

2.4 褪黑素与法氏囊

腔上囊是禽类最早发生并提供 B 淋巴细胞的器官。迁入的淋巴干细胞在其中向抗体生成细胞分化, 包括由淋巴干细胞分化为前 B 淋巴细胞, 进而分化出现 IgM 生成细胞再分化出现 IgG 生成细胞等, 尤其是从 IgM 生成细胞向 IgG 生成细胞的转化必须依赖腔上囊的微环境。另一方面, 腔上囊滤泡上皮具有内吞功能。并且通过腔上囊途径给予抗原, 可以使禽类获得对特异抗原的免疫能力, 这表明腔上囊可能同时具有外周淋巴器官的功能。此外, 腔上囊还产生促进 B 淋巴细胞分化成熟的激素物质腔上囊因子或腔上囊素。赵瑛等通过试验证明鸡、鸭、鸽子、鹌鹑腔上囊存在褪黑素受体, 且细胞核受体的含量最高。通过进一步分析发现随着年龄的增加腔上囊中褪黑素受体的数量会伴随着腔上囊的萎缩而减少, 同时褪黑素受体的数量在白天明显高于夜间。刘志楠、龄南分别通过对鸡、鸭不同光照时间的控制, 改变机体内源性褪黑素水平的改变, 运用原位杂交技术分别发现在鸡、鸭腔上囊小结髓质 B 淋巴细胞中均存在有褪黑素 Mella、Mellb、Mellc 受体 mRNA 的表达, 同时还发现鸡、鸭腔上囊褪黑素受体基因 mRNA 的表达随光照时间发生变化, 呈阳性信号的总体强弱 (24 h > 12 h > 6 h) 的规律。进一步证明了禽类体内的褪黑素直接作用于腔上囊, 从而来调节禽类的免疫功能。

3 结语

褪黑素对机体的免疫调节作用越来越引起人们的普遍关注, 国内外众多专家学者通过大量的试验研究表明, 褪黑素不仅能够影响免疫器官的生长发育, 而且对机体的体液免疫和细胞免疫以及细胞因子的分泌均起重要的调节作用, 而且这方面的生物学作用越来越多地应用于临床实践中。

19 冷诱导 RNA 结合蛋白的结构与功能

李士泽, 赵雅楠, 李玉恒, 杨焕民

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

哺乳动物和其他有机体一样, 在冷应激条件下可以改变其细胞膜的脂质组分, 抑制蛋白合成和细胞增殖, 但可以诱导冷休克蛋白 (cold shock proteins, CSPs) 大量表达, 这些蛋白大多数参与调节细胞的基本功能, 决定细胞命运, 参与转录、翻译、DNA 复制、RNA 稳定性、核糖体的装配、细胞骨架细胞周期及代谢的过程。迄今为止, 哺乳动物体内具有特征性的冷休克蛋白只有两种既 CIRP 和 Rbm3 (RNA-binding motif protein 3), 虽然这些冷诱导蛋白功能不是很清楚, 但它可以作为 RNA 分子伴侣在冷应激时促进翻译。

冷诱导 RNA 结合蛋白 (Cold inducible RNA-binding protein, CIRP) 最初是在小鼠的睾丸细胞中被分离鉴定的, 到目前为止, CIRP 在人类、大鼠、小鼠、仓鼠、牛蛙、非洲爪蟾、树蛙、鱼腥藻类、马哈鱼及海鞘等多种生物的细胞中发现其 cDNA, 发现 CIRP 的氨基酸结构具有高度保守性, 氨基酸序列也具有较高的同源性。近些年研究表明 CIRP 不仅参与人和动物冷应激过程, 它可能会揭示冷应激反应的调节机制和雄性不育症的分子机制提供新的线索; 可能参与调节两栖动物的冬眠活动; 与人和动物的生长发育 (如神经发育、胚胎发育及生殖发育) 有关; 可能与正常子宫内膜周期调节、癌症发生、肿瘤坏死因子 α 及干扰素 γ 等密切相关; 在组织器官的低温保护、脑损伤的治疗中发挥重要作用等。总之可以说 CIRP 是生物体中一种重要的多功能蛋白。

