

类风湿关节炎患者外周血 *TWEAK* 基因启动子区甲基化状态及其表达

娄 雪, 廖 莉, 李兴珺, 王 楠, 刘 爽, 崔若玫, 徐 健[△]

(昆明医科大学第一附属医院风湿免疫科, 昆明 650032)

[摘 要] **目的:**通过检测外周血肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂(tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, *TWEAK*)基因 DNA 甲基化水平、mRNA 表达水平及血清蛋白浓度,探究 *TWEAK* 基因与类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制的关联。**方法:**采用 MassARRAY 法检测 112 例 RA 患者和 86 例匹配的健康志愿者外周血 *TWEAK* 基因 DNA 甲基化水平,采用实时荧光定量 PCR 法检测外周血 *TWEAK* 基因 mRNA 表达水平,采用酶联免疫吸附测定法检测血清 *TWEAK* 蛋白浓度。比较 RA 组和健康对照组 *TWEAK* 基因 DNA 甲基化水平、mRNA 表达水平及血清蛋白浓度,并分析其与疾病活动度的关系。**结果:**RA 组 *TWEAK* 基因总体甲基化水平和 CpG₁₁、CpG₁₇、18、19、20、CpG₄₀、41、42 位点甲基化水平高于健康对照组($P=0.002$, $P=0.01$, $P=0.006$, $P=0.002$),高疾病活动度组 CpG₅₅、56 位点甲基化水平高于中低疾病活动度组($P=0.041$)。RA 组外周血 *TWEAK* 基因 mRNA 表达水平低于健康对照组($P=0.023$),高疾病活动度组 *TWEAK* 基因 mRNA 表达水平低于中低疾病活动度组($P=0.035$)。RA 组血清 *TWEAK* 蛋白浓度与健康对照组差异无统计学意义($P=0.508$),但其与 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.482$, $P<0.001$)。**结论:***TWEAK* 基因与 RA 的发病和病情活动程度密切相关,其高甲基化状态可能为调控 mRNA 低表达的表现遗传学机制之一,可作为临床监测和评价 RA 病情的重要指标之一。

[关键词] 肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂;DNA 甲基化;信使 RNA;类风湿关节炎

[中图分类号] R593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2021)06-1020-06

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2021.06.002

Methylation status and expression of *TWEAK* gene promoter region in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis

LOU Xue, LIAO Li, LI Xing-jun, WANG Nan, LIU Shuang, CUI Ruo-mei, XU Jian[△]

(Department of Rheumatology and Immunology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between tumor necrosis factor like weak inducer of apoptosis (*TWEAK*) gene and the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) by detecting the DNA methylation level, mRNA expression level and serum protein concentration of *TWEAK* gene in peripheral blood. **Methods:** The MassARRAY method was used to detect the DNA methylation level of the *TWEAK* gene in the peripheral blood of 112 RA patients and 86 matched healthy volunteers. The real-time quantitative polymerase chain reaction method was used to detect the mRNA expression level of the *TWEAK* gene in the peripheral blood of the subjects. The enzyme-linked immunosorbent assay method was used to detect the serum *TWEAK* protein concentration of the subjects. The *TWEAK* gene DNA methylation level, mRNA expression level and serum protein concentration between the RA group and the healthy control group were compared, and the relationship between it and the degree of disease activity analyzed. **Results:** The overall DNA methylation level of *TWEAK* gene and the DNA methylation levels of CpG₁₁, CpG₁₇, 18, 19, 20, CpG₄₀, 41, 42 site in the RA group were higher than those in the healthy control group ($P=0.002$, $P=0.01$, $P=0.006$, $P=0.002$, respectively). The DNA methylation level of CpG₅₅、56 site in the high disease activity group was higher than that in the medium and low disease

基金项目: 国家自然科学基金(81760296, 81501406, 81460256)、云南省医疗卫生单位内设研究机构科研项目(2017NS051, 2018NS0133, 2018NS0134)、云南省高层次卫生计划技术后备人才(H-2017068)、昆明医科大学“百名中青年学术和技术骨干”(60117190457)、2018年云南省“万人计划”青年拔尖人才(YNWR-QNBJ-2018-152)、云南省高层次卫生计划技术人才(领军人才)(L-2019004)、云南省“万人计划”名医(YNWR-MY-2018-040)、云南省皮肤免疫性疾病临床医学中心(ZX2019-03-02)和云南省临床皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(2019ZF012)Supported by National Natural Science Foundation of China (81760296, 81501406, 81460256), the Funding of Yunnan Provincial Health Science and Technology Plan (2017NS051, 2018NS0133, 2018NS0134), Yunnan Provincial Fund for High Level Reserve Talents in Health Science (H-2017068), the Hundred-Talent Program of Kunming Medical University (60117190457), the Youth Talent of Ten Thousand Scientists Program of Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2018-152), Yunnan Province High-level Health Technical Talents (Leading Talents) (L-2019004), Yunnan Province Special Project for Famous Medical Talents of the “Ten Thousand Talents Program” (YNWR-MY-2018-040), Yunnan Province Clinical Center for Skin Immune Diseases (ZX2019-03-02), and Yunnan Province Clinical Research Center for Skin Immune Diseases (2019ZF012)

[△] Corresponding author's e-mail, casxujian@163.com

网络出版时间:2021-11-12 17:09:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20211112.0940.012.html>

activity group ($P=0.041$). The expression level of *TWEAK* gene mRNA in the peripheral blood of the RA group was lower than that of the healthy control group ($P=0.023$). The expression level of *TWEAK* gene mRNA in the high disease activity group was lower than that in the medium and low disease activity group ($P=0.035$). The serum *TWEAK* protein concentration of the RA group was not significantly different from that of the healthy control group ($P=0.508$), but it was positively correlated with the mRNA expression level ($r=0.482$, $P<0.001$). **Conclusion:** The *TWEAK* gene is closely related to the onset and progression of RA, and its hypermethylation state may be one of the epigenetic mechanisms regulating its low mRNA expression, and it can be used as one of the important indicators for clinical monitoring and evaluation of RA.

KEY WORDS Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis; DNA methylation; mRNA; Rheumatoid arthritis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常累及多个外周关节的慢性自身免疫性疾病,特征为炎症细胞浸润关节,滑膜细胞及破骨细胞增殖,导致滑膜肿胀、骨及软骨破坏、关节功能损伤及畸形^[1-2],其患病率可达 0.3%~1.0%,多发于 40~60 岁女性^[3]。RA 主要表现为 T 细胞、B 细胞及巨噬细胞的大量增殖与浸润,这些细胞可直接作用于机体或分泌细胞因子等炎性介质参与疾病的发生^[1]。临床特征可表现为类风湿因子抗体及抗瓜氨酸蛋白抗体等自身抗体阳性,但并非所有患者都表现为抗体阳性。RA 的发病机制尚不十分明确,可能与遗传学、自身免疫和环境等因素密切相关,其中遗传学参与可达 50%~60%^[4]。

肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导剂 (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK, 又称 TNFSF12 或 APP3L) 是肿瘤坏死因子超家族中的一员,是一种 II 型跨膜蛋白,由肿瘤坏死因子超家族基因编码,具有刺激细胞增殖、凋亡,促进血管生成及诱导促炎细胞因子和趋化因子的表达等生物活性^[5]。TWEAK 与其受体成纤维细胞生长因子诱导早期反应蛋白 14 (fibroblast growth factor-inducible immediate-early response protein 14, Fn14) 结合可发挥多种生物学功能,参与细胞增殖、分化、凋亡、新生血管形成及炎症反应。有研究表明,TWEAK 与 RA 的发病机制有关,TWEAK 可以增加成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 中的炎性细胞因子的产生,如前列腺素 E2、基质金属蛋白酶 1 等^[6]。

遗传学在自身免疫性疾病的发生和发展中发挥着重要的作用,表观遗传学是细胞表型的可遗传变化,是在不改变 DNA 序列的情况下影响基因调控的化学修饰,表观遗传学的改变 (如 DNA 甲基化、非编码 RNA 及组蛋白修饰) 被认为与 RA 的发病机制有关^[7]。DNA 甲基化是一种 DNA 化学修饰,是指在 DNA 甲基转移酶的催化作用下,于基因组 CpG 位点的 5' 碳位共价键上结合一个甲基,使 5'-胞嘧啶转化为 5'-甲基胞嘧啶,DNA 甲基化在 RA 中的作用

日渐成为研究热点^[8-9]。DNA 甲基化通过甲基化调控区的胞嘧啶来抑制编码基因 mRNA 的转录,可在不改变 DNA 序列的情况下,调节基因的表达和关闭,通过控制基因的表达来改变遗传表观,与机体生理和病理过程密切相关,参与癌症等多种疾病的发病机制^[10]。DNA 甲基化参与炎症反应和免疫系统的调节,其可通过调节 T 细胞和 B 细胞的活性介导自身免疫性疾病的发生和发展过程,DNA 甲基化通过调控基因的表达参与机体的生理及病理反应,进而改变个体的表观遗传。

基因的 DNA 甲基化水平通过控制 mRNA 的表达,影响蛋白质的产生,该途径为基因参与机体多种功能的途径之一。与遗传突变相反,表观遗传是可逆的,可通过改变基因的甲基化进而影响疾病的发生与进展。本研究对 *TWEAK* 基因甲基化水平、mRNA 表达水平及蛋白浓度进行了研究,希望能进一步探讨该基因参与 RA 发病机制的途径和方法,为 RA 的早期诊断提供新的潜在生物标志物,并为治疗提供新思路和方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2019 年 10 月至 2021 年 1 月在昆明医科大学第一附属医院风湿免疫科住院的 RA 患者。纳入标准:(1) 年龄 ≥ 16 岁且 < 80 岁;(2) 符合 2009 年美国风湿病协会的 RA 诊断标准^[11]。排除标准:(1) 合并严重的脏器损伤;(2) 合并其他自身免疫性疾病;(3) 怀孕及哺乳期女性;(4) 合并肿瘤。根据纳入和排除标准连续取样,按照成组设计原则,另选取年龄和性别相匹配的同期体检健康志愿者作为健康对照组。本研究获得昆明医科大学医学伦理委员会批准,患者和健康志愿者均签署知情同意书。

按照 RA 疾病活动度评分 (disease activity score 28, DAS28) 标准^[12],根据压痛关节数量、肿胀关节数量、红细胞沉降率及视觉模拟评分,使用公式计算 DAS28 评分,对 RA 患者进行疾病活动度评估,并将

RA 患者分为中低疾病活动度组(评分 2.6 ~ 5.1)和高疾病活动度组(评分 > 5.1)。

1.2 DNA 甲基化水平检测

1.2.1 DNA 提取 分别从 RA 组和健康对照组中随机抽取 45 例,使用 TIANamp Blood DNA Kit 试剂盒(TIANGEN, 中国)按照操作说明进行 DNA 提取,得到的 DNA 溶液用于之后的 DNA 甲基化检测。MassARRAY 甲基化的 DNA 质量要求:电泳条带完整,主带明显,无严重降解;DNA 浓度 > 50 mg/L,单个样品总量 > 1 μg ; 2.2 > A260/A280 > 1.5; A260/A230 > 0.6。剔除质量不合格样品。

1.2.2 引物设计 选取基因转录起始位点 -5 000 bp 至 +1 000 bp 序列,并预测候选基因启动子区域、转录因子、CpG 岛等信息,采用美国 Agena 公司的 EpiDesigner 软件进行引物设计,合成对应片段的 PCR 引物序列:5' 端引物序列, aggaagagAGGTATTTAAGGGTATTTTTGGTGG; 3' 端引物序列, cagtaatacagactactataggagaaggctCCTATAATCCCAA CATTTTAAAAAACC。

