early rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.* **18**, 528–538 (2018).
  92. Plant, D. et al. Profiling of gene expression biomarkers as a classifier of methotrexate nonresponse in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 678–684 (2019).
  93. de Rotte, M. et al. Development and validation of a prognostic multivariable model to predict insufficient clinical response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *PLoS One* **13**, e0208534 (2018).
  94. Sergeant, J. C. et al. Prediction of primary non-response to methotrexate therapy using demographic, clinical and psychosocial variables: results from the UK Rheumatoid Arthritis Medication Study (RAMS). *Arthritis Res. Ther.* **20**, 147 (2018).
  95. Teitsma, X. M. et al. Inadequate response to treat-to-target methotrexate therapy in patients with new-onset rheumatoid arthritis: development and validation of clinical predictors. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 1261–1267 (2018).
  96. Szodoray, P. et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **9**, 140–143 (2010).
  97. Luban, S. & Li, Z. G. Citrullinated peptide and its relevance to rheumatoid arthritis: an update. *Int. J. Rheum. Dis.* **13**, 284–287 (2010).
  98. Gallucci, S. & Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 114–119 (2001).
  99. Matzinger, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* **8**, 11–13 (2007).
  100. Gubner, R., August, S. & Ginsberg, V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am. J. Med. Sci.* **221**, 176–182 (1951).
  101. Weinblatt, M. E. et al. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 818–822 (1985).
  102. Williams, H. J. et al. Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis: a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.* **28**, 721–730 (1985).
  103. Kremer, J. M. & Lee, J. K. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **29**, 822–831 (1986).
  104. US Food and Drug Administration Drug approval package. *accessdata.fda.gov* [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2013/204824Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/204824Orig1s000TOC.cfm) (2014).
  105. US Food and Drug Administration Rasuvo (methotrexate) injection *accessdata.fda.gov*. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/205776Orig1s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/205776Orig1s000TOC.cfm) (2015).

## 致谢

The work of T.M.A. was supported by grants from the US National Institutes of Health (R21AR063846, R42AI53948, R01AI044924), the American College of Rheumatology 'Within Our Reach' grant programme (ACR124405), the US National Center for Advancing Translation Sciences (UL1TR000445) and the US National Science Foundation Graduate Research Fellowship Program.

## 作者贡献

The authors contributed equally to all aspects of the article.

## 利益冲突

B.N.C. declares that he holds equity in Regenosine, a biotech start-up developing therapies for osteoarthritis, and CanFite Biopharma, that he has received grant support from AstraZeneca and Kairos Inc., and that he has a number of patents involving adenosine receptors and hepatic fibrosis, wound healing, bone regeneration and osteoarthritis. T.M.A. declares that he has no competing interests.

## 审稿人说明

*Nature Reviews Rheumatology* thanks W. Wei and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

## 出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© Springer Nature Limited 2020

翻译: 陈乐锋, 李谦华 (中山大学孙逸仙纪念医院)  
审校: 戴 冽 (中山大学孙逸仙纪念医院)

# 羟氯喹和氯喹的作用机制：风湿病中的应用

## Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology

Eva Schrezenmeier<sup>1</sup> 和 Thomas Dörner<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Intensive Medical Care, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

<sup>2</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

<sup>3</sup>Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin, Germany.

\*email:thomas.doerner@charite.de

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0372-x>

**摘要：**尽管羟氯喹和氯喹等抗疟药物在临床上广泛用于治疗类风湿关节炎（RA）、系统性红斑狼疮（SLE）和其他炎性风湿性疾病，但对这些药物作用机制的认识仍在不断涌现。羟氯喹和氯喹是弱碱，具有典型的“深”分布容积和大约 50 天的半衰期。抗疟药物能干扰溶酶体活性和自噬，与膜稳定性相互作用，改变信号通路和转录活性，从而抑制细胞因子的产生和调节某些共刺激分子。这些作用方式，加上药物的化学性质，可以解释这些药物的临床疗效和众所周知的副作用（如视网膜病变）。其剂量 - 反应关系未知，缺乏临床疗效所需的最小剂量和毒性剂量的定义，给临床实践带来了挑战。患者不依从性和血液药物水平可能的依赖性变化是构成了新的挑战。可用的机制数据为羟基氯喹的免疫调节效力提供了见解，并为寻找更有效和 / 或选择性的抑制剂提供了理论依据。

抗疟药物羟氯喹和氯喹是偶然和经验性地用于治疗各种风湿病的药物（图 1）。氯喹和羟氯喹均未进行常规药物开发，但它们的使用已成为当前类风湿关节炎（RA）<sup>[1]</sup>、系统性红斑狼疮（SLE）<sup>[2,3,4]</sup>、抗磷脂综合征（APS）<sup>[5]</sup> 和原发性干燥综合征<sup>[6,7]</sup> 治疗指南的一部分。

关于抗疟药物在系统性红斑狼疮（SLE）中应用的随机对照和观察性系统回顾研究<sup>[8,9]</sup>，特别强调了羟氯喹，发现了强有力的证据表明该分子具有免疫调节功能，包括预防疾病发作和促进 SLE 长期生存，以及在怀孕期间控制自身免疫性疾病活动，而没有胎儿毒性或胚胎毒性作用的证据。有证据表明，羟氯喹可以延缓或预防自身免疫中的器官损伤<sup>[10]</sup>，防止骨破坏<sup>[11]</sup>，并且具有抗血栓作用<sup>[12]</sup>。然而，评估抗疟药物治疗手骨关节炎的试验发现，羟氯喹在缓解疼痛方面并不比安慰剂更有效<sup>[13,14]</sup>，这意味着尽管抗疟药物对某些风湿性疾病有用，但它们并不是“神奇药物”。

氯喹和羟氯喹除了具有直接的免疫调节作用外，还可以降低动脉粥样硬化的发生率，改善高血糖和高脂血症，保护风湿性疾病患者免受感染<sup>[15,16]</sup>。然而，这些保护作用的潜在机制在很大程度上仍然是未知的。这些观察到的效应是否有共同的作用模式，或者是由各种不同的过程产生的是一个重要的问题。羟氯喹和氯喹的作用机制仍在现代分子医学中持续研究<sup>[17,18]</sup>，采用计算生物学<sup>[19]</sup>、合成生物学<sup>[20,21,22]</sup>、免疫学<sup>[23,24]</sup>、结构生物学<sup>[25,26]</sup> 和“大数据”驱动的公共卫生科学<sup>[27,28]</sup> 中等先进工具。需要对羟氯喹的作用方式进行详细研究，以便更好地了解剂量 - 反应关系和

安全性。这些知识将指导调节溶酶体活性和干扰自噬的新疗法的发展。

本综述的主要目的是讨论羟氯喹和氯喹的作用方式，包括可能解释这些抗疟药物临床疗效和不良反应的药代动力学和药效学特性。有关羟基氯喹和氯喹治疗某些疾病的临床方面的综合概述，请读者参阅更专业的文献<sup>[15,29,30]</sup>。

### 药代动力学

### 药物结构与化学

常用的抗疟药物根据其核心结构可分为不同的类别。羟氯喹和氯喹属于 4-氨基喹啉类的药物，而其他较不常用的抗疟药物属于其他类别 [如内过氧化物酶（青蒿素）或吡啶（美帕林）]<sup>[31]</sup>。图 2 描述了羟氯喹和氯喹的结构和代谢。这两种药物都有一个扁平的芳香核心结构，并且由于存在一个碱性侧链而成为弱碱。碱性侧链被认为有助于这些药物在细胞内，特别是溶酶体的积累，这似乎对其激活以及药物与核酸潜在的相互作用至关重要。

羟氯喹和氯喹都是对映异构体（R 和 S 异构体）。（R）-（-）-羟氯喹（羟氯喹的立体化学‘右旋’构型）在血液中的浓度高于（S）-（+）-羟氯喹（羟氯喹的立体化学‘左旋’构型）<sup>[32]</sup>，表明在这种药物的沉积和 / 或代谢中存在立体选择性过程。药物对映体的疗效和安全性也可能不同。然而，氯喹的（R）-（-）和（S）-（+）异构体在体外<sup>[33]</sup> 中具有相似的作用，氯喹对映体对大鼠的胚胎毒性也相当<sup>[34]</sup>。已开发出立体异构体特异性药物制剂用于减少副作用，如

## 要点

- 羟氯喹和氯喹是弱碱，积聚在酸性环境中如溶酶体和炎性(酸性)组织。
- 羟氯喹和氯喹的分布容积大，半衰期长，与起效慢和停药后的延迟效应一致。
- 在分子水平上，羟氯喹和氯喹干扰溶酶体活性和自噬，破坏膜稳定性，改变信号通路和转录活性。
- 在细胞水平上，这些药物通过减少 Toll 样受体信号和细胞因子的产生的直接和间接机制来抑制免疫激活，并可在 T 细胞中减少 CD154 的表达。
- 视网膜病变风险增加导致眼科指南建议的更新：羟氯喹的最大日剂量为 5.0mg/kg 体重；然而，没有足够的疗效数据支持这一建议。
- 未来的研究应关注溶酶体和 / 或自噬体活性的特异性靶向性是否有治疗风湿性疾病的潜力。

视网膜病变的风险，但其作用需要进一步的临床研究<sup>[35,36]</sup>（见下文）。

### 吸收、分布和清除

羟氯喹和氯喹的药代动力学的数据（图 2）主要是基于对健康个体的研究<sup>[32]</sup>。羟氯喹和氯喹的药代动力学特征复杂，因为它们的分布体积大，半衰期长<sup>[32]</sup>。此外，羟氯喹和氯喹的剂量 - 反应关系和毒性阈值尚未完全阐明。

羟氯喹以硫酸盐形式给药，而氯喹以磷酸盐形式给药。两者通常在肠道上段吸收<sup>[37]</sup>。硫酸羟氯喹（200mg）从口服至可在血液中检测到的时间通常为 0~0.85h（平均 0.43h）<sup>[37]</sup>，羟氯喹和氯喹的总生物利用度均为 0.7~0.8（参考文献<sup>38</sup>）。一些研究报告羟基氯喹和氯喹在人体内的药代动力学存在显著差异<sup>[38,39]</sup>；然而，这些差异可以通过所用分析方法、所用样品来源（即血浆与全血）或这些药物的肾清除率的差异来解释<sup>[38,40]</sup>。

吸收后，两种药物的半衰期相对较长（40~60 天），因为它们在血液中的分布量较大（羟氯喹为 472571，氯喹为 650001）<sup>[39]</sup>。这两种药物都能分布到细胞和细胞间的水室，导致平均停留时间较长（羟基氯喹约 1300h，氯喹约 900h）<sup>[39]</sup>。肾脏清除率也是一个重要的临床考虑因素<sup>[32]</sup>，尤其是在肾衰竭患者中，因为清除率降低会增加这些药物的生物利用度（图 2c）。

羟氯喹和氯喹的血浆、血液和血清浓度在个别患者中（特别是在血清和全血中测得的浓度）和患者之间（患者间变异性）存在差异<sup>[38]</sup>。关于在“深部”器官（例如淋巴组织、免疫细胞、骨髓、滑膜组织和其他结缔组织）药物分布数据很少，药物在组织间分布不能用三室模型药理

学来预测这些“深部”器官中的药物浓度。

作为一种弱碱，羟氯喹在酸性囊泡内积聚，例如溶酶体室（这是药物的重要作用部位）<sup>[41,42]</sup>。据报道，RA 和轻度关节炎患者的羟氯喹血药浓度高于活动性血清阳性患者<sup>[43]</sup>。药物水平的波动可能会进一步受到个体状况的影响，例如隔离这些药物的显性或亚临床炎症（即酸性环境）。

为了更好地了解羟氯喹药代动力学和药效学的复杂性，2018 年研究人员使用基于生理学的药代动力学模型来描述这种药物的吸收、分布、代谢、排泄和溶酶体特异性螯合组织特异性<sup>[44]</sup>。该模型需要测量药物血浆浓度，其临床适用性仍需研究，但可为羟氯喹的组织分布、剂量 - 反应关系和原位环境相关效应提供新的重要见解。

羟氯喹与黑色素很强的结合力，可沉积在皮肤和眼睛等含有黑色素的组织中，这可能解释了某些组织特异性机制（如羟氯喹视网膜病变或该药物治疗皮肤表现的疗效）。临床观察表明，羟氯喹比氯喹具有更低的视网膜病变风险，这可能是由于羟氯喹的分布量低于氯喹所致<sup>[45]</sup>。

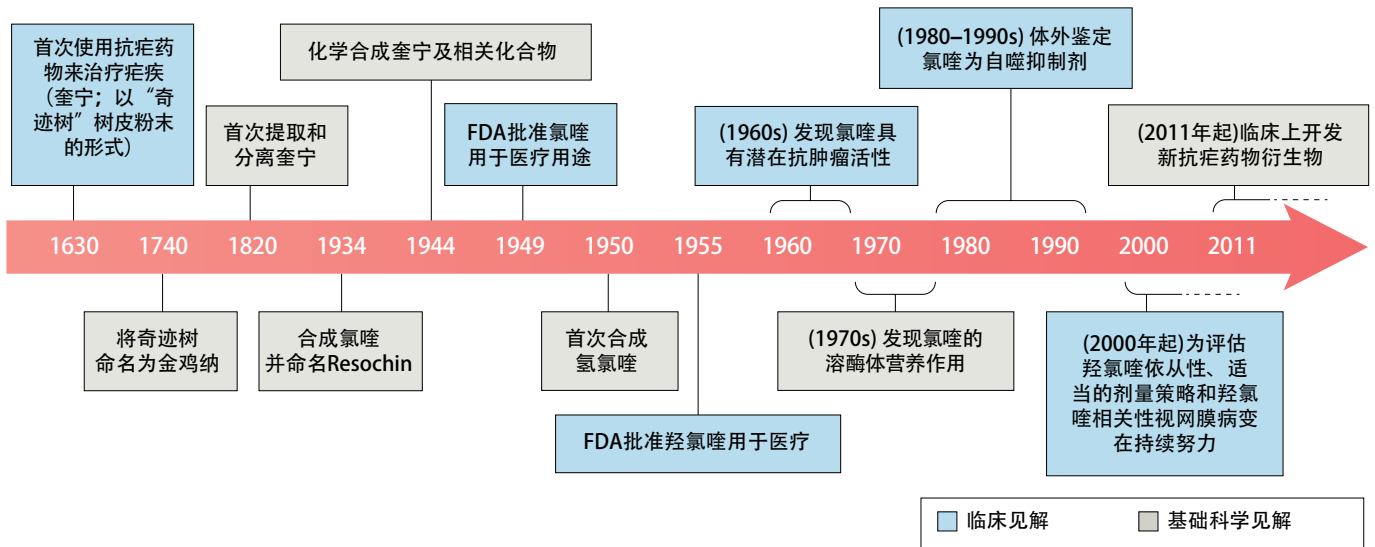
### 药物 - 药物相互作用

抗疟药物对其他药物的影响是一个重要的临床考虑因素（反之亦然）。氯喹和羟氯喹都是细胞色素 P450 (CYP) 酶（负责多种药物代谢的酶）的底物，因此可以干扰其他药物<sup>[38,46,47]</sup>。

CYP 酶催化氯喹和羟氯喹的脱烷基反应生成具有药理活性的代谢物<sup>[38,40,48,49,50]</sup>（图 2b）。利用微粒体稳定性测定或重组酶对负责各种药物代谢的特异性 CYP 酶进行了研究<sup>[48,51,52]</sup>。CYP2C8、CYP3A4、CYP2D6 和 CYP1A1 能代谢氯喹<sup>[48,49,50,52,53]</sup>。然而，这些异构体的作用可能在个体之间有所不同<sup>[51,53]</sup>而且据报道羟氯喹的血药浓度在个体之间也有所不同<sup>[54]</sup>。

就其他药物而言，同时使用氯喹会增加地高辛（一种强心苷）四倍体的血浆浓度<sup>[55]</sup>。因此，在抗疟治疗期间需要密切监测洋地黄毒素的水平。羟氯喹通过与同一种 CYP 酶 CYP2D6 竞争来阻止美托洛尔的代谢，从而影响美托洛尔的水平<sup>[56]</sup>。因此，羟氯喹治疗后美托洛尔的血药浓度和生物利用度增加。有趣的是，在羟氯喹治疗期间，其他 CYP2D6 代谢的药物（右美沙芬）水平并没有增加<sup>[56]</sup>。由于抗疟药物属于会干扰影响 QT 间期的药物，同时服用羟氯喹治疗心脏共病的患者也应监测心律失常的潜在风险<sup>[57]</sup>。





**图 1 氯喹和氢氯喹的临床应用时间表。** 在很早就将植物提取物用于治疗疟疾，之后人们合成抗疟药物<sup>[154]</sup>，随后被批准用于医疗用途<sup>[155,156]</sup>。自 20 世纪 40 年代以来，氯喹和氢氯喹用于治疗风湿性疾病。针对自噬体活性的化合物的新衍生物正在开发中。

根据眼科学的建议，三苯氧胺（一种用于治疗乳腺癌的选择性雌激素受体调节剂）与羟氯喹联合用药，由于协同抑制视网膜上皮细胞中的溶酶体酶<sup>[58]</sup>，导致眼睛毒性风险增加。因此，三苯氧胺与羟氯喹或氯喹的联合应用应限制在 6 个月内。

另一个需要考虑的相关药物相互作用是抗疟药物与其他药物之间的相互作用。羟氯喹可通过局部 pH 值变化减少甲氨蝶呤的胃肠道吸收，从而降低甲氨蝶呤的生物利用度<sup>[38,59]</sup>。这种效应可能解释了甲氨蝶呤与羟氯喹合用时急性肝脏不良反应风险的降低<sup>[60]</sup>。没有羟氯喹和甲氨蝶呤之间其他相互作用（如酶水平上的相互作用）的报道<sup>[47,60]</sup>。羟氯喹也可以增加环孢素的水平；因此，在联合治疗期间也应密切监测环孢素的水平<sup>[61]</sup>。

有些药物也会干扰羟氯喹和氯喹的生物利用度。例如，增加胃酸 pH 值的药物（例如质子泵抑制剂<sup>[62]</sup>）可能会干扰抗疟药物的口服吸收和口服生物利用度。然而，在一项针对系统性红斑狼疮患者的研究中，服用质子泵抑制剂的患者和未服用质子泵抑制剂的患者之间的羟氯喹血浆浓度没有差异<sup>[63]</sup>。最后，既往认为吸烟会干扰羟氯喹的生物利用度<sup>[64]</sup>；然而，2017 年的一项研究发现羟氯喹血浆浓度与吸烟状态之间没有相关性<sup>[65]</sup>。

**怀孕和哺乳**

尽管氯喹和羟基氯喹都可通过胎盘，尽管最初担心胎儿组织中存在与药物相关的色素沉着<sup>[66]</sup>，但这些药物对胎

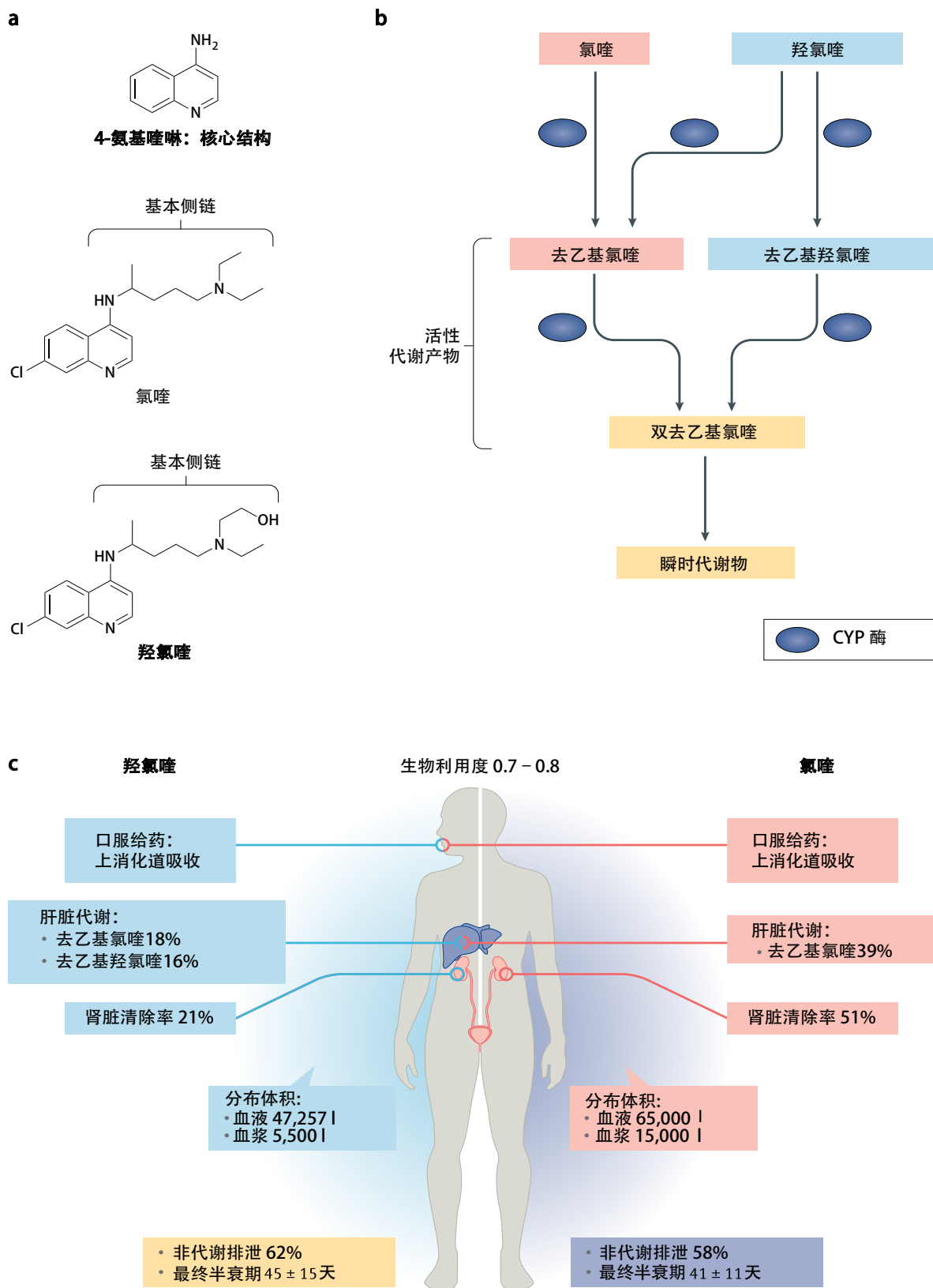
儿没有明显的毒性作用<sup>[67]</sup>。目前的指南强烈推荐对自身免疫性疾病患者在妊娠期间维持羟氯喹治疗<sup>[68-70]</sup>。一些数据表明，妊娠期间羟氯喹对先天性心脏传导阻滞具有保护作用<sup>[71,72]</sup>，可能是由于 I 型干扰素（IFN）标志物表达减少所致<sup>[73]</sup>。值得注意的是，在一个病例研究中没有胎儿心脏毒性作用的证据<sup>[74]</sup>。羟氯喹也可分泌到母乳中，但与儿童的不良事件无关<sup>[75]</sup>。分娩后继续治疗甚至有利于防止母亲发病<sup>[69]</sup>。总的来说，羟氯喹被认为在怀孕和哺乳期间使用是安全的。

**作用机制**

羟氯喹和氯喹的治疗或副作用有多种作用模式，其中大多数是基于体外研究。值得注意的是，这些机制与在体内观察到的临床疗效和安全性之间的联系尚未完全阐明。抗疟药物对溶酶体活性、自噬和信号通路有直接的分子效应（图 3）。关于这些药物对浆细胞样树突状细胞（PDC）、B 细胞、其他抗原呈递细胞和 T 细胞的作用的数据也可用（图 4）。与免疫系统的各种治疗干预一样（方框 1），其作用机制可能依赖于上下文（即，依赖于炎症条件和/或受影响的组织或器官）。

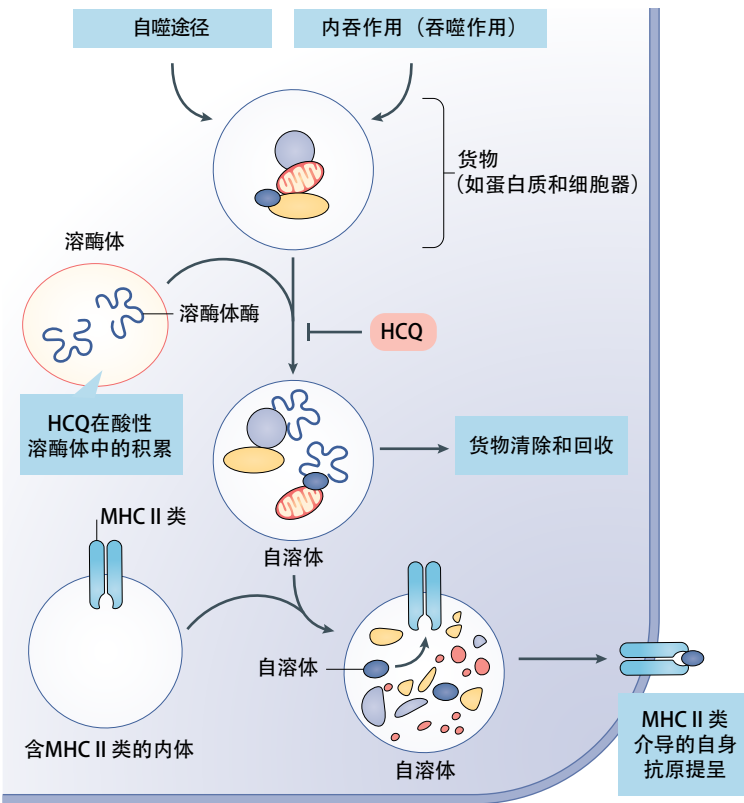
**分子效应**

**抑制溶酶体活性和自噬。** 氯喹和羟基氯喹的一个重要作用方式是干扰溶酶体活性和自噬。普遍认为氯喹和羟基氯喹在溶酶体中积聚（溶酶体变性）并抑制其功能。在体外，

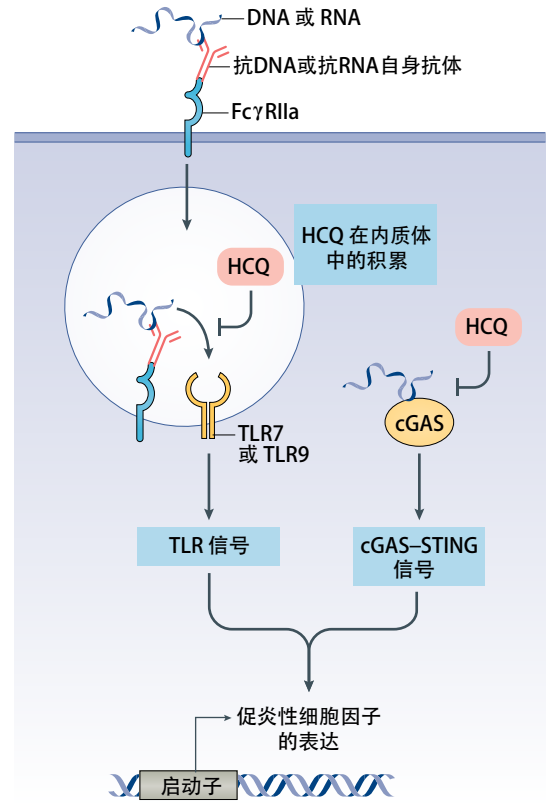


**图 2 羟氯喹和氯喹的药代动力学特性。** **a** 羟氯喹和氯喹属于 4-氨基喹啉类药物。这些药物具有 4-氨基喹啉核心结构和一个基本的侧链。**b** 细胞色素 P450 (CYP) 酶介导氯喹和羟氯喹的脱烷基化。去乙基氯喹是 CYP 介导的两种药物脱烷基的直接下游产物，而去乙基羟氯喹仅是羟氯喹的代谢物。二乙基氯喹是两种药物的下游代谢产物。二乙基氯喹是两种药物的下游代谢产物。**c** 羟氯喹和氯喹的某些药理学性质不同。两种药物的分布量大、半衰期长，但肾清除率差异显著。该数字中的数据取自 Costedoat Chalumau 等人<sup>[143]</sup> 和 McChesney<sup>[40]</sup> 的研究。

a 自身抗原提呈



b TLR 信号



**图 3 羟氯喹在自身免疫过程中的潜在分子机制。** a 羟氯喹 (HCQ) 沿 pH 梯度进入溶酶体并在溶酶体中积聚。在溶酶体中, 羟氯喹通过增加 pH 值来阻止溶酶体酶的活性, 从而抑制自溶酶体中从外部 (通过内吞或吞噬) 或内部 (通过自噬途径) 衍生物质的降解。抑制溶酶体活性可以阻止 MHC II 类介导的自身抗原呈递。b 羟氯喹也可以在内质体中积累并结合到双链 DNA 的小凹槽上。该药物可以通过改变内体 (参与 TLR 处理) 的 pH 值和/或阻止 TLR7 和 TLR9 与其配体 (分别是 RNA 和 DNA) 结合来抑制 TLR 信号。羟氯喹还可以通过干扰核酸传感器环 GMP-AMP 合酶 (cGAS) 与细胞溶质 DNA 的结合来抑制其活性。通过阻止 TLR 信号和 cGAS- 干扰素基因刺激因子 (STING) 信号, 羟氯喹可以减少促炎细胞因子的产生 (包括 I 型干扰素)。

氯喹可以破坏溶酶体膜, 促进细胞内溶酶体酶的释放<sup>[76]</sup>。尽管后一种机制的证据很少, 但这些药物干扰溶酶体活性的能力已被反复验证<sup>[77-79]</sup>。干扰溶酶体活性可能抑制淋巴细胞的功能, 具有免疫调节甚至抗炎作用。

该药物抗炎作用的可能机制之一是通过溶酶体途径损害抗原呈递。溶酶体含有水解酶, 并与其他囊泡协同消化物质例如细胞内的细胞器和物质 (自噬过程) 或细胞外的物质 (通过内吞或吞噬途径)。溶酶体不仅参与回收细胞基质<sup>[80]</sup>, 还参与抗原处理和 MHC II 类呈递, 间接促进免疫激活<sup>[81]</sup>。自噬也参与抗原提呈和免疫激活<sup>[82,83]</sup>。例如, 来自一项研究的数据表明, 自噬对于抗原呈递细胞向 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 MHC II 类介导的自身抗原呈递非常重要<sup>[84]</sup>。由于溶酶体中的 pH 值对于参与水解的溶酶体酶是最理想的, 因此通过增加内体室的 pH 值<sup>[85]</sup>, 氯喹和羟氯喹可能会损害溶酶体和自噬体的成熟, 并抑制沿溶酶体途径的抗原呈递 (图 3)。总的来说, 现有的研究表明, 羟氯喹和

氯喹损害或抑制溶酶体和自噬体功能, 随后激活免疫系统。

除了溶酶体变性外, 在溶酶体中确定羟氯喹确切分子靶点的工作也正在进行中。一项研究确定棕榈酰蛋白硫酯酶 1 (PPT1) 是一种参与脂质修饰蛋白质分解代谢的酶, 是氯喹和氯喹衍生物的潜在溶酶体靶点<sup>[86]</sup>。羟氯喹可结合并抑制 PPT1 活性<sup>[86]</sup>, 值得注意的是, PPT1 在 RA 患者的滑膜组织中过度表达<sup>[87]</sup>。尽管这是一个有趣的正在进行的研究的例子, 确认性功能研究和溶酶体内其他分子靶点的鉴定仍然是有必要的。

**信号通路抑制。** 羟氯喹和氯喹也可以干扰 Toll 样受体 (TLR) 信号。例如, 内体 pH 值的变化可干扰 TLR9 和 TLR7 的处理<sup>[88]</sup>, 因此, 这些抗疟药物可能通过介导局部 pH 的变化来阻止细胞外刺激时 TLR 的激活<sup>[88]</sup>。氯喹或羟氯喹也可直接与核酸结合, 因此可能通过抑制 TLR- 配体相互作用 (空间位阻) 在细胞内水平阻断 TLR9 信号 (图 3)。



后一种假设得到了基于表面等离子体共振和荧光光谱的分析的支持, 该分析表明抗疟药物可以直接抑制 CpG-TLR9 相互作用<sup>[89,90]</sup>。除了 TLR9 信号外, 羟氯喹还可以抑制 RNA 介导的 TLR7 信号激活<sup>[91,92]</sup>。尽管这些药物抑制 TLR7 和 TLR9 的确切作用模式需要在分子水平上进一步阐明<sup>[93]</sup>, 但抑制 TLR 加工和抑制 TLR 结合可能是主要的作用机制。

羟氯喹和氯喹的另一种潜在作用机制是通过抑制配体结合干扰环 GMP-AMP (cGAMP) 合酶 (cGAS) 活性<sup>[94]</sup>。cGAS- 干扰素基因刺激因子 (STING) 通路是 I 型干扰素应答的主要来源。胞浆 DNA 与 cGAS 和第二信使 cGAMP 结合, 通过转录因子 IFN 调节因子 3 (IRF3) 介导 I 型 IFN 的 STING 依赖性转录<sup>[95,96]</sup>。值得注意的是, cGAS 抑制剂目前正在开发中, 用于治疗风湿性疾病<sup>[97]</sup>。

### 细胞效应

**细胞因子产生与免疫激活。**羟氯喹和氯喹可间接减少各种类型细胞产生的抗炎细胞因子。在体外, 羟氯喹和氯喹抑制单核细胞产生 IL-1、IL-6、TNF 和 IFN $\gamma$ <sup>[98]</sup> (图 4)。此外, 羟氯喹治疗可抑制含 RNA 免疫复合物刺激的 pDC 和自然杀伤细胞共培养物中 TNF、IFN $\alpha$ 、IL-6 和 CCL4 (也称为 MIP1 $\beta$ ) 的产生<sup>[99,100]</sup>。

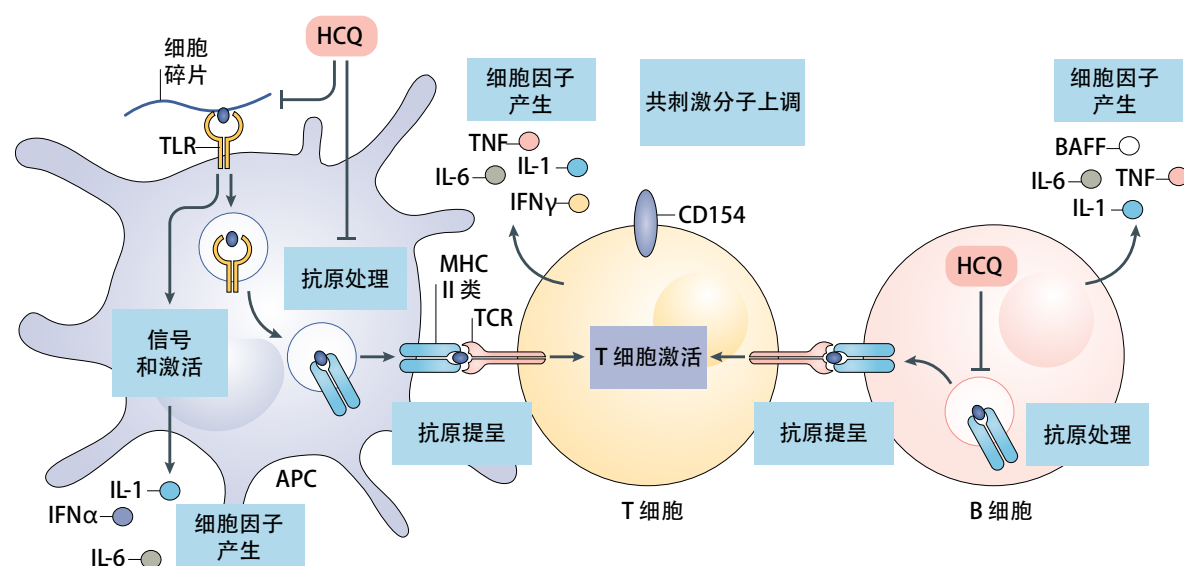
TLR 信号刺激细胞因子的产生, 因此羟氯喹和氯喹可能通过抑制 TLR 途径抑制细胞因子的产生。值得注意的是,

IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4; TLR7 和 TLR9 信号通路的一个组成部分) 的小分子抑制剂可以比羟氯喹更显著地减少外周血单个核细胞 (PBMC) 产生的细胞因子<sup>[101]</sup>。刺激后, 与羟氯喹相比 (492 对 65 个基因), 抑制 IRAK4 改变了大量的 RNA 诱导和免疫复合物诱导基因的表达。这一发现表明羟氯喹在抑制多种细胞因子产生方面不如 IRAK4 抑制剂有效。然而, 这项研究也令人信服地表明, 羟氯喹对 SLE 患者外周血单个核细胞产生细胞因子和基因表达有显著影响, 包括抑制 TNF 的产生<sup>[101]</sup>。事实上, 在其他研究中, 羟氯喹治疗与 SLE 患者血清 IFN $\alpha$  水平降低有关<sup>[102]</sup>。此外, 在类风湿关节炎患者中, 长期使用羟氯喹 (200–400 mg/天) 可降低循环中 IL-1 和 IL-6 的水平, 并与红细胞沉降率的改善相关<sup>[103,104]</sup>。

干扰上游的免疫激活 (包括抑制溶酶体活性) 可以部分解释羟氯喹和氯喹的抗炎作用。事实上, 羟氯喹治疗与 SLE 患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞共刺激分子 CD154 的剂量依赖性下调有关, 同时伴有细胞内 Ca<sup>2+</sup> 动员和活化 T 细胞胞浆核因子 1 (NFATc1) 和 NFATc2 核因子移位的减少<sup>[105]</sup>。然而, 抗疟药物对细胞因子产生的直接影响还需要进一步研究。

### 心血管效应

虽然羟氯喹不是抗凝剂, 但广泛认为其具有血管保护作用, 可预防血栓并发症的发生。这种保护作用似乎与全



**图 4 自身免疫期间羟基氯喹的潜在细胞效应。**羟氯喹 (HCQ) 通过抑制各种固有和适应性免疫过程, 在不同细胞水平上干扰免疫激活。在自身免疫过程中, 细胞碎片可激活浆细胞树突状细胞 (pDCs) 和其他免疫抗原提呈细胞 (APCs) (包括单核细胞、巨噬细胞和 B 细胞) 中 Toll 样受体 7 (TLR7) 和 TLR7 信号通路, 从而激活多种类型细胞, 分泌各种促炎性细胞因子。在 APCs 中, 羟氯喹可能干扰 TLR7 和 TLR9 配体结合和 TLR 信号 (通过溶酶体抑制和降低 MyD88 信号), 从而抑制 TLR 介导的细胞活化和细胞因子的产生。在 pDCs 和 B 细胞等 APC 中, 该药物还抑制抗原处理和随后 MHC II 向 T 细胞的呈递, 防止 T 细胞活化、分化和表达共刺激分子 (如 CD154), 也可减少 T 细胞和 B 细胞产生细胞因子 (如 IL-1、IL-6 和 TNF)。BAFF, B 细胞激活因子。

### 方框 1 羟氯喹和氯喹的主要作用机制

羟氯喹和氯喹抑制某些细胞功能和参与免疫激活的分子途径，如下所示，部分是通过在溶酶体内积聚和吞噬细胞的自噬以及改变局部 pH 值浓度来实现的：

- 抑制 MHC II 类分子表达、抗原呈递和免疫激活（减少 T 细胞的 CD154 表达）
- 抑制各种促炎细胞因子的产生，如 IL-1、IFN $\alpha$  和 TNF，这些因子可防止细胞因子介导的软骨再吸收
- 干扰 Toll 样受体 7（TLR7）和 TLR9 信号通路
- 干扰环 GMP-AMP（cGAMP）合酶（cGAS）活性

身炎症引起的继发性凝血病患者<sup>[106]</sup>和原发性 APS 患者最为相关<sup>[107]</sup>。

与普通人群相比，风湿性炎症性疾病患者发生心血管并发症的风险增加<sup>[108-111]</sup>。这种增加的风险是由基础疾病、用于治疗疾病的药物（如非甾体抗炎药，包括 COX-2 抑制剂<sup>[112]</sup>和大剂量糖皮质激素）以及合并症（如动脉高血压、高脂血症、慢性肾衰竭和糖尿病）引起的。相比之下，羟氯喹治疗似乎可以对抗这些影响，并通过降低心血管事件的风险、降低空腹血糖水平<sup>[113]</sup>和降低高脂血症提供长期益处<sup>[15,114]</sup>。例如，在一项针对 SLE 患者的研究中，在预防心血管并发症方面，联合使用小剂量阿司匹林和羟氯喹优于单独使用阿司匹林或羟氯喹<sup>[115]</sup>。然而，还需要足够大的对照研究来量化羟氯喹在预防风湿性疾病和其他非风湿性疾病患者心血管并发症方面的益处<sup>[116]</sup>。

羟氯喹和氯喹降低自身炎症性疾病促凝状态的潜在机制包括抑制抗磷脂抗体结合<sup>[117]</sup>或抑制血小板聚集<sup>[118,119,120]</sup>。值得注意的是，在 APS 小鼠模型中，羟氯喹治疗与内皮功能的改善有关<sup>[121,122]</sup>。确切的分子机制，这些药物介导其抗血栓作用很大程度上仍然未知。

#### 治疗意义

##### 不良反应：药物毒性

羟氯喹和氯喹有一个已知的和良好的安全性，并被认为是作为免疫调节而不是免疫抑制功能的药物。这些药物靶向的各种免疫途径 [ 如 TLR7 和 TLR9 信号、T 细胞受体（TCR）和 B 细胞受体（BCR）激活以及上文讨论的其他途径 ] 在治疗期间基本上保持不变（即未完全抑制）。

与甲氨蝶呤和来氟米特等免疫抑制药物治疗不同，羟氯喹或氯喹治疗与增加感染并发症或癌症风险无关<sup>[16,123]</sup>。这些抗疟药物最常见的不良反应是胃肠道反应，包括恶心、呕吐、腹泻和腹部不适<sup>[124]</sup>。此外，一些研究报告了羟氯

喹相关肌病的发生<sup>[125-128]</sup>和羟氯喹介导和 / 或氯喹介导的心脏毒性作用，包括风湿性疾病患者的心律失常（如 QT 间期延长）和心肌病的发展<sup>[129-132]</sup>。然而，这些药物引起的心脏毒性缺乏确凿证据，需要进一步的药物安全监测。肾功能受损会增加抗疟药物的生物利用度，增加不良反应的风险。

抗疟治疗最严重的并发症是视网膜病变。认为其是通过破坏视网膜色素上皮中感光细胞外段的溶酶体降解（视觉周期中的一个重要步骤）而引起视网膜损伤的。在机制上，这种干扰会导致视网膜色素上皮细胞中脂褐素的增加和光感受器的降解<sup>[133]</sup>。与羟氯喹相比，氯喹更常引起视网膜病变，可导致患者出现环状缺损（称为牛眼黄斑病变）和视网膜直径缺损。有关羟氯喹视网膜病变的病理生理学、流行病学和治疗的详细资料已广泛综述<sup>[133]</sup>。值得注意的是，在过去几年中诊断程序进步，以及由此产生的认识到羟氯喹相关的视网膜病变比以前认识到的更为常见，导致新的眼科指南更新<sup>[134,135]</sup>。在使用羟氯喹治疗期间，增加发生视网膜病变的风险包括多种因素：药物剂量 >5mg/ 千克实际体重 / 天，长期使用药物（10~25 年），高累积剂量（600~1000 g 以上），3~5 期慢性肾病和三苯氧胺中毒（>6 个月）<sup>[133]</sup>。羟氯喹视网膜病变最重要的预测因素是高剂量和长期（>5 年）使用，但目前的证据仅限于回顾性研究，其中大多数是基于医疗记录，并有很大的局限性（如关于肾损害的有限数据）<sup>[133]</sup>。

#### 剂量注意事项

根据眼科指南，通过使用适当的药物剂量（即考虑患者的实际体重）和使用前的筛查方式，如光学相干断层扫描<sup>[133]</sup>，可以最大限度地减少羟氯喹或氯喹治疗期间眼部不良反应的发生。然而，由于羟氯喹和氯喹的复杂药代动力学，其剂量 - 反应关系仍不清楚。羟氯喹和氯喹都是逐渐起效<sup>[41,42,136]</sup>，可能需要数周才能达到最大活性；此外，这两种药物的药效都很长，即使在停药后也很明显。羟氯喹、氯喹及其脱烷基代谢物的血浆清除半衰期长，分布范围广，可以解释其复杂的药代动力学。

风湿性疾病患者的羟氯喹治疗药物测量提供了一些重要的见解。首先，在羟氯喹治疗期间，低血药浓度的羟氯喹可预测系统性红斑狼疮患者随后的发作<sup>[137]</sup>。第二，不坚持羟氯喹是 SLE 患者复发的主要原因<sup>[138]</sup>。一项前瞻性研究纳入 305 例 SLE 患者，18.4% 的患者不依从羟氯喹治

疗, 即羟氯喹浓度低于 200 ng/ml 或检测不到去乙基氯喹, 而根据自我管理问卷, 23.4% 的患者不依从<sup>[138]</sup>。该人群不依从的危险因素是年龄小、缺乏类固醇联合用药、较高的体重指数和失业。因此, 不依从性是治疗药物监测的一个问题。

在慢性肾脏疾病中, 尽管药物清除率降低会导致羟氯喹浓度增加 (潜在毒性), 但目前的指导方针没有包括减少慢性肾脏病患者羟氯喹剂量的建议。在一个真实世界的 SLE 和终末期肾脏疾病患者队列中, 20% 的患者仍然服用羟氯喹<sup>[139]</sup>。肾内羟氯喹的不良反应可以模拟法布里氏病<sup>[140]</sup>。RA 患者血液中羟氯喹和脱乙基羟氯喹与早晨僵硬、疼痛强度增加以及类风湿因子阳性有关<sup>[43,46]</sup>。因此, 研究这些药物的水平和患者的临床反应, 有助于克服对不同疾病以及活跃期和静止期剂量 - 反应特性的有限知识。

美国眼科学会、皇家眼科学院和 EULAR 的最新指南建议, 使用比以前用于许多患者的低剂量羟氯喹 (最大每天 5.0 mg/kg 实际体重)<sup>[2,134,141]</sup>。这一最大剂量是有争议的, 主要是基于梅尔斯和马尔莫尔的眼科研究<sup>[142]</sup>。由于该研究使用了药房补充信息, 剂量估计值代表实际的羟氯喹摄入量, 而不是规定剂量。因此, 研究中 5 mg/kg 的 cut-off 值可能对应规定剂量 6 mg/kg 实际体重 (如其他所述<sup>[143]</sup>)。

在癌症研究中, 规定剂量的羟氯喹每天可达到 1200 mg。尽管剂量如此高, 但这些研究中没有报告相关的毒性不良反应 (白细胞减少外), 即使羟氯喹与其他眼毒性药物联合使用<sup>[144-148]</sup>。然而, 肿瘤的治疗时间一般比风湿性疾病短得多, 因此癌症患者的累积剂量通常低于风湿性疾病患者。

目前眼科指南的一个相关问题是, 最近推荐的最大剂量 (每天实际体重 5 mg/kg) 的疗效尚未在炎性风湿病患者评估。遵循这种剂量策略的临床后果可能是多种多样的。过去许多评价羟氯喹疗效的研究都评估了每天至少 6.5 mg/kg 理想体重的剂量。因此, 耀斑期间的有效剂量可能高于建议的最大剂量。此外, 不同疾病的患者可能需要不同剂量的抗疟药物。

### 当前和未来方向

最重要的是, 进一步确定羟氯喹和氯喹的作用模式, 以及其在目前建议剂量下的安全性和有效性。以 PPT1 为例, 这些药物的分子靶点的识别应允许开发新的治疗方式。方框 2 列出了其他知识差距和研究主题。目前的一个研究

方向是, 这些药物是否能够通过阻断 TLR7 和 TLR9 的结合来充分防止 IFN $\alpha$  的产生, 因为这是结缔组织疾病的重要途径。这些药物如何干扰核酸传感器下游信号, 包括双链 DNA 和 RNA (如 TLR9 和 TLR7) 的传感器, 以及这些效应的选择性和大小, 也需要进一步研究。这些药物的另一个独特特征是它们抑制溶酶体活性和阻断 MHC II 类表达的能力。这些过程至少部分可能通过药物介导的自噬体和 / 或溶酶体 pH 值的变化而产生, 这些变化间接影响免疫激活; 然而, 这种行动模式需要进一步的验证, 以协助未来药物的开发。

羟氯喹和氯喹 (以及其他 DMARDs) 的一个重要特征似乎是它们抑制先天免疫和适应性免疫的能力<sup>[149]</sup>。然而, 羟氯喹和氯喹对细胞因子的抑制作用不如糖皮质激素、JAK 抑制剂和生物药物, 且起效延迟。然而, 除了视网膜病变的风险外, 这些抗疟药物具有良好的安全性, 可能是因为它们不显著干扰与保护感染相关的重要途径, 如 BCR 或 TCR 信号、JAK-STAT 依赖细胞因子信号、TLR4 信号和某些趋化因子信号通路。重要的是, 抗疟药物干扰 TLR7 和 TLR9 信号和 MHC II 类表达不会增加感染风险。

开发用于治疗癌症的特异性自噬抑制剂是一个非常有趣的课题<sup>[150]</sup>, 这可能对风湿病学有临床价值。IRAK4 抑制剂也在研究中, 用于治疗自身免疫性疾病<sup>[151]</sup>和癌症<sup>[152]</sup>。这种策略不干扰 MHC II 类表达, 但可能比抗疟药物具有更有效的抗细胞因子作用。

最后, 口服不可降解聚合形式的氯喹治疗炎症性肠病的研究正在进行中。临床资料表明, 这种制剂可以抑制 IL-6 和 IL-1 $\beta$  的产生, 并且由于粘膜免疫稳态的改变而上调肠内 IL-2 的产生<sup>[153]</sup>。

### 结论

虽然羟氯喹和氯喹是众所周知的用于治疗风湿性疾病多年的药物, 但刚刚开始了解它们的确切作用机制。对这些药物的药代动力学、药效学和毒性特性来说, 重要的是它们在酸性腔室 (如溶酶体) 以及炎症 (酸性) 组织中积聚的能力。这些药物的体积分布大, 半衰期长, 可以解释它们的一些临床特点, 如起效慢, 停药后作用时间长。在细胞水平上, 已经描述了几种直接和间接的机制来解释羟氯喹和氯喹的免疫调节作用。特别是抑制自噬可以阻止不同类型细胞的免疫激活, 从而抑制细胞因子的产生并调节 T 细胞上 CD154 的表达。肾功能衰竭和某些药物相互作用



(如与三苯氧胺、苷类、甲氨蝶呤和环孢素的相互作用)会影响羟氯喹和氯喹的药代动力学,因此需要考虑。虽然羟氯喹和氯喹是安全的,药物与视网膜病变的风险增加相关。这种风险导致眼科指南建议羟氯喹的最大日剂量为5.0 mg/kg 实际体重,这在风湿病学家中是有争议的。最终,

需要进行药物水平监测研究,以重新评估这种给药策略的风险-收益关系。以溶酶体和自噬体活性为靶点的化合物的临床前研究正在进行中,并且应该揭示这些策略在系统性自身免疫疾病的治疗中是否有价值。

在线发表于2020年2月7日

## 参考文献

- Smolen, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 492–509 (2014).
- Fanourakis, A. et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 736–745 (2019).
- Pons-Estel, B. A. et al. First Latin American clinical practice guidelines for the treatment of systemic lupus erythematosus: Latin American Group for the Study of Lupus (GLADEL, Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus)-Pan-American League of Associations of Rheumatology (PANLAR). *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 1549–1557 (2018).
- Gordon, C. et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults. *Rheumatology* **57**, e1–e45 (2018).
- Tektonidou, M. G. et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1296–1304 (2019).
- Brito-Zeron, P., Ramos-Casals, M. & EULAR-SS task force group. Advances in the understanding and treatment of systemic complications in Sjogren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **26**, 520–527 (2014).
- Vivino, F. B. et al. New treatment guidelines for Sjogren's disease. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **42**, 531–551 (2016).
- Ruiz-Irastorza, G. et al. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 20–28 (2010).
- Ostensen, M. et al. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology* **50**, 657–664 (2011).
- Akhavan, P. S. et al. The early protective effect of hydroxychloroquine on the risk of cumulative damage in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **40**, 831–841 (2013).
- Mok, C. C., Mak, A. & Ma, K. M. Bone mineral density in postmenopausal Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **14**, 106–112 (2005).
- Petri, M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr. Rheumatol. Rep.* **13**, 77–80 (2011).
- Kingsbury, S. R. et al. Hydroxychloroquine effectiveness in reducing symptoms of hand osteoarthritis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **168**, 385–395 (2018).
- Lee, W. et al. Efficacy of hydroxychloroquine in hand osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res.* **70**, 1320–1325 (2018).
- Rempnault, C. et al. Metabolic and cardiovascular benefits of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 98–103 (2018).
- Ruiz-Irastorza, G. et al. Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R109 (2009).
- Flannery, E. L., Chatterjee, A. K. & Winzeler, E. A. Antimalarial drug discovery – approaches and progress towards new medicines. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 849–862 (2013).
- Ridley, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **415**, 686–693 (2002).
- Minie, M. et al. CANDO and the infinite drug discovery frontier. *Drug Discov. Today* **19**, 1353–1363 (2014).
- Paddon, C. J. et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **496**, 528–532 (2013).
- Hale, V. et al. Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 198–202 (2007).
- Mitchell, W. Natural products from synthetic biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 505–515 (2011).
- Conway, D. J. Paths to a malaria vaccine illuminated by parasite genomics. *Trends Genet.* **31**, 97–107 (2015).
- Karunamoorthi, K. Malaria vaccine: a future hope to curtail the global malaria burden. *Int. J. Prev. Med.* **5**, 529–538 (2014).
- de Beer, T. A. et al. Antimalarial drug discovery: in silico structural biology and rational drug design. *Infect. Disord. Drug Targets* **9**, 304–318 (2009).
- Vedadi, M. et al. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **151**, 100–110 (2007).
- Buckee, C. O. et al. Mobile phones and malaria: modeling human and parasite travel. *Travel. Med. Infect. Dis.* **11**, 15–22 (2013).
- Hay, S. I. et al. Big data opportunities for global infectious disease surveillance. *PLoS Med.* **10**, e1001413 (2013).
- Ponticelli, C. & Moroni, G. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert. Opin. Drug Saf.* **16**, 411–419 (2017).
- Wang, S. Q. et al. Is hydroxychloroquine effective in treating primary Sjogren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet. Disord.* **18**, 186 (2017).
- Manohar, S., Tripathi, M. & Rawat, D. S. 4-aminoquinoline based molecular hybrids as antimalarials: an overview. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1706–1733 (2014).
- Rainsford, K. D. et al. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* **23**, 251–269 (2015).
- Witiak, D. T. et al. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of asymmetric chloroquine analogues. *J. Med. Chem.* **24**, 712–717 (1981).
- Tagoe, C. N. & Ofori-Adjei, D. Effects of chloroquine and its enantiomers on the development of rat embryos in vitro. *Teratology* **52**, 137–142 (1995).
- Ducharme, J. et al. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after a single oral dose of the racemate to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **40**, 127–133 (1995).
- Tett, S. E. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxychloroquine enantiomers in patients with rheumatoid arthritis receiving multiple doses of racemate. *Chirality* **6**, 355–359 (1994).
- Tett, S. E. et al. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **27**, 771–779 (1989).
- Furst, D. E. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus* **5**, S11–S15 (1996).
- Cutler, D. J., MacIntyre, A. C. & Tett, S. E. Pharmacokinetics and cellular uptake of 4-aminoquinoline antimalarials. *Agents Actions Suppl.* **24**, 142–157 (1988).
- McChesney, E. W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *Am. J. Med.* **75**, 11–18 (1983).
- Fishbain, D. A. et al. Do some chronic pain patients with atypical facial pain overvalue and obsess about their pain? *Psychosomatics* **34**, 355–359 (1993).
- Tett, S. et al. Insights from pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of hydroxychloroquine. *Agents Actions Suppl.* **44**, 145–190 (1993).
- Tett, S. E., Day, R. O. & Cutler, D. J. Concentration-effect relationship of hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis – a cross sectional study. *J. Rheumatol.* **20**, 1874–1879 (1993).
- Collins, K. P., Jackson, K. M. & Gustafson, D. L. Hydroxychloroquine: a physiologically-based pharmacokinetic model in the context of cancer-related autophagy modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **365**, 447–459 (2018).
- Rynes, R. I. & Bernstein, H. N. Ophthalmologic safety profile of antimalarial drugs. *Lupus* **2**, S17–S19 (1993).
- Munster, T. et al. Hydroxychloroquine concentration-response relationships in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 1460–1469 (2002).
- Carmichael, S. J., Charles, B. & Tett, S. E. Population pharmacokinetics of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis. *Ther. Drug Monit.* **25**, 671–681 (2003).
- Spaldin, V. et al. The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **38**, 15–22 (1994).
- Projean, D. et al. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 748–754 (2003).
- Gil, J. P. & Gil Berglund, E. CYP2C8 and antimalarial drug efficacy. *Pharmacogenomics* **8**, 187–198 (2007).
- Projean, D. et al. Identification of CYP3A4 and CYP2C8 as the major cytochrome P450s responsible for morphine N-demethylation in human liver microsomes. *Xenobiotica* **33**, 841–854 (2003).
- Kim, K. A. et al. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 631–637 (2003).
- Li, X. Q. et al. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 429–442 (2003).
- Lee, J. Y. et al. Association of polymorphisms of cytochrome P450 2D6 with blood hydroxychloroquine levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 184–190 (2016).
- Leden, I. Digoxin-hydroxychloroquine interaction? *Acta Med. Scand.* **211**, 411–412 (1982).
- Somer, M. et al. Influence of hydroxychloroquine

- on the bioavailability of oral metoprolol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**, 549–554 (2000).
57. Kormelink, T. G. et al. Decrease in immunoglobulin free light chains in patients with rheumatoid arthritis upon rituximab (anti-CD20) treatment correlates with decrease in disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 2137–2144 (2010).
  58. Toimela, T., Tahti, H. & Salminen, L. Retinal pigment epithelium cell culture as a model for evaluation of the toxicity of tamoxifen and chloroquine. *Ophthalmic Res.* **27**, 150–153 (1995).
  59. Bannwarth, B. et al. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin. Pharmacokinet.* **30**, 194–210 (1996).
  60. Carmichael, S. J. et al. Combination therapy with methotrexate and hydroxychloroquine for rheumatoid arthritis increases exposure to methotrexate. *J. Rheumatol.* **29**, 2077–2083 (2002).
  61. van den Borne, B. E. et al. Combination therapy in recent onset rheumatoid arthritis: a randomized double blind trial of the addition of low dose cyclosporine to patients treated with low dose chloroquine. *J. Rheumatol.* **25**, 1493–1498 (1998).
  62. Namazi, M. R. The potential negative impact of proton pump inhibitors on the immunopharmacologic effects of chloroquine and hydroxychloroquine. *Lupus* **18**, 104–105 (2009).
  63. Jallouli, M. et al. Determinants of hydroxychloroquine blood concentration variations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2176–2184 (2015).
  64. Ezra, N. & Jorizzo, J. Hydroxychloroquine and smoking in patients with cutaneous lupus erythematosus. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**, 327–334 (2012).
  65. Yeon Lee, J. et al. Factors related to blood hydroxychloroquine concentration in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res.* **69**, 536–542 (2017).
  66. Borden, M. B. & Parke, A. L. Antimalarial drugs in systemic lupus erythematosus: use in pregnancy. *Drug Saf.* **24**, 1055–1063 (2001).
  67. Costedoat-Chalumeau, N. et al. Safety of hydroxychloroquine in pregnant patients with connective tissue diseases. Review of the literature. *Autoimmun. Rev.* **4**, 111–115 (2005).
  68. Teng, Y. K. O. et al. An evidence-based approach to pre-pregnancy counselling for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **57**, 1707–1720 (2017).
  69. Andreoli, L. et al. EULAR recommendations for women's health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 476–485 (2017).
  70. Gotestam Skorpen, C. et al. The EULAR points to consider for use of antirheumatic drugs before pregnancy, and during pregnancy and lactation. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 795–810 (2016).
  71. Izmirly, P. M. et al. Maternal use of hydroxychloroquine is associated with a reduced risk of recurrent anti-SSA/Ro-antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus. *Circulation* **126**, 76–82 (2012).
  72. Saxena, A. et al. Prevention and treatment in utero of autoimmune-associated congenital heart block. *Cardiol. Rev.* **22**, 263–267 (2014).
  73. Lisney, A. R. et al. High maternal expression of S1GLEC1 on monocytes as a surrogate marker of a type I interferon signature is a risk factor for the development of autoimmune congenital heart block. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1476–1480 (2017).
  74. Friedman, D. et al. No histologic evidence of foetal cardiotoxicity following exposure to maternal hydroxychloroquine. *Clin. Exp. Rheumatol.* **35**, 857–859 (2017).
  75. Sammaritano, L. R. & Bermas, B. L. Rheumatoid arthritis medications and lactation. *Curr. Opin. Rheumatol.* **26**, 354–360 (2014).
  76. Circu, M. et al. Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells. *PLoS One* **12**, e0184922 (2017).
  77. Mauthe, M. et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
  78. Frustaci, A. et al. Inhibition of cardiomyocyte lysosomal activity in hydroxychloroquine cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **157**, 117–119 (2012).
  79. Sundelin, S. P. & Terman, A. Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS* **110**, 481–489 (2002).
  80. Ballabio, A. & Bonifacio, J. S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 101–118 (2019).
  81. Lotteau, V. et al. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600–605 (1990).
  82. Ghislat, G. & Lawrence, T. Autophagy in dendritic cells. *Cell Mol. Immunol.* **15**, 944–952 (2018).
  83. Munz, C. Autophagy beyond intracellular MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol.* **37**, 755–763 (2016).
  84. Ireland, J. M. & Unanue, E. R. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 2625–2632 (2011).
  85. Ohkuma, S. & Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **75**, 3327–3331 (1978).
  86. Rebecca, V. W. et al. PPT1 promotes tumor growth and is the molecular target of chloroquine derivatives in cancer. *Cancer Discov.* **9**, 220–229 (2019).
  87. Ma, C. et al. Identifying key genes in rheumatoid arthritis by weighted gene co-expression network analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* **20**, 971–979 (2017).
  88. Ewald, S. E. et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658–662 (2008).
  89. Kuznik, A. et al. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* **186**, 4794–4804 (2011).
  90. Hacker, H. et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* **17**, 6230–6240 (1998).
  91. Lau, C. M. et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* **202**, 1171–1177 (2005).
  92. Vollmer, J. et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* **202**, 1575–1585 (2005).
  93. An, J. et al. Antimalarial drugs as immune modulators: new mechanisms for old drugs. *Annu. Rev. Med.* **68**, 317–330 (2017).
  94. Zhang, X. et al. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep.* **6**, 421–430 (2014).
  95. Zhang, X. et al. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol. Cell* **51**, 226–235 (2013).
  96. Shu, C., Li, X. & Li, P. The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 641–648 (2014).
  97. An, J. et al. Cutting edge: antimalarial drugs inhibit IFN- $\beta$  production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction. *J. Immunol.* **194**, 4089–4093 (2015).
  98. van den Borne, B. E. et al. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Rheumatol.* **24**, 55–60 (1997).
  99. Wallace, D. J. et al. The effect of hydroxychloroquine therapy on serum levels of immunoregulatory molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **21**, 375–376 (1994).
  100. Wallace, D. J. et al. The relevance of antimalarial therapy with regard to thrombosis, hypercholesterolemia and cytokines in SLE. *Lupus* **2**, S13–S15 (1993).
  101. Hjortorn, K. et al. Cytokine production by activated plasmacytoid dendritic cells and natural killer cells is suppressed by an IRAK4 inhibitor. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 238 (2018).
  102. Willis, R. et al. Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients: data from LUMINA (LXXV), a multiethnic US cohort. *Lupus* **21**, 830–835 (2012).
  103. Klinefelter, H. F. & Achurra, A. Effect of gold salts and antimalarials on the rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **2**, 177–182 (1973).
  104. Dixon, J. S. et al. Biochemical indices of response to hydroxychloroquine and sodium aurothiomalate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **40**, 480–488 (1981).
  105. Wu, S. F. et al. Hydroxychloroquine inhibits CD154 expression in CD4(+) T lymphocytes of systemic lupus erythematosus through NFAT, but not STAT5, signaling. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 183 (2017).
  106. Qushmaq, N. A. & Al-Emadi, S. A. Review on effectiveness of primary prophylaxis in aPLs with and without risk factors for thrombosis: efficacy and safety. *ISRN Rheumatol.* **2014**, 348726 (2014).
  107. Nuri, E. et al. Long-term use of hydroxychloroquine reduces antiphospholipid antibodies levels in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Immunol. Res.* **65**, 17–24 (2017).
  108. Dadoun, S. et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* **80**, 29–33 (2013).
  109. van den Hoek, J. et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. *Rheumatol. Int.* **37**, 487–493 (2017).
  110. Avina-Zubieta, J. A. et al. Risk of myocardial infarction and stroke in newly diagnosed systemic lupus erythematosus: a general population-based study. *Arthritis Care Res.* **69**, 849–856 (2017).
  111. Tselios, K., Gladman, D. D., Su, J., Ace, O. & Urowitz, M. B. Evolution of risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in systemic lupus erythematosus: a longterm prospective study. *J. Rheumatol.* **44**, 1841–1849 (2017).
  112. Padol, I. T. & Hunt, R. H. Association of myocardial infarctions with COX-2 inhibition may be related to immunomodulation towards a Th1 response resulting in atheromatous plaque instability: an evidence-based interpretation. *Rheumatology* **49**, 837–843 (2010).
  113. Hage, M. P., Al-Badri, M. R. & Azar, S. T. A favorable effect of hydroxychloroquine on glucose and lipid metabolism beyond its anti-inflammatory role. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **5**, 77–85 (2014).
  114. Cansu, D. U. & Korkmaz, C. Hypoglycaemia induced by hydroxychloroquine in a non-diabetic patient treated for RA. *Rheumatology* **47**, 378–379 (2008).
  115. Fasano, S. et al. Longterm hydroxychloroquine therapy and low-dose aspirin may have an additive effectiveness in the primary prevention of cardiovascular events in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **44**, 1032–1038 (2017).
  116. Towers, C. G. & Thorburn, A. Therapeutic targeting of autophagy. *EBioMedicine* **14**, 15–23 (2016).
  117. Rand, J. H. et al. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody- $\beta$ 2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood* **112**, 1687–1695 (2008).
  118. Jancinova, V., Nosal, R. & Petrikova, M. On the inhibitory effect of chloroquine on blood platelet aggrega-

- tion *Thromb. Res.* **74**, 495–504 (1994).
119. Bertrand, E. et al. Antiaggregation action of chloroquine. *Med. Trop.* **50**, 143–146 (1990).
  120. Nosal, R., Jancinova, V. & Petrikova, M. Chloroquine inhibits stimulated platelets at the arachidonic acid pathway. *Thromb. Res.* **77**, 531–542 (1995).
  121. Miranda, S. et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One* **14**, e0212614 (2019).
  122. Edwards, M. H. et al. Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation* **96**, 4380–4384 (1997).
  123. Lazarus, M. N. et al. Incidence of cancer in a cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology* **45**, 1012–1015 (2006).
  124. Srinivasa, A., Tosounidou, S. & Gordon, C. Increased incidence of gastrointestinal side effects in patients taking hydroxychloroquine: a brand-related issue? *J. Rheumatol.* **44**, 398 (2017).
  125. Abdel-Hamid, H., Oddis, V. & Lacomis, D. Severe hydroxychloroquine myopathy. *Muscle Nerve* **38**, 1206–1210 (2008).
  126. Jafri, K. et al. Antimalarial myopathy in a systemic lupus erythematosus patient with quadriparesis and seizures: a case-based review. *Clin. Rheumatol.* **36**, 1437–1444 (2017).
  127. Khosa, S. et al. Hydroxychloroquine-induced autophagic vacuolar myopathy with mitochondrial abnormalities. *Neuropathology* **38**, 646–652 (2018).
  128. Stein, M., Bell, M. J. & Ang, L. C. Hydroxychloroquine neuromyotoxicity. *J. Rheumatol.* **27**, 2927–2931 (2000).
  129. Dogar, M. U. et al. Hydroxychloroquine-induced restrictive cardiomyopathy: a case report. *Postgrad. Med. J.* **94**, 185–186 (2018).
  130. Chang, I. C. Y. et al. Hydroxychloroquine-mediated cardiotoxicity with a false-positive <sup>99m</sup>Tc-tin-99m-labeled pyrophosphate scan for transthyretin-related cardiac amyloidosis. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **11**, e007059 (2018).
  131. Chatre, C. et al. Cardiac complications attributed to chloroquine and hydroxychloroquine: a systematic review of the literature. *Drug Saf.* **41**, 919–931 (2018).
  132. Costedoat-Chalumeau, N. et al. Heart conduction disorders related to antimalarials toxicity: an analysis of electrocardiograms in 85 patients treated with hydroxychloroquine for connective tissue diseases. *Rheumatology* **46**, 808–810 (2007).
  133. Jorge, A. et al. Hydroxychloroquine retinopathy – implications of research advances for rheumatology care. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 693–703 (2018).
  134. Marmor, M. F. et al. Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology* **123**, 1386–1394 (2016).
  135. Yusuf, I. H. et al. The Royal College of Ophthalmologists recommendations on screening for hydroxychloroquine and chloroquine users in the United Kingdom: executive summary. *Eye* **32**, 1168–1173 (2018).
  136. MacIntyre, A. C. & Cutler, D. J. Kinetics of chloroquine uptake into isolated rat hepatocytes. *J. Pharm. Sci.* **82**, 592–600 (1993).
  137. Costedoat-Chalumeau, N. et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **54**, 3284–3290 (2006).
  138. Costedoat-Chalumeau, N. et al. A prospective international study on adherence to treatment in 305 patients with flaring SLE: assessment by drug levels and self-administered questionnaires. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 1074–1082 (2018).
  139. Bethel, M. et al. Hydroxychloroquine in patients with systemic lupus erythematosus with end-stage renal disease. *J. Investig. Med.* **64**, 908–910 (2016).
  140. Sperati, C. J. & Rosenberg, A. Z. Hydroxychloroquine-induced mimic of renal Fabry disease. *Kidney Int.* **94**, 634 (2018).
  141. Yusuf, I. H., Lotery, A. J. & Ardern-Jones, M. R. Joint recommendations for retinal screening in long-term users of hydroxychloroquine and chloroquine in the United Kingdom, 2018. *Br. J. Dermatol.* **179**, 995–996 (2018).
  142. Melles, R. B. & Marmor, M. F. The risk of toxic retinopathy in patients on long-term hydroxychloroquine therapy. *JAMA Ophthalmol.* **132**, 1453–1460 (2014).
  143. Costedoat-Chalumeau, N., Isenberg, D. & Petri, M. Letter in response to the 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus by Fanouriakis et al. *Ann. Rheum. Dis.* <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215573> (2019).
  144. Karasic, T. B. et al. Effect of gemcitabine and nab-paclitaxel with or without hydroxychloroquine on patients with advanced pancreatic cancer: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* **5**, 993–998 (2019).
  145. Rosenfeld, M. R. et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* **10**, 1359–1368 (2014).
  146. Rangwala, R. et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* **10**, 1369–1379 (2014).
  147. Rangwala, R. et al. Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* **10**, 1391–1402 (2014).
  148. Nti, A. A. et al. Frequent subclinical macular changes in combined BRAF/MEK inhibition with high-dose hydroxychloroquine as treatment for advanced metastatic braf mutant melanoma: preliminary results from a phase I/II clinical treatment trial. *Retina* **39**, 502–513 (2019).
  149. Dorner, T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J. Rheumatol. Suppl.* **77**, 3–11 (2006).
  150. Liang, N. et al. Multifaceted roles of ATM in autophagy: from nonselective autophagy to selective autophagy. *Cell Biochem. Funct.* **37**, 177–184 (2019).
  151. Bahia, M. S. et al. Interleukin-1 receptor associated kinase inhibitors: potential therapeutic agents for inflammatory- and immune-related disorders. *Cell Signal.* **27**, 1039–1055 (2015).
  152. Khanfar, M. A. & Alqtaishat, S. Discovery of potent IRAK-4 inhibitors as potential anti-inflammatory and anticancer agents using structure-based exploration of IRAK-4 pharmacophoric space coupled with QSAR analyses. *Comput. Biol. Chem.* **79**, 147–154 (2019).
  153. Kanvinda, S. et al. Pharmacokinetics and efficacy of orally administered polymeric chloroquine as macromolecular drug in the treatment of inflammatory bowel disease. *Acta Biomater.* **82**, 158–170 (2018).
  154. Messai, A. in *Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering* (ed. Bououdina, M.) 160–196 (IGI Global, 2016).
  155. U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Accessdata.fda.gov](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varAppNo=006002) <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varAppNo=006002> (2014).
  156. U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Accessdata.fda.gov](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=009768) <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=009768> (2014).

