

综述

## 重症肌无力相关自身抗体及其检测方法的研究进展

黄欣欣<sup>1</sup>, 朱德生<sup>2</sup>, 徐见容<sup>3</sup>, 管阳太<sup>1,2</sup>

1. 第二军医大学附属长海医院神经内科, 上海 200433; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院神经内科, 上海 200127; 3. 上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系, 上海 200025

**[摘要]** 重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是一种以体液免疫介导为主的自身免疫性疾病, 其临床特点为骨骼肌无力和易疲劳。其发病机制与体内产生针对神经-肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 突触后膜组分的自身抗体密切相关, 包括乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 抗体、肌肉特异性酪氨酸激酶 (muscle-specific receptor tyrosine kinase, MuSK) 抗体、低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4, LRP4) 抗体等; 近年来发现还存在针对集聚蛋白、乙酰胆碱酯酶相关胶原蛋白原链、皮层蛋白等抗原的自身抗体。MG 基于血清抗体特征可分为 AChR-MG、MuSK-MG、LRP4-MG 及血清抗体阴性 MG 等亚型。MG 自身抗体的检测对其分型诊断、治疗及预后判断非常重要。随着医疗技术的发展, 抗体检测方法得到不断改进, 为各类型 MG 的精准诊疗提供新的契机。该文对 MG 相关自身抗体分类及抗体检测方法的最新进展进行综述。

**[关键词]** 重症肌无力; 自身抗体; 检测方法; 疾病分型

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.021 **[中图分类号]** R746.1 **[文献标志码]** A

### Research progress on myasthenia gravis related autoantibody and detection approaches

HUANG Xin-xin<sup>1</sup>, ZHU De-sheng<sup>2</sup>, XU Jian-rong<sup>3</sup>, GUAN Yang-tai<sup>1,2</sup>

1. Department of Neurology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Neurology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 3. Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Medical Sciences, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease mediated mainly by humoral immunity, which is characterised by skeletal muscle weakness and fatigue. Its pathogenesis is closely related to the autoantibodies against the postsynaptic membrane components at neuromuscular junction (NMJ), including acetylcholine receptor (AChR) antibody, muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) antibody, and low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) antibody. In recent years, autoantibodies against antigens such as agrin, collagen Q, and cortactin have been identified. Based on serum antibody patterns, MG can be divided into different subgroups: AChR-MG, MuSK-MG, LRP4-MG and seronegative MG. The detection of autoantibody is vital in clinical for subgroup diagnosis, treatment and prognosis. With the development of medical techniques, the antibody detection approaches were improved, providing new opportunities for precise diagnosis and treatment of different subgroups. Thus, this paper reviewed the latest progress of MG autoantibody classification and the antibody detection approaches.

**[Key words]** myasthenia gravis; autoantibody; detection approach; disease subgroup

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是一种由自身抗体介导的横纹肌神经-肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 处神经递质信号传递障碍的自身免疫性疾病, 其特点是发病年龄广、致残率高、易复发、预后差, 严重威胁人类健康; 其全球患病率为 15/100 万 ~ 300/100 万, 年发病率为 10/100 万<sup>[1]</sup>。MG 是典型的抗体介导的自身

免疫性疾病, 主要靶抗原是 NMJ 突触后膜的乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR)。AChR 抗体阴性的患者可能存在肌肉特异性酪氨酸激酶 (muscle-specific receptor tyrosine kinase, MuSK) 抗体或低密度脂蛋白受体相关蛋白 4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4, LRP4) 抗体。3 种抗体均检测不到的患者称为血清抗体阴性 MG

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81471219); 上海交通大学医学院转化医学协同创新合作研究项目 (TM201508, TM201706) (National Natural Science Foundation of China, 81471219; Translational Medicine Collaborative Innovation Cooperation Research Project of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, TM201508, TM201706)。

**[作者简介]** 黄欣欣 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: 15821693736@163.com。

**[通信作者]** 管阳太, 电子信箱: yangtaiguan@sina.com。



(seronegative MG, SNMG)<sup>[2]</sup>。此外, 研究<sup>[3]</sup>发现一些患者血清中还存在针对胞内蛋白的抗体, 虽然这些抗体没有直接致病作用, 但仍可以作为疾病分型的生物学标志物。本文就上述 MG 相关自身抗体及对应检测方法的最新进展进行综述。

## 1 常见 MG 相关自身抗体及其检测方法

### 1.1 AChR 抗体

**1.1.1 AChR 抗原** 烟碱型 AChR 是由 4 种同源亚基构成的跨膜糖蛋白, 属于阳离子通道。人类肌肉有 2 种类型的 AChR, 其中胎儿型的亚基组成为  $2\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ , 成人型中  $\gamma$  亚基被  $\epsilon$  亚基所取代。AChR 抗体的主要免疫原区 (major immunogenic region, MIR) 在  $\alpha$  亚基, 其核心部位位于胞外段的第 67 ~ 第 76 位氨基酸<sup>[4]</sup>。对 AChR 抗原结构及 AChR 抗体库的研究<sup>[3]</sup>发现体内可以产生针对  $\delta$  亚基除外的所有亚基的抗体。

