

LAMP-2 在结节性多动脉炎中的表达水平及临床意义

朱 晴, 洪 静, 朱 彬, 吴 婷, 刘 莎莎, 李南方*

新疆维吾尔自治区人民医院高血压中心 新疆乌鲁木齐
新疆高血压研究所 新疆乌鲁木齐
国家卫生健康委高血压诊疗研究重点实验室 新疆乌鲁木齐
新疆维吾尔自治区重点实验室“新疆高血压病研究实验室” 新疆乌鲁木齐
新疆高血压(心脑血管)疾病临床医学研究中心 新疆乌鲁木齐

【摘要】目的 探讨血清溶酶体相关膜蛋白 2 (LAMP-2) 在结节性多动脉炎 (PAN) 患者中的表达及其临床意义。**方法** 本研究共纳入 26 例 PAN 患者作为病例组。同期收集与之性别、年龄相匹配的健康体检者 26 例作为对照 (HC) 组。根据伯明翰血管炎活动期评分 (BVAS) 量表对 PAN 的疾病活动程度进行评估。采用 ELISA 检测所有研究对象血清中 LAMP-2 水平。**结果** PAN 患者血清 LAMP-2 水平显著高于 HC, 差异有显著统计学意义 [0.66 (0.49-2.95) vs 0.17 (0.10-0.32), $Z=4.813$, $P<0.001$]。相关性分析表明, 血清 LAMP-2 水平与 BAVS ($r=0.438$, $P=0.025$)、Hs-CRP ($r=0.592$, $P=0.001$) 和 ESR ($r=0.406$, $P=0.039$) 呈显著正相关, 而与 Scr ($r=0.198$, $P=0.332$) 以及 24 小时蛋白尿 ($r=0.225$, $P=0.302$) 无相关性。**结论** 与对照组相比, PAN 患者的血清 LAMP-2 水平升高, 且与疾病活动指标呈正相关。LAMP-2 可能是一种新型的生物标记物用于 PAN 患者的诊断及疾病活动评估。

【关键词】 溶酶体相关膜蛋白 2; 结节性多动脉炎; 疾病活动

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2019D01C105)

【收稿日期】 2022 年 1 月 24 日 **【出刊日期】** 2023 年 5 月 13 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20230201

The levels and clinical significance of serum LAMP- 2 in patients with polyarteritis nodosa

*Qing Zhu, Jing Hong, Bin Zhu, Ting Wu, Shasha Liu, Nanfang Li**

*Hypertension Center of People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang
Xinjiang Hypertension Institute, Urumqi, Xinjiang*

NHC Key Laboratory of Hypertension Clinical Research, Urumqi, Xinjiang

*Key Laboratory of Xinjiang Uygur Autonomous Region "Hypertension Research Laboratory", Urumqi, Xinjiang
Xinjiang Clinical Medical Research Center for Hypertension (Cardio-Cerebrovascular) Diseases, Urumqi, Xinjiang*

【Abstract】 Objective: To investigate the levels and clinical significance of serum lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) in patients with polyarteritis nodosa (PAN). **Methods** A total of 26 PAN patients were enrolled as case group. At the same time, 26 healthy persons matched with sex and age were collected as health controls (HC) group. The disease activity of PAN was assessed by the birmingham vasculitis activity score (BVAS). The level of LAMP-2 in serum of all subjects was detected by ELISA. **Results** The level of serum LAMP-2 in PAN patients was significantly higher than in HC, the difference was statistically significant [0.66 (0.49-2.95) vs 0.17 (0.10-0.32), $Z = 4.813$, $P < 0.001$]. The correlation analysis showed that serum LAMP-2 levels were positively correlated with BAVS ($r=0.438$, $P=0.025$), Hs-CRP ($r=0.592$, $P=0.001$) and ESR ($r=0.406$, $P=0.039$), but not with Scr ($r=0.198$, $P=0.332$) and 24-hour proteinuria ($r=0.225$, $P=0.302$). **Conclusion** Compared with the control group, the serum LAMP-2 level of PAN patients was increased, which was positively correlated with disease activity indicators. LAMP-2 May be a novel

作者简介: 朱晴 (1987-) 女, 硕士, 主治医师, 主要研究领域: 高血压及其相关疾病的基础与临床研究

*通讯作者: 李南方 (1958-) 女, 博士, 教授, 主任医师, 主要研究领域: 高血压及其相关疾病的基础与临床研究

biomarker for diagnosis and disease activity assessment of PAN patients.

【Keywords】 Lysosome-associated membrane protein 2; Polyarteritis nodosa; Disease activity

结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa, PAN) 是一种主要累及中、小动脉的全身性坏死性、非肉芽肿性血管炎, 主要累及肾脏、脾脏、肠和软组织的血管系统^[1,2], 常常引起血压升高, 甚至表现为恶性高血压^[3]。虽该病的发病率低, 但不及时治疗, 容易导致不可逆的器官损伤, 致使 PAN 的致残率、致死率极高, 为社会及家庭带来沉重的经济负担^[4,5]。目前, 由于受累及部位, 累及血管类型及严重程度的影响, 其临床表现各异, 复杂多变, 且实验室缺乏敏感且特异的指标, 临床医生很难及时对 PAN 患者做出正确的诊断和病情评估^[2,6]。

溶酶体相关膜蛋白-2 (lysosome-associated membrane protein-2, LAMP-2), 一种新型抗中性粒细胞胞质抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)^[7], 是一种高度糖基化的溶酶体膜蛋白, 参与分子伴侣蛋白介导的自噬和维持溶酶体膜完整性^[8,9]。1995年, Kain 等首次在 ANCA 阳性且病理证实为寡免疫局灶性坏死性肾小球肾炎 (focal necrotizing glomerulonephritis, FNGN) 的患者中发现抗 hLAMP-2 抗体^[2,10]。近来, 研究发现 LAMP-2 和/或 LAMP-2 抗体在多种自身免疫疾病发病过程中起重要作用^[9,11-13]。目前 LAMP-2 在 PAN 患者中表达水平的研究却鲜有报道。本研究主要观察血清 LAMP-2 在 PAN 患者中表达水平, 及探讨血清 LAMP-2 水平与临床和实验室指标的关系, 以期预通过检测血清 LAMP2 水平, 协助临床医生对 PAN 患者及时准确做出诊断和治疗, 改善患者预后。

1 对象与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2013 年 1 月-2018 年 12 月在新疆维吾尔自治区人民医院高血压中心住院并明确诊断为 PAN 的患者, 共 26 例。所有患者的临床表现和诊断均符合 1990 年美国风湿病学会 PAN 诊断标准和/或 2012 年修订的国际教堂山共识会议的 PAN 分类标准^[14,15]。根据伯明翰血管炎活动期评分 (birningham vasculitis activity score, BVAS) 量表对 PAN 患者的疾病活动程度进行评估^[16]。

同期纳入在我院体检中心进行健康体检的正常人群。通过问题、一般检查和实验室检查, 本研究排除了 (1) 急性感染者: 包括呼吸系统、泌尿系统及胆道

系统疾病; (2) 患有高血压者: 既往服用降压药或此次体检发现血压高者; (3) 患有糖尿病者: 既往服用降糖药或此次体检发现血糖升高者; (4) 以及有急、慢性肾脏病等体检者。最终纳入与 PAN 患者性别、年龄匹配的健康对照 (healthy controls, HC) 组 26 例。

所有研究对象均签署了知情同意书, 自愿参加本研究。本研究经我院伦理委员会同意^[2,6]。

1.2 ELISA 方法检测血清 LAMP-2 水平

采集了所有研究对象的晨起空腹外周静脉血 5ml, 4°C 离心机 3000g/min 离心 15min 后, 收集血清, 分装冻存, -80°C 冰箱备用。采用双抗体夹心 ELISA 方法检测血清 LAMP-2 水平 (武汉云克隆科技股份有限公司, 中国)。检测方法严格按照检测试剂盒说明书操作进行 (样本按 1: 500 倍进行稀释, 单位为 ug/mL)^[2]。

1.3 数据收集和检测

所有临床数据来自患者住院期间的病例资料和健康人群体检资料。包括: 人口学基本特征、白细胞 (white blood cell, WBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HB) 和血小板 (platelet, PLT) 红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、超敏 C-反应蛋白 (high sensitivity C-reactive protein, Hs-CRP) 和 HBsAg、HCV、HIV、ANA、ENA、ANCA 等感染、免疫和自身抗体等指标, 以及血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 等生化指标。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 进行数据处理和统计分析。定量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数、四分位间距 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示。若指标符合正态性分布, 两组间采用 t 检验; 若不符合正态分布则采用秩和检验。分类资料以频数和百分比 (%) 表示, 组间差异比较采用 χ^2 检验。LAMP-2 与实验室指标的相关性采用 Spearman 进行分析, ROC 曲线分析用于预测最高的灵敏度和特异性以及确定临界值。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本特征

在 26 例 PAN 患者中, 26.92% 为女性, 平均年龄为 38.42 岁。26 例 HC 中, 30.76% 为女性, 平均年龄为 39.35 岁。两组间的年龄和性别没有统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究中两组人群临床和实验室特征比

较见表 1。

2.2 血清 LAMP-2 水平在 PAN 和 HC 两组之间的比较

PAN 患者血清 LAMP-2 水平显著高于 HC, 差异有显著统计学意义[0.66(0.49-2.95) vs 0.17(0.10-0.32), $Z=4.813$, $P<0.001$], 见图 1。

表 1 研究对象的基本特征

变量	PAN (n=26)	HC (n=26)	$t/Z/\chi^2$	P
年龄 (岁)	38.42±9.42	39.35±13.17	0.291	0.773
女, (%)	7 (26.92)	8 (30.76)	0.094	0.760
WBC ($\times 10^9/L$)	7.42±1.78	6.30±1.07	2.766	0.008
HB (g/L)	145.19±15.51	152.07±16.00	1.575	0.122
PLT ($\times 10^9/L$)	223.27±77.65	258.31±43.31	2.009	0.051
ESR (mm/h)	14.00 (10.00-25.50)	6.50 (4.00-10.75)	2.568	0.010
Hs-CRP (mg/L)	4.31 (1.00-9.09)	—	—	—
Scr ($\mu\text{mol/L}$)	100.00 (90.15-134.75)	70.39 (64.32-78.50)	4.228	<0.001
24 小时尿蛋白 (g)	0.20 (0.10-0.56)	—	—	—

注: WBC: 白细胞; HB: 血红蛋白; PLT: 血小板; ESR: 红细胞沉降率; Hs-CRP: 超敏 C-反应蛋白; Scr: 血清肌酐; PAN: 结节性多动脉炎; HC: 健康对照。

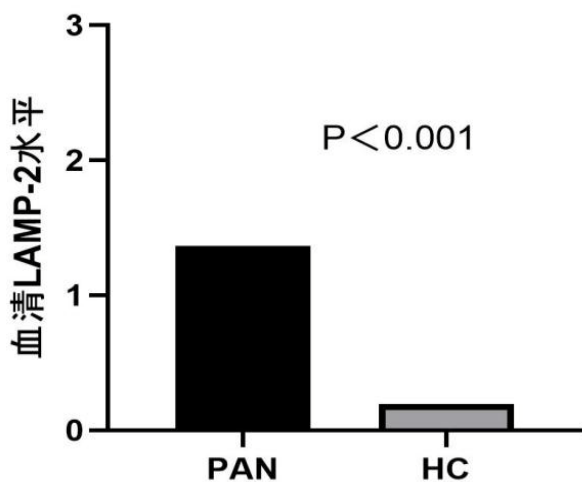


图 1 血清 LAMP-2 水平在两组间差异比较

2.3 血清 LAMP-2 水平与 PAN 患者的临床及实验室指标的相关性分析

相关性分析表明: 血清 LAMP-2 水平与 BAVS ($r=0.438$, $P=0.025$)、Hs-CRP ($r=0.592$, $P=0.001$) 和 ESR ($r=0.406$, $P=0.039$) 呈显著正相关, 而与 Scr ($r=0.198$, $P=0.332$) 以及 24 小时蛋白尿 ($r=0.225$, $P=0.302$) 无相关性。