1.2.3 DNA 甲基化 (1) 亚硫酸氢盐转化:待检测 DNA 样品使用甲基化 DNA 亚硝酸盐处理试剂盒(Zymo, 美国)进行转化处理,使非甲基化的胞嘧啶(C)发生脱氨基反应从而转变成尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶不能发生脱氨基反应,仍保留为胞嘧啶。向样品中加入 ddH₂O 9 mL, M-稀释缓冲液 3 mL, M-溶液缓冲液 500 μL , 混匀后上机,转化反应条件如下:98 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 64 $^{\circ}\text{C}$, 30 min(5 个循环); 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 min。转化后的 DNA 样品放置于 M-洗脱缓冲液中进行洗脱,之后移到纯化盒中纯化。(2) PCR 扩增反应:DNA 样品低速离心 10 s,取 DNA 模板 1 μL ,在冰上加入 ddH₂O 6.4 μL , 10 \times PCR 缓冲液 1 μL , dNTPs 1 μL , PCR 酶 0.2 μL , 正反引物各 0.2 μL , 进行扩增反应,反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$, 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 56 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min(共 45 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 min。(3) 虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)消化反应:配置 SAP 酶反应体系,取 PCR 扩增产物 5 μL , 加入不含核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)的 ddH₂O 1.7 μL 、SAP 酶 0.3 μL , 向反应板的每个孔中加入 7 μL SAP 反应液,离心后进行 SAP 反应,条件如下:37 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 min。去除得到的 PCR 扩增产物中的 dNTPs。(4) 转录酶切反应:①配置转录酶切反应体系:不含 RNase 的 ddH₂O 3.21 μL , 5 \times T7 聚合酶缓冲液 0.89 μL , T 剪切转录混合物 0.22 μL , 100 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)试剂

0.22 μL , T7 RNA&DNA 聚合酶 0.4 μL , RNase A 0.06 μL , PCR/SAP 混合剂 2 μL ; ②转录酶切反应条件如下:37 $^{\circ}\text{C}$, 3 h; 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 min。(5) 树脂纯化:向 MG Dimple 板内加入树脂进行纯化。(6) 芯片点样:采用 Nanodispenser 点样仪(美国 Agena 公司, 型号:RS1000), 将树脂纯化后的产物移至 384 孔 SpectroCHIP[®] 芯片上,进行点样处理,将点样后的 SpectroCHIP 芯片使用 MALDI-TOF 分析。检测结果使用 EpiTYPER[™] 软件提供的 DNA 甲基化定量分析手段进行分析,将实验数据与 DNA 序列相吻合,得到最终结果。

1.3 外周血 mRNA 表达水平检测

对所有受试者外周血 mRNA 表达水平进行检测。(1) RNA 提取和反转录 PCR 反应:取 400 μL 受试者外周血,使用 RNAPrep Pure Hi-Blood Kit 试剂盒(TIANGEN, 中国),按照操作说明要求提取受试者 RNA,之后使用 PrimeScript[™] RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(日本 TAKARA)按照操作说明书进行反转录 PCR 反应。(2) 实时荧光定量 PCR 反应:根据引物设计原则预测候选基因启动子区域、转录因子、CpG 岛等信息,进行引物设计选择和合成,正向引物:5'-AAGACCCCACTTCAGGCAC-TAA-3', 反向引物:5'-TCTTGTTCGCCCCCTCAC-3'。使用 TB Green[®] Premix EX Taq[™] II 试剂盒(日本 TAKARA)按照操作说明进行实时荧光定量 PCR 反应。(3) 数据计算:目的基因的 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,采用公式 $\Delta\Delta Ct = (\text{目的基因 } Ct \text{ 值} - \text{内参基因 } Ct \text{ 值})_{\text{实验组}} - (\text{目的基因 } Ct \text{ 值} - \text{内参基因 } Ct \text{ 值})_{\text{对照组}}$ 进行计算,用目的基因相对表达量来表示 mRNA 表达水平。

