

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003046

## A20 及 NLRP3 基因在幼年特发性关节炎中的表达及临床意义探讨

庞 敏<sup>1</sup>, 蔡 薇<sup>2</sup>, 罗晰文<sup>1</sup>, 唐雪梅<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学附属儿童医院风湿免疫科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、国家儿童健康与疾病临床医学研究中心、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014;

2. 华中科技大学协和深圳医院儿科, 深圳 518038)

**【摘要】目的:**比较 A20 及 NLRP3 基因在幼年特发性关节炎(juvenile idiopathic arthritis, JIA)患儿及健康儿童中的表达差异, 探讨其在预测 JIA 患儿生物制剂疗效中的作用。**方法:**依据 2001 年国际风湿病学联盟诊断标准, 收集 68 例初诊 JIA 患儿及同期 33 例健康儿童外周血提取单个核细胞, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 A20 及 NLRP3 基因 mRNA 表达水平。依据美国风湿病学会 2014 年提出的 JIA 疾病活动度评分, 将疾病无活动状态视为临床缓解。比较初诊时 JIA 患儿及健康儿童 A20 及 NLRP3 基因 mRNA 表达水平差异。根据不同治疗选择分为白细胞介素-6 受体拮抗剂组、肿瘤坏死因子- $\alpha$  抑制剂组及非生物制剂组, 随访两基因表达与治疗 6 个月后疗效之间的相关性。**结果:**初诊时, 相比于健康对照组, JIA 组 A20 基因表达水平明显降低 ( $P=0.039$ ), 全身型 JIA (systemic JIA, sJIA) 组 A20 基因表达水平低于非全身型 JIA (non-systemic JIA, non-sJIA) 组 ( $P=0.005$ ); 2 组 NLRP3 基因表达未见统计学差异 ( $P>0.05$ ); 采用二分类 logistic 回归分析未发现初诊 JIA 组 A20 及 NLRP3 基因表达水平与 JIA 治疗疗效具有相关性 (组间比较  $P>0.05$ ); 随访 6 个月后临床缓解组初诊 NLRP3 基因表达水平低于临床未缓解组 ( $P<0.05$ ), 初诊 A20 基因表达在临床缓解组与未缓解组中未见统计学差异 ( $P>0.05$ )。**结论:**A20 基因在初诊 JIA 患儿中表达降低, sJIA 组 A20 基因表达水平低于 non-sJIA 组, NLRP3 基因低表达 JIA 患儿治疗缓解率更高, 预后可能更好。暂未发现 A20 及 NLRP3 基因水平与 JIA 治疗效果的相关性。

**【关键词】**A20; NLRP3; 幼年特发性关节炎; 治疗效果**【中图分类号】**R725**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-01-05

## Expression and clinical significance of A20 and NLRP3 genes in juvenile idiopathic arthritis

Pang Min<sup>1</sup>, Cai Wei<sup>2</sup>, Luo Xiwen<sup>1</sup>, Tang Xuemei<sup>1</sup>

(1. Department of Rheumatology; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity; Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Pediatrics, Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen Hospital)

**【Abstract】Objective:** To analyze the expression of A20 and NLRP3 genes in healthy controls (HCs) and those with juvenile idiopathic arthritis (JIA), so as to investigate its role in predicting the efficacy of biological agents in JIA patients. **Methods:** According to the 2001 International League of Associations for Rheumatology (ILAR) diagnostic criteria for juvenile idiopathic arthritis, 33 HCs and 68

作者介绍: 庞 敏, Email: pmin0216@163.com,

研究方向: 儿童风湿免疫相关疾病。

通信作者: 唐雪梅, Email: tangxuemei2008@163.com。

基金项目: 十四五国家重点研发计划资助项目 (编号: 2021YFC2702003)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220623.1531.006.html>

(2022-06-24)

children newly diagnosed with JIA were enrolled in the study, and their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of A20 and NLRP3 genes. Inactive disease was regarded as clinical remission (CR) according to the Juvenile

Idiopathic Arthritis Disease Activity Score proposed by the American College of Rheumatology (ACR) in 2014. The differences in the mRNA expression level of *A20* and *NLRP3* genes were compared between the newly diagnosed children and HCs. According to different treatment options, JIA patients were divided into IL-6 inhibitors group, TNF- $\alpha$  inhibitors group and non-biological agents group. The correlations between the expression of these two genes and the efficacy after six months of treatment were analyzed. **Results:** The expression level of *A20* in JIA group was significantly lower than that in HCs ( $P=0.039$ ). The expression level of *A20* in systemic JIA (sJIA) group was lower than that in non-systemic JIA (non-sJIA) group ( $P=0.005$ ). There was no significant difference in the expression of *NLRP3* gene between the two groups ( $P>0.05$ ). There was no significant correlation between the expression of *A20* and *NLRP3* gene with the therapeutic efficacy by the binary logistic regression analysis ( $P>0.05$ ). After six months' treatment, *NLRP3* expression in the CR group was lower than that of the clinical non-remission group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference in *A20* gene expression between CR group and non-remission group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** The expression of *A20* is significantly decreased in children with JIA. The expression of *A20* in sJIA is lower than that in non-sJIA. Low expression of *NLRP3* gene in children with JIA may have a higher treatment response rate and better prognosis. No correlation has been found between the expression of *A20* and *NLRP3* genes and the therapeutic efficacy of JIA yet.

**【Key words】***A20*; *NLRP3*; juvenile idiopathic arthritis; therapeutic efficacy

幼年特发性关节炎(juvenile idiopathic arthritis, JIA)是一组原因不明,以慢性关节炎为特征,可伴有其他组织器官损害的慢性全身性儿童风湿性疾病<sup>[1]</sup>。JIA临床特征及治疗效果存在显著异质性,生物制剂在缓解病情、抑制关节破坏及改善预后方面有较大优势,但生物制剂价格昂贵,存在感染等潜在副作用。近年来,有报道指出20%~30%使用生物制剂的治疗效果欠佳或治疗后耐药<sup>[2]</sup>。

锌指蛋白A20(zinc finger protein A20, A20)又名肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白3(tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced protein 3, TNFAIP3),是肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导的原始反应基因。其表达蛋白负调控核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)信号通路,具有调控细胞分化凋亡、抑制炎症的作用<sup>[3]</sup>。A20基因可能通过阻断NF- $\kappa$ B、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、有丝分裂素激活蛋白激酶通路(mitogen-activated protein kinases, MAPK)、白细胞介素(interleukin, IL)等信号通路,抑制巨噬细胞坏死性凋亡等方式限制关节炎发展<sup>[4]</sup>。NLRP3炎性小体(nod-like receptor protein 3 inflammasome)是细胞内固有免疫传感器,可以识别微生物感染等危险信号,介导半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteine aspartic acid specific protease-1, caspase-1)活化,促进白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)等炎症

因子释放,发挥促炎、防御感染作用<sup>[5]</sup>。NLRP3炎性小体及其下游产物IL-1 $\beta$ 、IL-18等与JIA发病机制紧密相关<sup>[6]</sup>。A20及NLRP3信号通路中关键调控位点有望成为JIA药物治疗靶点。目前关于A20及NLRP3基因在JIA中的表达情况鲜有研究。本研究比较A20及NLRP3基因在JIA及健康儿童外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的表达差异,探讨其与JIA细胞因子水平及生物制剂疗效的相关性,为JIA精准靶向治疗提供理论基础。

## 1 研究对象及方法

### 1.1 研究对象及分组

本研究得到医院伦理委员会审查批准,批准号:(2017)年伦审(研)第(86-1)号;并取得患者知情同意。收集2019年6月至2021年6月在重庆医科大学附属儿童医院住院的68例初诊JIA患儿,纳入患儿均符合2001年国际风湿病学联盟(International League of Associations for Rheumatology, ILAR)制订的JIA分类诊断标准<sup>[7]</sup>,将JIA分为全身型JIA(systemic JIA, sJIA)、类风湿因子阳性多关节型JIA(rheumatoid factor positive polyarthritis JIA, RF<sup>+</sup>pJIA)、RF阴性多关节型JIA(rheumatoid factor negative polyarthritis JIA, RF<sup>-</sup>pJIA)、少关节型JIA(oligoarthritis JIA, oJIA)、附着点炎相关性关节炎(enthesitis-related arthritis, ERA)、银屑病关节炎(psoriatic arthritis, PsA)和未分化关节炎(undifferentiated arthritis, UA)共7个亚型。其中sJIA 21例,非全身型sJIA(non-systemic JIA, non-sJIA) 47例[含pJIA 18例、oJIA 15例、ERA 14例]。

均未经激素或免疫抑制剂治疗,除外合并严重感染、结核、狼疮等疾病。同时收集同期 33 例年龄匹配的健康体检儿童血液标本。根据不同治疗选择分为 IL-6 受体拮抗剂组、TNF- $\alpha$  抑制剂组及非生物制剂组。

## 1.2 研究方法

本研究为前瞻性研究,随访记录治疗前及药物治疗 6 个月后 JIA 患儿临床特征、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CPR)、血清白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、TNF- $\alpha$  表达水平等实验室指标,记录治疗药物的使用,评估疾病活动度。利用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)扩增并检测初诊时 JIA 组及 HC 组 PBMCs 中 *A20*、*NLRP3* 基因 mRNA 相对表达水平。

1.2.1 疾病活动度 依据美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)提出的 JIA 疾病活动度评分(Juvenile Arthritis Disease Activity Score, JADAS),将疾病无活动状态(inactive disease, ID)视为临床缓解<sup>[8]</sup>。本文采用 JADAS-27 关节版评价 sJIA 患儿疾病活动度;cJADAS-27 评分(The Clinical Juvenile Arthritis Disease Activity Score)评价 pJIA 及 oJIA 患儿;JSADA 评分(the Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity Index)对 ERA 疾病活动度评估较为准确有效,因目前尚无确切疾病无活动状态临界值<sup>[9]</sup>,故同样采用 cJADAS-27 评价 ERA 疾病活动度。

1.2.2 治疗药物 包括非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、抗风湿类药物(disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)、糖皮质激素(glucocorticoid, GC)、生物制剂如 TNF- $\alpha$  抑制剂及 IL-6 受体拮抗剂等药物。

## 1.3 统计学处理

*A20* 及 *NLRP3* 基因 mRNA 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$  表示,采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。根据是否符合正态分布采用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )或  $M_d(P_{25}, P_{75})$  描述变量分布情况,采用秩和检验分析各组 *A20* 及 *NLRP3* 表达水平的差异。采用 Spearman 相关检验和多元线性回归分析 *A20* 及

*NLRP3* 表达水平与血清学数据之间的相关性。采用二分类 logistic 回归分析血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平, *A20* 及 *NLRP3* 基因表达水平与生物制剂疗效之间的相关性。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

JIA 组共 68 例(女/男, 44/25),健康对照组 33 例(女/男, 14/19),平均年龄分别为  $(9.75 \pm 6.73)$  岁和  $(7.58 \pm 7.25)$  岁( $P=0.52$ )。JIA 组中 sJIA 21 例(30.9%)、non-sJIA 组 47 例(69.1%),包括 RF<sup>+</sup>pJIA 7 例(10.3%)、RF<sup>-</sup>pJIA 11 例(16.2%)、oJIA 15 例(22.1%)、ERA 14 例(20.6%)。JIA 一般资料详见表 1。

### 2.2 JIA 各亚型血清炎症指标及 JADAS-27 评分比较

初诊 sJIA 组中炎症指标 CRP、ESR 水平均明显高于其他亚型( $P<0.05$ )。各个亚型细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平未见明显统计学差异( $P>0.05$ )。sJIA 的 JADAS-27 评分明显高于 oJIA 及 ERA( $P=0.001$ )(表 1)。

### 2.3 JIA 组与 HC 组中 *A20* 及 *NLRP3* 基因表达水平比较

初诊时, JIA 组 *A20* 基因表达水平显著低于 HC 组 [ $(10.75 \pm 11.41)\%$  vs.  $(19.75 \pm 19.05)\%$ ,  $P=0.039$ ]; sJIA 组 *A20* 基因表达水平低于 non-sJIA 组 [ $(6.28 \pm 9.88)\%$  vs.  $(12.20 \pm 10.75)\%$ ,  $P=0.005$ ]。JIA 组及其各亚型的 *NLRP3* 基因表达水平与 HC 组均未发现明显统计学差异( $P>0.05$ )(表 1)。

### 2.4 *A20* 及 *NLRP3* 基因表达与血清细胞因子水平

多元线性回归分析影响因素显示:性别、发病年龄、CRP、ESR、JADAS-27 评分与 *A20* 基因表达无相关性( $F=0.905$ ,  $P=0.512$ );以上指标对 *NLRP3* 基因表达亦无影响( $F=0.822$ ,  $P=0.575$ )。通过 Spearman 相关分析发现 IL-6( $r=-0.109$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=-0.094$ )与 *A20* 基因表达无明显相关性( $P>0.05$ ); IL-6( $r=-0.036$ )、TNF- $\alpha$ ( $r=0.122$ )与 *NLRP3* 基因表达无明显相关性( $P>0.05$ )。

表 1 JIA 各亚型一般情况比较

| 指标                                    | JIA 组<br>( <i>n</i> =68) | sJIA 组<br>( <i>n</i> =21) | oJIA 组<br>( <i>n</i> =15) | RF <sup>+</sup> pJIA 组<br>( <i>n</i> =7) | RF <sup>-</sup> pJIA 组<br>( <i>n</i> =11) | ERA 组<br>( <i>n</i> =14) | 健康对照组<br>( <i>n</i> =33) |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--|---|--------------------------|--------------------------|
| 发病年龄/岁                                | 9.75 $\pm$ 6.73          | 10.00 $\pm$ 5.38          | 6.17 $\pm$ 6.92           | 12.08 $\pm$ 7.42                         | 11.33 $\pm$ 9.75                          | 11.54 $\pm$ 5.75         | 7.58 $\pm$ 7.25          |
| 人数(男/女)                               | 42/26                    | 13/8                      | 9/6                       | 3/4                                      | 5/6                                       | 12/2                     | 14/19                    |
| JADAS-27 评分                           | 17.00 $\pm$ 11.00        | 24.10 $\pm$ 8.05          | 12.00 $\pm$ 5.00          | 18.00 $\pm$ 12.00                        | 21.00 $\pm$ 14.00                         | 12.00 $\pm$ 4.50         | —                        |
| CRP/(mg·L <sup>-1</sup> )             | 9.50 $\pm$ 22.25         | 40.00 $\pm$ 58.13         | 4.00 $\pm$ 8.00           | 4.00 $\pm$ 10.00                         | 4.00 $\pm$ 17.00                          | 4.00 $\pm$ 18.25         | —                        |
| ESR/(mm·h <sup>-1</sup> )             | 33.00 $\pm$ 62.00        | 85.00 $\pm$ 44.00         | 17.00 $\pm$ 18.00         | 30.00 $\pm$ 51.00                        | 26.00 $\pm$ 35.00                         | 34.00 $\pm$ 32.75        | —                        |
| IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )           | 23.34 $\pm$ 37.44        | 47.25 $\pm$ 44.36         | 0.26 $\pm$ 1.11           | 24.63 $\pm$ 37.85                        | 27.32 $\pm$ 19.26                         | 7.15 $\pm$ 12.51         | —                        |
| TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> ) | 1.74 $\pm$ 9.24          | 0.91 $\pm$ 6.41           | 1.50 $\pm$ 12.59          | 12.02 $\pm$ 24.97                        | 8.63 $\pm$ 12.38                          | 6.76 $\pm$ 10.00         | —                        |
| <i>A20</i> /%                         | 10.75 $\pm$ 11.41        | 6.28 $\pm$ 9.88           | 14.65 $\pm$ 7.29          | 16.20 $\pm$ 13.01                        | 8.93 $\pm$ 11.27                          | 10.02 $\pm$ 16.23        | 19.75 $\pm$ 19.05        |
| <i>NLRP3</i> /%                       | 0.57 $\pm$ 0.75          | 0.35 $\pm$ 0.65           | 0.49 $\pm$ 0.83           | 1.34 $\pm$ 1.62                          | 0.62 $\pm$ 0.96                           | 0.58 $\pm$ 0.55          | 0.72 $\pm$ 1.14          |

## 2.5 A20 及 NLRP3 基因表达与疾病转归

2.5.1 治疗后缓解情况 JIA 组治疗随访 6 个月,除 4 例失访外,38 例生物制剂治疗患儿中有 21 例达到临床缓解(55.26%);包括 11 例 IL-6 受体拮抗剂组中有 6 例临床缓解(54.55%)、27 例 TNF- $\alpha$  抑制剂组 15 例临床缓解(55.56%);26 例非生物制剂组有 17 例临床缓解(68%);包括 21 例单用 DMARDs 药物患儿中有 15 例缓解(71.43%)、5 例 DMARDs 联合 GC 治疗有 2 例临床缓解(表 2)。值得关注的是:TNF- $\alpha$  抑制剂组中有 3 例患儿使用益赛普(Etanercept)治疗无效,换用类克(Infliximab)治疗 6 个月后均达到临床缓解,3 例患儿 A20 基因表达水平中位数为 16.20%,NLRP3 基因表达水平中位数为 1.10%,与其他药物治疗组未见差异( $P>0.05$ )。

此外,在 17 例 sJIA 中,有 2 例合并巨噬细胞活化综合征(macrophage activation syndrome, MAS),1 例患儿发热 1 个月余,关节症状明显,使用托珠单抗 6 个月后达到临床缓解,其初诊 A20 及 NLRP3 基因表达分别为 5.91%、0.051%,JADAS-27 评分 28.00;另外 1 例发热 1 周,关节表现不明显,通过 DMARDs 联合

GC 治疗 6 个月后未达到临床缓解,其初诊 A20 及 NLRP3 基因表达分别为 29.00%、0.35%,JADAS-27 评分 14.50。15 例 sJIA 不伴 MAS 患儿中有 8 例临床缓解。2 例 sJIA 伴 MAS 患儿的 A20 及 NLRP3 基因表达与 sJIA 不伴 MAS 之间无明显统计学差异( $P>0.05$ )(表 3)。

2.5.2 A20 基因表达与药物治疗疗效相关性 随访 6 个月后,不同药物治疗组缓解与未缓解患儿相比,初诊时 A20 基因表达无显著差异( $P>0.05$ )(表 4)。

2.5.3 NLRP3 基因表达与临床缓解及药物疗效相关性 治疗随访 6 个月后,初诊 NLRP3 基因表达水平在生物制剂组中的缓解患儿与未缓解患儿未见明显差异[(0.47  $\pm$  0.68)% vs. (0.72  $\pm$  0.80)%,  $P=0.198$ ];IL-6 受体拮抗剂治疗缓解患儿 NLRP3 基因表达低于未缓解患儿[(0.30  $\pm$  0.21)% vs. (0.63  $\pm$  0.52)%,  $P=0.043$ ];TNF- $\alpha$  抑制剂治疗缓解患儿 NLRP3 基因表达水平明显低于未缓解患儿[(0.59  $\pm$  0.73)% vs. (0.86  $\pm$  1.11)%,  $P=0.021$ ];非生物制剂组中缓解患儿 NLRP3 基因表达亦显著低于未缓解患儿[(0.42  $\pm$  0.67)% vs. (1.12  $\pm$  1.28)%,  $P=0.036$ ](表 4)。

表 2 各药物治疗组 6 个月后的缓解情况(n;n,%)

| 药物治疗组        |                    | 例数 | 缓解人数      |
|--------------|--------------------|----|-----------|
| 生物制剂组(n=38)  | IL-6 受体拮抗剂组        | 11 | 6(54.55)  |
|              | TNF- $\alpha$ 抑制剂组 |    |           |
|              | 阿达木                | 11 | 3(27.27)  |
|              | 类克                 | 9  | 6(66.67)  |
|              | 益赛普                | 4  | 3(75.00)  |
|              | 益赛普换用类克            | 3  | 3(100.00) |
|              | 合计                 | 27 | 15(55.56) |
| 非生物制剂组(n=26) | 单用 DMARDs 组        | 21 | 15(71.43) |
|              | DMARDs 联合 GC 组     | 5  | 2(40.00)  |

表 3 sJIA 伴和不伴 MAS 患儿 A20 及 NLRP3 基因表达比较( $\bar{x} \pm s$ ;n,%)

| 指标          | sJIA 组(n=17)     | sJIA 不伴 MAS(n=15) | sJIA 伴 MAS(n=2) | P 值  |
|-------------|------------------|-------------------|-----------------|------|
| JADAS-27 评分 | 24.10 $\pm$ 8.05 | 22.20 $\pm$ 8.70  | 26.20           | 0.18 |
| A20/%       | 8.25 $\pm$ 12.58 | 8.25 $\pm$ 10.11  | 17.46           | 0.66 |
| NLRP3/%     | 0.36 $\pm$ 1.00  | 0.48 $\pm$ 0.90   | 0.20            | 0.66 |
| 缓解人数        | 9(52.94)         | 8(53.33)          | 1(50.00)        |      |

表 4 随访 6 个月后不同药物治疗组 A20 及 NLRP3 基因表达水平比较(n,%; $\bar{x} \pm s$ )

| 指标      | 生物制剂组(n=38)      | IL-6 受体拮抗剂组(n=11)            | TNF- $\alpha$ 抑制剂组(n=27)     | 非生物制剂组(n=26)                 |
|---------|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 缓解人数    | 20(52.63)        | 6(54.45)                     | 14(51.85)                    | 17(65.38)                    |
| A20/%   |                  |                              |                              |                              |
| 缓解组     | 8.00 $\pm$ 8.68  | 5.78 $\pm$ 3.09              | 11.25 $\pm$ 11.36            | 10.80 $\pm$ 12.57            |
| 未缓解组    | 8.30 $\pm$ 17.65 | 5.26 $\pm$ 3.25              | 14.60 $\pm$ 16.15            | 15.10 $\pm$ 11.03            |
| P 值     | 0.73             | 0.893                        | 0.26                         | 0.139                        |
| NLRP3/% |                  |                              |                              |                              |
| 缓解组     | 0.47 $\pm$ 0.68  | 0.30 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> | 0.59 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup> | 0.42 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup> |
| 未缓解组    | 0.72 $\pm$ 0.80  | 0.63 $\pm$ 0.52              | 0.86 $\pm$ 1.11              | 1.12 $\pm$ 1.28              |
| P 值     | 0.198            | 0.043                        | 0.021                        | 0.038                        |

注:a,与未缓解组相比, $P<0.05$



采用二分类 logistic 回归未发现 *A20* 及 *NLRP3* 基因表达与药物治疗疗效之间具有相关性 ( $\chi^2=6.196, P>0.288$ )。

### 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是由 Rel 家族构成的二聚体蛋白,参与激活固有免疫及适应性免疫,在类风湿性关节炎等炎症性疾病中起关键作用<sup>[10]</sup>。*A20* 基因表达的 *A20* 蛋白羧基末端具有 7 个重复锌指蛋白结构域,可以泛素化修饰降解靶向蛋白;其氨基末端为卵巢肿瘤 (ovarian tumor, OUT) 结构域,通过去泛素化作用抑制蛋白酶降解靶向蛋白。*A20* 通过双重泛素编辑功能抑制 NF- $\kappa$ B 活化,限制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 泛素化和酪氨酸蛋白激酶 (janus kinase, JAK) 磷酸化,阻断 MAPK 信号通路,在多种炎症性疾病发挥重要作用。此外, *A20* 通过泛素化作用抑制 caspase-8 介导的细胞凋亡、限制受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinase 3, RIPK3) 磷酸化,抑制坏死性凋亡<sup>[4]</sup>。

NLRP3 炎症小体是由模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 组装成的多重蛋白复合体,由识别器 NLRP3、衔接器凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein, ASC) 和效应器 pro-caspase-1 组成。其中 NLRP3 是一种细胞内传感器,接收感染等危险信号后, NLRP3 通过 ASC 招募并激活 pro-caspase-1, 活性 caspase-1 剪切并释放具有活性的 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等细胞因子,引发炎症反应<sup>[11]</sup>。此外,活化的 caspase-1 水解消皮素 D (gasterein D, GSDMD), GSDMD 在细胞膜上形成孔隙,诱导细胞焦亡,进一步加重炎症。

*A20* 具有抑制 NLRP3 炎症小体活化的作用: NLRP3 炎症小体激活依赖 NF- $\kappa$ B 活化, *A20* 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路间接抑制 NLRP3 激活,也可直接作用于 NLRP3,降低其基础表达,减少 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等炎症因子生成释放<sup>[12]</sup>。研究发现成人类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者较健康人群 *A20* 基因 mRNA 表达显著降低,并且其表达水平可能与关节骨破坏有关<sup>[13]</sup>; Lieselotte 等构建了髓系细胞 *A20* 基因缺失小鼠模型,引发了类似 RA 的多关节炎症状,并发现模型中 NLRP3、pro-IL-1 $\beta$  及 pro-IL-18 mRNA 表达明显增加,其表达量与关节损害严重程

度相关。这一证据表明 *A20* 及 NLRP3 与关节炎发病机制之间存在紧密联系。

JIA 是一组异质性关节炎性疾病,其病因复杂,涉及遗传、环境、免疫紊乱等因素。研究发现 *HLA-DRB1*、*TNFAIP3*、*NLRP3* 等多种基因多态性与 JIA 遗传易感性相关<sup>[14-15]</sup>。尽管 TNF- $\alpha$  抑制剂、IL-6 受体拮抗剂在 JIA 中已广泛使用,但关节炎治疗仍缺乏精准有效的靶向治疗药物。*A20*、NLRP3 具有强大的炎症调节效应,针对其特定的调控位点及级联信号,有望成为 JIA 精准治疗靶点。本研究主要分析 *A20* 及 *NLRP3* 基因表达与 JIA 治疗疗效相关性,探讨其在预测 JIA 患儿生物制剂疗效中的作用,希望为 JIA 靶向治疗提供理论依据。

本研究发现初诊时 JIA 组 *A20* 基因表达水平低于 HC 组, sJIA 组 *A20* 基因表达水平明显低于 non-sJIA 组,未发现 *A20* 表达水平与 JIA 疾病活动度具有相关性。因 SJIA 更偏向于自身炎症性疾病<sup>[16]</sup>,其发病机制与 NF- $\kappa$ B、MAPK、JAK/STAT 等炎症信号通路高度相关, *A20* 通过负调控以上信号通路,参与 SJIA 发病机制,未来有待深入研究 *A20* 在 JIA 中致病机制及其蛋白分子功能,为 SJIA 创新性治疗提供新思路。本研究未发现 *A20* 基因表达水平与生物制剂疗效具有相关性,可能与 *A20* 和 JIA 发病机制之间涉及多条潜在信号通路有关,有待进一步增加样本量,延长随访时间,深入研究 *A20* 信号通路中关键信号位点与 JIA 发病机制及治疗疗效相关性。

本研究发现治疗随访 6 个月后,不同药物治疗组中缓解患儿的初诊 *NLRP3* 基因表达水平低于未缓解患儿,提示 *NLRP3* 基因低表达患儿缓解率更高,预后可能更好。多项研究从动物模型及临床患者研究中证实 NLRP3 炎症小体水平与关节炎严重程度呈正相关<sup>[12,17]</sup>,且发现其下游产物 IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6 等过度分泌,诱导关节软骨破坏,加剧关节炎炎症损害<sup>[18]</sup>。有研究发现 *NLRP3* 基因多态性与 JIA 遗传易感性相关, NLRP3 rs4353135 OR2B11 基因多态性与 oJIA 及 pJIA 早期疾病活动度及 TNF- $\alpha$  抑制剂治疗反应有关<sup>[15]</sup>。提示 *NLRP3* 基因在 JIA 发病机制中发挥一定作用,可能成为 JIA 潜在的治疗靶点及预后标志物。

随访 6 个月后,在各个药物治疗组中, DMARDs 联合 GC 治疗组缓解率低于单用 DMARDs 组。单用 DMARDs 组均为 non-sJIA, DMARDs 联合 GC 组有

4 例 sJIA, 1 例 pJIA RF(+), 两者 JADAS-27 评分无明显统计学差异, 但从分布趋势上看初诊时 DMARDs 联合 GC 组的疾病活动度明显高于单用 DMARDs 组。随访 6 个月后 DMARDs 联合 GC 组中的 3 例未缓解患儿均存在关节受累表现, 提示 GC 可以有效快速控制 sJIA 关节外症状, 对缓解关节症状效果可能欠佳。本研究 DMARDs 联合 GC 组纳入人数太少, 未来需进一步研究 DMARDs 联合 GC 治疗 JIA 的疗程、剂量及疗效相关问题。

近年来研究发现 IL-18 在 JIA 继发 MAS 发病机制中起关键作用<sup>[19]</sup>。作为炎症小体家族一员的 NLRC4, 研究发现其功能获得性突变与高水平 IL-18 及 MAS 相关<sup>[20]</sup>。本研究中有 2 例 SJIA 合并 MAS, 未发现其与 A20 及 NLRP3 表达水平具有相关性。随着高通量测序发展及对炎症小体结构模型及激活方式的不断探索了解, 未来尚待进一步研究 A20 及炎症小体与 MAS 发病机制的相关性。

本研究发现 A20 基因在 JIA 患儿中表达明显降低, sJIA 组 A20 基因表达水平低于 non-sJIA 组, NLRP3 基因表达水平可能与 JIA 治疗效果及预后相关。但本研究纳入病例数偏少, 需进一步扩大样本量, 细化 JIA 亚型及药物治疗分组, 从基因表达及蛋白分子水平深入探索 A20、NLRP3 炎症小体与 JIA 病理机制及治疗疗效之间的相关性, 为 JIA 靶向治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] 刘大玮, 梁芳芳, 唐雪梅. 儿童风湿病国际相关诊治指南系列解读之二: 幼年特发性关节炎分类标准解读[J]. 中国实用儿科杂志, 2020, 35(4): 252-255.
- [2] Liu DW, Liang FF, Tang XM. Interpretation of international guidelines for diagnosis and treatment of rheumatism in children ( II ): interpretation of the classification criteria of juvenile idiopathic arthritis[J]. Chin J Pract Pediatr, 2020, 35(4): 252-255.
- [3] Grönlund MM, Remes-Pakarinen T, Kröger L, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in a real-life observational cohort of patients with polyarticular juvenile idiopathic arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 59(4): 732-741.
- [4] Malynn BA, Ma A. A20: a multifunctional tool for regulating immunity and preventing disease[J]. Cell Immunol, 2019, 340: 103914.
- [5] Wu YY, He XM, Huang N, et al. A20: a master regulator of arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1): 220.
- [6] Zhao CY, Zhao W. NLRP3 inflammasome: a key player in antiviral responses[J]. Front Immunol, 2020, 11: 211.
- [7] Zhong ZY, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases[J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(4 Suppl 98): 12-16.
- [8] Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001[J]. J Rheumatol, 2004, 31(2): 390-392.
- [9] Consolaro A, Negro G, Chiara Gallo M, et al. Defining criteria for disease activity states in nonsystemic juvenile idiopathic arthritis based on a three-variable juvenile arthritis disease activity score[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2014, 66(11): 1703-1709.
- [10] Zanwar A, Phatak S, Aggarwal A. Prospective validation of the Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity Index in children with enthesitis-related arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(12): 2167-2171.
- [11] Mitchell JP, Carmody RJ. NF- $\kappa$ B and the transcriptional control of inflammation[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335: 41-84.
- [12] Moretti J, Blander JM. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation[J]. J Leukoc Biol, 2021, 109(3): 561-571.
- [13] Vande Walle L, van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis[J]. Nature, 2014, 512(7512): 69-73.
- [14] Wang X, Zhu LH, Liao ZW, et al. Alternative expression pattern of MALT1-A20-NF- $\kappa$ B in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 492872.
- [15] Angeles-Han S, Prahalad S. The genetics of juvenile idiopathic arthritis: what is new in 2010?[J]. Curr Rheumatol Rep, 2010, 12(2): 87-93.
- [16] Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Association of NLRP3 and CARD8 genetic polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis in a Taiwanese population[J]. Scand J Rheumatol, 2014, 43(2): 146-152.
- [17] Vandenhaute J, Wouters CH, Matthys P. Natural killer cells in systemic autoinflammatory diseases: a focus on systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome[J]. Front Immunol, 2019, 10: 3089.
- [18] Zhang YF, Zheng Y, Li HB. NLRP3 inflammasome plays an important role in the pathogenesis of collagen-induced arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 9656270.
- [19] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328.
- [20] Yasin S, Fall N, Brown RA, et al. IL-18 as a biomarker linking systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome[J]. Rheumatology (Oxford), 2020, 59(2): 361-366.
- [21] Alehashemi S, Goldbach-Mansky R. Human autoinflammatory diseases mediated by NLRP3-, pyrin-, NLRP1-, and NLRC4-inflammasome dysregulation updates on diagnosis, treatment, and the respective roles of IL-1 and IL-18[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1840.

(责任编辑: 周一青)