## 致谢

The authors would like to thank the Clinical Scientist Program of the Berlin Institutes of Health who provided grant support to E.V.S. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft who provided grant support to T.D. (projects Do491/7-4 and Do491/10-1). Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ) Berlin is funded by the Leibniz society.

## 作者贡献

The authors contributed equally to all aspects of the article.

## 利益冲突

The authors declare no competing interests.

## 审稿人说明

*Nature Reviews Rheumatology* thanks K. Elkon and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

## 出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© Springer Nature Limited 2020

翻译: 邢 瑞 (华中科技大学同济医学院附属同济医院)

审校: 董凌莉 (华中科技大学同济医学院附属同济医院)



# 霉酚酸酯、硫唑嘌呤以及他克莫司在风湿病中的作用机制

## Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology

Jasper C. A. Broen<sup>1</sup> 和 Jacob M. van Laar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Regional Rheumatology Center, Máxima Medical Center, Eindhoven and Veldhoven, Eindhoven, the Netherlands.

<sup>2</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

\*email:j.m.vanlaar@umcutrecht.nl

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0374-8>

**摘要:** 生物 DMARDs 在风湿病中的应用已经很大程度减少了许多疾病的负担。在这些生物 DMARDs 取得成功的同时, 一些传统免疫抑制剂亦用于新的适应证。显然, 霉酚酸酯、硫唑嘌呤和他克莫司已从实体器官移植药物中脱颖而出, 成为风湿病临床中的重要药物。霉酚酸酯和硫唑嘌呤抑制嘌呤途径, 从而减少细胞增殖。两种药物在各种风湿性疾病(包括狼疮肾炎)的治疗中都起着关键作用。他克莫司通过抑制钙调神经磷酸酶途径从而抑制淋巴细胞活化途径。其他方面, 霉酚酸酯和他克莫司也日益成为治疗系统性风湿病的间质性肺疾病和系统性硬化症的皮肤纤维化的有用药物。霉酚酸酯、硫唑嘌呤和/或他克莫司在风湿病领域中的临床试验日新月异, 可能为这些药物提供进一步的新颖用途。在本篇综述中, 我们讨论了霉酚酸酯、硫唑嘌呤和他克莫司在风湿病中的历史沿革、药效学、临床适应证和新用途。

在过去的二十年中, 随着生物 DMARDs 的引入, 风湿病患者的预后有了很大改善。然而, 传统 DMARDs 经受了在各种风湿性疾病中作为当家药物的时间测试, 尤其在系统性红斑狼疮和系统性血管炎中, 而在系统性硬化症和抗合成酶综合症中的作用亦日益凸显。传统 DMARDs 的机制通常是多效的, 并且我们对之了解甚少。然而, 对这些药物的机制进行研究可能会揭示一些途径, 这些途径对于开发新的靶向药物疗法或这些药物在其他风湿性疾病中的新应用具有重要意义。在本综述中, 我们重点研究三种药物: 霉酚酸酯 (MMF)、硫唑嘌呤和他克莫司。

与大多数现有的生物 DMARDs 不同, 大多数传统 DMARDs 最初并不是为治疗风湿病而开发的, 而是从其他领域 (例如血液学, 肿瘤学或移植医学) 重新开发出来的。在自身免疫性疾病新的致病观念的驱动下, 将这些 DMARDs 引入风湿病通常是一个反复试验的过程, 有时是在治疗风湿病患者的不同症状中偶然发现了这些药物对风湿病的有益作用。MMF、硫唑嘌呤和他克莫司都起源于移植医学领域, 并使用具有开创性的研究方法进行研发, 这些方法是由获得诺贝尔奖的科学家进行的<sup>[1]</sup>。除了它们在移植医学中的共同来源外, 这些药物还具有相似的作用机制并影响着共同的细胞途径。在本综述中, 我们讨论了风湿病学领域中 MMF、硫唑嘌呤和他克莫司的历史沿革、通常用途和未来展望。

### 霉酚酸酯

**历史沿革。** 首次描述霉酚酸 (MPA) 始于 1913 年<sup>[2]</sup>,

此时距离发现青霉素具有抗生素特性已有几十年时间, 之后它从匍匐茎青霉菌中被分离出来。MPA 不仅具有抗生素特性, 而且具有抗病毒和抗炎特性<sup>[3-5]</sup>。在研究 MPA 用于治疗银屑病患者的试验中清楚地显示了 MPA 的抗炎作用<sup>[6]</sup>。然而, 在这些试验中, MPA 的使用与胃肠道不良反应和病毒感染有关, 同时有人还提示出 MPA 与恶性肿瘤风险增加之间的关联, 但这一关联并未得到证实<sup>[6]</sup>。因此, 在 1970 年代末, MPA 的使用大都已停止<sup>[7]</sup>。

但是, MPA 的抗炎作用引起了人们对该药物进一步优化的兴趣。MMF 作为 MPA 的酯类物质被开发出来, 人们发现它比 MPA 具有更好的生物利用度和胃肠道耐受性<sup>[5,7]</sup>。1995 年, MMF 被 FDA 批准用于预防移植器官衰竭<sup>[7]</sup>。自 1995 年以来, MMF 已用于各种临床专业领域, 特别是用于风湿病的治疗 (如下文有关风湿病的当前适应证部分所述)<sup>[5,7]</sup>。

**药代动力学。** MMF 是 MPA 的前体药物。表 1 显示了 MMF 的分子结构和药代动力学参数。口服摄入后, MMF 几乎完全在小肠中吸收, 然后被血浆酯酶去酯化, 形成 MPA<sup>[8]</sup>。98% 的 MPA 以蛋白质结合形式存在, 蛋白质结合部分和游离部分几乎都存在于血浆中<sup>[8]</sup>。只有少量的 MPA 进入细胞。大部分 MPA 被代谢成酚醛葡萄糖醛酸, 然后从尿液中清除<sup>[8]</sup>。MPA 的血浆浓度在个体之间差异很大, 有时相差可达 10 倍<sup>[9]</sup>。这种差异部分是由编码尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸糖基转移酶 (例如 UGT1A9) 的基因变异引起的<sup>[10]</sup>。质子泵抑制剂可能会影响 MMF 的吸收, 但不会影



## 要点

- MMF、硫唑嘌呤和他克莫司是三种传统的 DMARDs，它们起源于移植医学领域，但已被重新用于风湿性疾病的治疗。
- MMF 和硫唑嘌呤均干扰嘌呤途径从而抑制细胞增殖，而他克莫司则抑制钙调神经磷酸酶活性以及随后的淋巴细胞活化。
- MMF 和硫唑嘌呤在狼疮性肾炎的治疗中起着关键作用。
- 在其他适应证中，霉酚酸酯和他克莫司也日益成为治疗系统性风湿病的间质性肺疾病和系统性硬化症的皮肤纤维化的有用药物。
- 这些药物的未来前景包括优化给药方案以及研究与其他 DMARDs 合用的新适应症及疗效。

响肠溶衣霉酚酸酯钠（后者是 MPA 的钠盐）的吸收，可能是因为质子泵抑制剂会增加胃肠道的 pH 值<sup>[11]</sup>。

除 MMF 外，霉酚酸钠是 MPA 的另一种前体药物。两种前体药物之间的主要区别在于，霉酚酸钠的吸收速率比 MMF 慢，这导致更长的  $T_{max}$ （约 3 小时，MMF 则为 90 分钟）以及更高的两次给药之间的剩余血浆浓度<sup>[8]</sup>。

MPA 浓度仅受肝脏和轻度肾脏疾病的轻微影响。但是，在患有严重肾脏疾病（CKD4 期，肌酐清除率低于 30 ml/min）的患者中，MPA 的浓度可以加倍，这时需要调整药物剂量<sup>[9]</sup>。在肾功能受损的患者中，MPA 的葡萄糖醛酸化代谢物的浓度会增加并引起胃肠道不良反应<sup>[12-14]</sup>。个体间药物浓度的差异以及肾功能受损对浓度的影响促使研究者探索使用血浆药物水平的测量值来指导狼疮性肾炎患者给药方案的益处。在两项此类研究中，使用 0 ~ 12 h 浓度 - 时间曲线下的治疗目标区域（MPA-AUC<sub>0-12h</sub>），在剂量分别为 30 ~ 60 mg × h/l 以及 60 ~ 90 mg × h/l 时得到了良好的肾脏预后；然而，在第二项观察性研究中，三分之一的患者发生了不良反应。

**分子及细胞作用方式。** MMF 抑制鸟嘌呤核苷酸的合成<sup>[15]</sup>。鸟嘌呤是 DNA 生成所必需的嘌呤核碱基之一，因此是细胞复制所必需。细胞能够通过两种不同的途径产生鸟嘌呤核苷酸：从头途径和挽救途径。MPA 通过抑制肌苷单磷酸脱氢酶作用于从头途径，从而减少鸟嘌呤核苷酸的合成<sup>[15,16]</sup>。

与许多其他细胞类型（例如神经元、肝细胞和肾脏细胞）不同，淋巴细胞仅依赖从头途径产生鸟嘌呤核苷酸。因此，淋巴细胞是 MPA 的相对特异性靶标<sup>[15,16]</sup>（图 1）。MPA 介导可逆性抑制 B 细胞和 T 细胞增殖，而不会引起骨髓毒性<sup>[15]</sup>。MPA 减少鸟嘌呤核苷酸的合成，阻碍了 DNA 的生成，因此减少了淋巴细胞的增殖、抗体的产生

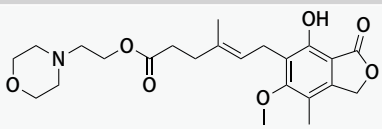
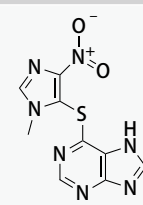
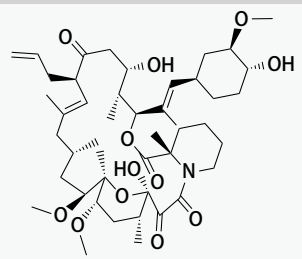
甚至 microRNA 的表达<sup>[15-17]</sup>。MPA 对 microRNA 表达的影响已归因于 CD4<sup>+</sup> T 细胞中 miR-142 和 miR-146a 的启动子区域的组蛋白修饰<sup>[17,18]</sup>。两种 microRNA 在免疫反应调节中均很重要。据认为，MPA 通过上调组蛋白 H3 和 H4 的整体乙酰化来影响组蛋白修饰的水平<sup>[19]</sup>。在 SLE 患者的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中，这种作用可能导致 CD40 配体（CD40L）的下调<sup>[19]</sup>。由于 CD40L 介导的抗原呈递细胞的共刺激在各种风湿性疾病中都起着至关重要的作用，因此 MPA 减少 CD40L 信号传导的能力值得关注，值得在 SLE 和其他风湿性疾病中进行进一步研究<sup>[20]</sup>。

尽管传统上将 MMF 视为靶向作用于淋巴细胞增殖的药物，但临床和体外数据表明 MPA 也会影响成纤维细胞生物学。值得注意的是，在风湿性疾病（如 SSc 和抗合成酶综合症）中，成纤维细胞的活化增强会导致并发症，如间质性肺病（ILD）<sup>[21]</sup>。与淋巴细胞一样，MPA 对成纤维细胞亦具有抗增殖作用，并可能通过抑制鸟嘌呤核苷的形成来介导这些作用<sup>[22-25]</sup>。考虑到该药对成纤维细胞的作用，这些细胞可能不仅依赖于嘌呤核苷酸合成的挽救途径，而且还依赖嘌呤核苷酸合成的从头途径，而只有后者才是 MMF 的靶标。

MPA 以剂量依赖的方式减少体外成纤维细胞的增殖<sup>[22,23]</sup>，这种作用发生在大鼠成纤维细胞、人肌腱成纤维细胞和人真皮成纤维细胞中<sup>[22,23]</sup>。在体外，MPA 处理不会促进成纤维细胞的凋亡，这表明该药对这些细胞没有直接的毒性作用。值得注意的是，向 MPA 处理的成纤维细胞培养物中添加鸟苷（一种鸟嘌呤核苷）可恢复细胞的增殖能力<sup>[22,23]</sup>。用与患者血浆相同的 MPA 浓度培养成纤维细胞可使其增殖降低约 50%<sup>[24]</sup>。一项研究探索多种药物（包括甲基强的松龙、环孢素、他克莫司、硫唑嘌呤、MMF 和依维莫司）对接受肺移植的患者支气管组织成纤维细胞增殖能力的影响<sup>[24]</sup>，结果显示他克莫司和 MMF 是在临床相关药物浓度下最有效的抑制增殖的药物<sup>[25]</sup>。

在博来霉素治疗的小鼠（SSc 的公认模型）中，MMF 治疗具有抗纤维化作用<sup>[26]</sup>。在这些小鼠的皮肤中，MMF 治疗可减少白细胞浸润、羟脯氨酸含量和皮肤厚度。此外，使用 MMF 治疗可减少皮肤中表达  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白（ $\alpha$ -SMA；成肌纤维细胞的标志物，该细胞主要负责纤维化）的成纤维细胞数量<sup>[26]</sup>。一种假设是在 SSc 进展期间，正常的成纤维细胞转化为促纤维化的  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> 肌成纤维细胞<sup>[27]</sup>。这些成肌纤维细胞能使胶原蛋白和纤维化成分的产生增

表 1 霉酚酸酯、硫唑嘌呤和他克莫司的药代动力学

参数	霉酚酸酯 <sup>[7,8]</sup>	硫唑嘌呤 <sup>[71,72]</sup>	他克莫司 <sup>[111-113]</sup>
分子结构			
分子式	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S	C <sub>44</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>12</sub>
普遍情况	通过血浆酯酶快速转化为霉酚酸；整个胃肠道吸收	整个胃肠道的吸收变化很大	整个胃肠道吸收（差）
生物利用度	94%	47% (27–80)%	20–25%
T <sub>max</sub>	1.5 小时，由于肠肝循环在 6 至 12 小时之间出现第二个高峰	1–2 小时	1–3 小时（胶囊和颗粒）或 6 小时（片剂）
分布量	0.71 l/kg	0.1–1.7 l/kg	0.68 l/kg
蛋白结合比例	97%	20–30%	>99%
代谢	在肝脏中转化为非活性葡萄糖醛酸代谢物	快速转化为 6-巯基嘌呤（部分取决于 TPMT）	CYP3A4 介导的肝和肠上皮代谢
清除	93% 从尿液，其余从粪便	主要从尿液（作为非活性硫代尿酸）；95% 从粪便一小部分从粪便清除	
清除半衰期	12–18 小时	60–120 分钟（转化为 6-巯基嘌呤后）12–15 小时	
常见不良反应	腹泻，恶心，呕吐，白细胞减少症，贫血，血肌酐浓度升高，巨细胞病毒性病毒血症，尿路感染，呼吸道感染和肝炎	恶心，呕吐，肝功能不全，感染（病毒，真菌或细菌）和厌食	高血压，腹泻，高血糖，贫血，头痛，震颤，失眠，疼痛和虚弱

CYP3A4, 细胞色素 P450 3A4; T<sub>max</sub>, 达到最大浓度时间; TPMT, 巯基嘌呤甲基转移酶。

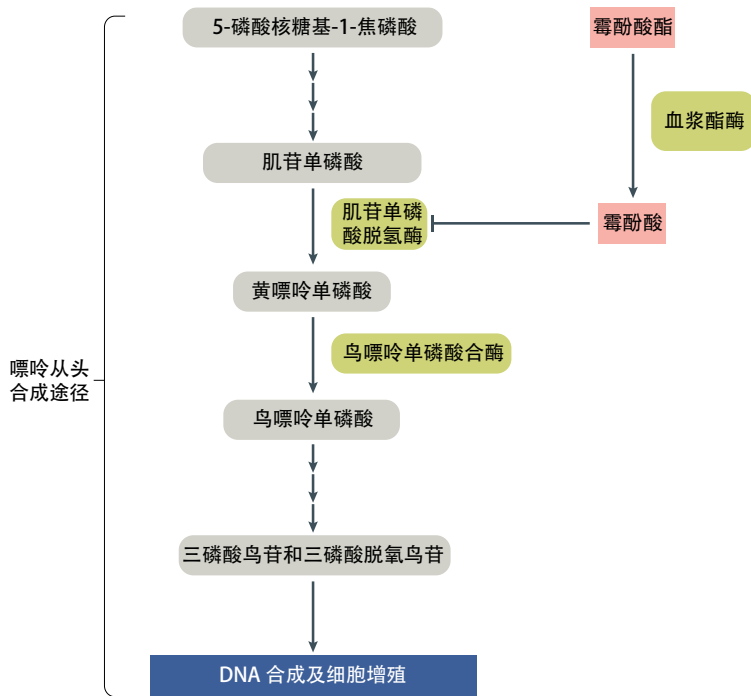
多<sup>[27]</sup>。值得注意的是，在博来霉素诱导的纤维化小鼠中，与安慰剂相比，MMF 治疗降低了促纤维化细胞因子转化生长因子-β (TGFβ) 的血清浓度<sup>[26]</sup>。MMF 可以减少驻留的成纤维细胞向潜在致病性成肌纤维细胞转化，这一发现在进行性 SSc 的治疗中具有重大意义，同时证明在疾病早期使用 MMF 治疗以减少纤维化进程是合理的。

人体肾小球系膜细胞的体外研究也提供了有用的见解。仅在肾小球系膜中发现，肾小球系膜细胞与成纤维细胞密切相关，并具有从肾脏基底膜上去除聚集蛋白的能力<sup>[27]</sup>。类似于成纤维细胞，肾小球系膜细胞可以产生基质蛋白，例如 I 型胶原蛋白和纤连蛋白<sup>[27]</sup>。越来越多数据显示肾小球系膜细胞参与了 SLE 患者肾脏的纤维化过程<sup>[28]</sup>。MPA 还可以在体外对 TGFβ、胎牛血清或成纤维细胞生长因子的刺激进行应答，从而减少人体肾小球系膜细胞的增殖<sup>[29-30]</sup>。此外，MMF 可以减少大鼠残余肾脏模型肾间质组织中成纤维细胞的浸润<sup>[23, 29, 30]</sup>。

综上所述，MMF 对成纤维细胞的作用似乎至少部分

取决于鸟嘌呤核苷酸的可用性降低。这种抑制作用可能导致成肌纤维细胞数量减少。此外，用 MMF 治疗可能破坏自分泌循环，在该循环中成纤维细胞增殖增加会导致 TGFβ 的产生和纤维化增加<sup>[32]</sup>。

**风湿病的最新适应证。** 在过去的十年中，MMF 在 SLE、SSc、血管炎和肌炎的治疗中发挥了核心作用<sup>[33-37]</sup>。一些报道认为，对于狼疮性肾炎的诱导治疗，MMF 比环磷酰胺更有效，并且耐受性稍好<sup>[38]</sup>。然而，这一结果并未在包括 618 例狼疮性肾炎患者的荟萃分析中得以重复，该分析指出 MMF 在疾病缓解方面并不优于环磷酰胺，仅与脱发与闭经的发生减少有关<sup>[39]</sup>。在静脉给予环磷酰胺诱导治疗后，MMF 是狼疮肾炎维持治疗的首选治疗方法<sup>[40-43]</sup>。值得注意的是，一项包括 53 项随机试验的荟萃分析对 MMF、环磷酰胺和钙调神经磷酸酶抑制剂治疗增生性狼疮性肾炎 (n=4,222) 进行分析，结果并未发现哪种药物在诱导治疗中更优，但分析表明 MMF 是最有效的维



**图 1 霉酚酸酯对核苷酸合成的抑制作用。** 霉酚酸酯 (MMF) 被羧酸酯酶代谢成霉酚酸 (MPA)，后者通过嘌呤合成从头途径抑制鸟嘌呤核苷酸的合成。该途径从 5-核糖磷酸到 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸 (PRPP) 的转化开始，PRPP 随后转化为肌苷单磷酸 (IMP)，然后通过肌苷单磷酸脱氢酶 (IMPDH) 脱氢转化为黄嘌呤单磷酸 (XMP)，之后再通过 GMP 合酶脱氢转化为鸟嘌呤单磷酸 (GMP)。GMP 转化为 DNA 合成所需的三磷酸鸟苷 (GTP) 和三磷酸脱氧鸟苷 (dGTP)。MPA 是 IMPDH 的强抑制剂，抑制 IMPDH 会导致核苷酸 (GMP、GTP 和 dGTP) 的利用率降低，因此 MPA 能阻止 DNA 复制和随后的细胞增殖。

持治疗的药物<sup>[44]</sup>。

在疾病活动性低、器官损害风险低的抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 相关性血管炎的患者中，MMF 诱导缓解的耐受性良好<sup>[45]</sup>。但作为维持治疗，该药的疗效比硫唑嘌呤稍差<sup>[45-47]</sup>。此外，MMF 似乎有助于肌炎患者取得良好的临床和生物学反应，并且在治疗与肌炎、SSc 或 RA 相关的肺部疾病的患者中具有一些有益作用<sup>[37, 48-50]</sup>。但是，目前尚不清楚 MMF 是否对 RA 的肺外症状有效。一项纳入 142 例 SSc 相关肺部疾病患者的临床试验表明，与口服 1 年疗程环磷酰胺相比，2 年疗程的 MMF 更安全，且耐受性更高<sup>[51]</sup>。但是，MMF 的疗效并不优于环磷酰胺。硬皮病肺研究 I 和 II 的分析发现，与安慰剂相比，MMF 与呼吸困难、肺功能和皮肤增厚的改善相关<sup>[51, 52]</sup>。MMF 对早期弥漫性皮肤型 SSc 患者的皮肤增厚也具有一定疗效。MMF 对皮肤增厚的临床效果与皮肤中炎性基因标记的减弱相关<sup>[32]</sup>。

**临床使用的新用途。** MMF 作为免疫抑制药物的最初应用主要是基于其能减少淋巴细胞增殖。如今，MMF 在

风湿病领域的大多数正在进行的试验均在研究其可能的抗纤维化特性，包括对 SSc 的肺纤维化和皮肤纤维化的影响。越来越多的证据表明，MMF 可以减轻 SSc 患者的肺部疾病负担和皮肤增厚（如上一节所述）。目前，正在进行的各种试验拟进一步证实该药物在 SSc 患者中的这些发现（补充表 1）。这些试验探究了 MMF 单独使用或与甲氨蝶呤、硼替佐米和 / 或吡非尼酮组合使用的情况。

截至 2020 年 1 月，共有 52 项涉及 MMF 治疗的试验正在进行或正在招募中<sup>[55]</sup>，来自 ClinicalTrials.gov 的数据显示其中大多数试验是血液学、肿瘤学和移植领域的研究。在风湿病领域，其中一些试验涉及 SSc 患者的自体造血干细胞移植 (HSCT)（补充表 1）。移植后，使用各种免疫抑制药物（包括 MMF）维持缓解。一项研究正在进行中，它比较了各种治疗方案以期找到在 SSc 患者进行 HSCT 后需要使用的最佳剂量<sup>[56]</sup>。由于 SSc 患者行 HSCT 的死亡率相对较高，因此在 HSCT 的疗效和安全性之间寻求平衡对于降低死亡率至关重要。

瑞典正在进行的一项试验研究了 MMF 在有或没有胃肠道并发症的 SSc 患者中的生物利用度<sup>[57]</sup>。这项试验很有意思，因为许多 SSc 患者的胃肠道受累可能会影响其他疾病表现（例如肺和皮肤表现）对 MMF 的反应。

狼疮性肾炎患者在环磷酰胺诱导治疗后，使用 MMF 作为维持治疗<sup>[43]</sup>。目前正在进行一些试验，以进一步优化 MMF 作为维持治疗的疗效和毒性之间的平衡<sup>[58-60]</sup>。例如，一项试验正在研究新诊断为狼疮性肾炎患者肾脏的淋巴细胞亚群是否能预测 MMF 作为维持治疗的疗效<sup>[8]</sup>。另一项试验旨在确定狼疮性肾炎维持治疗期间减量 MMF 治疗的理想方案和时机<sup>[59]</sup>。最后，还有一项研究正在进行以探究 MMF 的血清浓度是否是维持治疗期间逐渐减少或调整药物剂量可参照的良好指标<sup>[60]</sup>。

聚乙二醇尿酸酶是治疗难治性痛风的有效方法<sup>[61]</sup>，但是，抗聚乙二醇 (PEG) 抗体可能会阻碍这种疗效<sup>[62]</sup>。目前有人正在研究采用 MMF 进行预处理作为阻断这些抗体形成的策略<sup>[63]</sup>。

关于 MMF 作用机理的上述数据可能有助于改进 MMF 制剂，以更好地将高浓度的 MMF 运输到成纤维细胞增殖的地方。因此，研究人员研发了 MMF 软膏<sup>[64]</sup>。将这种软膏局部应用于 SSc 患者活动性皮肤病变处可能会增加局部药物浓度，从而提高疗效。同样，在间质性肺纤维化患者中，MMF 雾化可能提高纤维化部位的药物水平，从而比口

服 MMF 发挥更大作用<sup>[65]</sup>。

总之，在过去的一个世纪中，MMF 已从用作抗生素，转变为在移植医学和风湿病学中用作免疫抑制剂，现在正越来越多地作为抗纤维化药物用于治疗各种风湿病。

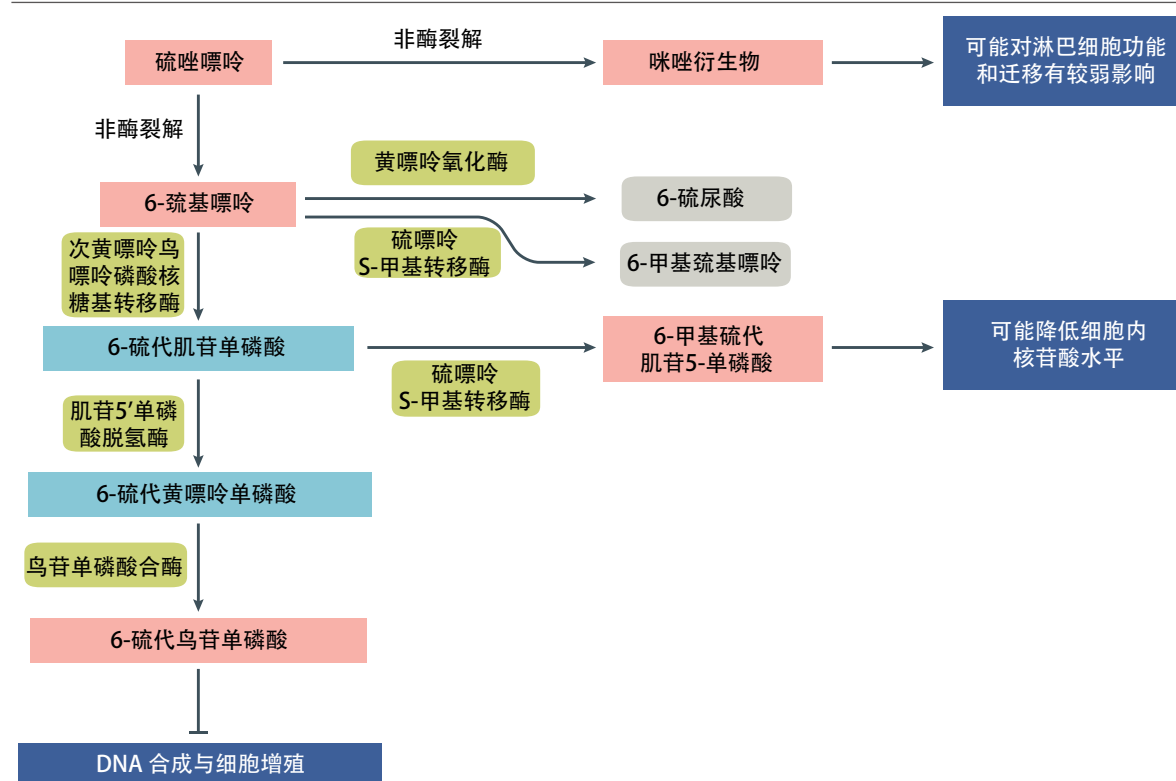
### 硫唑嘌呤

**历史沿革。** 硫唑嘌呤的使用源于 1957 年诺贝尔奖获得者 George Herbert Hitchings 和 Gertrude Elion 进行的研究<sup>[1]</sup>。Hitchings 和 Elion 以一种新的方式进行药物研发，即开发专门干扰细胞稳态途径的药物。如今，这种方法已经非常普遍。两名研究者研究了正常细胞、癌细胞和细菌之间核酸代谢的差异<sup>[1]</sup>。他们研究的目的是干扰嘌呤途径以减少腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸的产生<sup>[66]</sup>。这种方法是基于干扰核苷酸的产生可减少 DNA 的合成，并抑制细胞生长的想法<sup>[67]</sup>。通过系统的研究途径，Hitchings 和 Elion 助力于开发了在当今临床实践中仍大量使用的各种药物，例如别嘌醇、阿昔洛韦、甲氧苄啶和 6-巯基嘌呤<sup>[1, 66, 67]</sup>。

硫唑嘌呤是 6-巯基嘌呤的前体药，于 1957 年合成<sup>[67]</sup>。

最初研究 6-巯基嘌呤是将其用作治疗白血病的化疗药物，之后 Robert Schwartz 进一步研究了它的抗炎作用。他于 1958 年发现用 6-巯基嘌呤治疗兔子使得针对随后加用的抗原而产生的抗体减少。人们对器官移植排斥反应以及潜在的免疫学机制的了解加深，导致了这样一个假说的产生，即 6-巯基嘌呤可以降低移植排斥反应的风险。除 6-巯基嘌呤外，人们还研究硫唑嘌呤这一化合物用作阻断移植排斥反应。硫唑嘌呤被证明比 6-巯基嘌呤具有更好的耐受性，因此，除泼尼松、MMF 和环孢菌素外，它也被用于预防移植排斥反应。鉴于硫唑嘌呤在移植医学中的成功应用，研究者对该药在其他免疫介导的疾病中的作用进行了探索，发现其在治疗系统性炎症性疾病方面有效，这将在下文有关风湿病的目前适应证部分进行介绍。

**药代动力学。** 硫唑嘌呤的主要治疗效果取决于其代谢成具有细胞毒性的硫鸟嘌呤核苷酸，该物质能抑制嘌呤从头合成，从而减少白细胞的增殖。因此，硫唑嘌呤的代谢产物需要到达细胞核。表 1 显示了硫唑嘌呤的药代动力学



**图 2 硫唑嘌呤的免疫调节作用。** 硫唑嘌呤被含巯基的化合物非酶裂解为 6-巯基嘌呤或咪唑衍生物（如巯基咪唑）。据认为这些咪唑衍生物具有弱的免疫调节作用。黄嘌呤氧化酶和硫嘌呤 S-甲基转移酶（TPMT）分别将 6-巯基嘌呤进一步代谢为无毒的 6-硫尿酸和 6-甲基巯基嘌呤（6-MMP）。6-巯基嘌呤还可以被逐步代谢成有毒的 6-硫鸟嘌呤核苷酸，从而抑制 DNA 的有效合成和细胞增殖。首先，6-巯基嘌呤通过次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT）转化为 6-硫代肌苷单磷酸，6-硫代肌苷单磷酸被肌苷 5'单磷酸脱氢酶（IMPDH）代谢为 6-硫代黄嘌呤单磷酸，随后被鸟苷单磷酸（GMP）合酶转化为 6-硫代鸟苷单磷酸。抑制细胞增殖是硫唑嘌呤对淋巴细胞的主要免疫抑制作用。TPMT 还可以将 6-硫代肌苷单磷酸代谢为 6-甲基硫代肌苷 5'-单磷酸，据认为这会降低细胞中核苷酸的利用率。



参数和分子结构。

硫唑嘌呤的代谢很复杂。口服后，硫唑嘌呤可从整个肠道吸收。在肠壁、肝脏和红细胞中，硫唑嘌呤通过谷胱甘肽介导的非酶促过程转化为 6-巯基嘌呤，该过程涉及咪唑基团的去除。次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶以及其他酶促进细胞毒性硫鸟嘌呤核苷酸的合成。而黄嘌呤氧化酶和硫嘌呤 S-甲基转移酶 (TPMT) 则将 6-巯基嘌呤代谢成惰性化合物。因此，TPMT 和黄嘌呤氧化酶在保持药物耐受性和毒性之间的平衡中具有重要作用。TPMT 的遗传变异以及共同使用干扰 TPMT 或黄嘌呤氧化酶活性的药物 (如别嘌醇) 可影响硫唑嘌呤的毒性。在确定对硫唑嘌呤的反应中，TPMT 活性比肾功能更重要。然而，与肾功能正常的患者相比，在 3 期或更晚期慢性肾脏疾病的患者中因硫唑嘌呤引起的毒性风险会增加。

**分子及细胞作用方式。** 6-巯基嘌呤是一种嘌呤拮抗剂，可通过干扰核苷酸合成来抑制白细胞增殖 (图 2)。硫唑嘌呤的治疗指数优于 6-巯基嘌呤，因此硫唑嘌呤在治疗全身性自身免疫病的药物中占有更加重要的地位。细胞毒性硫鸟嘌呤核苷酸通过抑制酰胺转移酶和嘌呤核糖核苷酸相互转化，减少了经从头途径的嘌呤核苷酸的合成。人们认为该机理可以解释硫唑嘌呤对白细胞增殖的作用。另外，有毒的硫鸟嘌呤核苷酸被掺入至 DNA 和 RNA 中，据认为可介导硫唑嘌呤的细胞毒性作用。咪唑衍生物巯基咪唑是硫唑嘌呤和 6-巯基嘌呤的代谢产物，也可能对淋巴细胞功能产生影响。尽管尚未就硫唑嘌呤的治疗作用对这种代谢物进行研究，但巯基咪唑可以在小鼠中激活 T 细胞受体，从而降低 T 细胞增殖和活化 T 细胞核因子 (NFAT) 的信号转导。

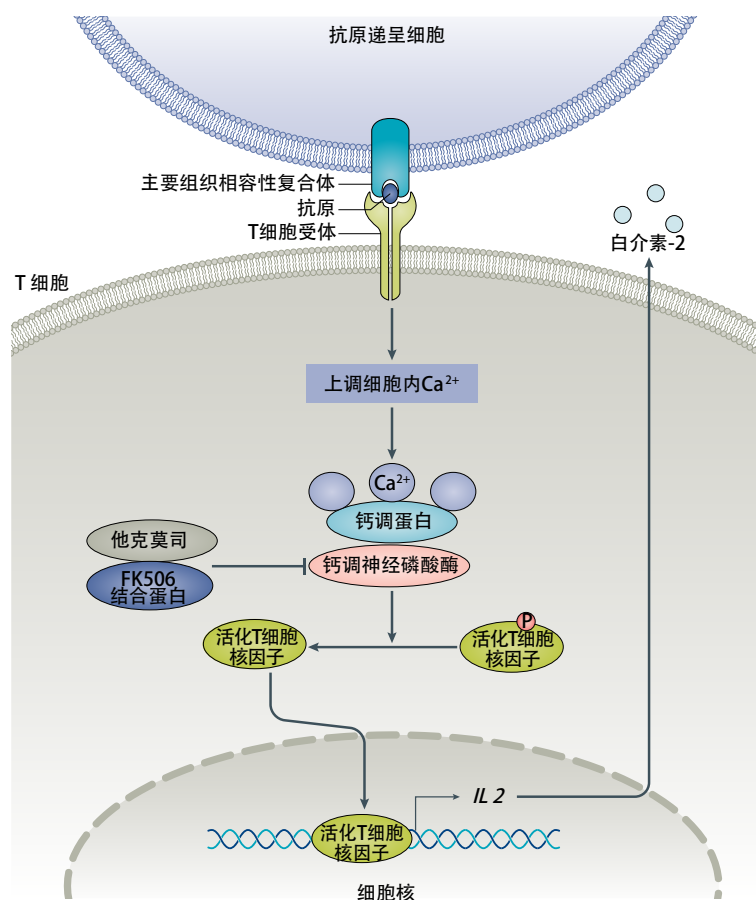
除了对嘌呤核苷酸合成的影响外，硫唑嘌呤还可以直接促进细胞凋亡并抑制增殖途径。在体外，将受刺激的原代人 T 细胞与硫唑嘌呤或 6-巯基嘌呤共培养可促进细胞凋亡。在这些细胞中，6-巯基嘌呤直接与 RAS 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (RAC1) 相互作用。RAC1 是一种 GTP 结合蛋白，在 T 细胞迁移和粘附中具有关键作用。T 细胞中的 RAC1 缺乏会减少这些细胞在淋巴结内和淋巴结之间的间隙迁移。6-巯基嘌呤的代谢产物 6-硫鸟嘌呤三磷酸也可以与 RAC1 结合，从而导致 B 细胞淋巴瘤超大分子 (BCL-XL) 的产生减少。而 BCL-XL 是一种具有重要抗凋亡功能的跨膜分子。有趣的是，BCL-XL 上调有助

