

[3] 马玉杰. 急性二硫化碳、硫化氢等混合气体急性中毒 21 例患者的抢救及护理[J]. 当代医学, 2009, 15(36): 137-138.

[4] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener[J]. EMBO J, 2001, 20(21): 6008-6016.

[5] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318(3): 756-763.

[6] 韩文章, 蔡尚郎. 冠心病患者血浆硫化氢水平变化[J]. 实用医学杂志, 2007, 5(24): 513-516.

[7] Chen YH, Yao WZ, Geng B, et al. Endogenous hydrogen sulfide in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chest, 2005, 128(5): 3205-3211.

[8] 张春雨, 杜军保, 闫辉新, 等. 新型内源性气体信号分子硫化氢对低氧性肺血管胶原重塑的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(7): 448-453.

[9] 李晓惠, 杜军保, 唐朝枢, 等. 内源性硫化氢对高肺血流大鼠肺血管重构及血管活性物质的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(3): 327-331.

[10] Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs[J]. Gastroenterology, 2005, 129(4): 1210-1224.

[11] Levine J, Ellis CJ, Furne JK, et al. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis[J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(1): 83-87.

[12] Deplancke B, Gaskins HR. Hydrogen sulfide induces serum-in-de-

pendent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells[J]. FASEB J, 2003, 17(10): 1310-1312.

[13] Eto K, Ogasawara M, Umemura K, et al. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3386-3391.

[14] Russo CD, Tringali G, Navarra P, et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo pituitary adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat[J]. J Neuroendocrinol, 2000, 12(3): 225-233.

[15] 曾克武, 王学美. 气体信号分子硫化氢与阿尔茨海默病的相关性研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2008, 10(7): 558-560.

[16] Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2007, 11(2): 207-218.

[17] 骆华, 冯爱平, 邱明权. 内源性硫化氢与阴茎勃起[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(2): 207-209.

[18] Chuah SC, Moore PK, Zhu YZ. S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(5): 693-701.

[19] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide[J]. Circulation, 2008, 117(18): 2351-2360.

[20] Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs [J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(10): 501-503.

(收稿日期: 2011-01-20)

• 综 述 •

结合珠蛋白清除血红蛋白作用及机制

龙 雪 综述, 朱光旭, 王惠莹 审校

(中国人民解放军昆明总医院检验科, 昆明 650031)

关键词: 珠蛋白类; 血红蛋白类; 溶血; CD163

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)10-1097-03

结合珠蛋白(Hp)又称触珠蛋白,是1种极丰富的急性时相血浆糖蛋白,结构上是 α_2 球蛋白的一部分,1938年由Polonovski和Jayle^[1]报道。在血管内溶血期间,游离血红蛋白(Hb)可释放入血循环,Hp与这部分Hb结合,Hp-Hb复合物通过与巨噬细胞表面的清道夫受体CD163结合,经内吞作用促进Hb清除,预防Hb相关的毒理效应。不同结构类型Hp与结合珠蛋白相关蛋白(Hpr)共同存在,这些Hpr也可结合Hb。Hp的生物学功能高度依赖于其与Hb结合后与受体之间的亲和力。

1 血管内溶血期间 Hb 的毒理作用

血管内溶血占整个红细胞破坏的10%~20%,这使Hb从O₂/CO₂传输的状态转变为具有高度毒性的物质,其毒性归因于血红素铁与内源性过氧化氢产生反应生成自由基,导致某些组织特别是对肾脏组织的损伤。一氧化氮(NO)是作为信号分子调节平滑肌细胞松弛、内皮黏附分子表达和血小板激活和聚集,Hb是NO的强力清除剂,Hb与NO反应是迅速而不可逆的,导致高铁血红蛋白生成,从而影响NO生物学活性及其血管内稳态。

生理条件下Hp捕获并结合游离Hb,形成复合体后与巨噬细胞表面的CD163受体结合,通过内吞作用,调节Hb毒性,导致Hb分子的肾小球滤过减少,限制了铁的丢失。在感染、创伤、珠蛋白生成障碍型贫血等状况下,血管内溶血可加速,Hp-Hb-CD163调节清除机制被迅速启动并被耗竭,从而产生重要病理反应。

