

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520141153485

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

先天免疫反应在自身免疫病相关的肺纤维
化发病过程中作用的研究

Investigation of the role of innate immunity in pathogenesis
of autoimmunity-associated pulmonary fibrosis

赵文洁

指导教师姓名: 余新华 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩日期: 2017年5月

2017年5月

先天免疫反应在自身免疫病相关的肺纤维化发病过程中作用的研究

赵文洁

指导教师

余新华

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学医学院中德联合自身免疫学实验室余新华教授)课题(组)的研究成果,获得(余新华教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学医学院中德联合自身免疫学)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 肺纤维化 (Pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性、致死性、弥散性的间质性肺病。在一些自身免疫病, 比如系统性硬皮病 (Systemic sclerosis, SSc) 和原发性干燥综合征 (primary Sjögren's syndrome, pSS) 里, PF也是一种常见的并发症并且是导致病人死亡的主要因素之一。值得注意的是, 虽然这些自身免疫病患者都有自身免疫反应, 但只有部分病人患有PF。这一现象表明除了自身免疫外, 还有一些其他因素参与了PF的发生。但目前为止, 自身免疫病相关的PF的发病机制仍然不清楚, 所以难以进行有效地治疗。在这项研究里, 我们采用了遗传学和实验动物学的方法来研究与自身免疫病相关的PF的发病机制。

方法: 为了研究SSc病人中与PF相关的易感基因, 我们在PubMed数据库中搜索有关SSc中PF的遗传相关性的研究, 然后通过meta分析来比较PF阳性和阴性的SSc病人来鉴定出该疾病中与PF相关的基因。另外, 为了研究pSS中PF的发病机理, 我们通过免疫Ro60_316-335多肽的方法建立了带有PF症状的pSS小鼠模型。在这个小鼠模型里, 我们检测了泪液唾液的分泌、自身抗体的产生、以及组织学病变等指标。通过比较C3H/HeN和C3H/HeJ两种小鼠在这个模型里的PF的发生情况, 我们研究了TLR4在PF发生过程中的作用。我们也通过对C3H/HeN小鼠使用TLR4拮抗剂, 来进一步确认TLR4在PF中的作用。

结果: Meta分析的结果表明, *IRF5* rs2004640 (OR = 1.12; 95%CI = 1.02-1.22, $P = 1.39 \times 10^{-2}$)、*STAT4* rs7574865 (OR = 1.15; 95%CI = 1.07-1.47, $P = 5.3 \times 10^{-3}$)、*CTGF G-945C* (OR = 1.42; 95%CI = 1.18-1.71, $P = 0.0002$) 和 *IRAK1* rs1059702 (OR = 1.20; 95%CI = 1.05-1.37, $P = 0.007$) 与SSc患者中PF的状态呈显著的相关性。而 *TNFAIP3* rs5029939 (OR = 1.13; 95%CI = 0.89-1.43, $P = 0.32$), *CD226* rs763361 (OR = 1.05; 95%CI = 0.96-1.15, $P = 0.29$), *CD247* rs2056626 (OR = 0.93; 95%CI = 0.78-1.12, $P = 0.46$) 以及 *IRF5* rs10488631 (OR = 1.04; 95%CI = 0.90-1.21, $P = 0.61$) 遗传多态性位点与SSc患者中PF的状态不相关。动物模型方面的研究结果显示, Ro60_316-335多肽免疫能够诱导C3H/HeN小鼠产生带有PF的类似pSS病人的症状, 包括产生自身抗体, 并出现外分泌腺体功能损伤, 以及肺部炎症和纤维化。但C3H/HeJ小鼠虽然也会出现自身抗体以及外分泌腺的损伤,

但却没有肺部炎症和纤维化的症状。通过对C3H/HeN小鼠和C3H/HeJ小鼠的TLR4基因的测序结果确认了C3H/HeJ小鼠的TLR4存在一个丧失功能的突变，即C3H/HeJ小鼠以组氨酸取代了C3H/HeN的脯氨酸。另外，在使用TLR4拮抗剂TAK-242后，C3H/HeN小鼠的PF程度有所减轻。