于 CD28 共刺激后 T 细胞的存活。这些发现表明，硫唑嘌呤及其代谢产物在 T 细胞共刺激后，通过抑制 RAC1 和 / 或 BCL-XL 对 T 细胞的存活和增殖具有抑制作用，这些药物通过该途径使 T 细胞更易于凋亡。除 T 细胞外，6-巯基嘌呤还可以抑制活化的巨噬细胞中的 RAC1，从而导致诱导型一氧化氮合酶表达降低。在非免疫细胞中，RAC1 途径也是 6-巯基嘌呤的靶标。例如，在用促炎因子 TNF 刺激的內皮细胞中，硫唑嘌呤处理会降低白细胞粘附分子 VCAM1 和 ICAM1 的表达，并削弱 NF- $\kappa$ B 信号传导。

在风湿病领域，硫唑嘌呤的治疗效果是否与循环白细胞数量有关尚不清楚。在 ANCA 相关血管炎中，环磷酰胺诱导治疗后经常使用硫唑嘌呤，因此在开始使用硫唑嘌呤治疗之前，环磷酰胺已经严重影响了白细胞水平。狼疮性肾炎的一项研究表明，在治疗开始之前，循环中的高水平 B 细胞数量是对硫唑嘌呤反应性的预测指标。在针对克罗恩病和溃疡性结肠炎的多项研究中，循环淋巴细胞的数量与对硫唑嘌呤的反应相关。然而，需要进一步的研究来确认测量循环淋巴细胞数量作为对硫唑嘌呤反应性的预测指标的临床实用性。

**风湿病的最新适应证。** 硫唑嘌呤目前用于治疗全身性自身免疫性疾病，包括重叠综合征，但其在 RA 治疗中的作用有限。在 RA 中，硫唑嘌呤比甲氨蝶呤逊色且作用较慢。尽管经常处方硫唑嘌呤治疗 SLE，但其在狼疮性肾炎或系统性血管炎患者的诱导缓解方面不如环磷酰胺。然而，在狼疮性肾炎和系统性血管炎的诱导治疗后，硫唑嘌呤作为维持治疗是有效的。尽管硫唑嘌呤和 MMF 均可作为狼疮性肾炎的维持疗法，但硫唑嘌呤在该适应症方面不如 MMF，并且仅当患者存在 MMF 禁忌症时方才使用 (如上一节关于 MMF 的详细讨论)。硫唑嘌呤广泛用于治疗 SLE 的其他临床表现，例如肝炎和肌炎。此外，硫唑嘌呤可联合或不联合糖皮质激素使用，用于治疗肌炎、白塞综合征、银屑病关节炎或反应性关节炎。伴有 ILD 或关节受累的 SSc 和重叠综合征患者也可以从硫唑嘌呤治疗中获益。

**临床使用的新用途。** 与 MMF 一样，硫唑嘌呤已从移植医学发展到风湿病学实践中。该药在各种全身性自身免疫性疾病 (包括与抗合成酶综合征相关的 ILD) 的一级治疗或维持治疗中发挥重要作用。根据 ClinicalTrials.gov 的数据 (补充表 1)，截至 2020 年 1 月，共有 29 项包含硫



**图3 他克莫司对T细胞的抑制作用。**在T细胞中，T细胞受体（TCR）信号传导提高了细胞质中钙的水平，从而导致了钙调神经磷酸酶-活化T细胞核因子（NFAT）途径的活化。在该途径中，NFAT的去磷酸化导致NFAT的活化、核易位以及IL2的转录。他克莫司与FK506结合蛋白（FKBP）结合，他克莫司-FKBP复合物抑制钙调神经磷酸酶-NFAT途径的活化，从而导致IL2生成减少并抑制T细胞的早期激活。APC：抗原递呈细胞。

唑嘌呤的试验正在进行。这些研究大多数都在胃肠病学领域，侧重于自身免疫性肝炎、克罗恩病和溃疡性结肠炎。然而，目前有9项试验正在研究将硫唑嘌呤作为主要化合物应用于风湿病实践中。硫唑嘌呤用于治疗抗合成酶综合征尤为热点，因为有关该病的知识和前瞻性研究稀少。目前正在进行的一项研究比较在抗合成酶综合征相关的ILD患者中，他克莫司诱导和维持治疗与环磷酰胺诱导联合硫唑嘌呤维持治疗之间的疗效差异。抗合成酶综合征相关的ILD具有高发病率和高死亡率。这样的研究可能有助于确定针对这种情况的最佳治疗策略，并可能产生基于证据的治疗标准。

除研究其他药物外，两项大型回顾性研究亦探索了硫唑嘌呤在难治性Takayasu病或结节病中的疗效。如针对MMF所讨论的，人们也正评估硫唑嘌呤用于SSc患者进行HSCT后的治疗，包括适当的治疗剂量和持续时间以及对疾病活动度的影响。最后，人们还努力明确在终末期肾

脏疾病的SLE或ANCA相关血管炎患者维持治疗期间减量硫唑嘌呤是否安全的问题。由于硫唑嘌呤相关的不良反应以及皮肤癌和宫颈癌的风险增加，因此这些研究可以帮助确定哪些患者可能会受益于该药的治疗，以及哪些患者应该避免或逐渐减少使用这些药物。

越来越多数据表明，对硫唑嘌呤治疗的患者选择和给药策略进行微调可能会取得更好的治疗效果，同时降低毒性。该药物似乎通过6-硫鸟嘌呤核苷酸的形成来介导其主要临床作用。在过去的15年中，研究者对炎症性肠病和其他免疫介导的疾病患者进行了TPMT基因谱分析，以评估不同变异体代谢硫唑嘌呤的能力，目的是通过毒性风险和/或治疗反应将患者进行分层。2014年，在亚洲血统的个体中发现了NUDT15的变异体，这些变异体在临床上与硫唑嘌呤的代谢有关。NUDT15编码一种酶，可将6-硫鸟嘌呤核苷酸水解成无活性的代谢产物。因此，在携带NUDT15变异基因（可使上述酶无效）的患者，硫唑嘌呤的不良反应风险增加。另外，硫唑嘌呤代谢产物的磷酸化会影响该药的临床疗效。对影响6-硫鸟嘌呤核苷酸水平的基因型和磷酸化谱的进一步研究可能有助于优化硫唑嘌呤的治疗。这种方法能实现个性化药物和个体剂量给药，从而降低毒性并获得更好的治疗效果。

### 他克莫司

**历史沿革。**1982年，随着环孢菌素的成功应用，日本的研究者研究了链霉菌属菌种的发酵产物，以确定它们在混合淋巴细胞反应中是否具有免疫抑制作用。其中一种产物被称为FK506，现在被称为他克莫司，来自tsukubaensis链霉菌，在混合淋巴细胞培养中抑制免疫反应的效力是环孢菌素的100倍。有关FK506的第一份科学报告发表于1986年，1989年在匹兹堡开始了第一批临床试验。该试验旨在评估FK506在接受肝移植且具有慢性排斥反应、环孢菌素肾毒性患者中挽救肝脏同种异体移植物的功效。在这项研究中，他克莫司具有良好的耐受性及令人鼓舞的作用。随后他克莫司的使用扩展至其他移植领域（肾脏、肝脏、肠和心脏）以及风湿病领域。

**药代动力学。**他克莫司在肠道的吸收较差，大多数通过粪便被清除。吸收后，约99%的他克莫司与红细胞结合。剩余1%的他克莫司（未结合）进入淋巴系统，发挥其主要的治疗作用。他克莫司的药代动力学参数和分子结

### 方框 1 未来的研究方向

霉酚酸酯、硫唑嘌呤和他克莫司的各种研究方向都需要进一步探索。首先，根据个体的药代动力学和药效学调整剂量的策略需要进一步完善。目前，各种研究都集中在逐渐减少这些药物对生物学或临床指标的影响上。要回答的一个重要问题是何时停止治疗。在什么时候治疗（例如，慢性肾衰竭）将无济于事？与给药相关的另一个研究领域是治疗剂量和持续时间对白细胞数量和亚群的影响。这项研究应有助于优化剂量，并降低这些药物在靶向循环或器官中的毒性。第二个方向是探索这些药物的新适应症，这可能使疾病得到更好的治疗并降低成本。MMF、硫唑嘌呤和他克莫司的专利权已经到期，这使得它们的购买价格相对便宜。在这方面令人振奋的新进展是可能使用他克莫司来治疗难治性类风湿关节炎。此外，目前一项 MMF 与他克莫司治疗抗合成酶综合症的 ILD 的头对头试验正在进行，它将更明确地证实其中哪种药物在抗合成酶综合症的治疗中具有更强的适应症。第三种途径是研究这些药物作为联合用药与其他生物或常规 DMARD 一起应用。当前，对 ILD 新型疗法的研究激增，包括生物制剂和合成药物，而这些药物通常与 MMF 或他克莫司联合使用。

构列于表 1 中。

特定剂量他克莫司的清除以及其疗效和毒性之间的平衡主要取决于两个细胞过程。第一个过程是他克莫司通过细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) (一种在肝脏和肠上皮中表达的酶) 代谢为无活性代谢产物。CYP3A4 的各种多态性会影响他克莫司的清除率，进而影响有效治疗所需的他克莫司剂量。影响他克莫司功效和毒性的第二个过程是 P-糖蛋白的活性，这是一种将他克莫司泵出细胞的蛋白泵。P-糖蛋白存在于肝细胞中，也存在于血脑屏障、胎盘和肠上皮等屏障上。因此，P-糖蛋白对他克莫司的生物利用度具有直接影响。在引起肠粘膜损害的疾病（如传染性腹泻）中，P-糖蛋白活性降低，这导致他克莫司生物利用度增加。因此，抑制 CYP3A4 或 P-糖蛋白活性的药物可能会增加他克莫司的浓度。他克莫司的清除半衰期为 12 至 15 小时。95% 他克莫司代谢产物通过胆道系统从粪便排出。尽管肾功能衰竭对他克莫司的清除没有影响，但他克莫司具有肾毒性，因此在肾功能衰竭的患者中应避免使用该药。

**分子及细胞作用方式。**他克莫司的作用方式在 T 细胞中最具特征。他克莫司是一种被人熟知的钙调神经磷酸酶抑制剂，据认为它对 T 细胞的作用是多重的，超出了抑制钙调神经磷酸酶的范围，它既影响促分裂原活化蛋白激酶

(MAPK) 信号转导，亦影响 TGF $\beta$  信号转导。

钙调神经磷酸酶是参与 T 细胞活化的钙依赖性和钙调节蛋白依赖性的磷酸酶。T 细胞受体信号转导导致钙调神经磷酸酶活性上调，从而导致 NFAT 活化、NFAT 核易位以及编码 IL-2 基因的转录。因此，钙调神经磷酸酶的活性增加导致 IL-2 表达增加，并因此促进 T 细胞的分化和存活。进入细胞后，他克莫司通过与被称为 FK506 结合蛋白 (FKBP) 的一种亲免疫蛋白结合而抑制钙调神经磷酸酶的活性。值得注意的是，环孢菌素 (另一种不同的钙调神经磷酸酶抑制剂) 也与亲免疫蛋白 (亲环蛋白 A) 结合。亲免疫蛋白 (亲环蛋白 A 和 FKBP) 是天然存在的钙调神经磷酸酶抑制剂，在其他钙调神经磷酸酶配体不存在的情况下，它能结合钙调神经磷酸酶并降低其活性。环孢菌素或他克莫司与亲环蛋白 A 或 FKBP 的结合，分别增加了这些亲免疫蛋白对钙调神经磷酸酶的亲和力。因此，通过亲免疫蛋白对钙调神经磷酸酶信号的抑制作用随这些药物而增加，并导致 NFAT 信号传导和 IL-2 产生减少 (图 3)。钙调神经磷酸酶还通过 NF- $\kappa$ B 促进第二波 IL-2 转录。NF- $\kappa$ B 的失活形式与一种称为 I $\kappa$ B 的蛋白质结合。钙调神经磷酸酶活性导致 I $\kappa$ B 降解，从而使 NF- $\kappa$ B 介导的促炎基因转录。因此，他克莫司或环孢菌素对钙调神经磷酸酶的抑制作用会增加与 I $\kappa$ B 结合的 NF- $\kappa$ B 的比例，并抑制 NF- $\kappa$ B 介导的促炎基因的转录。

除了抑制钙调神经磷酸酶外，他克莫司还可以通过抑制 MAPK 途径减少 IL-2 的转录。环孢菌素和他克莫司 (与它们各自的亲免疫蛋白结合) 抑制该途径组分的活性：他克莫司抑制 MAPK14 (也称为 p38 $\alpha$ )，而环孢菌素抑制 MAPK8 (也称为 JNK1)。在 T 细胞中，共刺激信号促进 MAPK14 和 MAPK8 的激活，后者转移至细胞核以发挥多种作用，包括上调 IL-2 表达。因此，环孢菌素和他克莫司对 MAPK 信号的上游抑制作用会导致依赖钙调神经磷酸酶的 IL-2 信号转导减少。

值得注意的是，一些体外数据表明他克莫司可以促进 T 细胞中 TGF $\beta$ 1 mRNA 的表达。这种现象的潜在机制尚不清楚。类似地，环孢菌素可以促进即将进行肾脏移植的患者外周血 TGF $\beta$ 1 的表达。尽管这些发现是初步的，但了解这种作用很重要，因为 TGF $\beta$ 1 在纤维化中具有重要作用，并且已经发现它与肾毒性和肺纤维化有关，而这些都是他克莫司治疗的并发症。对他克莫司上调 TGF 的机制进行更深入地了解，有助于制定策略以降低患者发生这些并发症



## 方框 2 我们可以从其他移植用药中得到什么？

借鉴历史能让我们更好应对未来。他克莫司、霉酚酸酯和硫唑嘌呤都来源于移植医学。与本综述中讨论的药物相似，其他一些药物目前正在移植医学中使用，将来可能会被推广至风湿病学实践中。例如，雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制剂西罗莫司和依维莫司。

在移植医学中，西罗莫司和依维莫司被用作移植后的维持疗法。对于不能耐受标准治疗的狼疮性肾炎患者，西罗莫司似乎是一种安全的选择。依维莫司联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎患者的初步研究取得了可喜的结果，但还需要进一步的随访研究。一些数据表明依维莫司和西罗莫司在间质性肺疾病中可能是把双刃剑。鉴于 mTOR 通路在各种风湿性疾病 (包括类风湿关节炎、干燥综合征、系统性红斑狼疮和痛风) 中的潜在功能，这类移植药物在未来几年的风湿病学实践和试验中可能会发挥更大的作用。

的风险。

虽然有关他克莫司的大多数研究都集中在 T 细胞上，但是该药也会影响其他类型细胞。他克莫司可以减少自然杀伤 (NK) 细胞在体外的细胞脱颗粒以及  $IFN\gamma$  的产生。类似地，与来自健康个体的 NK 细胞相比，从钙调神经磷酸酶抑制剂治疗的患者中分离得到的 NK 细胞的细胞脱颗粒和  $IFN\gamma$  产生减少。此外，他克莫司降低了树突状细胞刺激 T 细胞以及这些细胞产生 IL-12 和 CXC 趋化因子配体 10 (CXCL10) 的能力。用他克莫司孵育的树突状细胞具有耐受性表型，将他克莫司预处理的树突状细胞注入胶原诱导的关节炎小鼠可以抑制  $CD4^+$  T 细胞的增殖。一些数据还表明，他克莫司对单核细胞中 MAPK 途径的影响较小 (尽管与临床无关)。

**风湿病的最新适应证。** 他克莫司可以作为有效治疗 SLE 和与肌炎相关 ILD 的药物。例如，含有 1% 他克莫司的外用药膏在治疗皮肤性红斑狼疮中是有效的。在活检证实为活动性狼疮性肾炎的患者中，他克莫司联合泼尼松在诱导治疗方面不逊于 MMF，之后使用硫唑嘌呤维持治疗。为了降低他克莫司的毒性，研究者测试了 4 mg/天 (相对于标准剂量 0.1-0.2 mg/kg/d) 联合低剂量 MMF (1 g/天) 的方案治疗 368 例狼疮性肾炎。在这项随机对照试验中，低剂量 MMF 和他克莫司联合在 6 个月时即达到完全的肾脏缓解，优于静脉注射环磷酰胺冲击治疗。然而，这种结果是以增加感染风险为代价的。来自较小观察性研究的数据表明，所谓的低剂量 MMF 联合他克莫司的“多靶点”

疗法在治疗对标准疗法 (包括 MMF 单药治疗) 无反应的狼疮性肾炎中尤为有效。在患有多发性肌炎或皮肌炎的 ILD 患者中也可以考虑使用他克莫司。在这些患者中，与单独的标准治疗方法 (泼尼松、静脉内环磷酰胺或环孢菌素) 相比，标准治疗联合他克莫司治疗可以提高生存率。

**临床使用的新用途。** 截至 2020 年 1 月，已有 102 项有关他克莫司的临床试验正在进行，其中大部分涉及实体器官移植或血液系统恶性肿瘤患者。与风湿病学领域相关的有 10 项试验 (补充表 1)。例如，一项试验正在研究他克莫司滴剂治疗干燥综合征患者的干眼症。由于尚无对干燥综合征患者的干燥症状进行有效治疗的药物，因此该研究很有意义。如硫唑嘌呤所讨论的，目前也有一项前瞻性临床试验正在进行以研究他克莫司治疗抗合成酶综合征和 ILD 患者。与他克莫司对系统性自身免疫病中 ILD 的假定作用相一致，研究人员还在评估他克莫司对多发性肌炎及皮肌炎肺部受累的影响。人们对这些研究很感兴趣，希望这些结果对患者的肺部疾病的治疗有所帮助，因为这些疾病有时可能会迅速进展。其他针对他克莫司在狼疮性肾炎中的安全性和有效性的研究也正在进行中。

目前，在大多数国家中都很少将他克莫司用于 RA 的治疗。然而，他克莫司在日本被批准用于治疗 RA，人们好奇的是他克莫司是否确实能有效治疗该病。尽管来自各种临床试验的数据表明他克莫司在 RA 中具有有益作用，但他克莫司是否可以减少疾病的影像学进展尚不清楚。研究者们正在进行各种试验以探究他克莫司作为甲氨蝶呤的替代品或补充品。此外，人们也正在探索将生物 DMARD 与甲氨蝶呤或他克莫司联合使用的功效。如果这些研究证明他克莫司是有效的，那么对于对其他 DMARD 无反应的 RA 患者，该药可能是一种有用、低成本且相对安全的替代药物。

最后，他克莫司的缓释化合物已投放市场，并被用作肾脏移植的维持疗法。这种方法基于每天一次他克莫司制剂 (而不是每天两次) 可以改善患者依从性。在肾脏移植患者中进行的各种大型研究表明，这种剂型不劣于每日两次使用的他克莫司剂型。该化合物可能进入风湿病学领域，因为依从性差是许多风湿性疾病患者的普遍特征。但值得注意的是，缓释化合物的成本比普通他克莫司的成本要高出很多。

**总结**



MMF、硫唑嘌呤和他克莫司历史悠久，其共同根源为实体器官移植，但已作为治疗狼疮性肾炎、血管炎和全身性自身免疫性疾病（如SSc和抗合成酶综合征）的有效药物进入风湿病临床实践。

他克莫司是钙调神经磷酸酶途径的抑制剂，而硫唑嘌呤和MMF通过不同的机制抑制嘌呤从头合成途径。对嘌呤合成途径的进一步理解有助于制定更好的给药方案和了解药物输送机制。值得注意的是，MMF除了抑制淋巴细胞增殖外，还可以抑制成纤维细胞的增殖，这可以解释该药在SSc和ILD中的有益作用。MMF和他克莫司都

有望单独使用或联合应用作为风湿性疾病相关ILD的治疗药物。此外，有研究正在探索将硫唑嘌呤或MMF纳入HSCT后SSc患者的治疗方案。方框1讨论了需要进一步探索的其他研究领域。除了这三种药物以外，目前正在移植领域使用的其他药物也有可能应用于风湿性疾病的治疗（方框2）。

综上所述，MMF、硫唑嘌呤和他克莫司作为免疫抑制药物在临床医学各个领域已经走了很长一段路，并且很可能在全身性自身免疫性疾病未来的治疗中继续发挥重要作用。

在线发表于2020年2月13日

## 参考文献

- Nobel Media AB 2020. The Nobel prize in physiology or medicine 1988. *NobelPrize.Org*. <https://www.nobel-prize.org/prizes/medicine/1988/summary/> (2020).
- Alsberg, C. L. & Black F. in *Contribution to the study of maize deterioration; biochemical and toxicological investigations of Penicillium puberulum and Penicillium stoloniferum* (Trieste, 1913).
- Gong, Z. J. et al. Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication in vitro. *J. Viral Hepat.* **6**, 229–236 (1999).
- Abraham, E. P. The effect of mycophenolic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* in heart broth. *Biochem. J.* **39**, 398–404 (1945).
- Allison, A. C. & Eugui, E. M. Immunosuppressive and long-acting anti-inflammatory activity of mycophenolic acid and derivative, RS-61443. *Br. J. Rheumatol.* **30**, 57–61 (1991).
- Jones, E. L. et al. Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid. *J. Invest. Dermatol.* **65**, 537–542 (1975).
- Lipsky, J. J. Mycophenolate mofetil. *Lancet* **348**, 1357–1359 (1996).
- Bullingham, R. E., Nicholls, A. J. & Kamm, B. R. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin. Pharmacokinet.* **34**, 429–455 (1998).
- Van Hest, R. M. et al. Within-patient variability of mycophenolic acid exposure: therapeutic drug monitoring from a clinical point of view. *Ther. Drug Monit.* **28**, 31–34 (2006).
- Kuypers, D. R. et al. The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (*UGT1A9*) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T275A and C2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **78**, 351–361 (2005).
- Kees, M. G. et al. Omeprazole impairs the absorption of mycophenolate mofetil but not of enteric-coated mycophenolate sodium in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **52**, 1265–1272 (2012).
- Meier-Kriesche, H. U. et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal insufficiency. *Ther. Drug Monit.* **22**, 27–30 (2000).
- Daleboudt, G. M. et al. Concentration-controlled treatment of lupus nephritis with mycophenolate mofetil. *Lupus* **22**, 171–179 (2013).
- Alexander, S. et al. Pharmacokinetics of concentration-controlled mycophenolate mofetil in proliferative lupus nephritis: an observational cohort study. *Ther. Drug Monit.* **36**, 423–432 (2014).
- Ransom, J. T. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther. Drug Monit.* **17**, 681–684 (1995).
- Suthanthiran, M. & Strom, T. B. Immunoregulatory drugs: mechanistic basis for use in organ transplantation. *Pediatr. Nephrol.* **11**, 651–657 (1997).
- Tang, Q. et al. Mycophenolic acid upregulates miR-142-3P/5P and miR-146a in lupus CD4<sup>+</sup>T cells. *Lupus* **24**, 935–942 (2015).
- Li, L., Chen, X. P. & Li, Y. J. MicroRNA-146a and human disease. *Scand. J. Immunol.* **71**, 227–231 (2010).
- Yang, Y. et al. The effect of mycophenolic acid on epigenetic modifications in lupus CD4<sup>+</sup>T cells. *Clin. Immunol.* **158**, 67–76 (2015).
- Zhang, B. et al. The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease. *Immunol. Lett.* **153**, 58–61 (2013).
- Morales-Cárdenas, A. et al. Pulmonary involvement in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **15**, 1094–1108 (2016).
- Morath, C. et al. Effects of mycophenolic acid on human fibroblast proliferation, migration and adhesion in vitro and in vivo. *Am. J. Transplant.* **8**, 1786–1797 (2008).
- Badid, C. et al. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int.* **58**, 51–61 (2000).
- Johnsson, C., Gerdin, B. & Tufveson, G. Effects of commonly used immunosuppressants on graft-derived fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 405–412 (2004).
- Azzola, A. et al. Everolimus and mycophenolate mofetil are potent inhibitors of fibroblast proliferation after lung transplantation. *Transplantation* **77**, 275–280 (2004).
- Ozgen, M. et al. Mycophenolate mofetil and daclizumab targeting T lymphocytes in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**, 48–54 (2012).
- Piera-Velazquez, S., Li, Z. & Jimenez, S. A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am. J. Pathol.* **179**, 1074–1080 (2011).
- Wright, R. D., Dimou, P., Northey, S. J. & Beresford, M. W. Mesangial cells are key contributors to the fibrotic damage seen in the lupus nephritis glomerulus. *J. Inflamm.* **14**, 22 (2019).
- Wang, W., Mo, S. & Chan, L. Mycophenolic acid inhibits PDGF-induced osteopontin expression in rat mesangial cells. *Transpl. Proc.* **31**, 1176–1177 (1999).
- Dubus, I. et al. Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int.* **62**, 857–867 (2002).
- Zhou, X., Workeneh, B., Hu, Z. & Li, R. Effect of immunosuppression on the human mesangial cell cycle. *Mol. Med. Rep.* **11**, 910–916 (2015).
- Hinchcliff, M. et al. Mycophenolate mofetil treatment of systemic sclerosis reduces myeloid cell numbers and attenuates the inflammatory gene signature in skin. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1301–1310 (2018).
- Chan, T. M. et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1156–1162 (2000).
- Derk, C. T. et al. A prospective open-label study of mycophenolate mofetil for the treatment of diffuse systemic sclerosis. *Rheumatology* **48**, 1595–1599 (2009).
- Langford, C. A., Talar-Williams, C. & Sneller, M. C. Mycophenolate mofetil for remission maintenance in the treatment of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* **51**, 278–283 (2004).
- Majithia, V. & Harisdangkul, V. Mycophenolate mofetil (CellCept): an alternative therapy for autoimmune inflammatory myopathy. *Rheumatology* **44**, 386–389 (2005).
- Rowin, J. et al. Mycophenolate mofetil in dermatomyositis: is it safe? *Neurology* **66**, 1245–1247 (2006).
- Ginzler, E. M. et al. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2219–2228 (2005).
- Touma, Z. et al. Mycophenolate mofetil for induction treatment of lupus nephritis: a systematic review and meta-analysis. *J. Rheumatol.* **38**, 39–78 (2011).
- Henderson, L. et al. Treatment for lupus nephritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002922.pub3> (2012).
- Maneiro, J. R. et al. Maintenance therapy of lupus nephritis with mycophenolate or azathioprine: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology* **53**, 834–838 (2014).
- Stoenoiu, M. S. et al. Repeat kidney biopsies fail to detect differences between azathioprine and mycophenolate mofetil maintenance therapy for lupus nephritis: data from the MAINTAIN Nephritis Trial. *Nephrol. Dial. Transpl.* **27**, 1924–1930 (2012).
- Ordi-Ros, J. et al. Enteric-coated mycophenolate sodium versus azathioprine in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1575–1582 (2017).
- Palmer, S. C. et al. Induction and maintenance immunosuppression treatment of proliferative lupus nephritis: a network meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Kidney Dis.* **70**, 324–336 (2017).
- Ntatsaki, E. et al. BSR and BHPRR guideline for the management of adults with ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology* **53**, 2306–2309 (2014).
- Hiemstra, T. F. et al. Mycophenolate mofetil vs azathioprine for remission maintenance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized controlled trial. *JAMA* **304**, 2381–2388 (2010).
- Draibe, J. et al. Use of mycophenolate in ANCA-associated renal vasculitis: 13 years of experience at a university hospital. *Nephrol. Dial. Transpl.* **30**, i132–i137 (2015).
- Morganroth, P. A., Kreider, M. E. & Werth, V. P. Mycophenolate mofetil for interstitial lung disease in dermatomyositis. *Arthritis Care Res.* **62**, 1496–1501 (2010).

49. Saketkoo, L. A. & Espinoza, L. R. Rheumatoid arthritis interstitial lung disease: mycophenolate mofetil as an antifibrotic and disease-modifying antirheumatic drug. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1718–1719 (2008).
50. Gerbino, A. J., Goss, C. H. & Molitor, J. A. Effect of mycophenolate mofetil on pulmonary function in scleroderma-associated interstitial lung disease. *Chest* **133**, 455–460 (2008).
51. Tashkin, D. P. et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLE II): a randomized controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir. Med.* **4**, 708–719 (2016).
52. Volkman, E. R. et al. Mycophenolate mofetil versus placebo for systemic sclerosis-related interstitial lung disease: an analysis of scleroderma lung studies I and II. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 1451–1460 (2017).
53. Namas, R. et al. Efficacy of mycophenolate mofetil and oral cyclophosphamide on skin thickness: post-hoc analyses from two randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Care Res.* **70**, 439–444 (2018).
54. Herrick, A. L. et al. Treatment outcome in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: the European Scleroderma Observational Study (ESOS). *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1207–1218 (2017).
55. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://www.clinicaltrials.gov> (2020).
56. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03444805> (2019).
57. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03678987> (2018).
58. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02954939> (2019).
59. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01946880> (2019).
60. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02453997> (2017).
61. Ganson, N. J. et al. Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R12 (2005).
62. Hershfield, M. S. et al. Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R63 (2014).
63. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03303989> (2019).
64. Feturi, F. G. et al. Mycophenolic acid for topical immunosuppression in vascularized composite allotransplantation: optimizing formulation and preliminary evaluation of bioavailability and pharmacokinetics. *Front. Surg.* **9**, 5–20 (2018).
65. Dugas, H. L., Peters, J. I. & Williams, R. O. III Nebulization of mycophenolate mofetil inhalation suspension in rats: comparison with oral and pulmonary administration of Cellcept®. *Int. J. Pharm.* **441**, 19–29 (2013).
66. Elion, G. B. The purine path to chemotherapy. *Science* **244**, 41–47 (1989).
67. Elion, G. B., Callahan, S. W. & Hitchings, G. H. The metabolism of 2-amino-6-[[1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl]thio]purine [B.W. 57–323] in man. *Cancer Chemother. Rep.* **8**, 47–52 (1960).
68. Schwartz, R., Stack, J. & Dameshek, W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**, 164–167 (1958).
69. Starzl, T. E. et al. Extended survival in 3 cases of orthotopic homotransplantation of the human liver. *Surgery*, **63**, 549–563 (1968).
70. MacKay, I. R., Weiden, S. & Ungar, B. Treatment of active chronic hepatitis and lupoid hepatitis with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Lancet* **1**, 899–902 (1964).
71. Van Scoik, K. G., Johnson, C. A. & Porter, W. R. The pharmacology and metabolism of the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and azathioprine. *Drug Metab. Rev.* **16**, 157–174 (1985).
72. Van Os, E. C. et al. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* **39**, 63–68 (1996).
73. Stolk, J. N. et al. Reduced thiopurine methyltransferase activity and development of side effects of azathioprine treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 1858–1866 (1998).
74. Bergan, S. et al. Kinetics of mercaptopurine and thioguanine nucleotides in renal transplant recipients during azathioprine treatment. *Ther. Drug Monit.* **16**, 13–20 (1994).
75. Chocair, P. R. et al. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* **53**, 1051–1056 (1992).
76. Jung, E. J. et al. Oral administration of 1,4-aryl-2-mercaptoprimidazole inhibits T-cell proliferation and reduces clinical severity in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 1005–1013 (2009).
77. Tiede, I. et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **111**, 1133–1145 (2003).
78. Faroudi, M. et al. Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood*, **116**, 5536–5547 (2010).
79. Bertini, I. et al. The anti-apoptotic Bcl-x(L) protein, a new piece in the puzzle of cytochrome c interactome. *PLoS One* **6**, e18329 (2011).
80. Maltzman, J. S. & Koretzky, G. A. Azathioprine: old drug, new actions. *J. Clin. Invest.* **111**, 1122–1124 (2003).
81. Marinkovic, G. et al. 6-Mercaptopurine reduces macrophage activation and gut epithelium proliferation through inhibition of GTPase Rac1. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 1487–1495 (2014).
82. Marinkovic, G. et al. Inhibition of GTPase Rac1 in endothelium by 6-mercaptopurine results in immunosuppression in nonimmune cells: new target for an old drug. *J. Immunol.* **192**, 4370–4378 (2014).
83. Hessels, A. C. et al. Thiopurine methyltransferase genotype and activity cannot predict outcomes of azathioprine maintenance therapy for antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis: a retrospective cohort study. *PLoS One* **13**, e0195524 (2018).
84. Tareyeva, I. E., Shilov, E. M. & Gordovskaya, N. B. The effects of azathioprine and prednisolone on T- and B-lymphocytes in patients with lupus nephritis and chronic glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* **14**, 233–237 (1980).
85. Glas, J. et al. The leukocyte count predicts the efficacy of treatment with azathioprine in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Med. Res.* **10**, 535–538 (2005).
86. Fraser, A. G., Orchard, T. R. & Jewell, D. P. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* **50**, 485–489 (2002).
87. Suarez-Almazor, M. E., Spooner, C. & Belseck, E. Azathioprine for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, CD001461 (2000).
88. Grootsholten, C. et al. Azathioprine/ methylprednisolone versus cyclophosphamide in proliferative lupus nephritis: a randomized controlled trial. *Kidney Int.* **70**, 732–742 (2006).
89. Jayne, D. et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N. Engl. J. Med.* **349**, 36–44 (2003).
90. Mukhtyar, C. et al. EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 310–317 (2009).
91. Contreras, G. et al. Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 971–980 (2004).
92. Rahman, P. et al. Cytotoxic therapy in systemic lupus erythematosus: experience from a single center. *Medicine* **76**, 432–437 (1997).
93. Hamuryudan, V. et al. Azathioprine in Behçet's syndrome: effects on long-term prognosis. *Arthritis Rheum.* **40**, 769–774 (1997).
94. Jones, G., Crotty, M. & Brooks, P. Psoriatic arthritis: a quantitative overview of therapeutic options. The Psoriatic Arthritis Meta-Analysis Study Group. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 95–99 (1997).
95. Benenson, E. et al. High-dose azathioprine pulse therapy as a new treatment option in patients with active Wegener's granulomatosis and lupus nephritis refractory or intolerant to cyclophosphamide. *Clin. Rheumatol.* **24**, 251–257 (2005).
96. Bérezné, A. et al. Therapeutic strategy combining intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine to treat worsening interstitial lung disease associated with systemic sclerosis: a retrospective multicenter open-label study. *J. Rheumatol.* **35**, 1064–1072 (2008).
97. Hoyles, R. K. et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum.* **54**, 3962–3970 (2006).
98. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03770663> (2018).
99. Vuillard, C. et al. Clinical features and outcome of patients with acute respiratory failure revealing anti-synthetase or anti-MDA-5 dermatopulmonary syndrome: a French multicenter retrospective study. *Ann. Intensive Care* **11**, 87 (2018).
100. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03543527> (2018).
101. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02356445> (2017).
102. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02954939> (2016).
103. Dugué, P. A. et al. Risk of cervical cancer in women with autoimmune diseases, in relation with their use of immunosuppressants and screening: population-based cohort study. *Int. J. Cancer.* **136**, E711–E719 (2015).
104. Jiyad, Z. et al. Azathioprine and risk of skin cancer in organ transplant recipients: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Transplant.* **16**, 3490–3503 (2016).
105. Hagen, J. W. & Pugliano-Mauro, M. A. Nonmelanoma skin cancer risk in patients with inflammatory bowel disease undergoing thiopurine therapy: a systematic review of the literature. *Dermatol. Surg.* **44**, 469–480 (2018).
106. Lim, S. Z. & Chua, E. W. Revisiting the role of thiopurines in inflammatory bowel disease through pharmacogenomics and use of novel methods for therapeutic drug monitoring. *Front. Pharmacol.* **9**, 1107 (2018).
107. Kino, T. et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J. Antibiot.* **40**, 1256–1265 (1987).
108. Kino, T. et al. Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transpl. Proc.* **19**, 36–39 (1987).
109. Ochiai, T. et al. Comparative studies on the immunosuppressive activity of FK506, 15-deoxyspergualin, and cyclosporine. *Transpl. Proc.* **21**, 829–832 (1989).
110. Starzl, T. E. et al. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* **2**, 1000–1004 (1989).
111. Spencer, C. M., Goa, K. L. & Gillis, J. C. Tacrolimus: an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* **54**, 925–975 (1997).
112. Peters, D. H. et al. Tacrolimus: a review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* **46**, 746–794 (1993).
113. Yu, M. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics of tacrolimus in kidney transplantation. *Curr. Drug Metab.* **19**, 513–522 (2018).
114. Lemahieu, W. et al. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. *Am. J. Transplant.* **5**, 1385–1391 (2005).
115. Matsuda, S. et al. Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.* **1**, 428–434 (2000).

