

# 支气管哮喘候选基因的表达与信号转导途径的调控

黄永富<sup>1</sup>, 余世庆<sup>1</sup>综述, 许文荣<sup>2</sup>审校

(1. 南通瑞慈医院检验医学中心, 江苏南通 226010; 2. 江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212013)

关键词: 哮喘; 基因; 信号转导; 卫生; 免疫耐受; 治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0350-03

支气管哮喘(Bronchial asthma, BA), 是一种有明显家庭集聚倾向的多因子、多基因遗传病, 具有外显不全、遗传异质化、多基因遗传及协同作用等特征, 导致其在一个群体中发现的遗传连锁或相关基因在另一不同群体中不能被发现。但通过候选基因连锁分析、同胞配对分析、定位克隆、灵感克隆和全基因组扫描技术<sup>[1-6]</sup>, 以及其他一些分析方法, 发现 BA Th1/Th2 细胞和 Th17/Treg 细胞等的免疫失衡与 BA 候选基因的表达和 JAK/Stats 等信号转导途径调控异常之间的关系十分密切。现分别综述如下。

## 1 BA 候选基因

近年来研究表明 1~7q, 11~14q, 16q, 17q, 20q 等染色体区域中的众多基因与 BA 有连锁关系, 以 5q31~33 区域上大量基因群与 BA 关系最为密切, 参与变态反应和 BA 炎症过程的发生与维持<sup>[5]</sup>。哮喘遗传学协作研究组(CSGA)研究了 3 个种族共 140 个家系, 采用 360 个常染色体上短小串联重复多态性遗传标记进行全基因组扫描<sup>[7]</sup>。将哮喘候选基因粗略定位于 5p15; 5q23~31; 6p21~23; 11q13; 12q14~24. 2; 13q21. 3; 14q11. 2~13; 17p11. 1q11. 2; 19q13. 4; 21q21 和 2q33。

## 2 以 JAK/STATs 为主的信号转导途径

过去 Th1/Th2 偏移学说一直是 BA 发病最重要的免疫学机制, 但近来的研究认为, 对影响 Th1、Th2 分化的细胞因子微环境可以在转录水平进行调控, 包括染色体重排、组织特异性转录因子及靶基因的激活<sup>[8]</sup>。Th1 和 Th2 的分化方向受其特异的基因序列调控, 不同的细胞因子、抗原种类和浓度及协同刺激分子决定了不同调控序列的激活, 这一过程严格地受特异的转录因子调节。

细胞信号转导主要是 JAK/STATs 途径, 还可有 Ras/MAPK、PI<sub>3</sub>K-AKT/PKB 等其他多种途径<sup>[9-15]</sup>。其中 IL-2~7R、IL-9R 和 IL-11~13R 均属于 I 型细胞因子受体, 它们介导的细胞信号除 JAK/STATs 途径外, 还可有 Ras/MAPK、PI<sub>3</sub>K-AKT/PKB 等其他多种途径, 但与 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化密切的信号转导是 JAK/STATs 信号转导通路。IFN-R<sub>α</sub>、IFN-R<sub>β</sub>、IFN-R<sub>γ</sub>、IL-10R 属于 II 型细胞因子受体, 只介导 JAK/STATs 细胞信号转导途径。

JAKs/STATs 途径是近年来发现的 1 条由细胞因子刺激信号转导通路, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程。与其他信号通路相比, 这条信号通路的传递过程相对简单, 它主要由 3 个成分组成, 即酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT。(1)酪氨酸激酶相关受体: 许多细胞因子和生长因子通过 JAK/STAT 信号通路来传导信号, 这包括 IL-2、IL-7、GM-CSF、GH、EGF、