2 Hp 的结构特征

在蛋白水平上,Hp与Hpr有90%的序列相同,两种蛋白都含 α 与 β 亚基,均具有1个特定蛋白控制结构域及1个丝氨酸蛋白酶结构域,亚基之间以二硫键连接。Hp在多数哺乳动物中被发现,在2个 α 、 β 构成的亚单元($\alpha\beta$)之间由二硫键在 α 链的半胱氨酸上构成连接,形成以 $\alpha\beta$ 为一单元的二聚体($\alpha\beta$),相对分子质量约 90×10^3 ,该结构与携带2个Hp1等位基因的人Hp相对应,称为Hp1-1。另有2个Hp2-1和Hp2-2表型也存在于人类。由于复制部分包括 α 链内部二硫键连接的半胱氨酸(在人类位于33位点),Hp2-1和Hp2-2表型为一复杂的含 α 和 β 亚基的多聚体。人Hp分子结构异质性导致电泳时Hp1-1表型显示一单一的、相对快速迁移的蛋白带;Hp2-2表

型显示一系列低迁移带;Hp2-1 表型则在 Hp1-1 各迁移带不同位置上显示不同的低迁移带^[2]。

α 链连接($\alpha\beta$)亚基形成二聚体(Hp1-1 和 Hp2-2 表型)及多聚体(Hp2-1 和 Hp2-2 表型),而 β 链调节了复合体中 Hb 和清道夫受体 CD163 的反应过程。相对于 α 、 β 链趋于保守,整体上 Hp 并无蛋白活性, β 链与鸟氨酸丝氨酸蛋白酶最大的不同是位于丝氨酸蛋白酶结构域的 loop1,该 loop 暴露于表面,与位于丝氨酸蛋白酶上的 loop1 相比,该 loop1 在 Hp 和 Hpr 中被放大,在 Hb 清除中起重要作用。

Hpr 的($\alpha\beta$)亚基由二硫键在 α 链的苯丙氨酸上构成连接,导致 α 链内二硫键缺如,被认为与诱导蛋白分泌有关的 Hpr 氨基末端信号肽仍保持未裂解状态,这一高度疏水性序列可诱导 Hpr 与脂蛋白复合体锥虫溶解因子 1(TLF1)和包含载脂蛋白 A-I(ApoA-1)的锥虫溶解因子 2(TLF2)靶向性结合。TLF1 是高密度脂蛋白(HDL)亚结构成分的一部分,而 TLF2 是包括 IgMs 的含脂很少的复合体,两种 TLF 含有相同蛋白质成分,包括 ApoA-1 及载脂蛋白 L-I(ApoL-1)。

3 Hp 的基因

人 Hp 基因主要存在有 2 个等位基因:Hp1 和 Hp2。Hp2 由 Hp1 基因 1.7 kb DNA 片段演化而来。Hp 有 3 种基本基因表型:Hp1-1、Hp2-1 和 Hp2-2。Hp1 基因表型变化的频率较大,东南亚 Hp1 基因变化频率约 0.1,而在南美洲 Hp1 基因变化频率高达 0.8。Hp2 基因频率也因不同地域而异,亚洲约 0.75,欧洲约 0.6,非洲约 0.3~0.4^[3]。Hp 基因表型的不同分布源于遗传漂移和自然选择。特异的 Hp 表型与疾病类型有关。据相关文献报道,Hp1-1 与肝脏疾病和感染易感性有关,而 Hp2-1 表型与动脉粥样硬化及自身免疫性疾病有关联, Hp2-2 表型则可能与冠状动脉疾病及血管闭塞性疾病相关联^[4]。

