

· 临床论著 ·

DNase I 在多发性肌炎和皮肌炎中的作用

张思功 卢昕 田小兰 陈芳 王艳 杨文芳 张寅丽 周航 杨澜波 袁凯 王国春

【摘要】 目的 研究 DNase I 在多发性肌炎和皮肌炎发病机制中的作用。方法 选择 2011 年 12 月至 2012 年 10 月在中日友好医院风湿免疫科住院患者中符合多发性肌炎 (PM)/皮肌炎 (DM) 诊断标准的 61 例患者作为病例组。同期选择 48 例健康成年人作为对照组。辐射状酶扩散法测定血浆 I 型脱氧核糖核酸酶 (DNase I) 活性,并与患者血清学指标进行相关性分析。在 DNase I 活性受损的患者血浆中添加外源性 DNase I 和微球菌核酸酶 (MNase),进一步分析 DNase I 活性受损的原因。结果 DNase I 活性在 PM/DM 组为 (0.3353 ± 0.1894) U/ml,显著低于健康对照组 [(0.5441 ± 0.2536) U/ml, $P < 0.0001$]。36 例 DNase I 活性显著受损的患者血浆中添加外源性重组 DNase I 后,11 例患者的血浆不能明显恢复 DNase I 活性,而添加 MNase 后,患者血浆对底物 dsDNA 的降解完全恢复,说明这些患者血浆中存在 DNase I 的特异性抑制剂。相关性分析提示 DNase I 活性与血清球蛋白 ($r = 0.366, P = 0.005$) 和 IgG ($r = 0.322, P = 0.012$) 呈正相关。结论 PM/DM 患者血浆 DNase I 活性显著低于健康对照;部分 PM/DM 患者血浆中存在 DNase I 的特异性抑制剂;DNase I 的活性受损可能在 PM/DM 发病中起一定作用。

【关键词】 多发性肌炎; 皮肌炎; 脱氧核糖核酸酶 I

Contribution of DNase I in patients with polymyositis and dermatomyositis ZHANG Si-gong, LU Xin, TIAN Xiao-lan, CHEN Fang, WANG Yan, YANG Wen-fang, ZHANG Yin-li, ZHOU Hang, YANG Kan-bo, YUAN Kai, WANG Guo-chun. Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China
Corresponding author: WANG Guo-chun, Email: guochunwang@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate activity of plasma DNase I in patients with polymyositis (PM) and dermatomyositis (DM). **Methods** From the Department of Rheumatology of China-Japan Friendship Hospital (December 2011 to October 2012), 61 patients who satisfied the Bohan & Peter criteria for PM/DM were recruited for this study. To form a control group, 48 age and sex-matched healthy Chinese adults were selected during the same period. DNase I activity was measured by radial enzyme-diffusion method. The mechanism of impaired DNase I activity was further analyzed by adding exogenous DNase I and MNase to plasma samples. Correlation analysis were performed between DNase I activity and other serological items. **Results** DNase I activity in PM/DM group was (0.3353 ± 0.1894) U/ml, significantly lower than that in healthy control group [(0.5441 ± 0.2536) U/ml, $P < 0.0001$]. Eleven patients with PM/DM cannot completely restore DNase I activity by adding exogenous DNase I but restore DNase I activity after being added MNase, indicating specific inhibitor of DNase I occurring in plasma of these patients. DNase I activity positively correlated with globulin ($r = 0.366, P = 0.005$) and IgG ($r = 0.322, P = 0.012$). **Conclusion** DNase I activity is impaired in PM/DM patients. Specific inhibitors of DNase I occur in plasma of a subset of PM/DM patients. Impaired DNase I activity may play a role in pathogenesis of PM/DM.

【Key words】 Polymyositis; Dermatomyositis; Deoxyribonuclease I

多发性肌炎 (polymyositis, PM) 和皮肌炎 (dermatomyositis, DM) 是最常见的特发性炎症性肌病 (idiopathic inflammatory myopathy, IIM)。虽然它们的发病机制不尽相同,但是针对不同自身抗原的自身抗体形成是共同特征^[1-3]。在自身免疫病中,尤其是系统性红斑狼疮

(systemic lupus erythematosus, SLE) 中,自身抗体的形成与 I 型脱氧核糖核酸酶 (DNase I) 的活性受损造成的凋亡碎片的清除异常有关^[4-5]。而且新的研究发现中性粒细胞在形成中性粒细胞胞外网状陷阱 (neutrophil extracellular trap, NET) 去捕获并杀灭入侵的病原微生物的同时释放出了多种核内和胞内成分,如果不能及时被降解,就可能成为潜在的自身抗原^[6-7]。DNase I 作为水解 dsDNA 的特异性核酸内切酶^[8-9],如果其活性受损而不能及时降解凋亡碎片和 NET,过多的循环性游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 可以与蛋

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.13.030

作者单位: 100730 北京协和医学院研究生院(张思功、王国春); 中日友好医院风湿免疫科(张思功、卢昕、田小兰、陈芳、王艳、杨文芳、张寅丽、周航、杨澜波、袁凯、王国春)

通讯作者: 王国春, Email: guochunwang@hotmail.com

白质等形成复合物并在循环中长时间存在,增加对机体免疫系统的抗原刺激,若机体免疫调节异常,这些胞外免疫复合物可能会诱发自身抗体的形成^[10-12]。PM/DM 作为自身免疫性疾病, DNase I 在其发病中的作用仍然不明。本研究测定 DNase I 的活性,分析酶活性受损的原因并与临床血清学指标做一相关性分析,现报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:2011年12月至2012年10月在中日友好医院住院治疗的61例PM/DM患者满足B/P诊断标准^[13-14],作为PM/DM组。排除标准:合并其他自身免疫病或伴有感染。48例同期性别和年龄匹配的健康志愿者作为对照组,各组基本资料见表1。研究获中日友好医院研究伦理委员会同意。抽取参与者全血10 ml,3000 rpm/min离心10 min,血浆0.5 ml分装后-30℃冻存,用于检测血浆DNase I活性。

2. 血清学资料:从中日友好医院电子病历系统调取患者抽血同时期的自身抗体、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反应蛋白、补体、免疫球蛋白、中性粒细胞计数、血清球蛋白、肌酸激酶(creatinine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)等资料。

3. DNase I活性的测定:采用辐射状酶扩散法测DNase I活性^[15]。该法基于对底物dsDNA的降解,配制含有dsDNA(Sigma)和核酸染料Sybr Green(Sigma)的琼脂糖(Biowest)凝胶,用血浆扩散降解底物dsDNA后用凝胶成像系统测量扩散面积。具体步骤为:牛甲状腺dsDNA用蒸馏水溶解为5 mg/ml的溶液取1.86 ml, DNase I的缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂, 50 mmol/L NaCl)取18.14 ml, Sybr Green取10 μl,混匀后加热至40~50℃,配制20 ml 2%的琼脂糖凝胶待温度降至40~50℃时与配制好的混合液混匀,将胶倒入96孔细胞培养板的板盖中,待胶凝固后每孔用10 μl吸头加入

2 μl血浆,用已知浓度的DNase I(Worthington Biochemical Corporation)配制标准品,每孔加入从1.1 U/ml倍比稀释到0.034 U/ml的DNase I标准品各2 μl,胶用自封袋封口后避光37℃温箱孵育12 h。凝胶成像系统拍照,IPP 6.0软件定量分析。图1为凝胶成像系统拍摄的DNase I标准品水解底物DNA的面积,黑圈面积越大,酶活性越高。

4. 统计学分析:采用Graphpad Prism 5软件进行组间比较和制图,数据符合正态分布的采用Student's *t*检验,不符合正态分布的采用Mann-Whitney *U*检验。相关性分析采用SPSS 17.0软件。*P* < 0.05认为差异具有统计学意义。

结果

1. DNase I的活性在两组中的比较:如图2A所示, DNase I活性在PM/DM组为(0.3353 ± 0.1894) U/ml,显著低于健康对照组[(0.5441 ± 0.2536) U/ml, *P* < 0.0001]。

2. DNase I活性受损的分析:选择健康对照组DNase I活性的第25百分位数作为切点(图2A), DNase I活性低于第25百分位数的36例PM/DM患者(图2C)和9例健康对照(图2B)进一步做DNase I酶活性受损的原因分析。在这些受试者血浆中加入重组的外源性DNase I,终浓度250 ng/ml(0.55 U/ml),再用辐射状酶扩散法测DNase I活性。11例PM/DM患者不能明显恢复酶活性。将微球菌核酸酶(MNase)加入这11例患者血浆中,结果显示加入的MNase活性完全不受血浆影响(图2D)。

