

自噬相关基因多态性与克罗恩病

罗继壮 盛欣成 易 静*

(上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要 自噬是细胞降解自身长寿命蛋白、受损细胞器或入侵病原体, 以维持自身稳态的现象。最近, 利用全基因组关联扫描技术发现, *ATG16L1*、*IRGM*等自噬相关基因的单核苷酸多态性与克罗恩病的发生有关。该文综述了这些自噬相关基因多态性以及细胞自噬缺陷与克罗恩病发生发展过程的关系。

关键词 自噬; 克罗恩病; *ATG16L1*; *IRGM*

Polymorphism of Autophagy-related Genes and Crohn's Disease

Luo Jizhuang, Sheng Xincheng, Yi Jing*

(School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract Autophagy is the process that cells maintain normal cellular homeostasis by degrading long-lived protein and damaged organelles. Recently, several Crohn's disease associated genes have been identified by genome-wide association scan, including autophagy related gene *ATG16L1* and *IRGM*. In this review, we summarized the role of autophagy deficiency in the pathogenesis of Crohn's disease.

Key words autophagy; Crohn's disease; *ATG16L1*; *IRGM*

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种反复发作和缓解的胃肠道慢性炎症肉芽肿性疾病, 多累及末端回肠和升结肠, 并伴有病变区细胞因子分泌异常、肠道微生态紊乱、黏膜屏障功能损伤等^[1], 多发于青年人, 常见症状有腹泻、腹痛及体重减轻^[2]。克罗恩病的组织学特点为不连续的全壁炎、裂隙样溃疡、黏膜下层高度增宽、淋巴细胞聚集和结节样肉芽肿形成^[3]。该病的发病机制尚不清楚, 但与环境、遗传、感染、免疫、肠道微生态等因素有关。最近, 利用全基因组关联扫描(genome-wide association scans, GWAS)及meta分析鉴定出了163个炎症性肠病危险基因座^[4], 克罗恩病相关危险基因座已发现71个^[5]。在这些危险基因座中发现有*ATG16L1*、*IRGM*、*NOD2*、*LRRK2*、*ULK1*^[6]等自噬相关基因的单核苷酸多态性可影响细胞自噬, 与克罗恩病的发生发展有关。本文将主要对目前广泛研

究的*ATG16L1*与*IRGM*的多态性在克罗恩病发生发展中的角色作一介绍。

1 细胞自噬

自噬(autophagy)是真核细胞在饥饿、缺氧、应激、衰老、病原体感染等状态下, 通过降解自身长寿命蛋白、衰老细胞器及入侵病原体等物质, 以维持自身基本生命活动需要的过程。自噬分为巨自噬(macrophagy)、微自噬(microphagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)等^[7]。巨自噬是自噬的主要形式, 其基本过程如下: 首先, 待降解的物质被非溶酶体起源的双层膜结构包裹, 形成独立的运载体, 称为自噬小体(autophagosome)。多种自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)参与自噬小体的形成, 其中包括*Atg1-10*、*Atg16*、*Atg18*等。随后, 自噬小体与溶酶体融合, 形成自噬性溶酶

收稿日期: 2014-04-28 接受日期: 2014-06-17

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776565, Fax: 021-53065329, E-mail: yijing@shsmu.edu.cn

Received: April 28, 2014

Accepted: June 17, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776565, Fax: +86-21-53065329, E-mail: yijing@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2014-10-16 13:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0145.html>

体(autolysosome), 最后, 自噬性溶酶体内物质在溶酶体酶的作用下降解, 生成氨基酸等小分子, 供细胞重新利用。适度的自噬对维持细胞内环境稳态具有重要意义, 自噬过度则会造成细胞自噬性死亡。自噬紊乱与多种疾病密切相关, 包括肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病及神经退行性病变等。

2 *ATG16L1*在自噬中的作用及与克罗恩病相关的单核苷酸多态性

*ATG16L1*在自噬小体的形成中具有关键作用。*ATG16L1*可通过自身多聚化, 与*ATG5*和*ATG12*等蛋白相互作用形成复合体, 在诱导自噬时该复合体从细胞质转移到双层膜结构中, 以招募*LC3*。小RNA *MIR142-3P*的靶点为*ATG16L1*, 可调控*ATG16L1*的表达^[8]。2007年, Hampe等^[9]利用GWAS在*ATG16L1*编码区鉴定出一个与克罗恩病相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点(rs2241880), 该突变导致N末端第300位上苏氨酸变为丙氨酸(*ATG16L1*T300A), 且发生在进化保守的WD重复区。携带此SNP者患克罗恩病的风险是普通人的两倍, 且患克罗恩病后更易使回肠受累。这一SNP在正常人群中也相当普遍, 反映出克罗恩病的发生是基因、环境及微生物等因素共同作用的结果^[10]。

3 *IRGM*在自噬中的作用及与克罗恩病相关的单核苷酸多态性

免疫相关鸟苷三磷酸激酶(immunity related guanosine triphosphatases, IRGs)家族在大多数哺乳动物清除胞内致病菌的过程中必不可少。老鼠中含有21个IRGs家族成员, 而人类仅有2个*IRG*基因(*IRGC*和*IRGM*), 其中只有*IRGM*在机体防御中起作用, 主要参与自噬的诱导、自噬小体成熟^[11]。人类*IRGM*有5个不同的剪接变体(*IRGMa~e*), 但是, 由于表达量低以及动物模型中基因结构不同, 阐述各个*IRGM*亚型的特定功能十分困难。这些亚型在促进自噬、线粒体裂变、炎症和细胞死亡中可能起到不同的作用^[12]。目前, 已在*IRGM*基因座周围确定了多个克罗恩病相关SNP。这些疾病相关SNP并没有改变*IRGM*的一级结构, 但可能影响了*IRGM*的表达、剪切或翻译。在*IRGM*上游有20 Kb片段的缺失, 可通过影响*IRGM*的表达方式, 使细胞发生自噬缺陷进

而造成胞内菌清除障碍, 被认为与克罗恩病的发生密切相关^[13]。

4 自噬缺陷引起克罗恩病的可能机制

4.1 胞内菌清除能力降低

自噬是机体消灭入侵细菌的免疫防御机制之一, 自噬缺陷会影响细胞清除入侵的病原体。敲除*ATG16L1*的表达会显著降低包含有细菌的自噬小泡的形成^[14]。胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)是细菌细胞壁的成分, 可激活NOD2配体。一项实验利用MDP刺激上皮细胞、巨噬细胞及树突状细胞, 经*ATG16L1*及NOD2等作用激活自噬、NF- κ B(nuclear factor- κ B)及MAPK(mitogen-activated protein kinase)途径, 进而杀伤并清除沙门氏菌。而*ATG16L1*T300A突变体可抑制上皮细胞在MDP诱导时清除沙门氏菌的能力^[15], 原因可能是细胞通过自噬控制及捕获细菌的能力下降^[16]。伴有回肠损伤的克罗恩病患者肠道上皮细胞内常有黏附-侵袭大肠杆菌(adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC)侵入并增殖。生理水平的自噬可以限制AIEC在胞内增殖, 而*IRGM*和*ATG16L1*缺陷的细胞内有AIEC LF2菌株大量增殖^[17]。Murthy等^[18]对*ATG16L1*突变导致细菌清除障碍的机制进行了深入研究, 发现caspase3在其中起重要作用, *ATG16L1*T300A突变使得其易于被caspase3降解。在不激活caspase3的情况下诱导*ATG16L1*T300A突变体自噬, 其自噬水平不受影响, 而在小肠耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)感染、饥饿等引起的应激状态或TNF- α 与细胞膜上死亡受体结合后, 可激活caspase3, 导致*ATG16L1*T300A被分解, 从而引起细胞自噬水平降低。小肠耶尔森菌感染时还会造成TNF- α 和IL-1 β 分泌增加, 这可以解释为什么抗TNF- α 治疗对克罗恩病患者有较好疗效。原因可能是TNF- α 可激活caspase3降解*ATG16L1*, 反而导致更多TNF- α 分泌^[19]。

广泛的研究发现, *IRGM*表达降低会使得结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和AIEC等更容易在胞内存活^[12-13, 17, 20]。*IRGM*适度的表达可增强细胞通过自噬清除细菌的能力, 但过表达会加重溶酶体负担, 反而导致胞内菌的积累^[20]。由自噬缺陷引起的胞内菌清除障碍, 可影响细菌抗原肽经MHCII分子的递提呈, 引发过度免疫反应, 招募更多炎症细胞浸润,

造成细胞因子分泌过度,并可形成以炎症损伤为主的肉芽肿,与克罗恩病的发生相关。

4.2 适应性免疫异常

自噬在适应性免疫调节中发挥重要作用。*ATG16L1*和*IRGM*突变可通过以下几种机制参与克罗恩病的发生。第一,细胞内可溶性抗原可通过自噬被降解成抗原肽,被MHC II类分子识别并递呈给T细胞,激活适应性免疫。自噬缺陷可影响细菌抗原肽提呈。第二,正常情况下机体通过调节T细胞的数量以维持免疫反应的稳态。抗原刺激时,T细胞数量增加,抗原清除后,T细胞数量应下降。而克罗恩病时Th1、Th2、Th17等持续激活,可能与自噬紊乱、造成机体通过控制T细胞存活时间进而调节适应性免疫反应的持续时间及强度的能力下降有关^[24-25]。免疫突触过稳定可能是造成T淋巴细胞的过度激活机制之一。敲除树突状细胞(dendritic cells, DCs)中*ATG16L1*和*IRGM*的表达,会导致DCs与T细胞相互作用过于紧密,形成的免疫突触过稳定,导致T细胞尤其是Th17细胞激活增加。从*ATG16L1*突变的克罗恩病患者体内分离的DCs也观察到免疫突触过稳定现象^[26]。适应性免疫过强可能是*ATG16L1*突变者易患的克罗恩病的原因之一。第三,自噬缺陷可能会造成对肠道共生菌和自身抗原的免疫耐受降低,使得肠道适应性免疫增强^[20]。

4.3 IL-1 β 、IL-6、IL-18分泌升高

通过特异性敲除胎鼠肝脏中*ATG16L1*的表达,出生的*ATG16L1* KO嵌合鼠可用于研究*ATG16L1*缺失对免疫细胞功能的影响。这种小鼠造血功能不受影响,但造血干细胞存在*ATG16L1*缺失^[21]。LPS是Toll样受体4(Toll-like receptor, TLR)的配体,LPS刺激*ATG16L1*缺失的巨噬细胞,发现其自噬功能严重缺陷,且炎症因子IL-1 β 和IL-18分泌增加。其机制为,自噬缺陷的细胞产生高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS),激活TIR结构域衔接蛋白(Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta, TRIF)依赖的caspase1,从而导致IL-1 β 、IL18的升高。另外,*ATG16L1* KO嵌合鼠更易被葡聚硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)诱导产生急性结肠炎,表现为溃疡及淋巴细胞浸润加重,血清前炎性细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-18升高。通过注射抗IL-1 β 、IL-18抗体可以缓解。与动物实验结果相似,克罗恩病患者的外周血单核细胞中也过量分

泌炎症因子。研究人员从健康志愿者及*ATG16L1*突变的CD患者体内采集外周血单核细胞,分别用TLR2、TLR4、NOD2的配体刺激这些单核细胞,发现用MDP刺激NOD2,会影响*ATG16L1* T300A突变的单核细胞*ATG16L1*的表达,且IL-1 β 和IL-6分泌升高,而刺激TLR2和TLR4则无此效应^[22]。用DSS处理的*Irgm1*敲除小鼠会发生更为严重的回肠、结肠急性炎症,并伴有更严重的临床表现。敲除*IRGM*在人巨噬细胞的表达,则这些巨噬细胞感染AIEC后,会过度分泌IL-6及TNF- α ^[23]。以上研究表明,*ATG16L1*和*IRGM*可以通过介导自噬,有效抑制炎症因子的产生,在肠道炎症免疫应答中起重要作用。

4.4 潘氏细胞功能异常

潘氏细胞位于肠腺基底部,以回肠为多,能分泌溶菌酶和防御素,溶解肠道细菌的细胞壁,具有杀菌作用。*ATG16L1*和*ATG5*缺陷的小鼠,其潘氏细胞分泌杀菌物质的能力显著下降,但其他肠上皮细胞功能正常^[27]。一项利用*Irgm1*敲除小鼠的研究也发现,*Irgm1*敲除小鼠的肠道上皮细胞的自噬水平下降,潘氏细胞功能显著受损^[28]。此外,*ATG16L1*缺陷的潘氏细胞,编码过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)及脂代谢的基因表达水平升高。利用基因捕获载体扰乱*ATG16L1*的表达,生成的*ATG16L1*低表达(*ATG16L1^{HM}*)小鼠,其*ATG16L1*表达水平只有正常小鼠的30%左右。这些*ATG16L1^{HM}*小鼠会产生高水平瘦素和脂联素。瘦素和脂联素可以直接影响肠道损伤反应,并可作为克罗恩病的标记物。在*ATG16L1*危险等位基因纯合子的克罗恩病患者中,也发现了潘氏细胞分泌异常以及瘦素表达水平升高^[27]。这些发现表明,潘氏细胞对自噬基因缺陷较为敏感,潘氏细胞抗菌物质分泌异常可能会改变肠道菌群,并可影响肠道损伤反应。

5 结语

ATG16L1、*IRGM*等自噬相关基因多态性可引起细胞自噬缺陷,引起肠道固有免疫及适应性免疫紊乱,造成肠道持续性炎症反应。因此,全面理解自噬失调与克罗恩病的关系,寻找有效上调自噬的小分子有望成为治疗克罗恩病的新方法。依维莫司、西罗莫司可通过抑制mTOR促进细胞自噬,临床试验已发现二者对部分克罗恩病患者有效^[29-30],显示

出针对克罗恩病患者的风险基因型进行个体化治疗的前景。

尽管已证明自噬缺陷与克罗恩病关系密切, 但值得注意的是, *ATG16L1*与*IRGM*突变在西方人群中比之亚洲人群更为常见。已有研究报道, *IRGM*基因rs10065172和rs72553867位点多态性与韩国人克罗恩病易感性相关^[31], 而我国学者尚未发现*IRGM*、*ATG16L1*等基因突变与中国人群克罗恩病存在相关性^[32-33]。多中心大样本队列研究可以明确*IRGM*、*ATG16L1*基因多态性与克罗恩病在中国发病人群中的相关性, 有助于指导克罗恩病患者的个体化治疗。

参考文献 (References)

- 1 Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl Med* 2009; 361(21): 2066-78.
- 2 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012•广州). *中华内科杂志* 2012; 51(10): 818-31.
- 3 刘彤华. 诊断病理学, 第2版. 人民卫生出版社(Liu Tonghua. *Diagnostic Pathology*, 2 nd. Peoples Medical Publishing) 2006; 60-1.
- 4 Beaudoin M, Goyette P, Boucher G, Lo KS, Rivas MA, Stevens C, *et al*. Deep resequencing of GWAS loci identifies rare variants in CARD9, IL23R and RNF186 that are associated with ulcerative colitis. *PLoS Genetics* 2013; 9(9): e1003723.
- 5 Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, *et al*. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genetics* 2010; 42(12): 1118-25.
- 6 Henckaerts L, Cleynen I, Brinar M, John JM, van Steen K, Rutgeerts P, *et al*. Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 1(6): 1392-7.
- 7 Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 14(4): 728-41.
- 8 Zhai Z, Wu F, Dong F, Chuang AY, Messer JS, Boone DL, *et al*. Human autophagy gene ATG16L1 is post-transcriptionally regulated by MIR142-3p. *Autophagy* 2014; 10(3): 8-19.
- 9 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, *et al*. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genetics* 2007; 39(2): 207-11.
- 10 Kabi A, Nickerson KP, Homer CR, McDonald C. Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: Insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(4): 782-92.
- 11 Bekpen C, Xavier RJ, Eichler EE. Human IRGM gene "to be or not to be". *Semin Immunopathol* 2010; 32(4): 437-44.
- 12 Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006; 313(5792): 1438-41.
- 13 Hofmann S, Franke A, Fischer A, Jacobs G, Nothnagel M, Gaede KI, *et al*. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genetics* 2008; 40(9): 1103-6.
- 14 Rioux J D, Xavier R J, Taylor K D, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, *et al*. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genetics* 2007; 39(5): 596-604.
- 15 Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, Achkar JP, McDonald C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 139(5): 1630-41.
- 16 Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 2008; 3(10): e3391.
- 17 Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010; 12(1): 99-113.
- 18 Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R. A Crohn's disease variant in ATG16L1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* 2014; 506(7489): 456-62.
- 19 Kaser A, Blumberg RS. Cell biology: Stressful genetics in Crohn's disease. *Nature* 2014; 506(7489): 441-2.
- 20 Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, *et al*. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genetics* 2011; 43(3): 242-5.
- 21 Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, *et al*. Loss of the autophagy protein ATG16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008; 456(7219): 264-8.
- 22 Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, van de Veerdonk FL, de Jong DJ, Philpott DJ, *et al*. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* 2011; 60(9): 1229-35.
- 23 Lapaquette P, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* 2012; 14(6): 791-807.
- 24 Brest P, Corcelle EA, Cesaro A, Chargui A, Belaïd A, Klionsky DJ, *et al*. Autophagy and Crohn's disease: At the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* 2010; 10(5): 486-502.
- 25 Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He YW. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* 2007; 204(1): 25-31.
- 26 Wildenberg ME, Vos AC, Wolfkamp S, Duijvestein M, Verhaar AP, Te Velde AA, *et al*. Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology* 2012; 142(7): 1493-503.
- 27 Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, *et al*. A key role for autophagy and the autophagy gene ATG16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008; 456(7219): 259-63.
- 28 Liu B, Gulati AS, Cantillana V, Henry SC, Schmidt EA, Daniell X, *et al*. Irgm1-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2013; 305(8): G573-84.

- 29 Dumortier J, Lapalus MG, Guillaud O, Poncet G, Gagnieu MC, Partensky C, *et al.* Everolimus for refractory Crohn's disease: A case report. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14(6): 874-7.
- 30 Reinisch W, Panés J, Lémann M, Schreiber S, Feagan B, Schmidt S, *et al.* A multicenter, randomized, double-blind trial of everolimus versus azathioprine and placebo to maintain steroid-induced remission in patients with moderate-to-severe active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(9): 2284-92.
- 31 Moon CM, Shin DJ, Kim SW, Son NH, Park A, Park B, *et al.* Associations between genetic variants in the IRGM gene and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 19(1): 106-14.
- 32 陈 兰, 吕小平, 詹灵凌, 高星火. ATG16L1基因多态性与广西壮族群炎症性肠病的关系. 山东医药(Chen Lan, Lü Xiaoping, Zhan Lingling, Tang Xinghuo. Relationship of ATG16L1 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in zhuang population of Guangxi province. *Shandong Medical Journal*) 2011; 51(13): 10-2.
- 33 郑连民, 庞 智. IRGM和ATG16L1基因多态性与中国汉族人群克罗恩病的相关性. 胃肠病和肝病杂志(Zheng Lianmin, Pang Zhi. Association of IRGM and ATG16L1 gene polymorphism with Corhn's disease in the Chinese Han population. *Chin J Gastroenterol Hepatol*) 2012; 21(5): 437-40.