

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.042

• 专论与综述 •

β2 糖蛋白 I 及其抗体在抗磷脂抗体综合症病理进程中的作用探讨

余震波 顾磊 余娜 杜梦阳 李国华

(同济大学附属第一妇婴保健院生殖免疫科 上海 201204)

摘要: 抗磷脂抗体综合症(Antiphospholipid syndrome, APS)是以反复的动脉和静脉血栓形成为特征,与内皮细胞及单核淋巴细胞功能失调有关。β2 糖蛋白 I 是一种磷脂结合型糖蛋白,抗 β2 糖蛋白 I 抗体与血栓形成密切相关,并且在 APS 的发生发展过程中具有决定性作用,但是抗 β2 糖蛋白 I 及其抗体的功能尚未阐明。本文将围绕β2GPI 及其抗体的结构、生物学功能及其在血栓形成中的作用等方面进行详细的阐述,期望为 APS 发生发展过程中抗原抗体复合物调节细胞功能的分子机制提供新的观点。

关键词: 抗磷脂抗体综合症;β2 糖蛋白 I;抗 β2 糖蛋白 I 抗体;聚集;纤维蛋白降解

中图分类号: R593.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)20-3987-06

The Role of β2 Glycoprotein I and its Antibodies in the Pathological Process of Antiphospholipid Syndrome

YU Zhen-bo, GU Lei, YU Na, DU Meng-yang, LI Guo-hua

(Department of reproductive immunology, Shanghai First Maternity and Infant Hospital,

Tongji University School of Medicine, Shanghai, 201204, China)

ABSTRACT: Anti phospholipid antibody syndrome (APS) is characterized with recurrent arterial and venous thrombosis and is related with dysfunction of endothelial cells or mononuclear lymphocytes. β2 glycoprotein I is a kind of phospholipid binding glycoprotein. Anti-β2 glycoprotein I antibodies are closely related to thrombosis and play decisive roles in the development of APS, but the bio-function of anti-β2 glycoprotein I and its antibodies has not been elucidated. This review will elaborate on the structure, biological function and function of the antibody and its antibody in the formation of thrombus, hoping to provide a new view for the molecular mechanism of the antigen antibody complex to regulate the cell function during the development of APS.

Key words: Antiphospholipid syndrome(APS); β2 Glycoprotein I (β2GPI); Anti-β2GPI antibodies; Coagulation; Fibrinolysis

Chinese Library Classification(CLC): R593.2 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3987-06

前言

抗磷脂综合征(Antiphospholipid syndrome, APS)是一种自身免疫性疾病,与血管内皮细胞、单核细胞/巨噬细胞有关,导致血栓形成及纤维蛋白原降解过程中出现功能异常^[1]。临床表现以静脉及动脉血栓形成的为主,其中,静脉血栓以下肢深静脉血栓最常见,而动脉血栓则以血栓最为常见^[2]。习惯性流产是 APS 患者最常见的妊娠并发症。除了血栓形成及流产之外,APS 其他临床特征还包括血小板减少、溶血性贫血、网状青斑、瓣膜性心脏病和神经系统的白质病变等^[3]。该病的诊断指标都是持续性存在的抗磷脂抗体(aPLs),这些抗体与磷脂结合蛋白结合,参与调节内皮细胞和单核细胞功能^[4],导致血栓形成及妊娠并发症的出现^[5]。流行病学调查显示,APS 患者体内存在的抗磷脂抗体中,以抗 β2 糖蛋白 I(β2GPI)抗体检出率最高,抗体滴度更是居高不下^[6]。β2GP 与 APS 的发生发展有着密不可分的关系^[7]。APS 所带来的医学难题在于其导致的异常高的血栓形

成率,血栓常常出现在下肢深静脉和脑动脉循环当中^[8]。部分 APS 患者因此患上了灾难性的疾病,导致死亡率高,预后差^[1,8]。然而,APS 传统的治疗主要是依靠肝素长期抗凝治疗,临床效果并不理想^[1,9]。因此,深入探讨 APS 发生机制,优化治疗策略显得尤为必要,而其中,扩大对 APS 的发病机制目前了解则是当务之急。抗磷脂抗体与动脉和静脉血栓形成密切相关,尤其是抗 β2 糖蛋白 I 与血栓形成风险及妊娠并发症的重要关系^[10],强烈提示抗 β2 糖蛋白 I 在 APS 发生发展过程中扮演的重要角色。

1 β2GPI 的发现历程

β2 糖蛋白 I (β2GPI) 首次被发现存在于人类血浆中是在 1961 年^[11],而直到 1984 年,随着 β2GPI 氨基酸序列被破解,其生物学功能才逐步引起了科研人员的关注^[12]。β2GPI 是一种能与活化的血小板或者凋亡小体表面的磷脂酰丝氨酸(PS)等磷脂类物质^[13]、DNA^[14]、带负电荷分子如肝素、脂蛋白(VLDL 和 LDL)^[15]、及脂肪乳剂(人造脂肪乳剂)^[16]等结合的粘附蛋白。直到 20 世纪末,β2GPI 才被证实是抗磷脂抗体的主要靶标^[5],同时开启了 β2GPI 研究的新纪元。从那时起,β2GPI 才被作为血

作者简介:余震波(1976-),副主任医师,主要研究方向:复发性流产的防治,电话:021-20261125, E-mail: 15355881619@189.cn

(收稿日期:2019-01-30 接受日期:2019-02-25)

栓形成中的关键蛋白开始被研究,体外实验证实它具有促进及抑制血小板聚集的双重作用。越来越多的证据表明 β 2GPI能够作用于血栓形成、纤维蛋白原降解、细胞活化、免疫应答、动脉粥样硬化、细胞凋亡、血管生成及流产等诸多生理或病理过程中^[17]。但是与野生型小鼠相比, β 2GPI^{+/+}及^{-/-}小鼠体内凝血酶的产生均出现显著降低,提示在体情况下, β 2GPI具有重要的促凝作用^[18,19]。在体内情况下,完整的 β 2GPI可能处于一种裂解的或被氧化的动态平衡之中^[20]。这一平衡的改变可能会导致 β 2GPI生物调节活性的异常并引发一系列病理过程。此外,在体的血栓形成模型表明过量的抗 β 2GPI抗体会导致一系列促进血栓形成的作用^[21]。

2 β 2GPI 结构及构象及第 V 结构域的独特氨基酸组成

β 2GPI 是一种由 326 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白^[12],分子量约 54 kDa,属于载脂蛋白超家族成员,血浆中浓度约为 150 到 300 μ g/mL^[22],是人类血浆中丰度最高的蛋白之一,在参与血栓形成的蛋白中含量排名第二,广泛表达于肝脏及胎盘细胞^[23]。该分子属于具有约 60 个氨基酸重复(SCR)特征的超家族成员之一^[23]。每个 SCR 具有 16 个保守的氨基酸残基,以及两个保守的二硫键将第 1-第 3 及第 2-第 4 位半胱氨酸进行连接。

β 2GPI 由第 I-V 结构域组成,其中第 I-IV 具有保守氨基酸序列组成的结构域及第 V 突变结构域组成^[24]。前 4 个结构域表现出环形或开放形 2 种不同的构象,环形构象可以接收来自抗体及脂多糖(LPS)等外源刺激,而开放形构象具有磷脂结合位点,是蛋白质与包括 Toll 样受体(TLRs)等细胞膜受体和磷脂等进行结合的区域^[24]。通过与细胞膜受体以及/或磷脂的结合, β 2GPI 才有可能启动细胞相关信号通路参与调节内皮细胞和单核淋巴细胞/巨噬细胞的功能,从而参与 APS 的病理过程^[24]。除了与第 I-IV 结构域的 SCR 序列相似之外,第 V 结构域还含有额外的 7 个氨基酸残基组成的插入序列,19 个氨基酸残基组成的 C-端延伸序列,这两部分结构域被一个二硫键连接起来形成这一分子所特有的环形结构,而非常规的游离样尾端结构。第 V 结构域中的这一结构有着积极的意义,该结构域中包含的 C281-KNKEKK-C288 区域被称为活化的 FXI(FXIa) 317 位赖氨酸(Lys317)-318 位苏氨酸(Thr318)完全保守区,可使其无法与磷脂类物质结合^[25]。被降解的分子被称为剪切型 β 2GPI。 β 2GPI 的晶体结构表现出一种鱼钩样结构,并不含有半胱氨酸残基^[25]。新近研究表明,剪切型 β 2GPI 主要存在于血浆中。 β 2GPI 可能是在 Cys288-Cys326 被血小板和内皮细胞释放的硫代氧化还原酶所剪切^[21]。这一结果表明 β 2GPI 确实参与了血管生物学中的氧化还原反应^[26]。此外,新近研究表明, β 2GPI 具有环型及开放型两种不同构型^[27]。

3 β 2GPI 及其抗体的生物学功能

3.1 β 2GPI 及其抗体的胞内信号转导

临床研究表明抗 β 2GPI 抗体会增加患者体内血栓形成的风险^[28]。在抗 β 2GPI 抗体存在的情况下, β 2GPI 的 I-IV 型结构域呈开放状态,同时 V 型结构域则逐渐与细胞膜受体紧密结合,触发膜受体胞内段下游信号通路的激活^[17]。免疫学研究表明, β 2GPI 与包括 TLR4、TLR2、载脂蛋白 ER2 等多种膜受体可

以发生相互作用^[7]。同时,细胞膜磷脂可能是 TLRs 胞内信号转导及依赖于 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物的胞内细胞转导所必需的成分。例如, β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物存在时,Aannexin A2,钙网蛋白,及核仁与 TLRs 在细胞表面形成一个蛋白复合物组装体,并参与调节细胞功能^[29]。有趣的是,调节磷脂酰丝氨酸水平的磷脂爬行酶 1(Phospholipid scramblase 1, PLSCR1)在 APS 患者体内显著上调^[30],提示膜磷脂及相关蛋白在 β 2GPI 诱导的细胞信号转导及炎症反应过程中具有重要的作用。

TLR4 信号通路可能是内皮细胞和单核细胞内与 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物有关联的优势信号通路^[31]。与 LPS 触发 TLR4 信号通路集火的方式相似,抗 β 2GPI 的 IgM 和 IgG 型抗体通过与 TLR4 及 IL-1 受体激活的激酶 IRAK 结合,从而激活内皮细胞的 NF κ B 信号通路^[32]。此外,TLR2 也参与 β 2GPI 触发的相关信号通路中。 β 2GPI 能够直接与 TLR2 在内皮细胞膜上结合,而 TLR2 缺失则导致生物素化的 β 2GPI 无法与内皮细胞结合,从而无法激活细胞内 NF κ B 信号通路^[33]。

数十年来, β 2GPI 及其抗体免疫复合物的细胞内信号转导过程被研究的非常深入。 β 2GPI 与 TLR4 结合之后,APS 患者体内的抗 β 2GPI 抗体才能引起 IRAK 的磷酸化并激活单核细胞中的 NF κ B 信号通路,导致后者释放 TNF 及 TFs,赋予单核细胞促炎和促凝血的功能表型^[34]。与 NF κ B 信号通路相似,单核细胞中包括 MEK-1/ERK 和 p38 在内的被 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物激活的 MAPK 信号通路也引起了研究人员的关注^[35]。此外, β 2GPI 及其抗体组成的复合物通过 TLR4/MD-2/MyD88 和 NF- κ B 信号通路激活内皮细胞和单核细胞,并进一步调控促炎因子,如 IL-6、IL-8 及 TNF 的表达^[36],这就提示 β 2GPI 及其抗体复合物可能与 APS 患者体内内皮细胞和单核细胞功能异常有关^[37]。

Krüppel 样因子(KLF)是一类调控内皮细胞应对炎症刺激做出反应的重要转录因子^[1]。用 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物处理内皮细胞能通过激活 NF- κ B 信号通路以降低 KLF2 和 KLF4 的水平,而恢复 KLF2 或 KLF4 的水平则会抑制 NF- κ B 的转录活性并阻断 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物介导的内皮细胞激活过程^[38]。这些数据提示 KLF 对 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体复合物所触发信号通路的负性调控作用。

进一步研究证实, β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体以一种多蛋白信号复合物的形式来启动 TLR4/MD88 信号通路,从而导致 NF- κ B 的失活,这一能够作用于细胞表面发挥作用的多蛋白复合物由 Annexin A2、TLR4、calreticulin 及 nucleolin 组成^[39]。研究表明,细胞表面这种蛋白质之间的相互作用在在内皮细胞活化及 APS 病理进展过程中发挥至关重要的作用。

3.2 微囊泡: β 2GPI 及其抗体发挥新生物活性的新途径

微囊泡被认为是调控人类疾病进程当中一种重要的调控物质,而其生物活性尚未被彻底阐明。有关微囊泡生物活性与 β 2GPI/抗 β 2GPI 抗体功能之间关系的阐明将有助于阐述 APS 的病理进程,甚至有望推广应用到其他免疫相关疾病病理过程的干预手段当中。

微囊泡是一类直径在 100-1000 nm 的细胞外囊泡。当细胞受到刺激时,微囊泡就以质膜出芽的方式(胞吐)形成具有磷脂双分子层的囊泡结构,其内包含多种有功能的蛋白及 RNA^[39]。

一旦微囊泡被释放到细胞外,它们就会通过释放蛋白或通过 RNA 转移来交换遗传信息^[40]。

最近的体外研究表明,抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体能够诱导内皮细胞释放微囊泡^[41],这些微囊泡可能参与 APS 的病理过程。有趣的是,临床研究进一步证实,与正常个体相比,APS 患者体内来源于内皮细胞的微囊泡显著增高,其升高水平与抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体 IgG 和 IgM 型呈正相关^[42]。这一数据提示 $\beta 2\text{GPI}$ 在与抗磷脂抗体和微囊泡相关的血栓前状态进展过程中的重要作用。

研究发现,循环血中 $\beta 2\text{GPI}$ /抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体可能通过诱导内皮细胞释放外囊泡而促进血栓的形成。 $\beta 2\text{GPI}$ /抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体能导致内皮细胞的激活。 $\beta 2\text{GPI}$ /抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体复合物能够激活内皮细胞,使内皮细胞大量表达 E-selectin 和 ICAM1^[43]。同时,这一复合物将 RLC 进行磷酸化,导致丝状肌动蛋白大量表达,随后促进内皮细胞微囊泡的释放。然而,内皮细胞释放的微囊泡能够被诱发 RLC 磷酸化的物质所抑制^[43]。这些研究表明 $\beta 2\text{GPI}$ /抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体复合物能够通过不同的信号通路调节细胞骨架蛋白的组装过程。

抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体刺激内皮细胞释放的微囊泡的功能也得到了进一步研究。抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体与 $\beta 2\text{GPI}$ 能够触发内皮细胞内炎性小体的形成及胞外囊泡的释放^[44]胞外囊泡包含有成熟的 IL-1 及大量 microRNA 可以进一步激活周围的内皮细胞。有趣的是,细胞外囊泡激活的内皮细胞能够被 TLR7 及降解的 ssRNA 所抑制,而阻断 IL-2 受体信号转导过程,则对细胞外囊泡诱导的内皮细胞活化作用微弱^[45]。研究表明,抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体能够诱导内皮细胞释放细胞外囊泡,而这些囊泡则可依赖 TLR7 和 ssRNA 的方式进一步激活周围的内皮细胞。这些研究结论创新性的展示了 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体通过诱导内皮细胞释放含有某种生物活性成分的微囊泡,并进一步激活周围其他细胞。这一数据将进一步拓展我们对 APS 病理发展过程中 $\beta 2\text{GPI}$ /抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体复合物的认识,有助于为 APS 的防治提供新的防治策略。

3.3 APS 患者中 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体所触发信号通路的改变情况

考虑到 APS 病理过程中内皮细胞、单核细胞及血小板所发挥的重要作用,可以推断抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体与 $\beta 2\text{GPI}$ 结合之后,通过作用于上述细胞表面的受体或磷脂来进一步发挥作用。那么在 APS 患者体内, $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体所触发信号通路的改变情况如何呢?本文将进一步进行阐述。

$\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体能够触发内细胞和单核细胞内的促炎信号通路,从而促进 APS 的发生发展,而还有很多关键的问题尚未被阐明。 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体复合物与细菌组分(主要是 LPS)激活的 TLRs 共用相同的细胞内信号通路^[44],常见的 TLR4 受体的配体能够诱导内毒素血症及感染性休克。然而,感染性休克的症状、病程和严重程度与 APS 完全不同。与感染性休克的危重程度相比,APS 表现出相对较弱的免疫反应和长期的病程,包括公认的,比如,被 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体复合物所触发的细胞内 TLRs 信号通路激活程度远远低于被 LPS 以及其他内毒素性激活的程度。这一原因尚无法被现有的认知所解释。

因此,更多关于 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体复合物触发细胞内信号通路的研究将为更好地阐述 APS 的病理进程提供帮助,并能够为治疗 APS 提供新的靶点。

4 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体在血栓形成中的作用

APS 患者体内主要的病理变化就是胎盘脐带内形成大量的微血栓,影响胎儿血氧供应,这也在小鼠体内得到了验证:激光显微切割的方法损伤小鼠血管壁,再将从 APS 患者体内提取的抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体注射到小鼠体内,则导致小鼠损伤处血栓体积的显著增大^[46],强烈提示抗 APS 患者血清中的 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体直接参与血栓形成的病理过程,接下来本文就将系统阐述 $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体在血栓形成中的作用。

4.1 $\beta 2\text{GPI}$ 与相关凝血途径

目前, $\beta 2\text{GPI}$ 及其抗体作为促凝血或抗凝因子的重要功能主要有以下三个方面,当然其更多的功能还有待进一步研究证实。

凝血过程包括一系列丝氨酸蛋白酶的形成、凝血酶的产生及交联的纤维蛋白聚合物沉积。血栓的形成是被体内的内源性途径激活触发的^[46],当血浆中 FVII 与组织因子(TF)相互结合,从而激活因子 FIX 和 FX,进而导致血栓的形成。但是,在抗磷脂抗体 aCLs/抗 $\beta 2\text{GPI}$ 单抗存在时, $\beta 2\text{GPI}$ 可能会诱导内皮细胞及单核细胞组织因子的表达^[47]。动物研究证实,在载脂蛋白 E 受体 -2 敲除的小鼠体内, $\beta 2\text{GPI}$ 二聚体会导致纤维蛋白凝块的体积变大,并导致颈动脉内皮细胞中 TF 表达水平上调^[48]。

内源性凝血途径是由激肽释放酶原、高分子量激肽原(HMWK)及 FXI 的蛋白水解活性激发的 FXII 活性激活所致^[46]。在带负电磷脂存在时, $\beta 2\text{GPI}$ 能够直接抑制以生色底物为基质或在极低密度脂蛋白(VLDL)^[49]表面的激肽释放酶原^[50]及 FXII^[51]的激活。体外实验时,在抗 $\beta 2\text{GPI}$ 抗体 IgGs 存在时, $\beta 2\text{GPI}$ 与 FXI/FXIa 活性凝胶过滤的血小板表面结合并通过血栓及 FXIIa 抑制 FXI 的活性。

此外,抗 $\beta 2\text{GPI}$ 单抗也能够加强 $\beta 2\text{GPI}$ 对凝血酶的抑制作用,从而抑制 FXIa 的产生^[52]。经典的凝血途径是由 FX 作用于 TF-FVIIa 复合物所激活。因子 FXa 与因子 FVa 形成凝血酶原复合物。这一酶复合物也可以由 FIXa 在血小板表面形成。血小板酶产生更过的凝血酶原酶导致凝血酶瀑爆发性生成,形成稳定的止血过程^[53]。 $\beta 2\text{GPI}$ 在活化的血小板表面抑制凝血酶或磷脂囊泡的形成^[54],从而减少凝血酶的生成。研究证实 $\beta 2\text{GPI}$ 对凝血酶原的抑制作用不是由于直接占据血小板表面凝血酶原酶的结合位点形成的^[55]。抗磷脂抗体 IgGs 与 $\beta 2\text{GPI}$ 形成的复合物能加强 $\beta 2\text{GPI}$ 对凝血酶原酶产生的抑制作用^[54]。此外, $\beta 2\text{GPI}$ 能够抑制凝胶过滤的活化血小板产生酶并能在体外抑制 FX 的活化^[56]。狼疮抗凝物及部分抗磷脂抗体^[57]能够增强 $\beta 2\text{GPI}$ 对 FXa 产生的抑制作用。

4.2 $\beta 2\text{GPI}$ 与血小板血栓的形成

$\beta 2\text{GPI}$ 已被证实参与凝血级联反应的多种途径、血小板活化及血栓的形成等过程。

在血管损伤部位血管基底层胶原暴露时血小板被激活,导致原发性止血,并在可溶性受体激动剂如凝血酶、ADP 和血栓素 -2 的参与下持续活化^[58]。当 $\beta 2\text{GPI}$ 浓度在 3.7-18 μM 范围时,能抑制 ADP-诱导的血小板聚集。这一抑制作用是通过抑制 ADP-诱导的血小板活化过程中 5-HT 的释放来实现的,并且不呈 ADP 剂量依赖性,也不会引发凝血酶或胶原蛋白激活

血小板释放 5-HT, 从而不影响凝血酶介导的血小板聚集。

此外, β_2 GPI 也被当作体内血管性血友病因子(VWF)的生理性调节物质。 β_2 GPI 对血小板血栓形成的调控作用基于 β_2 GPI 翻译后产生的两种不同的修饰体。Hulstein 等人^[59]发现 β_2 GPI 结合活化的 VWF 对血小板粘附发挥抑制作用, 而抗 β_2 GPI 抗体 IgGs 的存在, 则能够竞争性结合 VWF, 则会导致 APS 循环血中活化的 VWF 水平显著上调。这一研究是利用纯化过程中被氧化的分子得出的结论。此外, 也有研究表明, 还原型 β_2 GPI 与 VWF 结合并增加血小板与 VWF 之间的粘附作用是依赖于一种巯基化反应形成的。这一功能是由糖蛋白 Ib α 复合物及血小板表面硫醇氧化还原酶作用下产生的还原型 β_2 GPI 导致的。

4.3 β_2 GPI 在纤维蛋白降解中的作用

大量研究表明, APS 患者体内存在纤溶过程。 β_2 GPI 与磷脂类物质不同, 前者被证实不仅影响血栓形成, 而且参与血栓清除过程。丝氨酸蛋白酶抑制剂和抗血纤维蛋白溶酶可通过影响 β_2 GPI 发挥纤溶作用。

纤溶过程是纤维蛋白蜕变以限制并降解血栓的过程。纤维蛋白作为纤溶酶原的辅助因子, 帮助其转化为纤溶酶。外源性纤溶途径中, 这一过程发生在有丝氨酸蛋白酶组织纤溶酶原激活物(tPA)存在的情况下产生的。Yasuda 等人发现 β_2 GPI 剪切体而非完整的 β_2 GPI 通过抑制 tPA 介导的纤溶蛋白酶产生来抑制内源性纤溶途径。 β_2 GPI 剪切体 - 纤溶酶 / 纤溶酶抑制因子复合物 (PPI) 与缺血性中风的密切关系强烈提示, 体内 β_2 GPI 对于外源性纤溶途径的调控作用。与此相反的是, Lopezlira 等人发现完整的 β_2 GPI 与纤溶酶原的直接结合可能被 ϵ - 氨基己酸(EACA)竞争性抑制。需要指出的是, 这些研究中并没有明确指出还原条件下 β_2 GPI 的纯化方法。 β_2 GPI 的蛋白降解过程可能发生在利用肝素 - 琼脂糖亲和层析的纯化过程中^[60], 从而影响这些数据的可靠性。

纤溶酶原可以被内皮细胞、单核细胞及一些肿瘤细胞(内源性纤溶途径)表达的尿激酶原或包括链激酶(SK)在内的非真核细胞纤溶酶原激活物所激活。SK 不依赖于纤维蛋白而行使功能, 而在远离纤维蛋白凝块区域的血液中大量产生纤溶酶, 这就提示 β_2 GPI 能够抑制内源性纤溶途径。人源与鼠源抗 β_2 GPI 单抗能够加强 β_2 GPI 对内源性纤溶途径的抑制作用。相反, β_2 GPI 则被证实具有增强 SK 的功能从而激活纤溶过程。

纤溶过程受到纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)、包括 α_2 - 抗纤溶酶和 α_2 - 巨球蛋白在内的抗纤溶酶、以及凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)的控制。纤溶的调节主要靠抑制 tPA 来完成。Ieko 等人证实, β_2 GPI 抑制 PAI 介导的 tPA 失活。这一作用是不依赖于磷脂的, 而是通过使用在纤溶酶原和可溶性纤维蛋白存在时 β_2 GPI 与 tPA 共孵育的体系来实现的。tPA 的活性依靠显色法确定的纤溶酶生成量来进行测定。两种人源抗 β_2 GPI 单抗, EY2C9 及 EY1C8, 能够抑制 β_2 GPI 对于 tPA 介导的 PAI 灭活的保护作用, 提示抗 β_2 GPI 抗体在 APS 患者体内具有抗纤溶及抗促血栓形成作用, 单抗对于 PAI 的抑制作用是不依赖于 β_2 GPI 及磷脂分子的。

5 结语与展望

APS 所致的较高血栓形成率是一项重要的临床挑战, 它以内皮细胞和单核淋巴细胞参与凝血及纤溶过程为特征, 在其病理进程与 β_2 GPI 及抗 β_2 GPI 抗体密不可分, 但是 β_2 GPI 及其抗体的生物学功能却尚未被彻底阐明。 β_2 GPI 是人体内含量较高的一种糖蛋白, 其独特的氨基酸组成使其在凝血及纤溶等不同的生物学过程中发挥独特的功能。在该复合物参与的细胞信号转导方面, β_2 GPI 及其抗体通过与 TLRs 相互结合, 从而激活下游的 MAPK 及 NF κ B 信号通路, 进而激活内皮细胞和单核细胞, 使其产生大量促炎因子。 β_2 GPI 及抗 β_2 GPI 抗体也可以通过激活内皮细胞以微囊泡为信息传递介质, 迅速进一步激活周围相关细胞以旁分泌或自分泌的方式发挥促凝及促炎作用。此外, β_2 GPI 的不同生物学构象也是其发挥生物学功能重要基础。血纤维蛋白溶酶或 FXIa 在 Lys317-Thr318 位点可能是其在调节凝血或纤维蛋白降解中发挥功能的主要区域。 β_2 GPI 也可在抗 β_2 GPI 抗体协助下形成二聚体或多聚体的形成来发挥生物活性。虽然抗 β_2 GPI 抗体在一定程度上能够抑制 β_2 GPI 的功能, 但是多数情况下还是以促进 β_2 GPI 发挥生物功能为主。 β_2 GPI 被氧化之后可能会发生构象改变, 从而影响其与磷脂类物质的结合, 并影响抗 β_2 GPI 抗体的识别功能及细胞活化功能。因此, β_2 GPI 及其抗体复合物生物活性及 β_2 GPI 蛋白构象的研究方面若能获得些突破, 将有望为 APS 的病理过程提供新的解释, 为 APS 的预防和治疗提供新的策略。

参考文献(References)

