

HLA - G 与类风湿性关节炎相关关系的研究进展与趋势

陈佳喜 沈 波

人类白细胞抗原 G (human leukocyte antigenG, HLA - G) 属于非经典 HLA I 类抗原, 最早发现表达于母胎界面的绒毛外滋养层细胞, 在胎儿逃避母体异体识别过程中发挥重要作用。HLA - G 具有抑制免疫细胞的功能, 如抑制自然杀伤细胞 (NK) 和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的细胞裂解、抑制 T 细胞增殖, 进一步研究发现它还能调节 Th0 细胞分化转向 Th2 细胞、产生 Treg 细胞。类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜组织炎性增生、关节进行性破坏为特征的慢性炎症自身免疫性疾病。其病因尚不明确, 最近研究发现, 除各种炎症细胞逃避死亡, 异常增生的滑膜组织类似于局限性侵袭生长的肿瘤外, 还有 Th1/Th2 细胞失衡、Treg 细胞减少, 造成关节的破坏。本文探讨它们之间的相关关系。

一、HLA - G 的简介

1. HLA - G 基因和分子结构: HLA - G 基因属于 HLA - I 类基因家族, 定位于人染色体 6p21.3, 包含 8 个外显子和 7 个内含子: 外显子 1 编码信号肽, 外显子 2~4 编码胞外 $\alpha 1 \sim \alpha 3$ 链, 外显子 6~8 编码胞质区。 α 链为糖基化的跨膜多肽, 通过与 15 号染色体编码的 β_2 - 微球蛋白非共价结合, 形成 HLA - G 分子。外显子 6 包含终止密码, 所以大部分外显子 6、7、8 不能翻译, 导致胞质区只有 6 个氨基酸残基, 因此它的自发性内吞明显减少、外源多肽不充分地呈递, 从而证明 HLA - G 的功能不是呈递, 而是抑制各类杀伤细胞。

HLA - G1 ~ HLA - G4 为膜结合型, HLA - G5 ~ HLA - G7 为可溶型。可溶型 HLA - G (sHLA - G) 能进入循环系统发挥全身免疫抑制作用。HLA - G1 是其中最完整的, 与其他 I 类分子就差胞内的缩短的末

尾; HLA - G2 异构体缺失外显子 3, 呈二聚体结构; 而这两者的成熟 mRNA 内若包含内含子 4, 就分别是 HLA - G5 和 HLA - G6; HLA - G3 缺失了外显子 3 和外显子 4; HLA - G4 不包含外显子 4; HLA - G7 是一小的可溶性结构, 包含外显子 2 和部分的内含子 2。位于未转录第八外显子的 14bp 插入缺失的多态性影响其 mRNA 转录表达, 14bp 的插入能降低转录编码 G1、G2、G3^[1]。

2. HLA - G 的表达与调控: 正常人体内 HLA - G 的表达组织高度局限, 除了绒毛膜滋养层细胞外, 还常规存在于成人胸腺髓质、角膜、指甲基质、胰岛、红系或血管内皮的原始细胞及间充质干细胞上^[2~7]。HLA - G 表达的疾病组织有: ①肿瘤及其组织里渗透的抗原呈递细胞 (APC) 表面; ②移植物及其组织里渗透的单核细胞表面; ③HIV 病人的单核细胞或 T 细胞表面; ④炎症组织及其组织里渗透的 APC 表面等。

HLA - G 的表达调控涉及基因表观遗传学、细胞因子或缺氧等的改变: 如 DNA 的去甲基化和组蛋白乙酰化会导致其染色体疏松及转录的激活^[8]; IL - 2、IFN - γ 、IL - 10 等细胞因子也能诱导 HLA - G 分子的表达^[9]; 提高黄体酮的浓度、延长作用时间, 均能增加 HLA - G mRNA 及其蛋白的表达量, 继而后用黄体酮拮抗剂处理后其效应消失^[10]。低氧主要通过低氧诱导因子 - 1 (HIF - 1) 和核因子 (NF) - κ B, 能诱导 HLA - G 阴性的 M8 细胞持续表达 HLA - G 基因, 且 NF - κ B 能加速 HLA - G 的水解脱落^[11]。热休克蛋白也能提高 HLA - G 基因的转录水平。而胞外的 ATP 通过 P2X₇ 受体抑制其在单核细胞的表达^[12]。

HLA - G 基因启动子的 3 个上游调控元件和对应的 3 个反式作用因子结合, 可激活其转录表达如: ①增强子 A 与 NF - κ B 等结合; ②干扰素刺激调节元件 ISRE 与 IFN - γ 等结合; ③SXY 调节元件与二类转录激活因子等结合。但在 220bp 的 HLA - G 启动子序列内, 如果增强子 A、ISRE 和 SXY 元件发生了变异或缺失, 3 条主要的反式激活途径均不能发挥作用。也有研究发现微小 RNA (miRNA) 通过与在 3'

基金项目: 浙江省科技厅公益技术社会发展项目 (2010C33001); 浙江省医药卫生科技资助项目 (2007B225)

作者单位: 317000 温州医学院附属台州医院检验科

通讯作者: 沈波, 主任技师, 电子信箱: shenbkz@yahoo.com.cn

UTP 区域假定的 miRNA 结合位点结合,参与 HLA - G 基因的表达调控。然而全面深入的 HLA - G 转录激活途径仍需继续研究^[13]。

3. HLA - G 抑制各种炎症细胞增生及杀伤活性的途径:HLA - G 能明显抑制 NK 细胞、CD4⁺CD8⁺T 细胞、DC 细胞等的活性。HLA - G 通过两种途径抑制 NK 细胞:①HLA - G 与 NK 细胞上不同的杀伤抑制受体 KIR 结合,直接激活酪氨酸抑制基序,抑制 NK 细胞活性,使 HLA - G 阳性的靶细胞免受 NK 细胞的裂解。NK 细胞上的 KIR 包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 KIR2DL4 和免疫球蛋白样转录分子 ILT - 2 和 ILT - 4;②HLA - G 也可通过靶细胞表面表达 HLA - E 与抑制性受体 CD94/NKG2A 二聚体相互作用,间接抑制 NK 细胞活性。ILT - 2/HLA - G 和 ILT - 4/HLA - G 能有效地竞争 CD8⁺T 细胞与经典的 MHC I 类分子的结合,抑制 CD8⁺T 细胞对靶细胞的裂解作用。sHLA - G 通过与 CD8 分子结合,能上调细胞 Fas L 的表达,诱导活化的 CD8⁺Fas⁺的 T 细胞和 NK 细胞凋亡,并通过一个反馈机制抑制分泌 sHLA - G 的 CD4⁺T 细胞的增殖反应。ILT - 2 和 ILT - 4 也能在 DC 或单核 - 吞噬等细胞胞膜上表达,HLA - G 与之结合后,促进 DC 耐受、抑制单核 - 吞噬细胞的抗原呈递和分泌细胞因子的功能,从而降低其对机体免疫反应的刺激^[14]。

HLA - G 还能介导 Th0 的分化,改变 Th1/Th2 比例,因为 HLA - G 分子在促进 IL - 4 分泌的同时抑制 IFN - γ 和 TNF - α 的释放,诱导其向分泌 Th2 型细胞因子转换。已在恶性肿瘤或器官移植病人的外周血中观察到高水平 HLA - G 表达调节 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,在慢性皮肤炎症如银屑病或皮肤过敏时也有这样的现象。高水平 HLA - G 和 IL - 10 能诱导机体产生 Treg 细胞,从而长期调节机体免疫耐受^[15]。如 IL - 10 能诱导间质干细胞分泌 HLA - G5,然后直接抑制 T 细胞增殖和诱导 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺生成;HLA - G1 转染的淋巴细胞也能诱导免疫耐受细胞生成。

二、RA 的简介

1. RA 的各种免疫活性细胞:①血管内皮细胞表面有大量黏附分子受体,与各种炎症细胞的表面配体连接后介导白细胞的黏附、趋化和回巢,完成了炎症细胞浸润到滑膜组织的最初步骤;②单核 - 吞噬细胞在 RA 患病处大量被激活表达 MHC II 类分子,不仅分泌 IL - 1、IL - 6、IL - 8、IL - 13、IL - 15、IL - 18 等

促炎症因子,肿瘤坏死因子(TNF) - α 、巨噬细胞炎症因子(MIP)和金属蛋白酶(MMP1 ~ 4)等扩大局部或系统的炎症反应;还调节着其他细胞的行为,如使成纤维母细胞在滑膜内膜层分泌大量促炎症因子和蛋白酶,导致软骨的破坏,表现为侵袭样生长,增加对细胞外基质的入侵和加速关节毁坏;③树突状细胞:当免疫复合物刺激 DC 细胞后,分泌的高水平的 IFN α/β 能诱导 B 细胞产生自身抗体;成熟 DC 能激活 RA 滑膜的 CD4⁺T 细胞;在 TNF - α 等炎症因子作用下,DC 能将衍生的内源性自我抗原向 T 细胞的呈递;④NK 细胞在 RA 病人炎症关节处占淋巴细胞的 20%,CD56、CD94/NKG2A 强阳性,但很少表达 CD16 和 KIR 受体。参与清除病毒感染或转化的细胞,刺激 T 细胞和 B 细胞的免疫功能,上调表达化学因子和黏附分子受体参与将炎症细胞引入 RA 关节,还通过一系列途径可激活单核细胞、DC 细胞、破骨细胞等;⑤RA 炎症关节处 B 淋巴细胞不仅分泌的类风湿因子,抗瓜氨酸抗体,抗核因子抗体、抗角蛋白抗体等,还可与 T 细胞及巨噬细胞一样产生炎症因子 TNF - α 和趋化因子 TNF - β 调节免疫细胞的运输和扩散,通过其自身具有的抗原呈递细胞能力也可激活 B 细胞本身;⑥RA 自身免疫的激发和延续就是 CD4⁺T 细胞对 APC 呈递的抗原多肽的自身反应造成的。而 RA 滑膜组织中血管内皮细胞、巨噬细胞、DC 细胞、NK 细胞、B 细胞甚至滑膜成纤维母细胞都可作为 APC,高度表达 HLA II 类分子,和抗原结合后以抗原肽 - MHC 分子复合物形式表达,提供 T 细胞 TCR 识别。用 CD4⁺单克隆抗体处理或 HIV 感染后均可使 RA 炎症的活动有所缓解。这些都表明,CD4⁺T 细胞在 RA 发病中起着重要作用。

2. RA 的肿瘤样侵袭:自身免疫和炎症的机制能部分解释 RA 的特征,但在滑膜炎相对不明显的情况下,关节破坏却持续发生。类似于其他肿瘤疾病,RA 的滑膜细胞存在去分化现象、失去接触抑制,已知其 T 细胞通过过表达 GADD45 β 抗凋亡,B 淋巴细胞通过 BAFF 途径促进增殖;也可见到新血管的增生和侵入,它们表达更多的黏附分子和细胞因子吸引新细胞介入到炎症关节;癌基因 ras、myc、myb、p53、HPRT、线粒体 DNA 等的突变和微小卫星的不稳定性也广泛存在 RA 滑膜。但基因异常大多认为是由于转录后突变产生的,而氧化反应和 NO 增加等才是导致基因特征性毁坏的重要原因。因 RA 炎症部位细胞杀伤活性、氧化反应强,低氧微环境产生的大量 NF - κ B

介入炎症细胞的生存、增殖和分化,增强滑膜炎;在 RA 关节腔多种因素作用下低氧诱导因子 HIF-1 的表达也增加^[16,17]。综上所述,RA 类似一局部的“良性肿瘤”。而研究如何抑制 RA 关节处这些炎症细胞的免疫活性,抑制它们的增殖及诱导耐受性细胞生成,已成为治疗 RA 的共同目标。

3. RA 病人 CD4⁺T 细胞的分化调节:随着对 RA 发病机制研究的不断深入,T 淋巴细胞亚群的紊乱在 RA 关节局部炎症和全身免疫反应过程中发挥的重要作用。目前公认的是,RA 患者体内占主导的 T 淋巴细胞是 CD4⁺T 细胞,分为促炎症 Th1 和 Th17 细胞、抗炎症 Th2 和 Treg 细胞。(1)Th1/Th2 与 RA 的关系:活化的巨噬细胞或 DC 细胞分泌 IL-12 与 IL-18,主要通过活化 STAT4 蛋白促进 Th0 细胞向 Th1 分化,分泌 INF- γ 、IL-2、TNF- α 等细胞因子,激活细胞毒 T 细胞、巨噬细胞吞噬杀伤靶细胞的作用;肥大细胞、嗜碱性粒细胞等分泌 IL-4,主要通过活化 STAT6 蛋白促进 Th2 分化,分泌 IL-4、TGF- β 、IL-10 等细胞因子而促进体液免疫反应。RA 患病关节处 Th1/Th2 的比值明显升高,激活滑膜中的巨噬细胞和成纤维母细胞,使关节内 IFN- γ 生成增多、IL-4 水平下降、炎症反应加剧,导致滑膜下层内皮细胞肿胀、内皮小静脉形成等病变。而 Treg 细胞表达下降使 Th1 细胞占优势更明显,加剧 RA 的炎症过程。Th1 细胞及其因子被认为能防卫胞内病原菌的感染导致自身免疫病。Th2 细胞及其因子能防卫蠕虫感染,导致过敏性疾病及哮喘。Th1/Th2 型细胞及其因子在正常情况下相互制约,它们之间的平衡决定着机体细胞免疫与体液免疫之间的平衡,一旦这种动态平衡被打破将导致疾病的发生,如急性肝炎及慢性重症肝炎时 Th1 型细胞因子增多,加强了细胞免疫,有利于清除病毒,但加重肝脏炎症。早有研究发现癌细胞变部位存在 Th2 型反应增强,但良性肿瘤则以 Th1 型细胞反应占优势,从而提出恶性肿瘤细胞存在 Th2 型因子优势表达。对过敏性疾病和自身免疫性疾病的流行病学和机制进行研究,发现这两者有很有趣的联系:自身免疫疾病能保护形成过敏性疾病,过敏性疾病也能防止自身免疫疾病的形成。从而提出一种 Th1/Th2 模型:炎症激活的 Th1 细胞能抑制过敏的形成,过敏也能抑制自身免疫的严重程度。流行病学发现 RA 患者中女性患病率是男性的 3 倍,女性 RA 患者在妊娠期症状明显减轻,而绝经期加剧或分娩后恶化,推测因雌激素抑制细胞免疫,孕激素能刺激 Th1

向 Th2 型转化。而产后 RA 的复发可能是因为喂奶导致下丘脑-垂体-肾上腺功能下降,催乳素合成增多,极大地增强了 Th1 细胞功能。大量研究发现纠正 Th1/Th2 比例失调后能有效治疗 RA,如大多抗风湿药(DMARDs)通过 Th1/Th2 模型改善病情,如甲氨蝶呤能纠正 RA 患者血清中 Th1/Th2 细胞及因子的不平衡;来氟米特和环孢素通过阻断 NF- κ B 的活化和基因表达,抑制 T 细胞向 Th1 分化;他克莫司处理或经雷公藤修饰的 DC 也能诱导其向 Th2 分化,均达到缓解或治愈 RA 炎性目的。(2)Th17 和 Treg 细胞与 RA 的联系:Th17 和 Treg 细胞不仅在分化发育中表现出相互抑制,其功能发挥也相互抑制。如 TGF- β 能促进 Th17 和 Treg 细胞都分化,但 IL-6 只促进 Th17 分化,却抑制 Treg 细胞生长。Treg 细胞特异表达转录因子 Foxp3、具有免疫负性调节功能,可通过细胞间接触抑制及分泌抑制性细胞因子(如 IL-10、TGF- β)等途径发挥抗炎和维持自身免疫耐受的作用,在 RA 等多种自身免疫性疾病及过敏性疾病中均存在 Treg 的功能缺陷或数量减少^[18]。Th17 细胞高分泌 IL-17,通过刺激 FLS 分泌基质金属蛋白酶(MMP)-1、与 IL-1 β 和 TNF- α 协同诱导核因子- κ B 受体激活因子配体等途径参与 RA 关节的骨质破坏及周围组织的炎性损伤,促进自身免疫性或过敏性疾病的进展。

三、HLA-G 与 RA 间的相关关系

研究发现 RA 病人外周血 sHLA-G 和 Treg 细胞显著低于在正常对照。提示了低的免疫抑制状态允许 RA 患处巨噬细胞、DC 细胞、NK 细胞、B 细胞、T 细胞等炎症细胞类似肿瘤样增生,且 Th1/Th2 细胞比例失衡平衡及各类促炎症因子也都极大促进 RA 的发展。很多已实验证明,若下调这些炎症细胞在 RA 关节处的免疫活性、诱导 Treg 细胞生成或调节 Th1/Th2 细胞的平衡都能明显改善和治疗 RA。而 HLA-G 不仅能抑制 NK 细胞和 CTL 介导的细胞裂解、抑制 T 细胞增殖,通过促进 Th2 细胞增生降低 Th1/Th2 的比值,还能增加 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 的 Treg 细胞生成,它们之间如此密切的关系值得我们更深入地研究。如 RA 病人用甲氨蝶呤治疗后,HLA-G 的表达明显提升;对 HLA-G 的 14bp 插入缺失基因型分析发现 -14bp/-14bp 基因型病人表达的 sHLA-G1 最高的浓度;而对甲氨蝶呤反应产生 HLA-G1 越多的病人,临床治疗效果越好。

大胆推测由于过度甲基化、胞外的 ATP 大量表

达且缺乏 IL - 10 表达等的影响下,导致 RA 病人 HLA - G 表达量明显比正常对照低,从而各类炎症细胞大量增生,表现为肿瘤样侵袭;促炎症因子大量分泌;Th0 的分化偏向 Th1 细胞且 Treg 细胞减少等,因此要治疗 RA 就必须有足够多的 HLA - G 抑制患病处各类炎症细胞的活性。而即使 RA 患处存在低氧 HLA - G 诱导剂 HIF - 1 和 NF - κ B,但在可能 220bp 的 HLA - G 启动子序列突变而没有激活作用,也可能这种诱导效果较弱,产生的 HLA - G 不够多,不能显著抑制 RA 患病处的炎症细胞。而怀孕期间因黄体酮等激素表达增加使血液循环中 HLA - G 明显上升,因此渗入到关节内 HLA - G 也将明显升高,从而抑制各类炎症细胞的杀伤作用、纠正 RA 体内 Th1/Th2 比例的失衡和 Treg 细胞的缺失,缓解 RA 症状。

四、结 语

综上所述,恶性肿瘤、过敏性疾病、正常妊娠等都是“Th2 现象”,且这些情况下 HLA - G 的表达都是超过正常水平的;RA、急性肝炎、良性肿瘤等都是“Th1 现象”,而在这些情况下 HLA - G 的表达一般是低于正常水平的。也已证实 RA 女性患者怀孕期间的症状明显缓解,RA 病人并发哮喘等过敏性疾病时 RA 症状也消失,高度怀疑 RA 并发恶性肿瘤时,RA 的症状也会改善。也支持提出的 Th1/Th2 模型:激活的 Th1 细胞能抑制 Th2 细胞过量而导致疾病,Th2 细胞能抑制 Th1 细胞过量形成疾病的严重程度。因为在恶性肿瘤、过敏性疾病、妊娠等情况下 HLA - G 的高水平表达:不仅仅能纠正 RA 体内 HLA - G 的分泌过少;抑制各类炎症细胞的杀伤活性及其肿瘤样增殖,诱导机体产生大量的 Treg 细胞;还调节 Th0 细胞分化转向 Th2,中和 RA 中 Th1 细胞过量表达;多方面联合作用下明显改善减轻 RA 症状。因此 HLA - G 高水平表达很可能就是妊娠期、服用避孕药(雌激素、孕激素)或抗风湿药(甲氨蝶呤)等缓解、治疗 RA 的根本原因。

研究如何抑制 RA 各类炎症细胞增生及其杀伤活性,减少炎症因子的分泌或用抗体中和,纠正 Th1/Th2 比例的失衡,使 Treg 细胞上升等都是如今治疗 RA 的共同目的。因此研究如何利用 HLA - G 的调节机制上调 HLA - G 表达,诱导体内产生大量膜结合或可溶性 HLA - G 的生成,纠正 RA 患者体内 HLA - G 表达的不足,将会给 RA 的治疗带来全新方案。

参考文献

1 Rousseau P, *et al.* The 14 bp deletion - insertion polymorphism in the

- 3'UT region of the HLA - G gene in - fluences HLA - G mRNA stability[J]. Hum Immunol, 2003, 64 (11):1005 - 1010
- 2 Laura Crisa, *et al.* Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA - G molecule with fetal trophoblasts[J]. J Exp Med, 1997, 186(2):289 - 298
- 3 Le Discorde M, *et al.* Expression of HLA - G in human cornea, an immune - privileged tissue[J]. Hum Immunol, 2003, 64 (11):1039 - 1044
- 4 Taisuke Ito, *et al.* Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2005, 125(6):1139 - 1148
- 5 Vincenzo Cirulli, *et al.* The Class I HLA Repertoire of Pancreatic Islets Comprises the Nonclassical Class Ib Antigen HLA - G[J]. Diabetes May, 2006, 55(5):1214 - 1222
- 6 C Menier, *et al.* Discorde Erythroblasts secrete the nonclassical HLA - G molecule from primitive to definitive hematopoiesis[J]. Blood, 2004, 104(10):3153 - 3160
- 7 Nasef A, *et al.* Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA - G[J]. Transplantation, 2007, 84(2):231 - 237
- 8 Gobin SJ, *et al.* Transcriptional regulation of the MHC class b genes HLA - E HLA - F HLA - G[J]. Hum. Immunol, 2000, 61(11):1102 - 1107
- 9 Philippe Moreau, *et al.* IL - 10 selectively induces HLA - G expression in human trophoblasts and monocytes[J]. International Immunology, 1999, 11(5):803 - 811
- 10 Shang - mian Yie, *et al.* Progesterone enhances HLA - G gene expression in JEG - 3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro[J]. Human Reproduction, 2006, 21(1):46 - 51
- 11 Gaël Mouillota, *et al.* Hypoxia modulates HLA - G gene expression in tumor cells[J]. Human Immunology, 2007, 68(4):277 - 285
- 12 Roberta Rizzo, *et al.* Extracellular ATP acting at the P2X7 receptor inhibits secretion of soluble HLA - G from human monocytes[J]. The Journal of Immunology October 1, 2009, 183(7):4302 - 4311
- 13 Zheng Tana, *et al.* Allele - specific targeting of microRNAs to HLA - G and risk of asthma[J]. The American Journal of Human Genetics, 2007, 81(4):829 - 834
- 14 Kim R, *et al.* Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape [J]. Immunology, 2007, 121(1):1214
- 15 Selmani Z, *et al.* Human leukocyte antigen - G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ regulatory T cells[J]. Stem Cells, 2008, 26(1):212 - 222
- 16 Simmonds RE, *et al.* inflammation and arthritis; NF - kappaB and its relevance to arthritis and inflammation[J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(5):584 - 590
- 17 Taylor PC, *et al.* Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. CurrOp in Rheumatol, 2005, 17 (3):293
- 18 Qiao M, *et al.* CD4 + CD25 + regulatory T cells render naive CD4 + CD25 - T cells anergic and suppressive [J]. Immunology, 2007, 120 (4):447 - 455

(收稿:2011 - 04 - 27)

(修回:2011 - 05 - 10)