

# 补体旁路途径在抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎中的作用及研究进展<sup>\*</sup>

上海交通大学医学院附属仁济医院 朱文博 黄琳琳 王娟 陈盛\*, 上海 200001

**关键词** 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎; 补体旁路途径; C5a 受体

**中图分类号** R593.2 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20210202

抗中性粒细胞胞浆抗体(antineutrophil cytoplasmic autoantibody, ANCA)相关性血管炎(ANCA associated vasculitis, AAV)是一组以坏死性小血管炎为特征的自身免疫性疾病。AAV 包括肉芽肿性多血管炎(granulomatosis with polyangiitis, GPA)、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)和嗜酸性肉芽肿性多血管炎(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA)。AAV 常累及全身多个脏器,以肾和肺的累及最为突出,也最为凶险。在早期的研究中,AAV 患者的病理组织中只发现少量的免疫复合物沉积,加之缺乏补体消耗的依据,因此,既往研究认为补体系统与 AAV 关系不大。随着研究的进展,发现在病变部位可见到少量的补体沉积<sup>[1]</sup>,使得人们重视对补体系统的研究。针对补体旁路途径中 C5aR 的抑制剂 CCX168 在目前的临床试验中也取得了不错的效果,本文对补体旁路途径在 AAV 发病机制中的研究进展以及相关药物研究进展作一综述。

## 补体系统概述

补体(Complement, C)系统是在长期的种系进化过程中获得的一种固有免疫因素,同时它也在适应性免疫中发挥效应。补体由 9 种成分组成,分别命名为 C1 ~ C9。这些成分大多是以酶的前体形式存在于血清中,需经过激活后才能发挥生物学活性作用。补体系统的激活可以从 C1 开始,这种从头开始的激活途径称为经典途径;补体系统的激活也可以越过 C1、C2、C4,直接从 C3 开始,这种途径称为补体旁路途径;此外,病原微生物表面的甘露糖等成分也可以通过凝集素途径直接激活补体系统。这三条途径最终都生成 C3 转化酶,使得 C3 裂解为

C3b,从而继续下游补体系统的激活。

经典途径主要由抗原抗体复合物介导,旁路途径则是更为古老的、原始的激活途径。参与激活旁路途径的因子包括 B 因子、D 因子和 P 因子等,它们构成补体的第二组分。其后又发现多种参与控制补体活化的抑制因子或灭活因子,如 C1 抑制物、I 因子、H 因子、C4 结合蛋白(C4BPA)、过敏毒素灭活因子等。这些因子可控制补体分子的活化,对维持补体在体内的平衡起调节作用,它们构成了补体的第三组分。

## 补体系统在 AAV 中发病机制

AAV 的发病机制目前尚未完全明确。既往认为经典的 AAV 发病机制是慢性感染或炎症通过白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等细胞因子激活中性粒细胞,之后诱导黏附分子以及内皮细胞活化,使得抗髓过氧化物酶抗体(myeloperoxidase-ANCA, MPO-ANCA)与抗蛋白酶-3 抗体(proteinase 3, PR3-ANCA)向细胞膜移位。MPO-ANCA、PR3-ANCA 与 Fc 受体连接,导致中性粒细胞脱颗粒,释放活性氧与蛋白酶,从而损伤血管内皮细胞,导致 AAV 的发生<sup>[2]</sup>。

在 AAV 中,活化的中性粒细胞也可以激活补体旁路途径,其中 C5a 及 C5a 受体起着重要的作用<sup>[3]</sup>。C5 可被 C5 转化酶裂解 C5a 及 C5b, C5b 主要是参与膜攻击复合体(membrane attack complex, MAC)的形成介导细胞溶解效应,而 C5a 有广泛的生物学效应。C5a 可以趋化并活化中性粒细胞,增加中性粒细胞上黏附分子的表达,并参与中性粒细胞的脱颗粒过程,从而进一步放大炎症效应。C5a 的受体包括 C5a 受体(C5aR)及 C5L2 受体(C5L2R), C5aR 介导了 C5a 的大部分作用。关于 C5L2R 的作用尚不明且存在争议。有研究认为 C5L2 具有抗炎功能<sup>[4]</sup>,也有研究表明,抑制 C5L2

<sup>\*</sup>基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81771752)

<sup>\*</sup>通信作者:陈盛, E-mail:13917556052@139.com

受体可以降低中性粒细胞的自身抗原的表达,提示 C5L2 受体可能同样起着促炎作用<sup>[5]</sup>。

此外,中性粒细胞死亡时会形成一个特有的结构叫做中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)。NETs 是中性粒细胞杀菌的重要武器,但也对血管内皮细胞产生毒性作用。NETs 进一步诱导 ANCA 的产生,激活补体旁路途径。NETs 的形成可能与 ANCA 的滴度并不相关,但是可以反映疾病活动性<sup>[6]</sup>。ANCA、中性粒细胞活化以及补体旁路途径激活的正反馈机制,已经得到多个研究的证实<sup>[7,8]</sup>。

近几年研究发现,补体系统与凝血系统也存在着相互作用。C5a 激活的中性粒细胞,可以释放组织因子,从而激活凝血系统并产生凝血酶<sup>[9]</sup>。这些凝血酶可以激活血小板。而这些被激活的血小板具有激活补体旁路途径的作用<sup>[10]</sup>,并且通过释放 CXCL4 促进 NETs 的形成<sup>[11]</sup>。临床上 AAV 患者出现血小板升高、静脉血栓、高凝血症的情况并不少见<sup>[12]</sup>。对 AAV 老鼠予以重组血栓调节蛋白(recombinant thrombomodulin, rTM)治疗可以改善肺出血和肾小球肾炎,并抑制 ANCA 和 NETs 的形成<sup>[13]</sup>。这些研究均提示补体旁路系统导致的凝血系统激活在 AAV 发病机制中也有重要作用。

另外,在老鼠表达 PR3 的凋亡嗜碱性白细胞上,观察到 C1q 结合增加,为 C1q 和 PR3 在清除凋亡细胞中的作用提供了新的线索<sup>[14]</sup>,提示 AAV 中补体系统与凋亡细胞清除缺陷存在某些关系,但尚且缺乏更多的研究支持。

### AAV 中补体旁路系统异常活化

补体分子是分别由肝细胞、巨噬细胞以及肠黏膜上皮细胞等多种细胞产生<sup>[15]</sup>。人类某些疾病的总补体含量或单一成分含量可发生变化,因而对体液中补体水平的测定,或组织内补体定位,对一些疾病的诊断具有一定意义。

补体旁路途径在 AAV 动物模型上的研究由来已久。在早期研究中,通过将小鼠被动免疫产生的 MPO-ANCA 转移至野生型和核基因重组激活基因 2(RAG2)缺陷的小鼠体内,发现 RAG2 缺乏的小鼠出现坏死性新月体肾炎(necrotizing crescent glomerulonephritis, NCGN),证实 ANCA 对于肾脏的直接致病性。接着 Xiao 等<sup>[16]</sup>进一步开展了补体途径的探索。在小鼠模型中,通过消耗 C3、使 C5 失活、敲除 B 因子(一种补体旁路途径的标记物),可以有效阻

止 NCGN 的发展,而敲除 C4(一种补体经典途径和凝集素结合途径的标记物)却仍会进展为 NCGN,证实了 ANCA 相关性的 NCGN 是由补体旁路途径激活,而非免疫复合物激活的补体经典途径所致。在后续的试验中,在转移 MPO-ANCA 前对小鼠予以抑制 C5 的单克隆抗体(BB5.1)进行预处理,观察到发展为 NCGN 的小鼠比例明显减少,而在转移 MPO-ANCA 后再用 BB5.1 进行治疗,观察到新月体的病变较轻以及蛋白尿减少<sup>[17]</sup>,表明 C5 在补体旁路途径中起着重要作用,而且对治疗有着潜在的意义。然而,目前的动物模型均为 MPO-ANCA 的小鼠模型。由于小鼠与人类的 PR3 的结构及表达不同,目前尚未有 PR3-ANCA 的 AAV 小鼠模型可用<sup>[18,19]</sup>。此外,这些模型主要都是针对肾脏病变进行研究,对于其他器官的模型研究尚少。

AAV 患者血浆中补体旁路途径的产物与疾病的活动性密切相关。通过对 AAV 患者血浆中补体成分的测定,观察到 C3a、C5a、sC5b-9 的含量均高于正常人,且与肾脏病变严重程度相关,但激活的补体成分可能因疾病活动或 ANCA 血清型不同而异<sup>[20,21]</sup>。这表明补体旁路途径在 AAV 患者中有明显激活。此后,多项研究发现,部分 AAV 患者初诊时体内的 C3 水平较低,而 C3 在肾脏的沉积可能与毛细血管的增生程度相关<sup>[22]</sup>,因此往往合并严重的肾脏疾病,并且肾脏存活率更低<sup>[23~25]</sup>。进一步在老鼠模型上对 C3aR 进行研究时,发现 C3aR 虽然可以促进巨噬细胞向炎症肾小球的募集,调节 ANCA 的生成,但没有改变组织学的严重程度<sup>[26]</sup>。因此 C3aR 可能对疾病致病机制并不重要。

Bb 因子与 C3a、C5a 的水平相关,被认为可以用来作为评价补体旁路激活程度的生物标志物<sup>[27]</sup>。Bb 因子的水平,还与疾病活动性以及肾脏病理病变程度相关<sup>[20]</sup>。Bb 因子越高,新月体数量越多。因此,Bb 因子既可反映病变的严重程度,也可反映补体旁路途径的激活程度。同样,H 因子在旁路途径中也起着重要作用。在活动性 AAV 患者中 H 因子的下降,可能是 AAV 预后的独立预测因素<sup>[28]</sup>。进一步的研究还发现 H 因子与 MPO-ANCA 相关,两者的相互作用,可能活化了补体途径<sup>[29]</sup>。

在肾脏病理中,AAV 的肾小球肾炎一直被归类为“寡免疫复合物沉积型”。但在电镜或免疫荧光法观察下,可以看到免疫球蛋白和补体的沉积相当常见<sup>[30]</sup>。补体成分(Bb 因子、C3 产物等)的沉积与补体调节蛋白(CD46, CD55 and CD59)的高表达很

有可能与组织损伤相关,包括肾小球的硬化与间质纤维化<sup>[31,32]</sup>。

### 阻断补体旁路系统异常活化可改善 AAV 疾病进展

补体旁路系统的异常活化在 AAV 的发病过程中得到了部分阐述,针对补体旁路系统异常活化的干预手段可能会成为 AAV 治疗的有效手段。C5aR 基因缺失可导致对小鼠 MPO 的自身免疫性降低, MPO-ANCA 生成减少,而抑制 C5aR 可以减少肾小球毛细血管内中性粒细胞滞留和活性氧爆发,从而实现对组织的保护<sup>[17]</sup>。给予小鼠口服 C5aR 抑制剂 CCX168 后,可以阻断 NCGN 的进展,这也成为了在人体上尝试使用 CCX168 的基础<sup>[4]</sup>。

随着对补体的病理生理机制研究的深入,针对补体旁路途径的药物研究也逐渐开展。目前有两种相对成熟的针对 C5a 受体的药物正在开展临床试验。口服的小分子制剂 CCX168 (Avacopan),是选择性 C5a 受体 (CD88) 的抑制剂,可以通过竞争性结合 C5a 受体,阻断 ANCA 介导中性粒细胞聚集和活化。Avacopan 目前在活动性的 MPA 与 GPA 患者中进行 II 期临床试验 (NCT01363388)<sup>[33]</sup>。入组患者在给予环磷酰胺或利妥昔单抗的治疗下,接受了为期 12 周的观察。结果表明服用 Avacopan 可以减少或替代口服糖皮质激素的使用,甚至在降低伯明翰系统性血管炎活动评分 (Birmingham vasculitis activity score, BVAS)、控制蛋白尿与血尿方面更有优势。在为期 52 周的治疗中,替代标准剂量的糖皮质激素观察到维持缓解的效果更优于口服糖皮质激素 (NCT02994927)<sup>[34]</sup>。Avacopan 使得不用糖皮质激素来诱导缓解变成可能,有着里程碑式的意义<sup>[35]</sup>。IFX-1 是另外一种针对 C5a 补体途径的单克隆抗体,也正在 AAV 患者中进行 II 期临床试验 (NCT03712345)<sup>[36]</sup>。实验设计与 Avacopan 的临床试验类似,进一步的结果尚且需要等待。此外, C5 单抗 (eculizumab) 是针对 C5 的单克隆抗体,可以通过结合 C5 来减少 C5a 和 C5b 的生成,在阵发性睡眠性血红蛋白尿症的患者中已获得疗效,但尚未在 AAV 患者中进行临床试验。在一些个案报道中,可能对难治性的 AAV 有一定益处,但仍需要更多数据支持<sup>[37,38]</sup>。

### 总结及展望

随着对 AAV 研究的深入,AAV 已经逐渐从一种急性致命性的疾病转变为一种慢性可控的疾病。

虽然糖皮质激素联合环磷酰胺或利妥昔单抗在 AAV 中的诱导缓解以及维持治疗中取得了较好效果,但目前的治疗困境仍然存在。例如,当前诱导缓解治疗时间过长,以至出现不可逆器官损伤,以及如何避免治疗期间的严重获得性感染。试图精准靶向补体旁路途径,来打破补体与中性粒细胞之间的正反馈环路,从而控制疾病发展,是一个切实可行的思路。然而针对补体途径治疗的临床经验很少,而且相关的研究都是针对肾脏累及为主,对于其他累及的系统是否有同样的效果,仍需更多的数据支持。另外,目前尚未有可靠的生物标志物来评估补体旁路途径的活化程度,可能导致在应用 C5a 受体抑制剂时缺乏有效的监管。因此,针对补体旁路途径的相关研究仍有着广阔的前景。

### 参考文献

- 1 Xing GQ, 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): 282-291.
- 2 Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Phagocyte NADPH Oxidase Restrains the Inflammasome in ANCA-Induced GN [J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26 (2): 411-424.
- 3 Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, et al. C5a Receptor Mediates Neutrophil Activation and ANCA-Induced Glomerulonephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 (2): 289-298.
- 4 Xiao H, Dairaghi DJ, Powers JP, et al. C5a Receptor (CD88) Blockade Protects against MPO-ANCA GN [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25 (2): 225-231.
- 5 Hao J, Wang C, Yuan J, et al. A Pro-inflammatory Role of C5L2 in C5a-Primed Neutrophils for ANCA-Induced Activation [J]. Plos One, 2013, 8 (6): e66305.
- 6 Kraaij T, Kamerling SWA, Van Dam LS, et al. Excessive neutrophil extracellular trap formation in ANCA-associated vasculitis is independent of ANCA [J]. Kidney Int, 2018, 94 (1): 139-149.
- 7 Chen M, Jayne DRW, Zhao MH. Complement in ANCA-associated vasculitis: mechanisms and implications for management [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13 (6): 359-367.
- 8 Schreiber A, Rousselle A, Becker JU, et al. Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (45): E9618-E9625.
- 9 Huang YM, Wang H, Wang C, et al. Promotion of Hypercoagulability in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis by C5a-Induced Tissue Factor-Expressing Microparticles and Neutrophil Extracellular Traps [J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67 (10): 2780-2790.
- 10 Miao D, Li DY, Chen M, et al. Platelets are activated in ANCA-associated vasculitis via thrombin-PARs pathway and can activate the alternative complement pathway [J]. Eur Immunol, 2019, 49: 813-813.