**1.1.2 AChR 抗体的病理表型** AChR 抗体大多数为 IgG1 和 IgG3 亚型, 可以激活补体级联反应, 攻击突触后膜组分, 导致 AChR 降解和结构改变, 使突触后膜受体数目减少<sup>[4]</sup>。AChR 抗体滴度与临床症状的严重程度不成正比<sup>[5]</sup>, 对此现象可能的解释是 MG 的肌无力症状主要由受体数目的减少导致, 其不仅受自身抗体滴度的影响, 还与抗体的类型或其他因素有关系。但有报道<sup>[6]</sup>指出在个体中抗体滴度的波动与肌无力症状的严重程度有关联, 对病情变化有提示作用, 这种联系仍需要进一步证实。对服用免疫抑制药物的 MG 患者, 重复抗体检测可以预测疾病的严重程度; 抗体滴度增加提示 MG 病情加重, 抗体滴度稳定或者下降提示病情稳定, 因而对治疗方案的选择有指导作用<sup>[7]</sup>。利用常规的方法检测 AChR 抗体, 阳性率为 70%, 而利用基于细胞的检测法 (cell-based assay, CBA), 可在 5% ~ 10% AChR 抗体阴性的患者中检测到该抗体<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.3 AChR 抗体的检测方法

(1) 放射性免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 该法基于患者体内的 AChR 抗体与可溶性的 AChR 结合, 后者标记放射性的  $\alpha$ -银环毒素 ( $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -银环毒素)。 $\alpha$ -银环毒素是一种蛇毒素, 可以高亲和力地结合 AChR 的非配体结合区域。AChR 主要从人的肌肉组织和人横纹肌肉瘤 TE671 细胞提纯。RIPA 的主要优点是灵敏度高, 可以对抗体的滴度进行准确定量, 是经过验证的可靠的金标准, 目前已有商品化的试剂盒。该方法在有临床症状的 MG 患者中的特异度约为 100%<sup>[5]</sup>。

(2) 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent

assay, ELISA) 该法是用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 替代放射性  $^{125}\text{I}$ , 但是其敏感度不如放射性的  $\alpha$ -银环毒素。目前常用的检测原理有双抗体夹心法和竞争法, 后者的敏感度高于前者<sup>[3]</sup>。

(3) 荧光素酶免疫沉淀法 (luciferase immunoprecipitation system, LIPS) 该法利用与重组的 AChR 亚基融合表达的荧光素酶蛋白, 可以检测针对多种抗原表位的抗体。该法检测 AChR 抗体的阳性率为 32%<sup>[9]</sup>。该法是非放射性的检测方法, 尽管与 RIPA 和 CBA 相比, 并未显示更高的特异度, 但其可应用于多种神经免疫疾病, 可用来检测神经递质受体和离子通道受体抗体。

(4) 荧光免疫沉淀法 (fluorescence immunoprecipitation system, FIPA) 该法同 LIPS 类似, 将 1 种或多种 AChR 亚基与荧光蛋白 [如增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)] 融合表达, 其敏感度接近 RIPA<sup>[10]</sup>。

(5) CBA AChR 通过集聚蛋白 (agrin)-LRP4-MuSK-接头蛋白 7 (docking protein, Dok7) 信号通路激活突触受体相关蛋白 (rapsyn), 实现在 NMJ 突触后膜簇集表达。将  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  4 个亚基与 rapsyn 共转染 HEK293T 细胞, 可以实现 AChR 簇集表达在 HEK293T 细胞表面, 模拟体内突触后膜受体的簇集表达<sup>[8]</sup>。在经 RIPA 或 ELISA 检测为阴性的患者中, CBA 可以检测到针对“簇集表达的 AChR”抗体。患者血清中的 IgG 抗体与细胞表面的 AChR 交叉反应, 可以使低亲和力的抗体更有效地结合抗原, 从而显示出更高的灵敏度。患者运用 CBA 检测的阳性率为 16% ~ 60%<sup>[11]</sup>。通过 CBA 检测到的针对“簇集表达的 AChR”抗体主要是 IgG1 亚型, 将此类抗体阳性的血清被动转移至小鼠体内, 同样可以引起 NMJ 受体表达减少或缺失<sup>[12]</sup>。所以 CBA 检测抗体阳性的 MG 患者与常规方法检测抗体阳性患者具有相同的病因和病理生理过程<sup>[13]</sup>。

因此, CBA 是敏感度较高的检测方法。但是为了方便监测病情, 大多数实验室仍采用 RIPA 或非放射性的 FIPA 观察抗体滴度的变化。故 RIPA 仍然是检测抗体和诊断的一线方法。当 MG 诊断不确定, 而 RIPA 检测 AChR 和 MuSK 抗体呈阴性时, CBA 可以作为补充的检测方法。

### 1.2 MuSK 抗体

**1.2.1 MuSK 抗原** MuSK 是单次跨膜糖蛋白, 相对分子质量为 120 000。其胞外段包括 3 个免疫球蛋白 (Ig) 样结构域 (IgG1 ~ IgG3) 和 1 段半胱氨酸富集结构域 (cysteine-rich domain, CRD), 与 wnt 受体 Frizzled 蛋白



