

颗粒蛋白前体与类风湿关节炎的研究进展

陈佳喜 沈 波

摘 要 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因不明的多系统性自身免疫性疾病, 以关节滑膜炎、血管翳及对称性的关节病变为主要特征。RA 的病理过程与多种免疫细胞、细胞因子及细胞信号通路异常相关。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor - α , TNF - α) 是 RA 病程中最早产生、最重要的细胞因子之一, 可与其他细胞因子共同促进炎症进程。近期研究获得重要发现, 颗粒蛋白前体 (progranulin, PGRN) 可通过结合肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 结合并影响其信号转导, 抑制 TNF - α 诱导的炎性反应, 发挥抗类风湿关节炎的作用。因此, 对 PGRN 的功能和相关细胞信号转导机制的研究将有助于人们对 RA 发病机制的认识, 并为临床治疗提供新的思路。本文将从 PGRN 生物学效应、细胞信号转导机制与 RA 的联系做一综述。

关键词 类风湿关节炎 颗粒蛋白前体

[中图分类号] R392.6 [文献标识码] A

一、TNF 的简介

TNF 是一种具有广泛生物学效应的细胞因子, 按其存在状态分 2 型: mTNF 和 sTNF。膜结合 TNF (membrane - bound TNF, mTNF) 即 II 型跨膜蛋白 TNF, 在金属蛋白酶水解作用下可变为可溶性 TNF (soluble TNF, sTNF)。研究发现, mTNF 与 sTNF 间存在巨大的生物学功能差异: sTNF 是急慢性炎症反应过程中的促炎性因子; 而 mTNF 在急慢性炎症反应过程中能抑制炎症的激活, 已有研究报道 mTNF 能抑制自身免疫性脑脊髓炎、慢性关节炎等自身免疫性疾病^[1,2]。

sTNF 是一种具有广泛生物学效应的细胞因子, 按其结构分为 2 型: TNF - α 和 TNF - β 。TNF 中发挥主要生物学活性的是肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α), 主要由单核 - 吞噬细胞分泌, 其他如淋巴细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等在一定条件下也具有产生和释放 TNF - α 的能力。而肿瘤坏死因子 - β (tumor necrosis factor - β , TNF - β) 主要由活化的自然杀伤细胞和 T 淋巴细胞产生。TNF - α 是一种促炎性细胞因子, 主要调节细胞增殖和细胞凋亡, 有细胞毒和细胞溶解作用, 并与其他细胞因子一起形成复杂的免疫网络影响细胞的生长分化。

二、TNFR 的简介

TNF - α 通过细胞膜上的肿瘤坏死因子受体

(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 发挥生物学活性, TNFR 按相对分子质量分为两类, TNFR1 (CD120a) 和 TNFR2 (CD120b)。它们的胞外区都含有 4 个富含半胱氨酸的结构域 (cysteine - rich - domain, CRD), 每个 CRD 由 6 个半胱氨酸组成, 形成 3 对二硫键, CRD 独特的结构决定 TNF - α 与 TNFR 之间的特异性结合, 与 TNF - α 结合部位是 CRD2 和 CRD3。TNFR1 和 TNFR2 与各自配体结合, 激活特异信号通路, 参与不同的效应。一般来说, TNFR1 表达很广泛, 主要促进炎症反应^[3]。而 TNFR2 主要表达在淋巴细胞上, 能刺激淋巴细胞的激活, 此外它还能抑制 Treg 细胞的激活及其免疫抑制功能^[4]。

三、TNF - TNFR 信号通路简介

TNFR1 主要激活强烈的 NF - κ B 信号通路从而介导胞内死亡区域有效激活 caspases 通路, 而 TNFR2 与 TNFR1 转导的信号通路相反: TNFR2 缺乏死亡区域, 只能通过经典或非经典的 NF - κ B 信号通路激活细胞保护功能, 抑制坏死通路介导细胞的死亡^[5]。因此, TNFR2 能抑制 TNFR1 介导的促炎性反应, 在不同疾病动物模型中发挥神经保护、组织修复功能^[6]。