2.4 ROC 曲线评估血清 LAMP-2 水平对 PAN 的诊断价值

对于 PAN 的诊断, 血清 LAMP-2 最佳截止值为

0.35 $\mu\text{g/mL}$, 敏感性和特异性分别为 88.5% 和 84.6%, 其曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.89 [95% 的置信区间 (0.772-0.96)], 见图 2。

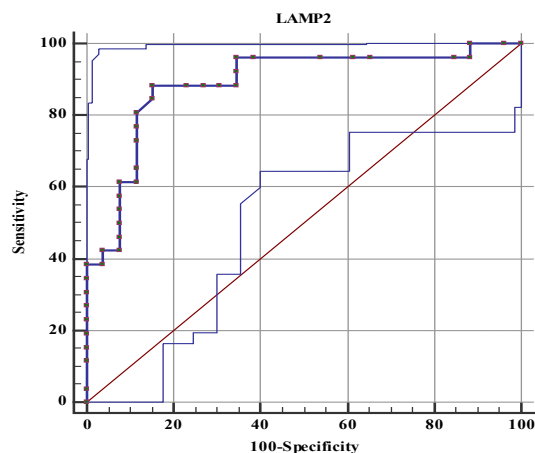


图 2 LAMP-2 对 PAN 诊断价值的 ROC 曲线

3 讨论

PAN 是以全身中、小动脉坏死性病变为主的血管炎^[2]。由于可累及单个或全身多个脏器的中、小动脉, 临床表现各异。另血清 ANCA 对大、中血管的诊断价值不大, 2012 年 CHCC 第二次会议已明确 PAN 为 ANCA 阴性的血管炎^[15]。因此, 目前 PAN 的诊断仍存在很大的困难和挑战^[2, 6, 17]; 此外, PAN 的疾病活动评估和疾病复发预测亦是临床诊疗的难点。临床常用血

细胞沉降率 (ESR) 和 C 反应蛋白 (CRP) 来评估疾病活动, 但近来研究发现部分活动期血管炎患者, 其 ESR 和 CRP 却在正常范围, 说明他们对 PAN 的疾病活动程度评估缺乏一定特异性^[6, 10]。因此, 临床迫切需要识别新的生物标记物更好地用于 PAN 的诊断和疾病活动评估。

LAMP-2 作为新型 ANCA 抗原被发现并受到了广泛的关注^[2, 10]。唐莎等^[18]研究发现 LAMP-2 抗体可促进中性粒细胞胞质外捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 的形成, 而抑制还原型辅酶 II 氧化酶的活性可阻断 NETs 形成, 说明 LAMP-2 抗体可能通过诱导中性粒细胞异常死亡, 激活自身免疫反应参与血管炎的发生过程。Kawakami 等^[19]研究发现成人过敏性紫癜患者血清抗 hLAMP-2 抗体水平明显升高, 推测 LAMP-2 可能参与了成人过敏性紫癜的发生。然而, 血清 LAMP-2 水平与 PAN 的关系, 国内外尚未见报道。

本研究采用 ELISA 法检测了 PAN 和 HC 两组人群的血清 LAMP-2 水平。研究结果表明: PAN 患者的血清 LAMP-2 水平明显高于 HC。近来, Gibson 等^[9]在 35% (18/51) 患有影响中、小型血管的慢性系统性血管炎儿童中检测到中等到高 LAMP-2-ANCA 滴度。该类型血管炎与 PAN 累及的血管类型及病理改变相似, 这提示 LAMP-2 在 PAN 中发病机制中可能起到一定作用。此外, 我们进一步相关分析表明, 血清 LAMP-2 水平均与 BVAS 和 Hs-CRP 呈显著正相关。这与以往研究结果相一致。陈熙等^[20]对 33 例 AAV 患者的血清 LAMP-2 抗体水平进行检测, 结果显示, AAV 活动期 LAMP-2 抗体水平显著高于非活动期和 HC。牛蒙等^[21]研究同样显示: AAV 活动期患者的血清中 LAMP-2 抗体水平明显高于 HC 组, 且 AAV 患者血清中 LAMP-2 抗体水平与 BVAS 评分呈正相关 ($r=0.669$, $P<0.05$)。Peschel 等^[22]研究结果发现活动期患者经过 1 个月的规律治疗后, 抗 hLAMP-2 抗体消失, 没有临床复发表现的 FNGN 患者抗 hLAMP-2 抗体为阴性。这说明血清抗 hLAMP-2 抗体不仅在 FNGN 患者中具有极高的阳性率, 而且可能与疾病活动期相关。