CRD 域的序列和结构相似<sup>[14]</sup>。单一跨膜螺旋连接胞外段与胞内区,其中胞内区包含酪氨酸激酶域。MuSK 是酪氨酸激酶受体,对神经肌肉突触的发育与稳定有重要作用。MuSK 在骨骼肌细胞表达,其激活后的下游信号通路可以促进 AChR 在突触后膜簇集表达以及诱导突触前膜神经末端分化<sup>[15]</sup>。MuSK 的配体是 LRP4,其与 MuSK 的亲合力可被 agrin 增强。另外, MuSK 的激活还需要一种细胞质适配器蛋白 Dok7<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 MuSK 抗体的病理表型** MuSK 抗体的阳性率为 1% ~ 10%<sup>[16]</sup>。与 AChR 抗体不同, MuSK 抗体类型大多属于 IgG4 亚型。MuSK 不引起终板处补体的激活,而直接发挥致病作用,减少突触后膜 AChR 的密度,破坏 NMJ 的结构<sup>[17]</sup>。患者个体中 MuSK 抗体滴度的波动与疾病的严重程度相关,故抗体滴度的变化可以反映疾病的活动性<sup>[18]</sup>。在动物体内被动转移 MuSK 抗体阳性患者的血清 IgG,可以引起终板的破坏<sup>[19]</sup>。大多数 MuSK 抗体结合胞外段 N 末端的 Ig 类似域,干扰 agrin-LRP4-MuSK 信号通路。乙酰胆碱酯酶相关胶原蛋白胶原链 (collagen Q, ColQ) 是结合 MuSK 胞外域的另一分子。ColQ 蛋白是乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 复合体的一部分,通过 collagen 尾结合 MuSK,将 AChE 锚定在突触的基膜上<sup>[20]</sup>。动物实验表明,疾病模型组中的 MuSK 抗体可以使 ColQ 密度降低约 10%<sup>[21]</sup>。MuSK-IgG 通过阻止 ColQ-MuSK 及 LRP4-MuSK 的相互作用,减少突触后膜 AChR 的簇集表达。胆碱酯酶抑制剂在 MuSK 抗体阳性 MG 患者中作用不佳也可能是由于 MuSK 抗体阻止 ColQ-MuSK 的相互作用,从而引起突触间隙的 AChE 缺陷<sup>[22]</sup>。

### 1.2.3 MuSK 抗体的检测方法

(1) RIPA 和 ELISA 这 2 种方法是检测 MuSK 抗体的标准方法,但不如 CBA 灵敏<sup>[23]</sup>。有研究<sup>[3]</sup>证实 RIPA 和 ELISA 检测阴性的血清标本中, CBA 检测 MuSK 抗体的阳性率为 13%,其中部分患者属于眼肌型 MG。

(2) FIPA 该法将 MuSK 蛋白与荧光蛋白融合表达,其敏感度接近 RIPA。可将 AChR 与 EGFP 融合表达,并将 MuSK 与红色荧光蛋白 mCherry 融合表达,利用 2 种荧光不同的激发光谱和发射光谱可以同时检测 2 种抗体<sup>[10]</sup>。

(3) CBA MuSK 与 AChR 不同,不在突触后膜簇集表达。Rodriguez Cruz 等<sup>[24]</sup>将 MuSK 蛋白表达在 HEK293T 细胞表面以检测 MuSK 抗体,对于 RIPA 检测呈阳性的血清,其检测阳性率为 98%;对于 RIPA 检测 AChR 和 MuSK 抗体呈阴性及 CBA 检测 AChR 抗体呈阴性的血清,其检测阳性率为 8%。CBA 检测 MuSK 抗体的特异度可达 97% ~ 98%。仅能通过 CBA 检测到 MuSK 抗

体的 MG 患者主要为年轻女性 (约 80%),中位年龄为 21 岁 (19 ~ 79 岁)。

因此,临床及动物研究显示,与 AChR 抗体的作用机制不同, MuSK 抗体可能通过非补体途径等其他多种途径发挥致病作用,其中抑制逆行信号转导是其重要的机制,也解释了 MuSK-MG 病情较重的现象。RIPA 是检测 MuSK 抗体的金标准,目前已有商品化试剂盒。

## 1.3 LRP4 抗体

**1.3.1 LRP4 抗原** LRP4 是单次跨膜蛋白,有较长的胞外域,包括多种低密度脂蛋白重复序列、类表皮生长因子和  $\beta$  螺旋的重复序列,还有跨膜区域和短的 C 末端。LRP4 在肌肉和神经等多种组织中表达,在四肢、外胚层器官、肺和肾的发育中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。在成人的骨骼肌中, LRP4 集中表达在 NMJ 突触后膜,结合突触间隙中的 agrin<sup>[26]</sup>, LRP4-agrin 复合体的形成激活 LRP4-MuSK 信号通路,促进 MuSK 磷酸化,促使 AChR 簇集表达以及突触后膜的分化<sup>[27]</sup>。

**1.3.2 LRP4 抗体的病理表型** LRP4 抗体在各种类型的 MG 中的阳性率为 1% ~ 5%<sup>[28]</sup>。在 AChR 和 MuSK 抗体阴性的 MG 患者中,其阳性率为 7% ~ 33%<sup>[29-30]</sup>。Shen 等<sup>[31]</sup>用 LRP4 抗体免疫小鼠建立经典的 MG 病理模型,可见补体激活,膜表面 LRP4 表达减少;在小鼠中发现的 LRP4 抗体类型主要是补体结合 IgG1 亚型,且 LRP4 抗体免疫小鼠模型与 AChR 抗体免疫小鼠模型的肌无力症状相似,与人的肌无力症状也相似。因此 LRP4 抗体的病理作用主要是通过干扰 LRP4 和 agrin 的结合,破坏 AChR 介导的神经肌肉信号转导。LRP4 抗体阳性 MG 患者的临床症状较轻,或仅表现为眼肌型 MG<sup>[32]</sup>。

