

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.06.003

❖ 基础研究 ❖

自噬相关基因在 Janus 蛋白酪氨酸激酶抑制剂治疗类风湿性关节炎前后患者外周血单个核细胞中的表达及其临床意义

廖霞¹, 姚婷², 谢泓源¹, 余湘¹, 雷天意¹, 张全波², 青玉凤¹

(川北医学院附属医院, 1. 风湿免疫科; 2. 老年科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨自噬相关基因(ATGs)是否参与类风湿性关节炎(RA)的发生发展及 Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK)抑制剂治疗前后的自噬表达变化。**方法:** 收集 30 例经 JAK 抑制剂治疗 24 周的 RA 患者(RA 组)的临床、实验室资料及外周血标本;同时收集 30 名健康者(HC 组)外周血标本作为对照。实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞中自噬相关基因的表达水平。**结果:** RA 组 ATG5、Beclin-1、LC-3 的 mRNA 表达水平平均高于 HC 组;ATG16 的 mRNA 表达水平低于 HC 组($P < 0.05$)。RA 组 ATG5 表达水平与 ESR、hsCRP、SJC、PtGA、DAS-28 (ESR)、CCP 正相关($P < 0.05$); ATG12 表达水平与 hsCRP、CCP 正相关($P < 0.05$); ATG16 表达水平与 hsCRP、SJC 正相关($P < 0.05$); Beclin-1 表达水平与 ESR、hsCRP、PtGA、DAS-28 (ESR) 正相关($P < 0.05$), 与 RF-IgG 负相关($P < 0.05$); LC-3 表达水平与 ESR、hsCRP 正相关($P < 0.05$)。治疗 24 周后, ATG5、LC-3、Beclin-1 的 mRNA 表达水平均降低, ATG16 的 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。**结论:** 自噬相关基因参与了 RA 发病;托法替布可能通过影响 RA 患者体内的自噬水平, 可作为一种潜在的自噬调节剂。

【关键词】 类风湿性关节炎; Janus 蛋白酪氨酸激酶抑制剂; 自噬基因

【中图分类号】 R593.22 **【文献标志码】** A

Expression and clinical significance of autophagy-related genes in peripheral blood mononuclear cells of patients before and after Janus protein tyrosine kinase inhibitors for rheumatoid arthritis

LIAO Xia¹, YAO Ting², XIE Hong-yuan¹, YU Xiang¹, LEI Tian-yi¹, ZHANG Quan-bo², QING Yu-feng¹

(1. Department of Rheumatology and Immunology; 2. Department of Geriatrics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore whether autophagy-related genes(ATGS) are involved in the development of rheumatoid arthritis(RA) and the autophagy expression changes before and after treatment with Janus protein tyrosine kinase(JAK) inhibitors. **Methods:** Clinical and laboratory data and peripheral blood samples of 30 RA patients treated with JAK inhibitors for 24 weeks (RA group) and 30 healthy people (HC group) were collected, and the expression levels of autophagy-related genes in peripheral blood mononuclear cells were detected by RT-qPCR. **Results:** The mRNA expression levels of ATG 5, Beclin-1 and LC-3 in RA group were higher than those in HC group, while mRNA expression level of ATG 16 in RA group was lower than that in the HC group ($P < 0.05$). In RA group, ATG5 expression was positively correlated with ESR, hsCRP, SJC, PtGA, DAS-28 (ESR) and CCP. ATG12 expression was positively correlated with hsCRP and CCP, ATG16 expression was positively correlated with hsCRP and SJC. Beclin-1 expression was positively correlated with ESR, hsCRP, PtGA and DAS-28 (ESR), and negatively correlation with RF-IgG. LC-3 expression was positively correlated with ESR and hsCRP ($P < 0.05$). After 24 weeks of treatment, the mRNA expression levels of ATG5, LC-3 and Beclin-1 decreased, while the mRNA expression levels of ATG16 increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Autophagy-related genes are involved in the pathogenesis of RA. Tofacitinib may act as a potential autophagy regulator by affecting the level of autophagy in RA patients.

