胸腺素 α1 的研究进展

秦桂香 龚兴国* 纪 静

(浙江大学生命科学学院，杭州 310027)

摘要 胸腺素 α1 是机体内的一种免疫活性肽，目前已用于乙型、丙型肝炎及恶性肿瘤、免疫缺陷等疾病的研究和临床治疗中。其作用机制尚不十分清楚，一般被认为具有生物反应调节物的功能。现对胸腺素 α1 的分布、作用机制及临床应用进行综述，并总结胸腺素 α1 在生物制备上的进展。

关键词 胸腺素 α1；生物反应调节物；临床应用

1966 年，胸腺素(thymosin)首次被发现[1]。该激素样物质从小牛胸腺中提取获得，并具有初步的生物活性。随后的研究表明，其由胸腺上皮细胞所分泌，是一类多肽激素的混合物，而其中的第 5 组分(thymosin fraction 5, TF-5)最为重要。其中，TF-5 又可根据等电聚焦电泳时等点电(isoelectric point, pI)的不同而分成三类：pI 小于 5.0 的为胸腺素 α，介于 5.0~7.0 的为胸腺素 β，而大于 7.0 的则为胸腺素 γ。

在胸腺素 α 中，又以对胸腺素 α1(thymosin αl, Tα1)的研究最为深入。Tα1 是一种具有热稳定性的酸性多肽，由 28 个氨基酸组成，pI 值为 4.2，相对分子量为 3108，且不含有甲硫氨酸、半胱氨酸及芳香族氨基酸。其氨基酸序列为 NH_2-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-COOH[1,2]。Tα1 最初通过离子交换层析和过滤法，从 TF-5 中分离得到，现多采用液相或固相多肽合成技术获得，而人工产物与天然蛋白质的生物学活性相仿。

1 Tα1 的分布

Tα1 具有高度的保守性，广泛分布于哺乳动物的胸腺、脾、肺、肾、脑、血液和其他一些组织中，在胸腺中浓度最高。Tα1 在各种组织器官中的蛋白质结构均相同。人 Tα1 序列与猪、牛、鼠等动物的 Tα1 具有很高的同源性。利用 NCBI、PIR 及 SWISS-PROT 等蛋白质数据库，对已知的 Tα1 进行蛋白质序列联配，发现从大肠杆菌到哺乳动物，来自不同种属的 Tα1 其氨基酸组成均高度保守(图 1)。

利用间接免疫荧光抗体技术，发现 Tα1 在人胸

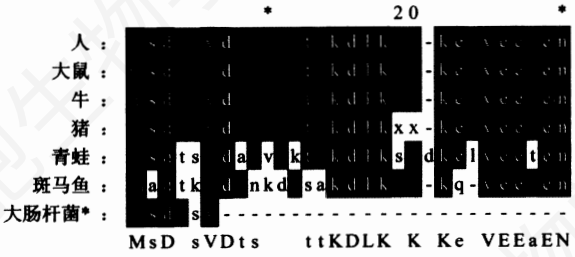

图 1 不同物种 Tα1 的序列分析

序列来源：NCBI、PIR 及 SWISS-PROT 数据库，使用软件：Genedoc。

腺中专一性地定位于囊下皮质及髓质上皮细胞中，而在深层皮质中并没有分布[3]。在髓质中，Tα1 阳性上皮细胞的数目随年龄增长而下降。另外，在培养的胸腺上皮细胞、微孔小室胸腺上皮细胞的上清液中也存在 Tα1 的高水平表达。同时，Tα1 也在其他上皮细胞中存在表达，如人乳腺癌细胞系 MCF-7(分泌细胞)及结肠腺细胞(非分泌细胞)。值得注意的是，Tα1 的表达水平在胸腺切除后并不下降，表明 Tα1 还存在其他的生物来源。而后者可能是 Tα1 的主要来源之一，或许是在 Tα1 缺乏状态下的补充途径。研究表明，激活的淋巴细胞可能是血清 Tα1 的主要来源，这与血清 Tα1 水平在放疗后下降及淋巴细胞在增殖时可产生 Tα1 的事实一致。

2 Tα1 作用机制

目前对 Tα1 的作用机制仍不十分了解。在体内或体外实验中，Tα1 对细胞因子的分泌、淋巴细胞的表面标志及淋巴细胞的功能均有影响，被认为具

收稿日期：2005-03-21 接受日期：2005-05-12

* 通讯作者。Tel: 0571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn

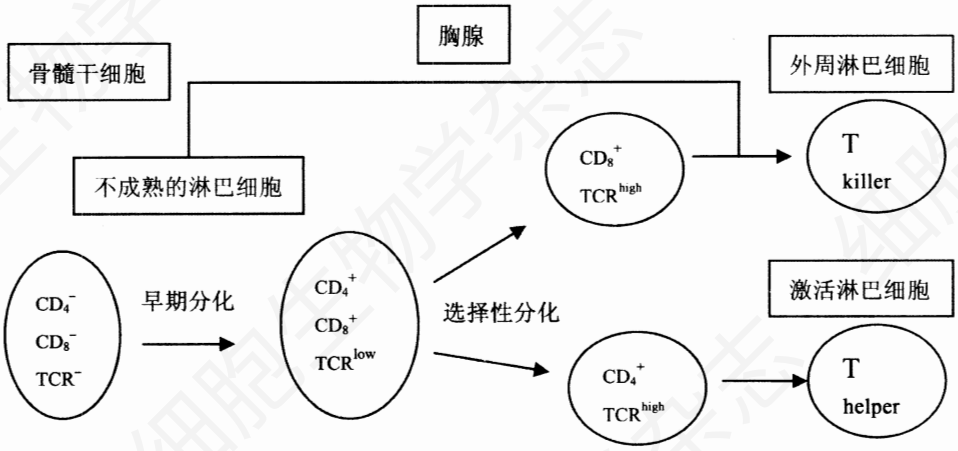

图2 Tα1在胸腺细胞发育中的作用[5]

有生物反应调节物(biological response modifier, BRM)的功能[4]。

2.1 Tα1对胸腺细胞凋亡的调节作用

凋亡是程序性细胞死亡，在T细胞的分化成熟过程中起着关键作用。一般认为，最后只有少于5%的胸腺细胞能成功分化为成熟的循环细胞，其余的则进入凋亡程序而被清除。来自骨髓的干细胞在胸腺增殖发育为成熟T细胞(图2)，其发育过程包括：(1)编码T细胞受体(T-cell receptor, TCR)的基因重排；(2)阳性识别，即只有可识别胸腺基质细胞上的主要组织相容性复合物(major hisocompatibility complex, MHC)分子的胸腺细胞才能继续存活并发育成熟；(3)阴性选择，不能适当的重排它们的TCR也不能识别自身抗原/MHC复合物的胸腺细胞通过细胞凋亡而清除。

Tα1通过调节T细胞的凋亡，从而影响T细胞免疫功能的实现。Tα1能够拮抗地塞米松(dexamethasone, DEX)及CD_3抗体的作用，抑制$CD_4^+CD_8^+$双阳性胸腺细胞的凋亡，从而增加后者的数量，增强免疫反应[5]。Roy等[6]利用Tα1来拮抗小鼠道尔顿-淋巴病诱导的凋亡，并发现Tα1激活的信号转导级联反应活化了蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)，从而导致凋亡基因前体(如bax、bad)表达的蛋白质水平的下降及bcl-2基因表达的蛋白质水平的上升。

2.2 Tα1作为BRM的作用机制

Tα1具有BRM的功能，其作用机制可用Oldham的生物反应调节理论来解释[3]，其主要内容包括：(1) Tα1可恢复T细胞的功能，并促进成熟T细胞的增殖、细胞因子及其受体的产生，从而增强机体对肿瘤的免疫应答能力；(2) 修饰肿瘤细胞，诱导宿主产生强烈的免疫反应；(3) 促进肿瘤细胞的分化成熟，使恶性增殖细胞恢复正常化；(4) 减轻化疗、放疗的副作用。

一般认为，Tα1通过其受体来实现对靶细胞的作用，尽管相应受体至今未获得克隆。有证据表明，Tα1可结合某些细胞表面的受体，如免疫荧光实验观察到Tα1与小鼠淋巴细胞表面发生结合[5]。另外，Tα1也可与干扰素(IFN)受体、肠血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)受体等发生结合。在对大鼠、小鼠腹腔的巨噬细胞及大鼠外周血淋巴细胞、脾淋巴细胞进行研究时发现，Tα1可与VIP受体的效应系统发生相互作用。对Tα1的全序列及其N端部分进行分析，发现其与VIP多肽家族在结构及物理化学性质上均极为相似。实验表明，Tα1是VIP家族的拮抗剂[7]。但Tα1究竟通过与何种受体的结合而发挥生物活性，仍有待研究。

目前认为，胸腺激素不是诱导胞浆分泌的第一信使，而更可能作为超强的附属诱导信使，但仍不清楚究竟何种第二信使介导了Tα1的诱导作用。早期的研究提示，此过程可能有环磷酸核苷及Ca^{2+}的参与，而近几年的研究也发现花生四烯酸、腺苷酸环化酶、PKC均可能参与了此过程[8]。Moody等[9]发现，Tα1与体外培养肺癌细胞表面的结合，刺激后者释放花生四烯酸，从而抑制了后者的生长。同时，磷酯酶A_2被认为充当了Tα1的第二信使。

2.3 Tα1对神经系统的调节

Tα1不仅在外周神经系统中具有免疫调节功能，在中枢神经系统中也存在表达，并发挥了重要作用。据报道，胸腺切除术导致小鼠学习和记忆的损伤，暗示胸腺激素和认知过程的调节、突触的功能有关[10]。研究显示，Tα1能够激活某些信号转导途径，如P42/44 MAPK活动，但目前仍不清楚Tα1

是否参与并如何影响神经元的活动。许多神经元活动(如谷氨酸受体的激活、量子释放等)均能被蛋白激酶A(proteion kinase A, PKA)和PKC所调节。Yang等[10]发现，浓度为1.0 μg/ml及10 μg/ml的Tα1均能极大地促进自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC)，此活动以谷氨酸受体激动剂AMPA为媒介；当Tα1浓度为10 μg/ml时，也促进了以AMPA为媒介的极小兴奋性突触后电流(miniature spontaneous excitatory postsynaptic current, mEPSC)，不过以上两种神经活动的范围并没有改变。Yang等认为，Tα1参与了海马神经元兴奋性突触传递，并能影响中枢神经系统中神经分泌细胞的功能。

Tα1与神经内分泌系统间的相互作用是目前研究的热点。在下丘脑和垂体提取物中存在高浓度的Tα1样肽，后者可能是一种神经内分泌调节剂。研究发现，Tα1能在下丘脑及垂体水平影响促肾上腺皮质激素(adrenocorti-cotropic hormone, ACTH)、促乳素(pro-lactin, PRL)、促甲状腺素(thyrotropin, TSH)和促黄体生长激素(luteinizing hormone, LH)的分泌，此影响的程度随Tα1在特异作用区的浓度而异[7]。当Tα1浓度为10^{-7} mol/L时，可明显地刺激ACTH的释放；对TSH释放产生刺激的最低有效剂量为10^{-9} mol/L；而LH的释放过程对Tα1相当敏感，当Tα1浓度为10^{-12} mo/L时便有明显作用，而Tα1浓度达到10^{-7} mol/L时，此作用效率增加了7倍。实验也发现，往下丘脑注入Tα1可抑制THR、CRH、SRIH的释放，往大鼠第三室注入Tα1则可抑制ACTH、TSH、PRL的释放[7]。

3 Tα1的临床应用

目前，临床施用Tα1一般采用策略包括：(1)单独使用；(2) 与淋巴因子联用，如α-、γ-干扰素或白细胞介素-2；(3) 与化疗制剂联用，如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、环磷酸酰胺(cyclophosphamide, CY)或淋巴因子[3,4,8,9,11~17]。

首先，Tα1作为免疫增强剂，除具有免疫刺激效应外，也具有直接抗病毒及抗肿瘤的作用。Hitoshi等[16]发现，Tα1能促进受CY诱导的免疫缺陷小鼠的恢复免疫功能。先给予小鼠CY[50 mg/(kg·d)]2天，然后再注射Tα1[30~300 μg/(kg·d)]。结果显示，实验组$CD_4^+CD_8^+$双阳性胸腺细胞的数目明显高于对照组($P<0.05$)，而细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic lymphocytes, CTL)及淋巴因子激活性杀伤细胞(lymphokine activated killer cells, LAK)的恢复也明显优于对照组。

另外，Tα1等胸腺激素成分在对癌症患者进行辅助放疗及联合化疗的过程中，也具有积极肯定的作用。近年来，利用胸腺激素与传统治疗方法协同使用，发现胸腺激素与某些特定淋巴因子的联用可显著增强疗效。Lau等[17]将96例病人随机分为三组：接受联合用药，单用法昔洛伟(famiciclovir, FCV)，或不接受任何治疗。结果发现，三个组的反应性外周血单核细胞数目及细胞因子的分泌，均无显著差异。但到了第26周，第一组的核心抗原、表面抗原及一系列血清HBV-DNA下降的中位数(0.94 log10copies/ml)明显高于第二组(0.70 log 10copies/ml)，且第一组中有5例病人于52周时HBVeAg血清转阴，而第二、三组中并无转阴的病例。

Tα1、人T细胞白血病毒的gag蛋白及HILVIII(LAV或HIV)在序列上具有同源性[5]。有人认为这可能有利于研制AIDS疫苗，因为这些同源区对HIV病毒的体外复制是关键的。将Tα1用于主疗或辅疗的临床试验表明，其能安全地用于HIV血清阳性病人。

目前，Tα1用于乙型肝炎的临床治疗已在中国、新加坡等15个国家获得批准，在美国、日本也已进入三期临床，而Tα1治疗丙型肝炎已在新加坡、委内瑞拉等4个国家允许上市，在日本和美国已分别进入2期和3期临床，Tα1治疗肿瘤在美国已开始第2期临床[18]。

4 Tα1的基因工程

目前市场出售的胸腺素主要有两种[19]：一是从小牛胸腺组织中提取获得的胸腺素混合物，由于受到原料来源的限制，产量极低；二是人工合成产物，由于Tα1是N端被乙酰化的28肽，因而易于化学合成，产物纯度可达到98%以上，并已用于对乙型、丙型肝炎的临床试验。

由于组织提取法产量极低，人工合成法尽管可大量获得，但鉴于产品价格较贵，且合成过程可能引入一定的毒性，限制了临床应用范围[1,20]。由于Tα1具有重要且广泛的应用价值，为了保证其生物安全性及药物有效性，采用合适的基因工程方法来获得大量表达，显得至关重要。

由于该蛋白质的编码序列过短，难于用基因工程的方法直接获得，故目前主要采用融合表达及串联拷贝法，将Tα1与其他有特殊功能的酶等进行融合表达，使产物具有较高的表达量，并避免了化学

合成法可能造成的毒性。同时，由于融合表达及串连拷贝的联用，使纯化方法得以简化，克服了小分子量肽段的单独表达不利于检测、纯化等缺点。

目前，Tα1 分别在原核、真核和螺旋藻中均实现了表达。其中以大肠杆菌为代表的原核重组表达系统为多。

薛晓畅等[21]获得了序列正确的三串体基因，成功地实现原核表达，获得高度纯化的融合蛋白。石继红等[19,22]将 Tα1 串体与硫氧还蛋白融合，获得高效表达的可溶性融合蛋白，该蛋白质占菌体总蛋白的 40%。同时，利用所设计的 CNBr 裂解位点，获得 N 端缺少乙酰基，而 C 端多一个同型丝氨酸内酯的 Tα1 单体类似物，后者经纯化后具有与天然 Tα1 相当的活性。为了避免 CNBr 的毒性污染，后来选用毒性较小的羟胺作为裂解剂，获得产物与天然 Tα1 具有完全相同的结构。但该法效率远不及 CNBr 法，仍需要进一步完善。修朝阳等[23]研究了 Tα1 与谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)在大肠杆菌中的融合表达。由于采用了大肠杆菌的偏好密码子构建肽基因，不仅提高了 Tα1 mRNA 的翻译效率，也有效避免了来自宿主菌蛋白酶的攻击，在宿主细胞内获得较高的表达。经发酵后，Tα1-GST 融合蛋白的表达量达到了细胞总蛋白的 35% 左右，高于 GST 的平均重组表达水平。王景林等[24]实现了 Tα1-IFNα-2b 融合蛋白的包涵体形式表达，约占菌体总蛋白的 24.5%。

曹俊霞等[25]用质粒 pPIC9K 中信号肽基因与质粒 pPIC3.5K/hTα1-RP 构建表达质粒 pPIC9K/S-hTα1-RP，电转化至毕赤酵母 GS115 菌株中，G418 筛选获得高拷贝酵母菌株。利用甲醇诱导表达，每升菌液可产约为 15 mg 的目的蛋白。徐峰等[26]构建了人胸腺素真核表达重组体 pBK-Tα1，并研究了其对人外周血淋巴细胞免疫活性的影响。

另外，徐虹等[27]将外源 Tα1 基因转入钝顶螺旋藻(*Sprirulina platensis*)，也获得了有效表达。

参考文献 (References)

[1] Goldstein AL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, **56**: 1010
[2] Silecchia G *et al. Cancer Immunol Immumother*, 1999, **48**: 172
[3] 曹颖瑛等。*国外医学免疫学分册*, 1999, **22**:27
[4] Garaci E *et al. Int Immunopharmacol*, 2003, **3**: 1145
[5] Baumann CA *et al. Mech Aging Dev*, 1997, **94**: 85
[6] Roy R *et al. Int J Immunpharmacol*, 2000, **22**: 309
[7] Coe CL *et al. Psychoneuroendo- crinology*, 1996, **21**: 237
[8] Hadden JW *et al. Clin Appl Immunol Rev*, 2001, **1**: 187
[9] Moody TW *et al. Cancer Res*, 1993, **53**: 5214
[10] Yang S *et al. Neurosci Lett*, 2003, **350**: 81
[11] Kullavanuaya P *et al. J Med Assoc Thai*, 2001, **84**: S462
[12] Moshier JA *et al. J Hepatol*, 1996, **25**: 814
[13] Shrivactava P *et al. Int J Immunopathol Pharmacol*, 2004, **17**: 39
[14] Ancell CD *et al. Am J Health Syst Pharm*, 2001, **58**: 879
[15] Andreone P *et al. J Viral Hepat*, 2001, **8**: 194
[16] Ohmori H *et al. Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2001, **23**: 75
[17] Lau GK *et al. J Viral Hepat*, 2002, **9**: 280
[18] 宫照龙等。*滨州医学院学报*, 2003, **6**: 444
[19] 石继红等。*中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**: 344
[20] 苗　红等。*中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 636
[21] 薛晓畅等。*第四军医大学学报*, 2001, **22**: 227
[22] 石继红等.*中国生化药物杂志*, 2003, **24**: 55
[23] 修朝阳等。*生物工程学报*, 2002, **18**: 54
[24] 王景林等。*生命科学研究*, 2004, **3**: 242
[25] 曹俊霞等。*生物技术*, 2003, **13**: 4
[26] 徐　峰等。*浙江大学学报(医学版)*, 2002, **31**: 121
[27] 徐　虹等。*高技术通讯*, 2002, **12**: 83

The Development in Thymosin α1

Gui-Xiang Qin, Xing-Guo Gong*, Jing Ji

(*College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*)

Abstract Thymosin α1 (Tα1) was an immune active peptide *in vivo*. It was used in the treatment of hepatitis B, hepatitis C, tumors and immune-deficiency syndrome. It was generally considered as an important biological response modifier, though the mechanisms of Tα1 was still not well mastered. Here, we reviewed the distribution, mechanism model of functions, and clinical application of Tα1, and summarized its recent development in biosynthesis.

Key words thymosin α1; biological response modifier; clinical application

Received: March 21, 2005 Accepted: May 12, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn