

胸腺素组分5及其多肽成分研究概况

山东医科大学生化药物研究室 王凤山 张天民

早在150年前人们即开始研究胸腺因子的性质,然而直到二十世纪六十年代初才认识到胸腺在个体发育和免疫系统功能方面的主要作用。1961年Miller以及Archer报道新生小鼠和新生兔的胸腺切除,使其正常生长、淋巴样组织的发育和成熟都受到阻碍,说明了胸腺在淋巴样系统发育中的重要性。从那时起,对几种动物的胸腺切除并以胸腺移植或提取物替代的研究都证明了胸腺在淋巴细胞的成熟、增殖和免疫功能方面的最重要的作用。

虽然胸腺怎样控制T细胞发育还不清楚,但30多年来针对有生物活性的胸腺因子或激素的分离和鉴定,已初步证明了几种胸腺因子或激素在胸腺中对控制T细胞发育的重要功能。本文将对胸腺素组分5(Thymosin F_5)及其多肽成分的分离及生化特征、生物学功能及作用机制加以综述。

一、胸腺素 F_5 及其多肽成分的分离及生化特征

1. 胸腺素 F_5

胸腺素 F_5 是Goldstein等通过将小牛胸腺匀浆、生理盐水提取、80℃加热去杂蛋白、冷丙酮沉淀,并进一步通过硫酸铵盐析及Sephadex G-50凝胶过滤制得并加以命名的。国内以Goldstein的工艺为基础并加以改进,也分别从小牛胸腺及猪胸腺提得了胸腺素 F_5 的类似产品。胸腺素 F_5 为一含有10~15个主要成分和20个以上较不重要组分的多肽的混合物。目前已从 F_5 中分离出了部分胸腺素(有生物学活性)及多肽(无生物学活性或活性没有确定)。

2. 胸腺素 α_1

胸腺素 α_1 是通过离子交换层析和凝胶过滤相结合从胸腺素 F_5 中分离而得,由28个氨基酸残基组成,分子量为3108,等电点(pI)4.2,活性是胸腺素 F_5 的10~100倍。胸腺素 α_1 从 F_5 的产量约为0.6%。胸腺素 α_1 在胸腺素 F_5 中的存在可能是在 F_5 的提取过程中较大的胸腺肽或蛋白质发生了水解修饰的结果。目前已有实验室合成了胸腺素 α_1 ,并证明其生物活性与天然 α_1 类似。

胸腺素 α_1 不仅仅存在于胸腺,Danho等从小牛脾脏中也分离得到,只是分离的量只相当于从小牛胸腺分离量的10~20%。

3. 胸腺素 α_7

最近Teresa等报道,胸腺素 α_7 可用GM纤维素和DEAE-纤维素进行离子交换层析和用Sephadex G-75进行凝胶过滤而得。其酸性强,pI为3.5左右。胸腺素 α_7 仍为一种部分纯化的制品,在反相层析柱上可将其分为几个组分,目前正在进行这些成分的纯化。

4. 多肽 β_1

多肽 β_1 是通过DEAE-纤维素离子交换层析和Sephadex G-75凝胶过滤从胸腺素 F_{5A} 中纯化而得。含有74个氨基酸残基,分子量为8451,pI为6.7。已证实 β_1 的氨基酸顺序与泛有素(Ubiquitin)完全相同,而后者广泛地存在于所有的组织细胞。现在认为 β_1 与泛有素为同一物质,是含于胸腺提取物的非特异性分子,不属于胸腺素的范畴。

5. 胸腺素 α_{11}

最近Caldarella等从胸腺素 F_5 中分离得到了与胸腺素 α_1 有关的两个多肽。一是在羧基端少了4个氨基酸残基,称为缺-(25-28)-胸腺素 α_1 ;另一个是胸腺素 α_{11} ,在羧基端多了7个氨基酸残基。胸腺素 α_{11} 在防止易感小鼠受念珠菌的感染上与 α_1 有相似的活性。

6. 胸腺素 β_4

胸腺素 β_4 最初由Low等从胸腺素 F_5 和 F_{5A} 中分离而得。它由43个氨基酸残基组成,含有较高比例的赖氨酸和谷氨酸。Hannappel等用一种能降低蛋白水解修饰的方法从新鲜冷冻的小牛胸腺中也分离得到了胸腺素 β_4 。Hannappel等的研究揭示,胸腺素 β_4 不仅存在于胸腺,而且也存在于脾、脑、肝、肺、肾及巨噬细胞等组织。在这些组织中以脾脏含量为最高,但它并不是胸腺素 β_4 的唯一来源,因为去脾动物其它组织中的水平并没有降低。

7. 胸腺素 β_{10}

胸腺素 β_{10} 是从几种哺乳动物的组织中分离而得,由42个氨基酸残基组成,结构顺序与 β_4 有75%的同一性。在许多组织包括脾、肝、胸腺及几种培养的细胞系中它与胸腺素 β_4 并存。在大鼠、小鼠、猫和人的脾脏中, β_{10} 约占总蛋白量的0.02%。

