

MPO-ANCA 相关性血管炎中 抗溶酶体相关膜蛋白-2 抗体的作用初探

桂雅迪, 帅宗文, 胡子盈, 张铭明, 武琳琳, 陈珊宇

摘要 目的 初步探讨抗溶酶体相关膜蛋白-2 抗体(LAMP-2A)在髓过氧化物酶抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎(MPO-AAV)中的存在及意义。方法 采用ELISA法分别检测入选者周围血的LAMP-2A、髓过氧化物酶抗中性粒细胞胞质抗体(MPO-ANCA)、溶酶体相关膜蛋白-2(LAMP-2)、髓过氧化物酶(MPO)及活化补体C5a水平,比较LAMP-2A阳性与阴性患者间临床资料及上述指标间的差别,并分析其相关性。结果 MPO-AAV患者中LAMP-2A的阳性率为48.44%,阳性率在有无肾、肺损害患者中差异无统计学意义;病例组LAMP-2水平显著高于对照组($P < 0.001$);LAMP-2A阳性患者C5a、MPO及LAMP-2水平显著高于阴性患者($P < 0.01$),并且LAMP-2A分别与C5a、MPO及LAMP-2水平呈显著正相关性($r_s = 0.056, 0.525, 0.723, P < 0.001$),与MPO-ANCA及BVAS无明显相关性。结论 MPO-AAV中自身抗体LAMP-2A常见,其独立于自身抗体MPO-ANCA,可能通过促进补体旁路激活、结合升高的自身抗原(LAMP-2)等途径影响MPO-AAV的临床损害,更确切的作用和意义有待进一步探讨。

关键词 ANCA相关性血管炎;髓过氧化物酶;抗溶酶体相关膜蛋白-2抗体;溶酶体相关膜蛋白-2;补体激活;致病机制中图分类号 R 593.27

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1196-04

我国AAV主要以抗髓过氧化物酶中性粒细胞胞质抗体(myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody, MPO-ANCA)阳性为特征的MPO-ANCA相关性血管炎(MPO-ANCA associated vasculitis, MPO-AAV)为主,临床并不少见,其病情多进展迅速,常累及多系统,误诊率及病死率高^[1]。目前认为MPO-ANCA是MPO-AAV的致病性抗体,但至今尚没有成功使用MPO或MPO-ANCA诱导AAV肺损害的动物模型,且有研究^[2]显示,患者MPO-ANCA

的水平与伯明翰血管炎活动度评分(Birmingham vasculitis activity score, BVAS)间并无肯定的相关性,推测MPO-AAV患者体内可能有其他因素参与其发病和临床损害。Kain et al^[3]首先在AAV肾炎患者中发现抗溶酶体相关膜蛋白-2抗体(anti-lysosome-associated membrane protein-2 antibodies, LAMP-2A),阳性率超过80%,并成功建立了AAV肾脏损害的动物模型^[4]。但研究^[5]显示仅21%的AAV患者LAMP-2A阳性,且未发现LAMP-2A在大鼠肾小球沉积及LAMP-2A导致大鼠肾小球肾炎的发生。因此,LAMP-2A在AAV中的作用目前尚存在争议。至目前尚未见LAMP-2A在MPO-AAV中的研究报道,该研究初步探讨MPO-AAV患者中LAMP-2A的存在情况以及其与MPO-ANCA、补体旁路激活及MPO-AAV活动的关系,从更广泛的角度初步探讨MPO-AAV的临床发病和损害机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取安徽医科大学第一附属医院2012年1月~2015年3月住院AAV患者128例。首先间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)筛检每例患者p-ANCA(+),再用ELISA法定量检测MPO-ANCA水平。患者临床表现均符合美国风湿病学院GPA和EGPA的分类标准及2012年Chapel Hill共识会议(Chapel Hill Consensus Conference, CHCC)关于MPA、GPA或EGPA的分类标准^[6]。为避免PR3-ANCA及ANA对研究的影响,排除PR3-ANCA(+)或ANA(+)的患者,并排除确诊为其他结缔组织病者。128例患者(病例组)中,男:女=51:77,年龄18~90(63.27±15.14)岁,病程2(0.5,60)个月,均为初诊未治疗的MPO-AAV患者,其中MPA 125例,GPA 2例,EGPA 1例,病情均处于活动期,BVAS 2~29(16.26±6.91)分。另于我院体检中心随机选择30例健康人作为正常对照组,男:女=12:18,年龄47~79(60.73±8.76)岁。收集每例患者的详细临床资料,采用BVAS评估病情活动性,采集周围静脉血并分离血清于-80

2016-05-04 接收

基金项目:中华医学会临床医学科研专项资金项目(编号:08010290107)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科,合肥 230022

作者简介:桂雅迪,女,硕士研究生;