Hpr 与 Hp 基因有高度同源性,并在染色体位置上相互邻近, Hp 基因定位于 16q22.1, Hpr 基因位于 16 号染色体 Hp 基因下游 2.2 kb DNA 处。Hpr 基因多数出现于低等动物,在这些 Hp 基因簇中,人仅存 2 个基因^[5]。有学者证实,在黑色人种后代中,携带 Hpr 基因复制频率比较高(多达 6 个 Hpr 基因在单一的染色体上缺失),这就表明 Hpr 基因的多态性在某些环境中可能对人类是有益的。

4 基因表达及在血中的情况

Hp 基因表达最初发现于肝脏,后来在其他组织器官(包括肺、脾、胸腺和心脏等)也陆续被发现。Hp 在健康人血中水平约 0.45~3 mg/mL,该蛋白在针对炎性因子,如白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)等反应中的急性反应阶段合成显著增加,称之为急性时相反反应蛋白,可作为临床上血管内溶血诊断的 1 个常规标志。

Hpr 表达于肝脏,其转录水平仅有 Hp 的 6%,由于 Hpr 表达被内含子中类似逆转录元件抑制, Hpr 在健康人血中水平约 30~40 mg/L,仅为 Hp 水平的 1/10。Hpr 血清水平与血管内溶血不完全相关,但多数 Hpr 与 TLF1、2 紧密关联。

5 Hp 清除 Hb 作用及机制

Hp-Hb 复合体针对 Hp 表型不同,在结合力上有细微差异(Hp1-1>Hp2-1>Hp2-2),通过位于 Hp1 β 链 243~258 位残基的基因敲除实验已证实结合 Hb($\alpha\beta$)亚基的 Hp 上的区域。Hp1-1 可结合 2 个 Hb 的 $\alpha\beta$ 亚基二聚体^[6]。Hp 可促进 Hb 清除和导致抗炎代谢,可对 Hb 毒性作用,起抑制作用以及防止 Hb 的过氧化改变。尽管 CD163 可结合 Hp-Hb,促进 Hb

清除,但是并非所有具有 CD163 受体的细胞一定具有此功能,如:肝细胞可通过受体依赖机制吞噬 Hp-Hb,但在 Hp-Hb 吞噬过程中,巨噬细胞的作用是在患者使用了药物治疗后血浆中 Hp-Hb 积累,巨噬细胞减少时发现的。

Hb 与 CD163 具较多的低亲和力, Hp 不能单独结合受体,只有与 Hb 结合后才能与 CD163 结合,在无 Hp 存在时也可部分由 CD163 吞噬。大量血液透析患者中,可消除由于 Hp 不足而导致的剩余 Hb 清除^[7]。Hp-Hb 复合体与 CD163 之间的高亲和力主要依赖于 CD163 受体半胱氨酸富集结构域以及 Hp β 链上的残基,包括谷氨酸 261、赖氨酸 262 及苏氨酸 264, 3 个残基一直被认为直接参与了受体结合,在位于 Hp 丝氨酸蛋白酶结构域的 loop1 为丝氨酸结构区域提供了一全新功能^[8]。在 Hp-Hb-CD163 反应中,CD163 与 Hb 和 Hp2-2 复合体的亲和力比 Hp1-1-Hb 复合体的亲和力更强,推测是由 Hp2-2-Hb 复合体中有多重受体结合位点所致^[9]。

在 CD163 调节 Hp-Hb 内吞后,该蛋白被溶酶体溶解,而由 Hb 来源的血红素则通过溶酶体血红素氧化酶(HO-1)转化为低毒素的 Fe^{2+} 、一氧化碳(CO)和胆绿素,胆绿素随后通过胆绿素还原酶转化为胆素原,该 Hp-CD163-HO-1 系统形成了 Hb 清除/代谢和抗炎反应宏观机制。HO-1 通常被认为具有保护功能,在血红素代谢过程中产生的 3 种代谢产物,即 CO、胆红素(或其代谢产物胆素原)以及 Fe^{2+} 的抗炎、抗凋亡和抗增殖效应中的 1 种或多种作用。特别是 CO,其作用类似于 HO-1 的保护效应,胆红素和胆素原很大程度上也通过抗氧化作用调节了保护功能, Fe^{2+} 在另一方面诱导铁螯合形成铁蛋白,调节 Fe^{2+} 的结合,几种治疗药物如 IL-1 以及前列腺素的功能由 HO-1 活化^[10]。