Hannappel等还报道了 β_8 和 β_9 的分离,多肽 β_8 是通过制备等电聚焦和反相高效液相层析(RP-HPLC)从胸腺素 F_5 分离而得,而 β_9 则是通过HPLC直接分离于冷冻的牛胸腺。

8. 猪胸腺激素 T_1 和 E_1

金以丰等以猪胸腺为原料,用改进的Goldstein等的工艺制备出了猪胸腺素 F_{5T} 和 F_{5E} ,通过制备电泳分别从 F_{5T} 和 F_{5E} 中分离得到了命名为猪胸腺激素 T_1 和 E_1 的两种纯肽。分子量分别为13,000和68,000,pI分别为4.6和5.2。从1公斤胸腺各能分离 T_1 和 E_1 20mg左右。

9. 胸腺多肽A

胸腺多肽A是刘培楠等用简化的Goldstein制备胸腺素 F_5 的工艺制得 F_5 ,然后再经DEAE—纤维素离子交换层析和两次Sephadex G—50凝胶过滤而提得,其分子量为3,600~4,000,由27个氨基酸残基组成,pI为3.9。

二、生物学功能

自从Goldstein等第一次提得胸腺素 F_5 ,并证明其对T细胞分化具有诱导作用以来,人们在对 F_5 中多肽成分进行分离的同时,从各方面探讨了胸腺素 F_5 及其多肽成分的生物学功能。表1为Teresa等综述的胸腺素 F_5 及其几种多肽的主要生物学功能。

表1 胸腺素 F_5 及胸腺素 α_1 的生物学功能

胸腺素 F_5

体外增加:

成年去胸腺小鼠脾细胞的咪唑巯基嘌呤敏感性

E-玫瑰花形成数

鼠脾和骨髓细胞表现型T-细胞标志的出现对分裂素的反应性

混合淋巴细胞反应

体内骨髓细胞向移植宿主活性细胞的转化抑制性T细胞的产生

巨噬细胞抑制因子(MIF)和T细胞生长因子(TCGF)

正常和去胸腺小鼠脾细胞绵羊红细胞抗体的生成

鼠脾细胞内cGMP水平

端基脱氧核苷酸转移酶(TdT)活性

破伤风杆菌、脑膜炎球菌和淋球菌特异抗体的生成

下丘脑中央基底和垂体LRF和LH的生成

体内增加:

正常、无病菌、去肾上腺、新生去胸腺和无胸腺小鼠淋巴细胞的生成

正常和新生去胸腺小鼠对异源移植物的排斥速率

对莫洛尼氏病毒诱导的肉瘤在正常小鼠体内进行性生长的抵抗性

正常或新生去胸腺小鼠淋巴样细胞的混合淋巴

细胞反应 (体内+体外)

正常和无胸腺小鼠的淋巴样细胞对分裂素的应答 (体内+体外)

无胸腺小鼠对异体和异基因肿瘤生长的抵抗性
延缓NZB小鼠异常胸腺细胞的分化 (失去抑制功能)

抗绵羊红细胞抗体的生成 (体内+体外)

带瘤鼠的寿命 (与化学治疗结合)

病毒刺激后干扰素的产生

可的松、ACTH和 β -内啡肽

胸腺素 α_1

体外增加:

癌患者E-玫瑰花形成细胞数

癌患者自身玫瑰花形成百分数

获得性T细胞依赖性IgG、IgM和IgA抗体应答

MIF百分比

T细胞依赖性特异抗体的生成

辅助T细胞活性

骨髓和脾中的TdT+细胞 (高浓度 α_1)

皮质酮的生成

体内增加:

淋巴细胞对分裂素的反应 (体内+体外)

淋巴毒素产生 (体内+体外)

带瘤小鼠的生存期

α 和 γ 干扰素的生成

MIF的产生

三、作用机制

1. 对T细胞分化的作用

王正森等最近报道,在一定浓度的ConA存在下,小牛胸腺肽在较高浓度下抑制小鼠胸腺细胞的增殖反应,而在较低浓度下则对此反应有促进作用。我们以PHA为丝裂原,试验了猪胸腺素对人外周血淋巴细胞转化的影响也得到了类似的结果(王凤山等,未发表)。这一双向调节功能是如何发挥的还不清楚。胸腺素做为一种多肽类激素,其对靶细胞的调节作用应是通过环核苷酸做为第二信使来发挥的。 F_0 能提高小鼠胸腺细胞中的cGMP水平,可能是其起双向

调节作用的一个原因。

2. 对T细胞表面受体的作用

胸腺素对E-玫瑰花环形成率的影响为目前测定胸腺素制剂有无活性的最为广泛应用的方法。Mendes等将T细胞加热至45℃ 1小时,其花结形成率下降到0,此种T细胞再与自身或正常人血浆孵育,又可使形成花环的能力恢复。他认为加热使T细胞的绵羊红细胞受体脱落,正常血清中的受体或脱落的受体又结合到T细胞上。胸腺素有促进这种结合的作用。胰酶可破坏受体,更换有胰酶的营养液后继续培养,又可产生受体,胸腺素对此种受体的产生有促进作用。这可能是胸腺素通过环核苷酸的第二信使作用促进了膜蛋白的合成。

