

2019年7月刊
总 117 期

生命奥秘

2019/7
LIFEOMICS

自身免疫性疾病

AUTOIMMUNE
DISEASE



无奇不有
生命世界
解读生命
走进科学

目录 CONTENTS

专题：自身免疫性疾病

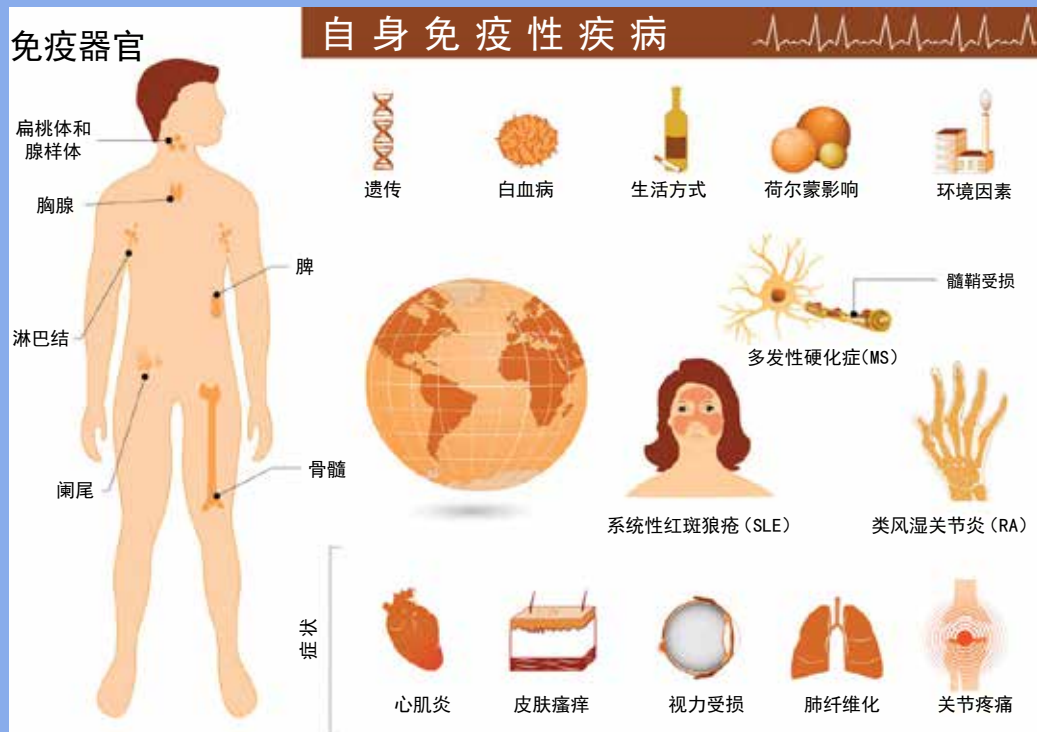
概念及简介：自身免疫性疾病	02
遗传性研究：人体自身免疫病遗传学的现状及未来发展方向	06
一、简介	06
二、主要组织相容性复合体（The Major Histocompatibility Complex Region）	10
三、非HLA易感位点	12
四、人种的差异	16
五、尚未阐明的遗传力	18
六、功能研究：编码突变、基因表达及表观遗传学	18
七、总结：该怎么做才能达成这个目标	23
疗法：抗原特异性疗法治疗自身免疫性疾病	24
一、耐受DNA疫苗接种或移植	30
二、基于蛋白质和肽的免疫疗法	32
三、基于纳米颗粒和细胞的免疫疗法	36
四、讨论	41

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

自身免疫性疾病

概念及简介： 自身免疫性疾病



图片来源: <https://www.sepalika.com/living-well/autoimmune-diseases-reversing/>

什么是自身免疫性疾病？

自身免疫性疾病会导致身体的免疫系统错误地攻击体内的健康细胞，病人的身体因此会产生抗体，以摧毁可能对身体有害的外来物质。因自身免疫性疾病而产生的抗体攻击的是健康细胞，而不是外来物质，从而引起炎症。

这种疾病可能会影响身体的任何部位，包括皮肤、器官、血液、消化系统和结缔组织。自身免疫性疾病的类型众多，包括红斑狼疮、乳糜泻和糖尿病等100多种疾病。

哪些因素会增加自身免疫性疾病的发病风险？

- 自身免疫性疾病的家族史
- 女性
- 怀孕
- 暴露于阳光或某些化学物质
- 某些药物，如一些抗生素和胆固醇药物
- 病毒或细菌感染

自身免疫性疾病的症状和体征有哪些？

体征和症状取决于自身免疫性疾病的类型和受影响的身体系统。症状可能是轻微或严重的，可能会因为各种因素而出现或消除。如果患有影响多个身体系统的自身免疫性疾病，可能会出现以下症状：

- 某个部位或关节发红、发热或肿胀
- 关节疼痛、僵硬或运动范围缩小
- 疲劳、虚弱或肌肉疼痛
- 发烧
- 体重增加或减轻，或没有胃口
- 腹泻、胃痉挛或腹胀
- 脱发
- 皮疹或皮肤颜色发生变化
- 眼睛发红、发炎

如何诊断自身免疫性疾病？

- 通过血液测试来测量体内的炎症量或寻找特异性抗体。测试也可能显示感染迹象。
- 通过X射线、CT或MRI检查关节或器官是否有损伤。X射线也可用于检查心脏或其它可能受影响的器官。进MRI室检查，请勿携带任何金属物件。金属会影响成像质量、损坏机器，甚至伤害人体。如果身体内或身体上有任何金属，务必告知医务人员。
- 活组织检查是用于采集关节液或组织样本的程序。它可以测试样品的感染情况、炎症情况或其它症状。

如何治疗自身免疫性疾病？

- 使用药物补充身体无法产生的甲状腺激素、胰岛素或其它激素。也可以通过服用药物，以降低免疫系统对健康细胞的攻击，或减轻肌肉、关节的炎症。可能需要使用外用乳膏或乳液来控制皮疹以及其它皮肤症状。
- 可给予处方止痛药。需咨询医疗保健提供者如何安全服用该药。
- 布洛芬等非甾体类消炎药（NSAID）有助减轻肿胀、疼痛和发烧。该药为非处方药。部分患者服用NSAID后可能会出现胃出血或肾脏

问题。如果您在服用血液稀释剂，请向您的医疗保健提供者咨询NSAID对您是否安全。请务必阅读药品标签，并按照说明使用。

- 对乙酰氨基酚可减轻疼痛和发烧。该药为非处方药。咨询医生服用量和服用次数。按照说明服用。如果服用不当，对乙酰氨基酚会损害肝脏。
- 类固醇有助于减轻肿胀和缓解疼痛。
- 如果您的血液受到影响，可能需要输血。

怎么做才能控制自身免疫性疾病？

- **适当休息。**如果您因疼痛或其它症状而无法入睡，请咨询医务人员。如果关节僵硬或疼痛，请减少活动。您的医疗保健提供者可能会建议使用支撑装置，如拐杖或夹板，让关节得到休息。
- **多吃健康食品。**健康食品包括水果、蔬菜、瘦肉、鱼和低脂乳制品。与您的医疗保健提供者或营养师合作，制定健康的膳食计划。如果您的消化系统受到自身免疫性疾病的影响，您可能需要停止食用某些食物。
- **按照指示对身体进行专业治疗。**物理治疗师可以帮助您制定锻炼计划。锻炼可能有助于增加你的活力。锻炼还有助于使僵硬的关节灵活，增加运动范围。当您突发疼痛或肿胀时，职业治疗师可以指导您进行日常活动。

● **禁烟。**尼古丁会损伤血管，使您的症状更难控制。如果您目前正在吸烟，并需要戒烟帮助，请咨询您的医疗保健提供者。电子烟或无烟烟草仍含有尼古丁。在使用这些产品之前，请咨询您的医疗保健提供者。

● **与您的医疗保健提供者讨论怀孕问题。**如果您是女性并打算怀孕，请咨询您的医疗保健提供者。您或您的宝宝可能有并发症的风险。您可能需要等到疾病得到控制或您的药物治疗结束后再怀孕。您可能因为疾病而怀孕困难。您的医疗保健提供者可能会向您提供增加怀孕机率的方法。

● **管理压力。**压力可能会减缓康复速度，并引发疾病。学习控制压力的方法，例如放松、深呼吸或听音乐。

症状出现时，该怎么做才能控制症状？

很多因素会触发症状，这些因素包括压力、寒冷天气和阳光。您的医疗保健提供者可以帮助您创建管理计划，其中包括突然发病的应急处理。迅速采取治疗措施，可以帮助预防严重疾病。

- 按指示冰敷或热敷。冰敷有助于减轻疼痛和肿胀，并可能有助于防止组织损伤。使用冷

敷垫，或将碎冰放入袋中。用毛巾盖住，每小时在疼痛部位冷敷15至20分钟，或遵医嘱。热敷有助于减轻疼痛和肌肉痉挛。每2小时或按照指示在该部位施加热敷包20分钟。

- 将疼痛区域抬高到心脏以上位置。抬高可以帮助减轻肿胀和疼痛，尤其是关节。尽可能经常抬高疼痛部位。

何时应该立即寻求护理？

- 有剧烈疼痛或肿胀。
- 发烧，伴有僵硬和疼痛。
- 尿液、粪便或呕吐物中有血液。
- 严重腹痛。
- 感到困惑、头晕或晕眩。

何时应该联系医疗保健提供者

- 出现新的症状。
- 排尿量减少。
- 鼻子或牙龈出血。
- 容易瘀伤。
- 您对自己的病情或护理有疑问或顾虑。

遗传性研究： 人体自身免疫病遗传学 的现状及其未来发展方向

随着大规模遗传学研究工作的开展，研究人员在人体自身免疫病（Human autoimmune disease）遗传学方面取得了极大的进展。近十年来，由于有了高通量基因分型（high throughput genotyping）技术和相应的分析技术，科研人员可以对数千名患者及对照者进行全基因组研究，并获得了大量的健康数据。这些研究工作已经发现了数百个非HLA位点，同时也发现了许多与多种自身免疫病易感性有关的HLA突变。表达数量性状位点（expression quantitative trait loci, QTL）、染色质结构变异（包括组蛋白标志物、Dna酶I敏感性、染色质抑制区域和转录因子结合位点）等后续的基因表达相关研究也进一步完善了这些位点的相关信息。将这些信息整合起来，至少能部分解释，某些遗传突变与人体自身免疫病之间的关系。就与人体自身免疫病有关的遗传因素（hereditary factors）和功能联系（functional connections）来说，尽管我们目前掌握的信息还不够全面，但这一定会帮助我们更好地认识与人体自身免疫病有关的关键信号通路，以及异常的免疫调控机制。进一步发现并认识这些功能突变，可以让我们开发出新的药物和个性化医疗手段，并根据每位患者自身独特的分子表型和遗传变异情况，为他们制定出最完美的治疗方案。

一、简介

哪些基因是哪种自身免疫性疾病的易感基因，我们对这一问题在过去十年间有了更深入的认识。这主要归功于全基因组关联分析（genome-wide association studies, GWAS），以及其它试验技术和数据分析手段的进步。可是即便如此，还是有一多半的常

见自身免疫性疾病的遗传力（heritability）我们不得而知，在已知的那一小半遗传风险因素中，接近一半都与HLA有关。不过我们对于具有显著统计学差异的（有一些例外情况）、真正有功能的变异（functional variants）还是知之甚少。本文会介绍该研究领域的最新进

展，并且会针对几个特别的要点给出具体的例子，也会指出当下的不足，以及未来发展的潜力（有助于我们认清自身免疫性疾病的病理遗传学机制，帮助我们更好地诊治这类疾病）。

本期刊物还介绍了其他几位来自不同领域的专家对自身免疫性疾病的详细观点。图1介绍了GWAS研究及测序研究的概况，我们会在后面的章节中进行细致的探讨。

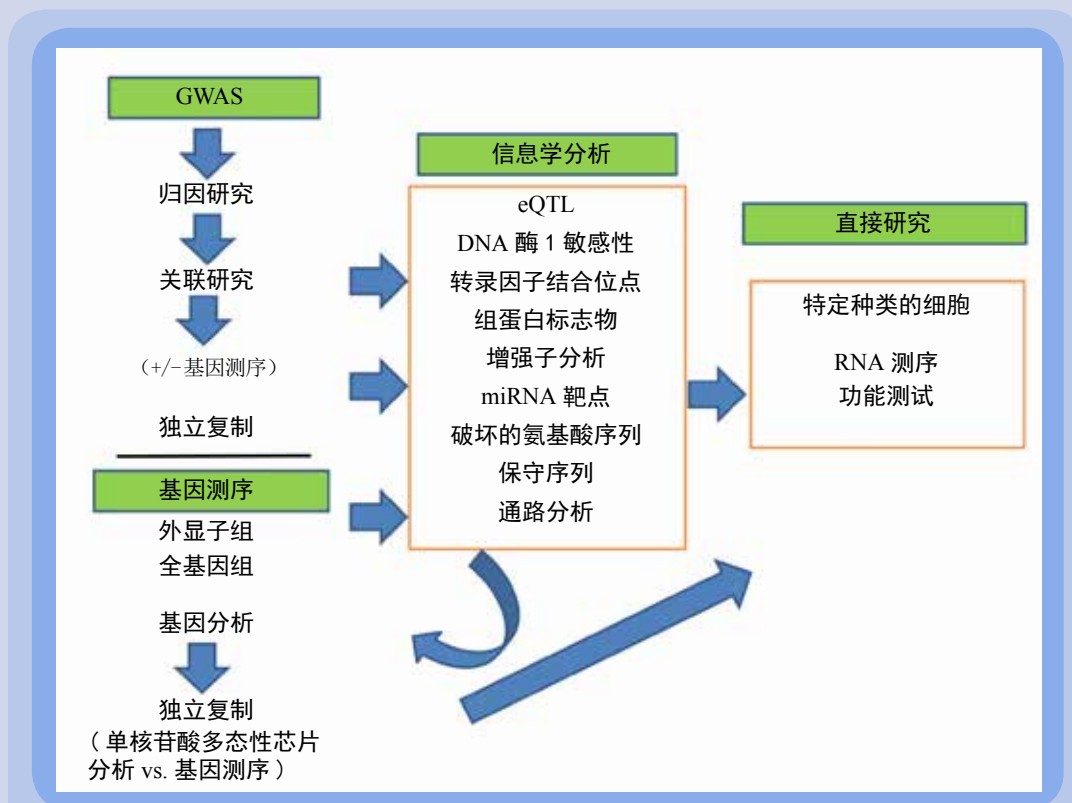


图1 对复杂自身免疫性疾病的常规遗传学分析路径。在发现可疑位点阶段，归因研究和复制研究都对GWAS研究大有帮助。复制研究在某些情况下，只会局限于那些已经在之前的研究中被明确的、与疾病显著相关的信号通路上的某些基因（位点）。这也适用于通过测序研究来发现非常见突变位点，这些位点的效力也能够部分通过有限的、复制研究得来的信号通路信息加以明确。eQTL（expression quantitative trait loci）：表达数量性状基因位点。

1. 遗传力 (Heritability)

针对类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、1型糖尿病 (type 1 diabetes, T1D)、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 和原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 等自身免疫性疾病的流行病学研究都发现, 这些疾病具有明显的遗传倾向。这些研究发现, 同卵双胞胎 (monozygotic twin) 都患病的几率要比异卵双胞胎 (dizygotic twin) 高。患者兄弟姐妹的患病率也要比普通入更高。虽然这些研究中绝大多数都不是真正的人群研究, 可能会存在偏倚, 但是研究结果还是值得关注的。

比如, SLE、T1D、乳糜泻和PBC等自身免疫性疾病比RA和MS等其它一些自身免疫性疾病更多见于家族患者。再比如, 虽然同卵双胞胎在自身免疫性疾病的患病风险上明显高于异卵双胞胎, 但是总体来看, 同卵双胞胎的患病风险还是不到50%。这说明, 肯定还存在其它相关作用因素, 比如环境因素。虽然利用遗传因素可以帮助我们明确与发病机制相关的重要因素, 但是这些遗传因素只能预测表型。我们目前也明确了一些环境因素, 比如吸烟与类风湿性关节炎的关系, 但是还有更大的未知领域亟待去开发。

2. 发现自身免疫性疾病易感遗传位点的常规方式

目前主要用来发现自身免疫性疾病易感遗传位点的方法就是GWAS。虽然在进行GWAS分析之前, 我们已经通过关联研究, 或者混合作图 (admixture mapping) 等其它方法确定了一些人体内不是那么重要的HLA位点和少数高危位点, 但是GWAS技术出现之后, 这些自身免疫病易感位点的数量就呈指数增长趋势, 现已超过了200个。GWAS技术能够让我们以非常高的效率, 准确地对SNP进行基因分型鉴定。与此同时, HapMap等大型研究项目的开展, 也帮助我们在不同种族人群中发现了数十万个SNP位点。GWAS研究的成功, 主要归功于它在实际操作中的优势, 即能够对大量样本和人群进行研究, 因为决定关联研究 (association study) 成败的就是样品数。这

些研究有一个非常重要的指标, 即是否有足够数量的、可供进行统计学分析的亚组对照人群 (样本)。最常用的统计分析方法就是逻辑回归方法 (logistic regression)。在某些研究中, 也仅会考虑大陆人口的差异 (continental population differences), 但是对于大部分因为没有发现的分层差异 (stratification differences) 而导致的2类误差 (假阳性), 已经被减少到最小了。实际上, 在很多研究中使用的都是公开发表的对照基因型数据, 并没有专门设置对照组。这是值得注意的一点, 因为这有可能会增加研究效力 (减少1类误差, 即假阴性), 通过对同质性更高的人群开展研究, 明确易感突变位点, 我们将在后文继续探讨亚结构人群的问题。由于GWAS技术主要依

赖已发现SNP与实际致病突变之间的连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 现象, 所以目前主要应用于判断常见突变位点, 即最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 大于0.05的位点, 以及常见疾病关系的研究工作当中。Illumina和Affymetrix公司的技术平台是最常用的基因分型技术平台, 再搭配目前常用的分析软件, 就可以准确地判断这些MAF>0.05的位点; 另外近期还出现了一些准确率更高的软件。

GWAS技术及其它关联研究技术还有一个非常重要的指标, 那就是对基因序列差异准确的基因型填充能力 (impute), 这些序列都是使用目前的基因分型鉴定平台无法直接进行基因分型分析的序列。这种归因操作主要基于强大的软件, 这些软件能够在给定的条件下, 对根据含有缺失信息的参考基因组数据而确定的不同基因分型标志物 (genotyped markers) 的序列差异, 进行准确的鉴定。这种分析方法主要依赖共享的位点信息 (几乎所有常用于基

因分型技术平台的SNP的信息都存在于参考基因组数据库里) 和突变信息数据库, 如<http://www.1000genomes.org>等。随着千人基因组测序项目 (1000 genome sequencing study) 3期工作的结束 (<http://www.1000genomes.org>), 我们现在已经拥有了不同种族人群的数据, 可用于进行基因型填充工作。这些信息可以向我们指出可疑的非同义损害变异体 (non-synonymous damaging variant), 或者是在另一些情况下的、可疑的非编码变异体 (non-coding variant)。我们判断这些变异的依据可以根据表达的数量性状 (expression quantitative trait)、转录因子的结合位点、DNA酶敏感性 (DNase sensitivity) 或组蛋白标志物 (histone mark) 等其它特征。这些特征在特定组织或细胞系中得到了阐明 (详见第6节的进一步讨论)。更重要的是, 这种方法也可以用来确定HLA的经典决定因素 (classical determinant) 和氨基酸。

3. 表型分析 (Phenotype)

任何关联研究的重要目的之一就是确定疾病的表型。从理论上讲, 对表型的定义越清晰、越明确, 1类误差被最小化的可能性就越大。这是因为如果纳入那些未受影响的个体, 或患有其他自身免疫性疾病的人, 可能会增加分析样品群体的异质性, 这就会降低能够导致一种特殊表型的高危风险变异的效应力。不过, 在实际操作过程中, 对于那些缺乏全面信息的 (比如缺少发病年龄和特异性自身免疫抗体等信息) 病例, 我们可能也会将其纳入研究样品当中, 因为与更加严格的纳入标准相比, 这种操作也可以增加样本量, 从而增加发现可

疑位点的可能性。有些自身免疫病具有非常明确的特征, 可以增加我们发现遗传易感位点的几率。SLE就是一个非常典型的例子, 与抗双链DNA抗体呈阴性的患者相比, 抗双链DNA抗体呈阳性的患者存在多种易感等位基因的比值比 (odds ratios, OR) 明显升高的现象。很多类风湿性关节炎研究也发现, 抗环瓜氨酸肽抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-CCP) 呈阳性的患者也存在类似的高风险位点。不过, 也有一些研究发现, 仅有anti-CCP抗体呈阳性的类风湿性关节炎患者, 体内存在某些类风湿性关节炎高危遗

传位点的几率反而更低，这可能是由于研究的样本数太少，所以降低了这些位点的效应力。同样，如果某个SLE研究纳入患者时，要求所有患者必须满足美国风湿病学会（American College of Rheumatology）提出的11项标准中的4条标准，那么该研究一定会漏掉很多可疑位点，因为能够入选的患者人数肯定会很少。

对表型的定义有点类似于当初对哺乳动物物种定义之争，不过随着多年前遗传疾病分类学（nosology）的发展，这个问题已经得到了解决。然而，对于某些自身免疫性疾病，“亚型”的定义可能是至关重要的。在一个重症肌无力（myasthenia gravis）的研究工作中，是根据发病年龄，还是根据胸腺（thymomas）

是否缺乏来划分疾病，就非常关键。不到45岁就发病的患者，与50岁以后才发病的患者相比，HLA基因易感性分析的结果则截然不同。此外，在早发重症肌无力（EOMG）患者中观察到的非HLA高危基因中，TNIP1基因的风险最高；但是在迟发性重症肌无力（LOMG）患者中则没有发现该基因的作用。

随着研究的不断深入，肯定还会有更多的研究关注内在表型（endophenotype）问题，比如疾病的临床表现（manifestations）、严重程度（severity）和死亡率（morbidity）等。比如就有人认为，某个特殊位点与SLE所导致的肾病（nephropathy）有关。这类研究就会纳入预后很差，或者病情非常严重的患者。

二、主要组织相容性复合体（The Major Histocompatibility Complex Region）

除了极少数情况之外，人类主要组织相容性复合体（MHC）中的基因HLA是所有自身免疫性疾病的高危基因。值得注意的几点是：1) 在HLA区域中，往往不止一两个相关信号，甚至有三个，这些信号要强于来自该区域以外位置的任何单个信号；2) 最近的研究表明，大多数最强的信号都来自经典的HLA决定簇（classical HLA determinant），而不是来自单一的SNP；3) 有一些研究已经发现了HLA决定簇之间的上位基因（epistasis）；4) 不同的HLA特异性与不同的自身免疫性疾病有关。

对于大多数以自身抗体为主要病理特征的自身免疫性疾病而言，最明确的关联就是与MHC II类基因（HLA D区域特异性）的关系，其中就包括了SLE、RA、T1D和乳糜泻等疾病。对于那些不是特别强调自身抗体特征的疾病，如强直性脊柱炎（ankylosing

spondylitis）、银屑病（psoriasis）和白塞氏病（Behcet's）等，则大多数与MHC I类基因，如HLA-A、HLA-B和HLA-C等有关。然而，情况并非总是如此。有一个最知名的例外就是早期发病的重症肌无力（early onset form of myasthenia gravis, EOMG）。该疾病的特点是抗乙酰胆碱脂酶受体抗体（anti-acetylcholinesterase receptor antibodies）呈阳性。这种疾病最明确的相关基因就是HLA-B8这种MHC I类基因，而不是DR81*03，后者与HLA-B8之间存在连锁不平衡情况。对于自身抗体不明显的自身免疫性疾病，相反的例子是，发现DR81*11这种MHC II类基因与溃疡性结肠炎（ulcerative colitis）和克罗恩病（Crohn's disease）有密切的关系。最近，研究人员在DQA1基因中发现有一些特异性氨基酸残基与特发性贡门失弛缓症（idiopathic

achalasia) 联系密切, 现在认为这种少见的疾病也是一种自身免疫性疾病。需要注意的是, 有证据表明在这种情况下, 能够识别I类抗原的CD8细胞可能也具有潜在的作用。此时, CD8细胞能够分泌 γ 干扰素 (IFN- γ), 诱导B细胞进行类型转换, 或在某些情况下发挥辅助功能, 而并非像其它情况下那样, 发挥细胞介导的细胞毒性作用。

虽然具体的联系是多种多样的, 但总体而言, 大量研究都发现, 特定的经典决定簇或特定的氨基酸, 都与特定的疾病相关。因此, 与RA最明确相关的“共享表位 (shared epitope)”——其中在第三个超可变区 (hypervariable region) 存在共享特定氨基酸残基的DRB1决定簇, 这就解释了为什么HLA与该疾病的关系最明确。但是, 同样的氨基酸残基却与大多数其它自身免疫性疾病没有很强的联系。与类风湿性关节炎和共享表位 (主要是DRB1*04决定簇) 具有强关联关系不同的是, MS与DRB1*1501的关系最明确, SLE与DRB1*0301的关系最明确, DRB1*08则和PBC的关系最明确。这些相关性要比那些利用GWAS研究发现的MHC SNP更明确。条件分析 (conditional analyses) 研究则进一步证实了这些试验结果。至少对包括T1D在内的一些自身免疫性疾病而言, HLA的总体遗传力, 即使是占主导地位的HLA相关基因, 也是非常复杂的。大量针对T1D相关单倍体 (haplotypes) 的研究都表明, DRB1、DQA1和DQB1等位基因之间都存在复杂的关系。此时, 特定的组合显示出了很强的易感性作用或保护作用, 这完全取决于两个单倍体的组合形式, 以及特定的决定簇。在某些情况下也可能是这两种因素中的一部分起作用, 从而使其在某些情况下会增加比值比, 但在其他情况下则会降低比值比。

值得进一步注意的是, D区域里的相关

氨基酸残基 (如与RA和溃疡性结肠炎有关的DRB1, 以及与特发性贡门失弛缓症相关的DQA1) 对于抗原结合, 或者在抗原结合时, HLA-DM肽段交换分子伴侣 (peptide exchange chaperone HLA-DM) 都是至关重要的。这些发现进一步表明, 未知的和难以明确的抗原才是这些自身免疫性疾病的致病因素, 这类似于在乳糜泻的发病机制中, 特异性DQ氨基酸参与了谷蛋白肽段 (gluten peptides) 的结合; 或在血清反应呈阴性的脊柱关节病, 如强直性脊柱炎和赖特综合征 (Reiter's syndrome) 患者中检出的微生物。还有学者提出了其它一些关于 HLA II类基因功能的假说, 比如分子模拟 (molecular mimicry)。另一种假说则认为, 在RA中, 共同的抗原表位氨基酸通过与细胞表面钙网蛋白 (CRT) 这种先天免疫受体结合, 并触发信号传导, 有一些研究也支持这一观点。

如上所述, 在许多自身免疫性疾病中, 都可以观察到多种不同的MHC关联现象, 还包括了许多二级位点。其中就包括第1类和DPB1决定簇, 以及一些与自身免疫性疾病有关的第三类决定簇。有一项针对RA的研究, 将所有的MHC风险归结于5种不同的氨基酸位点: 3个 DRB1氨基酸位点、1个HLA-B氨基酸位点和1个DPB1氨基酸位点。同样值得注意的是, MHC相关性的效应量 (effect-size) 区别很大。比如EOMG (HLA-88)、乳糜泻 (DRB1*03)、强直性脊柱炎 (HLA-828) 和某些T1D单倍型患者的比值比就大于5。大多数其它自身免疫性疾病, 比值比则大多在2.0左右。对于非MHC区域的相关性, 大于1.6的GRR (Gauge Repeatability and Reproducibility, 指量具的重复性和复现性) 是十分罕见的。因此, 与HLA决定簇强相关的抗原, 极有可能是某种自身免疫性疾病的致病因素。

三、非HLA易感位点

科研人员已经发现了几百个与一种或多种自身免疫性疾病有关的非HLA基因位点。其中大多数都是相对高频的基因，这可能由检测技术的敏感性较高所致，例如前面介绍过的GWAS技术。这些基因位点中的绝大多数都位于免疫系统组成基因的基因座内，或者距离它们都比较近。这些基因包括抗原组分的处理（processing）、呈递（presentation）、识别（recognition）、区分（differentiation）、信号传递（signaling），以及其它一些免疫调节作用，比如细胞因子（cytokines）、白细胞介素（interleukins）和干扰素（interferons）等。这些基因通常主要在T细胞、B细胞和树突状细胞（dendritic cell）中表达。尽管某些基因的GRR>1.5，但大多数基因的比值都比较低（<1.2）。大部分相关SNP都属于非编码SNP，其中许多都位于基因区域之间，还有一些位于基因组内缺乏基因的区域里，这些区域被称为基因沙漠（gene desert）。PTPN22非同义氨基酸突变（PTPN22 R620W）也与自身免疫性疾病有关联。在某些情况下，精细的基因作图、测序、表达研究，以及功能测试都已经发现了一些非常有价值的可疑突变和致病机制，但也有例外。有一些基因即便具有很强的相关性，但还不清楚是否一定与功能变异有关。比如，包括SLE在内的多种自身免疫性疾病，与多个STAT4基因SNP位点存在关联。相关性最高的SNP都位于STAT4基因内的一个内含子区域里，因此，到目前为止，还没有研究能够将这些SNP与任何功能联系起来。

由于STAT1基因仅仅位于这些SNP下游10kb处，因此，这些SNP可能是对STAT1基因发挥了调控作用，并未对STAT4基因有所影响。虽然这些SNP与STAT1基因的关联较弱，但这也是一个非常合理的假设。因为与物理距离（physical distance）并不直接相关的重组距离（recombination distance）并不会破坏潜在的功能联系，在这个例子中，就是顺式调控机制（cis regulatory mechanism）。虽然按照奥卡姆剃刀（Occam's razor）原理，应该尽可能地将所有关联集中于一个可疑基因，但还是有可能存在这样一种情况，即多个突变体分别对不同位置的基因加以调控，比如反式调控机制（trans-regulation）也是一种相关性。

有许多基因的多个单倍型与疾病有关，比如有些TNFAIP3和TNIP1单倍型就与SLE有关。还有一种可能是，许多与特定基因座的关联实际上反映了在同一个单体型上的、多个功能不同的、频率较低的突变体。然而，在高频单倍型中寻找这种稀有或不常见的突变体，迄今还没有被证明是容易成功的。本文原作者认为，这些关联中的大部分，实际上都是常见的突变，并不一定需要通过GWAS研究来发现罕见的突变。尽管有时需要通过对基因组区域进行精细的作图和测序，以进一步发现常见突变体关联背后的基因组变异（genomic variation），但现在关于这种变异的大部分信息，可能还需要通过前面介绍过的基因型填充工作来加以补充。

1. 不同自身免疫性疾病非HLA遗传位点的重合及差异问题

（在本节中，我将集中讨论那些只在欧洲人群中开展的研究工作，因为在后面的章节中，我们还将讨论不同人种之间的差异。）虽然，有一些非MHC基因位点与某些特定的自身免疫性疾病有特异性的、或相对特异性的关系，如SpB转录因子与PBC就是这种关系，但一般来说，有许多非MHC基因位点都和多种不同的自身免疫性疾病相关。虽然许多基因位点之间存在重叠的情况，但它们之间在效应力上却有着明显的差别。例如，STAT4基因和PTPN22基因都与SLE和RA相关。但是STAT4基因对应于SLE的比值比就要远远高于STAT4基因对应于RA的比值比。PTPN22基因的情况则恰好相反。PTPN22与许多自身免疫性疾病都有关联，都是这些疾病的易感基因，其中既包括了高比值比（ >2 ）的T1D，也包括了比值比稍低，但仍超过1.5的多种疾病，比如EOMG，还包括了影响最小，甚至是无影响的PBC、乳糜泄和MS等。有意思的是，尽管该突变（本例为非同义氨基酸突变体）还与克罗恩病有关，但却是对该疾病具有保护作用，而非促进作用。还有很多其它例子可以证明多个作用彼此交叉的突变位点，对不同遗传疾病具有不同的作用。对于EOMG来说，非HLA基因中的比值比最大的就是TNIP1基因，尽管该基

因也与SLE有关，但比值比就要小得多，而且涉及两种单倍型，不像EOMG，只与一种单倍型有关。IRF5基因对于SLE的比值比很高，对于PBC的比值比就是中等的，对于RA的比值比则较低。ITGAM基因是另一个SLE强（高比值比）易感基因，而且与RA或其它自身免疫性疾病（包括MS、T1D和乳糜泄等疾病）无关，对于系统性硬化症，该基因的作用有限。

通常，对于某种自身免疫性疾病，当增加样本量时，就能发现更多的、与其它自身免疫性疾病有交叉的突变位点，但这其中有许多位点的效应量都不大，比值比也都小于1.1。其中有几种至少与一种自身免疫性疾病强相关，也与其它几种自身免疫性疾病相关，但作用各不相同的基因（图2）。因此，对于非HLA突变体，决定其效应量的机制非常复杂，也是目前尚未解决的一个难题。为什么这些共同易感基因对于不同的自身免疫性疾病，其比值比存在如此大的差异呢？虽然有些差异是由于研究工作（主要是小样本研究）中的差异（variability）或背景噪音（noise）的影响，但似乎这其中大多数的差异还是真实情况的反映。今后，更重要的工作是确定这些差异与遗传风险因素之间相互作用的关系，以及这些差异与不同自身免疫性疾病易感性之间的关系。

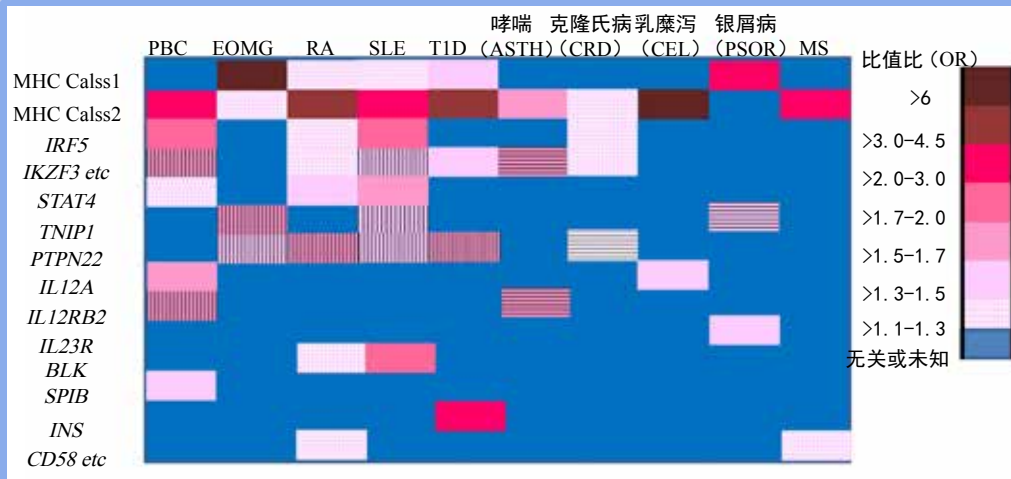


图2 与多种不同自身免疫性疾病相关基因的SNP效应量（effect size）比较。哮喘在此处是作为对照。图中使用不同颜色来表示不同的OR值，每一个OR值也都以正方向表示（不考虑次要等位基因频率）。每一个色块中的垂直或水平线条表示SNP/单体型（haplotype）与不同疾病的关系截然不同。比如在IKZF3等基因一行中，这些基因与PBC和SLE等疾病的关系，就与其和哮喘的关系截然相反。图中的OR值全都源自对欧洲人群的研究数据，并且这些数据大多源自大规模研究和荟萃分析研究。那些NA或NK基因，则属于目前缺乏足够的数据，还达不到确证的标准（ $p < 5 \times 10^{-8}$ ），但是它们与疾病可能存在关联。不同SNP的OR值各有不同，上图给出的是最大OR值对应的SNP。图中所列基因都满足以下入选标准，即至少针对一种自身免疫性疾病的OR值必须超过1.1，并能够区分效应量。IKZF3等基因包括了IKZF3、ORMDL3、ZBP2和GSDMB等。CD58等基因则包括了CD58、CD2和IGSF2等。

2. 非HLA突变与HLA突变之间的上位基因

对于任何一种自身免疫性疾病，在不同易感基因之间存在上位基因的示例是非常少的。其中最有力的示例可能就是强直性脊柱炎（HLA-B27）、银屑病（HLA-C6）和白塞氏病（HLA-B51）这三种疾病与非HLA易感基因ERAP1和HLA基因的关联。ERAP1基因编码一种氨基肽酶（aminopeptidase），其功能是修饰肽段，使其加载到MHC 1类决定簇上。对于上述疾病，ERAP1突变体只在同时合并存在

这些特定的HLA决定簇时才有作用，如果患者体内没有这些HLA决定簇，那么这些ERAP1突变体就几乎，或根本没有影响。有意思的是，同样的ERAP1变异体对于强直性脊柱炎和银屑病也表现出了相同的作用，但是对于白塞病的效果却正好相反，这表明ERAP1蛋白在通过内质网（endoplasmic reticulum）处理特定的蛋白质抗原时的不同要求，才是这些蛋白抗原触发免疫反应，导致疾病发生的一部分原因。

3. 稀有且不寻常的突变体

只有少数罕见（即最小等位基因频率 $<0.01\%$ ）或不常见（即最小等位基因频率 $<0.05\%$ ）的突变体，与常见的、复杂的自身免疫性疾病有关。其中一些突变体就是根据已知的、罕见的、具有自身免疫性疾病特征的孟德尔病（Mendelian diseases）的致病基因而发现的。这其中就包括了能够引起1型自身免疫性多腺综合征（autoimmune polyglandular syndrome type 1）的TREX1基因。科研人员也在SLE研究中发现了具有高效应力的TREX1基因罕见变异体。他们还利用IMMUNOCHIP芯片，发现了其它几个罕见的自身免疫性疾病突变，这些芯片中的位点主要都是在GWAS研究中发现的、基因区域里的高密度SNP位点，也包括了与乳糜泄有关的位点。然而，一般来说，这些研究都会受到现有突变体数据库（比如千人基因组项目的早期数据，或其它测序数据）信息的限制，不过未来肯定会取得更大的成功。比如，最近就有人利用外显子芯片（exon chip）新发现了几个与2型糖尿病这种常见的非自身免疫性疾病有关的罕见突变，也有多个科研小组正在利用这种芯片，对自身免疫性疾病开展类似的研究，试图发现更多相关的突变基因。有几个课题组在对特定的免疫系统基因进行测序研究，同时也有几个大规模的项目正在利用汇集手段（pooling approach）在整个外显子组里寻找突变体。还有一个项目，系统收集了乳糜泄病例及对照样本的800多个免疫相关基因的测序结果，也取得了一定的进展。

最近，有人做了一篇综述，对近来发现与自身免疫性疾病有关的罕见突变的研究进行了总结。他们认为，现在就对这些罕见突变的作用下一个结论，还为时过早。对外显子组进行系统性测序的作用是有限的，而对大量自身免疫性疾病病例进行全基因组测序的工

作才刚刚开始。对于这样的研究而言，其中一部分困难在于，如果要发现具有统计学相关意义的罕见突变，要么就需要极大数量的样本（数十万份样本），要么就需要某种方法，将所考虑的突变体限制在特定的条件下（例如更可能具有功能性的突变体），或者应用某种类型的负荷算法或折叠算法（burden or collapsing algorithm），将多个罕见突变体的复合效应综合起来分析。用于这些分析的算法就包括Variable Threshold、Madson Browning、KBAC、SKAT、SKAT0和VAAST等负荷或折叠算法，这些软件包使用不同的算法将序列突变体组合在一起，以检测其与疾病之间的关联情况。其中一些方法已被加入各种软件包之中，可以在分析中纳入种族结构（population substructure）等变量（参见<http://varianttools.sourceforge.net/>和<http://csg.sph.umich.edu/kang/epacts/>）。最近的模拟研究表明，SKAT0软件和另外一个通用版本的C-alpha测试软件在功能上可能比其它方法更加强大。对于发现外显子突变，SIFT、Polyphen和MutationTaster等工具则更为常用，更容易发现致病突变。不过，至少对于孟德尔疾病来说，用这些方法来发现致病突变还不是那么完美，可能会有所遗漏。使用Annovar（<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>）和Ensembl（http://uswest.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index）等软件，可能会发现更加复杂的功能突变编码突变。

对于非编码突变而言，情况就更加复杂了，尽管有几个搜索引擎可用来寻找关键的调控序列突变，包括微小RNA（micro-RNA）、转录因子结合位点、DNA酶I超敏位点和表达数量性状位点（eQTL）等。

四、人种的差异

在不同人群中，自身免疫性疾病的相关基因也有很大的差异。将一个大陆人群与另一个大陆人群的结果进行比较，就可以看出非常明显的差别。目前，最大规模的数据就是对欧洲人群和东亚人群的研究。导致这些差异的部分原因可能是，特定的变异在这些不同种群中的频率有所不同。因此，PTPN22 R602W变异与多种欧洲人自身免疫性疾病相关，但是在包

括东亚人口群体在内的其他种族中，却没有这种关联。另外一个相反的例子是，在东亚人群中，PADI4基因与RA具有很强的相关性，但是对于欧洲人的作用显然要小得多，并且欧洲人体内与RA相关性最高的SNP位点则几乎都缺失了。有研究揭示了欧洲人、日本人和中国人的RA队列研究中发现的关联和比值比比较的结果（图3）。

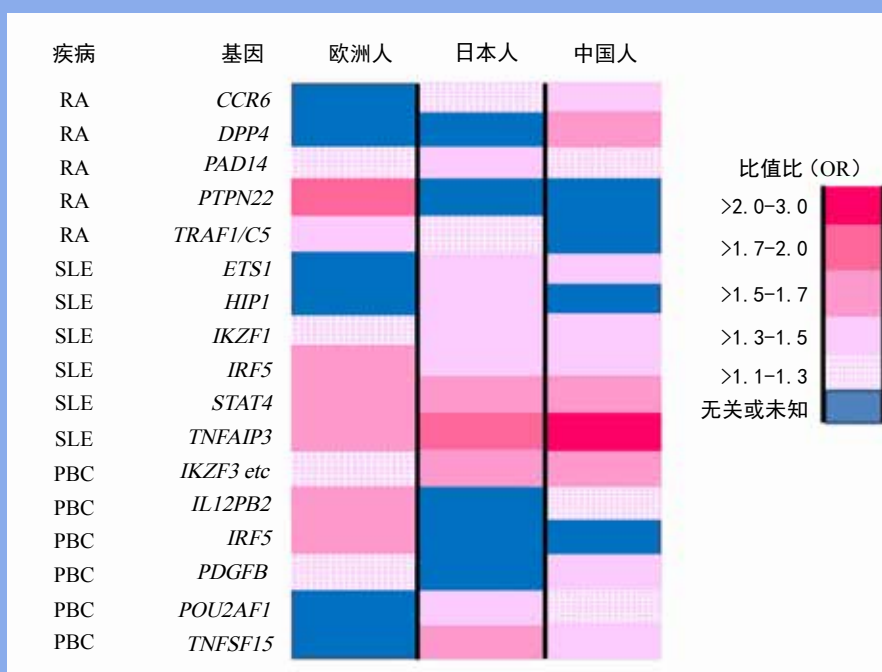


图3 在不同种族的人群中，针对3种不同的自身免疫性疾病来比较基因多态性的效应量。图中使用不同颜色来表示不同的OR值，每一个OR值也都以正方向表示（不考虑次要等位基因频率）。图中的OR值数据主要源自大规模研究和荟萃分析研究。图中所列基因都是在至少一个种族人群中的OR值大于1.3的基因。表示为NA或NK的基因都是缺乏足够证据（即在全基因组统计学分析中不具备统计学意义）能够证明其与疾病关系的基因。

还应该注意的，当一个群体中的等位基因频率明显较低时，即使比值比实际上是相似的，可能仍需要非常大的样本规模，以检测出具有统计学意义的相关性。因此，当样本量很大时，就能在欧洲人群中观察到PADI4基因与RA之间的联系。然而，比值比还是比较小，大约在1.1左右。而日本人群与RA的比值比为1.36。这很明显就是由于缺少了更相关的单体型。

各大陆内部也存在明显的差异。例如，常见的PADI4突变体在日本人群中就与RA明显相关，但是在中国人群中则没有这种相关性。在欧洲人群中，对于上述PTPN22突变的频率就有明显的差异，该基因在欧洲北部和南部的人群之间存在显著差异：北部芬兰人群的频率最高，达到了0.155，而南部意大利人群的频率最低，仅为0.021。这也凸显了在针对不同种族进行荟萃分析，使用Cochran-Mantel-Haenszel校正法分析等位基因频率的差异时，控制人口亚结构变量的重要性。

还需要注意的是，PTPN22基因这种在地理上的差异分布特点表明，它可能与自然选择有关。实际上，也有其它证据支持这一观点，很多与SLE有关的基因都与自然选择相关。其它自身免疫性疾病易感基因也和自然选择有关。比如在欧洲人群中，与乳糜泄有关的非同义突变体SH2B3就表现出很强的正向选择信号，有证据显示，这可以追溯到公元前541-542年间，在东罗马帝国爆发的查士丁尼瘟疫（Justinian plague）事件。因此，有一些自身免疫性疾病易感基因可能会在某些情况下（比如遭遇某种病原体感染时）帮助我们获得生存优势。这也可能是这些易感基因在不同种群中频率有所差异的原因。

对在不同种群中开展的研究进行比较时的一个难点就是，对于大多数易感基因而言，我们并不能确定真正的致病突变。种群之间的差异可能是由于不同的单倍型结构造成的，而不是由于缺乏或没有一个特定的原因。同一基因在不同种群中的差异，可能是因为不同的单倍型结构所致，而并非由于致病突变的效应力

太低，或者是同一基因在其他种群中突变不同所致。这种情况在从多个不同种群中筛选可疑多态性时，会显得尤为突出。如果在研究中纳入了足够的单倍体标记SNP，那么至少在常见变异假说（common variant hypothesis）的前提下，还是可以解决这个问题的。有些人主张对多个种群开展研究，以期能够对致病突变（causal variant）进行更加精细的作图分析。事实上，这就是假设，在不同的人群中存在相同的致病突变。跨种族样本的荟萃分析发现了一些新的与RA有关的突变。尽管这可能是由于样本量的增加所致，但并不否定我们之前观察到的，不同人群间关联强度上的差异。

需要强调的是，疾病表型上的差异也与种有关。有例子表明，在不同人种间，某种自身免疫性疾病的发病率是不同的，同时相关的易感突变也有差异。虽然疾病发生频率上的一些差异可能是由于环境的差异所致，比如可能是由于接触了不同的病原体，但其它因素显然与遗传有关。最好的一个例子就是，美国原住民患上T1D的几率非常低，这就是因为他们体内都缺少某种特定的HLA决定簇。最近，在像美国这样的多种族群体中，祖先信息标志物（AIM），或足够数量的未选择的独立标志物，如低内在标记LD（low intermarker LD）等，已被用于检查不同大陆间，或同一大陆内不同祖先之间的关系，也被用于研究群体自身免疫性疾病。SLE发病率较高的证据也与西非和美国原住民血统相关。一些关于SLE的研究已经使用这种方法，来检验该疾病的内在表型是否更可能与特定的祖先有关。其中有一些研究表明，有一些用环境协变量无法解释的实质性差异，的确与不同的祖先有关，尽管我们对这些协变量的测量并非那么准确。未来的研究可能会发现那些能够解释为何特定祖先更倾向于患上某种特定疾病的潜在突变。例如在SLE中，与南欧祖先后裔相比，北方祖先后裔的皮肤粘膜病损表现（mucocutaneous manifestation）发生率更高，抗dsDNA抗体更低。

五、尚未阐明的遗传力

对于大多数自身免疫性疾病而言，大约有超过50%的与遗传有关的基因位点人们还不甚了解。有很多无法自洽的理论可能都与这种“遗失的”遗传性有关，比如：

- 1) 只能用极大的样本量（例如样本量>>100,000），才能发现为数众多的、常见且风险低的突变；
- 2) 由于缺乏足够的测序量、样本量和合适的分析模型，所以大量罕见的突变都没有被检测到；
- 3) 对于基因拷贝数变异、小插入或缺失突变等基因组结构变异，还没有开展大规模研究；
- 4) 要更好地发现相关突变，就必须更好地定义疾病的表型（即减少疾病异质性）；
- 5) 两个或多个可能难以确定的基因位点之间的上位性因素；
- 6) 不同环境因素和遗传位点之间的上位

性因素（只能是在环境因素的背景下确定）。

随着大规模测序越来越容易开展，研究人员也许能够系统地对大量人口进行研究，来解决相关的难题。此外，有一些研究已经提出，可以利用序列驱动搜索（sequence driven search）来发现其它遗传因素。PheWas（全性状组关联分析）就通过这种方法，对医疗记录 and 实验室研究数据进行了检索，查看是否存在与某种表型相关的特定突变。例如，如果有一个庞大的序列数据库可供使用，那么我们就有可能发现与特定自身抗体有关的突变。令人怀疑的是，通常在这类工作中用到的ICD代码，是否能够提供足够多的信息，以发现新的关联，这需要进一步确认，虽然这种方法已经表现出一些潜力。另外，也可以选择那些已经具备突变序列信息（这些突变已经被明确具有很强的功能）的个体来进行研究。

六、功能研究：编码突变、基因表达及表观遗传学

在自身免疫性疾病易感的非MHC遗传基因座中，已经鉴定出了相对较少的非同义突变体，其中就包括PTPN22、TNIP1、ITGAM和SH2B3等基因。虽然科赫法则（Koch postulates）（又称证病律，通常是用来确定侵染性病害病原物的操作程序）还无法被验证，但是一些突变体的确有令人信服的证据表明，它们能够改变某种免疫反应功能。例如R620W突变体PTPN22已被广泛研究过。研究人员已经明确，该突变体能够增加T细胞和

B细胞扩增，对树突状细胞的高反应性和B细胞活化也有重要作用。然而，即便如此，我们对其背后的机制还是不清楚。虽然功能的获得似乎是最有可能的机制，但有证据表明，也可能是T细胞的外周阴性选择和B细胞的独立影响在起作用。

目前，已知的大多数与自身免疫性疾病遗传学机制有关的基因座都是非编码基因。因此，将它们与实际致病机制联系起来非常困难，需要广泛的间接证据。通常，与孟德尔式

疾病 (Mendelian developmental defect) 相关的都是编码基因, 这就形成了鲜明的对比, 并且, 在研究孟德尔式疾病时, 还经常可以利用模式生物, 从而能够非常方便地提供功能缺陷的证据。然而, 在复杂疾病中定义非编码突变体的生理学作用, 可就需要多种证据了。最初, 许多研究都会检查基因表达情况和各种有关DNA的变化情况, 例如甲基化修饰和组蛋白标记等。这些研究可以针对某些基因, 也可以针对全基因组, 并且通常包括: 1) 将来自病例的细胞与对照细胞进行比较; 2) 将具有特定突变体的细胞与那些正常细胞或组织进行比较。

科研人员已经在多种细胞和组织中进行了全基因组表达研究 (Genome-wide expression studies)。有几种方法是可行的。许多人使用未分离的外周血单核来开展研究, 这可能有点不妥, 即使他们使用已分化的白细胞计数这项指标进行了校正。虽然一些研究结果还不错, 例如SLE中的1型 α 干扰素信号通路结果, 但如果要发现大多数有功能的突变体, 可能还需要对特定类型的细胞进行更精细的研究, 并且可能还需要在特定活化刺激背景下, 才有可能获得成功。还有其它一些针对分选细胞群的研究, 虽然这些工作可能部分会受到细胞分离步骤的影响, 但它们更有可能提供有价值的相关信息。尽管RA的滑膜细胞 (synovial cell) 已被研究, 但对于大多数疾病而言, 我们可能很难在病损局部富集到特别相关的淋巴亚群细胞或实质组织来开展研究。

方法上也存在问题, 它们让我们难以获得基因表达的准确信息。芯片基因阵列的使用很可能被RNA测序研究所取代, 因为RNA测序还可以发现剪接形式变异, 以及与基因组序列偶联时优先等位基因表达的差异等信息。许多这类研究已经为我们研究个体自身免疫性疾病的发病机制提供了一些线索。然而, 将基因表达差异的模式与大量关联研究所发现的遗传因素联系起来是成功的难点和关键。

研究序列变体的功能意义, 方法之一是利用表达数量性状基因位点 (expression quantitative trait loci, eQTL)。许多研究已对来自不同组织的细胞或细胞系进行了定量检测, 以发现与eQTL相关的多态性 (通常为SNP)。其他研究也已经检查了甲基化、DNase1超敏感性和各种组蛋白修饰的情况。这些研究, 以及eQTL都有可能发现特定的突变体, 也包括那些通过各种关联研究 (GWAS或罕见变异分析) 发现的突变体, 或与这些突变体强烈连锁不平衡的突变体。数据信息通常来自较大科研项目的相关公共数据库, 其中最著名的就是人类基因组DNA元素综合百科全书项目 (Encyclopedia of DNA elements) 和eQTL数据的汇编。通过UCSC基因组浏览器 (UCSC Genome Browser) 编译和获得的DNA元件百科全书数据, 我们可以获得来自多个不同细胞系和许多组织的数据。这些数据可以提供Dnase敏感性、来自染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 实验的序列信息、组蛋白标记和来自许多细胞系和组织的转录因子结合位点等多种信息。不过需要提醒的是, 一些遗传变异体可能不会有处于特定活化状态下的、特定细胞群中的信息。因此, 虽然这是一个很好的工具, 但它可能存在假阴性和假阳性的可能性。

还有其他工具, 比如Genevar可用于评估突变体对DNA甲基化的作用 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>) 和eQTLs (http://www.bios.unc.edu/research/genomic_software/seeQTL/) 等。芝加哥大学eQTL浏览器 (<http://eqtl.uchicago.edu/cgi-bin/gbrowse/eqtl/>) 还提供了另一种工具, 它可帮助我们了解可疑突变体中的eQTL信息。值得推荐的是, 搜索eQTL和转录因子结合位点的好方法是使用RegulomeDB。

还有一些寻找可疑的、重要非编码变异的方法, 包括使用SinBaD来搜索保守基序

(conserved motif) 和使用Ensemble 等软件来确定突变体是否会影响剪接等方法。此外, PolymiRTS软件可用于预测3' UTR突变体是否真的, 或有可能改变微小RNA (miR) 的靶位点。这些位点在基因调控或miR本身是否具有变异上也可能是非常重要的。最近的研究还发现, 包括长非编码RNA (lncRNA) 在内的其它非编码RNA突变, 也可能具有一定的功能。

值得一提的是, 最近已经有人开发出了一套精细作图软件——因果SNP (Probabilistic Identification of Causal SNPs, PIC) 识别软件 (<http://www.broadinstitute.org/pubs/finemapping/?q=pics>), 它能够在与自身免疫性疾病有关的风险基因座中, 寻找可疑的功能突变体。该研究通过来自静息和受刺激的CD4 (+) T细胞、调节性T细胞、CD8 (+) T细胞、B细胞和单核细胞的RNA染色质定位数据, 发现大多数可疑的因果变异 (60%) 都位于免疫细胞基因组中的增强子区域。然而, 这其中只有10-20%直接改变了可识别的转录因子结合基序。因此, 我们还需要进一步认识基因的表达调控机制。该研究者提醒, 尽管PIC算法特别适用于荟萃分析, 但当使用初级数据并评估某个SNP对于关联信号的重要意义时, 条件分析 (conditional analyses) 是非常有价值的。

进一步定义功能的另一种方法就是使用动物模型, 特别是小鼠动物模型。许多研究使用基因敲除小鼠来帮助了解基因的作用。目前, 这已经发展为其它基因操作技术, 比如改变小鼠基因组里的特定碱基来研究特定突变体 (如

基因敲入小鼠) 的作用。与人PTPN22 R620W突变类似的小鼠PEP R619W突变体研究显示, 该基因对于T细胞的扩增和迁移、生发中心, 以及年龄相关的B细胞扩增等免疫细胞差异都有作用。这些小鼠能够产生自身抗体, 同时会表现出系统性自身免疫的各种特征。此外, 有缺陷的B细胞选择和仅在B细胞谱系内限制性表达的突变体都足以促发自身免疫。然而, 如果要研究人类基因之间的相互作用, 由于小鼠和人类基因之间存在一些差异, 所以可能会难以, 或不可能进行这种敲入研究。

随着能将人类基因更有效地引入小鼠干细胞的方法在不断的发展, 将来也许可以对可疑的人类基因突变体进行更多的生理学研究。现在, 研究人员已经制备了具有完整人免疫球蛋白基因区域的小鼠。另外, 在特定信号途径中引入多个人类基因, 也并非不可实现。当然, 这些实验也必须同时包括这些基因的特定突变体, 来模拟与具有特定自身免疫性疾病的人体内相似的环境和条件。此外, 尚不清楚是否可以使用适当的刺激, 来诱发可能依赖于某些特异性抗原攻击的特定自身免疫表型。

最后, 还应该注意的是, 仍然存在表观遗传变化和RNA编辑变异等情况。这些变异虽然不是遗传因素, 但对于一些自身免疫性疾病的发病机理, 也可能是同样重要的。针对特定的自身免疫性疾病, 选择同卵双胞胎进行研究, 得到的结论一致或不一致, 都可以帮助我们认识这些非遗传变化的作用。RNA测序研究也有助于发现RNA编辑变异, 不过这可能取决于细胞选择的正确性, 要确保这些细胞里发生了关键的体细胞变异, 如表型改变等。

1. 信号通路

我们可以通过查询各种数据库，以确定与自身免疫性疾病有关的基因位点是不是某条特定信号通路的组成部分。通常来说，这些方法都使用来自关联结果的独立信号（无LD）（通常来自荟萃分析，以及各种数据库的数据，通常包括BioCarta（<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>）、KEGG、Pathway Interaction Database（PID）（<http://pid.nci.nih.gov/userguide/introduction.shtml>）、Gene Ontology和Reactome。有一个例子就是使用MSigDB（<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>）数据库。接下来，就会使用i-GSEA4GWAS网络服务器等程序、Paris和Inrich在内的不同软件，来判断在一定的距离范围（例如20 kb的SNP或峰值在2个log值范围）内，这些基因是否属于某条信号通路，并找出关联最强的那个基因。然后，可以通过排列组合的方法，比较不同组合的信号强弱，来判断这些基因是否属于该信号通路。同时还可以纠正基因及基因组的效应大小。通常，用错误发现率（false discovery rate, FDR）来对多个实验进行校正，这些实验都因为有多种不同的排列组合，所以生成了多个富集分数（enrichment scores）。有时，不同实验方法之间结果的一致性，也被用来作为判断结论是否可信的重要指标。对于自身免疫性疾病而言，这些研究通常在有和没

有HLA信号的情况下进行，以确定该途径是否依赖于HLA，这是因为HLA是许多基因途径的一部分。一项关于MS的研究，使用蛋白质相互作用数据库将信号通路分析锁定在了有证据证明的（通过了蛋白质相互作用网络信号分析的），具有生理相互作用的那些基因之间，尽管尚不清楚这种方法是否明显优于前面介绍的那些方法。

此类研究已在许多自身免疫性疾病中进行，包括RA、SLE、MS、T1D、乳糜泻、PBC和克罗恩病等等。这些研究和其他研究都发现了某些特定信号通路的重要性，毫不奇怪，这些信号通路都在不同的自身免疫性疾病中有所作用。这些研究还对在先前研究中尚未达到统计学显著性差异，但在信号通路中又存在“过度表达”情况的候选基因进行了更仔细的基因分型分析，结果又发现了新的易感基因位点。

这些研究告诉我们，目前对于基因与信号通路的关系尚不清楚。对这些基因更详细的注释和了解也正在进之中，这应该有助于我们后续的分析。未来的工作可能包括对这些信号通路中的特定组分进行分类的方法，这些组分目前尚未进行区分，包括不了解是否存在针对不同突变体，能够预测它们表达上调或下调的信号，以及进一步基于系统生物学方法，来定义疾病的能力。



2. 对于疾病诊断和治疗的意义

从理论上讲，通过遗传风险因素就可以区分谁是特定自身免疫性疾病的高风险人群。对包括RA，MS和PBC在内的几种疾病的研究，已经使用各种遗传风险模型来了解GWAS研究所发现的基因位点组合，是否可以识别出MS，RA和PBC高风险的个体。这些研究已显示出一些前景，但是，很明显，我们目前对大多数自身免疫性疾病的遗传学知识仍然不足以帮助我们有意义地诊断疾病。此外，尚不清楚不完全外显率（incomplete penetrance）是否会严重限制遗传信息对诊断复杂疾病的价值。遗传信息也可能有意义地补充其他诊断信息，包括血清学，基因表达谱和可能的环境风险因素。从理论上讲，这些信息也可能有助于确定谁更有可能患病。

另一个显然会受到更多关注的领域是，研究和评估特定治疗药物的个体化应用问题，即它们是否更有可能针对携带不同高危等位基

因的患者，发挥不同的作用。对于SLE，一些定向研究和GWAS研究已经检测了回顾性分析中发现的基因型，这是否可以解释患者对使用TNF阻滞剂起效和不起效的原因。尽管这些研究已经指明了几个基因位点，但是没有一个位点在所有的研究中都得到同样的结论，而且此时没有一个被证实。样本量也限制了此类研究的效力。其他工作（例如在RA和PBC中）已经建议使用基因信号通路信息，来选择合适的自身免疫性疾病治疗药物。

发现更多的高危位点和致病突变，再加上大规模的个体测序与医疗记录的整合，就可以获得评估是否可以基于遗传学信息，开发出更优治疗方案所需的大量数据了。然而，不像对患有孟德尔式疾病的儿科患者那样，对于大多数类似于自身免疫性疾病这样复杂的疾病，可操作的遗传学手段还尚未出现。

七、总结：该怎么做才能达成这个目标

科学界的一些人质疑GWAS研究中发现的无数位点是否有帮助。虽然GWAS研究尚未发现导致自身免疫的原因，但我认为它对该领域产生了重要影响，并且这些基因位点的发现，将继续成为帮助我们进一步了解导致这些表型的主要因素之一。与大多数研究结果一样，这些研究又提出了更多的问题。例如，什么是真正的功能突变体？它们如何真正改变反应？遗传变异在哪些细胞，在细胞周期的哪个阶段发挥作用？为什么有些变异对一种自身免疫性疾病的影响要大于另一种？这些问题都不容易解决，但正如我们在这里介绍的，还是有一定的进展。

人类基因组的广泛变异，部分地受到了自然选择的影响，包括许多突变体，理论上它们有利于我们人类，在面临各种感染时存活下

去。了解哪些基因位点的功能变异是自身免疫的高危位点，或者会加重自身免疫，这也有利于我们进一步了解人体对感染因子的免疫反应。同样，正在进行的、旨在确定宿主对传染因子反应的研究，也可能为进一步揭示神秘的自身免疫性疾病提供必要的线索。

正如本文中所讨论的，不断增加的、对自身免疫性疾病的遗传学方面的理解，可能对早期诊断和/或用于治疗干预的决策具有影响。至少，我们对相关基因变异和信号通路的了解，应该集中在功能研究上。这些也可能导致新疗法取得发展。毫无疑问，正在进行的功能研究不仅增加了我们对发病机制的认识，同时也提高了我们对正常生物学和免疫调节的认识，虽然这个过程可能会很慢。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



疗法：抗原特异性疗法 治疗自身免疫性疾病

免疫系统在机体健康中的主要功能是保护宿主免受微生物和寄生虫感染。由于对非自身抗原的免疫反应可能会引发机体对自身抗原的免疫，因此进化赋予了免疫系统特殊的保护机制：中枢和外周耐受机制，包括调节性T细胞和调节性B细胞。虽然过去二十年间，我们见证了治疗慢性炎症的一系列新疗法成功进入临床阶段，但是能够在不损害正常免疫力的情况下，选择性地抑制自身免疫炎症、基于抗原的疗法的开发仍然屡战屡败。早期使用肽或完整抗原的自身抗原特异性疗法，已演变成通过抗原呈递细胞（antigenpresenting cell）间接或直接地借助主要组织相容性复合物分子（major histocompatibility complex molecule）将这些分子递送至自身反应性T细胞，从而促进克隆缺失和/或免疫调节的策略。但这些策略的疾病特异性、机制基础、可开发性和转化潜力仍有待深入研究。

多发性硬化症（multiple sclerosis, MS）、1型糖尿病（type 1 diabetes, T1D）和其它约98种自身免疫性疾病（autoimmune diseases）是慢性的、使人衰弱的，甚至致命的疾病，全球有数百万人罹患这类疾病。临床上急需新的、有效的自身免疫性疾病治疗方法。目前的疗法并非抗原或疾病特异性，不针对疾病的根本病因，且无法治愈，通常只能对疾病进展提供很小或中度的影响。更糟糕的是，这些疗法还具有潜在的危及生命或使人衰弱的副作用。

这些自身免疫性疾病的发生是由于推定的环境触发因素和散布在整个基因组中的众多多态遗传元件（数量性状基因座）之间不明确的相互作用导致的。这些相互作用引发针对自身抗原的、复杂而持久的免疫应答，它会损害特定细胞类型、组织或器官的结构完整性和/或功能。显然，大多数人和啮齿动物自身免疫

性疾病的进展涉及通过自身反应性淋巴细胞靶向多种抗原上的多种表位，包括普遍表达的分子。因此，这种细胞和抗原复杂性给在不损害正常免疫力的情况下，全面且有针对性地抑制自身免疫反应的治疗策略带来了巨大障碍。部分原因是由于这些挑战，经典免疫干预总是依赖于广泛作用的非疾病特异性药物。虽然这些药物中的一部分具有显著的临床益处，但是其它药物仅提供最小或渐进的改善，并会增加感染和罹患恶性肿瘤的风险。

目前，一般认为机体通过四种基本机制来控制自身耐受性：1) 对自身抗原呈高亲和力的自身反应性T细胞或B细胞克隆清除；2) 自身反应性胸腺T细胞或骨髓衍生B细胞的外周清除或功能失活；3) 从胸腺中输出成熟的调节性T（regulatory T, T_{reg}）细胞，4) 并且在外围重新产生T_{reg}或调节性B（regulatory B, B_{reg}）细胞。根据P. Serra和P. Santamaria等人的研究

结果，T_{reg}细胞发育不良和/或功能失调是遗传性自身免疫病的主要原因之一。这些研究成果与其他研究共同揭示，我们不仅可以通过促进对自身抗原不耐受的淋巴细胞的清除来抑制自身免疫，还可以通过增加调节性淋巴细胞的数量来抑制自身免疫。然而，尽管能够诱导调节性淋巴细胞（以抑制特定免疫应答中涉及的同源和非同源淋巴细胞特异性的能力为指标）这一方法的开发不需要全面破译疾病发生、进展和维持中涉及的许多抗原特异性的经验，但开发清除那些自身免疫性淋巴细胞的方法还是需要提前了解这些知识。因此，后者在药理学上不可行，除非某一疾病仅由一种或几种显性T细胞或B细胞特异性维持（通常情况并非如

此）。然而，尽管调节性淋巴细胞的移植或诱导内源性免疫调节细胞是更具吸引力的替代方案，但这种治疗策略也面临着诸多挑战，而且需要开辟全新的药物开发方法（例如，与已证实的广谱药物开发途径相比，需要单独开发单克隆抗体药物）。

本文回顾了治疗自身免疫性炎症的抗原特异性方法的开发现状，并重点关注新疗法的作用机制。我们首先总结了DNA疫苗方法，然后是基于肽和蛋白质的方法，最后讨论了更复杂的、基于纳米颗粒和细胞的方法，而且还整合了所有已进入临床试验的抗原特异性产品，包括赞助商和疗效（表1）。

表1 已进入临床试验的抗原特异性治疗药物的疗效

赞助商	疾病	疗法	临床分期	疗效
DNA疫苗				
Bayhill Therapeutics (NCT00453375)	T1D	肌肉注射编码胰岛素原的BHT-3021	1期	未观察到严重不良事件。与安慰剂组相比，BH-3021组患者的C肽水平得到改善，胰岛素原反应性CD8 ⁺ T细胞数目减少。
Bayhill Therapeutics (NCT00103974)	MS（复发-缓解型）	肌肉注射编码髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein, MBP）的BHT-3009；与阿托伐他汀钙联用	1/2期	安全且可忍受。减少表达髓鞘碱性蛋白的CD4 ⁺ T细胞的活化，并降低脊髓液中MBP特异性抗体的产生。脑核磁共振结果显示，脑中炎症性病变减轻。与阿托伐他汀联用没有提高药效。
Bayhill Therapeutics (NCT00382629)	MS（复发-缓解型）	肌肉注射编码MBP的BHT-3009（比NCT00103974研究的患者队列更大，治疗持续时间更长）。该研究测试了不同的剂量。	2期	核磁共振成像中病变减少（未达到主要终点），抗原特异性CD4 ⁺ T细胞活化降低，MBP自身抗体分泌减少。

多肽和蛋白				
罗马利比亚大学 (Libera Università)	T1D	近期接受过强化皮下注射胰岛素治疗的T1D患者连续1年每日口服胰岛素	1期?	治疗组与对照组的C肽、糖化血红蛋白和抗胰岛素抗体水平无差异。
维多利亚健康促进基金会&青少年糖尿病研究基金会 (VicHealth & the Juvenile Diabetes Research Foundation)	T1D	患有前驱糖尿病, 且体内存在疾病相关自身抗体的患者接受鼻内胰岛素治疗 (2天/周, 持续6个月)	1期?	没有观察到不良反应, 没有加速细胞功能丧失, 胰岛素特异性抗体增加, T细胞对胰岛素的反应降低。
图尔库大学 (University of Turku, NCT00223613)	T1D	对患有前驱糖尿病、体内疾病相关自身免疫抗体不断积累的易感儿童每日鼻内施用胰岛素	3期	没有阻断或延迟T1D的发病。
南特大学中心医院Centres Hospitaliers Universitaires de Nantes	T1D	对糖尿病发病不久的患者接受两剂口服胰岛素治疗	1期?	防止β细胞恶化。
迈阿密大学 (University of Miami) 糖尿病预防试验-1型糖尿病研究- DPT-1组	T1D	有风险的个体口服胰岛素	1期?	没有阻断或延迟T1D的发病。
国立糖尿病与消化和肾脏疾病研究所 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NCT00004984)	T1D	对于T1D发病风险高的人群, 低剂量皮下胰岛素治疗	3期	没有阻断或延迟T1D的发病。
Pre-POINT研究小组 (ISRCTN76104595)	T1D	T1D高危儿童每日口服高剂量胰岛素	1/2期	存在具有调控作用的胰岛素响应性CD4 ⁺ T细胞, 包括Foxp3的表达。

Diamyd Therapeutics AB 2期 (NCT00435981) 和3 期 (NCT0072341)	T1D	针对近期发病，空腹C肽水 平高于0.1 nM，且体内存在 GAD抗体的T1D患者，皮下 注射GAD-alum	2/3期	残留的胰岛素分泌细胞得以保 留，未观察到胰岛素需求的变 化。
国立糖尿病与消化和肾 脏疾病研究所 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases , NCT00529399)	T1D	最近发病的糖尿病患者接受 皮下注射GAD-alum治疗	2期	病发后1年内胰岛素分泌的减少 情况没有变化。
Neurocrine Biosciences公 司 (NCT00873561)	T1D	对近期发病的糖尿病患者进 行皮下NBI-6024 (Ins (9- 23) 衍生的自身抗原肽) 给 药	2期	β 细胞功能无变化。
卡迪夫大学 (Cardiff University , NCT01536431)	T1D	对最近发病的糖尿病患者进 行皮内施用DRB1* 0401限制 性胰岛素原肽	1期	安全，不会加速 β 细胞功能的 下降；胰岛素原依赖性IL-10 分泌增加； T_{reg} 细胞数量增加 (FoxP3 ⁺) 和 β 细胞特异性 CD8 ⁺ T细胞水平降低。
哈佛医学院布列根和妇 女医院 (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School)	MS (复 发-缓解 型)	口服牛髓鞘	1期	无毒性，无副作用，无治疗效 果。
大学医院神经内科	MS (复发-缓 解型)	皮下注射NBI-5788，一种来 自MBP (83-99) 的APL	2期	9%的患者出现超敏反应，导致 试验暂停。会激活非脑炎性自 身免疫T _H 2反应。
Neurocrine Biosciences公 司&Novartis公司	MS (复 发-缓解 型)	皮下注射CGP77116，一种 来自MBP (83-99) 的APL	2期	减轻相关疾病恶化。

BioMS Technology 集团 (NCT00468611)	MS (复发-缓解型)	对 DR2 ⁺ 或 DR4 ⁺ 患者进行静脉输注 MBP 衍生肽 (MBP8298)	3期	没有治疗结果。
罗兹医科大学 (Medical University of Lodz)	MS (复发-缓解型)	用含有3种相关MS肽 (MBP ₈₅₋₉₉ 、MOG ₃₅₋₅₅ 和PLP ₁₃₉₋₁₅₅) 的皮肤贴剂治疗患者	2期	累积病灶数减少, 复发率降低。以前的研究证明了IL-10分泌T细胞的作用。
Merck KGaA集团 (NCT01973491)	MS (复发-缓解型)	皮内注射ATX-MS-146 (由四种MBP衍生肽组成)	2期	治疗期间, T1核磁共振结果中总钆和新钆增强时, 病变区域减少。同时, T1钆增强病变显著减少。
国家关节炎和肌肉骨骼和皮肤病研究所 (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases , NCT00000435)	关节炎	口服dnaJPI1, 一种热休克衍生肽	2期	T细胞免疫紊乱, 且具有潜在临床疗效。
ImmusanT公司 (NCT02528799)	腹腔疾病	皮内施用Nexvax2, 一种与HLA-DQ2.5结合的疾病相关肽的混合物。剂量加大。	1期	如果逐渐增加剂量, 那么较高剂量就比较安全。治疗组表现出一些十二指肠组织学改善的趋势。

表位加载到相关的载体中

Corixa公司	MS (继发进展型)	静脉注射MBP (84-102) 与MHC II类分子DR2 (DRA / DRB1 * 1501) AG284联用	1期	安全且耐受性好。没有观察到治疗效果。
Artielle Immunotherapeutics (NCT00411723)	MS (复发缓解型)	静脉注射RTL1000, 一种含有HLA-DR2 (DRA / DRB1 * 1501) 外部结构域的单链蛋白, 并与多发性硬化症相关肽MOG (35-55) 连接在一起的药物	1期	最大耐受剂量为60 mg。没有描述治疗效果。

汉堡神经免疫学和临床多发性硬化症研究所 (Institute for Neuroimmunology and Clinical MS Research)	MS (复发缓解型和继发进展型)	静脉内施用负载MOG-、MBP-和PLP-衍生肽的自体血液单核细胞	1期	安全且耐受性好。用较高剂量、载有肽的单核细胞输注的患者, 特异性T细胞应答有所降低。没有描述治疗效果。
细胞免疫治疗				
TxCell (Eudract no. 2006-004712-44)	难治性克罗恩病	对服用过OVA (CATS1研究) 的患者单次注射体外分化扩增的、OVA (Ovasave) 特异性的自体TR1细胞	1/2a期	一些患者发生了一些不良事件。缓解主要与较低剂量的TR1细胞有关。
巴塞罗那医院诊所 (Hospital Clinic de Barcelona, Eudract no.2007-003469-42)	难治性克罗恩病	维生素A和地塞米松诱导的自体致耐受性树突状细胞通过单次腹腔注射三种不同剂量或单剂量三次注射	1期	安全且耐受性好。
格但斯克医科大学 (Medical University of Gdansk, ISRCTN06128462)	T1D	对近期发病的糖尿病儿童进行单次或两次静脉注射体外扩增的自体CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁺ 调节性T细胞	1期	安全且耐受性好。大多数患者对治疗有反应, C-肽水平增加, 对外源性胰岛素的依赖降低。(一些患者在1年时完全不需要外源性胰岛素) 自身抗体状态无变化。
加州大学 (University of California, NCT01210664)	T1D	对近期发病的糖尿病患者进行单次静脉注射体外扩增的自体多抗CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁺ 调节性T细胞	1期	安全且耐受性良好。几名患者在接受注射后, 2年多C-肽水平依然较高, 效应T细胞水平和自身抗体滴度没有改变。该研究还提供了关于输注T _{reg} 细胞持久性、动力学和表型的相关信息。
匹兹堡大学 (University of Pittsburgh, NCT00445913)	T1D	为T1D成年患者皮内注射体外诱导的致耐受原的树突状细胞	1期	安全且耐受性好。没有报告治疗效果。

国家健康与医学研究委员会 (National Health and Medical Research Council, ACTRN12610000373077)	类风湿关节炎	对患者进行两次 Rheumavax (暴露于瓜氨酸的自体致耐受性树突状细胞) 的皮内注射	1期	安全且耐受性好。增加调节性T细胞/效应T细胞比率。没有描述治疗效果。
纽卡斯尔大学 (University of Newcastle, NCT01352858)	类风湿关节炎	地塞米松和维生素D3诱导的致耐受性树突状细胞悬浮在自体滑液中, 并通过关节镜以三种不同剂量进行单次输注	1期	安全且耐受性好。没有描述治疗效果。

一、耐受DNA疫苗接种或移植

DNA疫苗接种即使用DNA载体在未发炎组织中瞬时表达抗原 (图1a)。DNA疫苗的优势在于可以扩大生产规模, 从而降低商品成本。目前已有几种策略可以改善该策略的致耐受性潜力, 包括改善蛋白质表达的水平 and 位置 (例如, 在细胞质中, 促进通过MHC I类分子提呈表位); 使用载带减少CpG含量的质粒, 以最小化TLR94介导的先天免疫激活; 以及调节细胞因子的共表达等。尽管已经探索了几种给药途径, 但肌肉递送 (通过直接注射或体内电穿孔) 仍是比较好的选择, 部分原因是这种方式能够使编码的自身抗原更持久地表达。

已有证据提示, 几种DNA疫苗在人体测试中是有效的, 尽管结果并不明确。在最近的临床试验中被诊断患有T1D的患者接种胰岛素编码质粒的DNA疫苗后, 外周血中胰岛素反应性CD8⁺ T细胞减少, 同时C肽水平更接近正常水平。在另一项临床1/2期试验中, 编码MBP的DNA疫苗 (BHT-3009; Bayhill Therapeutics) 在MS患者中耐受良好, 呈现临床有效趋势, 外周血同源1型T辅助细胞 (T helper type 1, T_H1) 频率降低, 并对蛋白脂蛋

白 (proteolipoprotein, PLP) 有反应。在随后的2期试验中, 疫苗治疗减慢了MS病变的进展, 但未能达到主要终点。

一些DNA疫苗接种方案发挥了肝脏的耐受性 (图1b)。在非肥胖糖尿病 (non-obese diabetic, NOD) 小鼠肝细胞中转染胰岛素B链9-23 (Ins₉₋₂₃) 表位的慢病毒, 可诱导CD25的表达, 但不表达白介素-7受体 (也称为FoxP3⁺ T_{reg}细胞) 的同源T_{reg}细胞。当该疗法与抗CD3单抗联用时, 能阻断糖尿病进展, 并促进疾病逆转。同样, 通过流体动力学注射MBP质粒, 在肝脏中异位表达MBP, 可防止中枢神经系统炎症, 在肝脏特异性表达MBP转基因的小鼠中, 这种炎症缓解效果得益于MBP特异性Foxp3⁺ T_{reg}细胞的产生。

虽然, DNA疫苗接种单用或与其它免疫疗法联用的作用机制尚不明确, 但目前一般认为是通过将供体细胞的抗原物质转移至未成熟的树突细胞, 从而激发动物模型中的自身免疫保护。我们还需要更多的研究来评估这种治疗方法在人体上的有效性和安全性。

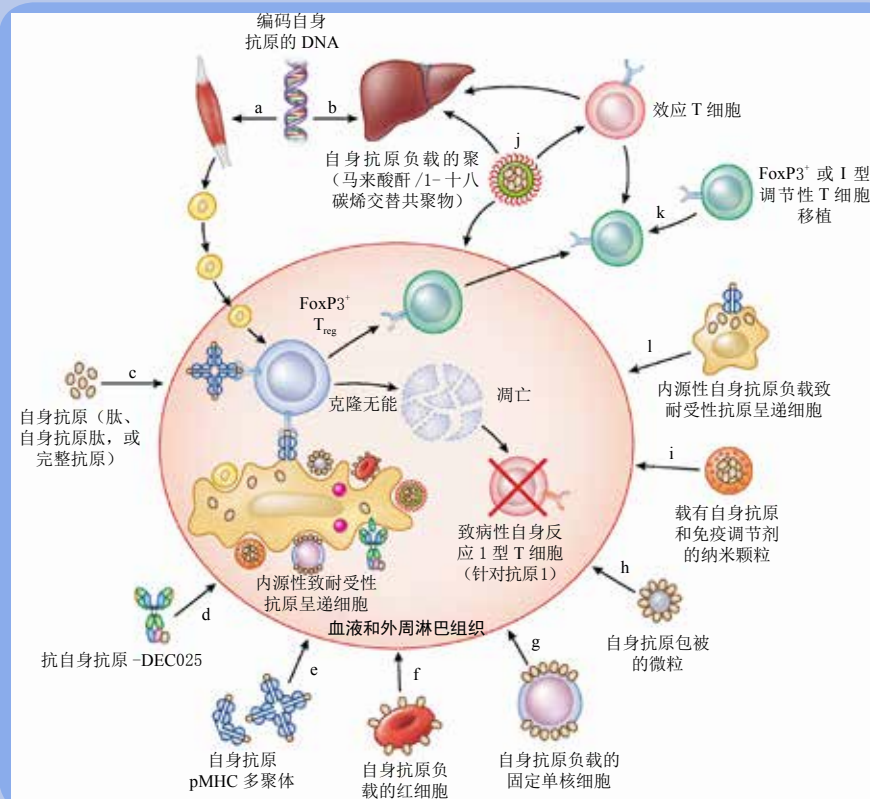


图1 输送未修饰的或抗原特异性的 T_{reg} 细胞、肽、自身抗原或编码自身抗原的DNA，或载有自身抗原的载体。方法包括递送编码自身抗原的DNA (a, b)；自身抗原肽 (autoantigenic peptides, APL) 或完整抗原 (c)；抗自身抗原的抗树突细胞分子，如DEC205 (d)；自身抗原pMHC多聚体 (e)；自身抗原负载的红细胞 (f)；自身抗原负载的固定单核细胞 (g)；自身抗原包被的微粒 (h)；载有自身抗原和免疫调节剂的纳米颗粒 (i)；自身抗原负载的聚 (马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物) 涂覆的纳米颗粒 (j)；未修饰的 T_{reg} 细胞 (k)；或自身抗原负载的未成熟树突细胞 (l)。外源性自身抗原负载致耐受性树突状细胞 (l)、内源性自身抗原负载致耐受性抗原呈递细胞 (通过a、d、f、g、h、i和j) 和pMHC多聚体 (e) 的主要作用机制是触发功能性失活或删除同源自身反应性T细胞，保留其所有非同源对应物。有证据表明，其中一些方法还可能促进 T_{reg} 细胞的形成，但除了i之外，证据是间接的。目前还没有体内 T_{reg} 细胞形成抗原特异性的证据，也没有体内同源 T_{reg} 细胞扩增的证据。

二、基于蛋白质和肽的免疫疗法

研究人员已经采用了一系列基于蛋白质和肽的方法，包括使用全抗原、经修饰或未修饰的肽配体和可溶性肽-MHC (pMHC, peptide-major histocompatibility complex, 肽-组织相

容性复合物) 复合物，目的是诱导耐受性，并选择性地改善自身免疫炎症，且不损害正常免疫力。

1. 使用全抗原诱导耐受性

关于使用自身抗原治疗自身免疫性疾病的研究非常多，这里不再赘述。其中大部分集中在T1D和实验性自身免疫性脑炎 (experimental autoimmune encephalitis, EAE) 小鼠模型上。也许由于机制不明确，给有风险的个体进行全抗原免疫治疗的临床试验通常以失败告终。这些研究包括口服、鼻内和全身给予胰岛素治疗，以及通过皮下和静脉途径同时输注胰岛素。初步口服胰岛

素试验 (Pre-POINT) 和新的鼻内胰岛素2期试验 (INIT II) 都是在完成小规模试点试验后才展开的，并得到了药效学活性的一些证据。在给儿童患者接种重组人谷氨酸脱羧酶65 (glutamic acid decarboxylase 65, GAD65; Diamyd) 疫苗的临床试验2期试验中，出现了不连续的阳性结果。不过，其它研究则未能证实这些积极结果。在MS中，使用口服MBP的早期研究也以失败告终。

2. 经修饰或未修饰的肽配体

经修饰的肽配体 (altered peptide ligands, APL) ——T细胞受体 (T cell receptor, TCR) 或MHC接触位置的氨基酸发生替代的肽——是探索协同性和拮抗性TCR-肽-MHC相互作用的性质和MHC结合强度对生物活性调控作用的有力工具。早期研究发现，在Hbb等位基因突变的小鼠中，血红蛋白β衍生肽Hbb^d₆₄₋₇₆能被T细胞识别。尽管在小鼠II类MHC分子I-E^k的背景下，Hbb^d₆₄₋₇₆肽能引发特定CD4⁺ T细胞克隆的增殖和白介素-4的分泌，

但该肽的修饰形式不能诱导CD4⁺ T细胞克隆的增殖，不能降低其诱导IL-4分泌的能力。这表明TCR可以“感知”肽-MHC界面的微妙变化，并做出完全不同的响应。

APL可以改变TCR信号传导事件，这增加了它们可能是调节自身免疫反应的有用工具的可能性 (图1c)。来自MBP的乙酰化N-末端肽 (Ac1-9) 的APL在体外具有超亲和性质，在体内对Ac1-9诱导的EAE具有保护作用。这一结果表明，APL通过触发Ac1-9特异性CD4⁺

T细胞来抑制EAE。不幸的是，虽然在自身免疫病的实验模型（例如，在TCR-转基因或自身免疫小鼠中）中APL具有显著治疗效果，但在非转基因自发性自身免疫病的晚期模型中尚未发现其有治疗效果：使用APL后，小鼠仍然对多种抗原靶标有自身反应性。例如，用胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白（glucose 6-phosphatase catalytic subunit-related protein, IGRP₂₀₆₋₂₁₄）残基206-214的超级激动剂APLNRP-V7处理NOD小鼠，可以完全清除小鼠体内致病的CD8⁺ T细胞，却不会降低糖尿病的发病率，也不会延迟疾病发生。事实上，目前没有研究显示经修饰或未修饰的肽能够在糖尿病小鼠中恢复正常血糖。这些和

其它观察结果（P. Serra和P. Santamaria等人的研究结果）表明，使用超级多肽或APL消除单一（或少数）自身抗原特异性细胞不能抑制多克隆和多抗原的自身免疫性疾病（图2），除非该治疗能在表位扩散发生之前（或能够引发免疫调节细胞发挥抑制作用）清除引发疾病的细胞类型。相比之下，具有部分激动活性的IGRP₂₀₆₋₂₁₄的APL促进了具有显性抗糖尿病特性的、低亲和力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反应性CD8⁺ T细胞亚群的激活和募集。同样地，载带未修饰的pMHC I类复合物的纳米颗粒也能诱导低亲和力的记忆T细胞的增殖。这表明，这两种方法都通过类似的作用机制起作用，虽然效率差异很大。

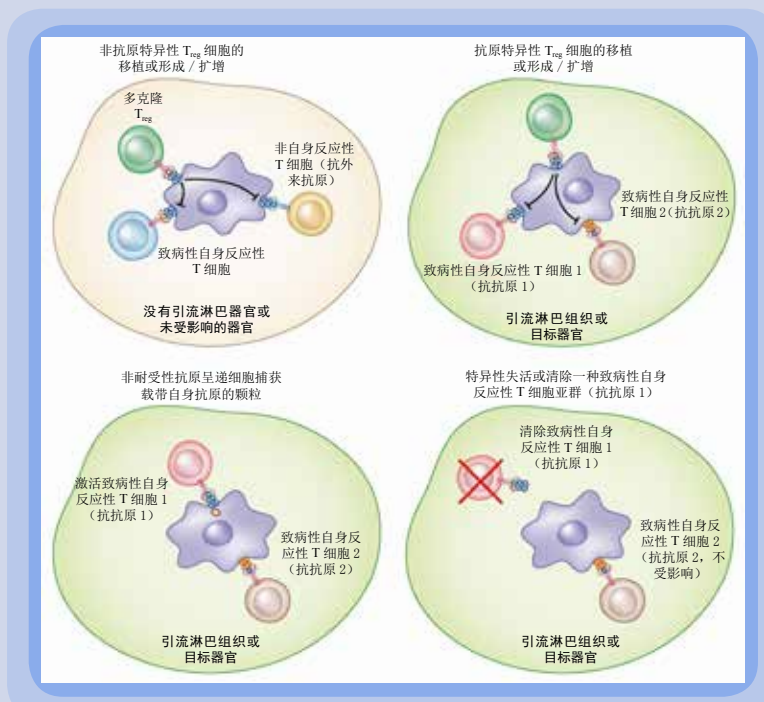


图2 治疗的免疫学效果与抗原特异性和抗原摄取位点相关。触发同源T细胞失活或清除的方法不能全面钝化参与自身免疫病的各种自身反应性淋巴细胞，但在抗原或表位扩散发生之前的最早期可能更有效（右下）。一些涉及T_{reg}细胞移植或从肝脏中自身反应性T细胞前体形成T_{reg}细胞的治疗方法，可能能够抑制患病（发炎）器官或引流淋巴组织中的同源和非同源自身反应性T细胞的反应（右上），但缺乏直接证据。由于大多数抗原递送载体可被耐受性和非耐受性，甚至被促炎性抗原提呈细胞捕获（左下），而且被耐受性和非耐受性细胞捕获的概率最终决定这些化合物的致耐受性（促进vs抑制同源自身反应性T细胞的激活）。多克隆T_{reg}细胞的移植可能潜在地抑制与疾病无关的免疫应答（左上），这可以通过移植单特异性T_{reg}细胞来解决。

其它肽或APL可以通过促进 T_{reg} 细胞活化来诱导显性免疫调节。在耐受性移植的小鼠模型中，来自Y染色体连锁的次要组织相容性抗原Dby的低亲和力APL能够持续刺激同源TCR-转基因T细胞，促进 $CD4^+ CD25^-$ T细胞分泌IL-10，并赋予雌性小鼠对雄性皮肤移植物的耐受性。其它研究表明，通过鼻内给予基于MBP的Ac1-9-4Y-APL的类似物——一种高亲和力的MHC结合APL，能抑制EAE的发生发展，而来源于 T_{reg} 细胞的IL-10介导了这种保护作用。这一结果提示，某些肽（虽然肯定不是大多数）可以触发调节 T_{reg} 细胞的抑制作用。

其他研究人员使用经修饰后包含侧翼硫醇-二硫化物氧化还原酶基序（CXXS）的肽，来增加pMHC-TCR相互作用的强度，促进 $CD4^+$ T细胞针对APC的溶细胞活性。据报道，用CXXS-GAD65肽治疗患有前驱糖尿病的NOD小鼠，可抑制其病情的发作。

设计具有所需生物活性的天然存在的肽或APL非常重要。控制任何给定肽或APL的特定生物活性的规则似乎是肽-、MHC-和抗原-受体特异性的，并且难以推广到其它肽-MHC-TCR组合。例如，对于修饰后具有TCR结合亲和力的APL，只有当存在具有独特TCR的同源T细胞时，APL才能发挥作用。一些研究也提示，虽然一些分子可能是某一特定克隆T细胞的激动剂，但同时可能是其它克隆T细胞的拮抗剂。对于具有多个MHC结合位点的肽，通过氨基酸替换来增强肽针对某些T细胞克隆的激动活性，可能会导致该肽完全失去对那些识别其它位点的T细胞克隆的激动活性。此外，肽序列（MHC-或TCR-结合强度）、剂量和给药途径对肽的生物活性也有不可预测的影响：高剂量激动剂持续激活效应 T_H1 细胞，会引发IL-10表达；通过渗透性微泵施用亚免疫原性剂量的 B_{9-23} 超级激动剂APL（并非 B_{9-23} 本身）促进了外部 $CD25^+ Foxp3^+ T_{reg}$ 的分化。但是，目前这一发现受到了外界的质疑。此外，由于T细胞反应需要MHC II类结合肽与由专职抗原提

呈细胞提呈的自身MHC分子结合以触发所需的T细胞反应，因此这些APC的活化状态在同源T细胞-APC相互作用（从耐受到激活）中起关键作用。由于难以控制哪种APC类型捕获和提呈肽，APL疗法可能会同时触发一系列相互抵消的免疫反应（促病和抗病原性），而不是引起极化的抗病原性免疫反应（图2右上，左下和右下）。通过树突细胞特异性抗DEC-205抗体向致耐受性稳态树突细胞靶向递送抗原是一种相对成熟的方法，能够克服这种相互抵消作用（图1d）。

因为在设计基于肽的临床干预时需要考虑多个变量，所以基于肽或APL的自身免疫治疗的人体测试基本上都以失败告终，少数例外仍处于早期试验阶段：如使用胰岛素 β -链衍生的APL（NBI-6024）的人体研究未发现临床功效。最近研究表明，与安慰剂相比，向患有T1D的患者皮内施用未修饰的胰岛素原肽，能增加表达IL-10和Foxp3 $^+$ T细胞的外周频率，同时增加有利的C肽释放水平和胰岛素剂量需求。此外，在人白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）-DR $^{2+}$ 呈阳性的MS患者中，静脉输注MBP肽（MBP₈₂₋₉₆），能显著延迟疾病进展。然而，在临床3期研究中，与安慰剂相比，MBP₈₂₋₉₈并未显示出临床益处。最近一项使用剂量逐步增加的ATX-MS-1467肽皮内注射，治疗复发缓解型MS患者的临床2a期研究显示，总钆和新钆增强时，病变区域减少。尽管作用机制尚不清楚，但通过皮肤贴片递送未修饰的MBP₈₅₋₉₉髓鞘少突胶质细胞糖蛋白（myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG）残基35-55（MOG₃₅₋₅₅）和PLP₁₃₉₋₁₅₅能抑制病情，相关机制包括增加分泌IL-10的T细胞和局部淋巴结中的颗粒状树突朗格汉斯细胞。用dnaJP1肽治疗关节炎患者，虽然导致IL-10增多，但并未显示临床疗效，这表明肽和适应症之间缺乏一致性。

研究者在乳糜泻中也测试了基于肽的方法的临床效果。乳糜泻是一种自身免疫性疾病，

由明确定义的谷蛋白衍生的多种肽导致的自身反应性T细胞反应驱动。使用递增剂量的乳糜泻相关麦醇溶蛋白表位的临床1期研究提供了功效的提示性组织学证据，并且提示肽治疗没有实质性的安全性问题。与其它更复杂的人类自身免疫性疾病不同，在乳糜泻中与疾病相关的自身抗原表位的谱系较窄，并且相应的同源T细胞的外周频率比其它适应症更高。这使得乳糜泻成为一种有吸引力的、在早期临床试验中测试新疗法的机制和功效的疾病，因为我们可以使用现有技术轻易地监测自身反应性T细胞的存在和表型。

未修饰的肽和APL疗法并非没有风险。给

人类使用MBP衍生的APL可能会导致疾病恶化或过敏反应。小鼠实验中，未修饰的胰岛素肽在重复给药时会引发其过敏性休克。尽管APL的风险概率明显高于未修饰的肽，并且这些风险可以最小化，但仍然无法基于每种肽的个体特征或其来源的抗原性质来排除。此外，考虑到信号强度（即亲和力和亲合力）对疗效的关键影响，肽的药效学性质随着剂量改变而改变——尽管这可以通过临床试验中的仔细剂量递增来减轻。此外，缺乏生物学和治疗活性的生物标志物使合理化药物设计、药物递送和给药方案变得很难。

3. 可溶性肽-MHC (pMHC) 复合物

可溶性II类pMHC单体疗法（图1e）或许可以避免肽疗法的一些局限性。根据预测，自身抗原性pMHC与同源T细胞的自身反应性TCR直接连接，会引发克隆无反应性和/或缺失。有研究显示，具有乙酰胆碱受体 α 链（AChR $\alpha_{100-116}$ ）的免疫显性表位的大鼠II类MHC分子提高了自身免疫性重症肌无力（experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG）大鼠的存活率。正如预期，这种治疗效果与T细胞对AChR $\alpha_{100-116}$ 的反应

性降低有关。同样地，用MBP₉₁₋₁₀₃-I-A^s单体处理SJL小鼠降低了EAE的发生率，并且DR2-MOG₃₅₋₅₅治疗在HLA-DR2转基因小鼠中逆转了EAE的症状。

可溶性pMHC在1期临床试验中具有良好的耐受性，但没有进一步研究。据报道，T1D相关抗原GAD65、胰岛素或嗜铬粒蛋白A衍生的I-A^{g7}二聚体和四聚体肽能诱导克隆无反应性、克隆缺失和IL-10的表达。

三、基于纳米颗粒和细胞的免疫疗法

鉴于肽和蛋白质存在递送问题，多种方法已探索使用纳米颗粒或细胞作为递送抗原至APC的载体、作为直接触发T细胞的工具，以及作为免疫调节的直接效应物，或作为诱导

T细胞耐受的APC。此类方法包括抗原-或肽-偶联的纳米颗粒、抗原-或肽-偶联的微粒或细胞，pMHC包被的纳米颗粒，以及T细胞或树突细胞移植。

1. 抗原/肽-偶联的细胞或纳米颗粒

几个小组已经使用抗原偶联的同系淋巴样细胞和红细胞（图1f和g）来促进显性耐受。静脉注射1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺（ECDI）固定的同种异体脾细胞或载有自身抗原的脾细胞能提高对复发缓解型EAE的耐受性。ECDI处理的脾细胞释放自身抗原负载的凋亡小体被认为是该方法诱发耐受性的机制。在这方面，MS的1期临床试验表明，这种疗法安全，且耐受性好。该方法的改进涉及使用载有自身免疫或过敏性疾病相关肽或自身抗原的微粒或纳米颗粒（图1h）。据报道，抗原负载的ECDI固定的脾细胞和微粒的致耐受性涉及各种致耐受机制，具体包括：克隆无能、克隆缺失、免疫偏离和CD25⁺ Foxp3⁺调节细胞的从头生成。最后一种机制被认为是由边缘区巨噬细胞通过胶原样结构巨噬细胞受体（macrophage receptor with a collagenous structure, MARCO）、低密度脂蛋白受体-1（low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1）和B类清道夫（class B scavenger, SRB）受体来摄取凋亡小体或微粒，最终产生IL-10和转化生长因子 β 而引发的。尽管我们仍不清楚每种机制对致耐受性的影响，但似乎不涉及抗原特异性T_{reg}细胞增殖。通过使用抗体阻断IL-10，或使用CD25⁺ T细胞耗竭单克隆抗体，科

学家已经证明，在肽包被的纳米颗粒的保护效果中，IL-10、TR1和其它产生IL-10的T_{reg}细胞起到的作用非常小。相反，Getts等人提供的证据表明，这些微粒主要通过诱导克隆无能而起作用。与Getts等人一样，本文原作者的实验室研究也发现，包被疾病相关肽的微粒，在慢性多克隆自身免疫病（包括T1D、胶原诱导的关节炎和EAE）的自发和实验模型中都没有治疗效果。

其他研究人员已经采用脂质体作为抗原载体。尽管这种载体尚未在自身免疫性疾病环境中进行测试，但有研究显示，载带凝血因子8和经修饰的高亲和力CD22配体的脂质体能够诱导同源B细胞的凋亡，并阻断血友病小鼠体内抗凝血因子8抗体的产生。一种负载胰岛素肽的含磷脂酰丝氨酸的脂质体通过不明确的机制抑制了NOD小鼠的糖尿病发展。在牛血清白蛋白诱导的关节炎模型中，基于磷脂酰丝氨酸、递送抗原和核因子- κ B（NF- κ B）抑制剂（抑制树突细胞成熟）的脂质体，能有效抑制关节炎。同样地，使用递送抗原和雷帕霉素的聚合物纳米颗粒，也能促进致耐受性树突细胞形成，在血友病小鼠中诱导因子8的特异性耐受，并且在PLP肽诱导的复发-缓解EAE模型中抑制疾病发生和发展。

载有相关自身抗原和芳烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 配体ITE (2-(1'H-吡啶-3'-羰基)-噻唑-4-羧酸甲酯) 的纳米颗粒 (图1i) 能诱导致耐受性树突状细胞 (通过ITE), 并抑制NOD小鼠中T1D的进展。当载带能被 β 细胞-自身反应性BDC2.5 TCR识别的模拟表位时, 这些化合物触发了BDC2.5-TCR转基因NOD小鼠中FoxP3⁺ T_{reg}细胞的产生。然而, 这些化合物是否能够在野生型NOD小鼠中引发T_{reg}细胞的形成或增殖尚不清楚。

携带聚(马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物)涂层的抗原负载纳米颗粒 (图1j) 优先积聚在肝窦内皮细胞区室中。已有研究显示, 该隔室充当了Foxp3⁺ T_{reg}细胞诱导剂的角色。EAE诱导后第二天施用负载MOG₃₅₋₅₅的纳米颗粒能阻断C57BL/6小鼠中EAE的发展。虽然治疗引发了T_{reg}细胞数量的增加, 但目前还缺乏在多克隆自身免疫背景下产生抗原特异性T_{reg}细胞或感染/显性耐受的证据。该方法是否在疾病进展的晚期阶段具有治疗活性仍有待确定。

几个研究小组已经研究了自身抗原负载红细胞的致耐受性 (图1f)。因为脾脏通常能清除衰老的凋亡红细胞, 所以自身抗原负载的红细胞可能主要将载带的抗原递送到脾脏APC。包含与血型糖蛋白A结合的12-氨基酸

肽ERY1 (在红细胞上选择性表达) 抗原的使用促进了红细胞携带与疾病相关的自身抗原。该方法首先在卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 特异性OTI TCR转基因小鼠模型中进行测试, 其中装载ERY1-OVA的红细胞会导致识别OVA肽SIINFEKL的CD8⁺ T细胞的清除和失活。研究者还发现, 这种方法可以通过TCR转基因 (单特异性) CD4⁺ T细胞阻止免疫功能低下的NOD受体发生T1D。然而, 这种方法尚未在自身免疫的多克隆模型中进行测试。

另一个团队使用分选酶A将自身抗原与标记的红细胞共价结合。载有MOG₃₅₋₅₅的红细胞延缓了MOG₃₅₋₅₅免疫的B6小鼠中EAE早期临床症状的进展, 并且输注载带胰岛素B链肽Ins₉₋₂₃的红细胞降低前驱糖尿病NOD小鼠中T1D的发生率。因为这种方法引发了同源T细胞的缺失 (图2, 右下), 而不是导致T_{reg}细胞介导的感染耐受 (图2, 右上图)。这种方法可能更适合阻止针对治疗蛋白的寡克隆B细胞反应 (即嵌合蛋白), 或阻断T-和/或B-细胞对特定过敏原的反应, 而不是钝化复杂自身免疫现象的发展。

真核或颗粒载体的替代方案包括口服益生菌, 包括乳酸乳球菌, 以将调节性细胞因子如IL-10、细胞因子拮抗剂和/或抗原递送至粘膜免疫系统。

2. pMHC涂覆的纳米颗粒

基于本文原作者的实验室研究，假设pMHC在纳米粒子（四聚体及以上）上的多聚化增强了它们的克隆缺失特性，那么几种不同pMHC的组合对于钝化多克隆自身免疫性疾病是必要的。他们试图同时靶向几种不同的自身反应性CD8⁺ T细胞特异性，包括识别普遍存在的IGRP表位（IGRP₂₀₆₋₂₁₄）特异性。令人惊讶的是，用载带NRP-V7（IGRP₂₀₆₋₂₁₄）/ K^d pMHC复合物的纳米颗粒处理NOD小鼠，能有效保护该小鼠免于罹患糖尿病，而且这与同源CD8⁺ T细胞群的扩增而非缺失相关。

这两种结果（同源自身反应性CD8⁺ T细胞的扩增和疾病保护）与全身NRP-V7肽递送在NOD小鼠中没有抗糖尿病效果的事实相矛盾，尽管NRP-V7肽触发了IGRP₂₀₆₋₂₁₄特异性T细胞的近乎完全清除。如何解释这种致病性T细胞群的扩增与药物的疾病保护效果之间的矛盾？以下观察提供了初步线索：首先，低亲和力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反应性CD8⁺ T细胞具有抗糖尿病特性，并且与其较高的亲和力对应物不同，在TCR-转基因NOD小鼠中自发分化为记忆样调节性T细胞；其次，递送IGRP₂₀₆₋₂₁₄（NRP-I4）的非缺失性低亲和力APL到NOD小鼠全身，也具有抗糖尿病效果。因此，他们假设纳米粒子以某种方式改变了表面上载带的多聚化NRP-V7（IGRP₂₀₆₋₂₁₄）/ K^d复合物的生物学行为，而且这些化合物选择性地引发了同源的、疾病诱导的记忆样自身调节CD8⁺ T细胞的扩增。他们对几种不同的pMHC I类复合物进行了广泛的体外和体内实验，证明了这一假

设，并且揭示了一种新的自身免疫病发病机制的范例：慢性自身抗原暴露可同时促进致病性高亲和力自身反应性克隆型的缺失和分化。它们的低亲和力对应物在pMHC-纳米颗粒的作用下，形成类似记忆T细胞之类的具有调节作用的细胞。

这些观察结果促使该研究小组认识到这种范例可能也在CD4⁺ T细胞区室中起作用。他们在T1D、MS和关节炎等几种不同小鼠模型以及植入来自T1D患者的外周血单核细胞的免疫缺陷小鼠中测试了疾病相关pMHC II类纳米颗粒的治疗效果。这些化合物都能延缓和逆转疾病症状，并且保护效果与TR1表型和转录谱的同源自身反应性CD4⁺ T细胞的全身性扩张相关。此外，这些自身反应性TR1样细胞触发了自身反应性B_{reg}细胞的形成并将其募集到引流淋巴结，抑制抗原提呈，从而激活了非同源自身反应性T细胞，不过没抑制全身免疫（图3）。因此，单一的、基于单特异性pMHC的纳米药物可以抑制复杂的自身免疫性疾病，而与同源T细胞群的存在或其在疾病过程中的作用无关。

尽管pMHC I类和II类纳米颗粒能产生相似的治疗和免疫学结果，但存在一个显著差异：pMHC I类纳米颗粒扩展了先前存在的、由低亲和力前体自发产生的记忆样自动调节CD8⁺ T细胞，而pMHC II类纳米粒子则触发抗原刺激过的致病效应细胞分化成抑制疾病的TR1细胞，然后系统扩增，最终促进下游调节细胞网络的形成。

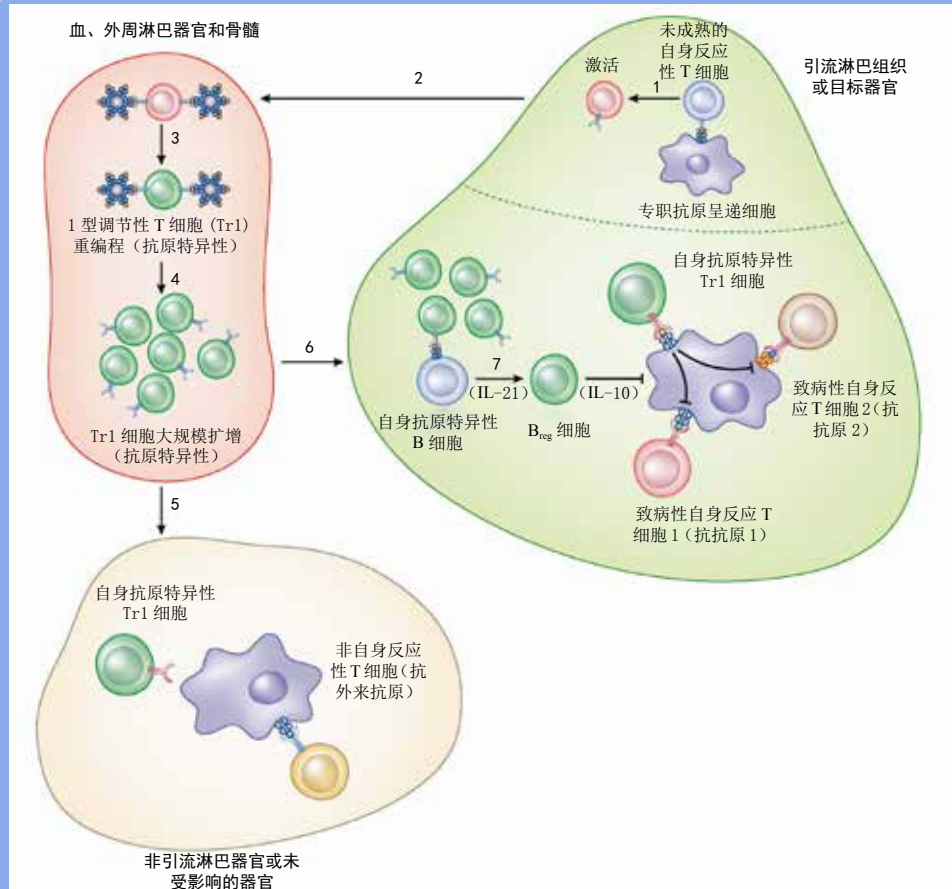


图3 基于pMHC的纳米药物。涂覆疾病相关的pMHC II类复合物的纳米颗粒能引发局部(1)和广泛的(2)同源自身抗原刺激过的CD4⁺T细胞分化成1型调节性T细胞(3)，然后大量扩增(4)。这些扩增的T_{reg}细胞分布全身，但当它们到达发炎组织或器官远端的组织或淋巴器官时，由于在这些部位缺乏同源自身抗原负载的APC，它们不能进行抗原诱导的激活(5)。相反，当它们到达发炎的组织或器官以及相应的引流淋巴器官时，这些T细胞识别内源性自身抗原负载的APC和B细胞表面上的同源pMHC II类复合物，导致抗原提呈和促炎能力的抑制(6)和B_{reg}细胞的形成(7)。综上所述，这些事件全面促进了复杂的自身免疫现象的组织特异性消退。

3. T细胞移植

体外扩增产生IL-10，但不产生CD25（IL-2的高亲和力受体）和FoxP3转录因子的TR1细胞，可以在小鼠模型中减轻结肠炎。给人类口服抗原（卵清蛋白）特异性TR1细胞在临床试验中能缓解克罗恩病（图1k）。在儿童或成人T1D患者中使用FoxP3⁺ T_{reg}细胞的过继转移研究表明，输注非抗原特异性T_{reg}细胞是安全、且可耐受的。

新兴的细胞工程技术保证了T_{reg}细胞疗法领域的快速变化，包括使用表达转基因FOXP3、自身反应性TCR和/或嵌合抗原受体（CAR）的常规T细胞。一个研究团队在CD4⁺ CD25⁺ T_{reg}细胞中表达与CD3ζ的细胞质尾部融合的EAE相关pMHC，以促进它们在与同源效应T细胞结合时的活化。另一个研究团队在常规T细胞中表达类似的嵌合pMHC复合物以及编码FOXP3的转基因。但这些方法缺乏特异性，因为它们会引发T_{reg}细胞多克隆库的激

活，包括与疾病无关的T_{reg}细胞，这可能导致非疾病特异性免疫抑制（图2，左上）。另一种方法是表达CAR与T_{reg}细胞上的组织特异性抗原结合，将其免疫调节活性集中在自身免疫所攻击的部位。

CAR T细胞也被用于特异性靶向和杀死自身抗原特异性B细胞。CAR-T细胞诱导的桥粒芯糖蛋白3（Dsg3）特异性B细胞的清除在天疱疮的小鼠模型中具有治疗效果。需要注意的是，该方法选择性地靶向具有独特抗原特异性的B细胞（图2，右下）。因此，在涉及多种自身反应性B细胞或T细胞的复杂抗原自身免疫性疾病中，这种方法可能适用性有限。

CAR T细胞在体内的存活时间、CAR转基因的安全性问题以及与细胞因子释放综合征相关的潜在致命毒性，可能会限制基于CAR-T细胞的方法对非致命性的自身免疫性疾病的适用性。

4. 树突状细胞移植

在某些情况下，树突状细胞（dendritic cell）的特定亚群通过产生无反应性T细胞和/或抗原特异性T_{reg}细胞来支持免疫耐受（图1l）。针对MS、关节炎和T1D的患者，研究人员已经成功在体外诱导了致耐受性树突状细胞，并且在临床1期试验中将这些细胞移植至患有T1D的患者体内，结果并未引发显著的不良事件。基于树突状细胞的免疫疗法可能优于其它基于细胞的疗法，因为有多种方案可以在相对短的时间段内大量地诱导树突状细胞和单

核细胞分化。此外，这些体外产生的树突状细胞可以通过各种方法分化为致耐受性细胞，包括NF-κB抑制、共刺激分子沉默（CD40、CD80和CD86），或免疫调节分子的表达，如IL-10、IL-4或吲哚胺2,3-双加氧酶。然而，树突状细胞疗法，和其它基于细胞的方法一样，涉及昂贵的制造过程以及重复给药问题。我们将需要更多的临床试验来确认它的安全性，并记录它的治疗潜力。

四、讨论

不能完全了解特定人类自身免疫性疾病中的致病机制和自身抗原库，加上需要从动物模型中推断信息，阻碍了抗原诱导的耐受性方法的临床转化。一些方法过早地进入临床，却未对不同遗传背景的自身免疫性疾病的各种自发和实验模型（以排除遗传背景特异性效应）的作用机制或治疗功效进行系统而深入的分析。其它方法依赖于使用选择不当的自身抗原靶标，或针对人类疾病中不明确的致病途径，或不适合提供机制证据和功效证据的临床试验设计（例如给药剂量、治疗方案），或持续时间设计不当。另外的方法则因非科学原因，包括缺乏资源、资金或有限的知识产权保护而无法进入临床。

自身免疫性疾病的“人源化”小鼠模型的开发可以通过实现人类特异性化合物的临床前测试来帮助弥合一部分缺陷，从而有助于基于自身抗原递送的自身免疫干预的临床转化。目前用于临床前研究自身免疫病的一些常用模型包括：在有或无共表达自身免疫性疾病相关的转基因TCR的HLA转基因小鼠免疫缺陷的NOD.Scid.II2r γ c (NSG) 小鼠中植入人外周血单核细胞或脐带血来源的CD34⁺造血干细胞。NSG小鼠的问题包括：移植物抗宿主病的发展，以及缺乏发育完全功能性免疫途径所需的、发育良好的淋巴器官，包括胸腺、淋巴结和肠相关淋巴组织。这些限制的一种解决方案是移植胎儿胸腺和肝脏衍生的（或骨髓衍生的）CD34⁺祖细胞（NSG-BLT小鼠）和/或通过共表达HLA和人细胞因子，例如人IL-3、GM-CSF和SCF（NSG-SGM3小鼠）转基因，从而促进骨髓细胞和T_{reg}细胞的发育。为了克服物种特异性的差异，我们需要通过基因修饰，用人类对应物替代鼠类自身抗原，这样才能充分模拟抗原特异性疗法在人体中的治疗

反应。不幸的是，尽管目前取得了进展，但大多数可用的动物模型对于发生的自发性自身免疫反应仍难以控制的，因此仍然不能真实地预测人类抗原特异性干预策略的结果。

尽管存在以上缺点，诱导抗原特异性耐受仍然是在自身免疫性疾病中恢复对自身耐受性的最有希望的策略。APL为实现这一目标打开了希望之窗。然而，多年来，科研界对APL的热情日渐冷却。CD4⁺ Foxp3⁺ T细胞和TR1细胞在维持外周耐受中可发挥重要作用，并具有成为临床干预的潜力，然而，多克隆或抗原特异性T_{reg}细胞的离体扩增在技术上具有挑战性——耗时且昂贵；体内T_{reg}细胞存在不稳定的问题（特别是在炎性微环境中），以及多克隆T细胞群缺乏抗原特异性可能会引发的安全问题。我们还讨论了使用全抗原、DNA疫苗、抗原偶联的凋亡细胞和肽包被的微粒和纳米颗粒。尽管这些方法在自身免疫的实验模型中具有不同程度的治疗功效，但是它们对抗原复杂细胞克隆复杂的自身免疫性疾病的治疗效果不明。潜在的作用机制的不确定、真实生物标志物的缺乏、自身抗原的普遍存在，外加靶向诱发疾病的病因的需求，这些都导致了临床转化的难度。几种方法，例如可溶性未修饰的肽，以及肽包被的颗粒已被证明可以诱导耐受性，从而阻断某些自身免疫反应的发作。然而，当在疾病高峰期（触发事件的下游）使用时，这种基于单特异性肽的方法无法系统而有效地逆转各种自身免疫病的症状。如果这些方法用作治疗剂而不是预防性疫苗，那么这一点就很重要了。

基于肽和抗原的方法似乎通过各种机制，包括克隆缺失、克隆无能、TCR下调和细胞因子的平衡偏离在起作用。这些机制中每一种的相对贡献根据疾病模型、遗传背景、剂量、

给药途径、TCR结合亲和力及佐剂的使用而变化。这种复杂性可能部分解释了上述观察到的结果，即治疗没效果，或疾病恶化，甚至产生危及生命的毒副作用。在多克隆自身免疫性疾病和临床试验模型中，基于抗原的治疗成功率低与其在过敏治疗中的日渐成功不一致。在过敏治疗中，过敏原特异性分泌IL-10的 T_{reg} 细胞生成增加相对常见，并且是治疗成功的关键。

抗原特异性治疗在治疗过敏和自身免疫性疾病中存在的效果差异的一个可能因素是，某些方法触发 T_{reg} 细胞形成的难度取决于它们对效应T细胞亚群的影响。例如，在过敏性疾病和自身免疫性疾病中产生IL-10的 T_{reg} 细胞可能源自不同的抗原特异性前体（分别为 T_H2 vs T_H1 或 T_H17 ），因此涉及不同的信号传导和转录途径。最近已经证实了c-Maf（IL-10表达的强阳性调节剂）的基因调节作用受到细胞亚群背景的影响。GAT3在 T_H2 细胞中的表达触发IL-10基因座处的染色质变化，这对于IL-10表达是必需的（但不足够）。在 T_H1 和 T_H17 细胞（缺乏GATA3表达）中，并非如此。在这两种细胞中，其它因子，例如转录因子E4BP4在慢性TCR刺激时激活IL-10的表观遗传变化。触发IL-10分泌的上游信号传导途径也在不同子集中差异表达。例如，转录因子Jun / AP-1是 T_H2 中IL-10表达所必需的，在 T_H1 细胞中则是非必需的。已有证据显示，APC衍生的IL-27在从未成熟T细胞前体诱导TR1细胞中起作用，其机制是触发转录因子cMAF、IL-21和ICOS的表达，但在pMHC纳米颗粒诱导抗原刺激过的 T_H1 效应细胞形成TR1的过程中并不必要。此外，与IL-27不同，pMHC II类纳米粒子只能诱导抗原刺激过的T细胞形成TR1细胞。总之，在T细胞中诱导 T_{reg} 分化和/或IL-10表达的途径是多样化的，疾病和T细胞亚群具有依赖性，并且受来自其它细胞类型的旁分泌因子的影响。在解释实验数据时必须仔细考虑这种复杂性：生物样品中的“IL-10上调”不能作为

“ T_{reg} 细胞分化”的同义词。

过敏性疾病和自身免疫性疾病之间的另一个根本区别也可能导致两种疾病对抗原和抗原肽疗法的反应不同。前者的病情与后者不同，前者是由对较少抗原发生反应的T细胞和B细胞反应过激引起的，而且患者体内效应（过敏原特异性）淋巴细胞的外周频率较高。通过反复暴露于显性过敏原衍生的表位，将这种外周频率高的效应 T_H2 细胞重编程为分泌IL-10的 T_{reg} 细胞（无论是否为TR1）可能足以减轻疾病，而不会诱导 T_{reg} 细胞任何亚群的扩增。相反，在自身免疫性疾病中，任何特异性T细胞（针对特定表位）的外周频率可能太低，以致于对 T_{reg} 细胞的任何假设重编程（通过其本身，在没有全身扩增的情况下）影响可能太小，导致无法抑制自身免疫性疾病。在这方面，扩增同源 T_{reg} 细胞的方法似乎最适合用来钝化抗原扩散——这是大部分自身免疫性疾病驱动因素。由于肽和抗原，无论是在溶液中还是与颗粒偶联，只能通过中间体APC起作用，因此它们的生物活性取决于吞噬细胞的功能（图2，左上图和左下图）。这是一个难以控制的过程，特别是当在溶液中使用肽时，它也可以结合并取代与之接触的任何专职APC上表达的MHC II类分子结合的肽。多价pMHC-纳米粒子-目标T细胞相互作用的高亲和力克服了基于肽或抗原的免疫疗法的不可预测性，其免疫调节作用依赖于结合强度，因此需要高抗原剂量和高亲和力配体。然而，这些基于pMHC的纳米药物是否会在人类中诱导免疫调节反应，这些反应是否与小鼠中观察到的一样安全、稳定和有效，以及是否需要频繁或偶尔诱导和/或维持人类治疗功效，直到相关临床测试完成了才能知道答案。

值得注意的是，在自身免疫性疾病和过敏的非简化模型（例如通过使用四聚体技术）中，治疗对于同源T或 T_{reg} 细胞的重编程和/或扩增（或缺失）的影响尚未被普遍记录（或报

告)。如上所述,某些肽能够促进某些克隆的失活和TR1样细胞转化。然而,尚未证实这些肽的使用是否能够促进 T_{reg} 细胞的形成,是否能促进来自野生型小鼠多克隆T细胞库中存在的少量同源T细胞的扩增,以及在非TCR转基因模型中能否持续逆转已建立的自身免疫现象。其它方法,例如pMHC二聚体,也可诱导克隆T细胞无反应性和IL-10表达,但不能促进 T_{reg} 细胞的全身性扩增。事实上,高阶多聚体形式的pMHC化合物(八聚体)能有效促进克隆缺失。目前还不清楚,某些肽或载带某些肽的颗粒处理导致的小鼠脾脏或淋巴结细胞培养物中大量出现的、表达IL-10的 $CD4^+$ T细胞是否确实是 T_{reg} 细胞,因为没有任何进一步的表型、转录或功能的支持。 T_H2 、 $FoxP3^+$ T_{reg} 细胞和恒定型自然杀伤T(invariant natural killer T, iNKT)细胞,以及其它细胞类型,都可以产生IL-10。此外,这种产生IL-10的T细胞也可能是具有不同细胞表面表型、转录和表观遗传谱和调节潜力的细胞的异质混合物。

近年来我们对自身免疫性疾病的发病机制及其抗原和细胞复杂性的了解取得了巨大进

展,这促使并鼓励了人们开发诱导抗原特异性耐受的新方法,这些方法可能涉及医学、免疫学、材料科学、生物技术和纳米技术等交叉学科。科学家已经意识到,使用抗原特异性方法治疗多克隆自身免疫性疾病(与自身抗原扩散之前的疾病状态不同,也与由单独或少数抗原反应性驱动的疾病不同)只能通过积极诱导“传染性”或调节性细胞来实现免疫调节,因此他们关注能够募集、引发和/或扩增自身抗原特异性调节性T和/或B细胞的策略。虽然已经证明能够通过消耗特定免疫细胞类型或通过增强 T_{reg} 细胞功能来抑制自身免疫性炎症的非抗原特异性策略是有效的,但毋庸置疑,抗原特异性疗法才可能是最终的优胜方案,问题只是在于:何时抗原特异性疗法才能够真正战胜自身免疫性疾病。这些方法的特异性将克服与非特异性治疗相关的副作用,并且可以使免疫稳态恢复至健康稳态(即可以治愈),这是非抗原特异性方法无法实现的结果。我们估计,在不久的将来,抗原特异性疗法将可以为患者提供单克隆抗体革命无法提供的组织和疾病特异性免疫抑制效果。

原文检索:

<https://www.drugs.com/cg/autoimmune-disease.html>

Michael F. Seldin. The Genetics of Human Autoimmune Disease: A Perspective on Progress in the Field and Future Directions. *J Autoimmun.* 2015 November ; 64: 1-12.

Pau Serra & Pere Santamaria. (2019) Antigen-specific therapeutic approaches for autoimmunity. *Nature Biotechnology.* 37: 238-251.

Eason、张洁/编译

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com



细胞鉴定质控服务指南

Cell Authentication and Quality Control Service

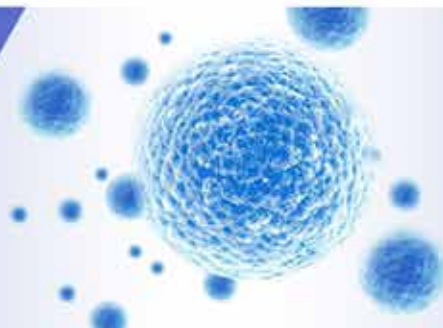
● 严把细胞质控，提高科研质量 ●



Step 1

STR鉴定

- 确定细胞来源的可追溯性
- 制定新构建细胞株的鉴定标准



Step 2

FISH检测

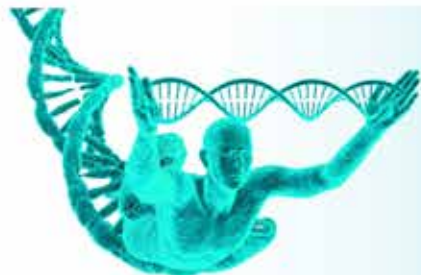
- 确定目的基因所在的染色体数目



Step 3

ddPCR检测

- 确定目的基因拷贝数目



Step 4

RT-PCR检测

- 确定研究基因的剪接体 (splice form)



◆ 建议支原体检测贯穿整个实验过程

细胞鉴定和质控相关产品

STR鉴定

STR(Short Tandem Repeat,短串联重复序列)基因分型已被CLAC、ATCC等权威机构作为金标准应用于细胞鉴定。

【PrecisionPlex™ STR25 Detection System—DNA 指纹检测系统】

【人源细胞STR分型检测】

【人源细胞来源一致性检测】



FISH探针

- 用于精准医疗的循环肿瘤细胞验证
- 协助检测、研究染色体畸变
- 用于染色体计数

【VividFISH™染色体计数探针 (CEP)】

【VividFISH™疾病相关基因探针 (LSI)】



支原体检测试剂盒

支原体感染前期较难被察觉，逐渐表现为细胞增殖缓慢、基因表达改变、代谢特征及细胞形态变化等。为确保研究结果的真实性，易锦生物推荐在实验过程中定期进行支原体检测。

【MycoGuard™ PCR Detection Kit 2.0 (PCR法)】

【MycoGuard™支原体检测试剂盒-生物化学发光法】



ddPCR

测量目标基因的绝对拷贝数，无需依赖参照品；
空前的精确，精准，去除PCR误差；
可用于液体活检，CNV analysis，极少量突变基因检测，单细胞分析和NGS结果确认。



RT-PCR

不同的剪接方式造成一个基因有多个不同剪接体。基因功能研究，首先需要确定研究该基因的哪个剪接体 (splice form)。

【RT-PCR引物及试剂】



扫一扫，关注官方微信

A group of people are forming a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid is composed of several layers of people, with the top layer having one person, the middle layer having two, and the base having three. The people are wearing dark clothing. The sky is filled with soft, white clouds. The overall tone of the image is motivational and collaborative.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmics.com