帅宗文,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

shuaizongwen@medmail.com.cn

℃冻存。本研究方案通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 ACNA 及 ANA 检测 以酒精固定的人中性粒细胞和 Hep-2 细胞为底物(欧蒙医学实验诊断股份有限公司试剂盒),IF 法检分别筛检外周血 AN-CA 和 ANA,筛选仅 p-ANCA 阳性的患者,剔除 c-ANCA 或 ANA 阳性者。

1.2.2 MPO-ANCA 检测 采用 ELISA 方法定量检测患者血清 MPO-ACNA 水平。96 孔酶标板中每孔包被 MPO 抗原(美国 Sigma 公司) $2 \mu\text{g}$, $1:100$ 稀释的患者或正常对照血清为一抗,抗碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP) 标记的羊抗人 IgG(美国 Sigma 公司) 经 $1:5000$ 稀释为二抗,其余实验步骤同常规 ELISA。取正常对照组吸光度(absorbance, A) 值的 $\bar{x} + 2s$ 为正常值上限,高于正常值上限为阳性,除外 ELISA 检测 MPO-ANCA 阴性患者。

1.2.3 LAMP-2A、LAMP-2、C5a、MPO 检测 采用 ELISA 方法(美国 TSZ 公司试剂盒)按照各试剂盒说明书操作步骤检测患者及正常对照组外周血 LAMP-2A、LAMP-2、C5a、MPO 水平。LAMP-2A 的检测和结果判定方法同 MPO-ANCA,取正常对照组所测指标 A 值的 $\bar{x} + 2s$ 为正常值上限,高于正常上限值为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组样本间比较采用经 Welch 校正的非配对 t 检验。计数资料用四分位数表示,2 组样本间比较采用 χ^2 及秩和检验分析。相关分析采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 病例组血清 LAMP-2A 的阳性率及 LAMP-2

水平变化 病例组与健康对照组间性别构成 ($\chi^2 = 0.000, P = 0.987$) 及年龄比较 ($t = 1.218, P = 0.227$) 差异无统计学意义。以健康对照组 LAMP-2A 的 ELISA 检测 A 值的 $\bar{x} + 2s$ 为正常值上限,检测病例组 LAMP-2A 的阳性率为 48.44% (62/128)。128 例患者中 70.31% (90/128) 合并有肾损害,67.19% (86/128) 合并有肺损害,有、无肺/肾损害患者间 LAMP-2A 阳性率比较见表 1,结果显示差异无统计学意义。病例组血清 LAMP-2 水平显著高于正常对照组,差异有统计学意义 [$0.142 (0.102, 0.238)$ vs $0.082 (0.063, 0.106)$], $Z = -5.112, P < 0.001$]。

表 1 有、无肾/肺损害患者中 LAMP-2A 的阳性率比较(n)

项目	LAMP-2A		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
肾损害				
有	44	46	0.025	0.875
无	18	20		
肺损害				
有	43	43	0.256	0.613
无	19	23		

2.2 LAMP-2A 阳性与阴性患者间部分临床指标的比较 将 62 例 LAMP-2A 阳性与 66 例阴性患者各设为一组,比较 2 组间部分临床指标,显示两组间性别构成、年龄、病程、BVAS 及 MPO-ANCA 水平比较差异无统计学意义,但 2 组间血清 C5a、MPO 及 LAMP-2 水平比较差异有统计学意义, LAMP-2A 阳性组显著高于阴性组,见表 2。

2.3 LAMP-2A 与部分临床指标的相关性分析 将 62 例 LAMP-2A 阳性患者的 LAMP-2A 水平分别与 MPO-ANCA、MPO、C5a 及 LAMP-2 及 BVAS 作相关分析,显示 LAMP-2A 分别与 MPO、C5a 及 LAMP-2

表 2 LAMP-2A 阳性与阴性患者间临床资料及观察指标的比较

项目	LAMP-2A		统计值	P 值
	阳性(n=62)	阴性(n=66)		
性别(n)				
男	29	22	$\chi^2 = 2.410$	0.121
女	33	44		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	65.89 ± 12.14	61.89 ± 15.74	$t = 1.006$	0.317
病程[月, $M(P_{25}, P_{75})$]	$2.5(0.50, 60.00)$	$2(0.43, 76.20)$	$z = -0.601$	0.548
BVAS(分, $\bar{x} \pm s$)	15.73 ± 7.70	15.75 ± 6.40	$t = -0.641$	0.402
MPO-ANCA($\bar{x} \pm s$)	0.53 ± 0.30	0.44 ± 0.20	$t = -1.421$	0.163
C5a(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	565.66 ± 504.72	369.98 ± 134.05	$t = -2.764$	<0.01
MPO(IU/L, $\bar{x} \pm s$)	908.49 ± 686.52	460.89 ± 208.14	$t = -3.506$	<0.001
LAMP-2($\bar{x} \pm s$)	0.328 ± 0.298	0.128 ± 0.060	$t = -5.181$	<0.001

