

肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 的功能及其小分子抑制剂的研究进展

谢万生¹, 李仲洋¹, 周瑞怡¹, 李耀华^{1,2}, 常丽梅^{1*}

1. 海南省药品和医疗器械审评服务中心, 海南 海口 570216

2. 国家药品监督管理局 医疗器械技术审评中心, 北京 100037

摘要: 肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) 依赖钙离子催化精氨酸残基向目标蛋白瓜氨酸残基转化的过程, 是一种翻译后修饰, 被称为瓜氨酸化。PAD4 通过组蛋白瓜氨酸化调节基因转录活性诱导人类疾病的发生、发展。综述了 PAD4 在自身免疫性疾病、肿瘤、急性冠状动脉综合征中的作用, 总结了 PAD4 抑制剂介导蛋白质瓜氨酸化的生物学作用的可能机制, 归纳了 PAD4 特异性抑制剂治疗类风湿关节炎和其他疾病的临床效用, 讨论了 PAD4 及其抑制剂对自身免疫性疾病和癌症的潜在治疗价值。

关键词: 肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4); PAD4 抑制剂; 自身免疫性疾病; 癌症; 急性冠状动脉综合征

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)06-1322-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.06.044

Research progress of PAD4 function and its small molecule inhibitors

XIE Wan-sheng¹, LI Zhong-yang¹, ZHOU Rui-yi¹, LI Yao-hua^{1, 2}, CHANG Li-mei¹

1. Hainan Provincial Drug and Medical Device Evaluation Service Center, Haikou 570216, China

2. Medical Device Technology Review Center, National Medical Products Administration, Beijing 100037, China

Abstract: Peptidylarginine deiminase4 relies on calcium ions to catalyze the conversion of arginine residues to citrulline residues of the target protein. This is a post-translational modification called citrullination. PAD4 regulates gene transcription activity through histone citrullination to induce the occurrence and development of human diseases. In this review, we summarized the role of PAD4 in autoimmune diseases, tumors, and acute coronary syndromes, and the possible mechanisms of the biological effects of PAD4 inhibitors mediating protein citrullination. The clinical utility of PAD4 specific inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis and other diseases were discussed. In addition, we summarized and discussed the potential therapeutic value of PAD4 and its inhibitors for disease diagnosis and treatment of autoimmune diseases and cancers.

Key words: peptidylarginine deiminase 4 (PAD4); PAD4 inhibitor; autoimmune disease; tumor; acute coronary syndrome

组蛋白的翻译后修饰对蛋白质的结构和功能有重大影响。组蛋白的翻译后修饰可以通过蛋白水解和降解蛋白来增强蛋白质的功能多样性, 如磷酸化、糖基化、泛素化、亚硝基化、甲基化、瓜氨酸化、乙酰化、脂化和蛋白水解, 从而影响多种疾病的发生和发展。因此, 研究组蛋白的翻译后修饰的细胞生物学对疾病的诊断和预防至关重要^[1]。其中肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 催化的瓜氨酸化主要通过调节染色质重塑和免疫细胞的细胞外捕获来影响许多重要的生物学功能, 如上皮分化、神经元生长、凋亡、胚胎发育和转录调控^[2-3]。目前已

知 PAD4 失调会导致类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症和癌症的发生、发展^[4]。因此 PAD4 抑制剂的开发引起全球研究人员的广泛关注。

PAD4 是单体相对分子质量为 7.4×10^4 的同二聚酶, 由 663 个氨基酸残基组成^[5]。PAD4 基因位于 1 号染色体的短臂上 36 位点 (1p36.13)^[6], 负责翻译后脱氨化过程中将精氨酸催化为瓜氨酸^[7]。PAD4 是唯一具有自然核定位的 PAD 家族成员, 在调控分化、发育和凋亡中起重要作用^[8]。PAD4 的单体结构具有独特的 N、C 末端结构域, 并包含 5 个 Ca^{2+} 结合位点。这 5 个 Ca^{2+} 结合位点中, 2 个位点有助于