结论：在这项研究里，我们利用meta-分析的方法鉴定出了四个与SSc中PF状态相关的基因，它们是*IRF5*、*STAT4*、*CTGF*以及*IRAK1*。动物实验表明TLR4在pSS中PF的发病过程中起到重要的作用。因为*IRF5*、*STAT4*、*IRAK1*以及TLR4均是先天免疫反应中的重要分子，本研究的结果表明先天免疫反应参与了自身免疫病相关的PF的发生。

关键词：肺纤维化；系统性硬皮病；原发性干燥综合征；自身免疫病；先天免疫反应

Abstract

Objective: Pulmonary fibrosis (PF) is a chronic, lethal, diffuse interstitial lung disease. In autoimmune diseases, such as systemic sclerosis (SSc) and primary Sjögren's syndrome (pSS), some patients also suffer from PF which is one of major causes of death in patients. Notably, although all SSc and pSS patients are characterized with autoimmunity, only some patients develop PF. This suggests that beside autoimmunity in general, some specific additional factors are involved in the initiation of PF. So far, the pathogenesis of the autoimmunity associated PF remains elusive, and effective therapies to PF are still missing. In this study, we aimed to explore the pathogenesis of autoimmunity associated PF using genetic analysis and experimental models.

Methods: To identify genetic polymorphisms associated with the status of PF in SSc, we performed an exhaustive search of the PubMed database to identify eligible studies. Then a comprehensive meta-analysis was performed by comparing PF⁺-SSc and PF⁻-SSc patients to identify genetic polymorphisms associated with the status of PF in SSc. To investigate the pathogenesis of PF in pSS, we induced an animal model of pSS by immunization mice with Ro60_316-335 peptide. Several pSS-like phenotypes were evaluated, including autoantibody production, secretion of tears and saliva, histological changes in exocrine gland and lung. To investigate the role of TLR4 signaling in the pathogenesis of PF in this mouse model, we first compared development of PF between C3H/HeN and C3H/HeJ mice, then investigated the effect of a TLR4 antagonist on the development of PF.

Results: Meta-analysis showed that *IRF5* rs2004640 (OR = 1.12; 95% CI = 1.02-1.22, $P = 1.39 \times 10^{-2}$), *STAT4* rs7574865 (OR = 1.15; 95% CI = 1.07-1.47, $P = 5.3 \times 10^{-3}$), *CTGF* G-945C (OR = 1.42; 95% CI = 1.18-1.71, $P = 0.0002$) and *IRAK1* rs1059702 (OR = 1.20; 95% CI = 1.05-1.37, $P = 0.007$) were associated with the status of PF in SSc patients. By contrast, *TNFAIP3* rs5029939 (OR = 1.13; 95% CI = 0.89-1.43, $P = 0.32$), *CD226* rs763361 (OR = 1.05; 95% CI = 0.96-1.15, $P = 0.29$), *CD247* rs2056626

(OR = 0.93; 95%CI = 0.78-1.12, $P = 0.46$) and *IRF5* rs10488631 (OR = 1.04; 95% CI = 0.90-1.21, $P = 0.61$) were not associated with PF. However, After immunization with Ro60_316-335 peptide, C3H/HeN mice developed several pSS-like immunological and clinical features, including autoantibodies, impairment in the secretion function of exocrine glands, and pulmonary inflammation and fibrosis. By contrast, C3H/HeJ mice also developed autoantibodies, and impairment in the secretion function of exocrine glands, but pulmonary inflammation and fibrosis were absent. Sequencing of TLR4 confirmed that the C3H/HeJ mice carry a loss-of-function mutation, with Pro in C3H/HeN mice replaced by His in C3H/HeJ mice. In addition, administration of TLR4 antagonist (TAK-242) slightly modulated the severity of PF in C3H/HeN mice.