呈显著正相关性 ($r_s = 0.525, 0.056, 0.723, P < 0.001$)。与 MPO-ANCA 及 BVAS 无明显相关性 ($r_s = -0.209, P = 0.285; r_s = -0.081, P = 0.530$)。

3 讨论

Kain et al^[3] 最早在 AAV 患者中发现抗 LAMP-2 抗体的阳性率是 87%。随后的两次研究中,该抗体的阳性率均在 80% 以上^[4,7]。然而,Roth et al^[5] 在 AAV 患者中测得该抗体的阳性率仅为 21%。本研究显示 MPO-AAV 患者中 LAMP-2A 的阳性率为 48.44%。除种族差异外,分析此阳性率的差异可能与 AAV 疾病的构成及治疗的影响有关。本研究选择的病例符合中国 AAV 以 MPO-ANCA 阳性 MPO-AAV 为主的特点,为除外治疗对观察指标的可能影响,入选病例均为未经治疗的初诊病例,而 Kain et al^[3-4,7] 选择的病例包括 MPO-AAV 和 PR3-AAV,均为经病理证实的 ANCA 相关性寡免疫复合物型局灶性坏死性肾小球肾炎 (pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis, FNGN),且病情处于活动期,部分患者经免疫抑制剂治疗病情缓解后 LAMP-2A 消失,认为该抗体与疾病活动度相关。Roth et al^[5] 选择的 AAV 病例也经病理证实为寡免疫肾小球肾炎,但 44.12% 的入选病例病情处于缓解期 (BVAS=0),结果未显示该抗体与 AAV 病情活动性之间存在显著相关性。上述研究均以探索寡免疫肾小球肾炎发病机制为目的,选择的患者均强调其有肾脏损害,而 AAV 中肾和肺均为最常见的损害器官^[1],本研究比较并发肾、肺损害患者 LAMP-2A 的阳性率,显示差异无统计学意义,提示在 AAV 中, LAMP-2A 并非特异存在于肾损害的患者。

近年来,动物实验^[8]与临床研究^[9-10]显示补体旁路途径激活在 AAV 中发挥重要作用,阻断补体旁路途径激活的 C5a 可以阻止 AAV 的发病^[11-12],前期研究^[13]也显示 MPO-AAV 患者周围血中 C5a 水平明显升高,而升高的 C5a 水平可趋化中性粒细胞,与中性粒细胞 C5a 受体结合,活化并促进中性粒细胞活性,加重炎症反应^[14]。LAMP-2A 如何介导 AAV 的临床损害,目前仍不清楚,本研究显示, LAMP-2A 阳性患者 C5a 水平明显高于阴性患者,且二者水平呈显著正相关性,推测该抗体可能通过某种间接途径参与补体旁路途径的激活,因为补体旁路途径的激活,特异性抗体(除 IgG4 外)并非直接激活补体的主要途径。

Kain et al^[4] 发现人 LAMP-2 蛋白与具有一型纤

毛细胞的革兰阴性菌的黏附素 FimH 有高度同源性,研究^[4]表明 69% LAMP-2A 阳性 FNGN 患者患病之前 12 周内 FimH 细菌感染史,从而认为感染菌的 FimH 与 LAMP-2 间的分子模拟是 LAMP-2A 产生的机制之一,但并非所有 LAMP-2A 阳性患者均感染 FimH 菌。本研究结果显示,比较 LAMP-2 水平, MPO-AAV 患者显著高于健康对照者, LAMP-2A 阳性患者 LAMP-2、MPO 水平明显高于阴性患者,且 LAMP-2A 分别与 LAMP-2 及 MPO 呈显著正相关性,据此推测, MPO-ANCA 通过诱导中性粒细胞脱颗粒及炎症破坏,可能增加血 MPO 及 LAMP-2 水平,其中,血循环中自身抗原 LAMP-2 的升高,一方面有利于其自身抗体 LAMP-2A 的形成,另一方面促进抗原抗体结合相关的免疫炎症反应。

本研究显示有 48.44% 的 MPO-AAV 患者中存在 LAMP-2A,但两种自身抗体 MPO-ANCA 与 LAMP-2 之间并无明显的相关性, Kain et al^[3] 及 Peschel et al^[15] 也发现,部分 ANCA 阴性的 AAV 患者体内存在 LAMP-2A,显示 MPO-ANCA 与 LAMP-2A 二种自身抗体间彼此的独立性。本研究结果显示 LAMP-2A 阳性与阴性患者间性别构成、病程并无差别,提示 LAMP-2A 的出现并非由于性别差异或慢性病程导致。LAMP-2A 阳性与阴性患者间 BVAS 差异无统计学意义,且 LAMP-2A 水平与 BVAS 间也并无相关性,推测影响 MPO-AAV 患者病情活动性应该是多因素的,除 LAMP-2A 外,其他因素尚应包括 MPO-ANCA、补体旁路途径等。

参考文献

- [1] 吕远帆, 帅宗文, 张铭明, 等. 髓过氧化物酶-抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎 132 例临床分析[J]. 中华风湿病学杂志 2014, 18(5): 308-12.
- [2] Mahler M, Radice A, Yang W, et al. Development and performance evaluation of novel chemiluminescence assays for detection of anti-PR3 and anti-MPO antibodies[J]. Clin Chim Acta 2012, 413(7-8): 719-26.
- [3] Kain R, Matsui K, Exner M, et al. A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and related membrane protein in glomerular endothelial cells[J]. J Exp Med, 1995, 181(2): 585-97.
- [4] Kain R, Exner M, Brandes R, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis[J]. Nat Med 2008, 14(10): 1088-96.
- [5] Roth A J, Brown M C, Smith R N, et al. Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic au-

- toantibody glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol* ,2012 ,23 (3) : 545 – 55.
- [6] Jennette J C , Falk R J , Bacon P A , et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides [J]. *Arthritis Rheum* 2013 ,65(1) : 1 – 11.
- [7] Kain R , Tadema H , McKinney E F , et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [J]. *J Am Soc Nephrol* 2012 ,23(3) : 556 – 66.
- [8] Xiao H , Schreiber A , Heeringa P , et al. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies [J]. *Am J Pathol* 2007 ,170(1) : 52 – 64.
- [9] Xing G Q , Chen M , Liu G , et al. Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis [J]. *J Clin Immunol* 2009 ,29(3) : 282 – 91.
- [10] Gou S J , Yuan J , Chen M , et al. Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [J]. *Kidney Int* 2013 ,83(1) : 129 – 37.
- [11] Huugen D , van Esch A , Xiao H , et al. Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice [J]. *Kidney Int* 2007 ,71(7) : 646 – 54.
- [12] Xiao H , Dairaghi D J , Powers J P , et al. C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA GN [J]. *J Am Soc Nephrol* 2014 ,25(2) : 225 – 31.
- [13] 武琳琳, 帅宗文, 胡子盈, 等. 髓过氧化物酶-抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎活动期血清标志物的研究 [J]. *医学研究生学报* 2015 ,28(4) : 406 – 10.
- [14] Hao J , Chen M , Zhao M H. Involvement of protein kinase C in C5a-primed neutrophils for ANCA-mediated activation [J]. *Mol Immunol* 2013 ,54(1) : 68 – 73.
- [15] Peschel A , Basu N , Benharkou A , et al. Autoantibodies to hLAMP-2 in ANCA-negative pauci-immune focal necrotizing GN [J]. *J Am Soc Nephrol* 2014 ,25(3) : 455 – 63.

Investigation on the role of anti-lysosome-associated membrane protein-2 antibody in MPO-ANCA associated vasculitis

Gui Yadi , Shuai Zongwen , Hu Ziyang , et al

(Dept of Rheumatology and Immunology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To preliminarily investigate the prevalence and role of anti-lysosome-associated membrane protein-2 antibody (LAMP-2A) in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis (MPO-AAV). **Methods** The peripheral blood from all patients was taken to detect LAMP-2A ,myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) ,lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) ,myeloperoxidase (MPO) and activated complement C5a by ELISA. These test results and some of other clinical indices were comparatively analyzed between LAMP-2A positive and negative group ,and the relationships between LAMP-2A and either of these induces were also investigated. **Results** The positive rate of LAMP-2A was 48.44% in MPO-AAV patients. This positive rate showed no significant difference between patients with nephric/pulmonary damage and without nephric/pulmonary involvement. The LAMP-2 level in patient group was higher than that in control group ($P < 0.001$). The levels of C5a ,MPO and LAMP-2 in patients with positive LAMP-2A were significantly higher than that in patients without LAMP-2A ($P < 0.01$). Moreover ,LAMP-2A had markedly positive correlations with either of C5a ,MPO and LAMP-2 ($r_s = 0.056 ,0.525 ,0.723$; $P < 0.001$, respectively) while there was no obvious relationship between LAMP-2A and MPO-ANCA or BVAS. **Conclusion** LAMP-2A is a common autoantibody in MPO-AAV and is independent from the other autoantibody MPO-ANCA. It might play an important role in the pathogenesis of clinical lesions in MPO-AAV by some way like promoting the activation of alternative complement pathway , combining with its elevated autoantigen LAMP-2 and so on. Further investigations on the exact roles of LAMP-2A in MPO-AAV are necessary.

Key words antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis; myeloperoxidase; anti-lysosome-associated membrane protein-2 antibody; lysosome-associated membrane protein-2; complement activation; pathogenic mechanism