收稿日期: 2021-01-16

作者简介: 谢万生 (1991—), 男, 硕士, 从事药物结构分析研究。E-mail: 497768966@qq.com

*通信作者: 常丽梅 (1977—), 女, 高级工程师, 硕士, 从事药物研究。E-mail: lily-email@163.com

桥接 N、C 端结构域, 其余 3 个在 N 端结构域中^[9]。N 末端结构域由 Met-1 至 Pro-300 氨基酸残基组成, 该氨基酸残基又分为 2 个免疫球蛋白样亚结构域 1、2。亚结构域 1 具有 9 个 β 链和核定位信号。亚结构域 2 具有 10 个 β 链, 4 个短 α 螺旋和 3 个 Ca^{2+} 离子。C 端结构域由 Asn-301 至 Pro-663 氨基酸残基组成, 连同 $\beta\beta\alpha\beta$ 模块以 α/β 螺旋桨的对称结构环状排列^[10-11] (图 1)。此外, PAD4 与 Ca^{2+} 的结合会引起构象变化, 从而导致活性位点裂口的形成。这一现象对开发新型 PAD4 抑制剂提供新方向^[12]。本文概述了 PAD4 的生物学功能和抑制剂研究进展, 期望对 PAD4 深入研究、相关临床疾病的诊断和新药研发提供帮助。



图 1 PAD4 的立体结构图

Fig. 1 Three-dimensional structure of PAD4

1 PAD4 在自身免疫性疾病中的作用

1.1 PAD4 在类风湿关节炎中的作用

类风湿关节炎是一种病因不明的复杂自身免疫性疾病, 全世界范围内的患病率为 0.5%~1%^[13-14]。类风湿关节炎的主要特征是滑膜关节组织发炎和类风湿血管翳的形成, 并破坏相邻的软骨和骨骼, 从而引起随后的关节畸形, 最终导致患者生活质量下降。近年来研究发现, PAD4 通常在白细胞和滑膜关节中处于休眠状态, 直到在炎症反应期间被激活^[15]。在类风湿关节炎患者的滑膜组织中检测到 PAD 家族中的 PAD2、PAD4、PAD6 呈现高表达, 而无法检测到 PAD1、PAD3 表达^[16]。因此 PAD4 可以作为类风湿关节炎滑膜衬里细胞层的增生的标志物^[17]。有研究表明, 非特异性的精氨酸脱氨作用会导致含有瓜氨酸的抗原决定簇的产生, 最终导致类风湿关节炎的发生、发展^[18]。吕卓等^[19]选取活动期类风湿关节炎患者 24 例、缓解期类风湿关节炎患者 14 例和健康个体 12 例作为研究对象, 通过

检测外周血 PAD4 的 mRNA 表达水平发现, 在活动期和缓解期类风湿关节炎患者中 PAD4 的 mRNA 表达水平显著高于健康个体。Zhao 等^[20]选取 109 例类风湿关节炎患者和 106 例健康个体, 通过 ELISA 检测重组人 PAD4 抗体, 评估 PAD4 与类风湿关节炎临床特征之间的关联。结果显示, 类风湿关节炎中抗 PAD4 高表达, 表明 PAD4 在类风湿关节炎中可能充当自身抗原, 在类风湿关节炎的发生、发展中发挥主要作用。

1.2 PAD4 在系统性红斑狼疮中的作用

PAD4 除了与类风湿关节炎的发病有着密切的联系, PAD4 还可通过促进细胞外捕获形成参与系统性红斑狼疮的发病过程, 有着密切的关联^[21]。PAD4 参与中性粒细胞的特殊死亡过程, 并形成特殊产物细胞外捕获。细胞外捕获中含有自身 DNA-抗菌肽复合物, 激活树突状细胞释放干扰素, 刺激自身 B 淋巴细胞释放针对自身抗原的抗体, 促进系统性红斑狼疮患者体内炎症反应和病情发展^[22-23]。结果表明, PAD4 在系统性红斑狼疮早期患者中呈现高表达, 且明显高于对照组^[24]。Massarenti 等^[25]选取 234 名系统性红斑狼疮患者和 484 名健康个体作为研究对象, 采用多重 Luminex 分析对 PADI4SNP 进行基因分型。结果显示, PADI4 的 rs1635564 多态性是系统性红斑狼疮的潜在危险因素, 是促进系统性红斑狼疮发生、发展的重要因素之一。

