

· 学科进展 ·

国家自然科学基金重大项目“自身免疫识别与应答的机制及调节研究”结题综述

吕群燕^{1*} 熊思东² 高晓明² 尹芝南³ 董尔丹¹

(1 国家自然科学基金委员会医学科学部,北京,100085; 2 苏州大学生物医学研究院,苏州,215123;
3 暨南大学生物医学转化研究院 广州,510632)

[摘要] 国家自然科学基金重大项目“自身免疫识别与应答的机制及调节研究”围绕自身免疫识别与应答的机制及调节这一免疫学重大基础科学问题,以活化淋巴细胞来源的双链 DNA(ALD-DNA)免疫小鼠诱导系统性红斑狼疮(SLE)为自身免疫病原型动物模型,研究了 DNA 的化学修饰及自身免疫识别机制、调节性抗体的产生机制及其在自身免疫应答与调节中的作用、Treg 亚群格局的调控及其在自身免疫应答中的作用这 3 个子科学问题。经过 4 年研究,以 ALD-DNA 和活化 T 细胞膜翻转脂筏相关蛋白为二大自身抗原,在 dsDNA 免疫原性的化学基础、DNA 免疫识别及应答规律、抗 T 细胞抗体的产生和调节机制、Treg 的调控及对自身免疫的调节等方面取得突破性进展,提出基于 SAP,Notch1,miR155,Foxo3a,CRT,W8,NK007 等的治疗 SLE 的新策略。

[关键词] 重大项目;自身免疫;活化淋巴细胞来源 DNA;系统性红斑狼疮;自身免疫识别;抗 T 细胞抗体;调节性 T 细胞

DOI:10.16262/j.cnki.1000-8217.2015.01.005

自身免疫是免疫系统对自身抗原进行识别并发挥免疫效应的过程。生理情况下对自身抗原的免疫识别和清除有助于维持免疫自稳,而针对自身组织抗原的病理性自身免疫的产生则导致自身免疫疾病的发生;生理性自身免疫向病理性自身免疫转换的关键取决于自身抗原的分子特征改变和对自身抗原的自身免疫识别和应答(固有免疫、适应性 T/B 细胞免疫),同时受多种免疫细胞和免疫分子的调控。深入研究自身抗原的分子特性,阐明对自身抗原的免疫识别和调节,及生理性自身免疫向病理性自身免疫转变的关键节点,是免疫学尚未解决的关键科学问题之一;同时为防治自身免疫疾病提供必需理论基础,具有重大科学意义。

1 立项背景

自身免疫性疾病(Autoimmune diseases, AID)是一类由于自身免疫耐受被打破、机体针对自身抗

原诱导免疫应答的一系列病理性免疫疾病。当前全球自身免疫性疾病的发病呈持续上升趋势,发病率达 0.1%—1.0%^[1]。类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)和系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)成为全球范围高发的 AID。其中 SLE 的全球患病率达 41/10 万人^[2],育龄妇女(30—39 岁)发病率为男性的 9 倍,SLE 病理损伤累及全身脏器,严重致残及致死,是我国最为严重的 AID,其发病机制迄今不明,缺乏特异性治疗措施。SLE 的特征是患者存在高水平血清抗双链 DNA(dsDNA)自身抗体,提示自身 dsDNA 是 SLE 的主要自身抗原,研究对 dsDNA 的自身识别和应答成为 SLE 及自身免疫基础研究的重大科学问题。

自身免疫应答的驱动原是自身抗原。免疫系统在生理状态下已诱导对自身抗原的免疫耐受,然而当自身抗原出现异常改变则可重新诱导自身免疫应答。除病原体感染诱导的模拟交叉抗原^[3]、自身成

收稿日期:2014-09-15;修回日期:2014-10-13

* 通信作者,Email: luqy@nsfc.gov.cn

分突破免疫屏障、自身抗原易位机制,化学修饰是自身抗原改变的新机制。化学修饰可直接导致新的自身变异性抗原(auto-altered antigen)出现,也可改变胞内分子定位而突破胞内免疫屏障作用(intracellular immunobarrier)间接导致自身抗原。该项目前期研究发现 dsDNA 的低甲基化修饰是自身 DNA 获得免疫原型的关键之一^[4]。基因启动子的表观化学修饰差异也是 SLE 发病的分子机制之一^[5]。探索自身抗原化学特性和免疫原性及抗原性的关系,对深入理解自身抗原具有源头意义。

目前就免疫细胞如何识别和区分自身抗原和正常自身成分的机制尚不清楚,外周已诱导免疫耐受或免疫无能的自身反应 T/B 细胞被重新激活的分子机制也不明确。除 TCR、BCR 介导的特异性自身免疫识别,近年研究提示了固有免疫感受器介导的固有免疫(innate immunity)在识别自身抗原、驱动自身免疫、放大组织炎症损伤和发挥免疫调节方面的重要意义^[6,7]。探索识别自身抗原的受体或感受器并阐明其相互作用的分子基础、反应动力学规律和下游传导信号通路,可补充免疫学基础关于自身免疫识别与应答的空白。

免疫调节机制的失控或失能是导致病理性自身免疫的重要机制。细胞免疫和体液免疫层面的自身免疫调节机制尚未阐明。本研究发现的由活化 T 细胞来源的膜翻转易位自身抗原诱导的抗 T 细胞抗体,即一种可调节活化 T 细胞的调节性抗体(Regulatory Ab)^[8-9];而调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)有效监控抑制自身抗原特异性淋巴细胞功能,其与效应细胞间的平衡是决定病理性自身免疫应答的关键^[10]。研究自身免疫病发病过程中的 Treg 亚群格局的动态改变及调控 Treg 分化的关键分子及机制具有理论和应用意义。

重大项目“自身免疫识别与应答的机制及调节研究”以活化淋巴细胞来源的双链 DNA(ALD-DNA)和膜翻转易位抗原为自身抗原,沿自身免疫识别-应答-调节主线,通过免疫学与化学学科联合攻关从全新视角突破以下关键科学问题:

(1) 赋予自身抗原免疫原性的化学修饰特征及对自身抗原免疫原性和抗原性的影响;

(2) 自身抗原的新的免疫识别受体或感受器及其相互作用的模式;

(3) 自身抗原免疫识别后活化的信号传导通路;

(4) 调节性抗体的产生机制及调节机制;

(5) Treg 亚群格局的动态诱导及其对自身免疫应答的调节机制

2 组织实施

重大项目“自身免疫识别与应答的机制及调节研究”酝酿于 2007 年,经专家研讨于 2008 年立项,2009 年正式启动。围绕自身免疫识别与应答的机制及调节这一免疫学重大基础科学问题,以 ALD-DNA 诱导的 SLE 小鼠模型为自身免疫病基本动物模型,解决 DNA 的化学修饰及自身免疫识别机制的研究、调节性抗体的产生机制及其在自身免疫应答与调节中的作用、Treg 亚群格局的调控及其在自身免疫应答中的作用这 3 个子科学问题。

2010 年 1 月 5 日,项目组召开第一次学术交流和协调会,根据专家的书面评价和意见,调整了研究工作的具体方案。2010 年 12 月 29 日,项目组召开了中期评估会议,经 9 位免疫和化学领域专家的审阅评估,认为项目基本完成任务书规定的研究内容,已形成较鲜明的研究特色;建议加强子课题组间合作及免疫-化学学科交叉、加强与临床相关学科的交流与合作。子课题完成了中期调整计划书。2012 年 1 月 4 日,项目组召开第二次学术交流和协调会议,专家组提出后期加强临床合作的建议。2013 年 3 月 15 日,结题验收会议召开,专家组一致认为:该项目通过免疫学与化学的学科交叉,有效开展了相关研究,已超额完成任务书规定的研究内容,在 DNA 自身免疫识别和应答的重要免疫学科学问题上有所突破。经费使用合理,项目组织和管理有序规范,专家组综合评议为特优,通过验收。

3 研究进展与成果

重大项目“自身免疫识别与应答的机制及调节研究”经过 4 年系统、交叉而又深入的研究,取得了一系列的突出进展和创新成果。

3.1 DNA 的化学修饰及自身免疫识别机制的研究

以 SLE 和 RA 两种代表性自身免疫病为原型,首次创新性阐明了活化淋巴细胞来源的双链 DNA(ALD-DNA)和活化 T 细胞的膜翻转易位蛋白-钙网蛋白(CRT)是主要的自身抗原,应用 ALD-DNA 首创了常规遗传背景的 SLE 动物模型,在国际学术界被广泛认可。在此明确自身抗原的自身免疫病模型基础上,创新性证实 DNA 的甲基化水平、所含

CpG 数量、片段长度和 DNA 构象是影响和决定自身抗原免疫原性的关键因素。从以下方面阐述了自身免疫识别和应答机制:

(1) 阐述了血清淀粉样蛋白 (Serum amyloid P component, SAP)、C 反应蛋白 (C-reaction protein, CRP)、甘露糖结合凝集素 (Mannose-binding lectin, MBL) 三种血清蛋白介导的对于 ALD-DNA/机体内冗余 DNA 的清除机制及在阻断自身免疫激活的重大作用。

(2) 阐述了对 ALD-DNA 的固有免疫识别的 Toll 样受体 9 (TLR9) 依赖和 DNA 依赖的干扰素调节因子激动剂 (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors, DAI)、黑色素瘤缺陷分子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 两种感受器介导的 TLR9 不依赖通路、应答及炎症放大效应在诱导 SLE 中的意义。解析了 SLE 患者血清中高迁移率蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 作为胞外 DNA 感受器结合抗原抗体复合物 (ICs) 经由 TLR2/MyD88/miR-155/Est1 通路激活放大炎症效应及自身抗体生成的新机制, 提示 HMGB1 在介导巨噬细胞对自身 DNA 危险信号的感知和固有免疫炎症放大效应中发挥重要作用, 并具有作为 SLE 诊断和预后指标分子的潜能。

(3) 证实自身抗原诱导的巨噬细胞极化是决定自身免疫应答发生的早期核心启动事件。ALD-DNA 在早期经由 Notch1-p38-NF- κ B 通路激活巨噬细胞向炎性 M2b 类型极化, 是驱动 SLE 发生的核心事件; 而 SAP 结合 ALD-DNA 后不仅促进巨噬细胞对其的吞噬清除还经 PI3K/Akt-ERK 通路诱导 IL-10 扭转 M2b-M2a 转化, 而逆转或减缓 SLE 发生。

(4) 证实 FOXO3a 是糖皮质激素 (GCs) 治疗 SLE 的新分子靶标。

(5) 提出基于 Notch1、SAP、miR155、Foxo3a 等的 SLE 治疗新策略^[11-15]。

上述研究基于原创的在正常遗传背景小鼠建立的 SLE 动物模型、针对重要的自身免疫原——自身 dsDNA, 提出了自身 DNA 识别与自身免疫启动与调控的新观点, 受到国际肯定, 在 Nat Rheumatol Rev(2011; 7(9)) 中, 就熊思东课题组发现的 SAP 调控的巨噬细胞 M2b-M2a 转化治疗 SLE 发表题为 “SAP-induced macrophage polarization: a poten-

tial therapeutic option for SLE?” 的评述, 认为 “开辟了 SLE 治疗的新途径 (opens a new potential therapeutic avenue for SLE disease)”。说明该研究有力推动了关于大分子 DNA 的免疫识别与应答的免疫学重大科学问题的阐明。

3.2 调节性抗体的产生机制及其在自身免疫识别与应答中的调控作用研究

基于 ALD-DNA 建立的 SLE 模型和 RA 模型, 创新性发现:

(1) 活化 T 细胞内一系列胞浆蛋白因发生膜翻转异位而发展为自身抗原, 可诱导多特异性的抗 T 细胞抗体, 这一系列胞浆蛋白为钙网蛋白 (calreticulin, CRT)、内质网蛋白 57 (Endoplasmic reticulum protein 57, ERp57) 及波形蛋白 (vimentin) 等 10 余种脂筏相关蛋白;

(2) 具有独特糖基修饰是膜翻转异位蛋白的重要特点, 发现 RA 与 SLE 患者血清中存在针对多种寡糖表位的自身抗体。

(3) 揭示活化态 T 细胞膜翻转异位蛋白诱导抗 T 细胞抗体产生的机制通过间接途径, 即被 APC 行外源性抗原提呈并依赖于 Th 细胞诱导抗 T 细胞抗体。

(4) RA 及 SLE 患者血清可溶性 CRT 水平显著增高, 揭示 CRT 经 TLR4/CD14 通路激活 B 与单核巨噬细胞的佐剂样免疫刺激功能, 提示其在自身免疫患者体内的病理作用。

(5) 阐明抗膜翻转异位蛋白特异性调节性抗体通过抑制 T 细胞表面脂筏结构融合、抑制胞内 LAT、Akt 磷酸化而发挥抑制 Th1 信号传导、调节

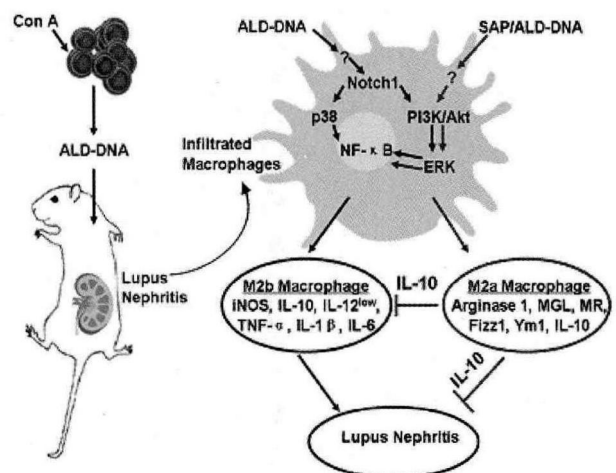


图1 ALD-DNA 诱导的巨噬细胞 M2b 极化是 SLE 自身免疫的启动事件^[14,15]

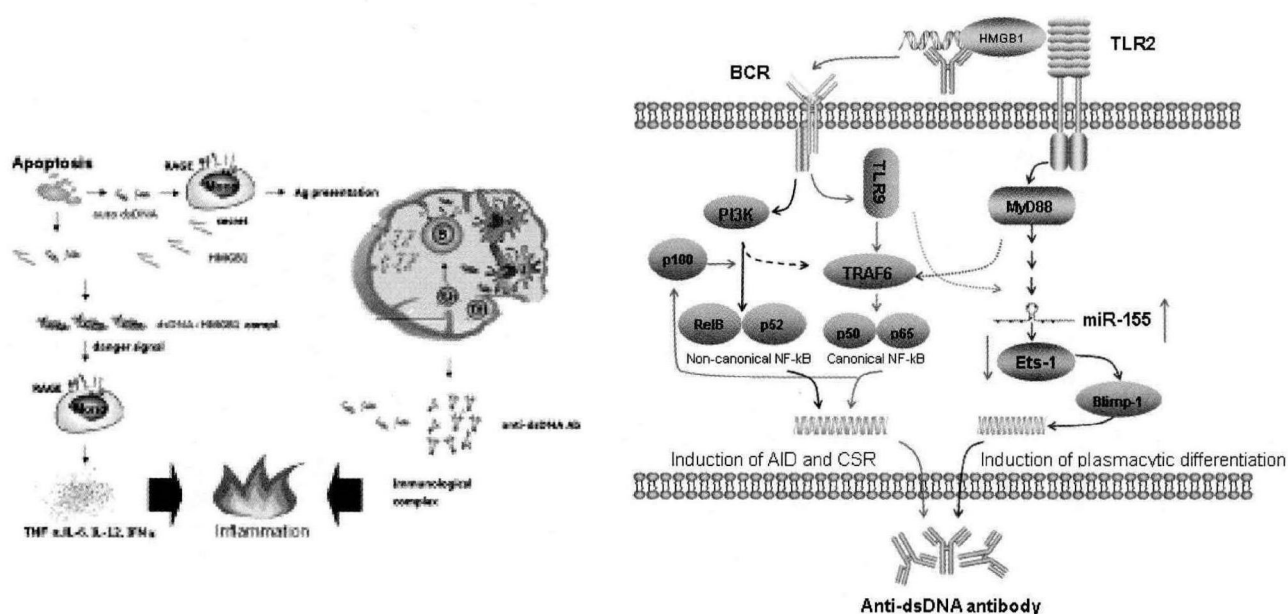


图 2 SLE 患者血清 HMGB1 结合 ICs 经由 TLR2/MyD88/miR-155/Ets1 通路激活放大炎症效应及自身抗体生成的新机制^[11]

自身免疫应答的机制,为多种自身免疫疾病发病的分子机制提供了新思路^[16-20]。

3.3 Treg 亚群格局的调控及其在自身免疫应答中的作用研究

在 ALD-DNA 诱导的 SLE 模型中发现:(1) nT-reg 亚群在疾病晚期显著减少从而使淋巴细胞活化失控;(2) 发现 ALD-DNA 可激活 DC 特异性诱导 IL-6 表达,抑制 Foxp3 表达和 Treg 亚群分化,从而促进 SLE 炎症病理过程;(3) 筛选得到可调控 Treg 亚群格局的娃儿藤碱类小分子化合物 DCB-3503 衍生物 W8,通过上调 FoxP3 启动子去甲基化和抑制去甲基转移酶,显著上调 Foxp3 表达和促进 Treg 分化,具有治疗自身免疫病的潜能;(4) 筛选得到通过加速 mRNA 降解而抑制 TNF-表达的抗炎药物 NK-007,已正式开展临床前研究^[21-23]。

项目执行期间,项目组共发表标注研究论文 76 篇,受理国家发明专利 23 项,获得授权 8 项;培养研究生 56 名,有 2 人获得国家杰出青年科学基金资助;广泛开展了国际合作交流,在国际学术会议大会口头或特邀报告 50 人次,邀请国外知名专家来华讲座及交流 45 次。依托本项目成果,南开大学、北大人民医院、瑞典 CMM 分子医学研究中心和耶鲁大学合作已获得科技部重大国际合作项目的资助,推进了我国自身免疫识别与应答的基础研究。

参 考 文 献

[1] Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 2014, S0140-6736(14)60128-8.

- [2] Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, et al. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64 (2):159-168.
- [3] Root-Bernstein R, Vonck J, Podufaly A. Antigenic complementarity between coxsackie virus and streptococcus in the induction of rheumatic heart disease and autoimmune myocarditis. *Autoimmunity*, 2009, 42(1):1-16.
- [4] Wen Z, Xu W, Xu L, et al. DNA hypomethylation is crucial for the apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in the SLE-non-susceptible mice. *Rheumatology*, 2007, 46:1796-1803.
- [5] Costa-Reis P, Sullivan KE. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*, 2013, 15 (9): 369.
- [6] Smith S, Jefferies C. Role of DNA/RNA sensors and contribution to autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, pii: S1359-6101(14)00081-1.
- [7] Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 461-88.
- [8] Zhang X, Liu X, Wang W, et al. Anti-T-cell humoral and cellular responses in healthy BALB/c mice following immunization with ovalbumin or ovalbumin-specific T cells. *Immunology*, 2003,108:465-473
- [9] Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, et al. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 2013,13(6):461-467.
- [10] Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(9): 543-551.
- [11] Wen Z, Xu L, Chen X, et al. Autoantibody induction by DNA-containing immune complexes requires HMGB1 with the TLR2/microRNA-155 pathway. *J Immunol*, 2013, 190 (11): 5411-22.

- [12] Zhang W, Zhou Q, Xu W, et al. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI) promotes lupus nephritis by activating the calcium pathway. *J Biol Chem*, 2013, 288 (19): 13524—13550
- [13] Wen Z, Xiong S. Production of anti-double-stranded DNA antibodies in activated lymphocyte derived DNA induced lupus model was dependent on CD4+ T cells. *Lupus*, 2012, 21(5): 508—516
- [14] Zhang W, Xu W, Xiong S. Macrophage Differentiation and Polarization via PI3K/Akt-ERK Signaling Pathway Conferred by Serum Amyloid P Component. *J Immunol*, 2011, 187(4): 1764—1777.
- [15] Zhang W, Xu W, Xiong S. Blockade of Notch1 Signaling Alleviates Murine Lupus via Blunting Macrophage Activation and M2b Polarization. *J Immunol*, 2010, 184 (11), 6465—6478.
- [16] Dai H, Dong HL, Gong FY, et al. Disease association and arthritogenic potential of circulating antibodies against the $\alpha 1,4$ -polygalacturonic acid moiety. *J Immunol*, 2014, 192 (10): 4533—4540.
- [17] Dai H, Han XQ, Gao X. Structure elucidation and immunological function analysis of a novel β -glucan from the fruit bodies of *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries. *Glycobiology*, 2012, 22(12): 1673—1683.
- [18] Qiu X, Hong C, Xiong S, et al. Modulation of cellular immunity by antibodies against calreticulin. *Eur J Immunol*, 2012, 42(9): 2419—2430.
- [19] Hong C, Qiu X, Gao X. Functional analysis of recombinant calreticulin fragment 39—272; implications for immunobiological activities of calreticulin in health and disease. *J Immunol*, 2010, 185(8): 4561—4569.
- [20] Xu W, Z Yuan, Gao X. Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in mouse following vaccination with a T-cell vaccine. *Proteomics*, 2012, 12(6): 922.
- [21] Meng X, Zhang Y, Xiong S, et al. A novel tylophorine analog W-8 up-regulates forkhead boxP3 expression and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol*, 2013, 93(1): 83—93.
- [22] Zhang S, Liang R, Xiong S, et al. High susceptibility to liver injury in IL-27 p28 conditional knockout mice involves intrinsic interferon- γ dysregulation of CD4(+) T cells. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1620—1631.
- [23] Wen T, Li Y, Yin Z. Therapeutic effects of a novel tylophorine analog, NK-007, on collagen-induced arthritis through suppressing tumor necrosis factor α production and Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (9): 2896—2906.

Final report of major program of National Natural Science Foundation of China “the mechanism and regulation of autoantigen immune recognition and response”

Lv Qunyan¹ Xiong Sidong² Gao Xiaoming² Yin Zhinan³ Dong Erdan¹

(1 Department of Medial Science, National Natural Science Foundation of China, Beijing, 100085;

2 Institutes of Biology and Medical Sciences, Chowchoo University, Suzhou, 215123;

3 Biomedical translational research institute, Jinan University, Guangzhou, 510632)

Abstract The major program of “the mechanism and regulation of autoantigen immune recognition and response” is aimed to solve the key basic scientific problem of immunology: the mechanism and regulation of autoantigen immune recognition and response. The program utilizes activated lymphocyte-derived DNA (ALD-DNA)-induced SLE as the major animal model for autoimmune disease. Upon 4-years study on autoimmune diseases induced by ALD-DNA and raft-related proteins translocated onto surface of Tact, breakthrough progress has been achieved in fields including: the chemical basis of immunogenicity of auto-dsDNA, molecular mechanism of autoimmune-recognition and response against ALD-DNA, production and regulatory mechanism of anti-T-cell Abs, regulation of Treg differentiation and its modulation of autoimmune response. These achievements provide new strategies of treatment for inflammatory autoimmune disease by targeting SAP, Notch1, miR155, Foxo3a, CRT, W8 and NK007.

Key words major program; autoimmunity; activated lymphocyte-derived DNA; SLE; autoimmune recognition; anti-T-cell antibody; regulatory T cell