

抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎的基因研究进展

陈沐 陈灵基(综述) 刘奇才 林新华(审校)

基金项目:国家自然科学基金项目(81571613)

作者单位:350122 福州市,福建医科大学研究生教育学院(陈沐)

571199 海口市,海南医学院热带医学与检验医学院(陈灵基)

350005 福州市,福建医科大学附属第一医院检验科(刘奇才)

350108 福州市,福建医科大学药学院(林新华)

通讯作者:刘奇才,E-mail:lqc673673673@163.com

林新华,E-mail:xhl1963@sina.com

【摘要】 抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关性血管炎是一种系统性自身免疫性疾病,主要包括韦格纳肉芽肿、显微镜下多血管炎、变应性肉芽肿病等;靶抗原为丝氨酸蛋白酶 3 和髓过氧化物酶。近年来,随着全基因组测序技术、CRISP-Cas9 等基因编辑技术的迅猛发展,ANCA 相关性血管炎相关的基因相继被发现,特别是近年来胰岛素抵抗相关基因-能量平衡基因、脂联素基因等与血管性疾病关系的部分阐明为 ANCA 相关性血管炎的临床诊断、治疗提供了理论依据。目前发现的 ANCA 相关性血管炎相关基因主要有蛋白酶 3、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 22 型、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、CD226、Fc γ 等,本文对这些基因目前的研究进展做一综述。

【关键词】 抗中性粒细胞胞浆抗体;血管炎;Adropin 蛋白;基因

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.013

抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)相关性血管炎是一种严重的累及中小血管引起的全身多系统器官功能衰竭的自身免疫性疾病。血清中存在针对靶抗原蛋白酶 3 (proteinase 3, PR3) 或髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的自身抗体。该疾病以小血管壁的炎症和纤维素样坏死为主要特征,主要包括韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis, WG)、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)、变应性肉芽肿性血管炎(churg-strauss syndrome, CSS)^[1]。由于 WG、MPA 和 CSS 在病因、临床表征、病理情况及治疗手段方面有许多相似点,故习惯将三者合称为 ANCA 相关性血管炎^[2]。ANCA 是 ANCA 相关性血管炎的特征性血清学标志物之一,其中抗 PR3 可作为 WG 的一个敏感的标志物,而抗 MPO 则为 MPA、CSS 的血清学标志物^[3-5]。

目前对于 ANCA 相关性血管炎相关基因的研究已经越来越多,包括 PR3、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 22 型(protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, PTPN22)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ($\alpha 1$ -antitrypsin, AAT)、

CD226、Fc γ 等基因,其中 PR3、PTPN22、CTLA-4、AAT 目前研究较多,甚至已经有不少学者提出了 PR3-ANCA 和 MPO-ANCA 相关性血管炎是两种独立的疾病,而且他们的易感基因也不尽相同^[6]。现对这些相关基因的研究进展做一综述。

1 PR3

PR3 由 PRTN 基因编码,是一种通常在 WG 中合成的血清蛋白酶,ANCA 靶抗原编码的基因在病毒的发病机制中也起一定的作用,PR3 通常在中性粒细胞表面表达,而且中性粒细胞中 PR3 高或低表达者的比例不受时间、年龄、性别的影响。

PR3 相对分子质量约为 29×10^3 , 是弱阳离子糖蛋白,具有多种生物学活性,其中蛋白水解活性在 ANCA 相关性血管炎中发挥着重要的作用。PR3 可在内皮细胞中表达,并转移到细胞膜,从而与 ANCA 结合导致内皮损伤。血管内皮细胞不仅是 ANCA 相关性血管炎的受损靶细胞,同时也是病理损害积极的参与者。有研究^[2,7]显示经 PR3 刺激的内皮细胞能合成并释放 IL-8,招募炎性细胞在病变部位聚集。同时,PR3 也可增加内皮细胞表面黏附分子-1 的表达,促进中性粒细胞