Conclusion: In this study, we have identified *IRF5*, *STAT4*, *CTGF* and *IRAK1* as susceptibility genes regulating the status of PF in SSc using meta-analysis. Furthermore, animal experiments have demonstrated that TLR4 signaling plays an important role in the pathogenesis of PF in mouse model of pSS. Since *IRF5*, *STAT4*, *IRAK1* and TLR4 are important regulators in innate immune response, these results suggest that innate immunity contribute to the pathogenesis of autoimmunity associated PF.

Keywords: Pulmonary fibrosis; Systemic sclerosis; primary Sjögren's syndrome; Autoimmune disease; Innate immunity.

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	V
Table of contents	VIII
第一章 前言	1
1.1 肺纤维化.....	1
1.1.1 肺纤维化的一般介绍.....	1
1.1.2 自身免疫病相关的肺纤维化.....	1
1.2 原发性干燥综合征与肺纤维化.....	2
1.2.1 原发性干燥综合征的基本特征.....	2
1.2.2 原发性干燥综合征与肺纤维化.....	3
1.2.3 原发性干燥综合征小鼠模型与肺纤维化.....	3
1.3 肺纤维化与系统性硬皮病.....	4
1.3.1 系统性硬皮病中的肺纤维化病变.....	4
1.3.2 决定系统性硬皮病中肺纤维化的遗传学基础.....	5
1.4 本文的研究目的.....	5
第二章 材料与方.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 实验动物.....	7
2.1.2 实验器材.....	7
2.1.3 主要试剂.....	9
2.1.4 实验试剂的配制.....	10
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 Meta-分析相关实验方法.....	12
2.2.2 分子生物学实验方法.....	13

2.2.3 小鼠模型相关实验方法	16
2.2.4 小鼠模型各项指标检测方法	17
2.2.5 肺部病变的评估	25
2.2.6 统计方法	25
第三章 实验结果	26
3.1 SSc 中肺纤维化相关基因的 meta-analysis	26
3.1.1 鉴定符合条件的研究和遗传多态性	26
3.1.2 遗传多态性与 SSc 中 PF 状态的关系	28
3.2 pSS 小鼠模型里肺纤维化的研究	30
3.2.1 pSS 模型在 C3H/HeN 小鼠中的情况	30
3.2.1.1 C3H/HeN 小鼠的外分泌腺病变情况	30
3.2.1.2 C3H/HeN 小鼠的肺部病变情况	32
3.2.2 pSS 模型在 C3H/HeJ 小鼠中的情况	34
3.2.2.1 C3H/HeJ 小鼠的外分泌腺病变情况	34
3.2.2.2 C3H/HeJ 小鼠的肺部病变情况	36
3.2.3 TLR4 突变在 C3H/HeN 和 C3H/HeJ 小鼠中的情况	37
3.2.3.1 C3H/HeN 和 C3H/HeJ 小鼠全基因组 DNA 提取及 TLR4 片段的 PCR 结果	37
3.2.3.2 C3H/HeN 和 C3H/HeJ 小鼠 TLR4 片段序列差异的检测	37
3.2.4 TLR4 拮抗剂在 pSS 小鼠模型的肺部病变中作用的研究	38
3.2.4.1 TLR4 拮抗剂不影响外分泌腺的病变	39
3.2.4.2 TLR4 拮抗剂对肺部病变的影响	39
第四章 讨论	41
4.1 SSc 中肺纤维化的遗传机理	41
4.2 TLR4 在肺纤维化中的作用	43
4.3 先天免疫系统在自身免疫病相关的肺纤维化发病机制中的作用	45
第五章 总结和展望	46
5.1 总结	46
5.2 展望	46
缩略语索引	47