### 1.3.3 LRP4 抗体的检测方法

(1) ELISA Zhang 等<sup>[27]</sup>通过真核细胞表达系统获得大鼠 LRP4 胞外段重组蛋白,建立了 LRP4 抗体的 ELISA 检测方法;利用此法在 120 例 AChR 及 MuSK 抗体阴性患者中检测到 11 例血清 LRP4 抗体阳性。

(2) CBA 将 LRP4 蛋白及伴侣蛋白 (低密度脂蛋白相关蛋白 1) 共转染 HEK293T 细胞,以提高细胞表面 LRP4 蛋白表达。用 CBA 检测 145 例确诊为 MG 患者的血清,在 RIPA 检测的 AChR 及 MuSK 抗体阴性的血清样品中,仅 2 例 LRP4 抗体阳性 (1% ~ 4%);此抗体的阳性率很低,1 例同时通过 CBA 检测到“簇集表达的 AChR”抗体<sup>[24]</sup>。

(3) LIPA Higuchi 等<sup>[28]</sup>将 LRP4 与 Gaussia 荧光素酶 (Gaussia luciferase, GL) 融合表达在 HEK293T 细胞,



从细胞培养上清中纯化 LRP4-GL 蛋白, 利用此蛋白检测 300 例 AChR 抗体阴性的 MG 患者血清, 发现 9 例 LRP4 抗体阳性; 在 100 例 AChR 抗体阳性的 MG 患者血清中, 未发现 LRP4 抗体阳性。

因此, LRP4 抗体的致病作用已经明确, 是阳性率仅次于 AChR 和 MuSK 抗体的 MG 自身抗体。目前 LRP4 抗体的检测在临床上还未普及, 其检测技术的标准化将有助于进一步评估 LRP4 抗体的特异度与其临床表型的相关性。

## 2 其他 MG 相关自身抗体及其检测方法

### 2.1 Agrin 抗体

**2.1.1 Agrin 抗原** Agrin 是运动神经末梢分泌的硫酸类肝素多糖蛋白<sup>[5]</sup>, 分为神经型 (N-agrin) 和肌肉型 (M-agrin) 2 种亚型。N-agrin 结合 LRP4 激活 MuSK, 诱导 AChR 簇集表达, 对调节 NMJ 的形成、维持及再生非常重要<sup>[33]</sup>。Agrin 功能被干扰可导致神经肌肉传导不充分<sup>[34]</sup>。Yan 等<sup>[33]</sup>发现 N-agrin 免疫小鼠表现出肌无力症状, NMJ 结构分散及降解, 而 M-agrin 免疫小鼠则无上述现象。用 N-agrin 抗体处理肌细胞, 同样可以观察到 AChR 簇集表达减少。

**2.1.2 Agrin 抗体的病理表型** 在 MG 的发病过程中, agrin 抗体通过抑制 agrin-LRP4-MuSK 信号通路产生致病作用<sup>[33]</sup>。Agrin 抗体仅在少数患者中可以检测到, 而且与 AChR、MuSK 及 LRP4 抗体同时存在; 同时 MG 患者血清可以识别 HEK293T 细胞重组表达的 agrin 蛋白, 抑制 agrin 诱导的 MuSK 磷酸化和 AChR 聚集。Agrin 抗体对 MG 患者的诊断有一定的特异性<sup>[35-36]</sup>。

#### 2.1.3 Agrin 抗体的检测方法

(1) CBA 通过构建 agrin 质粒并转染 HEK293T 细胞, 使 agrin 表达在 HEK293T 细胞表面, 在检测 MG 患者血清时通过荧光二抗观察抗体阳性与否<sup>[35]</sup>。

(2) ELISA 将转染的 HEK293T 细胞分泌的 agrin 通过亲和层析纯化, 获得 agrin 蛋白。Gasperi 等<sup>[35]</sup>利用此蛋白检测 54 例 MG 患者的血清, 发现 5 例 agrin 抗体阳性, 其中 4 例 MuSK 抗体同时阳性, 1 例 AChR 抗体同时阳性, 2 例 LRP4 抗体同时阳性。

Agrin 是新发现的 MG 自身抗体的靶点蛋白, 其抗体可能参与 SNMG 的发病过程, 且常与 AChR、MuSK 及 LRP4 抗体以不同的组合形式存在, 提示 agrin 抗体阳性 MG 患者有同时针对数种 NMJ 蛋白组分的自身抗体。Agrin 抗体的检测将有助于该病的诊断与治疗。

### 2.2 肌联蛋白和兰尼碱受体抗体

**2.2.1 肌联蛋白和兰尼碱受体抗原** 部分 MG 患者血清中存在针对骨骼肌和心肌横纹肌组分的抗体, 包括肌球蛋白、肌动蛋白、细丝蛋白等, 这些抗体称为横纹肌抗体。在约 95% 伴发胸腺瘤的 MG 及 50% 晚发型 MG 患者血清中存在 2 种横纹肌抗体, 即肌联蛋白 (titin) 和兰尼碱受体 (ryanodine receptor, RYR) 抗体<sup>[7]</sup>。Titin 是所有已知的蛋白中较大的蛋白, 相对分子质量为 3 000 000, 对维持细胞的弹性及肌肉的收缩运动至关重要<sup>[37]</sup>。大多数 titin 抗体识别 titin 蛋白的特定区域, 该区域的相对分子质量约 30 000, 称作 myasthenia gravis titin -30 (MGT-30), 是 titin 的主要免疫原区, 定位于肌肉的 A 带 -I 带连接处, 对 titin 介导的肌肉收缩有潜在的干扰作用<sup>[38]</sup>。Titin 定位在肌细胞内, 因此 titin 抗体一般不引起肌无力症状。

RYR 是肌浆网中的钙离子释放通道。肌膜的去极化引起 RYR 受体开放, 肌浆网中的钙离子顺浓度差释放到胞质中, 胞质中的钙离子与肌钙蛋白 (troponin C, TnC) 结合触发肌肉收缩。RYR 受体有 2 种类型, 分别是心肌 RYR2 受体和骨骼肌 RYR1 受体; MG 患者血清中 RYR 抗体可与这 2 种受体产生交叉反应<sup>[39]</sup>。

**2.2.2 Titin 和 RYR 抗体的病理表型** Titin 和 RYR 抗体多出现在胸腺瘤相关 MG 中, 在胸腺瘤相关 MG 中的阳性率为 70%, 是潜在的恶性肿瘤标志物。这 2 种抗体在晚发型 MG 中较常见, 其发病年龄在 60 岁之后; 而其在早发型 MG 中很少出现, 且在 50 岁之前出现症状并伴发胸腺瘤的 MG 患者中, titin 抗体是非常灵敏的指标<sup>[3, 40]</sup>。针对老年患者, 胸部 CT 检查排除胸腺瘤非常必要。Titin 和 RYR 抗体是重型 MG 的标志物, 此类患者对胸腺切除术无反应, 需要长期进行免疫抑制治疗<sup>[5]</sup>。

#### 2.2.3 Titin 抗体和 RYR 抗体的检测方法

(1) Titin 抗体 Stergiou 等<sup>[41]</sup>建立了 RIPA, 即重组表达 titin 的主要免疫原区 MGT-30 蛋白, 克隆 3 段主要的片段 IG-IF-FN (IG108 ~ 110), 通过原核表达系统获得纯化的 MGT-30 重组蛋白, 标记<sup>125</sup>I 进行 RIPA 检测。目前已有检测 titin 抗体的商品化 ELISA 试剂盒。

(2) RYR 抗体 ELISA 检测基于 RYR1 受体 N 端和 C 端已确定的抗原表位。免疫印迹法 (Western blotting) 检测以重组的 N 端主要免疫原区肽链 2 作为抗原<sup>[42]</sup>。

因此, titin 和 RYR 抗体在胸腺瘤相关及晚发型 MG 中具有高特异度, 其与临床表型的相关性及临床意义显著, 但关于 titin 和 RYR 抗体的产生机制及病理作用仍需进一步研究。



## 2.3 Kv1.4 抗体

**2.3.1 Kv1.4 抗原** 电压门控钾离子通道是由 4 个跨膜  $\alpha$  亚基组成的四聚体。Kv1.4 是相对分子质量为 73 000 的  $\alpha$  亚基,在中枢神经系统广泛表达,主要分布在轴突膜或近轴突,同时也表达于外周神经、骨骼肌和心肌<sup>[43]</sup>。

**2.3.2 Kv1.4 抗体的病理表型** Kv1.4 抗体在 MG 患者中的阳性率为 10% ~ 20%<sup>[44]</sup>。Kv1.4 抗体同样属于横纹肌抗体。在 MG 中,Kv1.4 抗体可同时攻击心肌中的电压门控钾离子通道<sup>[43]</sup>。有研究<sup>[45]</sup>报道,Kv1.4 抗体与重型 MG 及心脏并发症相关。

**2.3.3 Kv1.4 抗体的检测方法** Suzuki 等<sup>[46]</sup>建立免疫沉淀法,将横纹肌肉瘤细胞中提取的 <sup>35</sup>S 标记的蛋白作为抗原。用该法检测 61 例 MG 患者血清 Kv1.4 抗体,其中 11 例呈阳性。而基于重组 Kv1.4 蛋白的 Western blotting 和 ELISA 不能检测 Kv1.4 抗体,提示抗原表位的特定构象对于抗体的结合是必要的<sup>[47]</sup>。

因此,目前关于 Kv1.4 抗体的研究较少,迄今的研究发现其在重型及晚发型 MG 中阳性率较高。Kv1.4 抗体阳性的 MG 患者应高度重视发生心脏功能障碍及心肌炎的风险。关于 Kv1.4 抗体的病理作用有待进一步证实。

## 2.4 ColQ 抗体

**2.4.1 ColQ 抗原** ColQ 蛋白是 AChE 复合体的一部分,通过 collagen 尾将 AChE 锚定在突触的基膜上。AChE 亚基组成四聚体,同时结合一分子的 ColQ。ColQ 以三螺旋结构组成 AChE/ColQ 复合体,包括 12 个 AChE 亚基及 3 分子 ColQ<sup>[48]</sup>。AChE/ColQ 复合体通过 2 种机制锚定在突触后膜上:首先 ColQ 胶原区域的两分子带正电荷的硫酸乙酰肝素蛋白多糖结合域 (heparan sulfate proteoglycan binding domains, HSPBDs) 结合基底膜蛋白多糖 (perlecan),接着 ColQ 的 C 末端区域结合 MuSK<sup>[49]</sup>。

**2.4.2 ColQ 抗体的病理表型** ColQ 定位在细胞外基质,可接触到抗体,在 415 例 MG 患者中发现 12 例患者血清中存在针对 ColQ 的抗体<sup>[50]</sup>。ColQ 突变可以引起先天性肌无力综合征 (congenital myasthenic syndromes, CMS)<sup>[50]</sup>,因此 ColQ 抗体具有潜在致病性。但是,在健康人中也可以检测到 ColQ 抗体<sup>[3]</sup>。关于该抗原的病理作用以及对 AChE 抑制剂治疗效果的影响,仍有待探讨。

**2.4.3 ColQ 抗体的检测方法** Zoltowska Katarzyna 等<sup>[50]</sup>建立了 CBA 方法检测该抗体,先构建 pcDNA-ColQ-Caspr2TM 质粒,即将接触蛋白相关蛋白-2 (contactin associated protein-like 2, Caspr2) 的跨膜区域 (TM) 融合表达在分泌蛋白 ColQ 的 C 末端;将质粒转染 HEK293T 细胞,使

细胞膜表面表达 ColQ-Caspr2TM 融合蛋白,用此细胞模型来检测 MG 患者血清中的 ColQ 抗体。

ColQ 是与 AChE 功能密切相关的抗原靶标。ColQ 抗体可能破坏 NMJ 处 AChE 复合体的结构,导致其降解或缺失,从而影响乙酰胆碱的水解。故 ColQ 抗体阳性患者对 AChE 抑制剂的反应性不佳。

## 2.5 皮层蛋白抗体

**2.5.1 皮层蛋白抗原** 皮层蛋白 (cortactin) 是一种骨骼肌的胞内微丝肌动蛋白结合蛋白,在 NMJ 处高表达,可以促进肌动蛋白的聚集,而且作为一种信号转导蛋白参与 agrin-MuSK 复合体介导的 AChR 受体的簇集<sup>[51]</sup>。

**2.5.2 Cortactin 抗体的病理表型** 2014 年 Gallardo 等<sup>[51]</sup>利用蛋白芯片 (ProtoArray) 技术检测 91 例 SNMG 患者及 103 例血清阳性 MG (seropositive MG, SPMG) 患者 (69 例 AChR 阳性,34 例 Musk 阳性) 血清中潜在的自身抗原标志物,发现 6 例双抗体阴性 MG (double-seronegative MG, dSNMG) 患者的 cortactin 转录本 2 阳性,可能是 MG 自身抗原。Gallardo 等<sup>[51]</sup>还建立了 cortactin 抗体的 ELISA 方法,检测发现 SNMG 患者中 cortactin 抗体阳性率为 19.7%,而 SPMG 患者的阳性率仅为 4.8%。Cortactin 抗体阳性提示病情较轻。Cortactin 是 dSNMG 亚型的标记物,尤其是眼肌型 dSNMG。关于 cortactin 抗体如何产生及是否有致病作用还不清楚。多数患者血清 AChR、MuSK、LRP4、横纹肌抗体阴性,因此在 NMJ 结构损伤后表位扩展假说无法解释此现象<sup>[52]</sup>。Cortactin 是 NMJ 处的膜内蛋白,而膜内蛋白不能接触到循环中的抗体。有假说认为在双载蛋白 (amphiphysin) 抗体存在的条件下,在神经肌肉传导的瞬间,胞内蛋白可以短暂地接触到循环抗体,可能解释 cortactin 的病理作用<sup>[53]</sup>。另外 cortactin 抗体在健康人中的阳性率为 5%,在伴发多种自身免疫疾病包括肌炎的患者中的阳性率为 13%<sup>[54]</sup>。

**2.5.3 Cortactin 抗体的检测方法** Gallardo 等<sup>[51]</sup>推荐用 ELISA 检测该抗体,将纯化重组的 cortactin 蛋白包被 ELISA 板进行检测。对于阳性的样本进一步运用 Western blotting 验证,只有经 Western blotting 验证阳性后才能认定抗体阳性。

因此,cortactin 作为新的 SNMG 潜在自身抗原,尽管其特异的临床表型还未确定,但是其作为自身免疫性疾病的标志物,可以作为免疫调节疗法使用的支持证据。Cortactin 作为一种 NMJ 膜蛋白,其抗体的存在,表明可能存在影响 NMJ 功能的免疫病理过程。

### 3 小结与展望

AChR、MuSK 和 LRP4 是 3 种已经完全明确的自身免疫抗体针对 NMJ 的靶抗原。另有不针对 NMJ 组分的抗体, 包括 titin、RyR 和 Kv1.4 等 3 种典型的横纹肌抗体。近年还发现了针对 AChE 复合体 ColQ 以及针对胞内蛋白

cortactin 的抗体。MG 相关自身抗体种类的不断发现, 丰富了对 MG 病理过程的理解, 增加了 MG 诊断的特异度, 为各亚型 MG 的精准诊断与分型提供新的契机。建立抗原特异性的治疗方案可以更好地抑制自身免疫反应导致的抗体产生和肌无力症状; 增加对 MG 抗体及其检测方法的认识, 有助于疾病分型诊断及精准治疗。

### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Carr AS, Cardwell CR, Mccarron PO, et al. A systematic review of population based epidemiological studies in myasthenia gravis[J]. BMC Neurology, 2010, 10(1): 46.
- [2] Verschuuren JJ, Huijbers MG, Plomp JJ, et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(9): 918-923.
- [3] Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, et al. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(9): 924-930.
- [4] Huijbers MG, Lipka AF, Plomp JJ, et al. Pathogenic immune mechanisms at the neuromuscular synapse: the role of specific antibody-binding epitopes in myasthenia gravis[J]. J Intern Med, 2014, 275(1): 12-26.
- [5] Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies[J]. Lancet Neurol, 2015, 14(10): 1023-1036.
- [6] Heldal AT, Eide GE, Romi F, et al. Repeated acetylcholine receptor antibody-concentrations and association to clinical myasthenia gravis development[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114060.
- [7] Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, et al. Myasthenia gravis: autoantibody characteristics and their implications for therapy[J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(5): 259-268.
- [8] Leite MI, Jacob S, Viegas S, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis[J]. Brain, 2008, 131(Pt 7): 1940-1952.
- [9] Ching KH, Burbelo PD, Kimball RM, et al. Recombinant expression of the AChR- $\alpha 1$  subunit for the detection of conformation-dependent epitopes in myasthenia gravis[J]. Neuromuscul Disord, 2011, 21(3): 204-213.
- [10] Yang L, Maxwell S, Leite MI, et al. Non-radioactive serological diagnosis of myasthenia gravis and clinical features of patients from Tianjin, China[J]. J Neurol Sci, 2011, 301(1/2): 71-76.
- [11] Devic P, Petiot P, Simonet T, et al. Antibodies to clustered acetylcholine receptor: expanding the phenotype[J]. Eur J Neurol, 2014, 21(1): 130-134.
- [12] Rodriguez Cruz PM, Al-Hajjar M, Huda S, et al. Clinical features and diagnostic usefulness of antibodies to clustered acetylcholine receptors in the diagnosis of seronegative myasthenia gravis[J]. JAMA Neurol, 2015, 72(6): 642-649.
- [13] Jacob S, Viegas S, Leite MI, et al. Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis[J]. Arch Neurol, 2012, 69(8): 994-1001.
- [14] Hubbard SR, Gnanasambandan K. Structure and activation of MuSK, a receptor tyrosine kinase central to neuromuscular junction formation[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(10): 2166-2169.
- [15] Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(5): a009167.
- [16] Querol L, Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction[J]. Curr Opin Neurol, 2013, 26(5): 459-465.
- [17] Plomp JJ, Huijbers MG, van der Maarel SM, et al. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1275: 114-122.
- [18] Gomez AM, van Den Broeck J, Vrolix K, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction[J]. Autoimmunity, 2010, 43(5/6): 353-370.
- [19] Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, et al. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction[J]. Ann Neurol, 2008, 63(6): 782-789.
- [20] Otsuka K, Ito M, Ohkawara B, et al. Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling[J]. Sci Rep, 2015, 5: 13928.
- [21] Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK[J]. Neurology, 2011, 77(20): 1819-1826.
- [22] Ohno K, Otsuka K, Ito M. Roles of collagen Q in MuSK antibody-positive myasthenia gravis[J]. Chem Biol Interact, 2016, 259(Pt B): 266-270.
- [23] Chang T, Leite MI, Senanayake S, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis using both radioimmunoprecipitation and cell-based assays in a South Asian population[J]. J Neurol Sci, 2014, 343(1/2): 82-87.
- [24] Rodriguez Cruz PM, Huda S, Lopez-Ruiz P, et al. Use of cell-based assays in myasthenia gravis and other antibody-mediated diseases[J]. Exp Neurol, 2015, 270: 66-71.
- [25] Choi HY, Dieckmann M, Herz J, et al. Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover *in vivo*[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7930.
- [26] Zong Y, Zhang B, Gu S, et al. Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling[J]. Genes Dev, 2012, 26(3): 247-258.
- [27] Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis[J]. Arch Neurol, 2012, 69(4): 445-451.
- [28] Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis[J]. Ann Neurol, 2011, 69(2): 418-422.
- [29] Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis[J]. J Autoimmun, 2014, 52: 139-145.
- [30] Pevzner A, Schoser B, Peters K, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis[J]. J Neurol, 2012, 259(3): 427-435.
- [31] Shen C, Lu Y, Zhang B, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(12): 5190-5202.
- [32] Tzartos JS, Zisimopoulou P, Rentzos M, et al. LRP4 antibodies in serum and CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients[J]. Ann Clin Transl Neurol, 2014, 1(2): 80-87.
- [33] Yan M, Liu Z, Fei E, et al. Induction of anti-agrin antibodies causes myasthenia gravis in mice[J]. Neuroscience, 2018, 373: 113-121.
- [34] Witzemann V, Chevessier F, Pacifici PG, et al. The neuromuscular junction: selective remodeling of synaptic regulators at the nerve/muscle interface[J]. Mech Dev, 2013, 130(6/7/8): 402-411.
- [35] Gasperi C, Melms A, Schoser B, et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis[J]. Neurology, 2014, 82(22): 1976-1983.
- [36] Zhang B, Shen C, Bealmear B, et al. Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91816.
- [37] Powers K, Schappacher-Tilp G, Jinha A, et al. Titin force is enhanced in actively stretched skeletal muscle[J]. J Exp Biol, 2014, 217(Pt 20): 3629-3636.
- [38] Romi F, Skeie GO, Gilhus NE, et al. Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance[J]. Arch Neurol, 2005, 62(3): 442-446.
- [39] Romi F, Aarli JA, Gilhus NE. Myasthenia gravis patients with ryanodine receptor antibodies have distinctive clinical features[J]. Eur J Neurol, 2007, 14(6): 617-620.
- [40] Szczudlik P, Szydluk B, Lipowska M, et al. Antititin antibody in early- and late-onset myasthenia gravis[J]. Acta Neurol Scand, 2014, 130(4): 229-233.
- [41] Stergiou C, Lazaridis K, Zouvelou V, et al. Titin antibodies in "seronegative" myasthenia gravis: a new role for an old antigen[J]. J Neuroimmunol, 2016, 292: 108-115.
- [42] Hong Y, Li HF, Skeie GO, et al. Autoantibody profile and clinical characteristics in a cohort of Chinese adult myasthenia gravis patients[J]. J Neuroimmunol, 2016, 298: 51-57.
- [43] Romi F, Suzuki S, Suzuki N, et al. Anti-voltage-gated potassium channel Kv1.4

- antibodies in myasthenia gravis[J]. J Neurol, 2012, 259(7): 1312-1316.
- [44] Suzuki S, Utsugisawa K, Yoshikawa H, et al. Autoimmune targets of heart and skeletal muscles in myasthenia gravis[J]. Arch Neurol, 2009, 66(11): 1334-1338.
- [45] Suzuki S, Baba A, Kaida K, et al. Cardiac involvements in myasthenia gravis associated with anti-Kv1.4 antibodies[J]. Eur J Neurol, 2014, 21(2): 223-230.
- [46] Suzuki S, Satoh T, Yasuoka H, et al. Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2005, 170(1/2): 141-149.
- [47] Suzuki S, Utsugisawa K, Nagane Y, et al. Three types of striational antibodies in myasthenia gravis[J]. Autoimmune Dis, 2011, 2011: 740583.
- [48] Ohno K, Ito M, Kawakami Y, et al. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-musk myasthenia gravis[J]. J Mol Neurosci, 2014, 53(3): 359-361.
- [49] Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction[J]. J Cell Biol, 2004, 165(4): 505-515.
- [50] Zoltowska Katarzyna M, Belaya K, Leite M, et al. Collagen Q: a potential target for autoantibodies in myasthenia gravis[J]. J Neurol Sci, 2015, 348(1/2): 241-244.
- [51] Gallardo E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(10): 1003-1007.
- [52] Illa I, Cortes-Vicente E, Martinez MA, et al. Diagnostic utility of cortactin antibodies in myasthenia gravis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1412(1): 90-94.
- [53] Irani SR. 'Moonlighting' surface antigens: a paradigm for autoantibody pathogenicity in neurology?[J]. Brain, 2016, 139(Pt 2): 304-306.
- [54] Labrador-Horrillo M, Martinez MA, Selva-O'Callaghan A, et al. Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(10): 1008-1012.

[ 收稿日期 ] 2018-03-05

[ 本文编辑 ] 崔黎明

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院附属仁济医院举行“上海市癫痫病患者关爱项目”启动暨首例捐助仪式

为提高大众认知、进一步关爱难治性癫痫患者，2018年10月16日“上海市癫痫病患者关爱项目”在上海交通大学医学院附属仁济医院启动。

癫痫是大脑异常放电造成的一种慢性疾病，病程较长，容易反复，具有较高的发病率。世界卫生组织报告，全球癫痫患者约5 000万人，其中4 000万在发展中国家。我国有900多万癫痫患者，其中600万患者每年仍有发作，而且每年还会出现40万新发病例，近60%的患者没有接受正规的抗癫痫治疗。随着我国人口老龄化，脑血管病、痴呆和神经系统退行性疾病的发病率增加，老年人群中癫痫发病率已出现上升的趋势。仁济医院功能神经科至今已经完成各类难治性癫痫外科手术2 000多例，手术有效率在75%以上。

“上海市癫痫病患者关爱项目”由徐纪文医师发起，由上海市慈善基金会、爱心企业共同参与，仁济医院党委副书记闵建颖代表医院接受企业捐赠。启动会上还举行了首例患者捐助仪式。仁济医院副院长张继东表示：癫痫作为一种古老的神经系统常见病，严重危害着人类的健康，癫痫患者及其亲属构成了当前社会中的一个弱势群体；“上海市癫痫病患者关爱项目”的成立初衷就是为了提升社会对这个群体的关注，项目基金将定向用于贫困癫痫患者。