TNFR2 在抗原激活、增生、生存中均发挥中要作用。最近, TNFR2 信号通路还被证明能选择性促进 Treg 细胞增生及其细胞功能的发挥^[7]。mTNF 致耐受性作用也被归纳为是通过 TNFR2 发挥。因此, 免疫反应中 TNFR1 与 TNFR2 介导不同的重要信号通路提示可通过靶向抗 TNF - α 治疗。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY12H10002)

作者单位: 317000 临海, 浙江省台州医院检验科

通讯作者: 沈波, 主任技师, 电子信箱: shenbkz@aliyun.com

四、PGRN 的生物学效应

近年来研究发现,颗粒蛋白前体 (progranulin, PGRN) 就能与 TNFR2 强烈结合,在类风湿关节炎的治疗过程中起着重要的作用^[8]。人 PGRN 蛋白由染色体 17q21 上 PGRN 基因编码,相对分子质量为 88kDa,含有 7 个半富含丝氨酸的串联重复序列结构域 (CX5 - 6CX5CC X8CCX6CCXDX2HCCPX4CX5 - 6C),该前体被蛋白酶水解后,生成 7.5 个高度保守、具有生物学活性的多肽片段,称为颗粒蛋白^[9]。目前,PGRN 生物学效应主要归于促发育生长的作用和炎症调控作用两个方面。

1. 促发育生长的作用:PGRN 能够调节健康组织的生长、维持、修复。在损伤的皮肤组织中,PGRN 直接作用于成纤维细胞和上皮细胞,增加中性粒细胞、巨噬细胞的聚集,促进血管内皮细胞和成纤维细胞的增生、分化和迁移,形成新生血管,加速伤口愈合。而在未损伤的组织中,成纤维细胞和内皮细胞中均检测不到 PGRN^[10]。PGRN 还参与肿瘤的形成和增生。遗传性 PGRN 缺陷会导致痴呆和胶质母细胞瘤等神经系统肿瘤,但 PGRN 增多也会导致肿瘤的发生,如在乳腺癌、肾细胞癌、膀胱癌等多种恶性肿瘤患者外周血液中均发现 PGRN 的高水平表达,且可作为预测肿瘤复发、观察疗效的生物标志物^[11-14]。

2. 炎症调控作用:PGRN 具有重要的抗炎作用,是 TNF- α 的潜在抑制剂。在动脉粥样硬化患者颈动脉内膜平滑肌细胞标本中存在 PGRN 表达,提示 PGRN 参与动脉粥样硬化形成这一慢性炎症过程,过表达 PGRN 或加入外源性重组 PGRN 均可减少平滑肌细胞 IL-8 的分泌,而 PGRN 基因敲除的细胞中 IL-8 水平明显上升^[15]。PGRN 在控制自身免疫性疾病如类风湿关节炎的进程中也起到关键作用。已发现局部注射重组 PGRN 可使多种关节炎模型小鼠体内中性粒细胞炎性反应被抑制,提示 PGRN 是重要的炎性抑制因子。而且 PGRN 在关节炎性动物模型中可与 TNF 受体选择性结合并抑制下游炎性通路信号,显示出良好的抗炎治疗效果^[8]。最新多项临床研究发现,类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的患者血清 PGRN 水平明显高于正常人群,其高表达的机制可能提示机体慢性炎症、免疫紊乱状态^[16-19]。

五、PGRN 与 TNFR2 结合可抑制 TNF- α 的作用

鉴定 PGRN 与 TNFR2 特异性结合拮抗 TNF- α 信号可深入了解 PGRN 的作用及其作用机制,可为类风湿关节炎等由 TNF- α 信号介导的疾病提供更好

的治疗方案。

通过全基因组扫描后发现 TNFR2 确实是 PGRN 特异性受体^[8]。TNF- α 、PGRN 均可与 TNFR1、TNFR2 结合,但 TNF- α 与 TNFR1 有更高的亲和力,而 PGRN 与 TNFR2 有更高的亲和力。因此 PGRN 可通过干扰 TNF- α 与 TNFR 受体结合拮抗 TNF- α 的信号通路。已报道,加入 PGRN 能抑制 TNF- α 介导的嗜中性粒细胞的激活、软骨的降解。而且去除 PGRN 能显著增加嗜中性粒细胞释放 H_2O_2 ,及骨髓来源的巨噬细胞释放 NO,加剧 TNF- α 介导的软骨的破坏。

六、PGRN 与类风湿关节炎的研究进展

为深入了解 PGRN 在类风湿关节炎小鼠体内的作用,实验将小鼠体内 PGRN 基因敲除,发现 PGRN -/- 缺陷小鼠在 II 型胶原诱导后能引发更严重的关节炎,表现为 100% 的发生率,炎症得分比 PGRN 基因不敲除的同种小鼠更高,骨、关节的破坏也更严重,而应用重组的 PGRN 后能完全逆转疾病的进展^[8]。提示体内 PGRN 表达缺失将更容易诱发关节炎,但可运用重组的 PGRN 逆转。

为深入了解 PGRN 体内抗炎作用是否通过抑制 TNF- α 信号介导,发现 TNF 转基因小鼠去除 PGRN 基因后将自发关节炎、去除 PGRN 基因后显著加重已发的关节炎。虽然 TNF 转基因小鼠能自发轻度症状的类风湿关节炎,但相对 TNF-Tg PGRN +/+ 12 周龄的小鼠,TNF-Tg/PGRN -/- 和 TNF-Tg/PGRN +/- 小鼠关节肿胀畸形严重影响活动(其滑膜炎、血管翳形成、关节破坏、软骨基质破坏明显)。用重组的 PGRN 治疗 TNF-Tg 小鼠能消除肉眼可见的关节炎和显著降低炎症得分,而停用重组的 PGRN 治疗 7 天后又发展出肉眼可见的炎症及增加炎症得分^[8]。

虽然 PGRN 有强烈的抗炎作用,但多种不良反应限制了它在临床的直接运用,如强致癌阻碍它的临床应用。因此研究人员设计了一种新型蛋白-拮抗 TNFR 受体抑制 TNF/TNFR 信号通路 (antagonist of TNF/TNFR signaling via targeting to TNF receptors, Atsttrin),简称为 Atsttrin。这种蛋白由 3 个 PGRN 片段组成,具有选择性的 TNFR 结合特性,之后他们利用 Atsttrin 和 PGRN 分别进行动物实验,结果发现 Atsttrin 具有更强的抑制关节炎的活性。并且 Atsttrin 有更少的不良反应。事实已证明,运用高剂量的 Atsttrin 对横纹肌肉瘤细胞株 A673/6 几乎没有细胞毒作用,而 DBA1/J 小鼠每天注射高剂量的 Atsttrin,对其心、肺、胃、脾、胰腺、小肠、结肠均未观察到不良反应。

PGRN 与 TNF 都是 TNFR 的配体,两者存在竞争关系,它们之间的平衡能更好地解释炎症及肿瘤间的关系,例如 TNF 活性增加会增加 RA 等自身免疫性疾病的发生。反之,PGRN 活性增加会增加细胞的过度增生甚至导致肿瘤的发生。现如今的 TNF 抑制剂大多与 TNF 结合,从而抑制 TNF 介导的炎症发生。但此治疗过程必定会增强 PGRN 与 TNFR 的结合,而增强的 PGRN 活性将导致细胞的过度增生,最终可导致肿瘤的发生。而 Atsttrin 能直接与 TNFR 结合,既能抑制 TNF 的作用,降低 RA 等自身免疫性疾病的发生,也能抑制 PGRN 的作用,降低细胞的过度增生甚至抑制肿瘤的发生^[20]。

七、PGRN 激活 TNFR2 信号通路

越来越多的研究已证实 PGRN 与 Atsttrin 通过 TNFR2 信号通路保护 RA 关节侵蚀的机制:①可通过拮抗 TNF- α 抑制炎症反应,已证实 PGRN 与 TNFR2 的结合能力是 TNF- α 的 600 倍,因此 PGRN 与 TNFR2 的结合后可抑制炎症的进展^[20];②可通过刺激 Treg 细胞分化,已证实 PGRN 能促使原始细胞向 Treg 细胞分化;③可通过 TNFR2 信号通路调节 Treg 细胞功能,因为 Treg 细胞只能表达 TNFR2,而不能表达 TNFR1,因此能预防多种自身免疫性疾病,而且 PGRN 能保护 Treg 细胞免受 TNF- α 介导的炎症反应^[7]。