1.3 PAD4 在多发性硬化症中的作用

多发性硬化症是成人最常见的脱髓鞘疾病, 导致精神疲劳、肌肉无力和认知障碍, 影响了全世界约 200 万人。髓鞘碱性蛋白是多发性硬化症中维持髓鞘紧实和防止降解的关键蛋白, 受瓜氨酸的代谢途径所调控^[26]。PAD4 通过催化蛋白质翻译后的瓜氨酸, 从而参与多发性硬化症的发病过程。有研究发现, 抗中性粒细胞胞质抗体介导的中性粒细胞活化在体外可诱导细胞外捕获的形成, 在细胞外捕获中存在一些靶向的自身抗原表位, 如髓过氧化物酶和蛋白酶 3^[27-28]。Moscarello 等^[29]研究发现, 脱髓鞘小鼠模型中多发性硬化症的进展与髓磷脂 PAD4 表达增加的过度瓜氨酸化有关。Bradford 等^[30]利用 qPCR、免疫组化和 ELISA 检测多发性硬化症患者和健康个体中 PAD4 的表达水平。结果显示, 在多发性硬化症组织中 PAD4 的 mRNA 表达水平显著高于健康个体; 免疫组化和 ELISA 结果也表明多发性

硬化症组织中的 PAD4 显著高于健康个体。因此, PAD4 的异常表达将介导的瓜氨酸化在多发性硬化症的发病过程中具有重要作用。总而言之, PAD4 介导的瓜氨酸化在自身免疫性疾病发病过程中具有重要作用。

2 PAD4 在肿瘤中的作用

2.1 PAD4 在肿瘤中呈现高表达

PAD4 在乳腺癌、肺癌、肝细胞癌、食管癌、结肠直肠癌、肾癌、卵巢癌、子宫内膜癌、膀胱癌和子宫癌等恶性肿瘤中过表达,但在良性肿瘤中却不表达,提示 PAD4 在癌症进展中具有一定作用^[31]。通常,在许多癌症中均可观察到凝血酶活性升高,这可能是由于血清中 PAD4 瓜氨酸抗凝血酶水平升高所致^[31]。与健康个体的样品相比, PAD4 在胃癌患者的组织和血液样品中均呈现高表达。同时在 SGC-7901 胃癌细胞中发现,使用抗 PADI4-siRNA 抑制 PADI4 表达后,肿瘤细胞的增殖和侵袭会大大降低。此外,经 PADI4-siRNA 处理后,可增加 S 期胃癌细胞数量,减少 G₂/M 期胃癌细胞数量^[32]。另一方面, PAD4 与原发性肝癌的生长以及其他癌症的肝转移有关。有研究表明,原发性肝癌患者的组织和血液样品中的 PAD4 表达水平明显高于健康个体,并且肝癌患者手术后血液样本中 PAD4 的表达下降。

2.2 PAD4 与肿瘤侵袭、迁徙和转移有密切关系

PAD4 还参与肿瘤细胞的转移、侵袭过程。Yuzhalin 等^[33]研究发现, PAD4 介导的细胞外基质瓜氨酸化在大肠癌肝转移的生长中起重要作用。与人的大肠癌病灶和成对的相邻结肠组织相比,在人大肠癌肝转移组织中发现了更高水平的 PAD4 和瓜氨酸化细胞外基质蛋白(如原纤维蛋白 1、emilin-1 和胶原蛋白)。研究人员通过蛋白质组学证明,转移性细胞外基质中 PAD4 的含量是未受累肝组织中 PAD4 含量的 11 倍,并在细胞外基质中未检测到其他肽酰基精氨酸脱亚氨酶。此外,卵巢癌患者中组织和血液样品中 PADI4 表达明显高于健康个体^[34]。

肿瘤和微环境产生癌症胞外染色质网在肿瘤细胞生长、侵袭和迁徙中发挥重要作用, PAD4 可以介导 4T1 细胞中癌症胞外染色质网的形成,并且内源性 PADI4 可以促进乳腺癌向肺转移^[35]。同时,晚期肿瘤患者血清中的 PAD4 可使抗凝血酶瓜氨酸化活性降低,从而使其丧失抑制肿瘤生长、转移和抗血管生成作用。肿瘤相关性血栓的形成同样与