3. DNase I活性与血清学指标的相关性分析: DNase I活性与球蛋白(*r* = 0.366, *P* = 0.005)和IgG(*r* = 0.322, *P* = 0.012)呈正相关(表2)。

4. DNase I活性在不同亚组PM/DM患者中的比较:61例患者中有6例抗Jo-1抗体阳性,抗Jo-1抗体阳性组患者的血浆DNase I活性低于阴性组的患者

表1 两组患者的特征比较

组别	例数	男/女(例)	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	ILD(+/-, 例)	Anti-Jo-1(+/-, 例)	ANA(+/-, 例)
对照组	48	14/34	41.79 ± 15.07	0/48	0/48	0/48
PM/DM	61	19/42	43.73 ± 16.11	22/39	6/55	24/37

注:PM:多发性肌炎;DM:皮肌炎;ILD:间质性肺疾病;ANA:抗核抗体

表2 DNase I与血清学指标的相关性分析

指标	ESR	G	N	ANA	IgG	IgA	IgM	C3	C4	CRP	CK	CK-MB
<i>r</i> 值	0.182	0.366	-0.150	0.092	0.322	0.213	0.162	-0.008	-0.084	-0.167	0.089	0.034
<i>P</i> 值	0.165	0.005	0.248	0.478	0.012	0.102	0.220	0.953	0.527	0.222	0.495	0.794