PDGF 以及 IFN- $\gamma$  等。这些细胞因子和生长因子在细胞膜上有相应的受体。这些受体的共同特点是受体本身不具有激酶活性, 但胞内段具有酪氨酸激酶 JAK 的结合位点。受体与配体结合后, 通过与之相结合的 JAK 活化, 来磷酸化各种靶蛋白的酪氨酸残基以实现信号从胞外到胞内的传递。(2)酪氨酸激酶 JAK: 很多酪氨酸激酶都是细胞膜受体, 它们统称为酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinase, RTK), 而 JAK 却是一类非跨膜型的酪氨酸激酶。JAK 既能磷酸化与其相结合的细胞因子受体, 又能磷酸化多个含特定 SH2 结构域的信号分子, 如 STATs。JAK 族蛋白激酶包含 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK1 4 种成分, 约由 1 200 个氨基酸组成, 它们在结构上有 7 个 JAK 同源结构域(JH), 其中 JH1 结构域为激酶区, JH2 结构域是“假”激酶区, JH3 与 SH2 同源且具有结合受体胞浆段的疏水性  $\alpha$ -螺旋区的作用, JH6 和 JH7 是受体结合区域, 在细胞因子受体介导的信号转导中和细胞因子受体结合的 JAK 分子分别具有一定的特异性。(3)转录因子 STAT 其被称为“信号转导子和转录激活子”, 在信号转导和转录激活上发挥了关键性的作用。目前已发现 STAT 家族含有 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6 7 个成员。STAT 蛋白在结构上可分为以下几个功能区段: N-端保守序列、卷曲螺旋区、DNA 结合区、连接区、SH3 结构域、SH2 结构域及 C-端的转录激活区。其中, 序列上最保守和功能上最重要的区段是 SH2 结构域, 它具有与酪氨酸激酶 Src 的 SH2 结构域完全相同的核心序列, 对 STATs 二聚体形成和磷酸化激酶的激活有重要作用。STATs 从中部起都含有 DBD、SH3、SH2、TAD 等保守性区段。而且在 STATs 的 C 端都含有可被磷酸化的酪氨酸和丝氨酸位点(PY 和 PS)。N-端保守序列与 STATs 相互作用和二聚体形成有关。除 STAT2 和 STAT6 外, 在 C-端转录激活区其他 STATs 均具有保守的磷酸化丝氨酸残基。与 STAT4 相比, STAT4 $\beta$  在 C-端转录激活区。与 STAT6 相比, STAT6 $\beta$  的 N 端部分氨基酸切除, 而 STAT6 $\gamma$  的 SH2 区域有部分氨基酸切除。因此, IL-4 的刺激不能使其 Tyr 磷酸化。STAT2 和 STAT6 约含有 850 个氨基酸, 基因定位于 17q11. 1, 2q13. 3~14. 1; STAT1 和 STAT4 含有 750~795 个氨基酸, 基因定位于 2q12~13; STAT3、STAT5A 和 STAT5B 含有 750~795 个氨基酸, 基因定位于 17q11. 2~21. 31。

JAK/STAT 信号通路的传递过程如下: 细胞因子与相应的受体结合后引起受体分子的二聚化, 这使得与受体偶联的 JAK 激酶相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化作用而活化。JAK 激活后催化受体上的酪氨酸残基发生磷酸化修饰, 继而这些磷酸化的酪氨酸位点与周围的氨基酸序列形成“停泊位

点”(docking site),同时含有 SH2 结构域的 STAT 蛋白被招募到这个“停泊位点”。最后,激酶 JAK 催化结合在受体上的 STAT 蛋白发生磷酸化修饰,活化的 STAT 蛋白以二聚体的形式进入细胞核内与靶基因结合,启动多种基因的转录,行使生物学效应,同时激活 SOCS 基因。值得一提的是,1 种 JAK 激酶可以参与多种细胞因子的信号转导过程,1 种细胞因子的信号通路也可以激活多个 JAK 激酶,但细胞因子对激活的 STAT 分子却具有一定的选择性。小鼠基因敲除动物模型证实 STAT6、STAT3 与 Th2 细胞的成熟分化有关,参与 IL-4、IL-6、IL-13 的信号转导和生物学活性的表达,STAT4、STAT1/2 与 Th1 细胞的成熟分化有关,参与 IL-12、IFN- $\gamma$  的信号转导和生物学活性的表达。STAT3/4 与 Th17 细胞的成熟分化有关,参与 IL-6、IL-23、TGF- $\beta$  的信号转导和生物学活性的表达,而 STAT5 与 Treg 细胞的成熟分化有关,参与 TGF- $\beta$  的信号转导和生物学活性的表达。因此,有研究者应用 STAT6/STAT4、STAT6/STAT1/2 和 STAT3/4/STAT5 表示 BA 患者的 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的平衡关系。

### 3 信号转导途径中负调控机制

目前发现在 JAK/STATs 介导的信号转导途径中至少存在 3 类反馈抑制因子,即 SOCS(suppressor of cytokine signaling)族、PIAS(protein inhibitors of activated STATs)族和 SHP-1(phosphotyrosine phosphatases-1)抑制因子<sup>[16]</sup>。其中 SOCS 族抑制因子与 Th 细胞分化关系密切。

SOCS 家族成员通过几种机制抑制信号转导:(1)SOCS 家族的 CIS 通过 2 种不同的机制抑制 GHR-JAK2 的信号转导:通过一种部分抑制,可能与 CIS 和 STAT $\beta$  之间对共同的 GHR 胞浆尾磷酸酪氨酸结合部位的竞争有关;通过一种时间依赖性的抑制(在 SOCS1 或 SOCS3 中观察不到),这可能与蛋白酶体的作用有关。CIS 同样抑制 EPO 信号转导,且可与 EPOR 的 Y<sup>401</sup> 结合,而 Y<sup>401</sup> 是 EPOR 上的 2 个 STAT 结合位点之一。提示 CIS 可能通过遮蔽 EPOR 上的 STAT5 结合位点而调制 EPO 信号转导。(2)通过其 SH2 结构域与靶蛋白的磷酸氨基酸结合使 JAKs 内在激酶的 N 末端失活而抑制信号转导:SOCS1、SOCS3 可被 IL-3、IL-6、IL-13、IFN- $\gamma$  等刺激表达,并利用其激酶抑制区域(Kinase inhibitory region,KIR)抑制 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2,从而在 JAK1/STAT6、JAK2/STAT4、JAK1/STAT1/JAK3/STAT5 等信号转导途径中起负性调节作用,抑制 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-9、LIF、IFN- $\gamma$ 、GH、PRL 等的信号传导。SOCS5 可被 IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$  等刺激表达,并利用其 KIR 抑制 JAK3 和 TYK2,从而在 JAK1/STAT6 信号转导途径中起负性调节作用,部分抑制 IL-4、IL-6 和 LIF 的信号传导。SOCS3 主要在 Th2 细胞中表达,SOCS1、SOCS5 主要在 Th1 细胞中表达。哮喘时 SOCS3 表达增加,而 SOCS1、SOCS5 表达减少,使 Th0 分化向 Th2 细胞偏移,Th1 细胞相对减少。(3)SOCS 介导信号蛋白依赖蛋白酶体的降解过程:SOCS 分子羧基末端的 SOCS 盒可以介导 SOCS 蛋白与 Elongin BC 复合物的结合,后者又与 Cullin2(一种 E3 泛素化连接酶结合,而 SOCS 蛋白可以籍其 SH2 结构域与其他活化的信号蛋白结合,因此 SOCS 可能作为 1 种接头蛋白信号蛋白和 Cullin 2 相互靠近,进而使信号蛋白发生泛有素化并进一步被蛋白酶体降解,在此过程中 SOCS 蛋白本身也被降解。

PIAS 蛋白家族至少由 5 个成员组成:PIAS1、PIAS3、PIASx $\alpha$ 、PIASx $\beta$ 、PIASy。PIAS 家族分子含有多个高度保守的结构域,包括 1 段特定的锌结合基序和 1 段高度酸性的序列。PIAS1 和 PIAS3 在体内分别与活化的 STAT1 和 STAT3 高度特异性结合,抑制其 DNA 结合活性和转录激活活性。PIAS1 能通过其 C 端的 STRR1 相互作用功能域(氨基酸残基 392~541)结合 STAT1 的 N 端结构域(氨基酸残基 1~191),且 PIAS1 的 STAT1 相互作用结构域对 PIAS 抑制 STAT1 的转录活性是必需的。而 PIAS1 的 N 端结构域则作为调节功能域,促进 PIAS1 与 STAT1 二聚体的特异性结合,遮蔽 STAT1 的 DNA 结合功能域,从而抑制其 DNA 结合及转录激活活性。

SHP1 主要表达于造血细胞中。它是胞质的蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases,PTP),含有 2 个 SH2 结构域。SHP1 通过其 SH2 区与酪氨酸磷酸化的 EPOR 结合,其结合位点为 EPOR 胞浆区的 Y<sup>429</sup>。Y<sup>429</sup> 突变的 EPOR 不能与 SHP1 结合,且表达这种突变体的细胞表现出对 EPO 的超敏感性,并表现出 EPO 诱导后 JAK2 的持续激活。这些结果提示 SHP1 与 EPOR 结合后,通过其酪氨酸磷酸酶活性使 JAK2 去磷酸化失活,从而终止信号通路。

### 4 CD4<sup>+</sup> T 细胞相关的细胞因子表达与基因转录水平免疫平衡调控之间的关系

表达于 T 淋巴细胞上的 T 盒(T-box expressed in T cells, T-bet)、干扰素调节因子-1(interferon regulatory factor 1, IRF-1)、信号转导与转录激活因子-4(STAT-4)、ets 相关分子(ets-related molecule,ERM)、Hix 等是控制 Th1 分化的转录因子。T-bet 是 Th1 细胞分化过程中介导信号转导的重要的转录因子,包含 530 个氨基酸,其中 189 个氨基酸是结合 T-box 的结构域。T-bet 仅在肺组织、胸腺和脾脏中表达,是 Th1 细胞特异性转录因子。TCR 或 IL-12R/STAT4 介导的信号途径可调节 T-bet 的表达,IFN- $\gamma$ /STAT1 途径可参与 T-bet 的诱导表达。IL-27/WST-1 介导的信号转导能放大 T-bet 的诱导表达。因此可认为多条信号转导途径可以调控 T-bet 的表达。T-bet 可激活 IFN- $\gamma$  基因 IFNG,另外 T-bet 可诱导其靶基因 Hix 的表达,从而促进 IFN- $\gamma$  基因的转录与表达。而 GATA-3、STAT-6、c-Maf 等是控制 Th2 分化的转录因子,调节 Th2 细胞因子的基因表达,驱使其向 Th2 功能分化。ROR $\alpha$ T(retinoid-related orphan receptors- $\alpha$ T)、ROR $\gamma$ T、STAT-3、STAT-4 等是控制 Th17 分化的转录因子,调节 Th17 细胞因子的基因表达,驱使 Th0 向 Th17 功能分化。Th17 细胞具有双向调节炎症反应的功能,在疾病的急性期发挥致炎作用,而在慢性期却能抑制炎症反应。负调控信号 IL-2、IL-4、IL-27、IFN- $\gamma$  等的抑制作用,引起病理性 Th17 效应细胞增殖和自身免疫疾病恶化加快。哮喘发作时外周血 Th17 细胞比例及 ROR $\gamma$ t mRNA 的表达水平有所下降,而随病情缓解有所回升。因此,T-bet 和 GATA-3 最终决定了 Th0 细胞向 Th1 细胞还是 Th2 细胞分化,决定了 Th1/Th2 平衡的稳定性。哮喘时 T-bet、SOCS5 在肺组织中表达减少,而 GATA-3、SOCS3 表达明显增多。Agarwal 和 Rao<sup>[17]</sup>在研究 T 细胞亚群特殊细胞因子基因表达时提出,Th1 或 Th2 细胞的分化主要通过 2 个步骤:一是 T 细胞在抗原刺激下,染色体结构发生重排,使 Th2 特异性转录因子 GATA-3 接近转录的 DNA 序列;二是这些组织特异性的转

录因子协同其他转录因子,如活化转录因子活化蛋白-1(Activator protein-1, AP-1)和活化 T 细胞核因子(Nuclear factor of activated T cell, NF-AT),诱导 Th2 细胞基因转录。NF-AT 被证明可激活 IL-4 的启动,主要在 Th2 细胞中存在<sup>[14]</sup>。AP-1 在许多类型的细胞中都有表达,被证明在 Th2 源性细胞因子基因表达中起重要作用;T 细胞在接触抗原激发后,AP-1 快速诱导和协同已存在的转录因子 GATA-3,激活 Th2 细胞内的 IL-4、IL-5 及 IL-13 的基因转录。Siegel 等<sup>[18]</sup>首先阐述了 GATA-3 在 Th2 源性细胞因子基因序列的启动子区可能都存在结合位点,认为 GATA-3 的结合位点可能是 IL-5 的启动子,但除 IL-5 外,其他 Th2 源性细胞因子的 GATA-3 结合位点尚未得到鉴定。GATA-3 主要在造血细胞、肾和神经系统中表达,但在新生及成年小鼠中 GATA-3 仅大量表达于 T 淋巴细胞,在其他部位其表达量则大大减少或彻底消失。NF- $\kappa$ B(Nuclear factor-kappa B)是 Th1 细胞分化过程中介导信号转导的另一重要的转录因子,包括 NF- $\kappa$ B1 (P105-P50)、NF- $\kappa$ B2 (P100-P52)、P65(RelA)、C-Rel、RelB 和 p50 6 个成员。它们分子的 N 端都含有约 300 个氨基酸组成的 RHD(re-homology domain),具有结合 DNA、二聚体化、核转位、结合 I $\kappa$ Bs(inhibitor of NF- $\kappa$ B)和转录调节的作用。I $\kappa$ Bs 有 6 种异构体,其中以 I $\kappa$ B $\alpha$  和 I $\kappa$ B $\beta$  为重要。而 IKK(I $\kappa$ B kinase)含有 IKK1/IKK $\alpha$ 、IKK2/IKK $\beta$  和 IKK $\gamma$  3 个成员,IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  和 IKK $\gamma$  组成 1 个复合体(Signalsome),在信号转导中起承上接下的作用。NF- $\kappa$ B/Rel 不仅在天然免疫应答和激活 APC 中起着重要作用,而且能调节 IFN- $\gamma$  基因的表达,在 Th1 分化中起着重要的作用。在未受刺激时,NF- $\kappa$ B 以二聚体形式与 I $\kappa$ B $\alpha$  结合而被抑制<sup>[15]</sup>。FOXP3 作为一种特殊的转录因子特异地高表达于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 上,与其发育和功能成熟密切相关。Treg 细胞主要抑制自身免疫性疾病的发生,诱导机体外周免疫耐受,与肿瘤和自身免疫性疾病、过敏、病毒感染、移植排斥反应和妊娠相关免疫疾病的关系非常密切。哮喘发作时外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 的比例及 FOXP3 mRNA 的表达水平有所下降,而随病情缓解有所回升。因此,ROR $\gamma$ T 和 FOXP3 最终决定了 Th0 细胞向 Th17 细胞还是 Treg 细胞分化,决定 Th17/Treg 平衡的稳定性。

## 5 展 望

随着分子免疫学、分子生物学和基因遗传学的飞速发展,研究者对 BA 基因组学(genomics)和蛋白质组学(proteomics)的研究的日益深入,集中体现在 BA 候选基因表达和信号转导通路调控等方面。BA 的发病机制最终会被研究者彻底揭示,为 BA 的及早诊断、科学防治与新药开发提供有效的途径,尤其是近年来初见端倪的 BA 基因治疗。相信在 BA 候选基因和信号转导通路研究取得巨大进展的前提下,只要寻找合适的载体,增加靶组织的选择性和特异性,解决好短期与长期治疗的安全性,BA 基因治疗将具有广阔的前景。未来,BA 最终会被研究者完全控制甚至彻底根治。

## 参考文献

[1] Moffatt MF, Cookson WOMC, linkage and candidate gene studies

- in asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(2): 110-112.
- [2] 王正东,毛辉,黄茂. FOXP3 基因与支气管哮喘[J]. *国际呼吸杂志*, 2006, 26(8): 577-579, 583.
- [3] Collins FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore[J]. *Nat Genet*, 1992, 1(1): 3-6.
- [4] Daniels SE, Bhattacharya S, James A, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma[J]. *Naturem*, 1996, 383(6597): 247-250.
- [5] Bossé Y, Hudson TJ. Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes[J]. *Annu Rev Med*, 2007, 58: 171-184.
- [6] Ober C, Cox N, Abney M, et al. Listed A genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder populations[J]. *Mol Genet Hum*, 1998, 7(9): 1393-1398.
- [7] Platts-Mills TA, Erwin E, Heymann P, et al. Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma[J]. *Allergy*, 2005, 60(Suppl): 79: 25-31.
- [8] Postma DS. The genetics of atopy and airway hyperresponsiveness[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(3): 118-123.
- [9] Kolenko SV, Pestka S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2557-2565.
- [10] Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2638-2644.
- [11] Kaplan MH, Grusby MJ. Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules[J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64(1): 2-5.
- [12] Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, et al. STAT6 is required for IL-4 induced germline Ig gene transcription and switch recombination[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1): 302-310.
- [13] Rame T, Qutayba H, Lisa C, et al. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription factors GATA-3, C-MAF and signal transducer and activator of transcription factor-6 in induced sputum of atopic asthmatic patients[J]. *Chest*, 2003, 123(6): 2074-2082.
- [14] Kiani A, Rao A, Aramburu J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT[J]. *Immunity*, 2000, 12(4): 359-372.
- [15] Radiah AC, Mark A, Fuping Z, et al. T cell-intrinsic requirement for NF- $\kappa$ B induction in postdifferentiation IFN- $\gamma$  production and clonal expansion in a Th1 response[J]. *J Immunol*, 2003, 171(4): 1816-1824.
- [16] Hilton DJ. Negative regulators of cytokine signal transduction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(12): 1568-1577.
- [17] Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation[J]. *Immunity*, 1998, 9(6): 765-775.
- [18] Siegel MD, Zhang DH, Ray P, et al. Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(41): 24548-24555.

(收稿日期: 2010-02-23)