【Key words】 Rheumatoid arthritis; Janus protein tyrosine kinase inhibitors; Autophagy gene

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是最常见的自身免疫病之一, 全球发病率为 0.5% ~

基金项目: 四川省南充市科技项目(20SXQT0308; 20SXCXTD0002)

作者简介: 廖霞(1995 -), 女, 硕士, 住院医师。E-mail: 1451140054@qq.com

通讯作者: 青玉凤, 教授。E-mail: qingyufengqq@163.com

1%^[1],我国发病率约为 0.42%,女性多于男性^[2]。RA 除累及关节外,也常出现肺间质改变、心血管事件、慢性病贫血、恶性肿瘤等关节外表现。RA 疾病的进展可能导致患者生活质量下降,死亡率增加^[3-5]。早诊断、早治疗对于减少 RA 患者功能丧失,改善预后十分重要。目前 RA 发病机制尚不明确,与遗传、环境等因素相关^[6-7]。近年来相关研究^[8]发现,Janus 蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子(janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路的持续激活对 RA 的发病过程具有重要调控意义,以此为基础诞生了包括托法替布在内的一系列新型的口服(janus protein tyrosine kinase, JAK)抑制剂,并且在临床中逐渐得到应用。

自噬是一种广泛存在于真核生物中的降解机制,其主要作用是在溶酶体介导下降解或清除受损的细胞器和蛋白质聚集体及病原体从而维持细胞自身代谢及调节细胞稳态^[9]。研究^[10-12]发现,自噬的异常在心血管疾病、感染、衰老、肿瘤、神经系统疾病及自身免疫性疾病的发病过程中发挥重要作用。越来越多的研究^[13-14]也发现自噬参与了 RA 疾病的发生发展。本研究欲探讨 RA 患者体内是否存在自噬的异常表达,并探索其与 RA 患者临床表现之间的关系,同时通过检测托法替布治疗前后自噬相关基因(autophagy-related genes, ATGs)表达水平的变化,以明确托法替布是否可通过调控自噬而发挥作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2020 年 6 月至 2021 年 6 月于川北医学院附属医院门诊就诊的 RA 患者(RA 组)30 例为研究对象。纳入标准:符合 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟关于类风湿患者分类标准^[15];既往仅接受传统合成抗风湿药(conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, csDMARDs)治疗。排除标准:排除合并其他自身免疫性疾病、重要脏器疾病、感染、肿瘤、内分泌疾病患者及妊娠。选取同期川北医学院附属医院体检中心年龄、性别匹配的 30 名健康体检者为对照组(healthy control group, HC 组),HC 组实验室指标均正常,无自身免疫性疾病和家族史。本研究经医院伦理委员会审核通过,且全部患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 给药方式 予以枸橼酸托法替布片(正大天晴药业集团股份有限公司, H20193281), 5 mg/

次, 2 次/d, 连续治疗 24 周。

1.2.2 临床资料与实验室指标 收集托法替布治疗前、治疗后 24 周 RA 患者的临床治疗反应性指标,包括健康评估问卷残疾指数(HAQ-DI)、关节肿胀数目(SJC)、关节压痛数(TJC)、28 个关节疾病活动评分(DAS-28)、患者总体评估(PtGA)、DAS-28(ESR)疾病活动度分级、ACR20/50/70 应答率、红细胞沉降率(ESR)、超敏 C 反应蛋白(hsCRP)、自身抗体(RF、CCP)。所有实验室指标均在川北医学院附属医院检验科完成。

1.2.3 引物合成 根据 Pubmed Gene 中 ATG3、ATG5、ATG12、ATG16、Beclin-1、LC-3 和 β -actin 人基因序列,采用 Primer 6.0 引物设计软件设计相应引物,由上海生工生物合成公司合成引物。见表 1。

1.2.4 实时荧光定量法(RT-qPCR) 采用 RT-qPCR 检测 RA 患者及健康对照组外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)中 ATGs 的表达水平。用肝素钠抗凝的外周静脉血 3 mL,分离提取 PBMCs,采用 Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度,取 OD260/OD280 在 1.8 ~ 2.0 的 RNA 反转录合成 cDNA。RT-qPCR 总体积为 20 μ L,反应体系:TB Green Premix Ex Taq II 5 μ L,ROX Reference Dye II 0.2 μ L,去离子水 3.2 μ L,正向及反向引物各 0.3 μ L, cDNA 1 μ L。反应条件:第一步:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min。第二步:95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 34 s 进行循环扩增,循环 40 次。溶解曲线阶段:95 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C,每 15 s 1 个循环。每份标本均设两个复孔,反应结束后做溶解曲线。以目的基因的 Ct 值减去内参的 Ct 值为 Δ Ct,以 $2^{-\Delta Ct}$ 值表示目的基因 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度(bp)
ATG3	正向引物:5'-GATGGCGGATGGGTAACA-3,	21
	反向引物:5'-TC TTCACATAGTCTGAGCAATC-3,	23
ATG5	正向引物:5'-AAAGATGTCTCCAGATGTGT-3,	22
	反向引物:5'-CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA-3,	23
ATG12	正向引物:5'-TAGAGCGAACAGCAACCATCC-3,	21
	反向引物:5'-CACTGCCAAAACACTCATAGAGA-3,	23
ATG16	正向引物:5'-TCTGGACATTCGATCAGAGAG-3,	22
	反向引物:5'-CCTTCTGGCTTTAAGTCCAGG-3,	22
Beclin-1	正向引物:5'-ACCTCAGCCGAAGACTGAAG-3,	20
	反向引物:5'-AACAGCGTTTGTAGTTCTGACA-3,	22
LC-3	正向引物:5'-AACATGAGCGAGTTGGTCAAG-3,	21
	反向引物:5'-AACATGAGCGAGTTGGTCAAG-3,	21
β -actin	正向引物:5'-GAGCTACGAGCTCGCTCAGC-3,	20
	反向引物:5'-GTACTTTCGTGGATGCCACAG-3,	21

1.3 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布或近似正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 组间比较采用成组 t 检验, 组内比较用配对 t 检验; 非正态分布资料以 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 描述, 组间比较用 Mann-Whitney 检验; 计数资料用 $[n(\%)]$ 描述, 组间比较用成组 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法; 相关性分析采用 Spearman 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组研究对象年龄、性别构成比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), RA 组 ESR、hSCRp 水平高于 HC 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 两组自噬基因 mRNA 表达水平比较

与 HC 组相比, RA 组 ATG5、Beclin-1、LC-3 的 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.05$), ATG16 的 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), ATG3、ATG12 的 mRNA 表达水平无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 3 及图 1。

表 2 两组一般资料比较 $[\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75}), n(\%)]$

资料	RA 组 (n=30)	HC 组 (n=30)	t/χ^2 值	P 值
年龄 (岁)	50.83 ± 11.28	46.57 ± 9.13	1.610	0.113
性别			0.416	0.652
男	4(13.33)	5(16.67)		
女	26(86.67)	25(83.33)		
ESR (mm/h)	52.37 ± 27.87	7.10 ± 3.39	8.831	<0.001
hsCRP (mg/L)	24.75 ± 23.85	3.02 ± 2.95	4.952	<0.001
RF-IgM (IU/mL)	313(705.25)	-	-	-
RF-IgG (U/mL)	6.32(6.41)	-	-	-
RF-IgA (U/mL)	69.82(128.56)	-	-	-
CCP (RU/mL)	400(247.28)	-	-	-

ESR: 血沉; hSCRp: 超敏 C 反应蛋白; RF: 类风湿因子; CCP: 抗环瓜氨酸肽抗体。

表 3 两组 PBMCs 中自噬相关基因 mRNA 表达水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

基因	RA 组 (n=30)	HC 组 (n=30)	t 值	P 值
ATG3	0.037 ± 0.036	0.031 ± 0.016	1.742	0.087
ATG5	0.017 ± 0.025	0.012 ± 0.015	3.094	0.003
ATG12	0.018 ± 0.025	0.018 ± 0.024	1.281	0.205
ATG16	0.012 ± 0.023	0.016 ± 0.022	-2.217	0.031
Beclin-1	0.019 ± 0.048	0.013 ± 0.024	2.562	0.013
LC-3	0.134 ± 0.263	0.094 ± 0.110	3.742	<0.001

