

激活素 A :IL-6 拮抗剂

郑阳春,周总光

(四川大学华西医院微循环实验室,四川 成都 610041)

关键词:激活素;白细胞介素-6;拮抗剂;炎症;基因治疗

中图分类号:Q513.2;R459.9

文献标识码:A

文章编号:1006-2084(2002)07-0373-03

激活素(activin,ACT)是一种主要由性腺分泌的水溶性糖蛋白激素,属于转化生长因子(TGF β)超家族成员,最初由卵泡液中分离纯化获得,它与抑制素(inhibin,INH)因能分别特异的促进和抑制垂体细胞分泌卵泡刺激素(FSH)而得名。ACT尤其是ACT A是一种多功能的细胞因子,广泛存在于人和其他一些动物的多个组织和器官中,参与调节胚胎发育、骨形成、红细胞分化、肝实质细胞分化、神经细胞存活等多种生理过程。新近研究发现,ACT A可阻断白细胞介素-6(IL-6)生物效应,是IL-6拮抗剂,提示炎症反应时,ACT的表达有助于防止机体因炎症反应过度而造成伤害。本文着重就激活素分子生物学特性、激活素A与IL-6的关系综述如下。

1 ACT分子生物学特性

1.1 ACT蛋白结构与分类 ACT是由两个INH亚基以二硫键构成的二聚体糖蛋白,INH亚基则构成INH。从卵泡液和精液中分离出三种ACT形式:ACT A(AA)、ACT B(BB)、ACT AB(AB),其中A亚基含量最多,研究也相对较多。研究还发现另外三种亚基即C、D和E亚基,它们的基因也已陆续被克隆。序列分析表明,ACT亚基具有典型的TGF β 超家族结构特征,即在该分子C末端活性部位有9个保守的半胱氨酸残基。ACT亚基在不同种属间具有高度保守性,其中人、牛、猪及大鼠A亚基序列完全一致,其他亚基氨基酸序列也大部分相同。成熟的A~E亚基分别由116、115、116、114、114个氨基酸残基组成,它们之间具有高度同源性,其中A、B亚基有63%氨基酸序列一致,C、D、E有62%序列一致,5种亚基大约有50%序列一致,与其他TGF β 家族成员有20%~40%序列一致^[1]。分布上,除性腺外,A、B在肝脏等多个组织器官中都有表达,C亚基局限于肝脏,而E亚基除肝脏外,在肺脏中也有少量表达^[2],D亚基目前研究较少。

1.2 ACT受体与信号转导 ACT受体属跨膜丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有三种形式即I型受体(R_I)、II型受体(R_{II})和III型受体(R_{III})。R_I和R_{II}在信号转导中相互作用,缺一不可。R_I缺乏胞内区,不直接参与信号转导,但可作为连接分子增加配体与II型、III型受体间的亲和力。信号转导时,ACT先与R_I结合,再募集R_{II}形成R_I-ACT-R_{II}三聚体复合物,复合物中的R_{II}被R_I磷酸化,激活后的R_{II}依靠胞浆内SMAD(包括Smad1~9)中介蛋白将信号转导至核内。与ACT信号转导相关的SMAD主要是通路特异性(pathway-specific)SMAD包括Smad2、Smad3;公用性(common mediator)SMAD即

Smad4;抑制性SMAD包括Smad6、Smad7^[3,4]。研究发现一种鼠PDZ蛋白ARIP1(activin receptor-interacting protein 1),既能特异地和R_IA1结合又能与Smad2尤其是Smad3结合,从而调节ACT信号转导^[5]。

1.3 ACT生物活性调控 正常人循环血中ACT大部分以结合蛋白形式存在。卵泡抑素(follistatin,FS)是糖基化单聚体蛋白,是ACT的主要结合蛋白,最初作为垂体FSH抑制因子被纯化,后来发现它能通过其分子上的肝素域与ACT不可逆地结合,阻断ACT与R_I结合,从而调节ACT生物活性^[6]。研究表明,1分子FS能与2分子ACT以高亲和力结合(<1.0nM),其亲和力与ACT受体相似,最大结合力为(18 300 \pm 3 500)pmol/mg,解离常数为(590 \pm 230)pM。而INH、TGF β 、FSH及黄体生成素(luteal hormone,LH)等不能与FS结合或结合力很弱^[7,8]。

α_2 -巨球蛋白是ACT的另一结合蛋白,它是高分子量的四聚体蛋白,能与多种细胞因子包括ACT/INH结合。这种结合减少了ACT暴露,抑制ACT蛋白降解或转移ACT到靶组织,但并不影响ACT或INH的免疫及生物活性^[9]。