1 冷诱导 RNA 结合蛋白结构

冷诱导 RNA 结合蛋白 (Cold inducible RNA-binding protein, CIRP) 是在哺乳动物中发现的第一种冷休克蛋白, 它伴随着轻度冷应激过量表达。哺乳动物 (人类、大鼠、小鼠、仓鼠) 体内冷诱导 RNA 结合蛋白都统称为 CIRP, 人类 CIRP 由 172 个氨基酸残基组成的 18 kD 的冷休克蛋白, 与小鼠 CIRP 氨基酸序列同源性 95.3%; 大鼠 CIRP cDNA 编码的氨基酸和小鼠 CIRP 氨基酸序列同源性高达 100%。非洲爪蟾中 CIRP 有 3 个亚型即 XCIRP (Xenopus Cold-inducible RNA-binding Protein), XCIRP-1 和 XCIRP2。Saito T 等克隆鉴定了两栖动物体内 XCIRP, 长 887 bp 并编码 163 个氨基酸, 与哺乳动物 CIRP 氨基酸序列同源性 74%; XCIRP-1 是非洲蟾

蝾螈形成胚肾所必需的, XCIRP2 是一种主要的细胞质 RNA 结合蛋白, 它的精氨酸和甘氨酸富含区域称为 RG4 区域, 它是 XCIRP2 细胞核定位所必需的, Aoki K 等研究表明调节细胞定位与 XCIRP2 功能有关。牛蛙体内 CIRP 命名为 BFCIRP (Bullfrog cold inducible RNA-binding protein), 长度为 706 bp, 编码 160 个氨基酸, BFCIRP 与 XCIRP 氨基酸序列同源性 78.4%, CIRP 在马哈鱼中同系物为 SGRP (salmon glycine-rich RNA binding protein), 它有 205 个氨基酸组成, 分子量为 21.5 kD, 与哺乳动物和两栖动物的 CIRP 氨基酸序列同源性都高于 70%。

CIRP 属于高度保守且富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白家族 (也可能结合 DNA), 它包括氨基末端 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM) 和羧基末端甘氨酸富含区 (glycine-rich domain, GRD), 与植物中发现的应激诱导 RNA 结合蛋白类似。

RRM 基序, 又称为 RNP 基序 (ribonucleo-protein motif) 或称共同序列 RNA 结合域 (Consensus sequence RNA-binding domain, CS-RBD) 由 90 个氨基酸残基构成。它广泛存在于动物、植物、真菌和细菌细胞中, RRM 基序具有 RNA 结合功能, 可能与基因表达的转录后调控有关, 如 mRNA 剪接、定位、稳定、转运和多腺苷酸化等。每一个 RNP 基序包含两个保守序列, 它们分别是核糖核蛋白 1 (Ribonucleoprotein1, RNP1) 和核糖核蛋白 2 (Ribonucleoprotein 2, RNP2), RNP-1 结构域由 8 个保守氨基酸残基 (K/R) G (F/Y) (G/A) FVX (F/Y) 组成 (八聚体); 而 RNP-2 结构域由 6 个保守氨基酸残基 (L/I) (F/Y) (V/I) (G/K) (G/N) L 组成 (六聚体), 其两侧还散布一些疏水性氨基酸。RNP1 和 RNP2 的带电侧链和芳香族侧链在暴露在溶剂中外层, 可通过氢键与堆积力直接与 RNA 结合; 位于 RNP1 最后芳香侧链和其他高度保守的疏水氨基酸形成结构域的疏水核心。Nishiyama H 等认为 CIRP 可能类似于核不均一核糖核蛋白 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP) 的方式调控基因表达, 也可能凭借同 hnRNP C 和 hnRNP A1 竞争靶序列的方式调控特异性或普遍性基因表达, 通过参与调节相关蛋白合成来到达自身保护的作用。

羧基末端甘氨酸富含区即 RGG (Arg-Gly-Gly, arginine-glycine-glycine) 重复序列, 是一段重复出现的“精氨酸-甘氨酸-甘氨酸”组成的重复子。RGG 区域能够介导蛋白质与蛋白质间的相互作用, 从而影响 RNA 与蛋白质结合的活性并且能影响蛋白质的胞内定位。

2 冷诱导 RNA 结合蛋白定位和移行

通常 CIRP 存在于细胞核中, 但在个别应激条件下也存在于细胞质中, 1997 年 Nishiyama H 等人先后将 CIRP 基因定位在人第 19 条染色体 p13.3 位点上和人与小鼠细胞核中。随后 Matsumoto. K 等又发现 XCIRP2 主要在非洲爪蟾卵母细胞的细胞质中。

目前研究表明许多应激导致 CIRP 发生核与质的穿梭, 但冷应激可以诱导 CIRP 的表达但不能改变其细胞核的定位。CIRP 作为转译抑制因子甲基化作用发生移行是由于精氨酸甲基化并在精氨酸转移酶 I 的作用下使其在细胞质中蓄积, 核与质的穿梭依赖 RGG 区域高度相似的基序, 如紫外照射, 氧化应激都可以使 CIRP 发生从细胞核到细胞质的移位, 氧化应激不能影响 CIRP 表达; 遗传毒性应激诱导其表达且在结肠直肠癌 RKO 细胞中发生核与质的易位; 高渗应激时马哈鱼诱导产生的 SGRP (salmon glycine-rich RNA binding protein) 是 CIRP 的同系物, 含有核定位信号区 (nuclear localization signal, RPRR) 可以进行核与质的穿梭。

CIRP 在细胞核细胞质中作用不同, 在细胞核水平, 冷诱导可以抑制细胞增长; 细胞质水平, XCIRP2 和 ElrA 可以共同调节 mRNA 的稳定性, 在非洲爪蟾属卵母细胞中调节 poly (A) 尾部长度, XCIRP2 可以在核与质之间穿梭, 精氨酸末端甲基转移酶 I 诱导 XCIRP2 在细胞质中积聚而过量表达。

3 冷诱导 RNA 结合蛋白表达及其节律性

种属及器官不同 CIRP 的表达亦不相同, Nishiyama H 等研究表明人类 CIRP 在 K562、T24、HepG2、NC65、NEC8、HeLa 等多种细胞呈组成型表达, 且大多数被低温诱导过量表达, 在雄性鼠类精细胞 CIRP 中呈组成型表达, Saito T 等研究表明 24℃ 时检测到非洲爪蟾的大脑和肝中有 XCIRP 的表达, 低温诱导时脑内表达量增加, 在肝中 CIRP 表达变化不明显; 非洲爪蟾卵细胞中至少三种 CIRP 同系物在大量表达, Pan F 等证实高渗透压应激 48 小时后鱼鳃组织的 SGRP 表达量最高, 心脏、肝脏和肾脏中表达量没有明显差异。

CIRP 的氨基酸序列类似于植物昼夜节律蛋白, Nishiyama H 等发现在成年小鼠的多种组织表达, 以脑和睾丸中表达量最大, 脑中 CIRP 呈昼夜节律变化, 睾丸和肝脏则未检测此变化; CIRP 在大脑皮层、海马、丘脑、

下丘脑、小脑皮层大量表达,但其昼夜节律调节仅发生于大脑皮层和视交叉上核(昼夜节律最主要的起搏器),CIRP在白天表达水平升高;在夜间表达水平下降与啮齿类动物体温趋势呈正相关。刘爱军等进一步验证大鼠脑内不同脑区,不同低温条件下CIRP mRNA的表达均明显增高,各脑区CIRP表达也不相同。Saito T等研究证实非洲爪蟾属的脑中CIRP表达也呈昼夜节律行变化(与鼠的表达趋势相反),白天表达水平下降,夜间表达水平升高;冬季牛蛙脑中CIRP表达量高,而在夏季则表达量较低,低温诱导时脑中CIRP的表达量明显高于肝脏;Sugimoto K等研究发现树蛙脑和眼睛中CIRP的表达量在十二月显著高于七月。

综上所述表明CIRP昼夜节律性表达可能与鼠体温昼夜节律性变化及冬眠有关。此外,含有RRM基序的蛋白参与基因转录后的调节,与靶序列有很高的亲和力,CIRP定位于神经细胞细胞核中,可能参与昼夜节律相关或不相关基因表达转录后调节。因此,推测脑的不同区域及不同器官种中的CIRP表达调节机制对温度的敏感性不同,CIRP可能在动物昼夜节律性的调节及冬眠时发挥作用。

4 冷诱导 RNA 结合蛋白与应激

许多应激原如温度、局部缺血、 H_2O_2 、紫外线照射、缺氧、渗透压等都可以诱导CIRP表达。Nishiyama H等研究培养的人类细胞从 37°C 转移到 32°C 后,培养前12小时细胞中CIRP的mRNA水平和蛋白质水平显著提高。温和冷应激($32\sim 25^\circ\text{C}$)显著提高小鼠CIRP的mRNA水平,热应激(39°C 和 42°C)则降低其表达。不同细胞在低温应激可以显著的诱导CIRP表达,但不能使其蓄积。Yang C等发现CIRP对紫外线(UV)诱导的细胞死亡具有保护效应,紫外应激可以使CIRP在人类直肠癌细胞中发生移位。Xue JH等研究发现在局部缺血和 H_2O_2 应激时能够影响大鼠神经元细胞中CIRP的表达,局部脑缺血时CIRP的表达可能与活性氧簇的产生有关,进一步说明CIRP可能对低温治疗脑损伤有重要作用。Wellmann S等报道CIRP借助非缺氧诱导因子1(Hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)和线粒体依赖性机制调节CIRP适应性表达。Pan F等发现高渗透压条件下,马哈鱼的鳃片中SGRP mRNA的表达量增加,热应激和冷应激时都不能诱导产生SGRP。海鞘体内存在一种富含甘氨酸的RNA结合蛋白基因(CiGRP1),它与植物和脊椎动物中的许多的富含甘氨酸RNA结合蛋白同源。多数富含甘氨酸RNA结合蛋白都由寒冷应激诱导表达,CiGRP1在冷应激、热应激时均不能被诱导,而是在胚胎发生时的遗传过程中诱导产生。由此可见,许多应激原可以诱导CIRP的表达,使其发挥更多的生物学作用。

5 冷诱导 RNA 结合蛋白与生长发育

目前研究发现,CIRP的表达对神经发育、胚胎发育及生殖器官的生长发育等三方面起重要作用。

Uochi, M等研究表明非洲爪蟾属体内XCIRP在神经组织和原肾(中胚层)的生长发育早期短暂表达,说明XCIRP可能在神经和胚胎的生长发育及细胞周期的调节过程中发挥重要作用,此外XCIRP还作为一种新型XTcf-3特异性的靶基因调节神经发育,XCIRP和XTcf-3是神经发育所必需的。海鞘类体内CiGRP1是原索动物中发现的第一个富有甘氨酸的蛋白,与它不是由温度应激诱导的而是在胚胎时期表达,说明CiGRP1在海鞘胚胎期发育中起着重要作用。非洲爪蟾的XCIRP可以影响非洲蟾蜍胚肾形成、粘附分子表达和胚胎细胞移动,然而上述作用机制尚不明确,有待于进一步研究。

Nishiyama H等研究表明在小鼠睾丸内,在精子不同的分化期CIRP的表达水平也不同,CIRP在初级精母细胞中大量表达,精原细胞中CIRP表达量较低,研究发现热处理6小时后,CIRP在精细胞中表达量下降,说明CIRP可能在初级精母细胞中的具有特殊意义。阴囊温度增加导致精子活力下降和不育,Banks S等发现温和热应激(42°C)可以影响鼠类精子DNA的完整性,睾丸和附睾中CIRP表达量减低,说明CIRP可能在精子发生过程中发挥重要作用。近几年来,LI Shize等克隆了BALB/C鼠睾丸组织中CIRP的cDNA并对其序列进行分析,表明在活体动物冷应激的过程中能诱导CIRP过量表达而防止冷损伤;Zhou KW等有研究表明CIRP的过量表达及p53和Fas蛋白表达降低可能减少隐睾症患者的睾丸损伤。因此,研究CIRP在睾丸中的表达将有助于分析雄性不育的分子机制。此外,Aoki K等从非洲爪蟾卵母细胞中分离鉴定的XCIRP2可以调节核糖体功能并影响卵母细胞生长,以上研究证实CIRP在生殖发育过程中有重要作用。

6 冷诱导 RNA 结合蛋白与疾病发生

冷诱导RNA结合蛋白在人和多种生物中发现其表达量变化与癌症和肿瘤等疾病有密切关系。Lleonart ME

等研究表明 CIRP 是新一代的原癌基因 (proto-oncogene), 它是细胞内与细胞增殖相关的基因, 是维持机体正常生命活动所必须的, 在进化上高等保守 (很少突变)。

人类的多种癌症中细胞周期调节器即细胞周期蛋白 E1 都表现为异常表达, 乳腺癌细胞中 CIRP 可同时调节人类抗原 R (human antigen R, HuR) 和细胞周期蛋白 E1 (cyclin E1), 从而促进二者表达量增加。在乳腺癌细胞中用 CIRP 和抗原 R 水平的改变来评估细胞周期蛋白 E1 的影响。在非洲蟾蜍卵母细胞中 CIRP 和人类抗原 R 相互作用, 人类 CIRP 和抗原 R 共同调节细胞周期蛋白 E1。CIRP 可以提高抗原 R 结合细胞周期蛋白 E1 的 mRNA 并增加其稳定性。**总之 CIRP 可以调节抗原 R 的表达, 从而增加其靶蛋白合成。**