- [1] Chaturvedi S, McCrae KR. Recent advances in the antiphospholipid antibody syndrome[J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(5): 371-379
- [2] Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(4): 1019-1027
- [3] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(2): 295-306
- [4] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(6): 330-339
- [5] Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor[J]. *Lancet*, 1990, 335(8705): 1544-1547
- [6] Cucnik S, Kveder T, Ulcova-Gallova Z, et al. The avidity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with or without antiphospholipid syndrome: a collaborative study in the frame of the European forum on antiphospholipid antibodies[J]. *Lupus*, 2011, 20(11): 1166-1171
- [7] Willis R, Pierangeli SS. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1285: 44-58
- [8] Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1011-1018
- [9] Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients [J]. *Ann Rheum Dis*,

- 2009, 68(9): 1428-1432
- [10] Banzato A, Pozzi N, Frasson R, et al. Antibodies to Domain I of beta (2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS)[J]. *Thromb Res*, 2011, 128(6): 583-586
- [11] Schultze HE. Glycoproteins of human plasma[J]. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*, 1961, 17: 77-91
- [12] Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(12): 3640-3644
- [13] Wurm H. beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles[J]. *Int J Biochem*, 1984, 16(5): 511-515
- [14] Kroll J, Larsen JK, Loft H, et al. DNA-binding proteins in Yoshida ascites tumor fluid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 434(2): 490-501
- [15] Polz E, Kostner GM, Holasek A. Studies on the protein composition of human serum very low density lipoproteins: demonstration of the beta 2-glycoprotein-I [J]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1979, 360(8): 1061-1067
- [16] Polz E, Kostner GM. The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions [J]. *FEBS Lett*, 1979, 102(1): 183-186
- [17] Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, et al. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome [J]. *Blood*, 2007, 109(2): 422-430
- [18] Yasuda S, Tsutsumi A, Chiba H, et al. beta (2)-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 152(2): 337-346
- [19] Sheng Y, Reddel SW, Herzog H, et al. Impaired thrombin generation in beta 2-glycoprotein I null mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 13817-13821
- [20] Itoh Y, Inuzuka K, Kohno I, et al. Highly increased plasma concentrations of the nicked form of beta(2) glycoprotein I in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V [J]. *J Biochem*, 2000, 128(6): 1017-1024
- [21] Ioannou Y, Zhang JY, Passam FH, et al. Naturally occurring free thiols within beta 2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells, and regulation of oxidative stress-induced cell injury[J]. *Blood*, 2010, 116(11): 1961-1970
- [22] Willems GM, Janssen MP, Pelsers MM, et al. Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta 2-glycoprotein I complexes to lipid membranes [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(43): 13833-13842
- [23] Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, et al. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I[J]. *Biochem J*, 1991, 277 (Pt 2): 387-391
- [24] de Groot PG, Meijers JC. beta(2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function[J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(7): 1275-1284
- [25] Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, et al. Adhesion mechanism of human beta (2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure[J]. *EMBO J*, 1999, 18(19): 5166-5174
- [26] Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, et al. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I[J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(Suppl 1): 275-282
- [27] Agar C, van Os GM, Morgelin M, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome[J]. *Blood*, 2010, 116(8): 1336-1343
- [28] Meroni PL, Peyvandi F, Foco L, et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies and the risk of myocardial infarction in young premenopausal women[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(12): 2421-2428
- [29] Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, et al. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies[J]. *Blood*, 2012, 119(3): 884-893
- [30] Amengual O, Atsumi T, Oku K, et al. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome[J]. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(1): 81-88
- [31] Colasanti T, Alessandri C, Capozzi A, et al. Autoantibodies specific to a peptide of beta2-glycoprotein I cross-react with TLR4, inducing a proinflammatory phenotype in endothelial cells and monocytes [J]. *Blood*, 2012, 120(16): 3360-3370
- [32] Raschi E, Testoni C, Bosio D, et al. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies[J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3495-3500
- [33] Alard JE, Gaillard F, Daridon C, et al. TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I [J]. *J Immunol*, 2010, 185 (3): 1550-1557
- [34] Sorice M, Longo A, Capozzi A, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(8): 2687-2697
- [35] Lopez-Pedraza C, Buendia P, Cuadrado MJ, et al. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF- κ B/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1): 301-311
- [36] Zhou H, Sheng L, Wang H, et al. Anti-beta2GPI/beta2GPI stimulates activation of THP-1 cells through TLR4/MD-2/MyD88 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Thromb Res*, 2013, 132(6): 742-749
- [37] Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(9): 1828-1834
- [38] Allen KL, Hamik A, Jain MK, et al. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies is modulated by Kruppel-like transcription factors[J]. *Blood*, 2011, 117(23): 6383-6391
- [39] Montoro-Garcia S, Orenes-Pinero E, Marin F, et al. Pharmacological modulation of microparticle release: new strategies for the management of atherothrombotic vascular disorders [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(6): 840-849
- [40] Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1047-1057
- [41] Wu M, Barnard J, Kundu S, et al. A novel pathway of cellular activation