3. 胸腺素 F_0 中多肽因子在T细胞分化成熟过程中的作用部位

胸腺素促进T细胞DNA和蛋白质合成,不仅影响T细胞发育的早期过程,使骨髓的细胞合成TdT酶,而且也影响T细胞发育的后期阶段,使T细胞进一步成熟而产生绵羊红细胞受体。Teresa等根据目前对胸腺素研究所取得的结果,就 F_0 中多肽成分在T细胞成熟过程中的作用部位提出了假说,即胸腺素 α_1 作用在胸腺组织的早期和晚期阶段; α_2 变未成熟的T细胞为抑制功能的细胞; β_3 和 β_4 作用在成熟过程的很早阶段,使TdT阴性的骨髓干细胞形成TdT阳性的前胸腺细胞。

四、结语与展望

经过近30年的努力,对胸腺素 F_0 及其多肽成分的研究已取得很大的成果,目前国外进行临床试验,结果还是令人鼓舞的。

国内在此方面也做了大量的工作,刘士廉等已将 F_0 分成了许多亚组分,并进行了细致的研究。江苏泰州生化制药厂及山东莱阳生化制药厂与有关院校科研单位协作,研制出了猪胸腺素注射液,并正式投产。临床证明其对病毒性肝炎、支气管哮喘、小儿上呼

吸道感染及免疫功能低下等病有较好的疗效，并有一定的抗衰老功能。我们用与Góldstein完全不同的工艺研制出了胚胸腺素，并在进行临床验证。

当前胸腺素的研究仍然面临两个问题，即胸腺素制剂的不均一性及靶细胞分化过程的复杂性和功能的多样性。今后要通过分离

提纯并人工合成各种多肽，从分子水平上讨论其作用机制。随着免疫学、免疫性疾病及分离和制备技术的研究进展，胸腺素F。中多肽成分有可能成为临床上功能各异的免疫调节剂，故胸腺素的研究具有广阔的前景。

(参考文献39篇略)

· 文摘 ·

活性炭解救茶硷中毒的作用

口服活性炭已被用于治疗茶硷中毒，试验时设想活性炭能改变肠内茶硷的消除动力学，六只体重18~22kg的狗麻醉后，静注茶硷，一天二次，剂量28mg/kg 20分钟以上注完，给药一周。随机分组，实验组在静注完时给30g活性炭（溶于150ml水中）每2小时一次，共四次。对照组只给予等量

的水。血清茶硷浓度用免疫法测定。实验结果表明，血清茶硷峰时（Tmax）、血清峰浓度（Cmax）、血浆清除率（Clp）和表观分布容积（Vd）均无改变，仅半衰期显示了有意义的减少，但是Ttox无改变。平均值（+/-SE）如下：

药动学参数	对照组	实验组	对比情况
Tmax (hrs)	0.33 +/- 0	0.31 +/- 0.02	不显著
Cmax (mg/L)	46.7 +/- 2.3	48.0 +/- 1.4	不显著
Ttox (hrs)	4.67 +/- 0.42	5.33 +/- 0.67	不显著
t1/2 (hrs)	4.12 +/- 0.45	2.84 +/- 0.34	P<0.05
Clp (L/hr/kg)	0.13 +/- 0.01	0.15 +/- 0.02	不显著
Vd (L/kg)	0.78 +/- 0.04	0.59 +/- 0.04	不显著

注：Ttox为使血清中茶硷浓度减少到20mg/L以下的时间。

实验结果证明，活性炭虽能降低茶硷在狗体内的半衰期，但并不改变到达Ttox所需的时间，并且也不一定改善茶硷过量的中毒症状。

[J Clin Pharmacol《临床药理学杂志》，25(6)，460，1985(英文)]

许 臻译 王晓波校

妥拉苏林 诱导少尿

妥拉苏林(T)常用于治疗新生儿肺高血压，但在治疗中常伴有少尿和肾衰发生。对此尚未作过充分研究。作者在羊中对T稳态浓度的作用与生理盐水对排尿作用和长期使用导尿管时心血管系统的影响，进行了比较。

实验是在同一只羊、在不同天接受对照生理盐水(C) (n=5)和T(n=6)，每次观察时间约6小时。液体摄入量平均14.8ml/kg/hr，对照组与给药组无差别。对照组排尿量稳定在3.34ml/kg/hr，心血管参数无改变。相此之下，给药组的尿量从3.04ml降至0.61ml/kg/hr，(P<0.03)。

与对照组相比，给药组增加心率(P<0.01)和心指数(P<0.05)，而降低动脉压(P<0.05)和全身血管阻力(P<0.02)。

作者认为T急剧减少尿量的作用，可能是由于外周血管扩张而使血流从肾脏转移所致。T经肾小管消除，所以T导致少尿作用可能由于它抑制了本身的消除所致。

[J Clin Pharm《临床药理学杂志》，25：97—99，1986(英文)]

苟奎斌摘译 李万亥校

86.12.13.