Hamid AA 等研究发现 CIRP 在正常子宫内膜细胞、子宫内膜增生细胞、子宫内膜癌细胞中的表达量各不相同, 研究发现 CIRP 在子宫肥大细胞内表达是可变的而在大多数子宫内膜癌细胞和非典型增生细胞中不表达或表达量显著降低; 而且在月经周期 CIRP 的表达与腺细胞的增殖活动是呈负相关的, 在间质细胞和血管内皮细胞表达量是保持不变的。表明 CIRP 可能参与正常子宫内膜细胞调节活动, 其表达量的减少可能与子宫内膜癌的发生有关。Tan HK 等研究表明 CIRP 的过量表达增加中国仓鼠卵巢细胞中抗肿瘤药干扰素 γ 的产生, 从而抑制肿瘤的发生。Zhou KW 等 CIRP 的过量表达可以减少隐睾症患者睾丸损伤; 周克文等则发现小鼠隐睾中 CIRP 的表达明显降低可能在隐睾生精细胞损害中起着重要的作用。

此外, **适度低温对于脑损伤和心脏病人有保护作用**。1999 年, Xue JH 等提出 CIRP 可能是一种对低温治疗脑损伤有保护作用的蛋白, 近几年刘爱军等又验证了这一观点。低温时能量消耗低而使组织处于休眠状态, 提高了应激的耐受能力。Sakurai T 等研究适度低温 (32 °C) 诱导 CIRP 表达并可以通过激活细胞外信号调节激酶抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的细胞凋亡过程, 并在疾病治疗中起到保护细胞的作用。赵巧香等构建重组 BALB/C 鼠 CIRP 的原核表达载体, 并利用原核表达包涵体蛋白免疫兔获得了高效价的 CIRP 多克隆抗体, 且能够与天然 CIRP 发生特异性结合, 有利于今后对于 CIRP 的功能及其应用的研究。

7 小结

迄今为止, CIRP 确切机制尚未研究清楚, 其功能了解不够深入。但已经研究表明这类蛋白质参与多种转录后调控和某些疾病的发生过程。由于冷诱导 RNA 结合蛋白作为 RNA 分子伴侣, 参与人及动物的多种生理活动从而具有重要的生理和分子功能。有必要对其在信号传导通路的作用、疾病 (尤其是癌症和肿瘤) 中发挥的作用、低温时对细胞保护作用以及与其他蛋白质的相互作用等新的思路和方法上进一步的深入研究。这将会为今后对 CIRP 分子机制、功能及应用的深入研究提供重要理论基础。

20 白术多糖免疫调控作用的研究进展

田允波, 许丹宁, 黄运茂, 袁朝霞, 刘容珍

(仲恺农业工程学院生命科学学院, 广州 510225)

天然中草药是我国传统医学的瑰宝, 有效成分主要为多糖、甙类、生物碱、挥发油等生物活性物质。其中多糖 (Polysaccharide) 是一类由十个以上的单糖通过糖苷键连接而成的天然高分子多聚物, 许多多糖本身就是广谱的免疫促进剂, 能够对机体的免疫机能起到调节和增强的作用, 如控制细胞分裂和分化、调节细胞的生长与衰老等, 且没有细胞毒作用。中药多糖在畜牧兽医领域主要用作免疫辅佐剂和饲料添加剂, 能起到促生长、改善胴体品质、增强动物免疫力、提高疫苗保护率、降低疾病的发病率和死亡率等作用。我国地域辽阔, 中草药资源十分丰富, 开发利用中药多糖作为饲料添加剂将拥有巨大的潜力和价值。

中药多糖对机体免疫系统的综合促进作用, 是其作为促生长剂和促免疫增效剂的主要原因, 大量药理试验证明, 中药多糖调节机体免疫功能的作用是多途径、多靶点的, 主要体现在: ①通过作用吞噬细胞系统激发机体非特异免疫功能, 提高畜禽抗病能力; ②对 T 淋巴细胞的增殖能力的影响, 促进机体细胞免疫功能; ③活化 B 淋巴细胞, 提高体内抗体水平, 增强疫苗免疫效果; ④促进细胞因子的分泌, 调节细胞生长分化, 增强