PAD4 密切相关,其形成通常伴随有血浆组蛋白高瓜氨酸化。与肿瘤相关的血栓性微血管病患者血浆中的瓜氨酸化组蛋白水平较健康组明显升高^[36]。

3 PAD4 在急性冠状动脉综合征中的作用

急性冠状动脉综合征是严重影响人类健康的重大疾病,其病理基础包括易损斑块、易损心肌和易损血液。根据尸检结果,易损斑块的病理分型包括破裂斑块、蚀损斑块和钙化结节。其中蚀损斑块的特征是内皮细胞脱落和小血管腔内血栓形成,占有急性冠状动脉综合征的 25%~30%^[37]。PAD4 通过催化细胞外捕获参与蚀损斑块形成,进而参与急性冠状动脉综合征发病过程。细胞外捕获可与中性粒细胞释放的颗粒蛋白结合,从而在动脉粥样硬化、心肌梗死等心血管疾病中发挥重要作用。Wang 等^[38]研究表明,活化的中性粒细胞形成细胞外捕获时期,中性粒细胞表达高水平 PAD4。Stakos 等^[39]研究发现,在 ST 段抬高型急性心肌梗死患者的梗死相关冠状动脉内,参与冠状动脉血栓形成的组织因子的功能需要细胞外捕获结构的完整,暴露于细胞外捕获上的组织因子能够诱导凝血酶的产生,产生的凝血酶可以通过细胞蛋白酶活化受体进一步激活静止的血小板,从而参与血栓形成。因此, PAD4 可能破坏内皮的正常功能,从而成为预防和治疗冠状动脉粥样硬化血栓并发症的新靶点。

研究表明,在转基因小鼠模型中, PAD4 的缺陷导致细胞外捕获的形成减少,从而引起动脉粥样硬化和血栓性并发症的形成^[40]。Liu 等^[41]研究发现,使用脱氧核糖核酸酶 I 降解形成细胞外捕获,这种方法降低了野生型小鼠体内细胞外捕获水平,与未处理的对照组小鼠相比,小鼠体内血管斑块的大小明显减少。Warnatsch 等^[42]研究证明了细胞外捕获参与动脉粥样硬化的作用,他们将载脂蛋白 E 缺陷小鼠与缺乏中性粒细胞弹性蛋白酶和蛋白酶 3 的小鼠杂交以消除细胞外捕获,并给予高脂饮食,主动脉根部横截面积分析显示,两组在高脂饮食治疗 4 周后差异无统计学意义,但在高脂饮食治疗 8 周后,载脂蛋白 E/中性粒细胞弹性蛋白酶/蛋白酶 3 缺陷小鼠与仅缺乏载脂蛋白 E 的对照组小鼠相比,斑块面积减少了 75%。同样,给予高脂饮食喂养的载脂蛋白 E 缺乏小鼠注射脱氧核糖核酸酶 I,小鼠的斑块面积较前减少了 75%。这些实验结果表明,消除斑块部位的细胞外捕获或阻止细胞外捕获形成可能对动脉粥样硬化有预防或治疗作用。Franck 等^[43]

研究表明,造血细胞中的 PAD4 基因缺陷并不能影响动脉粥样硬化早期病变脂纹的形成、减少斑块大小或减少炎症反应。他们将 8 周龄的 *Ldlr*^{-/-} 小鼠接受致死性照射,与野生型或 PAD4^{-/-} 小鼠骨髓重组,给予高脂饮食 5 或 10 周后,两组小鼠血液胆固醇水平相似,两组小鼠主动脉的脂质含量比较差异无统计学意义。

4 PAD4 抑制剂的研究进展

目前,临床上用于类风湿关节炎的治疗已从水杨酸酯发展到非甾体类抗炎药、皮质类固醇和可缓解疾病的抗风湿药^[44]。可缓解疾病的抗风湿药如甲氨蝶呤单独或与生物制剂合用,已显示出可以改善绝大多数类风湿关节炎患者的预后^[45-46]。尽管上述治疗性干预措施可有效缓解疾病^[47],但耐受性较差,不能实现无毒缓解,许多患者甚至在治疗期间仍表现出持续的疾病状态^[46]。而 PAD4 的活性与各种疾病具有关联性,PAD4 特异性抑制剂具有治疗类风湿关节炎和其他疾病的临床效用。

4.1 以 amidine 为导向的化合物

已经发现了一些生物活性化合物,这些化合物主要作用是以不可逆转的方式来增加化合物的活性,具有特异选择性和生物利用度靶向 PAD4。最早发现的有效生物活性化合物之一是 F-amidine,它是基于抑制 PAD4 的 *N*- α -苯甲酰精氨酸酰胺结构同源设计的^[48-49]。F-amidine 通过修饰活性位点半胱氨酸(Cys645)不可逆地抑制 PAD4^[50]。有研究报道,在哺乳动物中进行双杂交实验评估 F-amidine 的活性,随着化合物的浓度增加,F-amidine 可通过 PAD4 抑制细胞之间相互作用^[49]。

在 F-amidine 成功的基础上,通过在卤代乙脒部分中用氯或氢取代氟来开发了一系列化合物。用氢原子替换氟代头部会导致其活性减弱,并且化合物 H-amidine 证明是可逆的竞争性抑制剂。有研究报道,用氯基取代可将抑制活性提高 3~4 倍^[50]。

Cl-amidine 是目前 PAD4 的最有效的抑制剂,并且在自身免疫性疾病和多种临床前模型中显示出较强的抗癌潜力。在类风湿关节炎的小鼠模型中,Cl-amidine 以剂量相关性方式降低疾病的严重性^[51],在关节炎和关节损伤模型小鼠中,Cl-amidine 可以降低疾病的严重程度^[52]。在乳腺癌模型中,Cl-amidine 可以通过影响 PAD 介导的 MMP2 和 MMP9 表达来降低肿瘤的生长和转移,并通过增加 caspase-3 激活来诱导异种移植小鼠体内的凋亡^[53]。

此外,Cl-amidine 还可以调节与肿瘤进展有关的细胞周期相关基因(p21、GADD45 α 和 Ki67)表达,从而诱导细胞周期 S 期阻滞^[54]。Cl-amidine 还可以通过抑制细胞微泡释放使 PC3 前列腺癌细胞对甲氨蝶呤敏感^[55]。同时,Cl-amidine 可以通过特异性抑制 PAD 活性降低促癌基因 miRNA-21 和 miRNA210 的水平,并增加抑癌基因 miRNA-126 的水平,共同抵抗胶质母细胞侵袭。而经 Cl-amidine 治疗后,胶质母细胞中组蛋白 H3 的瓜氨酸化也显著减少^[56]。上述结果证明了 Cl-amidine 在自身免疫性疾病和癌症中的具有较好的潜力。

尽管 Cl-amidine 已在细胞和动物研究取得较好的疗效,但其有一定的局限性,如在 PAD 之间缺乏选择性,体内半衰期短,活性相对较低以及生物利用度有限。因此,PAD1、PAD2、PAD3 和 PAD4 与 F-和 Cl-amidine 之间的构效关系研究将有利于开发出更好的第二代 PAD4 抑制剂。它由邻 O-F-amidine 和邻 O-Cl-amidine 组成,母体化合物的苯甲酰基环上带有邻羧酸盐,并表现出更好的特异性和活性。O-F-amidine 的活性是 F-amidine 的 65 倍,并且优先抑制 PAD1;而 O-Cl-amidine 特异地抑制 PAD1 和 PAD4^[57]。另一项研究发现 Cl-amidine 衍生物是具有 C 端苯并咪唑和 N 端联苯部分的 BB-Cl-amidine,该化合物疏水性的提高改善了其细胞活性、生物利用度和体内半衰期。在关节炎小鼠模型中,BB-Cl-amidine 可改善免疫介导的关节炎症^[58]。体外研究证明,BB-Cl-amidine 的细胞活性是母体化合物的约 20 倍($EC_{50}=8.8 \mu\text{mol/L}$,而 Cl-amidine 的 $EC_{50}>200 \mu\text{mol/L}$),体内半衰期明显更长^[59]。BB-Cl-amidine 在胶原诱导的关节炎模型中还表现出对 PAD2 增强的活性,这是因为与 Cl-amidine 相比,其改善的药动学和相对于 PAD2 的相对活性^[60]。Cl-amidine 的类似物 YW3-56 具有更高的生物利用度^[61]。YW3-56 不仅可以调控细胞周期和细胞凋亡,还可以诱导细胞自噬。而且在类风湿关节炎中激活自噬,使用 YW3-56 可以有效治疗类风湿关节炎关节损伤^[62]。

4.2 PAD4 靶向肿瘤抑制剂 YW3-56

鉴于 PAD4 在肿瘤发生、发展中的作用,更多靶向 PAD4 用于治疗肿瘤的抑制剂被发现。目前关注较多的抑制剂是 F-amidine、Cl-amidine (浓度为 $150\sim 200 \mu\text{mol/L}$)^[63],它们是苯甲酰基-精氨酸衍生的 PAD4 抑制剂。这些抑制剂在多种肿瘤细胞系

(如 U2OS、HL-60、HT-29 和 MCF-7 细胞系) 中显示出低细胞毒性^[47,60, 63-64]。因此, 在 Cl-amidine 基础上研发出更具有活性且生物利用度较高的新型抑制剂 YW3-56。YW3-56 靶向 PAD4 的选择性远高于 Cl-amidine。YW3-56 具有较高的细胞通透性, 可以显著抑制癌细胞的生长, 并在肉瘤小鼠模型中显著抑制减小肿瘤的体积。机制研究表明, YW3-56 通过抑制 PAD4 激活 p53 靶基因 (如 SESN2), 进而抑制 mTOR 信号传导途径, 从而影响自噬并抑制癌细胞增殖^[61]。

4.3 以 GSK 为导向的化合物

此外, GSK199 是 PAD4 的可逆的选择性抑制剂, 可与低钙 (2 mmol/L) 形式结合^[65]。GSK199 抑制 PAD4 目标蛋白的瓜氨酸化并减少细胞外捕获的形成^[65-66]。GSK484 以可逆的方式有效结合低钙 (2 mmol/L) 形式的 PAD4, 并与底物特异性竞争。在细胞实验和重组酶活性研究中表明 GSK484 对 PAD4 的选择性高于 PAD1-3。它是原发性中性粒细胞中细胞瓜氨酸化的抑制剂, 并且还显示出其在小鼠和人中性粒细胞中均抑制细胞外捕获形成的能力^[67]。GSK484 在小鼠和大鼠中表现出良好的药理学特征, 具有低中度清除率、良好的分布体积和半衰期, 可用作潜在的体内治疗药物^[68]。

4.4 PAD4 为导向的小分子抑制剂

除了上述的酶抑制剂外, 小分子抑制剂对 PAD4 活性有较好的抑制作用。Tjin 等^[69]利用吡啶取代吡啶杂环核心, 并用氯取代基在吡啶环周围进行衍生化反应, 从而鉴定出三氯吡啶抑制剂 24 具有较高的抑制活性, 并且对 PAD4 的选择性优于其他 3 种 PAD 同工酶。此外, Guo 等^[68]将 GSK484 的吡啶环上的 N-环丙基甲基替换为 N-苄基合成 PAD4 的抑制剂, 发现其对 4T1 细胞的杀伤效力提高了 5 倍以上。

5 结语与展望

近年来, 越来越多研究表明, PAD4 对蛋白质的瓜氨酸化在自身免疫性疾病和癌症中起着至关重要的作用。PAD4 介导的翻译后瓜氨酸化过程影响与自身免疫性疾病和癌症有关的基因和靶点蛋白。此外, PAD4 可能是自身免疫性疾病和癌症预后的生物标志物。尽管 PAD4 比其他 PAD 同工酶受到更多关注, 但仍需要深入探索 PAD4 的机制, 为自身免疫性疾病和癌症的诊断和治疗提供新的见解。同时, 使用 PAD4 抑制剂治疗自身免疫性疾病

和癌症将会是未来的研究热点, PAD4 将成为开发新一代治疗自身免疫性疾病和癌症药物的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Witalison E E, Thompson P R, Hofseth L J. Protein arginine deiminases and associated citrullination: physiological functions and diseases associated with dysregulation [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(7): 700-710.
- [2] Knuckley B, Causey C P, Jones J E, et al. Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3 [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(23): 4852-4863.
- [3] Nagar M, Tilvawala R, Thompson P R. Thioredoxin modulates protein arginine deiminase 4 (PAD4)-catalyzed citrullination [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 244.
- [4] Jones J E, Causey C P, Knuckley B, et al. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2009, 12(5): 616-627.
- [5] Bello A M, Wasilewski E, Wei L, et al. Interrogation of the active sites of protein arginine deiminases (PAD1, -2, and -4) using designer probes [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(2): 249-253.
- [6] Hashemi M, Zakeri Z, Taheri H, et al. Association between peptidylarginine deiminase type 4 rs1748033 polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis in Zahedan, Southeast Iran [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2015, 14(3): 255-260.
- [7] Luo Y, Arita K, Bhatia M. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(39): 11727-11736.
- [8] Brahmajosyula M, Miyake M. Localization and expression of peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) in mammalian oocytes and preimplantation embryos [J]. *Zygote*, 2013, 21(4): 314-324.
- [9] Alghamdi M, Al Ghamdi K A, Khan R H, et al. An interplay of structure and intrinsic disorder in the functionality of peptidylarginine deiminases, a family of key autoimmunity-related enzymes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(23): 4635-4662.
- [10] Raijmakers R, Zendman A J, Egberts W V, et al. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases *in vitro* [J]. *J Mol Biol*, 2007, 367(4): 1118-1129.
- [11] Arita K, Shimizu T, Hashimoto H, et al. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine

- deiminase 4 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(14): 5291-5296.
- [12] Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, *et al.* Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(8): 777-783.
- [13] Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A synopsis [J]. *Am J Manag Care*, 2014, 20(7 Suppl): S128-S135.
- [14] Suzuki A, Yamada R, Chang X, *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis [J]. *Nat Genet*, 2003, 34(4): 395-402.
- [15] Romero V, Darrah E, Andrade F. Generation of distinct patterns of rheumatoid arthritis autoantigens by peptidylarginine deiminase types 2 and 4 during perforin-induced cell damage [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(6): 912-918.
- [16] Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, *et al.* Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(11): 3541-3553.
- [17] Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A, *et al.* Genetic studies of rheumatoid arthritis [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015, 91(8): 410-422.
- [18] Carubbi F, Alunno A, Gerli R, *et al.* Post-translational modifications of proteins: Novel insights in the autoimmune response in rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 657.
- [19] 吕卓, 李娟, 冯知涛, 等. RA 患者外周血 HLA-DR4、PAD4、STAT4 mRNA 表达及与疾病活动的相关性 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(6): 1349-1353.
- [20] Zhao J, Zhao Y, He J, *et al.* Prevalence and significance of anti-peptidylarginine deiminase 4 antibodies in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(6): 969-974.
- [21] Wigerblad G, Kaplan M J. NETs spread ever wider in rheumatic diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(2): 73-74.
- [22] Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? [J]. *Front Immunol*, 2013, 3: 428.
- [23] Zhu H, Luo H, Yan M, *et al.* Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in systemic lupus erythematosus [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(4): 210-218.
- [24] Jonsson M K, Kantyka T, Falkowski K, *et al.* Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) activity in early rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2020, 49(2): 87-95.
- [25] Massarenti L, Enevold C, Damgaard D, *et al.* Peptidylarginine deiminase-4 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2019, 48(2): 133-140.
- [26] Chan V S. Epigenetics in multiple sclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1253: 309-374.
- [27] Koushik S, Joshi N, Nagaraju S, *et al.* PAD4: pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(4): 433-447.
- [28] Reyes-Castillo Z, Muñoz-Valle J F, Llamas-Covarrubias M A. Clinical and immunological aspects of anti-peptidylarginine deiminase type 4 (anti-PAD4) autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(2): 94-102.
- [29] Moscarello M A, Lei H, Mastronardi F G, *et al.* Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(2): 467-478.
- [30] Bradford C M. The role of citrullination of central nervous system proteins in multiple sclerosis [J]. *F*, 2012, 4(2): 13-16.
- [31] Chang X, Han J, Pang L, *et al.* Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 40.
- [32] Xin J, Song X. Role of peptidylarginine deiminase type 4 in gastric cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 3155-3160.
- [33] Yuzhalin A E, Gordon W A N, Tognoli M L, *et al.* Colorectal cancer liver metastatic growth depends on PAD4-driven citrullination of the extracellular matrix [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4783.
- [34] Wang L, Chang X, Yuan G, *et al.* Expression of peptidylarginine deiminase type 4 in ovarian tumors [J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(5): 454-464.
- [35] Shi L, Yao H, Liu Z, *et al.* Endogenous PAD4 in breast cancer cells mediates cancer extracellular chromatin network formation and promotes lung metastasis [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(5): 735-47.
- [36] Demers M, Wagner D D. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(3): 277-283.
- [37] Pasterkamp G, Den R H M, Libby P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(1): 21-29.
- [38] Wang Y, Li M, Stadler S, *et al.* Histone

- hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation [J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(2): 205-213.
- [39] Stakos D A, Kambas K, Konstantinidis T, *et al*. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(22): 1405-1414.
- [40] Van Avondt K, Maegdefessel L, Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(4): 542-552.
- [41] Liu Y, Carmona-Rivera C, Moore E, *et al*. Myeloid-specific deletion of peptidylarginine deiminase 4 mitigates atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1680.
- [42] Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, *et al*. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis [J]. *Science*, 2015, 349(6245): 316-320.
- [43] Franck G, Mawson T L, Folco E J, *et al*. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial injury: Implications for superficial erosion [J]. *Circ Res*, 2018, 123(1): 33-42.
- [44] van de Sande M G H, van Vollenhoven R F. Evolution of clinical trials for rheumatoid arthritis and spondyloarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(4): 340-346.
- [45] Fleischmann R, Landewé R, Smolen J S. Review of head-to-head study designs in rheumatoid arthritis [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2016, 46(3): 279-285.
- [46] Upchurch K S, Kay J. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51 Suppl 6: vi28-vi36.
- [47] Knuckley B, Luo Y, Thompson P R. Profiling protein arginine deiminase 4 (PAD4): a novel screen to identify PAD4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(2): 739-745.
- [48] Kearney P L, Bhatia M, Jones N G, *et al*. Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(31): 10570-10582.
- [49] Luo Y, Knuckley B, Lee Y H, *et al*. A fluoroacetamidine-based inactivator of protein arginine deiminase 4: design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(4): 1092-1093.
- [50] Luo Y, Arita K, Bhatia M, *et al*. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(39): 11727-11736.
- [51] Willis V C, Gizinski A M, Banda N K, *et al*. N- α -benzoyl-N $_5$ -(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol*, 2011, 186(7): 4396-4404.
- [52] Chumanevich A A, Causey C P, Knuckley B A, *et al*. Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6): G929-G938.
- [53] Qin H, Liu X, Li F, *et al*. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling [J]. *Cancer Lett*, 2017, 409: 30-41.
- [54] Mcelwee J L, Mohanan S, Griffith O L, *et al*. Identification of PADI2 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 500.
- [55] Kholia S, Jorfi S, Thompson P R, *et al*. A novel role for peptidylarginine deiminases in microvesicle release reveals therapeutic potential of PAD inhibition in sensitizing prostate cancer cells to chemotherapy [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 26192.
- [56] Uysal-Onganer P, Maclatchy A, Mahmoud R, *et al*. Peptidylarginine deiminase isozyme-specific PAD2, PAD3 and PAD4 inhibitors differentially modulate extracellular vesicle signatures and cell invasion in two glioblastoma multiforme cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1495.
- [57] Causey C P, Jones J E, Slack J L, *et al*. The development of N- α -(2-carboxyl)benzoyl-N(5)-(2-fluoro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide (o-F-amidine) and N- α -(2-carboxyl)benzoyl-N(5)-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide (o-Cl-amidine) as second generation protein arginine deiminase (PAD) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(19): 6919-6935.
- [58] Fuhrmann J, Clancy K W, Thompson P R. Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(11): 5413-5461.
- [59] Knight J S, Subramanian V, O'Dell A A, *et al*. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2199-2206.
- [60] Kawalkowska J, Quirke A, Ghari F, *et al*. Abrogation of collagen-induced arthritis by a peptidyl arginine deiminase inhibitor is associated with modulation of T cell-mediated immune responses [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26430.
- [61] Wang Y, Li P, Wang S, *et al*. Anticancer peptidylarginine

- deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 25941-25953.
- [62] Lin N Y, Beyer C, Giessel A, *et al.* Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(5): 761-768.
- [63] Li P, Yao H, Zhang Z, *et al.* Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4 [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(15): 4745-4758.
- [64] Slack J L, Causey C P, Thompson P R. Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(4): 709-720.
- [65] Lewis H D, Liddle J, Coote J E, *et al.* Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 189-191.
- [66] Hallur G, Reddy P B, Duraiswamy A J, *et al.* LC-ESI-MS/MS determination of GSK-199, A novel reversible PAD4 inhibitor in mice plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice [J]. *Pharm Anal Chem*, 2017, 3(2): 177-192.
- [67] Du M, Yang W, Schmul S, *et al.* Inhibition of peptidyl arginine deiminase-4 protects against myocardial infarction induced cardiac dysfunction [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106055.
- [68] Guo Z, Shi L, Wang B, *et al.* Synthesis of reversible PAD4 inhibitors via copper-catalyzed C-H arylation of benzimidazole [J]. *Sci China Chem*, 2019, 62(5): 592-596.
- [69] Tjin C C, Wissner R F, Jamali H, *et al.* Synthesis and biological evaluation of an indazole-based selective protein arginine deiminase 4 (PAD4) inhibitor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9(10): 1013-1018.

[责任编辑 解学星]