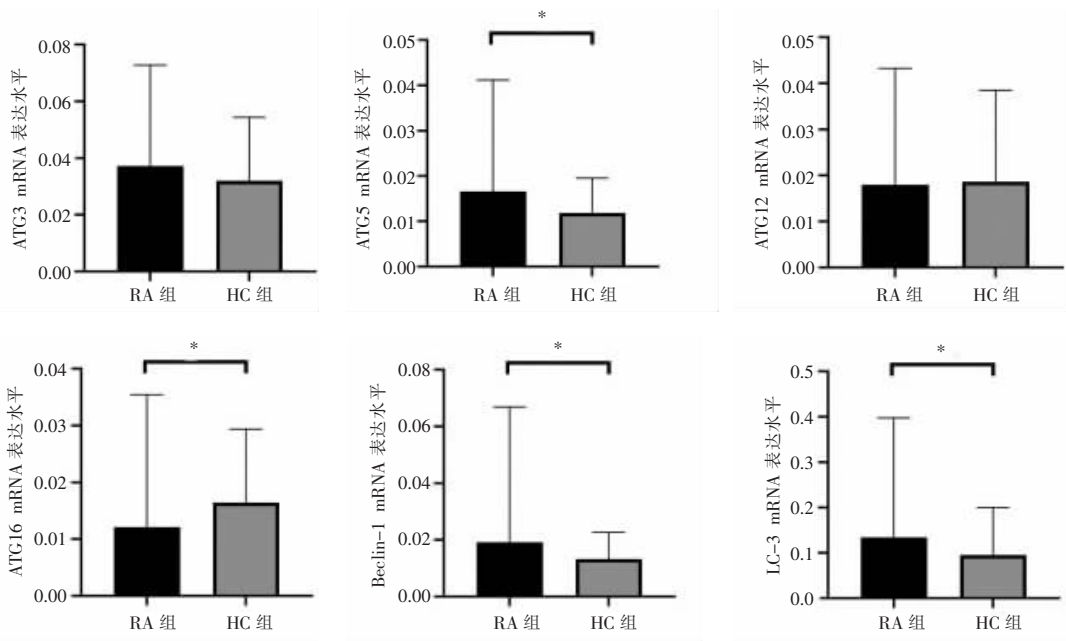


图 1 RA 组与 HC 组自噬相关基因表达水平对比

* $P < 0.05$, RA 组与 HC 组比较。

2.3 RA 患者自噬基因表达水平与临床指标的相关性分析

ATG5 与 ESR、hsCRP、SJC、PtGA、DAS-28 (ESR)、CCP 正相关 ($P < 0.05$); ATG12 与 hsCRP、CCP 正相关 ($P < 0.05$); ATG16 与 hsCRP、SJC 正相关

($P < 0.05$); Beclin-1 与 ESR、hsCRP、PtGA、DAS-28 (ESR) 正相关 ($P < 0.05$), 与 RF-IgG 负相关 ($P < 0.05$); LC-3 与 ESR、hsCRP 正相关 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 自噬相关基因与 RA 患者临床指标相关性分析

指标	ATG3		ATG5		ATG12		ATG16		Beclin-1		LC-3	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
HAQ-DI	-0.015	0.936	0.142	0.455	0.066	0.727	0.166	0.382	0.115	0.547	0.131	0.490
TJC	-0.100	0.601	0.285	0.127	0.070	0.714	0.275	0.142	0.211	0.264	0.308	0.097
SJC	0.057	0.767	0.385	0.036	0.136	0.474	0.369	0.045	0.339	0.067	0.315	0.090
DAS-28	-0.005	0.979	0.451	0.012	0.148	0.434	0.270	0.149	0.373	0.042	0.342	0.064
ESR	-0.025	0.894	0.511	0.004	0.211	0.263	0.285	0.126	0.379	0.039	0.394	0.031
hsCRP	0.282	0.131	0.998	<0.001	0.545	0.002	0.423	0.020	0.648	<0.001	0.576	<0.001
PtGA	0.194	0.305	0.384	0.036	0.170	0.369	0.261	0.164	0.395	0.031	0.298	0.109
RF-IgM	-0.084	0.695	0.266	0.309	-0.012	0.955	0.177	0.409	-0.033	0.878	0.180	0.400
RF-IgG	-0.199	0.351	-0.296	0.160	-0.371	0.074	-0.139	0.518	-0.435	0.033	-0.132	0.538
RF-IgA	0.150	0.516	0.130	0.575	0.109	0.638	-0.143	0.537	0.129	0.579	0.174	0.451
CCP	0.335	0.110	0.461	0.023	0.490	0.015	0.334	0.111	0.276	0.192	0.394	0.057

ATG:自噬相关基因;LC-3:微管相关蛋白1轻链3;TJC:关节压痛数;SJC:关节肿胀数;HAQ-DI:健康评估问卷残疾指数;PtGA:患者总体评价;DAS-28:28个关节疾病活动度评分;ESR:红细胞沉降率;hsCRP:超敏C反应蛋白;RF:类风湿因子;CCP:抗环瓜氨酸肽抗体。

2.4 RA 组治疗前后自噬基因表达水平对比

治疗后,RA 组经托法替布治疗 24 周后,ATG5、Beclin-1、LC-3 的 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$),ATG16 的 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$),ATG3、ATG12 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5 及图 2。