参 考 文 献	49
发表 论 文	61
致 谢	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Table of contents in Chinese	V
Table of contents in English	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1. 1 Pulmonary fibrosis	1
1. 1. 1 General introduction of pulmonary fibrosis.	1
1. 1. 2 Autoimmune disease associated pulmonary fibrosis.	1
1. 2 primary Sjögren' s syndrome(pSS) and pulmonary fibrosis	2
1. 2. 1 The basic characteristics of pSS	2
1. 2. 2 pSS and pulmonary fibrosis.	3
1. 2. 3 pSS mouse model and pulmonary fibrosis.	3
1. 3 Pulmonary fibrosis and systemic sclerosis(SSc).	4
1. 3. 1 Pulmonary fibrosis in SSc.	4
1. 3. 2 The genetic basis of pulmonary fibrosis in SSc.	5
1. 4 Aims of this study	5
Chapter 2 Materials and methods	7
2. 1 Materials	7
2. 1. 1 Experimental animal	7
2. 1. 2 Equipments	7
2. 1. 3 Reagents.	9
2. 1. 4 Reagent preparation	10
2. 2 Methods.	12
2. 2. 1 Meta-analysis.	12
2. 2. 2 Molecular biology methods	13

2. 2. 3	Introduction of the mouse model.....	16
2. 2. 4	Detection and analysis of mouse model.....	17
2. 2. 5	Evaluation of the pulmonary fibrosis.....	25
2. 2. 6	Statistical analysis	25
Chapter 3 Result		26
3. 1	Meta-analysis about PF associated polymorphism in SSc	26
3. 1. 1	Identification of eligible studies and genetic polymorphisms	26
3. 1. 2	Relationship between genetic polymorphism and PF status in SSc	28
3. 2	Study on PF in pSS mouse model.....	30
3. 2. 1	pSS model in C3H / HeN mice	30
3. 2. 1. 1	Exocrine gland lesions of C3H / HeN mice.....	30
3. 2. 1. 2	Pulmonary lesions of C3H / HeN mice	32
3. 2. 2	pSS model in C3H / HeJ mice	34
3. 2. 2. 1	Exocrine gland lesions of C3H / HeJ mice	34
3. 2. 2. 2	Pulmonary lesions of C3H / HeJ mice.....	36
3. 2. 3	TLR4 mutations in C3H / HeN and C3H / HeJ mice	37
3. 2. 3. 1	Genome extraction of C3H / HeN and C3H / HeJ Mice and PCR results of TLR4 fragment	37
3. 2. 3. 2	Detection of TLR4 fragment sequence in C3H / HeN and C3H / HeJ mice	37
3. 2. 4	Study on the role of TLR4 antagonist in pulmonary lesions of pSS mouse model.....	38
3. 2. 4. 1	TLR4 antagonist do not affect exocrine gland.....	39
3. 2. 4. 2	Effect of TLR4 antagonist on PF.....	39
Chapter 4 Discussion.....		41
4. 1	Genetic Mechanism of PF in SSc	41
4. 2	The role of TLR4 in the pathogenesis of PF.....	43
4. 3	The role of innate immune system in the pathogenesis of autoimmune disease associated PF.....	45
Chapter 5 Summary and perspectives.....		46
5. 1	Summary	46

5. 2 Perspectives	46
Abbreviations	47
Reference.....	49
Published papers.....	61
Acknowledgement.....	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 肺纤维化

1.1.1 肺纤维化的一般介绍

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是间质性肺疾病 (Interstitial lung diseases, ILD) 的一种主要表现形式。它是一种进行性、致死性和弥散性的间质性肺病, 其特征就在于成纤维细胞增殖和随后的胶原沉积^[1]。PF有多种类型, 其中最常见的是特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), IPF为成人发生的病因不明的慢性纤维化间质性肺病^[2]。其发病率会随着年龄的增长而急剧上升。在50岁以下的人群中几乎不存在IPF的患者, 但在75岁以上的人群中约有0.2%会发生IPF^[3]。进行性气喘和最终呼吸衰竭是其最常见的自然史, IPF的生存率与肺癌相当, 中位生存期仅为3年^[4,5]。

还有一种常见的PF是伴随着一些自身免疫性疾病而发生的。这些自身免疫性疾病主要是一些类风湿性结缔组织病^[6-8]。这一类PF被认为是自身免疫病相关的肺纤维化, 也叫做结缔组织病 (connective tissue diseases, CTDs) 相关的肺纤维化。另外, 慢性组织损伤也会导致PF的发生, 当肺组织受到损伤, 机体首先会自主进行修复, 但当修复过度时, 胶原蛋白分泌过多, 形成胶原沉积, 从而引起PF^[9]。

PF的发生, 因其不可逆转, 因而给患者带来极大的危害^[10]。尽管科学家们一直在努力地研究, 但其发病机制仍然不清楚, 因此难以进行特异并有效的治疗。所以, 进一步研究这一疾病具有非常重要的科学意义和临床意义。

1.1.2 自身免疫病相关的肺纤维化

在一些自身免疫病, 尤其是在结缔组织病中经常会出现肺部受累的情况, 其中最常见的就是肺纤维化。在CTDs, 特别是系统性硬皮病 (Systemic sclerosis, SSc)、原发性干燥综合征 (primary Sjögren's syndrome, pSS)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 以及多发性肌炎/皮肌炎 (polymyositis/dermatomyositis, PM / DM) 中, 病人经

常出现PF的症状^[11]。而在所有的CTDs中，SSc是PF发生频率最高的疾病，其发生频率依据种族，自身抗体亚群和皮肤病变程度的不同，为20%到40%不等^[12,13]。RA是CTDs中最常见的，发病率为1%~2%，女性与男性发病比例为3:1^[11]。PF的发生是RA致死的一大因素，仅次于心脏病^[14]。另外，PF也是PM / DM中最常见的呼吸并发症，报告的患病率差异很大，这也取决于确定标准和患者选择的方法^[15-19]，而有关节炎/关节痛、年龄大于45岁的成年人和抗氨酰-tRNA合成酶升高与ILD的发生有着显著相关性^[20-22]。这些CTDs相关的PF，如果不进行治疗，则有发展恶化的趋势，并成为导致病人死亡的主要因素之一^[23,24]。

与IPF不同，自身免疫病相关的PF患者具有相对高的生存率，当前的临床经验表明，免疫抑制药物能够缓解与自身免疫病相关的这种肺纤维化^[11]，这也显示自身免疫反应在其发生过程中起到了作用。

1.2 原发性干燥综合征与肺纤维化

1.2.1 原发性干燥综合征的基本特征

干燥综合征（Sjögren's syndrome, SS）是一种慢性炎症和淋巴增生性疾病，并伴随有单核细胞浸润外分泌腺的自身免疫性特征，特别是泪腺和唾液腺，因此也称该病为自身免疫性外分泌性疾病^[25]。该病是最常见的自身免疫系统疾病之一，主要特征在于炎症过程对泪腺和唾液腺的进行性破坏引起的眼干、口干^[26]。当其单独发生时，称为原发性干燥综合征（primary sjögren's syndrome, pSS），当确诊为其他自身免疫性疾病之后，继而发生干燥综合征时，称为继发性干燥综合征（secondary sjögren's syndrome, 2ndSS）。pSS的发病率约为0.5%，根据所使用的标准不同，其患病率有很大差异。该疾病的平均发病年龄通常在40到50岁左右^[27]。其发生偏向于女性，女性与男性的发病率为9:1^[28]。除了导致口干和眼干外，pSS还可能累及其它多个腺体和器官，如肺，肾，脾等，造成多个腺体和器官功能受到损伤^[29]。pSS患者的血清中还可以检测到多种较高滴度的自身抗体，如抗SSA抗体、抗SSB抗体、抗核抗体等^[30]，并且还存在着多种高于正常水平的细胞因子，如IL-17A和IFN- γ 等^[28]。有研究显示，白细胞介素（IL）-17可能是pSS发病过程中起关键作用的炎性细胞因子之一，消除IL-17可以起到缓解唾液腺体损伤的作用^[31]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库