2 ACT对IL-6的调节作用

2.1 调节IL-6生成 研究发现,ACT A可抑制植物血凝素和IL-1刺激的成年大鼠胸腺细胞增殖,当提高植物血凝素浓度或加入还原剂-巯基乙醇后,ACT A的抑制活性逐渐下降。进一步研究发现,ACT A在有植物血凝素或IL-1存在时,可抑制胸腺细胞生成IL-6,表明ACT A抑制胸腺细胞增殖分化作用,可能部分是通过抑制内源性IL-6生成实现的^[10]。但是,也有相反的研究结果显示,ACT A能以剂量依赖的方式刺激IL-6分泌。在以IL-4诱导的周围血单核细胞(PBMC)Iscoves培养基中(添加10%FCS)加入ACT A,培养第3d时,IL-6生成显著增加,培养第7d时,仍可观察到这种刺激效应。当ACT A浓度为 10^{-11} M时,就可观察到其对IL-6生成的刺激作用,当ACT A浓度为(10^{-8} ~ 10^{-7})M时,刺激作用最大。进一步研究发现,在纯化的PBMC培养细胞中加入ACT A孵育3h,即可出现ACT A诱导的IL-6 mRNA表达;在纯化的PBMC培养基中加入ACT A孵育3d,也出现相似的IL-6生成增加。

然而,Keelan等^[11]研究发现,羊膜分泌IL-6对ACT A的刺激呈双相反应,当ACT A为5 μ g/ml时,IL-6的分泌显著增加,当ACT A为50 μ g/ml时,IL-6的分泌明显受到抑制。羊膜分泌IL-8、PGE₂对ACT A刺激也呈相似反应,但ACT A对绒毛膜蜕膜和胎盘组织分泌IL-6、IL-8以及PGE₂无明显作用。

2.2 拮抗IL-6生物效应

2.2.1 抑制IL-6诱导的B淋巴细胞增殖 杂交瘤7TD1细胞是IL-6依赖的B淋巴细胞,IL-6可显著刺激其细胞增殖。在以IL-6诱导的7TD1培养细胞中加入ACT A时,可见ACT A

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39925032)

以剂量依赖性的方式抑制 IL-6 诱导的 7TD1 细胞增殖,而且当 ACT A 浓度仅为 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ 时,就可观察到这种明显的抑制效应。对照实验表明,培养细胞中如不加入 IL-6,ACT A 对 7TD1 细胞增殖无直接作用。在研究另一杂交瘤 B9 细胞时,也观察到相似结果,这表明 ACT A 通过拮抗 IL-6 活性从而抑制 B 淋巴细胞增殖^[12]。

尽管 ACT A 能拮抗 IL-6 对 B 淋巴细胞的生长刺激效应,然而它对巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)刺激的 14M1.1 细胞增殖、对粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)刺激的 NFS 细胞增殖和 IL-3 刺激的 MC/9 细胞增殖均无抑制作用,表明 ACT A 对 IL-6 的抑制作用是特异的^[13]。

2.2.2 抑制 IL-6 诱导的 M1 单核细胞吞噬活性增加 M1 单核细胞以 IL-6(10 $\mu\text{g/ml}$) 孵育 48h 后,细胞向吞噬细胞分化,表现为细胞内吞的聚苯乙烯乳胶微粒逐渐增多,吞噬细胞计数表明有吞噬活性的细胞百分比比较对照组增加 5 倍。在加入 ACT A 时,这种 IL-6 刺激的 M1 细胞吞噬活性增加作用被逐渐取消,当 ACT A 剂量为 25 $\mu\text{g/ml}$ 时,吞噬细胞活性下降到对照组水平,即 ACT A 完全抑制了 IL-6 诱导的单核细胞 M1 吞噬活性增加。进一步研究发现,ACT A 在缺乏 IL-6 的 M1 培养细胞中,对 M1 细胞的吞噬活性无明显影响,表明 ACT A 是作为 IL-6 的抑制剂,拮抗 IL-6 诱导的 M1 细胞向吞噬细胞分化^[12]。Brosh 等^[13] 研究也发现,M1(克隆 11)成髓细胞在 IL-6 刺激下向单核细胞分化,而 ACT A 能完全取消 IL-6 的刺激作用。

2.2.3 抑制 IL-6 诱导的 HepG2 细胞分泌急性期蛋白 利用 ELISA 法检测纤维蛋白原发现,IL-6 在 (0.01 ~ 10) $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内能浓度依赖性的刺激肝细胞癌 HepG2 细胞分泌纤维蛋白原。当加入 ACT A 后能显著减少 IL-6 诱导的纤维蛋白原生成,而且 IL-6 浓度越高,ACT A 对其的抑制作用越明显,当 IL-6 浓度为 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ 时,ACT A 能抑制 76.9% 的纤维蛋白原生成,对照实验表明 ACT A 本身对 HepG2 细胞分泌纤维蛋白原无直接作用^[12]。Russell 等^[14] 研究也发现,ACT A 能显著抑制 IL-6 诱导的 HepG2 细胞分泌急性期蛋白包括结合珠蛋白和 α_2 -酸性糖蛋白。ACT A 本身也能抑制结合珠蛋白分泌,但对 α_2 -酸性糖蛋白浓度无直接影响。

2.2.4 抑制 IL-6 诱导的其他细胞活性 Brosh 等^[13] 进一步研究了其他毫无关联的细胞系,包括增殖性杂交瘤细胞、分化性成髓细胞和活化性肝细胞癌细胞。IL-6 均能诱导这些细胞系产生不同的生物效应,但是 ACT A 同样能阻断 IL-6 的诱导作用,这表明 ACT A 可能是普遍的(universal) IL-6 拮抗剂。然而 Hedger 等^[10] 研究认为,ACT A 虽可通过抑制内源性 IL-6 生成从而抑制胸腺细胞增殖,但是当同时有外源性 IL-6 存在时,ACT A 却刺激胸腺细胞增殖,提示 ACT A 通过与其他细胞因子相互作用来调节 T 细胞生长,ACT A 并不是 IL-6 在所有类型细胞中的抑制剂。

2.3 拮抗 IL-6 生物效应的分子机制 研究表明,ACT A 可能通过两种机制拮抗 IL-6 的生物效应: ACT A 作用于靶细胞表面 IL-6 受体复合物 gp130 亚单位,竞争性拮抗 IL-6 与受体结合。ACT A 作用于胞内 IL-6 信号转导通路中的靶结构,抑制 IL-6 的信号转导^[12,13]。Brosh 等^[13] 在验证 ACT A 作为 IL-6 拮抗剂的可能性时发现,ACT A 在一定浓度时可完全阻断 IL-6 对 B9 细胞的生长刺激作用,却并不减少放射性标记的

IL-6 与其 B9 细胞表面受体的结合,提示 ACT A 可能还作用于 IL-6 受体后的信号转导通路。研究发现 IL-6 诱导的 B9 细胞当去除 IL-6 后,表现出短暂的即早基因 junB 表达的升高。在上述细胞中加入 ACT A 时出现 junB 基因更高水平的表达,持续 24h,此时细胞死亡早已发生;同时,用 ACT A 孵育的 B9 细胞还观察到另一即早基因 TIS-11 表达的升高。在研究用 ACT A 处理的 MPC-11 细胞和 HepG2 细胞时,也观察到 junB 基因表达的增高,但在这些细胞中,ACT A 并不影响 JAK/STAT 信号转导通路。进一步研究发现,在 HepG2 培养细胞中加入 IL-6(10U/ml) 和不同浓度的 ACT A (0 ~ 130U/ml) 孵育,随着 ACT A 浓度的增高或孵育时间延长,DNA 结合蛋白 STAT(包括 Stat3、Stat1 同源二聚体和 Stat3/Stat1 异源二聚体)水平逐渐增高,提示 ACT A 逐渐增加 STAT 激活,对比 ACT A 阻断 IL-6 诱导的 HepG2 细胞分泌急性期蛋白的现象,提示尚存在一种独立、未知的 ACT A 与 IL-6 信号转导通路之间的对话(cross-talk)通道。

3 结语

IL-6 是个多功能的细胞因子,参与调节免疫反应、炎症急性期反应和血细胞生成等病理过程,IL-6 的过度表达和多种临床常见疾病有关。ACT A 可阻抗 IL-6 生物效应的特性,提示 ACT A 对促进炎症反应的下调和炎症的转归可能具有一定作用。研究业已证实,在多种炎症性疾病和组织损伤的发生、发展和转归过程中,ACT A 扮演了重要角色^[12,15-17]。目前,ACT A 拮抗 IL-6 作用的分子机制仍然欠清,ACT A 在炎症中的地位尚有待进一步明确,有理由相信,随着对 ACT A 研究的逐渐深入,将会为临床炎症性疾病的抗炎细胞因子治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Fang J, Yin W, Smiley E, *et al.* Molecular cloning of the mouse activin beta(E) subunit gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 228(3): 669-674.
- [2] O Bryan MK, Sebire KL, Gerpraser O, *et al.* Cloning and regulation of the rat activin beta (E) subunit [J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 24(3): 409-418.
- [3] Krezschar M, Liu F, Hata A, *et al.* The TGF β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(8): 984-995.
- [4] Krezschar M, Massague J. SMADs: mediators and regulators of TGF β signaling [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(1): 103-111.
- [5] Shoji H, Tsuchida K, Kishill H, *et al.* Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5485-5492.
- [6] Sugino H, Sugino K, Hashimoto O, *et al.* Follistatin and its role as an activin-binding protein [J]. *J Med Invest*, 1997, 44(1-2): 1-14.
- [7] De Winter JP, Ten Dijke P, De Vries CJ. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 116(1): 105-114.
- [8] Phillips DJ, de Kester DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein [J]. *Front Neuroendocrinol*, 1998, 19(4): 287-302.
- [9] Mather JP. Follistatin and γ -Macroglobulin are soluble binding proteins for inhibin and activin [J]. *Horm Res*, 1996, 45(3-5): 207-210.
- [10] Hedger MP, Phillips DJ, de Kester DM. Divergent cell-specific effects of activin A on T lymphocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1 β or interleukin 6 in vitro [J]. *Cytokine*, 2000, 12(6): 595-602.
- [11] Keelan JA, Zhou RL, Mitchell MD. Activin A exerts both pro- and anti-inflammatory effects on human term gestational tissues [J]. *Placenta*, 2000, 21(1): 38-43.
- [12] Yu EW, Dolter KE, Shao LE, *et al.* Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implication for inflammatory arthropathies [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 112(1): 126-132.

定量 PCR 在 HBV 临床研究中的应用

孙 静, 侯孟君

(广州中医药大学附属广东省中医院中心实验室, 广东 广州 510515)

关键词: 聚合酶链反应; 肝炎病毒, 乙型; 斑点杂交法; 支链 DNA 技术
中图分类号: Q503
文献标识码: A
文章编号: 1006-2084(2002)07-0375-03

自 1989 年聚合酶链反应 (PCR) 技术应用于临床检测以来, 对 HBV 感染的研究提供了一种快速而敏感的有效手段。然而, PCR 临床应用亟待解决不能定量和污染所致的假阳性等问题。随着分子生物学的飞速发展, PCR 检测不仅能定性, 且也能定量检测, 从核酸分子杂交到定量 PCR 技术检测 HBV DNA, 其灵敏度和特异性不断提高。本文就目前几种 HBV DNA 定量检测方法及其临床应用综述如下。

1 HBV DNA 的定量检测方法

1.1 斑点杂交法 系一种固相杂交技术。将含有 HBV DNA 的样本点在硝酸纤维膜上, 再与特异性探针进行杂交, 经放射性自显影或酶促反应后在底片或膜上呈斑点, 直接对膜上的斑点进行放射性计数 (cpm) 或测定斑点光密度 (OD), 与根据不同已知量标准品 HBV DNA 杂交所得的标准曲线比较, 可定量分析样本初始 HBV DNA 量。由于该法敏感低, 且过程繁琐, 现已很少用于定量检测。

1.2 支链 DNA 技术 Chiron 公司推出的支链 DNA (bdNA) 技术是一种通过在固相微孔板进行一系列特异的杂交反应来扩增信号并以化学发光方法进行定量的技术。微孔板上包被的捕获探针捕获样本中靶 DNA 后, 加入的靶探针与靶 DNA 杂交结合, 再加入合成的 bdNA 扩增分子与靶探针杂交。由于 bdNA 分子上有几十个呈梳状排列重复的核苷酸序列, 每个核苷酸序列上结合有 3 个碱性磷酸酶, 而使得信号充分扩大。加入发光底物并测定发光强度, 可定性定量检测 HBV DNA。该方法灵敏度为 2.0×10^5 拷贝/ml。

1.3 荧光探针定量 PCR 法 荧光探针定量 PCR (FQ-PCR) 分析技术是在 PCR 技术的基础上发展起来的, 是 DNA 检测上的突破性进展。其原理为: 在普通 PCR 扩增系统中, 加入一个与靶基因序列特异互补的双荧光探针。探针的 5 端标记荧光报告基团, 3 端标有荧光淬灭基团。当探针完整时, 由于淬灭基团的淬灭作用, 荧光报告基团不能产生荧光发射。当有靶基因存在时, 在 PCR 的复性期, 标记探针即与靶基因互补结合, 在 PCR 的延伸期, 引物沿模板延伸至标记探针结合部时, DNA 聚合酶具有 5'-3' 的外切酶活性, 将探针 5 端荧光报告基团切下, 从而, 荧光报告基团淬灭作用被解除, 产生荧光发射,

通过荧光光谱分析仪检测荧光强度, 即可测知扩增产物的量。

另外, 也可在同一反应体系中加入二种以上针对不同靶基因序列的探针, 各探针分别用不同波长的荧光素 (荧光报告基团) 标记。当反应体系中有某种靶基因就显示某种波长的发射荧光。FQ-PCR 可以准确定量测出高至 10^{10} , 低至 10^0 个拷贝数的病原体, 定量范围极宽, 具有重要的临床诊断价值。

1.4 AcuGen Ampliseno™ HBV 法 由美国 Biotronics 公司建立的一种新型 HBV DNA 定量检测法。它属外参标定量 PCR 技术。基本原理是通过荧光素标记的引物在扩增中能量的转换而定量检测初始 HBV DNA 模板数。该技术用套式 PCR 扩增, 先扩增 HBV DNA S 区中 241 片段, 经 20~25 循环后, 加入信号引物继续扩增 241bp 片段中 64bp 片段, 并于每 3 个循环中测定 1 次信号引物能量转换情况, 结合标准品曲线可计算出靶 DNA 初始模板数。此方法使用计算机自动分析定量, 不需要传统电泳, 因而污染机会减少。也有研究将这种方法称之为能量转换方法 (QPCR)。该法灵敏度为 50 拷贝/ml。

1.5 其他 用于 HBV DNA 定量的方法还有滴度定量法, 竞争性 PCR 等方法。滴度定量法的影响因素较多, 因此难以标准化, 精确度也受到影响, 况且每份标本都要检测多个稀释度, 花费甚大, 已很少使用; 竞争性 PCR 方法没有除去影响 PCR 扩增率的诸多因素, 结果不够精确, 故也很少使用。

2 HBV DNA 定量检测的临床应用

2.1 流行病学方面 Jeniso 等^[1] 用 Souther 分析和斑点杂交法定性和定量检测了 15 例 HBsAg 携带者的血清标本。结果发现 11 例血清 HBV DNA 阳性, 滴度范围 $8.2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^{10}$ 拷贝/ml; 8 例唾液样本 HBV DNA 阳性, 滴度范围 $10^5 \sim 10^7$ 拷贝/ml; 3 例精液样本 HBV DNA 阳性, 滴度范围 $10^6 \sim 10^7$ 拷贝/ml。上述 8 例唾液及 3 份精液 HBV DNA 阳性标本皆来自血清 HBV DNA 阳性的病例。结果显示, 血清中 HBV DNA 阳性的患者, 其唾液和精液中隐含着高滴度的 HBV, 且与血清中 HBV DNA 的含量有关, 从而提示唾液、精液在乙肝病毒的肠外传播起重要作用, 其传染性大小可能与 HBV DNA 滴度有关。

2.2 定量 PCR 与 e 系统间的关系 赖宏芳等^[2] 采用 FQ-PCR 法准确定量检测 HBV-M 阳性标本中的 HBV DNA 数量, 结果显示, HBeAg(+) 组 (32 份) 的阳性率为 100%, HBV DNA 拷贝数范围在 $10^5 \sim 10^9$ /ml 之间。HBeAb(+) 组 (37 份) 的阳性率为 2.7%, HBV DNA 拷贝数为 10^5 /ml。商庆华等^[3] 应用定量

[13] Brosh N, Sternberg D, Honigwachs ha'anani J, et al. The plasmacytoma growth Inhibin restrictin P is an antagonist of Interleukin 6 and Interleukin 11[J]. J Biol Chem, 1995, 270(49): 29594-29600.
[14] Russell CE, Hedger MP, Brauman JN, et al. Activin A regulates growth and acute phase proteins in the human liver cell line, HepG2[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 148(1-2): 129-136.
[15] Hubner G, Brauchle M, Gregor M, et al. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease[J]. Lab Invest,

1997, 77(4): 311-318.
[16] Munz B, Hubner G, Tretter Y, et al. A novel role of activin in inflammation and repair[J]. J Endocrinol, 1999, 161(2): 187-193.
[17] de Krester DM, Hedger MP, Phillips DJ. Activin A and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation[J]. J Endocrinol, 1999, 161(2): 195-198.

收稿日期: 2001-10-25 修回日期: 2002-01-05