- 11 Matsumoto K, Yasuoka H, Suzuki K, et al. Platelet CXCL<sub>4</sub> Mediates Neutrophil Extracellular Traps Formation in ANCA-associated Vasculitis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):222.
- 12 Willeke P, Kumpers P, Schluter B, et al. Platelet counts as a biomarker in ANCA-associated vasculitis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2015, 44(4):302-308.
- 13 Watanabe-Kusunoki K, Nakazawa D, Kusunoki Y, et al. Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection[J]. *J Autoimmunity*, 2020, 108:102390.
- 14 Tacnet-Delorme P, Gabillet J, Chatfield S, et al. Proteinase 3 Interferes With C1q-Mediated Clearance of Apoptotic Cells[J]. *Front Immunol*, 2018, eCollection.
- 15 Xiao H, Heeringa P, Hu PQ, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(7):955-963.
- 16 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.
- 17 Dick J, Gan PY, Ford SL, et al. C5a receptor 1 promotes autoimmunity, neutrophil dysfunction and injury in experimental anti-myeloperoxidase glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(3):615-625.
- 18 van der Geld YM, Hellmark T, Selga D, et al. Rats and mice immunised with chimeric human/mouse proteinase 3 produce autoantibodies to mouse Pr3 and rat granulocytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(12):1679-1682.
- 19 Salama AD, Little MA. Animal models of antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2012, 24(1):1-7.
- 20 Wu EY, Mcinnis EA, Boyer-Suavet S, et al. Measuring Circulating Complement Activation Products in Myeloperoxidase- and Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(11):1894-1903.
- 21 Antovic A, Mobarrez F, Manojlovic M, et al. Microparticles Expressing Myeloperoxidase and Complement C3a and C5a as Markers of Renal Involvement in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis[J]. *J Rheumatol*, 2020, 47(5):714-721.
- 22 Augusto JF, Langs V, Demiselle J, et al. Low Serum Complement C3 Levels at Diagnosis of Renal ANCA-Associated Vasculitis Is Associated with Poor Prognosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158871.
- 23 Martinez MSA, Ruiz CR, Sanchez RS, et al. C3 deposits worsens the prognosis in type III extracapillary glomerulonephritis[J]. *Nefrologia*, 2018, 38(2):213-219.
- 24 Deshayes S, Aoubal A, Khoy K, et al. Hypocomplementemia is associated with worse renal survival in ANCA-positive granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4):e0195680.
- 25 Crnogorac M, Horvatic I, Kacinari P, et al. Serum C3 complement levels in ANCA associated vasculitis at diagnosis is a predictor of patient and renal outcome[J]. *J Nephrol*, 2018, 31(2):257-262.
- 26 Dick J, Gan PY, Kitching AR, et al. The C3aR promotes macrophage infiltration and regulates ANCA production but does not affect glomerular injury in experimental anti-myeloperoxidase glomerulonephritis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1):e0190655.
- 27 Ganter MT, Brohi K, Cohen MJ, et al. Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma[J]. *Shock*, 2007, 28(1):29-34.
- 28 Chen SF, Wang FM, Li ZY, et al. Complement Factor H Inhibits Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Induced Neutrophil Activation by Interacting With Neutrophils[J]. *Front Immunol*, 2018, eCollection.
- 29 Chen SF, Wang FM, Li ZY, et al. Myeloperoxidase influences the complement regulatory activity of complement factor H[J]. *Rheumatology*, 2018, 57(12):2213-2224.
- 30 Van Timmeren MM, Chen M, Heeringa P. Review article: Pathogenic role of complement activation in anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis[J]. *Nephrology*, 2009, 14(1):16-25.
- 31 Cheng L, Gou SJ, Qiu HY, et al. Complement regulatory proteins in kidneys of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 191(1):116-124.
- 32 Kallenberg CGM, Heeringa P. Complement is crucial in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(1):16-18.
- 33 Jayne DRW, Bruchfeld AN, Harper L, et al. Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(9):2756-2767.
- 34 Jayne DRW, Merkel PA, Schall TJ, et al. Avacopan for the Treatment of ANCA-Associated Vasculitis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(7):599-609.
- 35 Warrington KJ. Avacopan-Time to Replace Glucocorticoids? [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(7):664-665.
- 36 Riis PT, Thorlacius LR, Jemec GB. Investigational drugs in clinical trials for Hidradenitis Suppurativa[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(1):43-53.
- 37 Ribes D, Belliere J, Piedrafitra A, et al. Glucocorticoid-free induction regimen in severe ANCA-associated vasculitis using a combination of rituximab and eculizumab[J]. *Rheumatology*, 2019, 58(12):2335-2337.
- 38 Manenti L, Urban ML, Maritati F, et al. Complement blockade in ANCA-associated vasculitis; an index case, current concepts and future perspectives[J]. *Intern Emerg Med*, 2017, 12(6):727-731.

(2021-02-05 收稿)