表 5 RA 组治疗前后自噬相关基因 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

基因	治疗前	治疗后	t 值	P 值
ATG3	0.037 ± 0.036	0.037 ± 0.041	0.117	0.908
ATG5	0.017 ± 0.025	0.006 ± 0.005	2.562	0.016
ATG12	0.018 ± 0.025	0.030 ± 0.041	-1.433	0.163
ATG16	0.012 ± 0.023	0.044 ± 0.049	-5.019	<0.001
Beclin-1	0.019 ± 0.048	0.008 ± 0.003	2.101	0.044
LC-3	0.134 ± 0.263	0.028 ± 0.022	2.283	0.030

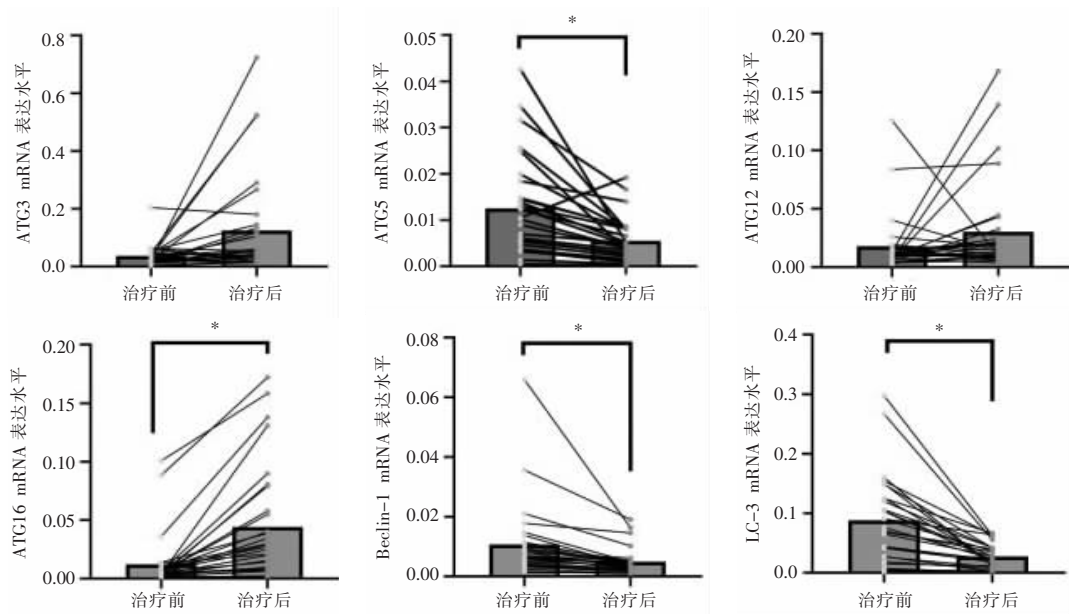


图 2 RA 组托法替布治疗前后自噬相关基因表达水平对比

* $P < 0.05$, 治疗前与治疗后比较。

3 讨论

类风湿关节炎是一种弥漫性结缔组织病,可影响多个器官系统,对患者及家庭产生严重影响。相关研究^[10-12]发现,自噬的异常上调或下调亦或是功能缺失在多种疾病的发病机制中发挥重要作用。研

究^[16]表明,自噬在类风湿性关节炎发病过程中发挥着重要作用:(1)诱导瓜氨酸化并呈递瓜氨酸肽给免疫细胞导致免疫炎症反应;(2)刺激破骨细胞生成并诱导其介导的骨吸收^[17];(3)诱导并维持成纤维样滑膜细胞形成“凋亡抵抗”^[18];(4)调节淋巴细胞的激活和保存^[19-20]。瓜氨酸化是指在肽基精氨

酸脱亚胺酶 (peptidyl-arginine-deiminase, PAD) 的作用下,精氨酸被化学转化为瓜氨酸的过程。新生成的瓜氨酸蛋白抗原在自噬参与条件下被呈递给 T 淋巴细胞并导致抗瓜氨酸抗体生成,后者能够分化为破骨细胞,从而促进骨丢失和破坏^[21]。

本研究中,与 HC 组相比,RA 组患者的 ATG5、Beclin-1、LC-3 的 mRNA 水平均呈高表达,与 Zhu 等^[22]的研究结果一致,提示 ATG5、Beclin-1、LC-3 等自噬基因的上调可能参与 RA 的发病;但与之不同的是我们发现 RA 患者 ATG16 的 mRNA 表达水平降低。Saitoh 等^[23]研究中也发现在 ATG16 功能缺失的巨噬细胞中白细胞介素 1、白细胞介素 18 表达增加,表明 ATG16 可能发挥着抑制某些炎症因子表达从而发挥免疫作用。此外,Hamaoui 等^[24]研究也强调了 ATG16 除在自噬发生过程中发挥重要作用,还广泛作为炎症的制动器发挥作用从而维持细胞稳态。因此推测 ATG16 在 RA 中可能发挥着抑制炎症的作用。