注:ESR:红细胞沉降率;G:球蛋白;N:中心粒细胞;ANA:抗核抗体;CRP:C反应蛋白;CK:肌酸激酶;CK-MB:肌酸激酶同工酶

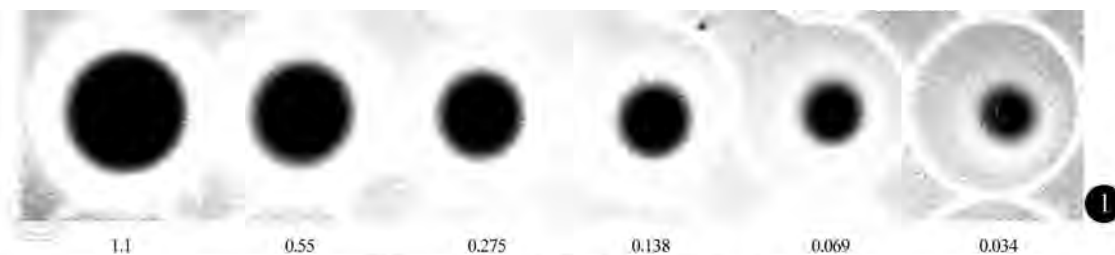


图1 DNase I 标准品活性从0.034到1.1 U/ml

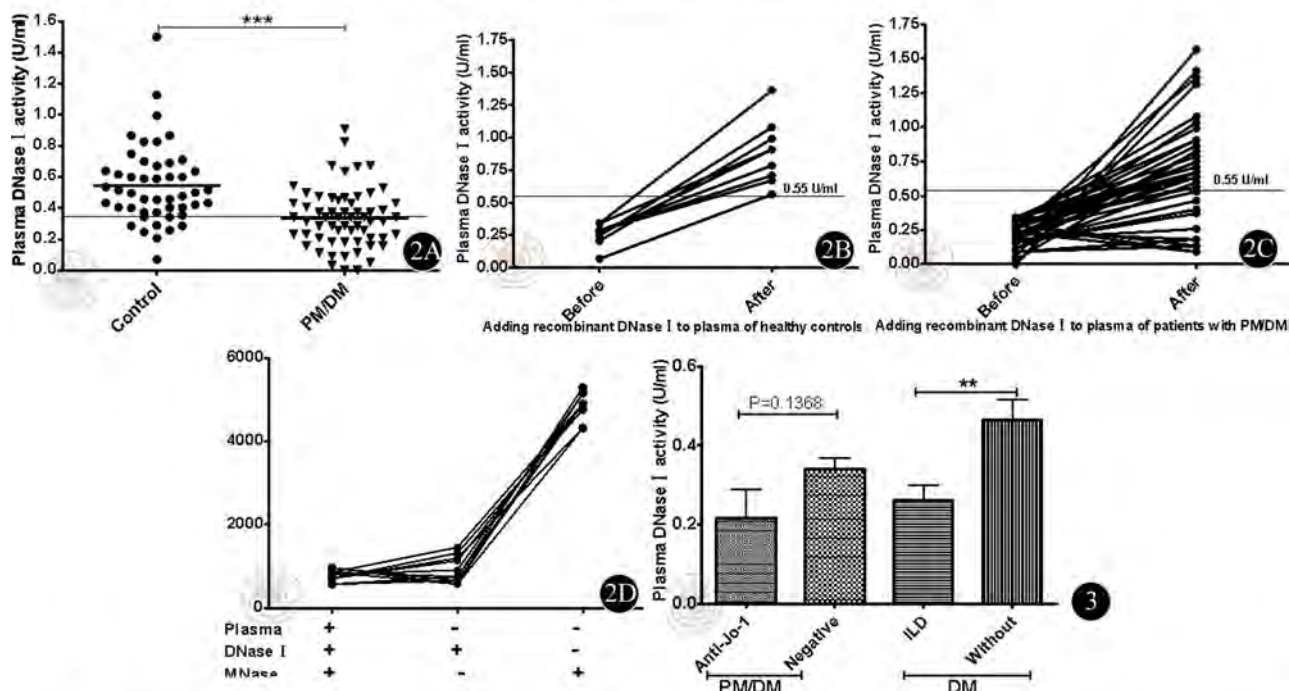


图2 血浆DNase I 活性的比较和活性受损的分析。2A为对照组和PM/DM组DNase I 活性的比较，短横线为中位数，长横线为对照组DNase I 活性的第25位数，分析小于第25位数的所有样本酶活性受损的原因。2B和2C分别示两组中酶活性小于第25位数的样本加入外源性DNase I 所测的酶活性的变化。2B和2C中长横线处于0.55 U/ml，2C示11例PM/DM患者加入外源性DNase I 后活性仍低于0.55 U/ml。2D示这11例样本加入MNase后，水解底物DNA的活性完全恢复正常。图3 血浆DNase I 活性在不同亚组的PM/DM患者中的比较。PM/DM患者分为抗Jo-1抗体阳性组和抗Jo-1抗体阴性组，比较两组患者血浆DNase I 活性；DM患者分为合并ILD组和无ILD组，比较两组患者血浆DNase I 活性。

(图3),但差异没有显著性意义;DM患者中19例患有间质性肺疾病(interstitial lung disease,ILD),比较患有ILD和未患ILD的DM患者血浆DNase I,结果提示患有ILD的DM患者DNase I活性显著低于未患的患者(图3)。

讨 论

IIM是一组少见的异质性疾病,以骨骼肌炎症和其他脏器系统的炎症为特征,可以导致不可逆的损害和残疾^[1-3]。在中国,PM和DM是最常见的类型。目前的观点认为PM是T细胞介导的细胞毒性T细胞原位造成的肌纤维损害,而DM是补体介导的微血管病^[1-3]。但自身抗体的形成原因和自身抗体在发病中的作用仍然不明。

本研究发现PM/DM患者DNase I活性明显低于

健康对照组。通过对PM/DM组DNase I活性严重受损的36例患者血浆中添加外源性DNase I后进一步研究发现,11例患者仍然不能恢复酶活性,而在添加了MNase后,对底物dsDNA的降解能力完全恢复,这一现象说明部分DNase I活性严重受损的患者血浆中存在DNase I的特异性抑制剂。这与在SLE中的报道相似^[16-17]。DNase I识别并剪切DNA的磷酸二酯键^[9]。既往研究结果发现肌动蛋白是DNase I的特异性抑制剂^[15],而且在炎症性肌病中,肌纤维的破坏可造成大量的肌动蛋白释放。但是在本研究中发现的DNase I的特异性抑制剂是否就是肌动蛋白尚需进一步的研究去证实。

DNase I的活性受损在SLE中早有报道^[8-9],并且有研究指出它与凋亡碎片^[4-5]和NET^[10-11]的清除相关。DNase I活性的受损导致凋亡碎片和NET的清除障碍,

这些 cfDNA 可以和其他蛋白颗粒形成复合物并长时间在循环中存在,使得抗原刺激时间延长并导致血浆 cfDNA 的水平升高。cfDNA 可通过 Toll 样受体高效地激活浆细胞样树突状细胞使其释放干扰素,并可刺激自身反应性 B 细胞诱发自身抗体的合成^[18-19]。我们推测 DNase I 活性受损可能在 PM/DM 的发病机制中起一定作用。具体的机制需要更进一步的研究。

在相关性分析中发现, DNase I 活性与血浆球蛋白和 IgG 呈正相关,而与肌炎疾病活性度相关的 ESR、CRP、CK、CK-MB 和 AST 等指标无明显相关性。这一结果可能与我们所选的病例中只有小部分是新发病例,还有一部分处于稳定期有关。自身抗体的形成是自身免疫病的特点。在本研究中没有发现 DNase I 与自身抗体的相关性,这可能与自身抗体阳性率较低有关。抗 Jo-1 抗体是 PM/DM 的特异性抗体,通过比较抗 Jo-1 抗体阳性的样本与阴性的样本发现, DNase I 活性在抗 Jo-1 抗体阳性的样本中明显低于阴性的样本。ILD 是影响 PM/DM 的预后的重要危险因素^[1-3]。本研究中 19 例 DM 患者患有 ILD,对患有 ILD 和未患 ILD 的 DM 患者进行比较发现,患有 ILD 的 DM 患者 DNase I 显著低于未患 ILD 的 DM 患者,提示 DNase I 可能在 DM 患者 ILD 的发病中起一定作用。

重组的 DNase I 作为药物在 SLE 治疗中有所尝试,但没有取得很好的效果^[9]。本研究的结果说明 DNase I 在 SLE 中的失败可能部分是由于血浆中 DNase I 的抑制剂所致。对于体内存在 DNase I 抑制剂的 PM/DM 患者,可以考虑使用其他的核酸酶去清除 NET 及凋亡碎片,以减少产生自身抗体的可能性。

综上所述,部分 PM/DM 患者血浆中存在 DNase I 的特异性抑制剂,使 DNase I 的活性明显受损。推测 DNase I 活性受损可能在 PM/DM 的发病中起一定作用,尤其是可能参与在 DM 患者合并的 ILD 中。DM 合并的 ILD 中是否是由于 DNase I 不能降解 NET 起作用需要进一步的研究去证实。

参 考 文 献

[1] Dalakas MC, Hohlfield R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*,

2003;362:971-982.

- [2] Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N Engl J Med*, 1991, 325:1487-1498.
- [3] Dalakas MC. Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. *Autoimmun Rev*, 2012, 11:203-206.
- [4] Denny MF, Chandaroy P, Killen PD, et al. Accelerated macrophage apoptosis induces autoantibody formation and organ damage in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 2006, 176:2095-2104.
- [5] Kaplan MJ. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 2004, 112:210-218.
- [6] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303:1532-1535.
- [7] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 2007, 176:231-241.
- [8] Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 1981, 1:55-60.
- [9] Valle FM, Balada E, Ordi-Ros J, et al. DNase I and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 2008, 7:359-363.
- [10] Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*, 2011, 3:73ra19.
- [11] Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107:9813-9818.
- [12] Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*, 2012, 188:3522-3531.
- [13] Bohall A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*, 1975, 292:344-347.
- [14] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts) *N Engl J Med*, 1975, 292:403-407.
- [15] Macanovic M, Lachmann PJ. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin Exp Immunol*, 1997, 108:220-226.
- [16] Puccetti A, Madaio MP, Bellese G, et al. Anti-DNA antibodies bind to DNase I. *J Exp Med*, 1995, 181:1797-1804.
- [17] Yeh TM, Chang HC, Liang CC, et al. Deoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*, 2003, 10:544-551.
- [18] Bosch X. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. *N Engl J Med*, 2011, 365:758-760.
- [19] Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, 449:564-569.

(收稿日期:2012-12-04)

(本文编辑:张志巍)