与内皮细胞的黏附。此外,内皮细胞也可借助其表面的蛋白 C 受体与中性粒细胞上 PR3 的结合而促进这两种细胞之间的相互黏附。

2 PTPN22

PTPN22 现被认为是除了主要组织相容性抗原复合物以外最重要的自身免疫性疾病危险因子。PTPN22 基因位于 1 号染色体短臂(1p13.3-p13.1),编码一种淋巴样特异性磷酸酶(lymphoid-specific phosphatase, LYP)。LYP 的磷酸酶活性能使 T 细胞中已磷酸化(有活性)的酪氨酸激酶 Lck 的 394 位酪氨酸去磷酸化从而负性调节 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)信号转导。除了 Lck 以外,LYP 还能结合一些其他的参与 TCR 信号转导的分子,包括 Zap70、CD3 ϵ 和 TCR ζ 链并使之去磷酸化(无活性)从而下调 TCR 信号转导^[8]。另外,LYP 还通过 C 端一个富含脯氨酸的模序与酪氨酸激酶 Csk (C-terminus src kinase, Csk)的 SH3 结构域结合。Csk 能使 Lck 的 505 位酪氨酸磷酸化从而抑制 Lck 的活性。因此,Csk 与 LYP 结合后能使 Lck 丧失激酶活性。PTPN22 基因 1858 C>T (rs2476601) 单核苷酸多态使第 620 位密码子编码的氨基酸从精氨酸变为色氨酸,导致 LYP 和 Csk 的结合部分或完全被破坏,并且增加了 LYP 的内在酶活性,从而使得一些重要的信号分子的磷酸化程度降低和相关的 TCR 信号转导下调,失去了对 T 细胞活化的抑制作用。大量研究^[9]表明这种变异与多种自身免疫性疾病如类风湿关节炎、青少年类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、I 型糖尿病、Grave's 病等的发病相关。

3 CTLA-4

CTLA-4 又称 CD152,属于免疫球蛋白超家族成员。位于 2 号染色体长臂 33,共有 6175 个碱基。CTLA-4 基因编码的蛋白质含有 223 个氨基酸。研究^[10]表明,CTLA-4 基因编码的蛋白质有两种形式,一种是膜性的 CTLA-4 蛋白;另一种是可溶性的 CTLA-4 蛋白,是一种单体蛋白质。活化的 T 细胞低表达可溶性的 CTLA-4 蛋白,但是能高表达膜性的 CTLA-4 蛋白。CTLA-4 免疫球蛋白是一种可溶性的嵌合蛋白质,包含了人类 CTLA-4 的胞外段和人类 IgG1Fc 受体的一部分。其与抗原递呈细胞上的 B7-1 和 B7-2 分子结合,因而阻断了 CD28 介导的激活 T 细胞的共刺激信号,使 T 细胞处于失能状态,从而参与免疫反应的负调节。CTLA-4 通过增强 T 细胞的运动性,阻断 T 细胞和抗原递呈细胞稳定耦联的信号,减少 T 细胞和抗原递呈细胞的接触时间,同时也就减少了细胞因子的产生和增殖,来调节 T 细胞的活化和保持对自身组织的免疫耐受。

T 细胞的过度活化在 ANCA 相关性血管炎的发病机制中有着重要的作用,而抑制 T 细胞活化的共刺激分子 PD-1 和 CTLA-4 也是近年来 ANCA 相关性血管炎研究的热点。国内外的研究^[11,12]结果表明,CTLA-4 基因在 ANCA 相关性血管

炎的发病中起着重要的作用。研究^[12]表明,CTLA-4 的 +49G 等位基因在 ANCA 相关性血管炎患者中出现的频率与对照组相比差异有统计学意义。与对照组相比,PD-1 基因的 5T 等位基因与 CTLA-4+49AA 纯合子基因型一起出现在 ANCA 相关性血管炎患者中的频率与对照组相比是比较低的。这些遗传多态性可能使 CTLA-4 的蛋白表达量减少,从而造成 T 细胞过度反应性,可能导致 T 细胞对血管的损害。有报道^[12]指出 CTLA-4 第三外显子 3' 非翻译区微卫星多态性(AT)_n 的短链等位基因是维持 CTLA-4 正常表达水平以及平衡 T 细胞激活和抑制的关键因素。

4 AAT

AAT 是血清中的一种含有碳水化合物的单链糖蛋白,其相对分子质量为 52×10^3 。可对抗多种以丝氨酸为活动中心的蛋白酶,如胰凝乳酶、组织蛋白酶、纤溶酶和凝血酶等,尤其是可以对抗白细胞弹性蛋白酶。AAT 是蛋白酶的抑制因子,同时也是一种免疫调节因子,可调节淋巴细胞的增殖、细胞毒性及迁移,并调节嗜中性粒细胞、单核细胞的功能^[13]。

同时,AAT 是 PR3、弹性蛋白酶重要的天然抑制物。其编码基因呈高度多态性,称为蛋白酶抑制位点(Pi)。根据血液中 AAT 水平,其表型分为正常型(M)和缺失型(Z,S)。Pi-SS 型或 Pi-MS 型 AAT 水平降低不明显,而同源性 Pi-ZZ 型为重度 AAT 水平缺陷。AAT 缺陷者血浆 PR3 抗原水平持续升高,诱导抗 PR3 抗体产生机率增高,未能被抑制的 PR3 所具有的蛋白溶酶活性可造成组织严重损伤。相关研究^[14]显示 AAT 水平缺陷可能与 ANCA 相关性血管炎相关。

5 CD226

CD226 基因定位于染色体 18q22-23,编码 65kDa 跨膜糖蛋白,包括含有 2 个免疫球蛋白 V 样结构域的胞膜外区、1 个跨膜区以及含有酪氨酸和丝氨酸残基潜在磷酸化位点的胞质区。CD226 表达于多种血细胞上,包括 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、单核细胞、粒细胞和血小板。猿、猴和小鼠的 CD226 基因在人、猿、猴以及小鼠体内的高度保守性,充分表明该分子在进化过程中有着重要的生物学功能。CD226 可调节血小板的活化与聚集以及血小板和巨核细胞在血管内皮细胞上的黏附。相关研究^[15]发现,白种人患 ANCA 相关性血管炎的概率与 CD226 中的 rs763361 位点有关,但具体机制目前还是不得而知。

6 Fc γ

Fc γ 受体家族主要表达于多种免疫细胞表面,是联系体液免疫系统和细胞免疫系统的枢纽,其主要成员有 Fc γ R I (CD64)、Fc γ R II a (CD32A)、Fc γ R II b (CD32B)、Fc γ III a (CD16A)、Fc γ III b (CD16B)。Fc γ Rs 主要通过 IgG 结合而发挥激活细胞、进而引起细胞吞噬功能改变、细胞裂解、脱颗粒及炎症因子释放等作用。

在 ANCA 相关性血管炎发病机制中,中性粒细胞上的 FcγR II a (CD32A) 发挥重要作用。FcγR II a 可能通过结合 ANCA 的 Fc 段激发中性粒细胞及单核细胞的炎症反应,进而导致细胞功能改变(细胞脱颗粒,黏附等),并释放一些炎症分子(氧自由基,炎症因子等),引起小血管炎症性坏死,是 ANCA 相关性血管炎的重要致病机制^[16,17]。

7 Adropin

Adropin 是 2008 年发现的一种新的内源性生物活性物质,是一种分泌型蛋白,由能量平衡相关基因(Enho)编码,表达在肝、脑、冠状动脉中,在维持能量平衡、脂肪代谢及胰岛素反应性中发挥重要作用。由于血管功能与胰岛素敏感性密切相关,Lovren 等^[18]推测 Adropin 可能直接作用于血管内皮细胞。他们首次证实,除了代谢作用外,Adropin 还通过激活 RISK 信号转导通路直接上调内皮型一氧化氮合酶表达,发挥保护血管内皮的非代谢作用。

Adropin 能有效促进脐静脉内皮细胞与冠状动脉内皮细胞的增殖、迁移以及微血管样结构的形成,降低由肿瘤坏死因子 α 诱导的内皮细胞凋亡。进一步研究^[19]发现,Adropin 能够激活 PI3K-Akt 通路,增加 Akt 的磷酸化,上调内皮一氧化氮合酶的表达,增加一氧化氮的合成,起血管保护作用。内皮的激活及损伤增加了血管渗透性及炎症细胞的聚集。由受损内皮释放的细胞黏附分子通过激活炎症细胞加剧组织破坏。浸润细胞特别是中性粒细胞通过分泌蛋白酶、产生活性氧、堵塞微血管床等直接对上皮细胞产生毒性作用,参与 ANCA 相关性血管炎的发病机制。

8 结论

尽管关于 ANCA 相关性血管炎基因的研究很多,也发现了很多相关的基因,但有些问题目前还无法解决。例如我们知道 ENHO 基因编码 Adropin 蛋白来保护内皮细胞,而内皮细胞的数量和 ANCA 相关性血管炎密切相关,过低的内皮细胞数量甚至会导致该病的复发,但是 Adropin 蛋白和内皮细胞间作用机制目前尚不清楚,有待进一步研究。目前,关于 ANCA 相关性血管炎相关基因的研究大多还处于对单一基因的研究阶段,而 ANCA 相关性血管炎的发生与多个基因相关,机体作为一个整体,基因之间也会发生一定的作用,因此开展多基因协同研究很有必要。ANCA 相关性血管炎与遗传因素,环境因素,补体旁路途径等有关,目前这方面的研究还比较少,因此在这方面进行研究有望取得新的突破。

9 参考文献

- 1 吴子燕,吴庆军,徐涓娟,等. HLA-DPB1 及 PRTN3 基因和 ANCA 相关性小血管炎的相关性分析. 标记免疫分析与临床,2014,21: 709-714.
- 2 张蜀澜,李永哲,李磊,等. 联合检测炎症性肠病患者抗酿酒酵母细胞抗体和抗中性粒细胞抗体的临床意义. 中华检验医学杂志,

- 2008, 31:1142-1146.
- 3 陈旻. 原发性小血管炎发病机制研究进展. 中华肾病研究电子杂志, 2014, 3: 297-303.
- 4 张秀琴, 胡朝军. 480 例血管炎 PR3、MPO 的阳性率观察. 现代诊断与治疗, 2013, 23: 2195-2196.
- 5 薛超, 罗佐杰, 廖蕴华, 等. 基于家庭的原发 ANCA 相关性小血管炎与 TGFβ1-509C/T 及 TCRCα-575A/G 的相关性. 中华检验医学杂志, 2011, 34: 164-169.
- 6 Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. N Engl J Med. 2012, 367: 214-223.
- 7 孙艳艳, 胡朝军, 康熙雄, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体 IIF 法筛查与特异性抗体检测的相互关系及临床意义. 中华检验医学杂志, 2013, 36: 761-763.
- 8 郑瑞芝, 李蓉, 张素华. PTPN22 基因多态性与自身免疫性内分泌疾病. 国际内分泌代谢杂志, 2007, 27: 89-91.
- 9 Cao Y, Liu K, Tian Z, et al. PTPN22 R620W polymorphism and ANCA disease risk in white populations: a meta analysis. J Rheumatol. 2015, 42: 292-299.
- 10 卜昆鹏, 薛超. CTLA-4 基因在自身免疫性疾病中的研究进展. 医学综述, 2011, 19: 2917-2920.
- 11 于志云, 张进安, 买尔哈巴, 等. PTPN22 基因多态性与自身免疫甲状腺病的相关性. 细胞与分子免疫杂志, 2008, 24: 804-807.
- 12 Adriana O, Juan P, Lu T, et al. A single-chain variable fragment intrabody prevents intracellular polymerization of Z α1-antitrypsin while allowing its antiprotease activity. FASEB J, 2015, 29: 2667-2678.
- 13 Stoller JK, Aboussouan LS. A review of α1-antitrypsin deficiency. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185: 246-259.
- 14 Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. Lancet Oncol, 2004, 5: 182-190.
- 15 刘蓉蓉, 金伯泉. PTA1/CD226 亚家族的研究进展. 细胞与分子免疫杂志, 2009, 25: 665-667.
- 16 魏丹丹, 林旭红, 白春洋. FcγRIIIa 及相关炎症分子在 ANCA 相关性血管炎中的意义. 现代预防医学, 2014, 41: 4184-4196.
- 17 Tse WY, Nash GB, Hewins P, et al. ANCA-induced neutrophil F-actin polymerization: implications for microvascular inflammation. Kidney Int, 2005, 67: 130-139.
- 18 Lovren F, Pan Y, Quan A, et al. Adropin is a novel regulator of endothelial function. Circulation, 2010, 122: S185-S192.
- 19 Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J Physiol Pharmacol, 2002, 53: 503-514.

(收稿日期: 2015-11-05)

(本文编辑: 张志成)