- mediated by antiphospholipid antibody-induced extracellular vesicles [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(10): 1928-1940
- [42] Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, et al. Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations[J]. *Thromb Res*, 2015, 135(1): 102-108
- [43] Betapudi V, Lominadze G, Hsi L, et al. Anti-beta2GPI antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin II motor protein-dependent pathway[J]. *Blood*, 2013, 122(23): 3808-3817
- [44] Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(11): 1033-1044
- [45] Arad A, Proulle V, Furie RA, et al. beta (2)-Glycoprotein-I autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model [J]. *Blood*, 2011, 117(12): 3453-3459
- [46] Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(1): 17-25
- [47] Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(12): 2870-2878
- [48] Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, et al. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome [J]. *Blood*, 2011, 117(4): 1408-1414
- [49] McNally T, Mackie IJ, Isenberg DA, et al. beta 2 glycoprotein-I inhibits factor XII activation on triglyceride rich lipoproteins: the effect of antibodies from plasma of patients with antiphospholipid syndrome[J]. *Thromb Haemost*, 1996, 76(2): 220-225
- [50] Schousboe I. Inositolphospholipid-accelerated activation of prekallikrein by activated factor XII and its inhibition by beta 2-glycoprotein I[J]. *Eur J Biochem*, 1988, 176(3): 629-636
- [51] Schousboe I, Rasmussen MS. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by beta 2-glycoprotein I and anti-beta 2-glycoprotein I [J]. *Thromb Haemost*, 1995, 73(5): 798-804
- [52] Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, et al. Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: anti-beta2-glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of beta2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 605-613
- [53] Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, et al. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(Suppl 1): 102-115
- [54] Goldsmith GH, Pierangeli SS, Branch DW, et al. Inhibition of prothrombin activation by antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein I[J]. *Br J Haematol*, 1994, 87(3): 548-554
- [55] Nimpf J, Bevers EM, Bomans PH, et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 884(1): 142-149
- [56] Shi W, Chong BH, Hogg PJ, et al. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets[J]. *Thromb Haemost*, 1993, 70(2): 342-345
- [57] Galli M, Bevers EM, Comfurius P, et al. Effect of antiphospholipid antibodies on procoagulant activity of activated platelets and platelet-derived microvesicles [J]. *Br J Haematol*, 1993, 83 (3): 466-472
- [58] Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function[J]. *Circ Res*, 2007, 100(12): 1673-1685
- [59] Hulstein JJ, Lenting PJ, de Laat B, et al. beta2-Glycoprotein I inhibits von Willebrand factor dependent platelet adhesion and aggregation[J]. *Blood*, 2007, 110(5): 1483-1491

(上接第 3986 页)

- [28] Jackson TL, Desai R, Simpson A, et al. Epimacular Brachytherapy for Previously Treated Neovascular Age-Related Macular Degeneration (MERLOT): A Phase 3 Randomized Controlled Trial [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(6): 1287-1296
- [29] Odergren A, Algvare PV, Seregard S, et al. Vision-related function after low-dose transpupillary thermotherapy versus photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Acta ophthalmologica*, 2010, 88(4): 426-430
- [30] Mimouni M, Meshi A, Vainer I, et al. Bevacizumab dosing every 2 weeks for neovascular age-related macular degeneration refractory to monthly dosing [J]. *Japanese journal of ophthalmology*, 2018, 62(6): 652-658
- [31] Chaudhary V, Barbosa J, Lam WC, et al. Ozurdex in age-related macular degeneration as adjunct to ranibizumab (The OARA Study) [J]. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*, 2016, 51(4): 302-305
- [32] Calvo P, Ferreras A, Al Adel F, et al. Dexamethasone intravitreal implant as adjunct therapy for patients with wet age-related macular degeneration with incomplete response to ranibizumab[J]. *The British journal of ophthalmology*, 2015, 99(6): 723-726
- [33] Rezende FA, Lapalme E, Qian CX, et al. Omega-3 supplementation combined with anti-vascular endothelial growth factor lowers vitreal levels of vascular endothelial growth factor in wet age-related macular degeneration [J]. *American journal of ophthalmology*, 2014, 158(5): 1071-1078
- [34] Sridhar J, Hsu J, Shahlaee A, et al. Topical Dorzolamide-Timolol With Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor for Neovascular Age-Related Macular Degeneration [J]. *JAMA ophthalmology*, 2016, 134(4): 437-443