

TSAb 诱导的相关信号通路的研究进展

金更学 徐翔宇 李 瑶 陈 慧

摘 要 Graves 病是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,促甲状腺素受体刺激性抗体(TSAb)是 GD 发病的关键环节并贯穿疾病始终,该抗体与促甲状腺素受体(TSHR)结合,激活 TSHR 相关的信号通路。本文就 TSAb 结合 TSHR 后诱导的相关信号通路及其意义进行综述。

关键词 Graves 病 促甲状腺素受体刺激性抗体 信号通路

中图分类号 R58 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.005

Graves 病(Graves' disease, GD)又称毒性弥漫性甲状腺肿,是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,其发病与促甲状腺素受体抗体(thyrotropin receptor antibody, TRAb)关系密切。现认识到 TRAb 包含 3 种类型,包括促甲状腺素受体刺激性抗体(thyroid stimulating antibody, TSAb)、促甲状腺素受体刺激阻断性抗体(thyroid stimulating blocking antibody, TSBAb)、中和性抗体^[1]。GD 的发病目前日益增多,针对 GD 的治疗方法现有 3 种,分别为抗甲状腺药物治疗、放射碘治疗、手术治疗,上述方法均未直接涉及 GD 的自身免疫环节,且均存在治疗后复发的风险。TSAb 诱导的相关信号通路是 GD 发病的关键环节,如从该环节予以干预,也许是未来 GD 生物治疗的新途径,为此本文就 GD 发病涉及的信号通路予以综述。

一、TSHR 抗原

促甲状腺素受体(thyrotropin receptor, TSHR)主要存在于甲状腺滤泡上皮细胞膜上,是一种 7 次跨膜糖蛋白受体,属于 G 蛋白偶联受体^[2]。TSHR 经过复杂的翻译后修饰过程而成为活性状态,主要包括二硫键的形成、裂解、二聚化、棕榈酰化、硫酸化、糖基化、唾液酸化、磷酸化、脱落等。其中糖基化在胞外域有 6 个特定位点(氨基酸残基 77、99、113、177、198、302)。经分子内裂解,释放 1 个约由 50 个氨基酸组成的 C 肽(氨基酸残基 316~366)。TSHR 包含 A 亚

基和 B 亚基,两个亚基借二硫键形成 TSHR 的二级结构。

TSHR 由 764 个氨基酸组成,包含 3 部分:①细胞外结构域,亲水性,识别、结合胞外信号分子,存在 TSH 和 TRAb 识别的表位(包括构象性表位和线性表位)。胞外域可分为两部分,亮氨酸丰富的区域(leucine rich domain, LRD, 氨基酸残基 22~260)和铰链区。其中 9 个 LRD 对受体的正确折叠、配体的结合具有重要作用^[3,4]。铰链区连接 LRD 和跨膜部分,越来越多的研究表明铰链区对受体激活后向细胞内进行信号转导及配体的结合也起重要作用^[3~5];②跨膜部分,为 7 个疏水的跨膜片段,形成 3 个胞外环、3 个胞内环,将胞外信号传递给 G 蛋白;③细胞内结构域,与 G 蛋白偶联,将胞外信号传递到胞内而产生效应。受遗传、感染、精神刺激等相关因素的影响,GD 患者免疫功能紊乱,尤其是体液免疫异常,机体将 TSHR 识别为一种自身抗原,递呈于免疫系统,诱发机体产生抗 TSHR 的抗体即 TRAb。

二、促甲状腺素受体抗体(TSAb)

TRAb 于 1956 年被首次发现,称为长效甲状腺刺激物。TRAb 为异质性抗体,可分为 TSAb、TSBAb、中和性抗体^[1]。TSAb 已表明与 GD 关系密切,它模拟 TSH 的作用,与 TSHR 结合,引起甲状腺细胞过度生长、功能增强,导致甲状腺肿大、功能亢进,诱发 GD。早期研究提出 TSAb 主要识别 TSHR 胞外域 N 端的构象性表位,TSBAb 主要识别 TSHR 胞外域 C 端的线性表位。但近年来随着单克隆抗体技术的发展,发现 TSAb、TSH、TSBAb 三者识别表位相近且多重叠,主要参与部位为 TSHR LRD。有研究者认为在 LRD C 端部分^[6]。也有研究者持不同观点,认为在 LRD N 端半胱氨酸丰富的区域(氨基酸残基 22~30)^[7]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81241029)

作者单位:730000 兰州大学第二临床医学院(金更学、徐翔宇、李瑶);730030 兰州大学第二医院内分泌代谢科(陈慧)

通讯作者:陈慧,教授,博士生导师,电子信箱:13909313366@163.

com

TSAb 与 TSBAbs 可共存于 GD 患者的血清中,二者效价可随患者病情而转换,有研究者提出大胆假设,认为 TSBAbs 可能是 TSAbs 的前体物质^[8]。现研究较多的 TSAbs 单克隆抗体包括 MS1、RSR-12、M22、K1-18、KSAbs1、KSAbs2、Mc4。

三、TSAbs 诱导的相关信号通路

当 TSAbs 与甲状腺细胞 TSHR 结合后,可产生与 TSH 结合 TSHR 后极为相似的效应。因此,通常认为 TSAbs 模拟了 TSH 的作用,但不同的是 TSH 激发的是一种生理过程并受甲状腺轴系的反馈调控,而 TSAbs 与 TSHR 结合后诱导了异常活跃的持续性病理过程,并不受相关调节轴等的影响。

目前关于 TSAbs-TSHR-信号通路的相关研究,主要通过采用 TSAbs 单克隆抗体或 GD 人血清激活细胞内的关键信号分子进行,TSAbs-TSHR 主要信号通路有以下 5 条:

1. $G_{\alpha s}$ -腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)-环腺苷酸(cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP)-蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)信号通路:此通路发现最早、研究较为成熟,是目前公认的引起甲状腺功能亢进的最重要信号通路。MS1、RSR-12、M22,因来源不同,其轻链的组成也不尽相同, Morshed 等^[1]用此 3 种抗体分别刺激大鼠甲状腺细胞(fischer rat thyroid cell line-5, FRTL-5)进一步补充了激活的下游信号分子,即 AC-cAMP-PKA-环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)信号通路,CREB 进入细胞核内,调节基因表达,促进细胞增殖。此信号通路中关键信号分子的磷酸化水平与甲状腺细胞增殖指数呈正比,且明显高于 TSH 激活的水平,此为 TSAbs 与 TSH 激活的信号通路相似却又有不同的表现之一。不仅如此,上述 3 种抗体激活的信号通路也各不相同,M22 激活此信号通路最明显,而 RSR-12 不能激活。表明 TSAbs 与 TSHR 结合诱发细胞内信号通路是一个精细的过程。高浓度的线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mROS)可通过氧化应激反应诱导细胞凋亡甚至导致其坏死。进一步的研究发现,TSAbs 导致甲状腺细胞增殖的深入机制可能是通过激活 AC-cAMP-PKA-CREB 信号通路,抑制了 mROS 及细胞应激水平^[9]。

2. G_q -磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)-三磷酸肌醇(inositol 3, 4, 5-trisphosphate, IP_3)- Ca^{2+} 信号通路:在表达 TSHR 的人胚胎肾细胞(HEM293)中

证实,用 M22 刺激,可通过 $G_{q/11}$ 激活 PLC,使 IP_1 水平增加(IP_3 很快降解为 IP_1 ,因此检测 IP_1 的水平),并证实此信号通路及 cAMP 信号通路的持续激活并不依赖 TSHR 的内化^[10]。PLC 可水解磷脂酰肌醇二磷酸(phosphatidylinositol biphosphate, PIP_2)为 IP_3 和二酰基甘油(diaclyglycerol, DAG)。 IP_3 可使线粒体内的 Ca^{2+} 流入胞内,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加。细胞内 Ca^{2+} 升高,可刺激碘从胞内流出,碘化甲状腺球蛋白,刺激甲状腺素的合成。DAG 可进一步激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC),PKC 为一重要的关键信号分子,其激活的下游信号通路见下文。此信号通路主要调控甲状腺细胞功能。

3. PKC 信号通路:Morshed 等^[1]报道单克隆刺激抗体可显著激活 PKC。PKC 可激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)信号通路。Gilbert 等^[11]报道单克隆刺激抗体 KSAbs1、KSAbs2 可激活 ERK1/2 信号通路。ERK1/2 信号通路是胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor-1, IGF-1R)下游重要的信号通路。TSHR 信号通路与 IGF-1R 信号通路间相互交叉、影响^[12-14]。此外,PKC 还可激活核转录因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB)信号通路^[1,15]。NF- κB 是一种重要的核转录因子,激活后与 NF- κB 抑制剂(inhibitor of NF- κB , I κB)分离、进入细胞核内,调节细胞因子的合成和分泌^[16]。

4. $G_{\beta\gamma}$ -磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI_3K)-蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB 又称 AKT)-哺乳动物雷帕霉素靶体蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路: PI_3K 是由催化亚基(P110)和调节亚基(P85)构成的异二聚体。AKT 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,AKT 信号通路是已知细胞生长和增殖所需要的最显著的信号通路。mTOR 可分为 mTORC1(mTOR complex 1)和 mTORC2(mTOR complex 2)。当细胞受到刺激后,P110 和 P85 结合并异位至细胞膜, PI_3K 激活,将 PIP_2 磷酸化为 3,4,5 三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate, PIP_3)。 PIP_3 与 AKT N 端的 PH 结构域结合,在磷脂酰肌醇依赖性激酶 1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK-1)的辅助下,磷酸化 AKT 蛋白上的苏氨酸(Thr308)和丝氨酸(Ser473),使其活化。活化的 PI_3K -AKT 进一步激活下游 mTOR 分子,mTOR 活化下游的低分子,这些低分子作为转录因子,进入细胞

核内调控细胞的增殖、生长。PI₃K - AKT - mTOR 信号通路与肿瘤关系密切,在甲状腺肿瘤的恶变及转移中均起到重要的作用,新型抑制剂的靶向治疗正在研发^[17]。在 FRTL - 5 细胞中,M22、MS1 可激活 AKT/mTOR/核糖体 S6 蛋白激酶(ribosomal S6 kinase 1, S6K1),进而抑制 mROS 的产生、细胞应激,促进甲状腺细胞增殖^[1,9]。

5. G_i - 磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) - 花生四烯酸(arachidonic acid, AA) - 前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 信号通路:GD 患者的 IgG 可激活 AC - cAMP 信号通路和 PLA₂ - AA 信号通路,同时激活以上两条信号通路,致使 GD 患者病情更为严重表现为更大的结节、更高的甲状腺激素水平^[18]。此信号通路近年来研究较少。

在以上 5 条信号通路中,调控甲状腺细胞生长、增殖的信号通路主要为 AC - cAMP - PKA - CREB、PI₃K - AKT - mTOR、PKC - NF - κB 信号通路,调节甲状腺细胞功能的信号通路主要为 AC - cAMP 和 PLA₂ - AA 信号通路^[15]。因此,各信号通路间及与其他受体诱导的信号通路间相互影响、相互制约,互为补充,形成一个复杂、相互交叉的信号网络系统。

四、展 望

如今对于 GD 的治疗措施只是针对症状而未针对该病的免疫环节,不能有效阻止或逆转 GD 的进展。目前尚无有效的措施从病因学方面预防和治疗 GD。近年来 Neumann 等^[19]致力于 TSHR 低分子拮抗剂的研究,最新合成的 TSHR 低分子拮抗剂为 NCGC00242364 (ANTAG3)。在细胞模型中,其可抑制 TSH 刺激的 cAMP 信号通路。在雌性小鼠体内,其可抑制 M22 刺激的甲状腺素的增加,是未来治疗 GD 的有效药物。另有研究发现,TSBAb 单克隆抗体 K1 - 70 可通过阻断 TSHR 的激活,抑制细胞内 cAMP 水平,从而抑制甲状腺激素的分泌,还可抑制 M22 的作用,其作用强度及特殊性均强于 TSHR 低分子拮抗剂,是治疗 GD 重要的潜在药物^[20,21]。中药甲亢宁能降低 GD 小鼠甲状腺素水平,降低 mTOR 的表达,可能是通过 AKT/mTOR 靶点发挥作用^[22]。因此 TSAb 诱导的相关信号通路可能是未来治疗 GD 非常有前景的新靶点。

综上所述,TSAb 诱导的相关信号通路是一个复杂、相互交叉的网络系统,关于各信号通路间相互作用及意义的研究已取得重大进展。TSAb 诱导的相关信号通路,是 GD 发病机制研究中一个非常有前景的

切入点,可为未来 GD 的诊疗提供新思路。

参考文献

- Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody - induced signaling cascades [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(1): 519 - 529
- Mansourian AR. Central dogma in thyroid dysfunction: a review on structure modification of TSHR as a cornerstone for thyroid abnormalities [J]. *Pak J Biol Sci*, 2011, 14(3): 170 - 181
- Kleinau G, Mueller S, Jaeschke H, *et al.* Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(25): 22622 - 22631
- Hamidi S, Chen CR, McLachlan SM, *et al.* Insight into thyroid - stimulating autoantibody interaction with the thyrotropin receptor N - terminus based on mutagenesis and reevaluation of ambiguity in this region of the receptor crystal structure [J]. *Thyroid*, 2011, 21(9): 1013 - 1020
- Krause G, Kreuchwig A, Kleinau G. Extended and structurally supported insights into extracellular hormone binding, signal transduction and organization of the thyrotropin receptor [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52920
- Núñez Miguel R, Sanders J, Sanders P, *et al.* Similarities and differences in interactions of thyroid stimulating and blocking autoantibodies with the TSH receptor [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 49(2): 137 - 151
- Hamidi S, Chen CR, McLachlan SM, *et al.* Insight into thyroid - stimulating autoantibody interaction with the thyrotropin receptor N - terminus based on mutagenesis and re - evaluation of ambiguity in this region of the receptor crystal structure [J]. *Thyroid*, 2011, 21(9): 1013 - 1020
- Ochi Y, Kajita Y, Hachiya T, *et al.* A novel hypothesis for the etiology of Graves' disease: TSAb may be thyroid stimulating animal IgG - like hormone and TBAb may be the precursor of TSAb [J]. *Med Hypotheses*, 2012, 78(6): 781 - 786
- Morshed SA, Ma R, Latif R, *et al.* How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis [J]. *J Autoimmun*, 2013, 47(6): 17 - 24
- Boutin A, Allen MD, Geras - Raaka E, *et al.* Thyrotropin receptor stimulates internalization - independent persistent phosphoinositide signaling [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 80(2): 240 - 246
- Gilbert JA, Gianoukakis AG, Salehi S, *et al.* Monoclonal pathogenic antibodies to the thyroid - stimulating hormone receptor in Graves' disease with potent thyroid - stimulating activity but differential blocking activity activate multiple signaling pathways [J]. *J Immunol*, 2006, 176(8): 5084 - 5092
- Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin - like growth factor - 1 (IGF - 1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012, 26(3): 291 - 302
- 孟淑华, 魏军平. TSHR 信号转导通路在 Graves 眼病发病机制中的作用 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2014, 34(2): 84 - 86

(下转第 26 页)

可以促进波形蛋白的分化。波形蛋白可以发生翻译后修饰,如磷酸化、糖基化修饰等。

Chang 等^[4]报道磷酸化修饰的波形蛋白在轴突的生长方面发挥重要作用,在施万细胞中也有类似的发现,磷酸化的波形蛋白与轴突的再生过程密切相关,磷酸化波形蛋白还可以提高施万细胞的迁移活性。有相关研究证实波形蛋白糖基化修饰能与磷酸化修饰相互作用^[14, 15]。磷酸化修饰与糖基化修饰之间的交互作用可以在很多细胞的生物活动中发挥重要作用,比如在细胞分裂、细胞骨架功能及调节某些酶的活性的方面可起到重要作用^[15-17]。波形蛋白可以与许多相关分子相互作用,比如某些细胞信号分子和配体蛋白分子,从而调节细胞的功能活动,而波形蛋白促进 PC12 细胞神经分化的具体分子机制是以后需要继续研究的方向。

综上所述,本研究发现,波形蛋白在分化程度高的 PC12 细胞中表达也高,波形蛋白的表达量与 PC12 细胞的分化情况正相关,波形蛋白干扰后能有效地抑制 PC12 细胞的神经分化,提示波形蛋白分子能促进 PC12 细胞的神经分化。

参考文献

- Ivaska J. Vimentin: central hub in EMT induction? [J]. Small GTPases, 2011, 2(1): 51-53
- Vitalo AG, Sirbulescu RF, Ilies I, et al. Absence of gliosis in a teleost model of spinal cord regeneration [J]. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2016, 202(6): 445-456
- Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting [J]. Microcirculation, 2014, 21(4): 333-344
- Chang IA, Oh MJ, Kim MH, et al. Vimentin phosphorylation by Cdc2 in Schwann cell controls axon growth via beta1-integrin activation [J]. FASEB J, 2012, 26(6): 2401-2413
- Budday S, Steinmann P, Kuhl E. Physical biology of human brain development [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 257
- Di Miceli M, Gronier B. Psychostimulants and atomoxetine alter the electrophysiological activity of prefrontal cortex neurons, interaction with catecholamine and glutamate NMDA receptors [J]. Psychopharmacology Berl, 2015, 232(12): 2191-2205
- Wigerius M, Asghar N, Melik W, et al. Scribble controls NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells [J]. Eur J Cell Biol, 2013, 92(6-7): 213-221
- Su WT, Liao YF, Wu TW, et al. Microgrooved patterns enhanced PC12 cell growth, orientation, neurite elongation, and neuritogenesis [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(1): 185-194
- Hui SP, Nag TC, Ghosh S. Characterization of proliferating neural progenitors after spinal cord injury in adult zebrafish [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0143595
- Gorris R, Fischer J, Erwes KL, et al. Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes [J]. Glia, 2015, 63(12): 2152-2167
- Liu Z, Li Y, Cui Y, et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke [J]. Glia, 2014, 62(12): 2022-2033
- Chang IA, Kwon KB, Park YC, et al. Permissive role of Cdc2 activity induced from astrocytes in neurite outgrowth [J]. J Neurochem, 2013, 125(2): 214-224
- Vinci L, Ravarino A, Fanos V, et al. Immunohistochemical markers of neural progenitor cells in the early embryonic human cerebral cortex [J]. Eur J Histochem, 2016, 60(1): 2563
- Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock [J]. Cell Metab, 2013, 17(2): 291-302
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease [J]. Annu Rev Biochem, 2011, 80: 825-858
- Myers SA, Daou S, Affar El B, et al. Electron transfer dissociation (ETD): the mass spectrometric breakthrough essential for O-GlcNAc protein site assignments - a study of the O-GlcNAcylated protein host cell factor C1 [J]. Proteomics, 2013, 13(6): 982-991
- Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes [J]. Clin Proteomics, 2014, 11(1): 8
- (收稿日期: 2016-05-29)
- (修回日期: 2016-05-30)
- (上接第 17 页)
- Krieger CC, Neumann S, Place RF, et al. Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobulins [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(3): 1071-1077
- Morshed SA, Davies TF. Graves' disease mechanisms: the role of stimulating, blocking, and cleavage region TSH receptor antibodies [J]. Horm Metab Res, 2015, 47(10): 727-734
- Reale C, Iervolino A, Scudiero I. NF- κ B essential modulator (NEMO) is critical for thyroid function [J]. J Biol Chem, 2016, 291(11): 5765-5773
- Saji M, Ringel MD. The PI₃K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 321(1): 20-28
- Di Cerbo A, Di Paola R, Menzaghi C, et al. Graves' immunoglobulins activate phospholipase A2 by recognizing specific epitopes on thyrotropin receptor [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(9): 3283-3292
- Neumann S, Nir EA, Eliseeva E, et al. A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice [J]. Endocrinology, 2014, 155(1): 310-314
- Furmaniak J, Sanders J, Young S, et al. In vivo effects of a human thyroid-stimulating monoclonal antibody (M22) and a human thyroid-blocking autoantibody (K1-70) [J]. Auto Immun Highlights, 2011, 3(1): 19-25
- Furmaniak J, Sanders J, Núñez Miguel R, et al. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies [J]. Horm Metab Res, 2015, 47(10): 735-752
- 李青穆, 魏军平, 李敏, 等. 甲亢宁胶囊对 Graves 病小鼠甲状腺功能及 Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9): 1119-1124
- (收稿日期: 2016-05-07)
- (修回日期: 2016-05-15)