116. Cardenas, M. E. et al. Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* **13**, 5944–5957 (1994).
117. Clipstone, N. A. & Crabtree, G. R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–697 (1992).
118. Shaw, K. T. et al. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 11205–11209 (1995).
119. Hoyos, B. et al. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* **244**, 457–460 (1989).
120. Frantz, B. et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* **13**, 861–870 (1994).
121. Matsuda, S. et al. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **273**, 12378–12382 (1998).
122. Khanna, A. et al. Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells. *Transplantation* **67**, 614–619 (1999).
123. Shin, G. T. et al. In vivo expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* **65**, 313–318 (1998).
124. Khanna, A. et al. Expression of TGF- $\beta$  and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **62**, 2257–2263 (2002).
125. Sasaki, T. et al. Characteristic features of tacrolimus-induced lung disease in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Rheumatol.* **35**, 541–545 (2016).
126. Koike, R. et al. Tacrolimus-induced pulmonary injury in rheumatoid arthritis patients. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **24**, 401–406 (2011).
127. Issa, N. et al. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am. J. Nephrol.* **37**, 602–612 (2013).
128. Morteau, O. et al. Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. *PLoS One* **5**, e13294 (2010).
129. Tiefenthaler, M. et al. In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 553–560 (2004).
130. Ren, Y. et al. Tolerogenic dendritic cells modified by tacrolimus suppress CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation and inhibit collagen-induced arthritis in mice. *Int. Immunopharmacol.* **21**, 247–254 (2014).
131. Kannegieter, N. M. et al. The effect of tacrolimus and mycophenolic acid on CD14<sup>+</sup> monocyte activation and function. *PLoS One* **12**, e0170806 (2017).
132. Lampropoulos, C. E. et al. Topical tacrolimus therapy of resistant cutaneous lesions in lupus erythematosus: a possible alternative. *Rheumatology* **43**, 1383–1385 (2004).
133. Mok, C. C. et al. Tacrolimus versus mycophenolate mofetil for induction therapy of lupus nephritis: a randomised controlled trial and long-term follow-up. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 30–36 (2016).
134. Liu, Z. et al. Multitarget therapy for induction treatment of lupus nephritis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **162**, 18–26 (2015).
135. Choi, C. B. et al. Outcomes of multitarget therapy using mycophenolate mofetil and tacrolimus for refractory or relapsing lupus nephritis. *Lupus* **27**, 1007–1011 (2018).
136. Barba, T. et al. Treatment of idiopathic inflammatory myositis associated interstitial lung disease: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* **18**, 113–122 (2019).
137. Kurita, T. et al. The efficacy of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with polymyositis or dermatomyositis. *Rheumatology* **54**, 39–44 (2015).
138. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03865888> (2019).
139. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00504348> (2017).
140. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01410747> (2019).
141. Suzuki, M. et al. Clinical effectiveness and safety of additional administration of tacrolimus in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to abatacept: a retrospective cohort study. *Int. J. Rheum. Dis.* **22**, 2199–2205 (2019).
142. Shin, K. et al. Efficacy and safety of add-on tacrolimus versus leflunomide in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to methotrexate. *Int. J. Rheum. Dis.* **22**, 1115–1122 (2019).
143. Dutta, S. & Ahmad, Y. The efficacy and safety of tacrolimus in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **3**, 283–291 (2011).
144. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03737708> (2019).
145. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02837978> (2019).
146. Krämer, B. K. et al. Tacrolimus once daily (ADVAGRAF) versus twice daily (PROGRAF) in de novo renal transplantation: a randomized phase III study. *Am. J. Transplant.* **10**, 2632–2643 (2010).
147. Cattral, M. et al. Randomized open-label crossover assessment of Prograf vs Advagraf on immunosuppressant pharmacokinetics and pharmacodynamics in simultaneous pancreas-kidney patients. *Clin. Transplant.* <https://doi.org/10.1111/ctr.13180> (2018).
148. Marquet, P. et al. Pharmacokinetic therapeutic drug monitoring of advagraf in more than 500 adult renal transplant patients, using an expert system online. *Ther. Drug Monit.* **40**, 285–291 (2018).
149. Anghel, L. A. et al. Medication adherence and persistence in patients with autoimmune rheumatic diseases: a narrative review. *Patient Prefer. Adherence* **12**, 1151–1166 (2018).
150. Yap, D. Y. H. et al. Longterm data on sirolimus treatment in patients with Lupus Nephritis. *J. Rheumatol.* **45**, 1663–1670 (2018).
151. Bruyn, G. A. et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1090–1095 (2008).
152. Solazzo, A. et al. Interstitial lung disease after kidney transplantation and the role of everolimus. *Transpl. Proc.* **48**, 349–351 (2016).
153. Woodcock, H. V. et al. The mTORC1/4E-BP1 axis represents a critical signaling node during fibrogenesis. *Nat. Commun.* **10**, 6 (2019).
154. Blokland, S. L. M. et al. Increased mTORC1 activation in salivary gland B cells and T cells from patients with Sjögren's syndrome: mTOR inhibition as a novel therapeutic strategy to halt immunopathology? *RMD Open* **5**, e000701 (2019).
155. Vazirpanah, N. et al. mTOR inhibition by metformin impacts monosodium urate crystal-induced inflammation and cell death in gout: a prelude to a new add-on therapy? *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 663–671 (2019).

作者贡献

The authors contributed equally to all aspects of the article.

利益冲突

J.M.v.-L. declares that he has received honoraria from Arxx Tx, Eli Lilly, Gesyntha, Leadiant, Roche and Sanofi-Genzyme, and grants from Astra Zeneca, MSD, Roche and Thermofisher, unrelated to the topic of this work. J.C.A.B. declares that he has no competing interests.

审稿人信息

*Nature Reviews Rheumatology* thanks H. Lorenz, J. Pope, M. Wiese and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

补充信息

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0374-8>.

© Springer Nature Limited 2020

翻译: 罗 贵 (中国人民解放军总医院)

审校: 朱 剑 (中国人民解放军总医院)



# 遗传学和表观遗传学在骨关节炎中的相互调控作用

## Interplay between genetics and epigenetics in osteoarthritis

Sarah J. Rice<sup>1</sup>, Frank Beier<sup>2,3</sup>, David A. Young<sup>1</sup> 和 John Loughlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK.

<sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, The University of Western Ontario, London, ON, Canada.

<sup>3</sup>Western Bone and Joint Institute, The University of Western Ontario, London, ON, Canada.

\*email:john.loughlin@ncl.ac.uk

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0407-3>

**摘要:** 近年来运用高效全基因组连锁扫描方法发现了大量与骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 相关的新型风险基因位点, 极大地支持了 OA 的分子遗传学研究。在这令人耳目一新发现的同时还涌现出关于关节组织 DNA 甲基化、组蛋白修饰和调节 RNA 的表观遗传学研究。这些表观遗传学研究运用人群样本和动物模型分析骨发育、稳态和疾病。从这两种互补方法中可以显著观察到大量 OA 遗传风险信号与表观遗传之间相互作用、映射或关联。这表明表观遗传机制及其对基因表达的影响是 OA 遗传风险多态性发挥其功能作用的主要途径。令人振奋的是, 这些研究结果为 OA 易感性的机制性提供了新见解。此外, 这一研究表明通过表观基因组学减少风险等位基因带来的不利影响, 以期作为 OA 治疗干预的靶点的新途径。

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种具有重要的遗传特征由多种因素共同作用导致的疾病。近几年来报道了大量的 OA 风险基因位点<sup>[1-5]</sup>。这些令人瞩目的研究包括应用全基因组关联研究 (genome wide association studies, GWAS) 对典型的数十万个体的大群体队列中数百万变异的 DNA, 主要是单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 进行分析。这些研究将 OA 紧密地归入多基因常见病的范畴当中来。一项源于英国生物样本库的队列研究对 77,000 多例 OA 患者和 378,000 例未诊断 OA 的人群的分析后发现了 52 个新型 OA 关联信息<sup>[4]</sup>。迄今为止, 在广泛研究的欧洲人或欧洲血统的人群中已有 90 多个 OA 易感基因位点被报道<sup>[1-5]</sup>。

来自 OA 的 GWAS 获得的疾病相关 DNA 变体以及强连锁不平衡的共遗传变体的研究结果, 重点强调了风险等位基因可以改变蛋白质氨基酸序列。这种错义改变的例子包括编码软骨基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP)、软骨粘附素样蛋白 (chondroadherin-like protein, CHADL) 和 XI 型胶原的基因变体, 这些都属于软骨细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的结构蛋白<sup>[1,3]</sup>。然而, 绝大多数 OA 风险变体并没有改变蛋白质的氨基酸序列, 而是位于基因组的非蛋白质编码区, 例如在内含子、mRNAs 的非翻译区 (untranslated regions, UTRs) 或者位于大基因间隔区的基因之间。因此, OA 的遗传易感性主要是改变基因的表达调控, 而不是改变蛋白质序列。OA 并非是一个特例, 绝大多数常见的多因素疾病也具有调控

靶基因表达的 DNA 变体构成的遗传结构<sup>[6]</sup>。

研究人员利用关节成形术后切除的组织直接检测 OA 风险等位基因与疾病相关细胞 (包括软骨细胞) 基因表达之间相关性<sup>[7]</sup>。这些研究主要运用等位基因特异性表达不平衡 (allelic expression imbalance, AEI) 技术比较风险等位基因和非风险等位基因对目标基因 mRNA 表达总量的差异。这种方法已鉴定出多种 OA 遗传风险与靶基因表达之间的功能联系, 包括与风险基因表达的增加或减少相关的 *ALDH1A2*、*MGP* 和 *PLEC* 基因<sup>[8-12]</sup>。这种方法着重强调了基因表达的调控是 OA 易感性的一个重要方面, 并揭示了与 OA 相关的调控因素及其靶基因。

表观遗传学的原理是在原有核苷酸序列不发生改变的情况下改变基因表达<sup>[13]</sup>。表观遗传学调控的三个主要机制包括 DNA 修饰 [例如胞嘧啶 - 鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 的甲基化]、组蛋白翻译后修饰和非编码 RNA 调控。这三种机制在体细胞中都存在, 可以通过细胞分裂来传递并通过改变表达基因的序列 (短期或长期) 使细胞对环境作出反应。这些表观遗传学机制能调节染色质可及性、转录因子与 DNA 的结合以及基因组的 3D 结构。

大量表观遗传学研究在 OA 等肌肉骨骼疾病中已经相继开展。由于阵列分析和下一代测序技术进行高通量数据分析的成本相对低廉, 这些研究主要集中在 DNA 甲基化和 RNA 调控上, 尤其是 microRNAs (miRNAs) 的分析上。最近以此为题发表的几篇高质量综述确定了与疾病相关的表观遗传学标记, 并比较了 OA 关节不同组织和跨骨



## 要点

- 全基因组关联分析在过去十年中发现了大量新的骨关节炎 (OA) 风险基因位点。
- 这些风险基因位点绝大多数位于非编码区, 这些基因可能通过调节靶基因的表达来增加罹患疾病风险。
- 许多这些风险位点与表观遗传学介质接近或相关。
- 表观遗传学特征和介质表明了 OA 遗传风险因素与疾病发病或进展之间的联系。
- 新兴的基因组技术包括染色质转座酶可及性测序分析 (ATAC-seq)、基因组编辑和单细胞测序用以阐明 OA 中这些表观遗传效应。
- 调控表观遗传特征可能使其成为潜在的治疗靶点。

髓部位的表观遗传学特征<sup>[14,15]</sup>。在本文中,我们将重点阐述 OA 表观遗传学的最新研究进展,尤其是遗传学和表观遗传学之间的相互作用,以及表观遗传学在 OA 遗传易感性的功能和机制效应上的新认知。

## 关节组织的表观遗传学调控

当涉及表观遗传学机制在 OA 中的作用时必须区分以下两种主要情况。首先,关节和骨骼的发育是通过多种表观遗传学机制调控的。这些过程的改变可以降低或增加将来罹患 OA 的风险,例如,改变关节形态(由此改变生物力学负荷模式)、软骨 ECM 成分、软骨细胞表型和/或关节细胞对细胞因子和生长因子的反应性<sup>[16]</sup>。这个设想为“健康和疾病的发展起源”的概念提供了一个实例,即产前和产后早期发育的过程决定了疾病的基线风险<sup>[16]</sup>。其次,成人的表观遗传学过程可由某些特定事件触发,如关节损伤或代谢失调可控制促进 OA 起始和进展的基因表达变化。更复杂的是,一些与 OA 相关的细胞变化类似于那些在骨骼生长发育过程中活跃的细胞变化,例如从关节软骨细胞表型向生长板软骨细胞表型的转变<sup>[16,17]</sup>。

在疾病晚期患者的样本中区分上述情况是相当困难的;然而,通过建立动物模型我们能够检测到在疾病发展的过程中多种成分和通路的表达。在本章节中,我们将利用患者和动物模型的数据讨论表观遗传学调控如何影响关节组织的发育以及发病机制。

**DNA 甲基化。** DNA 甲基化与转录调控相关,通常涉及基因表达的抑制,是 OA 中研究最广泛的表观遗传学机制。有力的证据表明 DNA 甲基化在 OA 发病中具有调节作用<sup>[18]</sup>。单基因和全基因组分析揭示了部分疑似与 OA 有关的基因甲基化的改变,包括编码转录因子(如 *SOX9*)

的基因,编码 ECM 蛋白和基质降解蛋白酶(包括 *COL2A1*、*ACAN* 和 *MMP13*) 的基因,以及参与生长因子和细胞因子信号传导的基因,如 *GDF5* 和 *BMP7*<sup>[18]</sup>。尽管尚未对所有已发表的研究进行系统回顾,但一些新的趋势表明,甲基化模式在 OA 的不同关节和疾病的不同阶段可能有所不同。例如,膝关节软骨和髌关节软骨之间以及同一关节轻度和重度受累软骨之间可能会出现不同的甲基化模式<sup>[19-21]</sup>。需要进一步整合不同关节组织与疾病相关的甲基化变化,包括分析 RNA 和蛋白质表达以及组蛋白修饰,以明确有生物学意义的变化并对其机制进行更深入理解(方框 1)。

除了搞清楚与关节发育和疾病进展相关的甲基化变化外,确定潜在的机制在未来的研究中将是至关重要的。2017 年发表的一项研究揭示了 DNA 甲基转移酶 DNMT3B 在 OA 中具有重要功能<sup>[22]</sup>。该酶参与从头开始的 DNA 甲基化,并在 OA 患者和动物模型中均有下调。值得一提的是,小鼠软骨特异性缺失 *Dnmt3b* 导致早期 OA,这可能至少部分是通过改变细胞代谢介导的。相反,软骨中 *Dnmt3b* 的过度表达保护了小鼠免受手术诱导的 OA。因此, DNMT3B 在 DNA 甲基化中具有重要作用,是软骨健康维持所必需的。

DNA 去甲基对基因激活至关重要。研究表明,羟甲基胞嘧啶(DNA 去甲基化的中间产物)的模式在 OA 和软骨细胞分化过程中均会产生改变,这表明 DNA 去甲基化(以及由此产生的基因激活)会在这个过程中发生<sup>[23,24]</sup>。随后利用细胞系和原代细胞对软骨发生进行的功能研究表明,甲基胞嘧啶双加氧酶 TET1 是软骨细胞中催化胞嘧啶去甲基化的一种重要酶<sup>[25]</sup>。

尽管关于 OA 中产生 DNA 甲基化改变的数据还在不断增加,我们对 OA 中涉及这些 DNA 甲基化改变的机制认知才刚刚开始起步。此外,这些甲基化改变与疾病发生的因果关系还不尽然,许多方面值得进一步探究。例如,大量研究都集中在软骨上却很少关注其他相关组织类型如软骨下骨和滑膜。缺乏 OA 表型分层研究,与终末期疾病的研究相比,软骨和关节发育的全基因组研究不足。最后,还需要更详尽的机制研究,例如确定影响关节生物学 DNA 甲基化的不同分解代谢和合成代谢调节因子之间的联系,以及了解 OA 发病过程中特定基因不同的激活状态。

**组蛋白修饰。** 组蛋白翻译后修饰由乙酰化、甲基化

### 方框 1 OA 表观遗传学未来研究的重点领域

- 在表观遗传学研究中应从患者数量和表观遗传学标志物数量两方面纳入大量样本
- 研究染色质的 3D 结构作为潜在致病因素
- 研究软骨的其他关节组织，如软骨下骨和滑膜
- 分析年轻供者的样本以探究 OA 相关遗传和表观遗传因素的潜在发育起源
- 整合不同的遗传和表观遗传标志物，并与其他相关测量（如蛋白质表达数据）进行关联分析
- 开展基因型、表观基因型、基因表达和表型之间的关系的持续性研究
- 应用新兴技术，如染色质转座酶可及性测序分析（ATAC-seq）、基因组编辑和单细胞测序。

和其他可逆化学调节通过多种机制调控基因表达实现的。这些机制包括调控染色质压缩，招募转录因子和辅因子以及向染色质编码提供信号<sup>[26]</sup>。与全基因组 DNA 甲基化研究不同的是，大多数组蛋白研究集中于检测软骨发育和/或 OA 中单个酶的功能。染色质免疫沉淀测序（chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq）在全基因组水平上描述组蛋白修饰具有可行性，但在 OA 中尚未见到广泛报道。虽然关节软骨细胞的染色质状态已经被绘制出来，但是其在疾病过程中的动态变化还不清楚<sup>[27]</sup>。

组蛋白乙酰转移酶（histone acetyltransferases, HATs）介导的乙酰化和组蛋白去乙酰化酶（histone deacetylases, HDACs）介导去乙酰化之间的平衡调节着组蛋白的乙酰化状态。需要说明的是，许多 HATs 和 HDAC 还有其他底物，比如转录因子<sup>[28]</sup>。因此，敲除编码 HDACs 或 HATs 的基因以及药物干预编码蛋白质后观察到的表型变化不能完全归因于组蛋白乙酰化的改变。与 HATs 相比，HDACs 在关节生物学中的作用研究更多。组蛋白去乙酰化通常与转录抑制有关，并由几类 HDACs 催化<sup>[29]</sup>。许多 I 类和 II 类 HDACs 与软骨发育有关，例如，敲除 HDAC3、HDAC4、HDAC5 或 HDAC7 可破坏小鼠的软骨内骨化<sup>[30-35]</sup>。其中一些 HDACs 在 OA 的体外实验中也得到了验证。例如，HDAC4 抑制对软骨细胞肥大很重要的 runt 相关转录因子 2（runt-related transcription factor 2, RUNX2）并且 RUNX2 在 OA 患者软骨细胞中介导的 MMP13 表达<sup>[36]</sup>。然而，这些蛋白在 OA 模型中的体内功能尚不清楚，需要进一步研究。HDAC 抑制剂作为治疗 OA 的潜在可能药物已经开展研究，其机理是 HDAC 抑制剂通过抑制编码基质降解蛋白和促炎症介质的基因的表达<sup>[37,38]</sup>。然而，因为非特异性 HDAC 抑制可能导致 RUNX2 激活和软骨细胞肥大，所以

应谨慎对待 HDAC 抑制剂的潜在应用时价值。

Sirtuins (SIRT) 是 III 型组蛋白去乙酰化酶。特别是 SIRT1 在关节生理学中的作用已经被广泛研究。SIRT1 是维持软骨内稳态所必需的<sup>[39-41]</sup>，包括通过调节软骨细胞中线粒体的生物合成<sup>[42]</sup>。实际上，OA 患者的软骨细胞线粒体生物生成能力降低，而激活含有 SIRT1 的途径可以在体外逆转这种表型<sup>[42]</sup>。同样，SIRT3 缺陷小鼠出现与氧化应激增加有关（提示线粒体功能障碍）的自发性老年性 OA<sup>[43]</sup>。缺失 SIRT6 的小鼠会导致软骨发育紊乱<sup>[44]</sup>，而 SIRT6 的大量表达可以防止手术诱导的 OA<sup>[45]</sup>。同样，人软骨细胞中 SIRT6 缺失导致细胞衰老和基质降解蛋白酶（MMP1 和 MMP13）表达增加<sup>[46]</sup>。总之，这些研究明确表明组蛋白去乙酰化（扩展到组蛋白乙酰化）在联合发育、内环境稳定和退化中具有至关重要的作用。

在首次研究组蛋白甲基转移酶基因 DOT1L 和 OA 之间的遗传关联<sup>[47]</sup>以及随后 DOT1L 在 OA 小鼠模型中的功能研究之后<sup>[48,49]</sup>，组蛋白甲基化在 OA 病理学中的作用引起了广泛关注。这些研究将在后面的章节中详细讨论，表明这种酶在 OA 中包括抑制软骨细胞肥大在内起保护作用。同样，小鼠组蛋白甲基转移酶 ESET 的缺失导致生长板软骨细胞和关节软骨细胞的肥大分化加速，表明了两种细胞类型调控机制的重叠作用<sup>[50]</sup>。缺乏介导组蛋白 H3 中赖氨酸 27 三甲基化（H3K27；抑制性组蛋白标志物）的 EZH1 和 EZH2 的小鼠，其生长板发育受损<sup>[51]</sup>，药物抑制 EZH2 后减缓了小鼠前交叉韧带横断引起的 OA 进展<sup>[52]</sup>。抑制组蛋白去甲基化酶 KDM6B（也称为 JMJD3）也会损伤软骨发育并加速小鼠内侧半月板失稳性引起的 OA<sup>[53,54]</sup>。如上所述，对于 HATs 和 HDACs，这些发现提示组蛋白甲基转移酶和去甲基酶也有非组蛋白底物，其调节可能与某些表型有关。

现有的证据明确表明多种组蛋白修饰蛋白在关节发育和稳态中的重要作用。然而，仍需要大量研究以明确其在关节中的特异性作用以及发现治疗干预靶点。在发育和疾病过程中需要多种组蛋白修饰的综合图谱。此外，与上述探讨的 DNA 甲基化一样，这些研究大都是基于软骨上进行，而对其他组织成分的研究很有限（方框 1）。

**非编码 RNA。**非编码 RNA 包括 miRNAs 和长链非编码 RNA（Long noncoding RNAs, lncRNAs）提供了基因表达的另一个表观遗传学调控水平。过去十年中 miRNAs 在

关节及 OA 领域有很大的发展, 自 2009 年以来已发表超过 450 篇论文。miRNAs 作为 OA 的致病因子、治疗靶点或药物以及潜在的生物标志物正在积极研究中。这个方向在其他很多综述中已做阐述<sup>[55-57]</sup>, 本文不再赘述。总之, 大量证据有力支持许多 miRNAs 在关节发育、衰老和疾病、保护和分解代谢以及所有关节组织中的重要功能。OA 中一些重要的 miRNAs, 如 miR-455 和 miR-140, 将在后面的部分讨论。

相比之下, lncRNAs 的研究远远少于对 miRNAs 的研究, 特别是在体内研究中, 物种间 lncRNAs 的保守性较差。2019 年发表的一项描述基因间 lncRNAs 表达特征的研究发现, 健康人群和 OA 患者的软骨中几乎有 200 个 lncRNAs 存在差异表达<sup>[58]</sup>。另一项研究集中分析 OA 患者和健康人的滑膜基因表达, 并确定了 17 个差异表达的 lncRNAs<sup>[59]</sup>。其中许多 RNA 的功能尚不清楚。然而, 予以 lncRNA HOTAIR 可以诱导大鼠 OA 的表现<sup>[60]</sup>, 而另一种 lncRNA, lncRNA HIT 通过促进组蛋白乙酰化诱导小鼠骨骼发育过程中需要软骨形成<sup>[61]</sup>。此外, 仅在软骨中表达的 lncRNA ROCR 通过控制 SOX9 的表达来调节软骨形成(在后面的章节中阐述); 尽管 ROCR 在成人软骨中表达并且在 OA 中差异表达, 但这种 lncRNA 在成人组织中的功能作用仍有待确定<sup>[62]</sup>。总的来说, 这些数据表明 lncRNAs 在关节的发育和疾病中都有重要的作用, 但这一领域还处于非常早期的阶段, 需要不断地深入研究。

**染色体的三维结构。** 染色体并非无序地分布在整个细胞核中, 而是以一种高度有序和动态的形式存在的<sup>[63-65]</sup>。这种高度调控的空间组织控制着诸如增强子与启动子的相互作用、相邻基因与增强子或沉默子互不影响以及共同调控基因在细胞核亚区内的共同定位等特征。染色体组织在细胞分化和疾病过程中发生变化, 但没有研究发现 OA 或软骨发育本身具有这种变化。然而, 有一些研究涉及肢体发育过程中的染色体组织对关节的形成和功能有直接的影响。在小鼠肢体间充质中, 转录抑制因子 CTCF (控制染色体组织的一个重要因子) 的缺失导致前肢完全缺失和后肢严重缺失<sup>[66]</sup>。一系列具有里程碑意义的研究表明, 破坏正常的基因组组织可以导致人类和小鼠的肢体畸形<sup>[67,68]</sup>。虽然目前还没有证据表明基因组结构的破坏对 OA 的影响, 但染色体的 3D 结构在老化过程中发生了变化是合理的。这种变化可能使增强子和启动子之间产生新的相互作用,

并改变促进疾病发展的基因表达。因此, 有新证据表明 3D 染色质组织在基因表达、组织发育和疾病的调控中具有重要作用, 这一过程可能参与 OA 的发病机制(方框 1)。

### OA 的遗传 – 表观遗传相互影响

**OA 相关 SNPs 和 mQTLs。** 确定特定疾病相关 SNPs 与 DNA-CpG 甲基化模式 [称为甲基化数量性状位点 (methylation quantitative trait loci, mQTLs)] 之间的相关性有助于确定常见疾病遗传风险位点的效应基因和调控元件的优先级<sup>[69]</sup>。这类分析有助于解读 GWAS 数据, GWAS 数据经常显示复杂的基因丰富位点与疾病发病之间并没有显著关联。mQTL 以疾病的普遍性状做分析, 例如分析 OA 关节软骨的 DNA 表达<sup>[12,54,70-72]</sup>。

到目前为止, 研究已经确定软骨中的 DNA-CpG 甲基化与 OA 相关 SNPs 的基因型有 18 个相关基因位点<sup>[12,70,71,73,74]</sup> (表 1)。一个典型的例子就是由 SNP rs10948172 标记的位于染色体 6p21.1 上的 OA 风险基因位点 (图 1)。该 SNP 标记了一个仅包含两个基因的拓扑结合域 (topologically associating domain, TAD), 编码 HAT 酶的 *SUPT3H* 基因和编码软骨内骨化和成骨细胞分化所必需的转录因子的 *RUNX2* 基因。通过对包括软骨在内的关节的不同组织成分中的风险位点进行分析后确定了一个 572 bp 的差异性甲基化区域 (Differentially methylated region, DMR), 位于两个基因的上游 82 kb 处。在这个 DMR 中, CpGs 的 DNA 甲基化水平与 rs10948172 的基因型相关, OA 风险 G 等位基因的 DNA 甲基化水平低于非风险 A 等位基因<sup>[71]</sup> (图 1)。另外, *RUNX2* (而非 *SUPT3H*) 的表达与 DMR 内 CpG 的甲基化相关, 这标志着甲基化和表达数量性状位点 (methylation and expression quantitative trait locus, meQTL)<sup>[71]</sup>。最后, CRISPR-Cas9 切除了 Tc28a2 永生软骨细胞基因组中的 DMR 导致 *RUNX2* P1 亚型的表达增加了四倍, 但对其他测定转录物的表达没有影响<sup>[71]</sup>。这一发现证实了 *RUNX2* 是染色体 6p21.1 上 OA 相关 mQTL 的靶基因 (参考文献<sup>[71]</sup>), 在 OA 病因学的背景下特别值得注意, 因为已知 *RUNX2* 在 OA 软骨中上调并促进软骨细胞肥大, 这是该疾病的普遍特征<sup>[73,74]</sup>。这些 OA mQTL 分析显示了在 OA 病因背景下已知或可能相关的基因的优先顺序, 包括 *PLEC*、*ALDHIA2*、*GDF5*、*MGP*、*COLGALT2* 和 *COL11A2*, 通过对 OA 相关调控元件的鉴定, 其中有几个已经进行了下游功

表 1 mQTL 分析: CpG 甲基化相关的 OA 相关 SNP

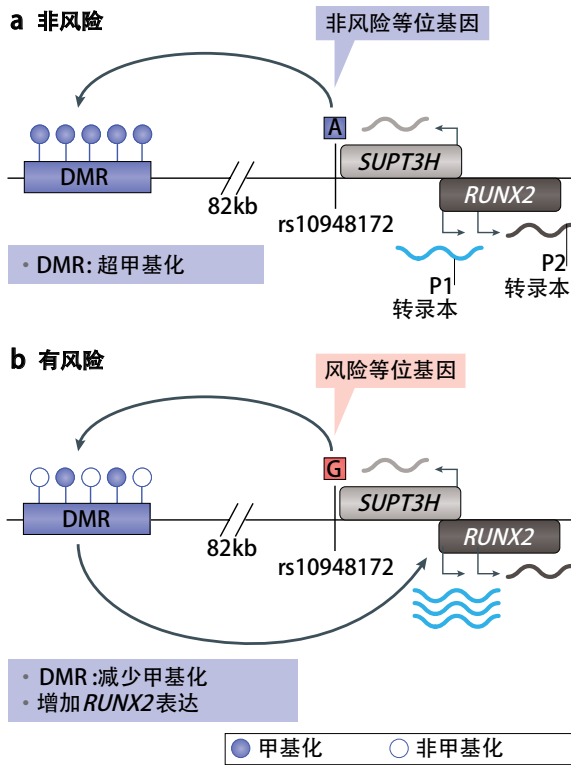
OA- 相关 SNP	CpGs	可能靶基因	编码蛋白的功能	参考文献
rs6976	cg18099408 cg15147215 cg18591801	<i>GNL3</i>	基因表达调控因子	70
rs10948172	cg13979708 cg19254793 cg20913747 cg18551225	<i>RUNX2</i>	骨骼发育转录因子	70,71
rs3204689	cg12031962	<i>ALDH1A2</i>	维甲酸合成酶	70
rs143383	cg14752227	<i>GDF5</i>	软骨生长因子	70
rs10471753	cg25008444	<i>PIK3R1</i>	磷脂酰肌醇合成酶	12
rs11780978	cg19405177 cg20784950 cg01870834 cg07427475 cg02331830 cg04255391 cg14598846 cg23299254 cg10299941	<i>PLEC</i>	组织完整性所需细胞骨架连接蛋白	12
		<i>GRINA</i>	离子型谷氨酸受体	12
rs4764133	cg20917083	<i>MGP</i>	软骨细胞分泌抑制异位钙化的钙结合蛋白	12
rs6516886	cg00065302 cg05468028 cg18001427 cg20220242 cg24751378 cg16140273	<i>RWDD2B</i>	相关报道有限	12
				72
				72
				72
				72
rs11583641	cg18131582	<i>COLGALT2</i>	翻译后修饰胶原蛋白酶	72
rs62182810	cg10114877	<i>NBEAL1</i>	相关报道有限	72
rs11732213	cg20987369 cg25007799	<i>FGFR3</i>	骨骼发育生长因子	72
rs9277552	cg02197634 cg25491704 cg13921245 cg02375585	<i>COL11A2</i>	软骨胶原	72
				72
				72
				72
rs60890741	cg18170545	<i>ASAP1</i>	细胞骨架重塑调节因子	72
rs317630	cg22375663	<i>CPSF1</i>	加工前 mRNAs 的切割和多聚腺苷酸化特异性因子( CPSF ) 复合物成分	72
rs35206230	cg20040747 cg10253484	<i>SEMA7A</i>	免疫调节膜糖蛋白	72
rs6499244	cg26736200 cg26661922	<i>NFAT5</i>	渗透保护和炎症基因转录调控转录因子	72
		<i>WWP2</i>	WWP2 是一种参与蛋白泛素化的 E3 泛素蛋白连接酶。WWP2 也是 miR-140 的宿主基因, 参与基因表达的调控	72
rs2953013	cg16779580	<i>RAB11FIP4</i>	调节细胞分裂	72
rs62063281	cg17117718 cg10826688 cg15295732 cg11117266 cg16520312 cg18228076 cg01934064 cg15633388 cg23616531	<i>LRRc37A</i>	相关报道有限	72
		<i>CRHR1</i>	信号传导受体	72
		<i>MAPT</i>	Tau 蛋白参与神经元发育	72
		<i>KANSL1</i>	组蛋白乙酰转移酶复合体之一, 参与组蛋白乙酰化	72

CpG, 胞嘧啶 - 鸟嘌呤二核苷酸; mQTL, 甲基化数量性状位点; OA, 骨关节炎; SNP, 单核苷酸多态性。



能表征的验证<sup>[9,11,12,70,72,75]</sup>。在大多数情况下，mQTL 影响从染色质状态数据到作为增强子发挥功能的区域，将 OA 归于“增强子病”的常见疾病类别中<sup>[76]</sup>。

目前开展的 mQTL 分析突显的问题是检测的覆盖范畴很低，例如 HumanMethylation450 BeadChip 芯片 (Illumina, CA, USA) 及其后续研发的 MethylationEPIC BeadChip 试剂盒 (Illumina) 能够检测的范围分别约占人类表观基因组 2300 万个 CpG 的 1.6% 和 3.0%<sup>[77]</sup>。因此，与 OA 有关的 18 种疾病相关 MQTL 的报告 (表 1) 可能低于实际水平。将来对 OA 风险位点基因和相应调控元件的表观遗传学分析需要通过基于测序的技术测得的更全面的甲基化数据，包括增加表观基因组的覆盖率，这将提供更准确的 DNA 甲基化数据去分析 OA 差异性基因表达。



**图 1 OA 相关 mQTL 调控 RUNX2 的机制。**以单核苷酸多态性 (SNP) rs10948172 标记的骨关节炎 (OA) 风险位点包含两个基因: *SUPT3H* 和 *RUNX2*。基因 *RUNX2* 编码一种对骨骼健康发育和维持至关重要的转录因子，它有两个不同的启动子: P1, 产生 P1 转录本 (蓝色); P2, 产生 P2 转录本 (黑色)。P1 转录本因包含了一个额外的外显子所有比 P2 转录本 mRNA 分子更长。**a** 这个 SNP 中的 A 等位基因 (非风险等位基因) 与差异甲基化区域 (DMR) 内的远端胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸 (CpGs) (基因上游 82 kb) 的 DNA 超甲基化有关。**b** G 等位基因 (OA 风险等位基因) 与 DMR 内低甲基化水平相关, 也与 *RUNX2* P1 转录物的较高表达水平相关, 标记出 OA 相关的 meQTL。meQTL 值得注意的是, 因为 *RUNX2* 在 OA 患者的软骨中上调, 因此是 OA 中遗传和表观遗传相互作用的一个很好的事例。此图改编自参考文献<sup>[71]</sup>。CC BY4.0 协议 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)。

**OA 相关 SNPs 和组蛋白修饰物。** GWAS 确定了很多 OA 风险信号相关含有编码修饰人类表观基因组的蛋白质的基因 (表 2; 图 2)。包括编码蛋白质的基因, 这些蛋白质具有与组蛋白修饰相关的一系列不同功能, 包括赖氨酸甲基化修饰、乙酰化状态修饰 [*PHF2* (参考文献<sup>[78]</sup>)、*PRDM9* (参考文献<sup>[10]</sup>) 和 *DOT1L* 参考文献<sup>[47,49]</sup>) 乙酰化状态修饰 (*SUPT3H*<sup>[4, 4.10, 47, 79, 80]</sup>, *CITED2* (参考文献<sup>[79]</sup>), 组蛋白的 *NCOA3* (参考文献<sup>[78]</sup>) 和 *HMGN3* (参考文献<sup>[78]</sup>) ]。这些基因的差异表达可能改变染色质状态、下游基因的异常调节和增加患病风险。此外, OA 风险基因位点包含与组蛋白自身产生有关的基因, 即 *HIST1H2AC*<sup>[4]</sup> 和 *SLBP*<sup>[4, 79]</sup>。