Hp、CD163 和 HO-1 均可被炎性细胞因子 IL-6 诱导,这些蛋白在炎性条件下表达均上调,促进了 Hb 的清除和代谢。由于血红素代谢的抗氧化和抗炎性效果,Hb 由 Hp-CD163 调节通过单核/巨噬细胞系统导致抗炎性反应发生。Hp-Hb 结合到细胞表面 CD163 后,通过细胞内信号会进一步促进抗炎性反应。应用抗体调节的与细胞表面 CD163 交联信号可激发细胞内信号途径,促进 Ca^{2+} 动员、三磷酸肌醇合成、IL-6 以及粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的分泌^[11]。同样, Hp-Hb 结合于细胞表面 CD163,也可促进 Ca^{2+} 动员、三磷酸肌醇合成以及 IL-6 与 IL-10 分泌,后者的分泌伴随着 HO-1 诱导^[12]。鉴于 IL-6 对 Hp、CD163 和 HO-1 的上调效应以及 IL-10 对 CD163 和 HO-1 的上调效应,可推测 IL-6、IL-10 也与 Hb 清除机制密切相关,促进红细胞破坏后 Hb 的清除和血红素降解。Hp1-1-Hb 较 Hp2-2-Hb 能刺激巨噬细胞更高水平的 IL-6 和 IL-10 分泌,该过程依赖于 Hp-Hb 与 CD163 结合,以及酪蛋白激酶活性^[13]。也有文献报道显示在 Hp-Hb 结合到 CD163 后未检测到蛋白磷酸化依赖性信号转导,当 CD163 表达细胞被置于高度纯化的 Hb 与 Hp 复合体存在的环境中时,未检测到 IL-10 表达和分泌。因此,CD163 可能是作为 Hb 的运输子促进 Hb/血红素内吞代谢诱导 HO-1 上调,商品化 Hb 的内毒素污染也可导致 IL-10 分泌^[14]。

功能上,与 Hb 相互作用的 Hp 具有不同表型,包括与 Hb 和 CD163 结合力各异,以及通过 CD163 作用对 Hp-Hb 清除率也有差别,在细胞表面通过 Hp-Hb 结合到 CD163 后启动内吞信息也有所差异,对于防止或降低 Hb 介导的氧化反应也有所不同,在能力上 Hp1-1 优于 Hp2-2^[15]。可以认为,具有 Hp2-2 表型的糖尿病患者发展成心血管疾病的概率翻了几倍,进一步

揭示糖尿病患者 Hp2-2 与心血管疾病之间的部分机制^[16];在糖尿病患者,糖化血红蛋白显著增加的人群中, Hp 的抗氧化功能普遍减退。基于这一发现,即 Hp2-2 和 Hp 复合体清除 Hb 效率显著低于 Hp1-1-Hb,因此推测 Hp2-2 表型的糖尿病患者应具有更高强度的氧化应激反应。

6 在临床的潜在应用

Hp 和 Hpr 从结合 Hb 能力的角度上两者均可谓为结合珠蛋白,尽管拥有类似结构特征和功能, Hp 和 Hpr 却拥有不同 Hb 依赖性生物学作用。Hp 与 CD163 协同可从血液循环中清除 Hb,因此对抗游离 Hb/血红素的毒性效应。由于 HO-1 调节的抗炎性血清代谢产物及 Hp-Hb 结合到 CD163 引起的信号级联被认为有助于该反应进一步阐明了抗炎机制。

Hp-Hpr-Hb 系统医学上可能的应用潜力值得进行进一步深入研究。从诊断角度讲, Hp/Hpr 可与 Hb 结合形成复合体,该复合体以每小时 15 mg Hb/100 mL 血浆的速度代谢,若 Hb 的释放量超出正常的 2~3 倍,血清中的 Hp 水平会降低,若发生血管内溶血, Hp 水平显著下降,如溶血性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PHN)、遗传性球形红细胞增多症(HS)等, Hp 可作为溶血的基本标志,而在感染、组织损伤等炎性刺激状态下, Hp 合成明显增加,反映了急性反应状态;然而当与其他标志物结合时, Hp 表型在冠心病的预防、治疗在疾病风险评估中具有较高价值。此外,与该系统相关分子如 CD163 等与巨噬细胞活性明显相关,在血浆中不同水平的可溶性状态出现,也可作为感染炎症疾病的潜在生物学标志。

治疗方面,在单核细胞系的细胞表面选择性表达 CD163 可能有助于靶向性诱导药物到单核/巨噬细胞,通过针对 Hp-Hb 复合体的药物研发来实现这些治疗策略。在很多的疾病,如抗炎性疾病、感染以及特定的癌症患者,这些疾病均拥有表达 CD163 的巨噬细胞和(或)树突状细胞,也许可以作为病理学诊断的关键细胞类型,识别 Hp/Hpr-Hb 受体具有高亲和力,用特异性的靶向药物来避免目前使用药物所产生的不良反应是极有可能的。

总之, Hp 在 Hb 清除中发挥了重要作用,深入认识其清除机制,在血管内溶血相关疾病诊断和治疗上可为临床所用。

参考文献

[1] Polonovski M, Jayle MF. Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'act peroxydasique de l'am hemoglobine[J]. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales. 1938, 129(2):457-460.

[2] Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C, et al. A unique loop extension in the serine protease domain of haptoglobin is essential for CD163 recognition of the haptoglobin-hemoglobin complex[J]. J Biol Chem, 2007, 282(7):1072-1079.

[3] Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases[J]. Int J

Lab Hematol, 2007, 29(8):92-110.

[4] Atkinson SH, Mwangi TW, Uyoga SM, et al. The haptoglobin 2-2 genotype is associated with a reduced incidence of Plasmodium falciparum malaria in children on the coast of Kenya[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(1):802-809.

[5] Cox SE, Doherty C, Atkinson SH, et al. Haplotype association between haptoglobin(Hp2) and Hp promoter SNP(A-61C) may explain previous controversy of haptoglobin and malaria protection[J]. PloS ONE, 2007, 2(1):e362.

[6] Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification[J]. Blood, 2009, 113(10):2578-2586.

[7] Maniecki MB, Hasle H, Friis-Hansen L, et al. Impaired CD163-mediated hemoglobin-scavenging and severe toxic symptoms in patients treated with gemtuzumab ozogamicin[J]. Blood, 2008, 112(6):1510-1514.

[8] Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2003, 92(6):1193-1200.

[9] Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, et al. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin[J]. Circ Res, 2006, 99(6):943-950.

[10] Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme[J]. Trends Immunol, 2003, 24(10):449-455.

[11] Abraham NG, Drummond G. CD163-mediated hemoglobin-heme uptake activates macrophage HO-1, providing an anti-inflammatory function[J]. Circ Res, 2006, 99(3):911-914.

[12] Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis; anti-inflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery[J]. Circ Res, 2004, 94(3):119-126.

[13] Guetta J, Strauss M, Levy NS, et al. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin[J]. Atherosclerosis, 2007, 191(5):48-53.

[14] Strauss M, Levy AP. Regulation of CD163 associated casein kinase II activity is haptoglobin genotype dependent[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 317(3):131-135.

[15] 谭丽娜, 黄进华. 结合珠蛋白研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(1):43-47.

[16] 刘海波, 施育平. 结合珠蛋白多态性与冠心病[J]. 国际心血管病杂志, 2008, 35(1):19-22.

(收稿日期:2011-03-01)

不同类型资料的相互转化

如检测 4 名成年人的红细胞平均体积(MCV),检测结果分别为 73、90、95、112 fl,即为计量资料;如按参考范围(80~100 fl)对受试对象进行分类,可分为降低组(1例)、正常组(2例)、升高组(1例),即为等级资料;如具体分类为正常组 2 例,异常组 2 例,即为二分类资料,即计数资料。