此外, 已有研究证实 LAMP-2 除了在中性粒细胞表达, 还可在肾小球内皮细胞表面表达, 这不同于 MPO 和 PR3 抗体。Kain 等^[23]的动物实验显示, 抗 LAMP-2 抗体可以导致大鼠出现血尿、蛋白尿等肾损伤的症状。我们推测 LAMP-2 可能与 PAN 肾损伤也有一定关系。因此, 我们进一步研究了血清 LAMP-2 是否

与 PAN 肾损伤有关。然而, 相关性分析结果显示血清 LAMP-2 水平与 24 小时尿蛋白以及 Scr 均无相关性。我们分析其中可能的原因是 PAN 与 AAV 引起的肾损伤机制不同。AAV 主要累及小血管及毛细血管, 其肾脏受累主要为肾小球肾炎。而 PAN 主要累及到中血管, 其肾脏受累主要为肾动脉及其分支狭窄所导致的肾缺血。因此, 对于 LAMP-2 是否直接参与以及如何参与 PAN 肾损伤的过程仍不清楚。需要进一步扩大样本量对每一个 PAN 亚组进行深入分析。此外, 基于 ROC 曲线分析, 进一步评价 LAMP-2 为生物标志物对于 PAN 的诊断价值。结果显示, 诊断 PAN 时, LAMP-2 的最佳截止值为 0.35 ug/ml, 敏感性、特异性和 AUC 分别为 88.5%、84.6% 和 0.89。这提示 LAMP-2 可能是一个有用的生物标记物用于 PAN 的诊断。

本研究存在一定局限性。首先, 本研究纳入样本较少。血管炎发病率低, 但危害大, 后续需扩大样本量进一步证实此研究结果稳定性。其次, 本研究为横断面研究, 无法确定因果关系, 后续需通过纵向研究来观察 LAMP-2 对于 PAN 患者的诊疗价值。第三, 本研究为单中心, 可能存在一定偏倚。今后多进行多中心研究深入探讨 LAMP-2 作为生物标志物的价值。

综上所述, 我们研究认为 LAMP-2 可能参与了 PAN 疾病的发生发展, 血清 LAMP-2 可以作为新型的生物标记物用于 PAN 的诊断及疾病活动评估。

参考文献

- [1] Karadag O, Jayne DJ. Polyarteritis nodosa revisited: a review of historical approaches, subphenotypes and a research agenda[J]. *Clinical and experimental rheumatology*, 2018, 36 Suppl 111(2):135-142.
- [2] 朱彬. 系统性血管炎患者临床特点及生物标记物的相关研究[D]. 新疆医科大学, 2019.
- [3] Zhu Qing; Liu Shasha; Heizhati Mulalibieke; Yao Xiaoguang; Wang Menghui; Luo Qin; Wang Lei; Zhang Delian; Chang Guijuan; Li Nanfang; Systemic Vasculitis: An Important and Underestimated Cause of Malignant Hypertension[J]. *Cardiovascular Innovations and Applications (CVIA)*, 2019, 4(2):99-108.
- [4] Benarous L, Terrier B, Laborde-Casterot H, et al. Employment, work disability and quality of life in patients with ANCA-associated vasculitides. The EXPOVAS study[J]. *Clinical and experimental rheumatology*, 2017, 35 Suppl 103(1):S40-46.
- [5] Barra LJ, Bateman EA, Rohekar S, et al. Assessment of