关于 *NCOA3* 和 *DOT1L* 的研究不断深入以确定其在 OA 病理学中的功能作用。在 OA 患者的髌关节和膝关节软骨中的研究显示 *NCOA3* 等位基因表达不平衡, 这些 OA 患者具有疾病相关的 SNP rs6094710 杂合子, OA 风险等位基因与该基因表达降低相关<sup>[81]</sup>。免疫组化分析显示 *NCOA3* 在软骨内表达, 敲除人关节软骨细胞中的 *NCOA3* 基因导致合成代谢基因 *COL2A1* 的表达增加, 分解代谢基因 *MMP13* 和 *RUNX2* 的表达减少 (参考文献<sup>[81]</sup>)。 *DOT1L* 还具有完整的软骨保护功能<sup>[48]</sup>。 *DOT1L* 是唯一已知的介导组蛋白 H3 赖氨酸 79 甲基化的真核生物 H3K79 甲基转移酶<sup>[82]</sup>。在软骨的内稳态过程中, 软骨细胞内 *DOT1L* 的表达与 *SIRT1* 的抑制相关, 与介导 Wnt 信号通路细胞核反应的 *LEF1* 和 *TCF1* 基因启动子的 H3K79 甲基化相关。这两个基因的低水平转录让 Wnt 信号通路低水平活性以维持软骨内稳态<sup>[48]</sup>。相反, 软骨细胞内 *DOT1L* 的减少或缺失导致高水平的 Wnt 信号转导和软骨降解<sup>[48, 49]</sup>。值得注意的是, OA 患者的软骨细胞中 H3K79 甲基化水平低于健康人的软骨细胞, 小鼠中 *DOT1L* 活性的降低与年龄相关性 OA 和创伤后 OA 的进展增加有关<sup>[49]</sup>。综上所述, 这些研究为软骨细胞的染色质状态在健康关节软骨的发育和维持中的重要性提供了强有力的证据, OA 中染色质修饰的调节异常可导致软骨降解。

**OA 相关 SNPs 和非编码 RNAs。**许多 OA 风险基因位点包含非编码 RNAs, 包括位于蛋白质编码基因内含子中的 miRNA (称为 miRNA 宿主基因)。这些风险基因位点包括 *COL27A1* 和 *WWP2* 附近的位点, 分别是软骨特异性 miRNAs、miR-455 和 miR-140 的宿主基因 (表 2)。

表 2 编码表观基因组调控子的基因组区域中 OA 相关的 SNP

SNPs	可能靶基因	编码蛋白质或 RNA 分子的功能	参考文献
rs12551314	<i>PHF2</i>	去甲基酶组蛋白	78
rs1494593	<i>PRDM9</i>	组蛋白甲基转移酶	10
rs12982744	<i>DOT1L</i>	组蛋白甲基转移酶	47,79
rs11880992			
rs12154055	<i>SUPT3H<sup>a</sup></i>	组蛋白乙酰转移酶	4,10,47, 79,80
rs7770034			
rs10948155			
rs10948172			
rs7739938	<i>CITED2</i>	组蛋白乙酰转移酶的联合激活剂	79
rs6094710	<i>NCOA3</i>	组蛋白乙酰转移酶	78
rs1577792	<i>HMGN3</i>	组蛋白乙酰化	78
rs115740542	<i>HIST1H2AC</i>	组蛋白	4
rs11732213	<i>SLBP<sup>a</sup></i>	调节组蛋白 mRNAs 转录的 RNA 结合蛋白	4,79
rs2236995			
rs1078301	<i>COL27A1<sup>a</sup></i> (miR-455 宿主基因)	软骨结构元件的 XXVII 型胶原 ( COL27A1 也含有参与	3,4
rs919642		基因表达调控的 miRNA miR-455 )	
rs34195470	<i>WWP2<sup>a</sup></i> (miR-140 宿主基因)	参与蛋白泛素化的 E3 泛素蛋白连接酶 ( WWP2 具有基	3,4
rs6499244 <sup>b</sup>		因表达调控的 miRNA miR-140 )	
rs17659798	<i>MIR8068</i>	基因间 miRNA 参与基因表达调控	4
rs11105466	<i>LINC02399</i>	基因间 lncRNA 参与基因表达调控	4

lncRNA, 长非编码 RNA; miRNA, 微小 RNA; OA, 骨关节炎; SNP, 单核苷酸多态性。<sup>a</sup> 据报道 SUPT3H, SLBP, COL27A1 和 WWP2 上存在独立的关联信号, 这可能表明多个风险位点作用于这些基因。<sup>b</sup> 该 SNP 位于 NFAT5 的 3' 非翻译区 ( UTR )。

宿主基因的表达和相对应的这两种 miRNA, 有很强的相关性<sup>[83,84]</sup>。2019 年发表的一项转录组分析发现 OA 软骨中 *COL27A1* 或 *WWP2* 等位基因表达失衡<sup>[7]</sup>; 然而由于没有具体分析 miRNA 的表达, 因此这些 OA 相关的 SNPs 是否也影响 miRNA 的表达尚不清楚。

OA 相关的 SNPs 位于 *COL27A1* 基因的启动子内<sup>[4]</sup>。编码软骨中胶原蛋白 *COL27A1* 的突变与一种罕见孟德尔遗传病 -Steel 综合征的发病有关, 这种疾病会骨骼发育异常, 表现为身材矮小和髌关节病变<sup>[85,86]</sup>。同样, *Col27a1* 编码序列缺失的小鼠也会发生严重的软骨发育不良<sup>[87]</sup>。值得一提的是, 6 个月大的 miR-455 敲除鼠出现早期 OA 样疾病的迹象, 在较薄的关节软骨中存在肥大的软骨细胞; 然而, 还需要对这些小鼠进行更详细的表型分析<sup>[88]</sup>。因此, 还需要进一步的研究来确定 *COL27A1* 启动子内 OA 相关的 SNPs 是否可能通过影响 *COL27A1*、miR-455 或两者的表达来发挥作用。

源于英国生物库 ( UK Biobank ) 的数据与冰岛队列的

GWAS 研究发现 *WWP2* 的多态性与软骨厚度<sup>[7]</sup> 和 OA 相关<sup>[3]</sup>。有趣的是, 汇集了 UK Biobank 和英国关节炎遗传学协会 ( Arthritis Research UK Osteoarthritis Genetics, arcO-GEN ) 的第二项 GWAS 数据<sup>[4]</sup> 也发现同一染色体区为 OA 易感位点; 然而, 前哨 SNP ( rs6499244 ) 位于 *NFAT5* 的 3' UTR 位置, 距离 *WWP2* 关联信号 rs34195470 约 220kb ( 参考文献<sup>[3]</sup> )。这两个 OA-GWAS SNPs 处于低连锁不平衡 (  $r^2$  0.22 ) 表明与 OA 单独相关。尽管 *NFAT5* 既往只与炎性关节炎有关, 但两个基因都与关节炎有关<sup>[89]</sup>。有趣的是, rs34195470 位于全长 *WWP2* 的内含子 10 内。这个内含子包含 *WWP2* ( *WWP2-C* ) 和 miR-140 ( 参考文献<sup>[90]</sup> ) 的启动子, 这可能表明 *WWP2* 转录物被加工成 miR-140。有趣的是, 尽管 *WWP2* 中的几个转录物 SNPs 显示软骨中的等位基因表达不平衡, 但疾病相关最相关信号来自 *WWP2-C*/miR-140 转录物亚型中的 SNPs<sup>[7]</sup>。

最早的研究发现 *Wwp2* 缺失的小鼠与身形矮小和颅面短小有关<sup>[91]</sup>, 但在之后的 *Wwp2* 缺失小鼠研究中未能复制

这种颅骨表型<sup>[92-94]</sup>。miR-140 缺失鼠也呈现身材矮小和颅面短小的表型<sup>[95]</sup>，值得注意的是，两个没有血缘关系的患者中也发现了这种 miRNA 的缺失<sup>[96]</sup>。miR-140 缺失小鼠或 *Wwp2* 缺失小鼠也会发生自发性 OA 样疾病，而 *Wwp2* 伴 miR-140 缺失小鼠的病情加重（参考文献<sup>[95,97]</sup>）。基于上述发现，需要进一步研究该区域内的 OA 易感位点是否通过调节 miR-140、*WWP2* 或两者的表达而导致疾病。

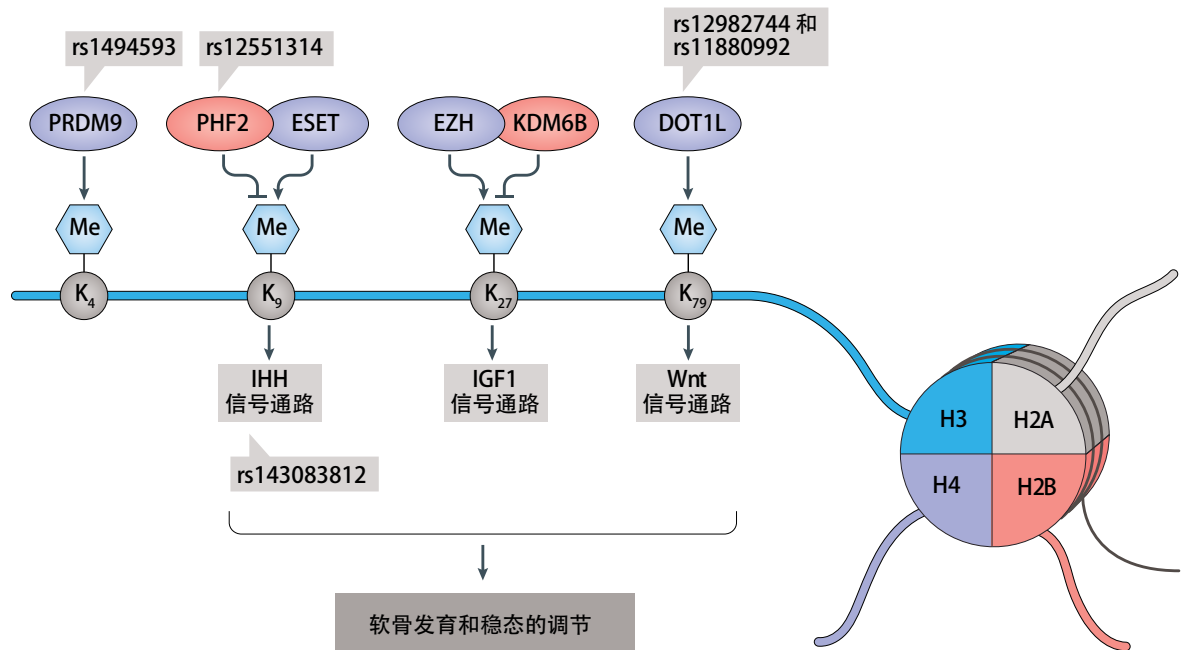
与膝关节 OA 相关的 SNP rs8067763 位于 *SOX9* 上游约 100kb 处<sup>[4]</sup>，*SOX9* 编码对骨骼发育重要的转录因子。在骨骼发生过程中，*SOX9* 能部分调节软骨细胞成熟过程，从静止的软骨细胞到增殖的软骨细胞，再到增生前的软骨细胞，最后被骨替代<sup>[98]</sup>。很多增强子能调控 *SOX9* 何时和组织特异性表达，这些增强子的染色体畸变可导致骨骼发育障碍和染色体发育不良<sup>[99]</sup>。有趣的是，尽管 *SOX9* 位于“基因沙漠”区域中，但 rs8067763 与软骨特异性 lncRNA ROCR 非常接近。ROCR 的缺失阻止了间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）向软骨细胞的分化，其机制涉及抑制 *SOX9* 的表达<sup>[62]</sup>。ROCR 是否调控成年软骨中基因的表达有关仍有待阐明；然而该区域的 SNPs 也与

髌部的形状和大小有关<sup>[100]</sup>，尤其是与转子间的区域有关<sup>[5]</sup>。鉴于在软骨中发挥部分功能，转录因子 *SOX9* 也参与调节 miR-140 的表达（参考文献<sup>[84]</sup>），其本身也直接调节（如 HDAC4（参考文献<sup>[101]</sup>）和 ADAMTS5（参考文献<sup>[95]</sup>））和间接调节（如 MEF2C<sup>[102]</sup>，参与软骨发育和/或内稳态的成分的 RUNX2（参考文献<sup>[10]</sup>）和 MMP13（参考文献<sup>[103]</sup>）（图 3）。

一些 OA 易感基因位点也位于其他潜在重要的非编码 RNA 附近，包括 miR 8068 和 lncRNA LINC02399（参考文献<sup>[4]</sup>）。这些非编码 RNA 在 OA 病理生理学中的作用值得进一步研究。

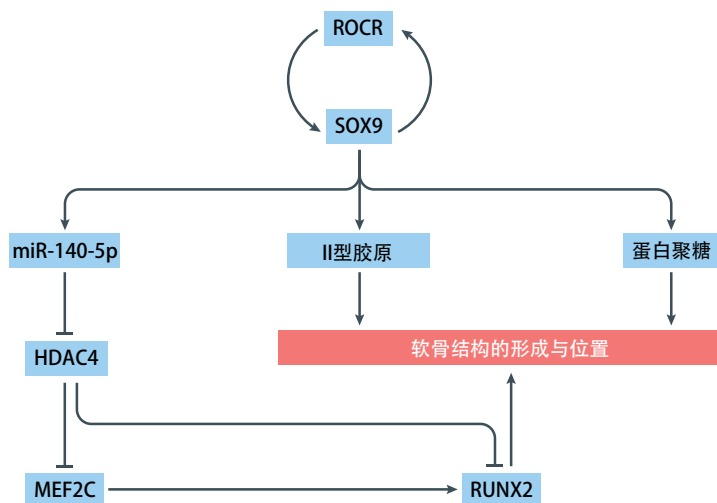
新兴研究领域

OA 风险基因位点和表观遗传学之间功能和机制相互作用的研究不断涌现。这些相互作用的基因和调控 RNA 已经在本综述的前面章节中讨论了。一个很好的例子是 *SOX9*、ROCR、miR-140 和 *RUNX2* 之间的相互作用（图 3）。研究人员还需要进行更大规模和更全面的研究去验证这些效应并发现 OA 遗传学和表观遗传学之间的新联系。例如，

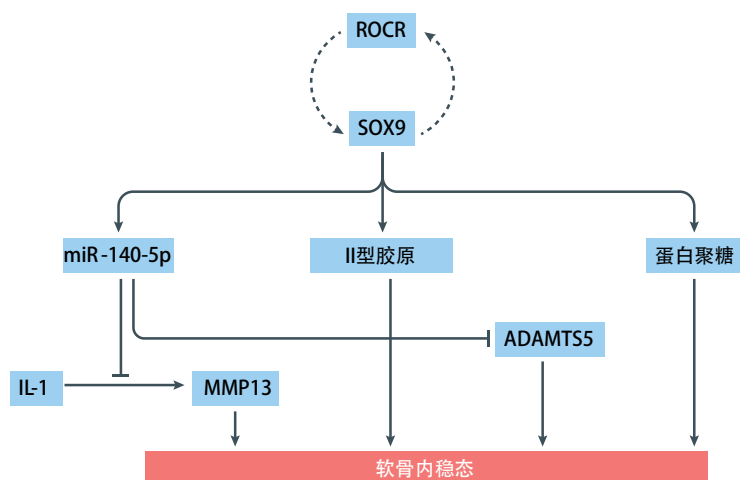


**图 2 组蛋白修饰物参与软骨发育和稳态。**染色质的基本元素是主要由组蛋白组成的核小体。核小体包含八个核心组蛋白：组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各两个。每个组蛋白都有一个可以通过翻译后氨基酸修饰 N-末端的尾部。这些修饰的组合构成了一个“组蛋白密码”，参与多方面细胞功能的调节。特定赖氨酸残基（K）可通过乙酰基（未显示）或甲基（Me）的酶促加成来修饰，后者可涉及单甲基、二甲基或三甲基的加成（为简单起见，图中未描绘）。酶可以去除这些修饰，在甲基化的情况下由去甲基酶完成。无论是在基因上还是在功能上，许多负责增加或去除这些组蛋白修饰的酶与 OA 或软骨发育有关。例如，甲基转移酶 PRDM9（参考文献<sup>[10]</sup>）、ESET50、EZH1（参考文献<sup>[51,52]</sup>）、EZH2（参考文献<sup>[51,52]</sup>）和 DOT1L<sup>[47,79]</sup> 在组蛋白 H3 的指定位置将甲基转移到赖氨酸残基，而组蛋白去甲基酶 PHF2（参考文献<sup>[78]</sup>）和 KDM6B<sup>[53,54]</sup> 从赖氨酸残基移除甲基。组蛋白修饰的效应可能很广泛，但新的证据表明组蛋白修饰物可以影响许多细胞途径，包括 Wnt 信号通路，胰岛素样生长因子 1 信号（IGF1）和 Indian hedgehog（IHH）信号通路，由于途径对软骨发育和内环境稳定都很重要，所有这些都影响 OA 的遗传易感性<sup>[3,47-49]</sup>。这些途径也直接受到遗传多态性的影响。Rs 值表明 GWAS 识别的信号影响这些表观遗传修饰子或通路的表达。

## a 软骨形成



## b 关节软骨内部



**图 3** *SOX9*、*ROCR*、*miR-140* 和 *RUNX2* 在软骨形成和关节软骨稳态期间的相互作用。**a** 在软骨形成过程中，长非编码 RNA (lncRNA) *ROCR* 调控 *SOX9* 的表达，*SOX9* 对 *ROCR* 的表达起交互调节作用。*SOX9* 是软骨生成的关键转录因子，能够促进许多基质基因如包括 *COL2A1* 和 *ACAN* 的表达，二者分别编码软骨的主要结构蛋白 II 型胶原和蛋白聚糖。*SOX9* 还促进一种间接影响 *RUNX2* (编码一种对软骨细胞肥大很重要的转录因子) *miR-140* 的表达。*miR-140* 介导的 *RUNX2* 调控可能通过抑制 *HDAC4* 表达而发生，因此这种 *miRNA* 从多方面参与软骨内骨的形成。**b** 在软骨内稳态中，合成代谢反应 (如产生 II 型胶原和蛋白聚糖) 和分解代谢反应 (如聚蛋白聚糖酶和胶原酶分解软骨结构，如 *ADAMTS5* 和 *MMP13*) 的平衡有助于维持关节软骨稳态。尽管成人软骨中表达 *ROCR*，并在 OA 中表达存在差异，但该 lncRNA 在成人组织中的功能作用仍有待确定，假设该 lncRNA 控制 *SOX9* (虚线) 的表达，进而调节 *miR-140* 的表达。*miR-140* 的优势链 *miR-140-5p* 抑制 *ADAMTS5* 的表达，也抑制 *IL-1* 介导的 *MMP13* 表达上调。OA 中软骨的丢失通常是这些环节失衡所介导的，促进了软骨的破坏。值得注意的是，*miR-140-5p* 在 OA 软骨中表达下调。这些数据多从动物实验中获取，人体组织学样本有待进一步研究。

甲基化分析尚需要检测大量患者以验证 mQTLs 在所有风险等位基因表达。使用互补的基因组技术将势在必行，以最大限度地解读 OA 表观遗传学数据。

在最后一节中，我们将探讨四个正在疾病中研究令人为之振奋的新兴研究领域。

**循环调节 RNA 和细胞外囊泡。**虽然大多数的遗传学和表观遗传学的研究都集中在基于组织的表达谱上，OA 通常是软骨中的表达谱，但是研究循环 RNA，特别是存在于体液 (如血清和血浆) 中的 *miRNA* 的研究不断增加。这些循环 RNA 存在于循环的细胞外囊泡和外泌体中，或与 *miRNA* 介导沉默的关键效应蛋白 Argonaute 形成复合物<sup>[104]</sup>。这种循环 RNA 是疾病或疾病状态下的潜在生物标记物，同时具有治疗潜力。例如，药物抑制非人灵长类动物 *miR-122* 可以长期抑制丙型肝炎病毒<sup>[106]</sup>。尽管有人认为循环 RNA 在细胞间通讯中具有“激素样”功能，但其功能尚不清楚<sup>[107]</sup>。因此，许多研究检测了 OA 患者血清或血浆中循环 *miRNAs* 的表达；然而，这些研究大多存在局限性，包括患者的样本过少<sup>[108-111]</sup>，并且还没有统一的能够预测疾病的发生或进展 *miRNAs*。尽管如此，这些研究具有局限性但也表明这一领域具有潜力，如在骨关节炎促进项目 (Osteoarthritis Initiative, OAI) 等在更大和更具表征的队列中进行 *miRNA* 基因图谱筛查。循环 *miRNAs* 的定量和标准化仍然具有挑战性，借助液滴数字 PCR 技术可以提供向临床诊断转化的方法。

细胞外囊泡可以将药物送达至靶细胞和组织发挥治疗作用。虽然机制尚不明确，MSC 衍生的外泌体可以在各种细胞损伤模型中发挥保护作用。在大鼠骨软骨缺损模型中，人胚胎来源的 MSC 衍生的外泌体能够修复软骨和软骨下骨<sup>[113]</sup>。还可以对外泌体进行修饰以提高疗效，例如，注射从人滑膜间充质干细胞分离的外泌体在修饰后过表达 *miR-140-5p* (*miR-140* 的显性链) 能显著降低 OA 大鼠模型疾病的严重程度<sup>[114]</sup>。因此，无细胞囊泡作为未来的生物标志物和治疗策略具有很大的潜力，但后者尤其需要进一步的研究和标准化。

**软骨染色质前景。**尽管 DNA 甲基化研究已经证明有助于识别在疾病或健康期间软骨中差异甲基化的基因或基因组区域，但实际上，基因表达很少与启动子区域 DNA 甲基化的改变相关。事实上，基因表达的组织和 / 或细胞类型特异性似乎受到增强子的调控<sup>[115]</sup>，在健康和疾病状态下，在软骨物质中观察到差异甲基化 CpG 的富集<sup>[116]</sup>。此外，如上所述，软骨中许多 OA 相关的 mOTLs 定位于预期作为增强子发挥作用的区域。然而，我们目前对关节软骨细胞中活性增强子的认识仍然非常有限，因此应该优先考虑这方面的研究。激活增强子能促进染色质修饰



## 方框 2 染色质转座酶可及性测序分析 (ATAC-seq)

转录因子获取基因组的短片段在基因调控中可能很重要。染色质转座酶可及性测序分析 (ATAC-seq) 是一种新研发用于识别转录因子可及的染色质区域的全基因组方法。尽管有其他技术比 ATAC-seq 更详尽地测量染色质, 但 ATAC-seq 相对简单以及所需的生物样品少 (通常只有 50,000 个细胞) 的特点使其迅速成为表观遗传学和基因组调控研究的标准工具。为此, ATAC-seq 分析已被用于研究细胞分化和发育研究中的一些染色质相关特征<sup>[138]</sup>, 以及包括癌症<sup>[139]</sup> 和 OA<sup>[119]</sup> 在内的疾病。在 ATAC-seq 中, 把细胞核从细胞中分离出来, 并用改良转座酶短暂孵育。这种转座酶在开放的染色质区域切割可接近的 DNA, 同时在切割位点添加特定的 DNA 寡核苷酸, 这一过程称为标记<sup>[137]</sup>。数千个 DNA 寡核苷酸标记的基因组区域通过 PCR 扩增并测序。应用一系列的生物信息学工具来绘制这些区域相对富集而形成了峰值的图谱。在确定这些峰值之后, 可以使用计算轨迹方法来识别可能促进细胞特异性或疾病活动的富集转录因子的结合位点。ATAC-seq 操作程序简单易行, 也使得它成为在单细胞水平上检测染色质状态的首选方法。在单细胞分析中, 使用 ATAC-seq 数据来定义增强子比单独使用 RNA 表达数据能更好地进行细胞分类<sup>[140]</sup>。在单细胞水平上改进染色质修饰图谱的技术正在迅速崛起<sup>[141]</sup>。

H3K4 甲基化结合 H3K27 乙酰化<sup>[117]</sup>。运用 ChIP-seq 技术, 这些联合修饰已被用于定义参与 MSCs 软骨形成的增强子<sup>[118]</sup>, 以及定义成人软骨细胞的表观基因组包括活性增强子, 尽管这些发现是在早期骨骼发育的背景下进行的<sup>[27]</sup>。增强子活性与开放的染色质区域相关, 使转录因子结合从而调节基因表达。因此, 研究人员可以使用一种比 ChIP-seq 更简单的技术, 即通过测序 (ATAC-seq; 方框 2) 分析转座酶可及的染色质, 从而在全基因组范围内定位这些开放的染色质区域。例如, 一项研究运用 ATAC-seq 技术比较 OA 患者的完整软骨和受损软骨以确定不同基因组的区别<sup>[119]</sup>。这些区域富含潜在的增强子、差异甲基化位点和 GWAS 鉴定的几个 OA 相关 SNP。

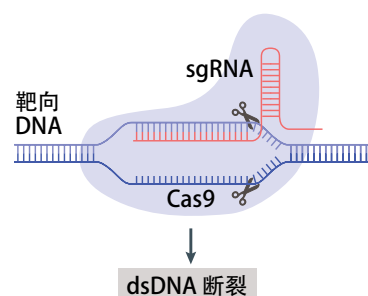
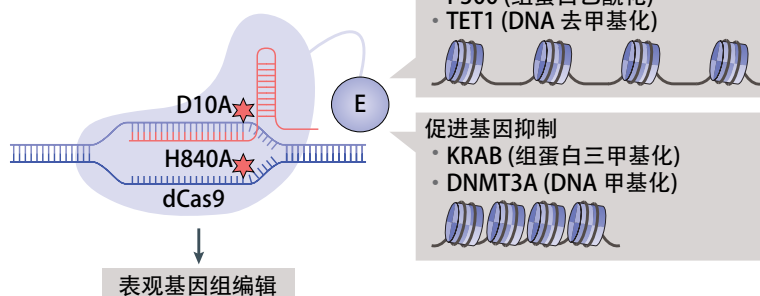
最后, 尽管在确定参与骨骼组织发育和内环境稳定的增强子方面取得了进展, 但确定这些增强子调控哪些基因还是存在问题的, 许多这样的分析依赖于研究与最近基因的关联。然而, 由于先前描述的染色质的复杂三维结构, 增强子可以远离其目标基因, 绕过干预基因并可能通过“环”与基因相互作用。基本上基于染色体构象捕获 (chromosome conformation capture, 3C) 技术变化的一系列技术可用于确定调控元件与基因的空间接近性<sup>[120]</sup>。尽管这种增强子-基因的相互作用通常是从研究良好的模型细胞系统中估算出来的, 但这种相互作用是时空依赖的, 因此应该在目标细胞或组织中检测。这种分析已成功应用于肢体发育研究中, 但目前在 OA 研究领域尚很缺乏<sup>[67,68]</sup>。很有必要在疾病早期、发育过程中以及软骨以外

的组织中绘制动态染色质图谱。

**表观遗传标志物调控。**古菌和细菌基因组中以及组成原核适应性免疫系统的 CRISPR 相关蛋白的发现是分子遗传学领域的一个革命性突破。CRISPR-Cas9 现在为哺乳动物基因组的精确编辑提供了一个不可或缺的工具。由于其成本效益、有效的靶向性和易于编程的特性, 该技术已经成为基因编辑技术的金标准, 在很大程度上取代了更成熟的技术, 如锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)。一些已发表的研究主要通过 CRISPR-Cas9 直接敲除相关基因或删除其调控元件来研究软骨发生和软骨细胞病理生物学功能<sup>[71,121-123]</sup>。

在 CRISPR-Cas9 的发现之后, Cas9 蛋白被重新利用以产生融合到多种效应元件的催化死亡结构 (dCas9)。这种方法能够有针对性地编辑表观基因组和直接激活或抑制基因表达 (图 4)。KRAB (Krüppel-associated box, KRAB) 能靶向引起 H3K9 三甲基化进而抑制转录<sup>[124]</sup>。运用 dCas9-KRAB 靶向编码促炎细胞因子受体 (如 TNFR1 和 IL-1R1) 的基因的启动子区域, 能够让人类永生脂肪源性干细胞中基因表达减少高达 90% 并导致蛋白质表达显著减少<sup>[125]</sup>。TNF 或 IL-1 $\beta$  是一种能导致软骨破坏的细胞因子, 通过编辑该细胞, 敲除 TNF 或 IL-1 $\beta$  后产生保护作用<sup>[125]</sup>。随着这些技术的不断优化和发展, 它们将有助于阐明表观基因组在维持健康软骨细胞和在软骨中的作用。在短期内, 这些工具将有助于建立疾病模型以便更好地了解潜在的病因。重要的是, 该领域正朝着个性化治疗和疾病修饰方向发展, 基因组和表观基因组修饰可用于通过改变个体软骨细胞内 OA 相关 SNP 来设计“增强”软骨, 并用于靶向表观基因组编辑以优化表观基因组。

**单细胞分析。**单个 OA 组织转录组数据提供了一系列具有差异表达基因和通路。数据门户 SkeletalVis 集成了这些数据集, 为骨骼转录组学数据提供了一个探索和比较的平台<sup>[126]</sup>。尽管信息量很大, 但是这些转录组数据集是大量细胞的平均表达信号。相比之下, 单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 着眼于单个细胞, 可以识别新的细胞群, 揭示基因之间的调控关系, 跟踪不同细胞谱系在发育过程中甚至在疾病中的轨迹<sup>[127]</sup>。在软骨发育方面, scRNA-seq 有助于识别自我更新和多潜能的

**a CRISPR-Cas9 系统****b 表观基因组编辑系统**

**图 4 CRISPR-Cas9 系统：表观基因组调控的再运用。** **a** CRISPR-Cas9 系统最初用于多种细菌和古细菌的研究以及作为基因编辑工具。Cas9 蛋白通过一个定制的单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 靶向基因组的特定区域，两个 Cas9 核酸酶结构域 (RuvC 和 HNH) 在靶位点启动 DNA (dsDNA) 的双链切割。**b** 催化失活 (catalytically dead, dCas9) 系统在核酸酶结构域中有两个突变 (RuvC 中的 D10A 和 HNH 中的 H840A) 以去除 Cas9 的内切酶活性。dCas9 蛋白作为 DNA 结合域发挥作用，可以与效应蛋白 (E) 共价结合以调节靶区的表观基因组。各种效应因子可以促进靶基因的激活或抑制。DNMT3A, DNA 甲基转移酶 3a; KRAB, KRAB 结构域; P300, 组蛋白乙酰转移酶 P300; TET1, 甲基胞嘧啶双加氧酶 TET1; VP64, 病毒蛋白 64; VPR, 由 VP64、转录因子 p65 和复制和转录激活子 (RTA) 组成的第二代激活域。

人类骨骼干细胞，这些细胞产生除脂肪以外的骨、软骨和基质的祖细胞<sup>[128]</sup>。这些干细胞存在于成骨中，在骨骼损伤后导致扩张从而诱导再生。同样的干细胞也可以从脂肪基质中获得，这表明脂肪来源的干细胞可以用于退行性骨骼疾病的细胞治疗。就成人软骨而言，使用 RNA-seq 分析来自 10 例 OA 患者的 1464 个软骨细胞鉴定出 OA 关节软骨中的 7 个软骨细胞群<sup>[129]</sup>。此外，这种分析方法检测出软骨祖细胞、具有干细胞样再生能力的细胞的不同标记物<sup>[129,130]</sup>。根据疾病严重程度对患者样本进行分层，使研究人员能够预测哪些基因有助于 OA 的进展，并确定这些基因在哪些软骨细胞群中表达。随着目前 scRNA-seq 技术的快速发展，未来的研究可能会涉及更大的细胞数量以及转录组学和表观基因组学数据的结合，例如单细胞 ATAC-seq 分析<sup>[127,131,132]</sup>。虽然单细胞分析非常有用，但其破坏组织，如酶消化以分离得到单个细胞。然而，结合单细胞分析（或数据集）和空间转录组学可以为病理过程中发生的基因表达变化提供定位<sup>[133]</sup>。

**结论**

表观遗传学通过调节多种基因的表达在调控关节的形成和维持方面发挥着重要作用。此外，OA 损伤部位中许多表观遗传标记物的改变有关。新的研究数据表明，大部分 OA 遗传风险位点至少对表观遗传学调控因子产生影响。

因此，遗传风险位点和表观遗传因素之间的相互作用，以及基因表达的相应变化影响 OA 的发生和发展已经更明确。

OA 患者关节软骨细胞失去了维持健康表型的能力<sup>[134]</sup>，许多 OA 研究的共同目标在于表观遗传学机制在抑制软骨细胞从关节表型向肥大表型的致病转变中具有重要作用。正如在这篇综述中所涉及到 OA 也是由异常的关节形态和 ECM 组成改变导致的<sup>[16,135]</sup>。表观遗传机制在发育和整个生命过程中都是活跃的。因此，我们应该考虑到从青春期到成年期 OA 遗传 - 表观遗传相关性在关节形成过程中发挥作用的可能性。OA 可能是一种老年性疾病，但遗传和表观遗传学风险可能从生命之初就开始了。如此的话，我们就有更多时间提前进行干预。

因此，未来的研究应着力于从广度（更多的样本）和深度（更多的举措）维度上去扩大组织中的表观遗传和互补分析研究。这些分析不仅应在成人组织中进行，还应在发育组织如胎儿样本中进行（方框 1）。此外，这些数据需要与 OA 遗传风险位点关联起来，以阐明表观基因组操作的位点以及存在潜在的治疗价值靶点。最后，利用机器学习和人工智能技术整合基因组学、表观遗传学、代谢学、蛋白质组学和影像学数据，将有助于更全面地了解 OA 的发病机制，以及患者分层和为个别患者设计个性化治疗方案<sup>[136]</sup>。

在线发表于 2020 年 4 月 9 日

### 连锁不平衡

群体中两个等位基因的非随机关联。连锁不平衡的多个变异体的等位基因通常会一起遗传并组成单倍型。当缺乏单倍型多样性时，可能会出现连锁不平衡的大区域，称为“LD 块”。

### 等位基因表达失衡

杂合子个体中来自每个等位基因的 mRNA 相对数量的不平衡，通过使用基因编码序列或未翻译区域中的单核苷酸多态性来测量；任何偏离 1:1 比率（由患者 DNA 确定）的情况都意味着一个等位基因与较高的表达相关水平高于其他等位基因。

### 染色质免疫共沉淀测序 (ChIP-seq)

一种利用抗体和 DNA 测序来评估哪些蛋白质与 DNA 序列结合，和 / 或哪些蛋白质修饰发生在基因组或全基因组的特定点上的技术；这种技术可以在从细胞系或病人细胞分离的染色质上进行。

### 增强子

DNA 短序列 (<1500 bp) 与转录因子结合后通过顺式结构中的物理相互作用增强基因启动子的活性，从而“激活”基因表达。

### 沉默子

沉默子是一段能够通过与蛋白质的直接结合来抑制基因表达的 DNA 序列，主要通过抑制基因启动子上转录机制的组装来实现减少或阻止转录。

### 甲基化数量性状位点 (methylation quantitative trait loci, mQTLs)

CpG 位点的 DNA 甲基化水平与单核苷酸多态性 (SNP) 的基因型之间存在相关性的位点；mQTL 分析通常在患者细胞的 DNA 上进行，并且可以针对特定 CpG 和 SNP，或者可以作为全基因组方法的一部分来分析整个基因组，例如 CpG 和 SNP 基因分型阵列。

### 拓扑关联结构域 (Topologically associating domain, TAD)

基因组中 DNA 序列可以相互作用的区域。单个 TAD 被如 CCCTC 结合因子 (CTCF) 和粘聚素之类的蛋白质分隔开来。这些结构域能够通过其特定的增强子调控靶基因，同时阻止调控元件与 TAD 外基因的相互作用。

### 甲基化数量性状基因座 (Methylation and expression quantitative trait locus, meQTL)

CpG 位点甲基化水平与基因表达之间存在相关性的位点，后者直接通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 或作为全基因组方法的一部分，通常为 RNA 测序。

### 增强学

疾病的潜在机制涉及基因增强子的异常功能的病理学。这种病理可由染色质状态改变、DNA 甲基化或增强子区域内的序列变异引起。增强子活性的改变导致基因表达的失调。

### 基因沙漠

基因组中没有蛋白质编码基因的区域。这些区域与一些重要的调控功能有关，可能包含许多参与发育的重要基因的增强子，如 SOX9。

### 液滴数字 PCR

改进了传统的 PCR 方法采用水 - 油乳化液滴系统。与传统的 PCR 在单个反应中扩增样品不同之处在于，液滴数字 PCR 通过大量样品分离提高了精确度，核酸样本被分成数千个纳升大小的液滴，在每个液滴中进行 PCR 扩增，确保对扩增的 DNA 序列进行可靠的测量。

### 空间转录组学

一种不需要分离细胞或使组织均匀化就可以量化细胞中 RNA 的技术，使研究人员能够辨别复杂和异质组织中基因表达的空间差异。

## 参考文献

1. Styrkarsdottir, U. et al. Whole-genome sequencing identifies rare genotypes in *COMP* and *CHADL* associated with high risk of hip osteoarthritis. *Nat. Genet.* **49**, 801–805(2017).
2. Zengini, E. et al. Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. *Nat. Genet.* **50**, 549–558 (2018).
3. Styrkarsdottir, U. et al. Meta-analysis of Icelandic and UK data sets identifies missense variants in *SMO*, *IL11*, *COL11A1* and 13 more new loci associated with osteoarthritis. *Nat. Genet.* **50**, 1681–1687 (2018).
4. Tachmazidou, I. et al. Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nat. Genet.* **51**, 230–236 (2019).
5. Styrkarsdottir, U. et al. GWAS of bone size yields twelve loci that also affect height, BMD, osteoarthritis or fractures. *Nat. Commun.* **10**, 2054 (2019).
6. Gallagher, M. D. & Chen-Plotkin, A. S. The post-GWAS era: from association to function. *Am. J. Hum. Genet.* **102**, 717–730 (2018).
7. den Hollander, W. et al. Annotating transcriptional effects of genetic variants in disease-relevant tissue: transcriptome-wide allelic imbalance in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 561–570 (2019).
8. Styrkarsdottir, U. et al. Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the *ALDH1A2* gene and with rare variants at 1p31. *Nat. Genet.* **46**, 498–502 (2014).
9. Shepherd, C. et al. Functional characterization of the osteoarthritis genetic risk residing at *ALDH1A2* identifies rs12915901 as a key target variant. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1577–1587 (2018).
10. den Hollander, W. et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 2046–2053 (2017).
11. Shepherd, C., Reese, A. E., Reynard, L. N. & Loughlin, J. Expression analysis of the osteoarthritis genetic susceptibility mapping to the matrix Gla protein gene *MGP*. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 149 (2019).
12. Rice, S. J. et al. Prioritization of *PLEC* and *GRINA* as osteoarthritis risk genes through the identification and characterization of novel methylation quantitative trait loci. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1285–1296 (2019).
13. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 487–500 (2016).
14. Simon, T. C. & Jeffries, M. A. The epigenomic landscape in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **19**, 30 (2017).
15. van Meurs, J. B., Boer, C. G., Lopez-Delgado, L. & Riancho, J. A. Role of epigenomics in bone and cartilage disease. *J. Bone Miner. Res.* **34**, 215–230 (2019).
16. Pitsillides, A. A. & Beier, F. Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 654–663 (2011).
17. Sun, M. M. & Beier, F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* **102**, 74–82 (2014).
18. Miranda-Duarte, A. DNA methylation in osteoarthritis: current status and therapeutic implications. *Open Rheumatol. J.* **12**, 37–49 (2018).
19. Rushton, M. D. et al. Characterization of the cartilage DNA methylome in hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2450–2460 (2014).
20. den Hollander, W. et al. Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2208–2212 (2014).
21. Moazedi-Fuerst, F. C. et al. Epigenetic differences in human cartilage between mild and severe OA. *J. Orthop. Res.* **32**, 1636–1645 (2014).
22. Shen, J. et al. DNA methyltransferase 3b regulates articular cartilage homeostasis by altering metabolism. *JCI Insight* **2**, 93612 (2017).
23. Taylor, S. E., Smeriglio, P., Dhulipala, L., Rath, M. & Bhutani, N. Aglobal increase in 5-hydroxymethylcytosine levels marks osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 90–100 (2014).
24. Taylor, S. E., Li, Y. H., Wong, W. H. & Bhutani, N. Genome-wide mapping of DNA hydroxymethylation in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2129–2140 (2015).
25. Taylor, S. E. et al. Stable 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) acquisition marks gene activation during chondrogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **31**, 524–534 (2015).
26. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395 (2011).
27. Ferguson, G. B. et al. Mapping molecular landmarks of human skeletal ontogeny and pluripotent stem cell-derived articular chondrocytes. *Nat. Commun.* **9**, 3634 (2018).
28. Jeřsko, H. & Strosznajder, R. P. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathol.* **54**, 212–233 (2016).
29. Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713 (2014).
30. Feigenson, M. et al. Histone deacetylase 3 deletion in mesenchymal progenitor cells hinders long bone development. *J. Bone Min. Res.* **32**, 2453–2465 (2017).
31. Carpio, L. R. et al. Histone deacetylase 3 supports endochondral bone formation by controlling cytokine signaling and matrix remodeling. *Sci. Signal.* **9**, ra79 (2016).
32. Bradley, E. W., Carpio, L. R. & Westendorf, J. J. Histone deacetylase 3 suppression increases PH domain and leucine-rich repeat phosphatase (Phlpp) 1 expression in chondrocytes to suppress Akt signaling and matrix secretion. *J. Biol. Chem.* **288**, 9572–9582 (2013).
33. Nishimori, S. et al. PTHR1 targets HDAC4 and HDAC5 to repress chondrocyte hypertrophy. *JCI Insight* **4**, 97903 (2019).
34. Vega, R. B. et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* **119**, 555–566 (2004).
35. Bradley, E. W., Carpio, L. R., Olson, E. N. & Westendorf, J. J. Histone deacetylase 7 (Hdac7) suppresses chondrocyte proliferation and  $\beta$ -catenin activity during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* **290**, 118–126 (2015).
36. Cao, K. et al. Decreased histone deacetylase 4 is associated with human osteoarthritis cartilage degeneration by releasing histone deacetylase 4 inhibition of runt-related



- transcription factor-2 and increasing osteoarthritis-related genes: a novel mechanism of human osteoarthritis cartilage degeneration. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 491 (2014).
37. Culley, K. L. et al. Class I histone deacetylase inhibition modulates metalloproteinase expression and blocks cytokine-induced cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* **65**, 1822–1830 (2013).
  38. Khan, N. M. & Haqqi, T. M. Epigenetics in osteoarthritis: potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacol. Res.* **128**, 73–79 (2017).
  39. Gabay, O. et al. Sirtuin 1 enzymatic activity is required for cartilage homeostasis in vivo in a mouse model. *Arthritis Rheum.* **65**, 159–166 (2013).
  40. Gabay, O. et al. Increased apoptotic chondrocytes in articular cartilage from adult heterozygous SirT1 mice. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 613–616 (2012).
  41. Gabay, O. et al. Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype. *Joint Bone Spine* **80**, 613–620 (2013).
  42. Wang, Y., Zhao, X., Lotz, M., Terkeltaub, R. & Liu-Bryan, R. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ . *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2141–2153 (2015).
  43. Fu, Y. et al. Aging promotes SIRT3-dependent cartilage SOD2 acetylation and osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1887–1898 (2016).
  44. Piao, J. et al. Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signalling. *Sci. Rep.* **3**, 3022 (2013).
  45. Wu, Y. et al. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- $\kappa$ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development. *Sci. Rep.* **5**, 17602 (2015).
  46. Nagai, K. et al. Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1412–1420 (2015).
  47. Castaño Betancourt, M. C. et al. Genome-wide association and functional studies identify the *DOT1L* gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 8218–8223 (2012).
  48. Monteagudo, S. et al. *DOT1L* safeguards cartilage homeostasis and protects against osteoarthritis. *Nat. Commun.* **8**, 15889 (2017).
  49. Cornelis, F. M. et al. Increased susceptibility to develop spontaneous and post-traumatic osteoarthritis in *Dot1l*-deficient mice. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 513–525 (2019).
  50. Yang, L. et al. ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates. *Dev. Biol.* **380**, 99–110 (2013).
  51. Lui, J. C. et al. EZH1 and EZH2 promote skeletal growth by repressing inhibitors of chondrocyte proliferation and hypertrophy. *Nat. Commun.* **7**, 13685 (2016).
  52. Chen, L. et al. The inhibition of EZH2 ameliorates osteoarthritis development through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Sci. Rep.* **6**, 29176 (2016).
  53. Zhang, F. et al. JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 23–34 (2015).
  54. Dai, J. et al. Kdm6b regulates cartilage development and homeostasis through anabolic metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1295–1303 (2017).
  55. Endisha, H., Rockel, J., Jurisica, I. & Kapoor, M. The complex landscape of microRNAs in articular cartilage: biology, pathology, and therapeutic targets. *JCI Insight* **3**, 121630 (2018).
  56. Malemud, C. J. MicroRNAs and osteoarthritis. *Cells* **7**, E92 (2018).
  57. Trachana, V., Ntoumou, E., Anastasopoulou, L. & Tsezou, A. Studying microRNAs in osteoarthritis: critical overview of different analytical approaches. *Mech. Ageing Dev.* **171**, 15–23 (2018).
  58. Ajekigbe, B. et al. Identification of long non-coding RNAs expressed in knee and hip osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 694–702 (2019).
  59. Xiang, S., Li, Z., Bian, Y. & Weng, X. Identification of changed expression of mRNAs and lncRNAs in osteoarthritic synovium by RNA-sequencing. *Gene* **685**, 55–61 (2019).
  60. Hu, J. et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes osteoarthritis progression via miR-17-5p/FUT2/ $\beta$ -catenin axis. *Cell Death Dis.* **9**, 711 (2018).
  61. Carlson, H. L. et al. *LncRNA-HIT* functions as an epigenetic regulator of chondrogenesis through its recruitment of p100/CBP complexes. *PLoS Genet.* **11**, e1005680 (2015).
  62. Barter, M. J. et al. The long non-coding RNA *ROCR* contributes to SOX9 expression and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Development* **144**, 4510–4521 (2017).
  63. Rowley, M. J. & Corces, V. G. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 789–800 (2018).
  64. Bompadre, O. & Andrey, G. Chromatin topology in development and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **55**, 32–38 (2019).
  65. Sivakumar, A., de Las Heras, J. I. & Schirmer, E. C. Spatial genome organization: from development to disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 18 (2019).
  66. Soshnikova, N., Montavon, T., Leleu, M., Galjart, N. & Duboule, D. Functional analysis of CTCF during mammalian limb development. *Dev. Cell* **19**, 819–830 (2010).
  67. Lupiáñez, D. G. et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* **161**, 1012–1025 (2015).
  68. Kraft, K. et al. Serial genomic inversions induce tissue-specific architectural stripes, gene misexpression and congenital malformations. *Nat. Cell Biol.* **21**, 305–310 (2019).
  69. Hannon, E. et al. Leveraging DNA-methylation quantitative trait loci to characterise the relationship between methylation variation, gene expression, and complex traits. *Am. J. Hum. Genet.* **103**, 654–665 (2018).
  70. Rushton, M. D. et al. Methylation quantitative trait locus analysis of osteoarthritis links epigenetics with genetic risk. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 7432–7444 (2015).
  71. Rice, S. J. et al. Identification of a novel, methylation-dependent, *RUNX2* regulatory region associated with osteoarthritis risk. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 3464–3474 (2018).
  72. Rice, S. J., Cheung, K., Reynard, L. N. & Loughlin, J. Discovery and analysis of methylation quantitative trait loci (mQTLs) mapping to novel osteoarthritis genetic risk signals. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 1545–1556 (2019).
  73. Wang, X. et al. Regulation of MMP-13 expression by *RUNX2* and *FGF2* in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 963–973 (2004).
  74. van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 225–232 (2012).
  75. Reynard, L. N., Bui, C., Syddall, C. M. & Loughlin, J. CpG methylation regulates allelic expression of *GDF5* by modulating binding of SP1 and SP3 repressor proteins to the osteoarthritis SNP rs143383. *Hum. Genet.* **133**, 1059–1073 (2014).
  76. Smith, E. & Shilatifard, A. Enhancer biology and enhanceropathies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 210–219 (2014).
  77. Solomon, O. et al. Comparison of DNA methylation measured by Illumina 450K and EPIC BeadChips in blood of newborns and 14-year-old children. *Epigenetics* **13**, 655–664 (2018).
  78. Evangelou, E. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 2130–2136 (2014).
  79. Castaño Betancourt, M. C. et al. Novel genetic variants for cartilage thickness and hip osteoarthritis. *PLoS Genet.* **12**, e1006260 (2016).
  80. arcOGEN Consortium & arcOGEN Collaborators. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* **380**, 815–823 (2012).
  81. Gee, F., Rushton, M. D., Loughlin, J. & Reynard, L. N. Correlation of the osteoarthritis susceptibility variants that map to chromosome 20q13 with an expression quantitative trait locus operating on *NCOA3* and with functional variation at the polymorphism rs116855380. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2923–2932 (2015).
  82. Nguyen, A. T. & Zhang, Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev.* **25**, 1345–1358 (2011).
  83. Swinger, T. E. et al. The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1909–1919 (2012).
  84. Barter, M. J. et al. Genome-wide microRNA and gene analysis of mesenchymal stem cell chondrogenesis identifies an essential role and multiple targets for miR-140-5p. *Stem Cell* **33**, 3266–3280 (2015).
  85. Gonzaga-Jauregui, C. et al. Mutations in *COL27A1* cause Steel syndrome and suggest a founder mutation effect in the Puerto Rican population. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 342–346 (2015).
  86. Kotabagi, S., Shah, H., Shukla, A. & Girisha, K. M. Second family provides further evidence for causation of Steel syndrome by biallelic mutations in *COL27A1*. *Clin. Genet.* **92**, 323–326 (2017).
  87. Plumb, D. A. et al. Collagen XXVII organises the pericellular matrix in the growth plate. *PLoS One* **6**, e29422 (2011).
  88. Sun, H. et al. MiR-455-3p inhibits the degenerate process of chondrogenic differentiation through modification of DNA methylation. *Cell Death Dis.* **9**, 537 (2018).
  89. Yoon, H. J. et al. NF-AT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 1843–1852 (2011).
  90. Yamashita, S. et al. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 22206–22215 (2012).
  91. Zou, W. et al. The E3 ubiquitin ligase Wwp2 regulates craniofacial development through mono-ubiquitylation of Goosecoid. *Nat. Cell Biol.* **13**, 59–65 (2011).
  92. Li, H. et al. WWP2 is a physiological ubiquitin ligase for phosphatase and tensin homolog (PTEN) in mice. *J. Biol. Chem.* **293**, 8886–8899 (2018).
  93. Yang, Y. et al. E3 ligase WWP2 negatively regulates TLR3-mediated innate immune response by targeting TRIF for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 5115–5120 (2013).
  94. Inui, M. et al. Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. *Nat. Cell Biol.* **20**, 516–518 (2018).
  95. Miyaki, S. et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* **24**, 1173–1185 (2010).
  96. Grigelioniene, G. et al. Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia. *Nat. Med.* **25**, 583–590 (2019).
  97. Mokuda, S. et al. Wwp2 maintains cartilage homeostasis through regulation of Adams5. *Nat. Commun.* **10**, 2429 (2019).
  98. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**, 85–89 (1999).
  99. Yao, B. et al. The *SOX9* upstream region prone to chromosomal aberrations causing campomelic dysplasia contains multiple cartilage enhancers. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5394–5408 (2015).
  100. Baird, D. A. et al. Identification of novel loci associated with hip shape: a meta-analysis of genomewide association studies. *J. Bone Miner. Res.* **34**, 241–251 (2019).
  101. Tuddenham, L. et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett.* **580**, 4214–4217 (2006).
  102. Papaioannou, G. et al. MicroRNA-140 provides robustness to the regulation of hypertrophic chondrocyte differentiation by the PTHrP-HDAC4 pathway. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 1044–1052 (2015).
  103. Miyaki, S. et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum.* **60**, 2723–2730 (2009).
  104. Arroyo, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 5003–



- 5008(2011).
105. Kosaka, N., Iguchi, H. & Ochiya, T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* **101**, 2087–2092 (2010).
  106. Lanford, R. E. et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198–201 (2010).
  107. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–433 (2011).
  108. Ntoutoum, E. et al. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin. Epigenetics* **9**, 127 (2017).
  109. Borgonio Cuadra, V. M., González-Huerta, N. C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A. & Miranda-Duarte, A. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and *in silico* analysis of their pathways. *PLoS One* **9**, e97690 (2014).
  110. Beyer, C. et al. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, e18 (2015).
  111. Kong, R., Gao, J., Si, Y. & Zhao, D. Combination of circulating miR-19b-3p, miR-122-5p and miR-486-5p expressions correlates with risk and disease severity of knee osteoarthritis. *Am. J. Transl Res.* **9**, 2852–2864 (2017).
  112. Zhao, G. et al. Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serves as a promising diagnostic method for gastric cancer. *BMC Cancer* **18**, 676 (2018).
  113. Zhang, S. et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 2135–2140 (2016).
  114. Tao, S. C. et al. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics* **7**, 180–195 (2017).
  115. Dunham, I. et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
  116. Reynard, L. N. Analysis of genetics and DNA methylation in osteoarthritis: what have we learnt about the disease? *Semin. Cell Dev. Biol.* **62**, 57–66 (2017).
  117. Kundaje, A. et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317–330 (2015).
  118. Herlofsen, S. R. et al. Genome-wide map of quantified epigenetic changes during *in vitro* chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* **14**, 105 (2013).
  119. Liu, Y. et al. Chromatin accessibility landscape of articular knee cartilage reveals aberrant enhancer regulation in osteoarthritis. *Sci. Rep.* **8**, 15499 (2018).
  120. Hakim, O. & Misteli, T. SnapShot: chromosome conformation capture. *Cell* **148**, 1068.e1–1068.e2 (2012).
  121. Varela-Eirin, M. et al. Targeting of chondrocyte plasticity via connexin43 modulation attenuates cellular senescence and fosters a pro-regenerative environment in osteoarthritis. *Cell Death Dis.* **9**, 1166 (2018).
  122. Fu, L. et al. Up-regulation of FOXD1 by YAP alleviates senescence and osteoarthritis. *PLoS Biol.* **17**, e3000201 (2019).
  123. Ren, X. et al. Maintenance of nuclear homeostasis by CBX4 alleviates senescence and osteoarthritis. *Cell Rep.* **26**, 3643–3656 (2019).
  124. Thakore, P. I., Black, J. B., Hilton, I. B. & Gersbach, C. A. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat. Methods* **13**, 127–137 (2016).
  125. Farhang, N. et al. CRISPR-based epigenome editing of cytokine receptors for the promotion of cell survival and tissue deposition in inflammatory environments. *Tissue Eng. Part. A* **23**, 738–749 (2017).
  126. Soul, J., Hardingham, T., Boot-Handford, R. & Schwartz, J. M. SkeletalVis: an exploration and meta-analysis data portal of cross-species skeletal transcriptomics data. *Bioinformatics* **35**, 2283–2290 (2019).
  127. Shema, E., Bernstein, B. E. & Buenrostro, J. D. Single-cell and single-molecule epigenomics to uncover genome regulation at unprecedented resolution. *Nat. Genet.* **51**, 19–25 (2019).
  128. Chan, C. K. et al. Identification of the human skeletal stem cell. *Cell* **175**, 43–56 (2018).
  129. Ji, Q. et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 100–110 (2018).
  130. Jiang, Y. & Tuan, R. S. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 206–212 (2015).
  131. Buenrostro, J. D. et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* **523**, 486–490 (2015).
  132. Cusanovich, D. A. et al. Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing. *Science* **348**, 910–914 (2015).
  133. Ståhl, P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* **353**, 78–82 (2016).
  134. Singh, P., Marcu, K. B., Goldring, M. B. & Otero, M. Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1442**, 17–34 (2019).
  135. Aspden, R. M. & Saunders, F. R. Osteoarthritis as an organ disease: from the cradle to the grave. *Eur. Cell Mater.* **37**, 74–87 (2019).
  136. Nelson, A. E. et al. A machine learning approach to knee osteoarthritis phenotyping: data from the FNIH Biomarkers Consortium. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 994–1001 (2019).
  137. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods* **10**, 1213–1218 (2013).
  138. Lara-Astiaso, D. et al. Immunogenetics. Chromatin state dynamics during blood formation. *Science* **345**, 943–949 (2014).
  139. Corces, M. R. et al. The chromatin accessibility landscape of primary human cancers. *Science* **362**, eaav1898 (2018).
  140. Yoshida, H. et al. The cis-regulatory atlas of the mouse immune system. *Cell* **176**, 897–912 (2019).
  141. Ludwig, C. H. & Bintu, L. Mapping chromatin modifications at the single cell level. *Development* **146**, dev170217 (2019).

## 致谢

S.J.R. and J.L. acknowledge research support from Versus Arthritis (grant 20771), the Medical Research Council and Versus Arthritis as part of the Centre for Integrated research into Musculoskeletal Ageing (CIMA, grant JXR 10641, MR/P020941/1 and MR/R502182/1), the Ruth and Lionel Jacobson Charitable Trust, the JGW Patterson Foundation and the Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Charity. F.B. acknowledges research support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; application number 332438). D.A.Y. acknowledges research support from the JGW Patterson Foundation and the Dunhill Medical Trust (grant R476/0516).

## 作者贡献

The authors contributed equally to all aspects of the article.

## 利益冲突

The authors declare no competing interests.

## 审稿人信息

*Nature Reviews Rheumatology* thanks M. Goldring, J. Westendorf and I. Meulenbelt for their contribution to the peer review of this work.

## 出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 相关链接

eNCODE: <https://www.encodeproject.org/>  
 GwAs Catalog: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>  
 LNCipedia: <https://lncipedia.org>  
 ROADMAP epigenomics project: <http://www.roadmapepigenomics.org>  
 skeletalvis: <http://phenome.manchester.ac.uk>  
 The Osteoarthritis initiative: <https://nda.nih.gov/oa/>  
 washU epigenome Browser: <https://epigenomegateway.wustl.edu>

翻译: 张伶俐 (四川大学华西医院)  
 审校: 刘毅 (四川大学华西医院)

# 糖皮质激素治疗风湿病观点的趋同时代

## Views on glucocorticoid therapy in rheumatology: the age of convergence

Frank Buttgerit

Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité University Medicine, Berlin, Germany.

e-mail: frank.buttgerit@charite.de

<https://doi.org/10.1038/s41584-020-0370-z>

**摘要：**关于糖皮质激素优缺点的激烈争论已有几十年，对其认知逐渐趋同。目前对类风湿关节炎（Rheumatoid arthritis, RA）、风湿性多肌痛和大血管炎等疾病的治疗建议达成了共识，即根据需求使用糖皮质激素，但应尽可能减少用量。在过去的几年里，随着糖皮质激素管理工具不断开发，建立了一系列糖皮质激素减量策略。对糖皮质激素引起的骨质疏松症也有了一个全面的认识，即骨骼脆性不仅仅取决于糖皮质激素治疗的剂量和持续时间。然而，长期使用极低剂量的糖皮质激素治疗 RA 患者是否可行，以及寻求新的糖皮质激素或糖皮质激素受体配体以提高获益风险比最终能否成功，这些问题仍有待解决。

糖皮质激素被用于治疗多种疾病，可以说是全球最重要、应用最广的一类免疫抑制剂。事实上，2017 年美国的一项研究报告：每 5 个参加商业保险计划的成年人中就有一个在 3 年内（2012-2014 年）因为不同病症短期口服糖皮质激素<sup>[1]</sup>。

尽管糖皮质激素不一定是最佳选择，但是许多风湿病患者需要使用糖皮质激素才能成功治疗。

1949 年 4 月 19 日，Philipp Hench 与其同事发表了一项开创性的工作，用化合物 E（现称为可的松）成功治疗了 14 例 RA 患者<sup>[2]</sup>。1955 年，第一个合成的糖皮质激素，泼尼松和泼尼松龙<sup>[3]</sup>被批准用于医疗，随后甲基泼尼松龙和地塞米松也很快被批准（图 1）。然而，在 20 世纪 50 年代早期，人们已经认识到长期使用糖皮质激素，尤其是高剂量的糖皮质激素，可能会导致不良反应，包括骨质疏松症、高血压、感染率增加、2 型糖尿病、体重增加以及库欣样体质<sup>[4]</sup>。此后人们一直在努力优化这些药物的治疗，包括定义剂量和治疗方案，制定糖皮质激素治疗各种疾病的指南和建议，以及不断开发和完善监测药物毒性的工具<sup>[5-7]</sup>。几种不同的糖皮质激素减量策略正在测试；比传统糖皮质激素具有更好的效益-风险比的新型糖皮质激素或糖皮质激素受体配体也正在研发中<sup>[8-11]</sup>。2007 年取得了一项特别重要的进展，明确了糖皮质激素具有改善疾病的治疗效果；糖皮质激素不仅可以减轻 RA 患者的临床症状和炎症，而且可以延缓疾病的影像学进展<sup>[12]</sup>。

毫无疑问，糖皮质激素有很好的治疗效果，但也有很大诱发不良反应的可能性。因此，关于糖皮质激素使用的意见不一。然而，随着糖皮质激素获益风险比数据的

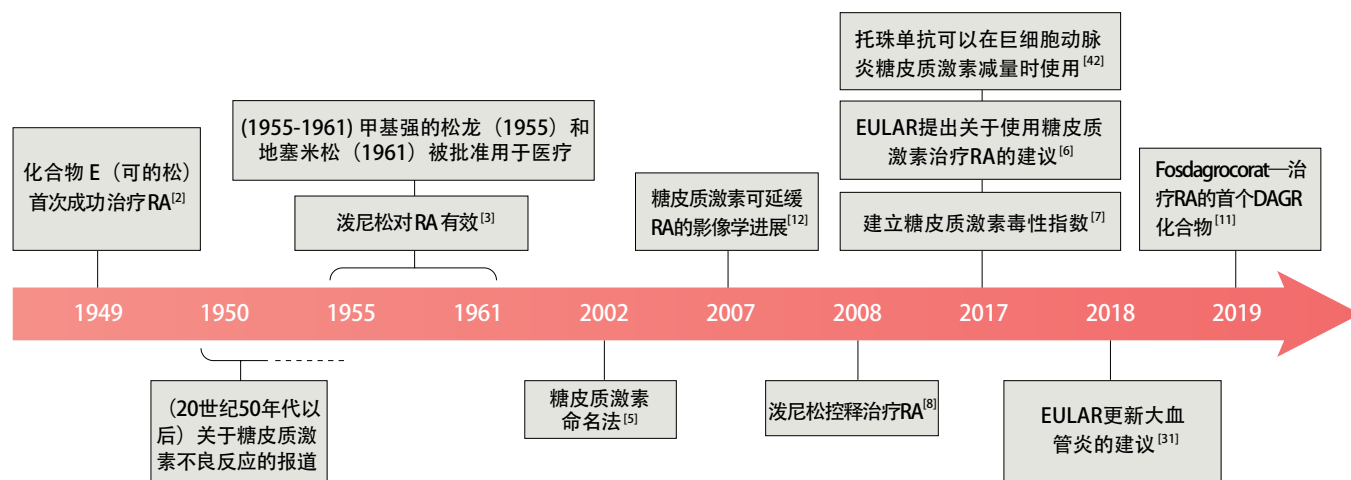
积累，意见正在逐渐统一。有些医生和患者依然更倾向于或更反对使用糖皮质激素治疗，但总的来说，我们对糖皮质激素治疗的观点似乎已经到了趋同的时代。在本文中，我将介绍糖皮质激素在 RA、风湿性多肌痛（Polymyalgia rheumatica, PMR）和大血管炎中的最佳治疗观点，描述糖皮质激素的抗炎作用（重点关注骨），讨论糖皮质激素减量的新策略、糖皮质激素毒性检测的进展以及糖皮质激素受体配体的发展现状。

### 对糖皮质激素的态度

RA 是一种慢性全身炎症性疾病，在发达国家有 0.5 ~ 1.0% 的成年人受累<sup>[13]</sup>。尽管靶向治疗在 RA 中取得了进展，但糖皮质激素仍是 RA 常用药物。对于其他风湿性疾病，包括巨细胞动脉炎（Giant cell arteritis, GCA）、最常见的原发性血管炎（发病率为 18/10 万）以及 PMR（发病率为 113/10 万个 50 岁或 50 岁以上的北欧人），糖皮质激素仍然是一线治疗药物<sup>[14]</sup>。因为这几种疾病有最新的管理建议，接下来我将用它们举例说明目前对糖皮质激素治疗风湿性疾病的一些看法。

### 类风湿关节炎

**当前的建议。**2012 年发表的一篇研究快报<sup>[15]</sup>对 2008 年<sup>[16]</sup>及 2012 年更新版<sup>[17]</sup>美国风湿病学会（American College of Rheumatology, ACR）关于 RA 的治疗建议提出了批评，因为在建议中忽略了糖皮质激素在 RA 治疗中的重要地位。因此，2015 年 ACR 关于 RA 的治疗建议<sup>[18]</sup>纳入了糖皮质激素，指出应在尽可能短的时间内以尽可能低的



**图 1 糖皮质激素在风湿病中的重要应用进展。**在可的松首次成功用于治疗类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 患者后, 糖皮质激素在临床医学中得到了广泛应用。随着对糖皮质激素益处和风险研究的深入, 关于其最佳使用的治疗建议也在逐渐完善。DAGR, 糖皮质激素受体的解离激动剂。

剂量使用糖皮质激素, 为患者提供最佳获益 - 风险比。特别是, 建议给开始使用改善病情抗风湿药 (Disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 治疗的中度或高疾病活动度 RA 患者, 或对传统合成 DMARDs (csDMARDs) 或生物制剂 DMARDs (bDMARDs) 治疗无效的患者, 考虑在治疗方案中增加低剂量糖皮质激素 ( $\leq 10$  mg/d 泼尼松或等效物)。对疾病复发患者推荐短期使用糖皮质激素 ( $< 3$  个月)<sup>[18]</sup>。

目前 EULAR 关于在 RA 中使用糖皮质激素的建议<sup>[6]</sup> 与 ACR<sup>[18]</sup> 相似, 但略有不同。基于 2007 年的研究<sup>[12]</sup>, 2010 年 EULAR 关于使用 csDMARDs 和 bDMARDs 治疗 RA 的建议<sup>[19]</sup> 指出, 糖皮质激素不仅具有抗炎特性, 而且还能改善疾病。因此, 2010 年 EULAR 建议将低至中高剂量的糖皮质激素与 csDMARD 单药 (或 csDMARDs 的联合治疗) 结合使用, 作为初始短期治疗, 但在临床可行的情况下尽快减少糖皮质激素用量 (3~6 个月内), 并最终停止使用<sup>[19]</sup>。这也反映了一个事实, 即长时间使用糖皮质激素治疗 RA 会引起不良反应, 但需要注意的是, 不良反应数据分析较难 (方框 1)。2013 年<sup>[20]</sup> 和 2016 年<sup>[6]</sup> EULAR 建议更新版依然强调了减少糖皮质激素用量, 但在其他方面给出了更精准的建议。2016 更新版<sup>[6]</sup> 提出了几种糖皮质激素桥接疗法, 包括每日口服不超过 30 mg 泼尼松, 单次肌肉注射 120 mg 的甲基泼尼松龙或单次静脉注射 250 mg 甲基泼尼松龙冲击治疗。这一更新<sup>[6]</sup> 还明确指出当开始使用或更改 csDMARDs 时考虑使用糖皮质激素作为桥接治疗, 意味着在使用 csDMARD 时要一直使用

糖皮质激素以达到最大疗效, 而当使用 bDMARDs 或靶向合成 DMARDs 时则不需要使用糖皮质激素作为桥接治疗, 因为这些治疗通常起效迅速, 并且使用糖皮质激素可能会增加感染风险。此外, 由于没有证据支持先前的建议<sup>[20]</sup>, 2016 更新版<sup>[6]</sup> 将“最多 6 个月”更改为“短期糖皮质激素”。值得注意的是, 对于“短期”目前还没有以周或月为单位的明确定义。然而, 有一点是明确的, 由于存在潜在安全风险, 长期使用 (3~6 个月或更长时间)<sup>[4]</sup> 应避免剂量超过 5 mg/d<sup>[21,22]</sup>。

**其余观点。**包括我在内的一些风湿病学家认为长期使用极低剂量的糖皮质激素 (理想剂量为 2 mg/d 至 4 mg/d) 是 RA 患者的现实治疗选择<sup>[23]</sup>, 这一观点也得到了真实世界队列数据的支持。例如, 在一项关于早期 RA 患者糖皮质激素耐受性的研究中 ( $< 6$  个月病程), 602 例患者中有 386 例 (64.1%) 在整个随访期间 (中位数为 7 年) 接受了低剂量泼尼松治疗 (平均  $3.1 \pm 2.9$  mg/d)<sup>[24]</sup>。作者综合使用死亡、心血管疾病 (包括心肌缺血、脑血管意外和心力衰竭)、严重感染和骨折来评估糖皮质激素在该人群中的安全性, 结果发现极低剂量糖皮质激素在早期活动性 RA 中具有良好的安全性。同样, 来自德国早期关节炎队列 (CAPEA) 的 669 例 RA 患者的数据显示, 77% 的患者接受起始剂量  $< 7.5$  mg/d 至  $> 20$  mg/d 的泼尼松龙, 47% 的患者在 2 年后仍在接受糖皮质激素治疗<sup>[25]</sup>。一项研究对澳大利亚风湿病协会数据库 (收集炎症性关节炎患者长期预后数据的注册中心) 中的 3699 例成年 RA 患者的数据

进行了分析<sup>[26]</sup>。在这个队列中，口服糖皮质激素的概率随着时间的推移而下降，从2001年至2005年的55%下降到2012年至2015年的39%。有趣的是，在2008年至2015年期间，糖皮质激素的使用只减少了3%<sup>[26]</sup>，这可能表明目前的治疗选择已经到达了一个平台期。

使用糖皮质激素的患者比例不断下降，并且平均每日剂量也已降低到有效治疗所需的最低剂量。来自德国关节炎协作中心国家数据库的8084例患者中有48.3%的患者平均接受相当于5 mg/d泼尼松的糖皮质激素治疗（8.5%的患者每日剂量<5 mg，37.7%的患者每日剂量为5~7.5 mg，只有2.1%的患者每日剂量>7.5 mg）<sup>[27]</sup>，符合当前的建议<sup>[6,18]</sup>。

总的来说，这些分析<sup>[23-27]</sup>突出了两个主要事实。首先，糖皮质激素逐渐减量至停用或至最低有效剂量的方法被广泛应用。其次，一定比例的RA患者仍或多或少地在不断地接受糖皮质激素治疗。存在以下问题：医生和患者有没有尽最大努力减少使用糖皮质激素？以及从长期来看，DMARDs和小剂量糖皮质激素联合治疗是否比单独使用DMARDs更有效？尽管一些答案可以从RA类固醇减量试验（Steroid elimination in RA, SEMIRA）<sup>[28]</sup>（见下文关于糖皮质激素减量策略章节）数据的初步分析中找出，但目前尚无定论。

## 血管炎

**风湿性多肌痛。**2015年EULAR-ACR关于PMR治疗的建议指出，糖皮质激素而非非甾体类抗炎药（Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs）应作为PMR患者的一线治疗药物，除非短期使用NSAIDs治疗其他疾病相关的疼痛<sup>[29]</sup>。该建议强调了糖皮质激素在治疗PMR中的重要作用<sup>[14]</sup>。更具体地说，专家组建议制定糖皮质激素治疗最短且有效的个体化疗程（假设至少12个月），以及使用最低有效剂量（等同于泼尼松12.5~25 mg/d的剂量范围）的糖皮质激素作为PMR的初始治疗<sup>[29]</sup>。对于不良事件风险低、复发风险高的患者，可考虑使用建议范围的较高剂量。而对于合并有其他疾病（如糖尿病、骨质疏松症或青光眼）或存在糖皮质激素不良反应的其他危险因素的患者，推荐使用该范围内的较小剂量。对于初始减量，在治疗4~8周内减至口服10 mg/d泼尼松剂量或等效剂量。一旦病情得到缓解，剂量就应该逐步减少。他们还提供了糖皮质激素治疗复发性PMR的具体建议<sup>[14,29]</sup>（表1）。

值得注意的是，这些建议<sup>[29]</sup>共同指导如何选择患者特定的最低有效糖皮质激素剂量以及治疗疗程，以平衡药效与副作用。对于不同患者特定参数的制定，需要评估和考虑疾病活动性、糖皮质激素相关不良事件的危险因素、合并症、合并用药、复发和长期治疗。这也许可以解释为什么除了白内障之外，359例PMR患者中与糖皮质激素治疗相关的发病率并未高于359例年龄和性别匹配的无PMR患者的发病率<sup>[30]</sup>。

**大血管炎。**大血管炎，如GCA和Takayasu大动脉炎，有可能引起严重的并发症，包括失明、主动脉瘤和血管狭窄。因此，快速诊断和治疗非常必要，糖皮质激素在这些疾病的治疗中发挥着重要作用。EULAR对大血管炎的治疗建议于2018年进行了更新，旨在快速推动证据向临床转化，以改善患者的疾病管理和预后<sup>[31]</sup>。患者通常对大剂量糖皮质激素治疗反应良好；因此，建议对活动性GCA或Takayasu大动脉炎患者立即给予40~60 mg/d等效剂量泼尼松治疗，以缓解病情（表1）。对于有急性视力丧失或一过性黑朦的GCA患者，应考虑使用非常高的糖皮质激素剂量（每天静脉注射0.25~1 g甲基泼尼松龙，持续3天）<sup>[31]</sup>。大剂量可以确保作用于所有的糖皮质激素受体；因此，可以预期获得最大的基因组效应（或糖皮质激素受体介导的效应）<sup>[5]</sup>。此外，所谓的“非基因组效应”<sup>[32]</sup>的发生可能有助于治疗取得成功，因此，在高剂量下，糖皮质激素与细胞膜的非特异性相互作用以及由胞质和膜结合糖皮质激素受体介导的非基因组效应可以带来更好的疗效<sup>[33]</sup>。一旦疾病得到控制，糖皮质激素应逐渐减少剂量<sup>[31]</sup>。2至3个月内达到15-20 mg/d的目标剂量，1年后GCA和Takayasu大动脉炎的目标剂量分别为≤5 mg/d和≤10 mg/d（表1）。

### 方框 1 临床研究中糖皮质激素毒性报告的问题

大多数关于糖皮质激素毒性的研究质量低，持续时间短<sup>[19,53]</sup>。事实上，关于糖皮质激素毒性的随机临床试验（Randomized clinical trials, RCTs）很少，试验大多设计用于评估治疗的益处；因此，这些试验周期很短且参与者较少，无法正确评估糖皮质激素引起的不良反应。观察性研究的质量通常不高，并且有很高的偏倚风险，因为通常是疾病活动度非常高的患者接受最高剂量的糖皮质激素治疗，在解释观察性研究的结果时要考虑到这一点<sup>[53-55]</sup>。在RCTs和观察性研究中，糖皮质激素暴露的记录（理想情况下应该包括平均每日剂量和累积剂量）通常都不完整，并且各个研究之间使用的风险归因模型往往不同<sup>[53]</sup>。总的来说，这些差异可能导致研究结果相互矛盾，支持或反对糖皮质激素使用的观点存在偏倚。



**表 1 糖皮质激素治疗血管炎的最新建议**

治疗类型	风湿性多肌痛	巨细胞动脉炎 <sup>a</sup>	大动脉炎 <sup>b</sup>
诱导治疗	开始口服糖皮质激素 12.5–25 mg/天	糖皮质激素起始剂量为 40–60 mg/天	糖皮质激素起始剂量为 40–60 mg/天
糖皮质激素减量	在 4–8 周内将糖皮质激素剂量减至 10 mg/天，然后每 4 周减量 1 mg，直至停药	在 2–3 个月内将糖皮质激素减至 15–20 mg/天，1 年后减少至 ≤ 5 mg/天	在 2–3 个月内将糖皮质激素减至 15–20 mg/天，1 年后减少至 ≤ 10 mg/天
复发治疗	增加糖皮质激素至复发前剂量；在 4–8 周内逐渐减量至复发时的剂量	增加糖皮质激素至 40–60 mg/天（严重复发）或至最后有效剂量（轻微复发）	增加糖皮质激素至 40–60 mg/天（严重复发）或至最后有效剂量（轻微复发）

数据基于 Buttergeriet 等<sup>[14]</sup>和 Hellmic 等<sup>[31]</sup>的研究。所有剂量均为 mg 泼尼松等效剂量。<sup>a</sup> 对于巨细胞动脉炎相关视觉症状的患者以及 EULAR 推荐的 II 期治疗有特定的建议<sup>[31]</sup>。<sup>b</sup> 对于 EULAR 推荐的 II 期治疗有特定的建议<sup>[31]</sup>。

治疗建议<sup>[31]</sup>需权衡复发风险和糖皮质激素相关不良事件风险，由于缺乏数据支持，很难提出明确的建议。例如在 GCA 中，一旦糖皮质激素剂量逐渐减少，疾病就易复发（34–75% 的患者）<sup>[31]</sup>。因此，尽管长期使用大剂量糖皮质激素治疗可能会降低复发率，但也会增加糖皮质激素相关不良事件的风险。而减量过快会增加复发的风险，需要恢复原来的剂量，或增加糖皮质激素的剂量，导致累积糖皮质激素暴露增加，这也增加了糖皮质激素相关不良事件的风险。因此，治疗建议只是提供了目前最新治疗方法的相关信息和大概思路，在实际应用中必须针对患者具体情况，制定个体化糖皮质激素给药方案。

#### 对不良反应的态度

上述临床实例清楚地说明了风湿病临床实践中对糖皮质激素的持续需求。然而，这些药物的实际获益 - 风险比的不确定性可能会影响适应症患者获得糖皮质激素最佳治疗<sup>[23]</sup>。这样的情况可能会对患者产生负面影响，只有通过制定有助于实施现有治疗建议的策略才能克服这种不利影响。EULAR 特别工作组就制定了这样一种策略，以保证长期接受糖皮质激素治疗时不良反应在可接受范围（在下一节中讨论）<sup>[4]</sup>。幸运的是，尽管仍然存在一些不确定性，但我们现在已经回答了许多有关糖皮质激素治疗的重要问题。在下面的章节中，我将重点介绍其中的一些不确定性。

**有安全剂量吗？**糖皮质激素的广泛使用引发了一个问题，即是否可以找到风湿病患者长期使用的安全剂量。为此，EULAR<sup>[4]</sup>召集了一个由专家和风湿病患者组成的多学科小组，分析了对患者和医师而言最令人困扰的四种与糖皮质激素相关的不良反应<sup>[34]</sup>：骨质流失、高血糖和 / 或糖尿病、心血管疾病和感染。2016 年，EULAR 特别工作组<sup>[4]</sup>

得出结论，大多数长期接受（3–6 个月或更长）糖皮质激素治疗的患者，在接受 ≤ 5 mg/d 泼尼松等效剂量时发生不良反应的风险较低，但在剂量 > 10 mg/d 时风险增加。在 5–10 mg/d 的剂量下，患者的特定特征（例如年龄、性别、遗传易感性、合并症、联合用药和生活方式）决定了现有和潜在的不良不良反应。例如，一例 72 岁的 PMR 妇女每天服用 7.5 mg 泼尼松超过 6 个月，如果她有足够的维生素 D 和钙摄入量，且进行肌肉强化锻炼，并接受双膦酸盐或骨合成代谢药物治疗，那么其骨骼健康受影响风险较低。但是，如果她有骨质疏松症、低体重、低骨密度和骨折家族史，并且如果她拒绝服用维生素 D 和抗骨质疏松药物，那么相同剂量的糖皮质激素影响她骨骼健康的风险就会很高。值得注意的是，EULAR 特别工作组<sup>[4]</sup>的报告列出了一系列常见的糖皮质激素相关的风险因素和保护因素，这些因素在评估个体长期使用糖皮质激素治疗的不良反应和潜在风险时应考虑。

EULAR 特别工作组报告<sup>[4]</sup>的结果与一项回顾性队列研究得出的数据一致，该研究包括 16762 例 RA 患者，分析了与糖皮质激素治疗相关的全因和病因特异性死亡率<sup>[35]</sup>。这项队列研究的结果表明，目前每天低于 5 mg（泼尼松等效剂量）的糖皮质激素剂量与死亡风险增加无关，但在高剂量组确实存在剂量 - 效应关系<sup>[35]</sup>。尽管有这些发现，但由于缺乏长期糖皮质激素治疗危害风险的有力证据，研究结果往往要么缺失，要么相互矛盾，要么存在偏倚<sup>[4]</sup>（方框 1），长期安全剂量仍不能确定。糖皮质激素毒性指数（Glucocorticoid Toxicity Index, GTI）<sup>[7]</sup>是一种在临床试验中评估糖皮质激素相关毒性的工具，在未来的研究中应用 GTI 可能有助于解决这些问题（参见关于未来方法的章节）。

**糖皮质激素引起的骨质疏松症如何？**在我看来，“糖

皮质激素引起的骨质疏松症”这种说法并不合适。在实验条件下可以如此描述，例如，一项研究发现，每天 5 mg 泼尼松可降低健康绝经后妇女的骨修复或更新能力，从而影响骨量和 / 或骨强度<sup>[36]</sup>。但是，这些发现与临床医学几乎没有关联，并且可能会引起误导，因为健康的人通常不使用糖皮质激素的治疗。在风湿病诊所，糖皮质激素被用于帮助减轻风湿病相关的炎症，这比健康个体的情况更为复杂。

在目前的临床实践中，RA、外周型脊柱关节炎、系统性红斑狼疮、血管炎和其他炎症性疾病的患者经常使用糖皮质激素，这会对骨骼产生有害影响。糖皮质激素通过直接抑制成骨细胞破坏骨形成，刺激破骨细胞，对骨细胞产生有害影响，并间接改变性腺和神经肌肉系统的功能<sup>[37]</sup>。因此，糖皮质激素治疗可导致早期快速的骨丢失，从而增加骨折风险<sup>[37]</sup>。然而，越来越多的人认为风湿性疾病相关的炎症也是骨质疏松性的重要决定因素<sup>[38,39]</sup>。炎症相关骨质疏松性涉及的机制已在其他文献中进行了全面综述<sup>[38]</sup>，但总的来说，炎症性疾病活动以及其他常见的危险因素似乎促进了炎症性风湿病患者骨质疏松症的发展。然而，大多数个体中存在一种复杂情况，危险因素和预防因素共同存在，例如使用糖皮质激素既是危险因素又是预防因素（图 2）。在这种情况下，“糖皮质激素引起的骨质疏松症”这种说法在很大程度上是不合适的，因为还有其他几个重要因素决定了炎症性疾病患者骨质疏松症相关的骨质疏松性。此外，当给予最低有效剂量的糖皮质激素时，对全身炎症的抑制和伴随的机体活动的增加可能会超过（至少在某种程度上）对骨骼的固有负面影响。表 2 总结了过去 5 年的大规模高质量研究的结果，这些研究描述了糖皮质激素对炎症性风湿病患者骨骼的影响。

此外，炎症诱发的其他并发症也应该引起重视。持续的高炎症活动不仅对骨骼有负面影响，而且对心血管系统和能量代谢也有负面影响<sup>[40]</sup>。同样，只有通过考虑疾病的病理生物学、并发症和糖皮质激素治疗的综合作用，才能解释 RA 患者感染风险的增加<sup>[41]</sup>。尽管这些考虑因素有些复杂，但它们支持最终的共识。当使用最低有效剂量的糖皮质激素治疗患者时，医生们利用糖皮质激素的抗炎和免疫调节作用来减轻疾病体征和症状，同时将炎症引起的并发症（如骨质疏松症、加速动脉粥样硬化和代谢影响）降至最低，并减少糖皮质激素引起的固有但呈剂量依赖的不良反应。

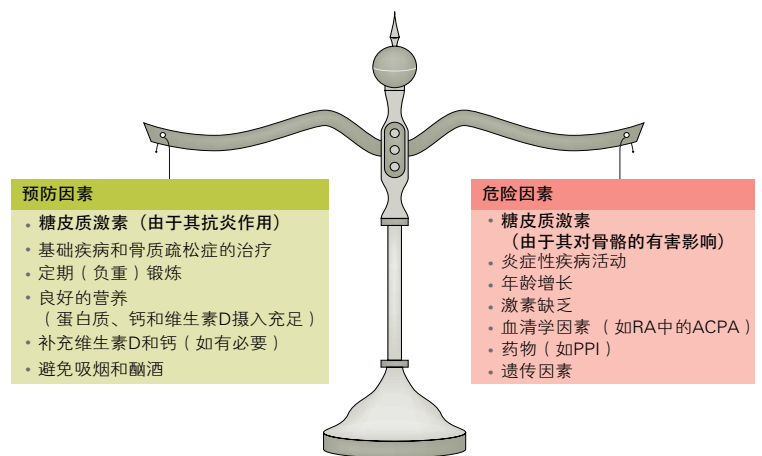
## 未来的方法

尽管我们对糖皮质激素的认知有所进步，但如何进一步优化这些药物的治疗仍是个问题。这个问题目前可以通过三种方式解决。首先，目前糖皮质激素减量方法的深入试验是临床研究的重要焦点。SEMIRA<sup>[28]</sup> 和 GiACTA<sup>[42]</sup> 试验都是此类研究的突出实例，试验结果仍有待于在临床实践中全面实施。第二，客观地评估糖皮质激素的毒性，以确保将来能够正确描述这种治疗的获益风险比。GTI<sup>[7]</sup> 可以用于实现此目标。第三，新型糖皮质激素受体配体目前处于不同的开发阶段，以期开发出一种比传统糖皮质激素具有更好的获益风险比的药物。这三种方法将在下一节中详细讨论。

## 糖皮质激素减量策略

风湿病学领域的几项不同研究目前正在解决如何减少糖皮质激素的使用这一重要问题。在下面的讨论中，我将重点介绍两个示例，即针对 RA 患者的 SEMIRA 研究<sup>[28]</sup> 和针对 GCA 患者的 GiACTA 研究<sup>[42]</sup>。

**类风湿关节炎。** SEMIRA 试验是一项随机安慰剂对照的 III b/IV 期临床试验，旨在告知临床医生糖皮质激素逐渐减量治疗 RA 的益处和风险，该研究的初步结果已在 2019 年的 EULAR 大会上公布<sup>[28]</sup>。在这项研究中，使用 IL-6 受体抑制剂托珠单抗联合 csDMARDs 和长期泼尼松（5 mg/d）达到低疾病活动度（Low disease activity, LDA）或病情缓解的患者随机分为两组，在 24 周内将泼尼松从



**图 2 影响风湿性疾病骨质疏松相关骨质疏松性的因素。**大多数个体都有复杂的危险因素和预防因素，这些因素影响风湿病患者骨质疏松相关的骨质疏松性。使用糖皮质激素既是危险因素也是预防因素。ACPA, 抗瓜氨酸蛋白抗体; PPI, 质子泵抑制剂; RA, 类风湿关节炎。

表 2 糖皮质激素对炎性风湿病患者骨的影响

研究	研究方法	结果	评论	参考文献
Ozen 等人 (2019)	在一项纵向、观察性注册研究中, 对 11412 例既往无骨折的 RA 患者进行了骨质疏松症相关部位骨折评估 (n=914)	糖皮质激素治疗与 RA 患者椎体和非椎体骨折风险增加相关	糖皮质激素剂量仅粗略分为 0、 $< 7.5\text{mg/天}$ 和 $\geq 7.5\text{mg/天}$ 组; 患者未被随机分配至评估药物组; 协变量 (包括疾病活动) 来自自述问卷中获得	39
Blavnsfeldt 等人 (2018)	在随机、双盲、安慰剂对照研究中评估泼尼松对 RA 患者骨密度影响的系统文献检索	根据 7 项已发表的研究数据, 接受糖皮质激素治疗 24 个月以上的患者与接受安慰剂治疗的患者相比, 骨密度变化无差异	糖皮质激素的抑炎作用可能会抵消其对骨重塑的不利影响	56
Mendoza-Pinto 等人 (2018)	来自前瞻性纵向和横断面研究的数据比较了 3442 例 SLE 患者和 6198 例健康人的骨密度, 以评价骨密度和糖皮质激素治疗与 SLE 椎体骨折之间的关系	SLE 患者的骨密度低于健康人, 但数据并未显示糖皮质激素治疗对骨密度有影响	糖皮质激素治疗对 SLE 患者的骨密度无明显影响; 原因可能是糖皮质激素可以抑制全身炎症, 有助于增加机体活动, 这可能会超过糖皮质激素对骨骼的不良影响	57
Petri 等人 (2015)	使用英国临床实践研究 Datalink 作为数据源, 作者分析了 GCA 的发生率、糖皮质激素的累积使用以及与 GCA 最相关的合并症	骨质疏松症与 GCA 密切相关 (RR=2.9, 95% 置信区间 2.3–3.7)	作者提出假说糖皮质激素治疗导致骨质疏松症, 但无法确定因果关系	58

BMD, 骨密度; CI, 置信区间; GCA, 巨细胞动脉炎; RA, 类风湿关节炎; RR, 相对风险; SLE, 系统性红斑狼疮。

5 mg/d 降至 0 mg/d (每 4 周减少 1 mg/d), 或在 24 周内继续接受 5 mg/d 的泼尼松。初步研究结果发现, 维持糖皮质激素使用剂量比糖皮质激素减量使用控制疾病效果更好 (尽管疾病活动评分之间的总体均值差异很小), 77% 接受泼尼松维持治疗的患者达到关键次要终点 (维持 LDA, 无疾病活动, 无需要替代治疗的肾上腺功能不全), 但只有 65% 的接受减量治疗的患者能够达到该终点。此外, 尽管总体安全性相似, 无肾上腺功能不全或死亡的报道, 但糖皮质激素减量组的患者比维持组患者在治疗中出现的紧急不良事件更多。

总的来说, SEMIRA 研究的初步结果表明, 持续使用 5 mg/d 的泼尼松比糖皮质激素减量治疗更安全且能够更好地控制疾病, 这可能会影响未来对 RA 患者最佳糖皮质激素使用的建议。但是毋庸置疑, 这些结果可以帮助医生和患者在糖皮质激素减量方面做出更好的共同决策。在未来, 尽管许多 RA 患者一旦找到有效的 DMARD 疗法, 就可以停止糖皮质激素治疗, 但我推测仍有一部分患者需要每天用非常低剂量的泼尼松 (或等效物) 进行联合治疗。低剂量糖皮质激素治疗有效的原理很简单: 2.5 mg 的泼尼松相当于约 10 mg 的内源性糖皮质激素<sup>[43]</sup>。因此, 每天服用 2.5 mg 泼尼松可使成人可用的糖皮质激素总量从约 10 mg<sup>[44]</sup> 增加到约 20 mg。也就是说, 用泼尼松 2.5 mg/d 的剂量治疗可使总的糖皮质激素增加 100%, 这可能解释了低剂量糖皮质激素有效的原因。

值得注意的是, 除了 SEMIRA 研究之外, 缺乏随机对照试验 (Randomized controlled trials, RCTs) 的证据来指导 RA 患者口服糖皮质激素的减量策略。然而, 目前正在进行的一项试验比较了糖皮质激素减量 (在缓解或达到 LDA 后每月减少每日剂量 1 mg) 与氢化可的松替代疗法 (用氢化可的松 20 mg/d 替代糖皮质激素 3 个月, 在 3 个月内减少到 10 mg/d, 然后在缓解或达到 LDA 后立即停止) 治疗 RA<sup>[45]</sup>。这项试验的科学问题是, 与糖皮质激素减量相比, 氢化可的松替代疗法是否增加了 1 年后糖皮质激素停药的成功率, 这些结果可能有助于临床制定糖皮质激素的最佳减量策略。

**血管炎。** GiACTA 试验的主要目的是研究托珠单抗对糖皮质激素减量期间 GCA 患者复发率的影响<sup>[42,46]</sup>。在这项 RCT 研究中, 251 例患者被随机分配接受托珠单抗 (每周或每两周皮下注射 162 mg) 或安慰剂联合泼尼松治疗, 在 26 或 52 周内逐渐减量。在第 52 周时, 将持续无糖皮质激素缓解率作为主要和次要终点比较四种不同治疗方案。缓解被定义为没有复发、泼尼松减量以及 C 反应蛋白浓度正常。总的来说, 托珠单抗组超过 50% 的患者出现持续缓解, 而安慰剂组不到 20%。另一个惊人的结果是, 与安慰剂相比, 在 52 周的研究期内, 添加托珠单抗后, 泼尼松的累积中位剂量减少了约一半: 每个托珠单抗组为 1862 mg, 而对照组分别为 3296 mg (安慰剂加 26 周泼尼

松减量)和 3818 mg (安慰剂加 52 周泼尼松减量), 表明这种治疗方法(托珠单抗加糖皮质激素)适用于糖皮质激素减量。然而, 由于该研究持续时间太短, 无法清楚地证明这种糖皮质激素减量策略能否减少临床相关糖皮质激素引起的不良事件。

### 糖皮质激素毒性指数

由于没有一个全面评估糖皮质激素毒性的工具, 阻碍了糖皮质激素疗法的研究<sup>[47]</sup>。为了在前瞻性 RCTs (糖皮质激素根据方案或研究者的最佳医学判断使用)中更好地评估糖皮质激素相关发病率以及其他疗法中糖皮质激素减量效果, 一组专家开发了一种可靠的工具 GTI<sup>[7]</sup>。GTI 的开发过程具有 10 个里程碑, 包括文献综述、小组共识方法、多标准决策分析和使用临床场景进行评估。总 GTI 包含了一个复合 GTI 和一个特定列表。复合 GTI 项目是主要工具, 可以量化在典型临床试验期间(6~36 个月)糖皮质激素不同累积剂量的常见毒性。复合 GTI 测量的是糖皮质激素毒性的变化, 而不是绝对的糖皮质激素毒性, 以说明先前糖皮质激素治疗的影响和不良事件的发生率。因此, 复合 GTI 的不同项目将被划分为 9 个方面(BMI、葡萄糖耐受性、血压、脂质、骨密度、类固醇肌病、皮肤毒性、神经精神毒性和感染), 需要在两个不同的时间点进行评估, 然后再进行加权, 以衡量其下降和改善。为了最大限度地提高可用性, 特别列表旨在捕获复合 GTI 未纳入的糖皮质激素毒性。GTI 开发的最后一个步骤是由参与开发的专家和外部测试人员对复合 GTI 进行初步评估。结果表明, 它具有良好的信度和效度<sup>[7]</sup>。因此, 在未来评估糖皮质激素相关发病率的临床研究中, GTI 很可能被用作主要或次要结果。

### 药物开发

生物节律在 RA 中的突出作用<sup>[13]</sup>促进了泼尼松改良释放(或延迟释放)的生物钟疗法的发展, 该疗法已成功用于治疗 RA 患者。这种疗法优化了糖皮质激素的治疗时机, 减少了夜间血液中 IL-6 浓度的增加, 与早晨服用相同剂量的糖皮质激素相比, 减少了晨僵和疼痛<sup>[8-10,48-50]</sup>。改善糖皮质激素治疗的另一种方法是开发糖皮质激素受体激动剂, 使其与传统糖皮质激素(如脂质体糖皮质激素

和新型糖皮质激素受体配体)相比, 具有更好的效益-风险比<sup>[32,51,52]</sup>。2019 年, 一项为期 12 周的 II 期 RCT 评估了首个口服、具有选择性、高亲和力的分离型糖皮质激素受体(Dissociated agonist of the glucocorticoid receptor, DAGR)激动剂 fosedagrocorat (PF-04171327)<sup>[11]</sup>。在 323 例中重度 RA 患者中, 10 mg 或 15 mg 剂量的 fosedagrocorat 与 10 mg 泼尼松的疗效相似, 安全性与 5 mg 泼尼松相似, 这些结果<sup>[11]</sup>都支持这样一种观点, 即 DAGRs 可能与传统糖皮质激素有相似的疗效, 同时也减少了不良反应。然而, 2017 年一篇关于口服选择性糖皮质激素受体调节剂与糖皮质激素在各种类型关节炎中的疗效与安全性比较的综述中<sup>[51]</sup>, 其作者得出了这样的结论: 总的来说, 能够证明选择性靶向糖皮质激素受体的治疗优于传统的糖皮质激素的获益-风险比的证据非常有限。作者还指出, 许多这类药物的开发在临床前阶段就停止了<sup>[51]</sup>。因此, 还需要进一步的研究以及药物研发人员与临床医生的合作努力来开发改良的糖皮质激素和糖皮质激素受体配体。

### 结论

在风湿病学领域, 经过多年的争论, 关于糖皮质激素治疗的观点正在逐渐趋同, 人们普遍认为糖皮质激素是很有价值的药物, 但需要谨慎使用。对糖皮质激素的使用, 即使是毫克的用量, 尤其是需要长期使用时, 必须证明其合理性。在有可能进一步减少剂量时, 则不应该继续使用该剂量。过去几年的研究<sup>[26,28,43]</sup>表明, 通过减少糖皮质激素的使用来降低潜在不良反应的发生是有可能的。这些研究结果应迅速转化到临床实践中。如何在临床实践中减少糖皮质激素的使用, 以及寻找更好的糖皮质激素或糖皮质激素受体配体仍将是未来研究的重点。然而, 可以预见的是, 传统糖皮质激素, 特别是极低剂量的糖皮质激素, 仍将用于治疗多种风湿性疾病。极低剂量糖皮质激素治疗的潜在不良反应是可解决的, 与临床疗效相比微不足道。在大多数患者中, 剂量范围低于 5 mg/d 泼尼松当量时, 即使需要长期治疗, 糖皮质激素抑制炎症的良好效果超过了其潜在的不良反应。在临床研究中使用 GTI 能证明上述观点; 因此, 在长期使用传统糖皮质激素时, 应用 GTI 有可能提高临床安全性。

在线发表于 2020 年 2 月 19 日



**一过性黑朦**

单眼或双眼无痛性暂时性视力丧失。

**桥接治疗**

在开始使用传统合成 DMARD 治疗或需要换用另一种此类药物的患者中使用糖皮质激素，以便在新药物治疗生效前过渡一段时间。

**时间生物学**

研究周期性生理现象的生物学分支。

**库欣样体质**

由合成糖皮质激素治疗引起的，类似于库欣病（一种垂体释放过多促肾上腺皮质激素的疾病）患者的体质。

**冲击治疗**

每天用 250 mg 以上泼尼松等效剂量治疗 1 天或数天。

**参考文献**

- Waljee, A. K. et al. Short term use of oral corticosteroids and related harms among adults in the United States: population based cohort study. *BMJ* **357**, j1415 (2017).
- Hench, P. S., Kendall, E. C., Slocumb, C. H. & Polley, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **24**, 181–197 (1949).
- Bunim, J. J., Pechet, M. M. & Bollet, A. J. Studies on metacortandrolone and metacortandracin in rheumatoid arthritis; antirheumatic potency, metabolic effects, and hormonal properties. *J. Am. Med. Assoc.* **157**, 311–318 (1955).
- Strehl, C. et al. Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: viewpoints from an EULAR task force. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 952–957 (2016).
- Buttgereit, F. et al. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 718–722 (2002).
- Smolen, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 960–977 (2017).
- Miloslavsky, E. M. et al. Development of a Glucocorticoid Toxicity Index (GTI) using multicriteria decision analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 543–546 (2017).
- Buttgereit, F. et al. Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **371**, 205–214 (2008).
- Buttgereit, F. et al. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1275–1280 (2010).
- Buttgereit, F. et al. Low-dose prednisone chronotherapy for rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial (CAPRA-2). *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 204–210 (2013).
- Buttgereit, F. et al. Fosdagrocorat (PF-04171327) versus prednisone or placebo in rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, multicentre, phase IIb study. *RMD Open* **5**, e000889 (2019).
- Kirwan, J. R., Bijlsma, J. W., Boers, M. & Shea, B. J. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1**, CD006356 (2007).
- Buttgereit, F., Smolen, J. S., Coogan, A. N. & Cajoche, C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 349–356 (2015).
- Buttgereit, F., Dejaco, C., Matteson, E. L. & Dasgupta, B. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: a systematic review. *JAMA* **315**, 2442–2458 (2016).
- Boers, M., Kirwan, J. R. & Bijlsma, J. W. American College of Rheumatology treatment guidelines continue to omit guidance on glucocorticoids: comment on the article by Singh et al. *Arthritis Care Res.* **64**, 1622 (2012).
- Saag, K. G. et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **59**, 762–784 (2008).
- Singh, J. A. et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* **64**, 625–639 (2012).
- Singh, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* **68**, 1–25 (2016).
- Smolen, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 964–975 (2010).
- Smolen, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 492–509 (2014).
- Ramiro, S. et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1101–1136 (2017).
- Chatzidionysiou, K. et al. Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1102–1107 (2017).
- Buttgereit, F. & Bijlsma, J. W. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: the picture is shaping up. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1785–1787 (2017).
- Roubille, C. et al. Seven-year tolerability profile of glucocorticoids use in early rheumatoid arthritis: data from the ESPOIR cohort. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1797–1802 (2017).
- Albrecht, K. et al. Clinical remission in rheumatoid arthritis. Data from the early arthritis cohort study CAPEA [German]. *Z. Rheumatol.* **75**, 90–96 (2016).
- Black, R. J. et al. Factors associated with oral glucocorticoid use in patients with rheumatoid arthritis: a drug use study from a prospective national biologics registry. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 253 (2017).
- Albrecht, K. et al. Medical treatment of rheumatoid arthritis in 2014: current data from the German Collaborative Arthritis Centers [German]. *Z. Rheumatol.* **76**, 50–57 (2017).
- Burmester, G. et al. Randomized controlled 24-week trial evaluating the safety and efficacy of blinded tapering versus continuation of long-term prednisone (5 mg/d) in patients with rheumatoid arthritis who achieved low disease activity or remission on tocilizumab [abstract]. *Ann. Rheum. Dis.* **78** Suppl. 2, 84–85 (2019).
- Dejaco, C. et al. 2015 Recommendations for the management of polymyalgia rheumatica: a European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1799–1807 (2015).
- Shbeeb, I., Challah, D., Raheel, S., Crowson, C. S. & Matteson, E. L. Comparable rates of glucocorticoid-associated adverse events in patients with polymyalgia rheumatica and comorbidities in the general population. *Arthritis Care Res.* **70**, 643–647 (2018).
- Hellmich, B. et al. 2018 Update of the EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, 19–30 (2020).
- Strehl, C., van der Goes, M. C., Bijlsma, J. W., Jacobs, J. W. & Buttgereit, F. Glucocorticoid-targeted therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 187–195 (2017).
- Matteson, E. L., Buttgereit, F., Dejaco, C. & Dasgupta, B. Glucocorticoids for management of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **42**, 75–90 (2016).
- van der Goes, M. C. et al. Patient and rheumatologist perspectives on glucocorticoids: an exercise to improve the implementation of the European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1015–1021 (2010).
- Movahedi, M. et al. Oral glucocorticoid therapy and all-cause and cause-specific mortality in patients with rheumatoid arthritis: a retrospective cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* **31**, 1045–1055 (2016).
- Ton, F. N., Gunawardene, S. C., Lee, H. & Neer, R. M. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 464–470 (2005).
- Rizzoli, R. & Biver, E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: who to treat with what agent? *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 98–109 (2015).
- Briot, K., Geusens, P., Em Bultink, I., Lems, W. F. & Roux, C. Inflammatory diseases and bone fragility. *Osteoporos. Int.* **28**, 3301–3314 (2017).
- Ozen, G., Pedro, S., Wolfe, F. & Michaud, K. Medications associated with fracture risk in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1041–1047 (2019).
- Buttgereit, F. Do the treatment with glucocorticoids and/or the disease itself drive the impairment in glucose metabolism in patients with rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1881–1883 (2011).
- Listing, J., Gerhold, K. & Zink, A. The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. *Rheumatology* **52**, 53–61 (2013).
- Stone, J. H. et al. Trial of tocilizumab in giant cell arteritis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 317–328 (2017).
- Buttgereit, F., Brand, M. D. & Burmester, G. R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 363–368 (1999).
- Dineen, R., Stewart, P. M. & Sherlock, M. Factors impacting on the action of glucocorticoids in patients receiving glucocorticoid therapy. *Clin. Endocrinol.* **90**, 3–14 (2019).
- US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02997605> (2019).
- Unizony, S. H. et al. Design of the tocilizumab in giant cell arteritis trial. *Int. J. Rheumatol.* **2013**, 912562 (2013).
- Da Silva, J. A. et al. Safety of low dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: published evidence and prospective trial data. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 285–293 (2006).
- Alten, R. et al. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in patients with rheumatoid arthritis treated with nighttime-release prednisone. *J. Rheumatol.* **37**, 2025–2031 (2010).
- Alten, R., Grahn, A., Holt, R. J., Rice, P. & Buttgereit, F. Delayed-release prednisone improves fatigue and health-related quality of life: findings from the CAPRA-2 double-blind randomised study in rheumatoid arthritis. *RMD Open* **1**, e000134 (2015).
- Alten, R. et al. Morning stiffness response with delayed-release prednisone after ineffective course of immediate-release prednisone. *Scand. J. Rheumatol.* **44**, 354–358 (2015).
- Safy, M. et al. Efficacy and safety of selective glucocorticoid receptor modulators in comparison to glucocorticoids

- in arthritis, a systematic review. *PLoS One* **12**, e0188810 (2017).
52. Buttgereit, F., Bijlsma, J. W. J. & Strehl, C. Will we ever have better glucocorticoids? *Clin. Immunol.* **186**, 64–66 (2018).
  53. Santiago, T. & da Silva, J. A. Safety of glucocorticoids in rheumatoid arthritis: evidence from recent clinical trials. *Neuroimmunomodulation* **22**, 57–65 (2015).
  54. van Sijl, A. M., Boers, M., Voskuyl, A. E. & Nurmohamed, M. T. Confounding by indication probably distorts the relationship between steroid use and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: results from a prospective cohort study. *PLoS One* **9**, e87965 (2014).
  55. Reinau, D. et al. Glucocorticoids and the risk of peptic ulcer bleeding: case-control analysis based on Swiss claims data. *Drug Saf.* **41**, 725–730 (2018).
  56. Blavnsfeldt, A. G. et al. The effect of glucocorticoids on bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized,

controlled trials. *Bone* **114**, 172–180 (2018).

57. Mendoza-Pinto, C. et al. Bone mineral density and vertebral fractures in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-regression. *PLoS One* **13**, e0196113 (2018).
58. Petri, H., Nevitt, A., Sarsour, K., Napalkov, P. & Collinson, N. Incidence of giant cell arteritis and characteristics of patients: data-driven analysis of comorbidities. *Arthritis Care Res.* **67**, 390–395 (2015).

### 利益冲突

F.B. declares that he has received consultancy fees, honoraria, travel expenses and grant support from Horizon Pharma, Mundipharma, Pfizer and Roche. The work of F.B. in the ongoing Rh- GIOP study (Glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with chronic inflammatory rheumatic diseases or psoriasis; NCT02719314) is supported by joint funding from Amgen, BMS, Celgene, Generic Assays, GSK,

Hexal, Horizon, Lilly, Medac, Mundipharma, Novartis, Pfizer, Roche and Sanofi.

### 审稿人信息

*Nature Reviews Rheumatology* thanks P. Verschuere, E. Matteson and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

### 出版说明

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© Springer Nature Limited 2020

翻译: 陈经纬 (南京大学医学院附属鼓楼医院)

审校: 孙凌云 (南京大学医学院附属鼓楼医院)



Reprinted from articles originally published in English in *Nature Reviews Rheumatology* Volume 16 Issue 1-6 © 2020 Springer Nature Limited

This translation is © 2021 by Shanghai Springer Nature Information Consulting Service Co., Ltd. BJ Branch. All Rights Reserved

Translated and distributed by Springer Healthcare. Although great care has been taken in the translation of this publication, Springer Healthcare takes no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.

No part of this publication may be reproduced, transmitted or stored in any form or by any means either mechanical or electronic, including photocopying, recording or through an information storage and retrieval system, without the written permission of the copyright holder. Although great care has been taken in compiling the content of this publication, the publisher and its servants are not responsible or in any way liable for the currency of the information, for any errors, omissions or inaccuracies, or for any consequences arising therefrom. Inclusion or exclusion of any product does not imply its use is either advocated or rejected. Use of trade names is for product identification only and does not imply endorsement. Opinions expressed do not necessarily reflect the views of the Publisher, Editor or Editorial Board. Please consult the latest prescribing information from the manufacturer before issuing prescriptions for any products mentioned in this publication.



RM 408-412, Beijing Ideal Plaza, No. 58 Northwest, 4th Ring Road, Haidian District, 100080, Beijing, China  
+86 10 8341 5020  
[www.springerhealthcare.com](http://www.springerhealthcare.com)

Part of the Springer Nature group

Printed in Mainland China