八、展望

PGRN 是具有多种生物学效应的内源性蛋白,同时也是 TNFR2 的一种配体,可作为 TNF- α 信号途径的拮抗剂,从而扰乱 TNF- α /TNFR1 相互作用。已证明 PGRN 在小鼠炎症关节炎的病理发生过程中扮演了重要的角色。发明的 Atsttrin 作为 PGRN 的衍生物,不良反应更少,且能更强烈地抑制 RA 的发病及炎症进展。因为很多疾病都涉及 TNF/TNFR 信号通路,因此,拮抗此信号通路将能治疗多种疾病,但目前针对 PGRN 的信号转导机制仍不完全清楚,对其细胞信号通路的深入研究,可架起连接二者的桥梁,加深对类风湿关节炎发病机制的理解,将成为今后相关疾病的早期诊断和治疗提供科学依据。

参考文献

- 1 Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, *et al.* Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity [J]. *Curr Dir Autoimmun*, 2010, 11: 1-26
- 2 Alexopoulou L, Kranidioti K, Xanthoulea S, *et al.* Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36 (10): 2768-2780
- 3 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, *et al.* The TNF and TNF re-

- ceptor superfamilies: integrating mammalian biology [J]. *Cell*, 2001, 104 (4): 487-501
- 4 Valencia X, Stephens G, Goldbach - Mansky R, *et al.* TNF down-modulates the function of human CD4⁺ CD25^{hi} T - regulatory cells [J]. *Blood*, 2006, 108 (1): 253-261
- 5 Raut H, Wicovsky A, Müller N, *et al.* Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor - 2 (TNFR2) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (10): 7394-7404
- 6 Nijholt IM, Granic I, Luiten PG, *et al.* TNFR2: target for therapeutics against neurodegenerative diseases? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 567-573
- 7 Chen X, Oppenheim JJ. Contrasting effects of TNF and anti - TNF on the activation of effector T cells and regulatory T cells in autoimmunity [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585 (23): 3611-3618
- 8 Tang W, Lu Y, Tian QY, *et al.* The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice [J]. *Science*, 2011, 332: 478-484
- 9 He Z, Bateman A. Progranulin (granulin - epithelin precursor, PC - cell - derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2003, 81 (10): 600-612
- 10 He Z, Ong CHP, Halper J, *et al.* Progranulin is a mediator of the wound response [J]. *Nature Medicine*, 2003, 9 (2): 225-229
- 11 Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell - derived growth factor (PC-DGF/ GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25 (9): 1587-1592
- 12 Monami G, Gonzalez EM, Hellman M, *et al.* Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex [J]. *Cancer Research*, 2006, 66 (14): 7103-7110
- 13 Ren J, Li W, Yan L, *et al.* Expression of CIP2A in renal cell carcinomas correlates with tumour invasion metastasis and patients' survival [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105 (12): 1905-1911
- 14 Niemeri M, Kauko O, Sihto H, *et al.* CIP2A signature reveals the MYC dependency of CIP2A - regulated phenotypes and its clinical association with breast cancer subtypes [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (39): 4266-4278
- 15 Kojima Y, Ono K, Inoue K, *et al.* Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 206 (1): 102-108
- 16 Yamamoto Y, Takemura M, Serrero G, *et al.* Increased Serum GP88 (Progranulin) Concentrations in Rheumatoid Arthritis [J]. *Inflammation*, 2014, [Epub ahead of print]
- 17 Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, *et al.* Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14 (6): R244
- 18 Qu H, Deng H, Hu Z. Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 360190
- 19 Thurner L, Stöger E, Fadl N. Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel diseases [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59 (8): 1733-1742
- 20 Chuan - ju Liu. Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585 (23): 3675-3680

(收稿日期: 2014-04-04)

(修回日期: 2014-05-12)