维普资讯 http://www.cqvip.com

323-327 肝纤维化 Ⅳ型胶原 结构 功能

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

(41)

Ⅳ型胶原与肝纤维化

R575.202

病理生理教研室 沈 宜* 综述 范维珂 审校

中图分类号 R575.2

细胞外间质(ExtraCellular Matrix,ECM)是人体组织的重要组成部份,它主要由胶原蛋白、非胶原糖蛋白及蛋白多糖三大部份组成,其中胶原蛋白是其主要结构成分。胶原是动物体内含量最多、分布最广的一组蛋白质,占人体总蛋白的1/3[1]。目前,已报道了有17种胶原蛋白,它们是一组在结构上既有共同特点、又有差异的一组蛋白质[2]研究较多的有14种,可按其类型、多肽链种类、分子组成、三螺旋长度及代表性组织归纳如表1:

在整个胶原家族中,Ⅳ型胶原不论是从结构、分布及功能上都有其明显不同于其它型胶原的基本特点。目前对Ⅳ型胶原的特殊结构、功能及其临床病理学意义越来越引起人们的重视。本文拟对Ⅳ型胶原的结构与功能、编码基因的特点、在肝纤维化时的变化及其血清学检测研究进展作一简要综述。

1 Ⅳ型胶原的结构与功能

1971年Kefalides[3]等人从晶状体被膜用胃酶消化溶解后得到一种胶原蛋白,发现它含有一个经溴化氰降解后所产生的特有的多肽模型的α链,认为这是一种独特的胶原蛋白,有别于Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型间质胶原,而认为在基底膜中含有一种特有的胶原蛋白,命名为Ⅳ型胶原。现经多年的工作分析,已肯定Ⅳ型胶原是基底膜中所特有的胶原蛋白,故又称为"基膜胶原"。它的分子量、氨基酸组成及生理、生化特性明显不同于间质胶原[4]。Ⅳ型胶原绝大多数是由两条α1(Ⅳ)链与一条α2(Ⅳ)链构成的异三聚体。α1链由1669个氨基酸残基组成,α2链由1712个氨基酸残基组成[5],每条链形成左手螺旋,螺距为0.87nm,相邻两个氨基酸距离为0.29nm,三条肽链又相互缠绕形成大三螺旋,为右手螺旋,螺距为9.6nm。在胶原三螺旋结构中,沿肽链的每第3个氨基酸的位置,其空间大小正好能放入分子量最小的甘氨酸(G)残基。在Ⅳ型胶原α肽链上75%左右的氨基酸序列为(G-X-Y)n的重复序列,所以Ⅳ型胶原仍基本上是个杆状的三螺旋分子,而其余部位里每第3个氨基酸已不是甘氨酸,所以Ⅳ型胶原分子是一个不连续的杆状三螺旋分子[6],在人体α1(Ⅳ)链上G-X-Y重复序列中有21处被中断,α2(Ⅳ)链上有23处被中断,这些部位重迭后产生26处不规则的、长度易变的三螺旋中断区域,导致了比间质胶原更有柔性的特点,这些区域对蛋白酶十分敏感[6]。完整的Ⅳ型胶原分子在被胃蛋白酶作限制性降解时,被分解成数个大的多肽片段,其数目常因水解条件不同而略有差异。Ⅳ型胶原的氨基酸组成G-X-Y除甘氨酸外,在X、Y中含有丰富的3-羟脯氨酸和糖化的赖氨酸,每1000个氨基酸中含7-10个3-羟脯氨酸、碱性氨基酸的含量高于间质胶原,丙氨酸、精氨酸的含量比间质胶原低[6]。

上皮细胞合成并分泌Ⅳ型前胶原,不经端肽酶的水解作用直接参与基底膜的分子构成。每4个Ⅳ型胶原分子氨基末端相互以二硫键及羟赖氨酸与赖氨酸间形成的氢键连接成高度稳定的结构,这个四分子的结合区已通过蛋白酶水解分离出来,长30nm,分子量为200-300K,旋转投影观察该结构为十字交叉形,沉降系数为7s(svedberg单位),所以把它称为7s区[7]。每2个Ⅳ型胶原分子羧基末端由227-229个氨基酸残基组成,内含6个半胱氨酸,通过赖氨酸衍生物的交联键结合相互连接形成球形的非胶原螺旋段(NC_1)[8],中间的主三螺旋区长330nm,每条α(Ⅳ)链由1400个左右的氨基酸组成,其G-X-Y重复序列有20余处中断。7s区与主三螺旋区之间由13个氨基酸组成的肽片段,称为NC_2区,它使G-X-Y序列中断。这样的Ⅳ型胶原分子以四聚体为基础,N端及C端在分子间彼此交联,先形成二聚体,再侧相连接形成规则的三维网状结构,状如多孔床垫,又富有弹性,形成基底

* 女,1963-11出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜中一个稳固、不可逆的骨架结构,起着支撑基底膜其它成分,包括层粘蛋白(Laminin)、硫酸肝素蛋白多糖(perlecan)、内动蛋白(entactin)等,形成完整的基底膜结构。Ⅳ型胶原的变异体尚有

表1 各型胶原的特征

类型	多肽链种类	分子组成	三螺旋长度	代表性组织
每α^1(I)67mm长有横纹的长纤维状胶原				
Ⅰ	α^1(I)α^2(I)	$[\alpha^1(I)]_2[\alpha^2(I)]$	300mm;67mm	皮肤,肌腱
			横纹细纤维	骨,牙质
		$[\alpha^1(I)]_3$		胎儿皮肤组织
Ⅱ	α^1(Ⅱ)	$[\alpha^1(II)]_3$	同 上	软骨,玻璃体
Ⅲ	α^1(Ⅲ)	$[\alpha^1(III)]_3$	同 上	皮肤,肌肉,血管,常与CI在一起
Ⅴ	α^1(Ⅴ);α^2(Ⅴ);	$[\alpha^1(V)]_3$	390nm;N末	细胞培养;胎儿
	α^3(Ⅴ)	$[\alpha^1(V)]_2[\alpha^2(V)]$	端球形区	胎膜胎盘;大多
		$[\alpha^1(V)][\alpha^2(V)][\alpha^3(V)]$	常与CI在一起	数间质组织
Ⅺ	α(Ⅺ);α^2(Ⅺ);	$[\alpha^1(XI)][\alpha^2(XI)][\alpha^3(XI)]$	300nM;细纤维	软骨
	α^3(Ⅺ)		常与CⅡ在一起	
具有三螺旋中断处的纤维状胶原				
Ⅸ	α^1(Ⅸ);α^2(Ⅸ)	$[\alpha^1(IX)][\alpha^2(IX)]$	200nm,N末端球形	软骨,
	α^3(Ⅸ)	$[\alpha^3(IX)]$	区;结合氨基糖蛋	玻璃体
			白多酯,与CⅡ一起	
ⅩⅡ	α^1(ⅩⅡ)	$[\alpha^1(XII)]_3$	长的N末端区;十字	胚胎期肌
		$[\alpha^1(III)]_3$	一形分子;与CI作用	腱与皮肤
ⅩⅣ	α^1(ⅩⅣ)	$[\alpha^1(XIV)]_3$	长N末端区;十字形	胎儿皮肤
			分子	与肌腱
具有串珠结构的纤维状胶原				
Ⅵ	α^1(Ⅵ):α^2(Ⅵ);	$[\alpha^1(VI)][\alpha^2(VI)]$	150nm,N与C末端有	大多数
	α^3(Ⅵ)	$[\alpha^3(VI)]$	球形区;每100nm有	间质组
			横纹,与CI在一起	织
具有地毯状结构的胶				
Ⅳ	α^1(Ⅳ):α^2(Ⅳ);	$[\alpha^1(IV)]_2[\alpha^2(IV)]$	二维交叉连结的	所有基
	α^3(Ⅳ):α^4(Ⅳ);	其它形式	网状结构	底膜
	α^5(Ⅳ)			
Ⅷ	α^1(Ⅷ),α^2(Ⅷ)	不清楚	规则的三角形网格	内皮细胞
Ⅹ	α^1(Ⅹ)	$[\alpha^1(X)]_3$	150nm	生长板
形成锚合纤维的胶原				
Ⅶ	α^1(Ⅶ)	$[\alpha^1(VII)]_3$	450nm;二聚体;每	锚定皮肤
			端都是球形区	基底膜
仅从cDNα克隆知道的胶原				
ⅩⅢ	α^1(ⅩⅢ)	不清楚	不清楚	内皮细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

α3(Ⅳ),α4(Ⅳ),α5(Ⅳ),α6(Ⅳ)链已被证实[9,10],Ⅳ型胶原的6条α链有不同的分布,α1(Ⅳ)、α2(Ⅳ) 链存在于所有组织的基膜中,而α3(Ⅳ)－α6(Ⅳ)链的分布组织很有限[11]。α3(Ⅳ)、α4(Ⅳ)、α5(Ⅳ)链有相似的分布[10,12],存在于肾小球基膜中,α3(Ⅳ)、α4(Ⅳ)链还存在于肌纤维的突触上(而在肌纤维的外突触上则没有),晶状体被膜中[9],及主动脉壁基膜中[13]。α6(Ⅳ)链蛋白的分布仍不清楚,而COL4A6基因产物则在很多组织中存在[14],最高水平表达在食管和肺中。但这些新发现的Ⅳ型胶原α链在各组织中的特殊分布与功能的关系仍不十分清楚,现认为它们与小球基膜的分子筛及平滑肌细胞的分化有关,目前所知的病理意义主要与一些遗传性疾病有关,如自身免疫病－-Goodpasture综合症,Alport综合症,进行性、遗传性血管球性肾炎,遗传性平滑肌瘤。α3(Ⅳ)链是Goodpasture综合症自身抗体作用的靶[9]。多发性Alport综合症是COL4A5基因在X性染色体发生突变,又有COL4A3、COL4A4基因突变[15,16]。 遗传性平滑肌瘤病中COL4A5、COL4A6基因丢失[14]。

2 Ⅳ型胶原的基因及其调控

2.1 **氨基酸序列** 在生物进化及胚胎发育的很早期,基底膜早已出现。它们起着支持细胞的作用,且对胚胎发育时期的细胞分化及形态发生是十分重要的。目前已对小鼠及人的α1(Ⅳ)及α2(Ⅳ)多肽链的氨基酸序列全部查明[6,17,18,19]。已如前述,它们可分成7s区、NC_1区、NC_2及主三螺旋区。亦测定了果蝇、酵母及蛔虫的Ⅳ型胶原α链的氨基酸序列并与人及小鼠的进行比较。

发现在其中最保守的部分是C末端的NC_1,它有230个残基长,在2个α1(Ⅳ)及1个α2(Ⅳ)特异性结合及胶原分子的聚集时具有重要作用。4个胶原分子通过其N末端聚集起来,该末端包括非螺旋尾肽及继后的117个残基的三螺旋段。各个α(Ⅳ)链在其杆状三螺旋区中有多个非三螺旋区,在不同的链中有所不同。人的α1(Ⅳ)与α2(Ⅳ)链各含21与23个中断,每一中断可以是1至20个残基不等。这一中断在N端比C端要多。这些氨基酸的排列,在Ⅳ型胶原具有一定的特征性。

2.2 **外显子/内含子结构** Ⅳ型胶原基因的结构正好反映了Ⅳ型胶原肽链的氨基酸序列。编码人α1(Ⅳ)的基因(COL4A1)[20],鼠α2(Ⅳ)(COL4A2)[21],果蝇α1(Ⅳ)(COL4A1)[22]与酵母α1(Ⅳ)(COL4A1)[23]的外显子边界均已搞清。蛔虫COL4A2基因的外显子/内含子结构亦已发表[24]。比较其编码序列可见人与小鼠的COL4基因与果蝇、蛔虫的COL4基因有明显的区别。

人与小鼠的COL4基因长而复杂,约100Kb长,COL4A1含52个外显子,COL4A2含47个外显子。而在无脊椎动物仅7.5Kb长,含12及9个外显子。两者间很少相似,而只有NC1区似乎来源于共同的祖先基因。

2.3 **COL4A1及COL4A2基因的转录单位** 人类Ⅳ型胶原α1(Ⅳ)、α2(Ⅳ) 链的两个基因COL4A1、COL4A2定位于染色体13q34,他们以头对头的方式排列、以相反的方向转录[25,26,27]。α1(Ⅳ)和α2(Ⅳ)mRNA转录起始位置之间有一个127bp的分隔区,在这分隔区中含有两个基因重迭启动子。

COL4A1的第一个外显子编码5'未翻译区和α1(Ⅳ)的信号多肽链。COL4A2基因的相应区域被分成3个外显子。这个相对较小的在启动子周围的基因片段与两个基因密码主要部位被大的间隔序列的延伸所分隔开。启动子单独都无转录活性,在α1(Ⅳ)或α2(Ⅳ)方向转录均无活性。两个基因都含有一个对重叠启动子激活所必需的区域,位于第1外显子/内含子的边界上,他们以基因的特异的方式控制mRNA的转录。这个作用使COL4A2重叠启动子严格从α2(Ⅳ)方向转录,COL4A1相应片段向α1(Ⅳ)方向转录。这些基因特异成分的作用不同于典型的增强子,因为他们的活性完全取决于启动子的拓朴学排列。启动子在距离或方向发生变化时就会导致它的活性丧失[28]。人COL4A1与COL4A2的重叠启动子显示内部对称性。

在启动子中央有一GC盒,它类似于转录因子Sp1的结合位点,在α2(Ⅳ)基因起始点上游160bp为一CCAAT结构域单元(motif),可与CBP结合,未见典型的TATA盒结构域单元。CCAAT结构域单元与GC盒之间有一长串嘧

维普资讯 http://www.cqvip.com

啶CCCCCTCCCCCCC隔开,称为CTC盒,可与CTC因子结合。当上述CCAAT结构域单元、GC盒、CTC盒进行人工突变时,均能使其结合亲合性明显降低,使α1(Ⅳ)mRNA及α2(Ⅳ)mRNA转录活性降低。实验结果显示CCAAT结合蛋白CPI及CTC因子是α2(Ⅳ)启动子的转录因子,而且该2个重叠启动子并未完全独立起作用。目前尚不知道是否有其他核蛋白可作用于重叠启动子而且主要调控α1(Ⅳ)mRNA。

这种头对头的两个胶原基因翻译两个功能分子亚基仅存在于Ⅳ型胶原中。α3(Ⅳ)与α4(Ⅳ)基因分别定位于人染色体2q35－37[29],α5(Ⅳ)基因则位于染色体Xq22[10]。在进化过程中为什么会出现这种特殊的转录单位及它有什么优势呢?可能的回答就是两个基因可以同等转录以及基因的调控能被普通的顺式和反式激活因子所调控[28]。

2.4 COL4A1与COL4A2基因的表达 胶原的基因表达在许多水平上受到调控。第一步是基因组DNA转录为mRNA。染色质结构与甲基化型式的改变可严重影响转录水平。并受顺式与反式作用的核因子的调节。但其详尽过程目前尚不清楚。用能产生人Ⅳ型胶原的各种细胞,分析其转录α1(Ⅳ)及α2(Ⅳ)mRNA的速率及含量之比及Ⅳ型胶原分子中α1(Ⅳ)与α2(Ⅳ)之比取得了如表2的结果[28]:

表2 不同细胞中Ⅳ型胶原肽链的转录与翻译

细胞	α1(Ⅳ)/α2(Ⅳ) 体内转录速率	稳态mRNA值	分子中亚单位组成 A431
(鳞彩上皮)	119:1	0.3:1	
HBL100(乳腺水皮)	2.2:1	0.4:1	
Tere2(畸胎癌)	1.1:1	1.1:1	
HE(胚胎纤维细胞)	1.7:1	0.8:1	
HS732(胚胎起源)	1.3:1	1.2:1	
HT1080(纤维化肉瘤)			
(延滞期)	1.6:1	1.2:1	2:1
指数生长期	1.6:1	0.7:1	2:1
静止期	2.6:1	0.3:1	2:1

说明Ⅳ型胶原基因在体内的转录速率比较一致,均在2:1左右,而细胞浆内α1(Ⅳ)/α2(Ⅳ)mRNA则差别很大,可以0.3:1至1.2:1。但在蛋白水平上,Ⅳ型胶原分子中的α1(Ⅳ)/α2(Ⅳ)均保持在2:1,符合Ⅳ型胶原的基本结构。

3 肝纤维化时Ⅳ型胶原的变化

肝纤维化的实质就是细胞外间质成分的增生和沉积,常继发于肝细胞的反复发作的变性与坏死,其原因可以是多方面的,为病毒性肝炎、酒精或其他药物、毒物慢性中毒,血吸虫感染、慢性心力衰竭、胆汁性肝硬化等等。且这一过程往往是变化的、动态的,不是静止不变的。在感染、毒物及代谢性损伤反应时肝脏内各种细胞产生ECM增多,后者又反过来影响这些细胞的分化、增殖、粘附和表型的表达,这种相互作用又有很多细胞因子所介导,所以导致肝纤维化发生的机理是十分错综复杂的。

目前发现肝组织中有5型胶原:Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型胶原蛋白。正常情况下,胶原蛋白约占肝脏总蛋白的5%－10%,其中80%是Ⅰ、Ⅲ型胶原(各占40%),Ⅳ型胶原仅占肝总胶原含量的1%,Ⅳ型胶原6个基因产物在肝组织中只有α1(Ⅳ)、α2(Ⅳ)两种[30],呈含量少的小碎片,主要分布在血管、淋巴管、胆管、毛细胆管基底膜及神经轴索周围。电子显微镜下在血窦狄氏腔中呈不连续的分布,肝窦与狄氏间隙之间只有一层由内皮细胞、枯否氏细胞组成的间隔,缺乏完整的基底膜,肝细胞微绒毛伸向狄氏腔间隙,进行物质交换。

当肝脏发生纤维化时,胶原蛋白可占肝脏总蛋白的50%,在肝纤维化早期,以Ⅳ型胶原增多为主,而发展到肝硬化时,Ⅰ型胶原明显增多。Ⅳ型胶原代谢与合成也主要在肝脏内进行,正常情况下主要由贮脂细胞、胆管上皮细胞与肝窦内皮细胞产生[31]。在肝脏发生纤维化过程中,肝细胞也合成Ⅳ型胶原[36],在其他ECM大量沉积的同时[32,33],Ⅳ型胶原沉积明显增多,并认为是Ⅳ型胶原产生增多[34,35]。免疫组化显示,Ⅳ型胶原在肝血窦壁呈连续分布,导致基底膜结构的形成[34]。在肝纤维化早期,α1(Ⅳ)胶原mRNA增多[36]。在酒精性及胆汁淤积性肝硬化组织中Ⅳ型胶原很早期就沉积增多[37]。Ⅳ型胶原增多,主要病理意义是参与肝血窦的毛细血管化。肝纤维化时,肝血窦中Ⅰ、Ⅲ型胶

维普资讯 http://www.cqvip.com

原增多,同时肝窦壁上Ⅳ型胶原转为连续性,并出现层粘连蛋白,在内皮细胞与肝细胞之间出现一层连续的基底膜,使血窦成为类似于毛细血管样通道。在肝纤维化时肝细胞表面微绒毛数量减少,可以加重肝细胞的营养物质的交换障碍,加重肝细胞损害。

Ⅳ型胶原主要在肝内合成代谢,随肝组织中Ⅳ型胶原代谢的变化,血清中Ⅳ型胶原及它的分解产物浓度也会发生相应变化。现已建立了多种血清Ⅳ型胶原的免疫学检测方法,包括放射免疫法(RIA)与酶联免疫吸附试验法(ELISA),分别应用相应的抗体测定血清中Ⅳ型胶原7s区、NC_1区及主三螺旋区,并被广泛用于肝纤维化病人的检测[38]。1986年Schuppan建立的血清Ⅳ型胶原羧基端肽(NC_1)的放免检测法证实了肝纤维化病人血清NC_1浓度(9－240ng/ml)明显高于正常人(6±2.9ng/ml)。1992年Yamada建立了血清7s胶原的放射免疫检测法,并用于各种慢性肝病,证实7s胶原的血清浓度对慢性肝病判断有重要意义,且与肝纤维化程度密切相关。Obata 建立了Ⅳ型胶原单克隆抗体夹心酶联免疫吸附试验,生产出的试剂盒已被广泛应用[39]。Marawaki Y等人几次测定慢性肝炎病人血清中Ⅳ胶原7S区和主三螺旋区水平,其结果是它们均与肝组织的纤维化程度密切相关,它们是肝纤维化的良好血清标志物[40,41]。

4 小结

Ⅳ型胶原是存在于基底膜中呈巨分子网状结构的胶原蛋白,分子具有高度柔性,在基底膜中起着支架结构、支撑基底膜其它成分的作用。Ⅳ型胶原与慢性肝病及肝纤维化发生、发展过程中所起的重要作用正日益被人们所重视。血清或肝组织Ⅳ型胶原测定是唯一直接反映肝组织基底膜胶原变化的可靠指标,是各种类型肝纤维化血清学诊断很有前途的指标之一,因之在反映早期肝纤维化有重要临床意义。

参考文献

1.Schuppan D.Semin Liver Dis 1990;10:1
2.Kehua L. et al. J Biol Chem 1993;12:8825
3.Kefalides NA. BiochemBiophysResCommun 1971;45:226
4.Bornstein P. et al.Annu Rev Biochem1980;49:957
5.Brazel D. et al. Eur J Biochem1988;172:35
6.李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法.第一版.人民卫生出版社,北京,1988年
7.Timpl R.et al. Eur J Biochem1981;120:203
8.Weber S. et al. Eur J Biochem1988;175:229
9.Butkowski RJ.et al. J Bioch Chem1987;262:7874
10.Hostikka SL . et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:1606
11.Langeveld TPM.et al. J Biol Chem1988;263:10481
12.Butkowski RJ.et al. Kidney Int 1989;35:1195
13.Reddy GK.et al. Biochem Biophys Acta 1993;1157:241
14.Zhou J.et al. Science 1993;261:1167 15.Tryggvason K.et al.Kidney Int1993;43:38
16.Barker DF.et al. Science 1990;248:1224
17.Hostikka SL.et al. J Biol Chem 1988;263:488
18.Muthukumaran G.et al.J Biol Chem 1989;264:6310
19.Saus J.et al. J Biol Chem 1989;264:6318
20.Soininen R.et al. J Biol Chem1988;263:217
21.Buttice G.et al. J Mol Evol 1990;30:479
22.Blumberg B.et al.Biochem Biophys Res Commun 1988;263:328
23.Guo X.et al.Nature 1991;349:707
24.Pettitt J.et al. J Biol Chem 1991;266:149
25.Griffn CA.et al.Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:512
26.Poschl E.et al. EMBO J 1988;7:2687
27.Soininen R.et al.J.Biol.Chem.1988;263:217
28.Rohrbach DH.et al.Molecular and cellular aspects of basement
membranes.P129,136, Academic press,Inc. 1993
29.Kamagata Y.et al.J Biol Chem 1992;33:23753
30.Kuhn K.et al.Ann NY Acad Sci 1986;460:14
31.Clement B.et al.Hepatology 1986;6:225
32.Rojkind M.et al. Collagen Rel Res1982;2:151
33.Seyer TM.et al. J Clin Invest1979;59:241
34.Hahn E.et al. Gut 1982;21:63
35.LevasseurE.et al. J Hepatology 1995;22:10
36.Alo－kokkol.et al. Biochem J 1987;244:75
37.Abdel－Aziz G.et al. Am J Pathol 1990;137:1333
38.Tsutswmi M.et al.Hepatology 1993;17:820
39.Obata K.et al. Clin Chim Acta 1989;181:293
40.Murawaki Y.et al.J Hepatol 1996;24:148
41.Murawaki Y.et al.Hepatology 1994;20:780

(收稿日期 1998－06－11)