既往研究^[22-24]及本研究结果均表明 RA 患者体内的确存在自噬的异常,为了明确自噬异常对 RA 患者临床症状及疾病活动性的影响,本研究进一步进行了相关性分析,结果发现 ATG5、ATG12、ATG16、Beclin-1、LC-3 与 ESR、hsCRP、CCP 等指标呈现不同程度的正相关关系。在 RA 患者中,我们通常将 ESR 及 hsCRP 作为判断患者疾病活跃度的参考指标,而将 RF 和 CCP 抗体滴度作为判断患者病情严重程度及疾病预后的预判指标。上述结果表明在活动性 RA 患者中,其自噬水平高低与疾病活动性、炎症指标、关节肿胀等临床指标密切相关,降低自噬相关基因的表达水平可能成为类风湿关节炎治疗的新靶点。

托法替布是一种新型的口小分子药物,主要通过靶向抑制 JAK/STAT 信号通路发挥治疗目的。最近一项在 Clec16aKO 小鼠中的研究^[25]结果表明,托法替布对自噬的影响可能是通过抑制 JAK/STAT 信号通路中 STAT1、STAT3 发挥作用。以此为基础,本研究检测了托法替布治疗 24 周后 RA 患者的 ATGs 的表达水平,发现 ATG5、Beclin-1、LC-3 的基因表达水平降低,而 ATG16 基因表达水平升高,提示托法替布可能通过影响自噬相关基因的表达而参与自噬调节。但是由于目前缺乏托法替布对 RA 患者自噬影响的直接研究,因此关于托法替布对 RA 患者自噬影响的具体机制尚不明确。

综上,RA 患者体内存在自噬基因的异常表达

且与疾病活动性和炎症水平等密切相关,提示自噬可能成为未来 RA 治疗的新靶点。此外,托法替布可通过调控部分自噬基因的表达从而影响自噬,可能为其治疗 RA 的新途径,亦可能成为潜在的自噬调控剂,但其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Urits I, Israel J, Hakobyan H, *et al.* Baricitinib for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Reumatologia*, 2020, 58 (6) : 407 - 415.
- [2] 曾小峰, 朱松林, 谭爱春, 等. 我国类风湿关节炎疾病负担和生存质量研究的系统评价 [J]. *中国循证医学杂志*, 2013, 13 (3) : 300 - 307.
- [3] 郑慧, 郝慧琴, 张莉芸, 等. 自噬在类风湿关节炎发病机制中的研究进展 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23 (1) : 63 - 66.
- [4] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. *The Lancet*, 2016, 388 (10055) : 2023 - 2038.
- [5] Taylor PC, Atzeni F, Balsa A, *et al.* The key comorbidities in patients with rheumatoid arthritis: A narrative review [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10 (3) : 509.
- [6] Dai YJ, Hu SX. Recent insights into the role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2016, 55 (3) : 403 - 410.
- [7] Mateen S, Zafar A, Moin S, *et al.* Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2016, 455 : 161 - 171.
- [8] Ghoreschi K, Jesson MI, Li X, *et al.* Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550) [J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2011, 186 (7) : 4234 - 4243.
- [9] Buckland J. Autophagy: a dual role in the life and death of RASFs [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2013, 9 (11) : 637.
- [10] Héraud C, Griffiths A, Pandruvada SN, *et al.* Severe neurodegeneration with impaired autophagy mechanism triggered by ostml deficiency [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289 (20) : 13912 - 13925.
- [11] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. *Immunity*, 2021, 54 (3) : 437 - 453.
- [12] Huang YH, Al-Aidaros AQ, Yuen HF, *et al.* A role of autophagy in PTP4A3-driven cancer progression [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (10) : 1787 - 1800.
- [13] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, *et al.* The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13 (5) : 619 - 624.
- [14] Karami J, Masoumi M, Khorramdelazad H, *et al.* Role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches [J]. *Life Sciences*, 2020, 254 : 117734.
- [15] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis Rheum Rheumatism*, 2010, 62 (9) : 2569 - 2581.

(下转第 744 页)