- work limitations and disability in systemic vasculitis[J]. *Clinical and experimental rheumatology*, 2016,34(3 Suppl 97):S111-4.
- [6] 刘莎莎. MCP-1 与系统性血管炎的相关性研究[D].新疆医科大学,2019.
- [7] 桂雅迪, 帅宗文. 溶酶体相关膜蛋白-2 及其自身抗体的研究进展[J].*中华风湿病学杂志*, 2016, 20(6):424-428.
- [8] Gonzalez A, Valeiras M, Sidransky E, et al. Lysosomal Integral Membrane Protein-2: A New Player in Lysosome-Related Pathology[J].*Molecular genetics and metabolism*, 2014,111(2):84-91.
- [9] Gibson Kristen M,Kain Renate,Luqmani Raashid A,et al. Autoantibodies Against Lysosome Associated Membrane Protein-2 (LAMP-2) in Pediatric Chronic Primary Systemic Vasculitis.*Frontiers in immunology*.2020;11: 624758.doi:10.3389/fimmu.2020.624758
- [10] 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 a related membrane protein in glomerular endothelial cells[J]. *Journal of experimental medicine*, 1995,181(2):585-597.
- [11] Roth AJ, Brown MC, Smith RN, et al. Anti-LAMP-2 Antibodies Are Not Prevalent in Patients With Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Glomerulonephritis[J]. *Journal of the American society of nephrology*, 2012, 23(3):545-555.
- [12] Wang Lu,Wang Jingbo,Shi Yongquan,et al.Identification of a primary biliary cirrhosis associated protein as lysosome- associated membrane protein-2.*Journal of Proteomics*.2013;91: 569-79. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.019
- [13] Lee Jong-Jer,Ishihara Kenji,Notomi Shoji,et al. Lysosome-associated membrane protein-2 deficiency increases the risk of reactive oxygen species-induced ferroptosis in retinal pigment epithelial cells. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*. 2020;521(2):414-419.doi:10.1016/j.bbrc. 2019. 10.138.
- [14] Lightfoot RW Jr, Michel BA, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa[J]. *Arthritis Rheumatology*, 1990, 33(8):1088-1093.
- [15] Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides[J]. *Arthritis Rheumatology*, 2013, 65(1):1-11.
- [16] Mukhtyar C, Lee R, Brown D, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3) [J]. *Annals of the rheumatic diseases*, 2009, 68(12):1827-1832.
- [17] Monach PA. Biomarkers in vasculitis[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2014,26(1):24.
- [18] 唐莎, 张莹, 施维维. 溶酶体相关膜蛋白-2 抗体诱导中性粒细胞胞外捕网形成的实验研究[J].*免疫学杂志*,2012,(11):968-971.
- [19] Kawakami T, Takeuchi S, Arimura Y, et al. Elevated antilyosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in patients with adult Henoch-Schönlein purpura[J]. *British journal of dermatology*, 2012, 166(6):1206-1212.
- [20] 陈熙, 胡志东. 溶酶体相关膜蛋白 2 抗体在 ANCA 相关性肾炎患者血清中的表达水平及意义[J].*中华肾脏病杂志*,2014,30(7):494-498.
- [21] 牛蒙, 李娜, 孙建平, 等. 溶酶体相关膜蛋白 2 抗体在抗中性粒细胞胞质抗体相关性小血管炎患者血清中的表达及临床意义[J].*中华风湿病学杂志*, 2016, 20(5): 321-324.
- [22] Peschel A, Basu N, Benharkou A, et al. Autoantibodies to hLAMP-2 in ANCA-Negative Pauci-Immune Focal Necrotizing GN[J].*Journal of the American society of nephrology*, 2014,25(3):455-463.
- [23] Kain R, Tadema H, Mckinney EF, et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis[J]. *Journal of the American society of nephrology*, 2012,23(3):556-566.
- [24] Kain R, Exner M, Brandes R, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis[J]. *Nature Medicine*, 2008,14(10):1088-1096.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS