

· 专 论 ·

三叶肽结合蛋白研究进展

任建林 董菁 卢雅丕

三叶因子家族 (trefoil factor family, TFF) 是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽。目前在哺乳动物体内发现的三叶肽 (trefoil peptide) 有 3 种, 即乳癌相关肽 (pS2 或 TFF1)、解痉多肽 (SP 或 TFF2) 和肠三叶因子 (ITF 或 TFF3)。其共同特征为均含一特殊结构 - P 结构域, 由一段 38 ~39 个氨基酸序列通过 6 个高度保守的半胱氨酸残基由 3 个分子内的二硫键 (Cys1- Cys5, Cys2- Cys4, Cys3- Cys6) 相互联接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶状结构, 由此命名。这种三叶形结构的稳定性使三叶因子家族具有明显的抗蛋白酶水解、抗酸消化及耐热特性, 因而能在消化道复杂的环境中保持生物活性。在哺乳动物体内, 三叶肽具有黏膜保护与修复、肿瘤抑制、信号传导、诱导细胞凋亡等功能, 但其发挥功能的具体机制尚不明了。

1982 年由 Masiakowski 等在雌激素诱导的人乳腺癌细胞系 MCF-7 中获得 TFF1, 分子由 60 个氨基酸组成, 内部有 7 个半胱氨酸残基, 6 个参与构成 P 结构域。Mark 等应用平衡超速离心、凝胶过滤、聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱分析, 发现 TFF1 可通过第 7 个半胱氨酸与另一个 TFF1 分子形成分子间二硫键而形成二聚体。有实验表明, TFF1 生物活性可能与同源二聚体的形成或与其他蛋白结合形成低聚体有关。在正常组织中, TFF1 主要在胃体及胃窦黏膜上皮表面细胞表达, 其次在空肠、回肠、结肠、唾液腺、胰腺及呼吸道、乳腺等黏液上皮细胞中亦有低水平表达。多种恶性肿瘤中可见 TFF1 高水平表达, 如胃、乳腺、胰腺、肺、子宫内膜、卵巢、前列腺、膀胱、胆管、食管、甲状腺及皮肤等恶性肿瘤中均有报道。1982 年, Jorgensen 等从猪胰腺提纯胰岛素过程中分离到了 TFF2, 分子由 106 个氨基酸组成, 含有 2 个对称的 P 结构域, 其位于第 6 位与第 104 位的半胱氨酸残基 (P 结构域外) 亦形成 1 个二硫键 (第 7 个分子内二硫键), 使其结构极其稳定。TFF2 主要在胃

体及胃窦的黏液颈细胞和下段十二指肠腺表达, 此外, 在黏膜损伤部位如消化性溃疡、炎症性肠病及胃肠道肿瘤、胰腺癌、肠增生性息肉、Barrett 食管等均可见 TFF2 表达增高。1991 年 Suemori 等从大鼠空肠中发现了 TFF3, 分子仅由 59 个氨基酸组成, 含有 1 个 P 结构域, 质谱分析表明, TFF3 亦存在单聚体及二聚体 2 种形式, 其同源二聚体亦通过 2 个 C 末端半胱氨酸 (Cys⁵⁹) 形成分子间二硫键连接而成。TFF3 主要在小肠及结肠杯状细胞中表达, 在人子宫、正常乳腺、下丘脑、垂体、肺等组织中的低水平表达亦有报道。在肿瘤组织如皮肤黏液癌、乳腺癌、结肠癌等中可见 TFF3 表达上调。肿瘤与三叶肽之间的因果关系尚不明了。TFF1 基因敲除小鼠模型中, 所有小鼠胃上皮细胞均表现为严重增生、高度发育不良及胃窦部腺瘤形成, 部分发展为胃浸润型癌。Jame 等^[1]研究发现缺乏 TFF2 小鼠的胃黏膜厚度及黏膜细胞增殖率均明显下降, 壁细胞数量及胃酸分泌量增多 2 倍。TFF1 转基因鼠乳房组织过量表达 TFF1, 但并不导致乳腺增生及发育异常。这提示 TFF1 可能是一种肿瘤抑制因子。研究结果还表明三叶肽在诱导细胞凋亡方面有一定作用。Efsthathiou 发现 rTFF3 可引起 HT29 细胞系细胞钙黏蛋白下调, 减弱细胞与细胞、细胞与基底膜之间的黏附作用, 下调 α - 链蛋白、 β - 链蛋白的表达, 诱导细胞凋亡。

国外已有大量实验证明, 三叶肽在胃肠道黏膜保护中发挥重要作用。其作用机制目前有 2 种假说:

物理方式: 与黏液中的糖蛋白结合形成稳定的凝胶复合物, 加强黏液凝胶层, 减少胃表面有害物质及机械应力等因素对黏膜的损伤。生物化学方式: 三叶肽可能通过与其受体或转运蛋白结合而发挥生理功能, 但具体的受体或结合蛋白并未确定。除保护作用外, 研究结果证明三叶肽参与了损伤组织的修复过程, 可增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面迁移覆盖, 促进损伤黏膜的重建。三叶肽是一种快速反应肽, 在黏膜损伤后 30 分钟内即可见表达上调。体外实验显示, 无论是重组 TFF3 或重组 TFF2, 都能刺激肠道上皮细胞的迁移, 促进伤

作者单位: 361004 厦门大学医学院第一临床学院、厦门中山医院、厦门市消化病研究所

口愈合,改变上皮细胞钙黏蛋白的表达和细胞定位。

目前认为三叶因子家族可能具有特异性受体,是通过配体-受体或配体-结合蛋白方式表达其生物学功能的。1988年 Frandsen 提出 TFF2 受体可能是一种胰性多肽。Playford 等对吡哆美辛诱导的大鼠胃溃疡模型皮下注射小剂量 hTFF2,发现 TFF2 可发挥黏膜保护作用,提示三叶肽受体存在的可能。Poulsen 等将 ¹²⁵I 标记的 TFF2 静脉注射到大鼠体内,6 分钟后约有 14%在胃肠道显影,胃体及幽门部对放射性 TFF2 的摄取可被非放射性标记的 TFF2 所代替,且这一过程呈剂量依赖性,这更证实了受体存在的可能。1997 年,美国学者 Tan 等根据配体斑点杂交 (ligand blotting) 法研究的结果,提出 TFF3 可能受体为一 50 kDa 的糖蛋白。2000 年,Thim 等提取猪 TFF2 作为配体进行亲和层析,提取物经聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱分析发现了一个分子量约 220 kDa 及 3 个分子量约为 140 kDa 的蛋白质。前者是一个 CRP-Ductin 基因产物,含有一个短小的细胞质区、一个跨膜区及一个长细胞外区,推测这可能是三叶肽受体或某种三叶肽结合蛋白^[2]。Newton 等研究发现 TFF1 在正常胃黏膜中有 3 种形式:单聚体、二聚体及一种分子量约 25 kD 的 TFF1 复合物。其中,TFF1 复合物浓度最高,而二聚体仅少量存在。已有大量实验证明,TFF1 二聚体在细胞迁移及黏膜保护方面较单聚体有更强的生物活性,而实验中发现二聚体含量甚微,因此推测该 25 kD 的 TFF1 复合物可能由 TFF1 与某种蛋白结合而成,且发挥了重要的生物作用^[3]。但上述研究结果均未得到公认,这些假说的意义有待于进一步验证^[4-6]。

三叶因子家族在黏膜保护及修复过程中发挥了

重要的作用,深入探讨三叶因子家族的作用机理对于黏膜保护、溃疡治疗及肿瘤诊治等方面均有重要意义。体外研究业已证实它们能促进上皮细胞修复,但在肿瘤生成、生长过程中所扮演的角色及与胃酸分泌、胃动力之间的关系尚不明确,主要问题在于未能自分子水平阐明三叶因子家族分子的作用机制,而家族各成员与结合蛋白或受体之间的相互作用成为进一步研究的重点。因此,进一步研究三叶因子家族各成员的作用机制是目前的主要研究突破方向。由于三叶因子家族具有明确的调节肽功能,研究其下游的受体/结合蛋白除阐明作用机制外,还可能提出新的研究方向如肿瘤的生成假说及新型药物的开发。

参考文献

- 1 Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, et al. TFF2/SP- deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002;109:193-204.
- 2 Thim L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Peptid* 2000;90:61-68.
- 3 Newton JL, Allen A, Westley BR, et al. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000;46:312-320.
- 4 任建林,卢雅丕,陈建民,等.三叶因子 1 表达与胃黏膜损伤及胃癌的关系. *中华消化杂志* 2003;23:671-673.
- 5 任建林,卢雅丕,王琳,等.TFF1 在正常及损伤胃黏膜中的表达改变. *世界华人消化杂志* 2003;11:1809-1810.
- 6 卢雅丕,任建林.三叶因子家族研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:2019-2021.

(收稿日期:2004-03-30)

(本文编辑:白岚)

第一届全国消化内科危重疑难少见病学术大会

会议日期:2005 年 6 月 17~21 日(17 日报到、18~20 日开会,21 日撤离);会议地点:广州市华泰宾馆国际会议厅。

征文要求:征文内容包括各类危重少见消化病的基础或临床研究、经验总结、病例报告均可。大会欢迎各位医学同仁踊跃投稿,投稿者请将论文全文 3000 字左右及 800 字左右结构式摘要(目的、方法、结果、结论)各一份文稿及软盘于 2005 年 5 月 10 日前寄至大会秘书处(广州市同和南方医院消化内科研究所智发朝、肖冰副教授,邮编 510515;或 E-mail: zfc@fimmu.com.cn、fjxb@163.com)。投稿者同时配备内镜、X 线、手术等录像的请在文稿摘要中注明。无论文欲参加会议者请向大会秘书处联系报名。

会议性质:属国家级继续教育项目,颁发国家 I 类继续教育学分和论文证书

秘书处联系电话:(020)61641534、61641532;传真:87280770;联系人:智发朝副教授、肖冰副教授。

中国医促会胃病专业委员会