1.4 血清 TWEAK 蛋白浓度检测

从 RA 组和健康对照组中随机各抽取 40 例,使用人 TWEAK 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Invitrogen, 美国)按照操作说明检测血清 TWEAK 蛋白浓度。用分光光度计读取微孔板上各孔的光密度(使用 450 nm 作为主波长),根据各孔的光密度值,计算各孔的样品浓度值,剔除误差值较大的样品。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料以四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料以率(%)表示,采用卡方检验。符合正态分布的数据采用 Pear-

son 相关分析,不符合正态分布的数据采用 Spearman 相关分析,相关分析采用相关系数 (r) 表示。统计学检验为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

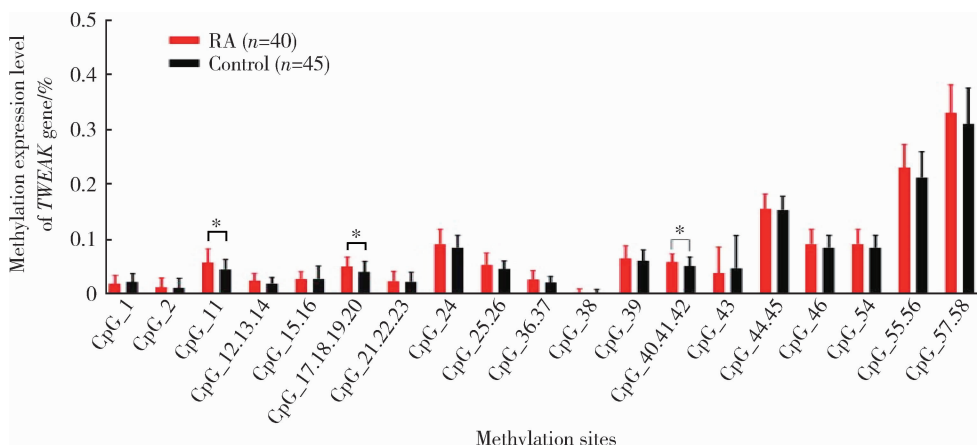
2.1 研究对象基本信息

研究最终纳入 RA 患者 112 例,平均年龄 (53.27 ± 12.90) 岁,包括女性 83 例,男性 29 例;其中,高疾病活动度组 63 例,平均年龄 (54.73 ± 10.48) 岁,包括女性 43 例,男性 20 例;中低疾病活动度组 49 例,平均年龄 (51.39 ± 15.37) 岁,包括女性 40 例,男性 9 例。健康对照组 86 例,平均年龄 (50.79 ± 9.57) 岁,包括女性 59 例,男性 27 例。RA 组和健康对照组性别、年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 外周血 TWEAK 基因各位点甲基化水平

剔除掉质量不合格的样品后,本研究共对 40 例 RA 组患者(高疾病活动度组 24 例,中低疾病活动度组 16 例)和 45 例健康志愿者进行了 TWEAK 基因甲基化水平检测。RA 组 TWEAK 基因总体甲基化表达水平高于健康对照组 ($t = 3.160, P = 0.002$)。共检测到 RA 组 TWEAK 基因的 19 个位点发生甲基化,其中 CpG_11 ($Z = -2.582, P = 0.01$)、CpG_17.18.19.20 ($Z = -2.73, P = 0.006$)、CpG_40.41.42 ($Z = -3.131, P = 0.002$) 位点处的甲基化水平明显高于健康对照组(图 1)。

除高疾病活动度组 CpG_55.56 甲基化水平明显高于中低疾病活动度组 ($t = -2.112, P = 0.041$) 外,TWEAK 基因总体甲基化水平在两组间差异无统计学意义 ($t = -0.579, P = 0.566$,表 1),其他位点甲基化水平在两组间也未见差异化表达。



RA, rheumatoid arthritis.

图 1 RA 组和健康对照组各位点 DNA 甲基化水平比较

Figure 1 Comparison of DNA methylation levels at various points in the RA group and the healthy control group

表 1 高疾病活动度组与中低疾病活动度组的甲基化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of methylation levels between high, medium and low disease activity ($\bar{x} \pm s$)

Items	High disease activity group ($n = 24$)	Medium and low disease activity group ($n = 16$)	t value	P value
Overall methylation level/%	0.078 ± 0.008	0.077 ± 0.009	-0.579	0.566
CpG_55.56/%	0.241 ± 0.048	0.216 ± 0.028	-2.112	0.041

2.3 外周血 mRNA 表达水平

RA 组 TWEAK 基因 mRNA 表达水平低于健康对照组,差异有统计学意义 (0.94 ± 0.32 vs. $1.05 \pm 0.36, t = -2.295, P = 0.023$)。高疾病活动度组的 TWEAK 基因 mRNA 表达水平低于中低疾病活动度组,差异有统计学意义 (0.88 ± 0.32 vs. $1.01 \pm 0.31, t = 2.129, P = 0.035$)。

2.4 血清 TWEAK 蛋白浓度

剔除掉误差值较大的样品后,共对 39 例 RA 组患者和 40 例健康志愿者进行了血清 TWEAK 蛋白浓度检测。RA 组血清 TWEAK 蛋白浓度与健康对照组相比差异无统计学意义 [$316.8 (212.7, 406.6)$ ng/L vs. $301.3 (213.7, 536.1)$ ng/L, $Z = -0.662, P = 0.508$]。将血清 TWEAK 蛋白浓度与 mRNA 表

达水平进行相关分析,血清 TWEAK 蛋白浓度与 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.482, P<0.001$,图 2)。

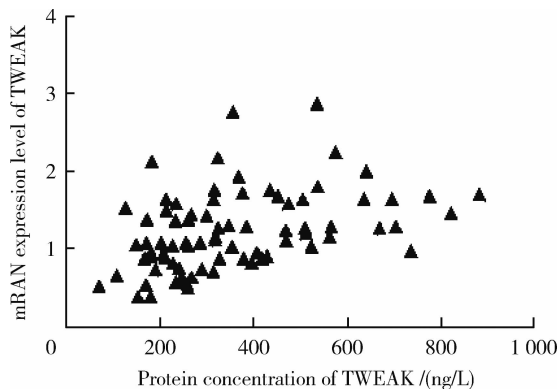


图 2 血清 TWEAK 蛋白浓度与 mRNA 表达水平的相关性

Figure 2 Correlation between serum TWEAK protein concentration and mRNA expression level

3 讨论

RA 是一种累及全身多关节的慢性自身免疫性疾病,主要表现为多个外周关节的炎症和破坏,其发病机制复杂多样,遗传因素、环境因素及其相互作用参与其中。细胞因子是由免疫细胞以及其他组织中的某些细胞产生的小分子量蛋白质或糖蛋白,多种细胞因子已被证实与 RA 的发病机制密切相关^[2]。肿瘤坏死因子超家族的各成员与 RA 发病机制的关系也越来越被人们所关注,相关研究表明,TWEAK 与 RA 的发病可能相关,但是其参与 RA 发病的途径尚不清楚,对于其作用机制的进一步研究或可为 RA 的临床诊断与治疗提供新的思路及治疗靶点。

TWEAK 作为肿瘤坏死因子超家族中的一员,具有多向性功能,可诱导内皮细胞的增殖和迁移,参与新生血管的生成和炎症反应。TWEAK 具有促炎细胞因子的作用,抑制 TWEAK 可减轻关节炎、滑膜血管新生以及软骨和骨的破坏。人类的 TWEAK 基因位于 17 号染色体上,Fn14 是人 TWEAK 的唯一受体,参与介导 TWEAK 诱导内皮细胞增殖等反应,两者结合可发挥多种生物学功能^[13]。TWEAK-Fn14 相互作用可诱导趋化因子和炎症因子的产生,参与炎症反应调节,与多种自身免疫性疾病的发病相关,如 RA、系统性红斑狼疮及多发性硬化症^[14-15]。RA 患者中,TWEAK-Fn14 可通过诱导细胞增殖和新生血管的生成,导致关节组织发生持续性炎症和进行性破坏^[16]。Park 等^[17]发现,RA 患者血清 TWEAK 蛋白水平比正常对照人群和强直性脊柱炎患者显著升高。van Kuijk 等^[16]发现,RA 患者

滑膜组织中 TWEAK 的表达水平明显高于银屑病关节炎患者。Dharmapatni 等^[18]发现,RA 患者滑膜组织中 TWEAK 的表达明显高于骨关节炎患者。值得注意的是,Maecker 等^[19]发现,与 TNF- α 的作用机制相反,TWEAK 能抑制转录激活因子 1 的刺激,诱导 p65 核因子- κ B 与组蛋白去乙酰化酶 1 的结合,抑制促炎细胞因子基因的转录和细胞因子的产生。将小鼠的 TWEAK 基因敲除后,发现 TWEAK 能抑制干扰素- γ 和白细胞介素-12 的产生,控制先天性炎症反应以及其向 TH1 型适应性免疫反应的转变。这提示 TWEAK 的功能可能已经进化,其可阻止过度炎症和自身免疫反应的发展,TWEAK 的抑制作用可能有助于增强抗感染和抗癌免疫,TWEAK 受体激活可能有助于控制自身免疫性疾病。

表观遗传机制可能是基因型、环境和表型之间的动态联系。表观遗传学参与 RA 的发病机制,DNA 甲基化是最重要的表观遗传修饰之一,其在不改变 DNA 序列的情况下,调控机体的生长发育及基因的表达模式和稳定性,且 DNA 甲基化在发育和细胞增殖的过程中是可以稳定传递的。DNA 甲基化多发生于启动子区域,控制靶基因的转录和表达,与靶基因的 mRNA 表达水平具有相关性。Guo 等^[20]发现,RA 患者与健康人群相比共有 383 个高甲基化和 785 个低甲基化基因位点存在差异。Zhu 等^[21]证实了低甲基化可以引起对应靶基因的过度表达,而高甲基化则会引起对应靶基因的沉默表达。本研究发现,TWEAK 基因总体甲基化水平和 CpG_11、CpG_17、18、19、20、CpG_40、41、42 位点甲基化水平均高于健康对照组,TWEAK 基因 mRNA 表达水平低于健康对照组,该结果证实了基因启动子区的高甲基化水平可调控该基因 mRNA 表达水平的下调,TWEAK 基因启动子区甲基化水平可能是 mRNA 表达的调控机制之一。RA 患者血清 TWEAK 蛋白浓度与健康对照组差异没有统计学意义,但其与该基因 mRNA 表达水平呈正相关,且随着 mRNA 表达水平升高,血清蛋白浓度也升高,这与基因 mRNA 表达对蛋白翻译的调控相一致。本研究结果表明,TWEAK 与 RA 的发病机制相关,TWEAK 基因的高甲基化水平、低 mRNA 表达可能参与了 RA 的发病过程,DNA 甲基化可通过调控基因表达,参与机体的生理及病理反应,进而改变个体的表观遗传。既往有文献报道 RA 患者 TWEAK 的表达水平升高,该结果与本研究相反,可能因为甲基化是一个可改变的表观修饰,当机体发生炎症反应及免疫失调时,增多的 TWEAK 可通过机体的负反馈机制进一步上

调基因的甲基化水平,使得 *TWEAK* 基因的 mRNA 表达下调,而血清蛋白浓度的调控所需时间较长,所以尚未完全表现出差异。同时有研究表明,机体在体内对 *TWEAK* 基因的表达有调节性,*TWEAK* 基因 mRNA 水平可能不是 *TWEAK* 基因蛋白丰度的可靠指标^[17]。本研究发现,与中低疾病活动度组相比,高疾病活动度 RA 患者 mRNA 表达水平降低、CpG_55.56 位点甲基化水平升高,该结果与本研究一致,*TWEAK* 与 RA 的疾病活动度有关,其外周血 mRNA 表达水平及 CpG_55.56 位点甲基化水平对 RA 的疾病活动度具有临床提示价值。

本研究属于小样本量研究,结果可能存在偏倚,此外,本研究只检测了外周血,缺乏其他组织器官的表达研究,后续需扩大样本量,进一步探究 *TWEAK* 基因与 RA 的发病机制和病情进展的关联性。

综上所述,本研究对 RA 患者外周血 *TWEAK* 基因 DNA 甲基化水平、mRNA 表达水平及血清蛋白浓度进行了研究,初步探讨了 *TWEAK* 基因甲基化水平及表达与 RA 发病机制的关联,结果发现 *TWEAK* 基因与 RA 的发病和病情进展密切相关,*TWEAK* 基因的高甲基化状态可能是调控 mRNA 低表达的表观遗传学机制之一,*TWEAK* 基因通过该机制参与了 RA 的发生与进展,可作为临床监测和评价 RA 病情的重要指标之一,为 RA 的临床诊断及治疗提供了新的思路 and 手段。

参考文献

[1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356 - 361.

[2] Sánchez-Ramón S, López-Longo FJ, Carreño L. Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: Beyond proinflammatory cytokines [J]. *Reumatol Clin*, 2011, 6(S3): S20 - S24.

[3] Song X, Lin Q. Genomics, transcriptomics and proteomics to elucidate the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2017, 37(8): 1257 - 1265.

[4] Karami J, Aslani S, Jamshidi A, et al. Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: An updated review [J]. *Gene*, 2019, 702: 8 - 16.

[5] Park J, Kwok S, Lim M, et al. *TWEAK* promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(3): 857 - 867.

[6] Chicheportiche Y, Chicheportiche R, Sizing I, et al. Proinflammatory activity of *TWEAK* on human dermal fibroblasts and syno-

viocytes; Blocking and enhancing effects of anti-*TWEAK* monoclonal antibodies [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(2): 126 - 133.

[7] Karami J, Aslani S, Tahmasebi MN, et al. Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98(3): 171 - 186.

[8] Singer BD. A practical guide to the measurement and analysis of DNA methylation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(4): 417 - 428.

[9] Hua XM, Wang J, Qian DM, et al. DNA methylation level of promoter region of activating transcription factor 5 in glioma [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(9): 757 - 762.

[10] Fuso A, Raia T, Orticello M, et al. The complex interplay between DNA methylation and miRNAs in gene expression regulation [J]. *Biochimie*, 2020, 173: 12 - 16.

[11] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2010(4): 265 - 270.

[12] Schwartz N, Su L, Burkly LC, et al. Urinary *TWEAK* as a biomarker of lupus nephritis: A multicenter cohort study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(5): R143.

[13] Xu W, Zhao Y, Liu Y. Role of the *TWEAK*/Fn14 pathway in autoimmune diseases [J]. *Immunol Res*, 2016, 64(1): 44 - 50.

[14] Kamijo S, Nakajima A, Kamata K, et al. Involvement of *TWEAK*/Fn14 interaction in the synovial inflammation of RA [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(4): 442 - 450.

[15] Bertin D, Stephan D, Khrestchatsky M, et al. Is *TWEAK* a biomarker for autoimmune/chronic inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2013(4): 489.

[16] van Kuijk AW, Wijbrandts CA, Vinkenoog M, et al. *TWEAK* and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(1): 301 - 304.

[17] Park MC, Chung SJ, Jung SJ, et al. Relationship of serum *TWEAK* level to cytokine level, disease activity, and response to anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2008, 37(3): 173 - 178.

[18] Dharmapatri A, Smith MD, Crotti TN, et al. *TWEAK* and Fn14 expression in the pathogenesis of joint inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(2): R51.

[19] Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, et al. *TWEAK* attenuates the transition from innate to adaptive immunity [J]. *Cell*, 2005, 123(5): 931 - 944.

[20] Guo SC, Zhu Q, Jiang T, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from Chinese Han patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2017, 27(3): 441 - 447.

[21] Zhu H, Wu LF, Mo XB, et al. Rheumatoid arthritis-associated DNA methylation sites in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(1): 36 - 42.

(2021-08-16 收稿)
(本文编辑:赵波)