

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2013.03.015

· 综述 ·

TGF- β 系统及其在硬骨鱼中的研究进展

詹绪良, 吴金英, 李文笙

(中山大学生命科学学院水生经济动物研究所, 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一类多效应细胞因子, 在很多生理活动中发挥功能。TGF- β 以前体形式合成, 随后被切割活化形成成熟的 TGF- β 。TGF- β 以二聚体的形式发挥作用, 与受体 T β R I (transforming growth factor- β receptor I) 和 T β R II (transforming growth factor- β receptor II) 形成一个大型复合物后, 磷酸化胞内的 Smad, 激活下游信号通路。鱼类中对 TGF- β 家族成员的研究主要集中在对 TGF- β 1 的研究, 包括 TGF- β 1 与免疫相关和与生殖相关的功能, 也有研究表明 TGF- β 1 与肝功能相关。此外, 有少量对 TGF- β 家族其他成员和 TGF- β 受体的研究。

关键词: TGF- β ; TGF- β 受体; 硬骨鱼

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)03-0090-07

TGF- β system and its research advances in teleost

ZHAN Xuliang, WU Jinying, LI Wensheng

(Guangdong Provincial Key Lab. for Aquatic Economic Animals; Institute of Aquatic Economic Animals
School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Transforming growth factor- β (TGF- β) family members are multi-functional cytokines, which play pivotal roles in many physiological activities. TGF- β is synthesized as a pro-TGF- β precursor. Subsequently, the N-terminus of the immature protein is removed, and the new proteins form a homodimer. TGF- β mediates its biological functions via binding to receptors T β RI and T β RII, and then phosphorylates intracellular Smad proteins to activate signal pathway. Till now, most researches in TGF- β family are focused on TGF- β 1, which is involved in immune, reproductive and liver functions, while just few studies about the other members of TGF- β and TGF- β receptors exist.

Key words: TGF- β ; TGF- β receptor; teleost

转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族是一类多效应细胞因子, 在抑制肿瘤、细胞增殖、细胞分化、组织形成、世系决定、细胞迁移和细胞凋亡等多种生理过程中发挥重要作用^[1]。TGF- β 超家族成员包括转化生长因子 β (TGF- β)、活化素 (activin) 和骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 3 个家族。狭义上的 TGF- β 通常指的是 TGF- β 家族。TGF- β 既能促进细胞增殖, 又能抑制细胞增殖; 能控制细胞外基质的形成, 如促

进胶原蛋白的合成; 通过调节细胞外基质诱导细胞凋亡和调控形态发生; TGF- β 也是一种神经蛋白, 能刺激神经生长因子的形成^[2]。研究表明, TGF- β 系统与人类多种疾病有重大关联, 如心脏疾病^[3]、微血管疾病^[4]和癌症^[5]等。在哺乳动物中对 TGF- β 及其受体的报道每年有数百篇, 足以说明 TGF- β 系统的重要性。近年来, 有许多学者在低等脊椎动物中对 TGF- β 系统进行了研究, 而鱼类具有其独特的生活环境和进化历史上的特殊意义, 因此 TGF- β 系统在

收稿日期: 2012-12-09; 修回日期: 2013-01-14

资助项目: 现代农业产业技术体系 (罗非鱼体系) 专项资金 (CARS-49); 公益性行业 (农业) 科研专项 (3-49-10)

作者简介: 詹绪良 (1989-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类鱼疫研究。E-mail: zhan.xuliang@yahoo.com.cn

通信作者: 吴金英 (1963-), 女, 副教授, 博士, 从事鱼类生理鱼疫学研究。E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn

低等脊椎动物中的研究又集中在鱼类上。

1 TGF- β 介绍

TGF- β 第一次是从人胎盘中发现的^[6], 在哺乳动物中已发现了3种TGF- β (1/2/3), 其中TGF- β 1在免疫系统中发挥主要功能^[7]。在鸟类中发现有3种TGF- β (TGF- β 2/3/4), 两栖类中发现有2种TGF- β (TGF- β 2/5), 已有证据表明鸟类的TGF- β 4和两栖类的TGF- β 5是TGF- β 1进化的前体, 因此也称之为TGF- β 1^[8]。到目前为止, 在硬骨鱼中发现了4种TGF- β (TGF- β 1/2/3/6)。

哺乳动物TGF- β 主要是由T细胞产生, 但是在其他的细胞中都有表达。其他主要来源包括血小板、巨噬细胞、噬中性粒细胞、骨和软组织如胎盘、肾、子宫内膜和疾病细胞, 通过自分泌和旁分泌的方式产生^[2]。

哺乳动物中的3种TGF- β 都可以在转录水平进行调控。TGF- β 2和TGF- β 3的启动子都包含有TATAA框和一个普通的近端CRE-ATF位点, 这说明这些启动子都服从激素和发育调控^[9]。TGF- β 1的启动子缺少经典的TATAA框, 但是有多元的调控位点, 能够被*c-jun*、*c-Fos*和*egr-1*以及很多的致癌基因如*abl*、*fos*、*jun*、*ras*和*src*激活^[10]。TGF- β 1启动子的活性能被肿瘤抑制物所抑制^[11]。低等脊椎动物中目前尚未见有关TGF- β 转录调控方面的研究报道。

TGF- β 是以前体蛋白的形式编码, 每种TGF- β 都是由一个单独的基因编码。TGF- β 蛋白前体在细胞内经过一系列的加工过程后才分泌到细胞外。其中最重要的一步是前

体蛋白的水解, 将前体蛋白的N端切掉, 是在高尔基体中由弗林蛋白酶(Furin-like peptidase)水解^[12]。另有研究表明C型胶原蛋白酶也能裂解此位点^[13], 切掉的N端多肽又会形成二聚体, 称为潜在关联蛋白(latency-associated protein, LAP), 它与成熟TGF- β 同型二聚体非共价结合, 该复合体称为潜在的TGF- β (latent TGF- β , L-TGF- β)或小潜在复合体(small latent complex, SLC)。该复合体可以直接分泌到细胞外, 或者再与潜在TGF- β 结合蛋白(latent TGF- β binding protein, LTBP)相结合形成一个大的潜在复合体(large latent complex, LLC)而分泌, LTBP在使TGF- β 靶向细胞外基质中发挥重要作用^[14-15]。

哺乳类TGF- β 1 LAP(LAP-1)的结构被广泛研究, LAP-1包含N端连接的糖链, 其中2个含有甘露糖-6-磷酸基团, 可以与细胞表面的甘露糖-6-磷酸盐/胰岛素样生长因子II受体相互作用^[16]。人类LAP-1含有3个半胱氨酸残基, 223和225位置上的半胱氨酸对LAP形成链间二硫键十分重要。在223和225位置上的半胱氨酸用丝氨酸代替后, TGF- β 1可直接以活性的形式分泌, 表明这2个位置的半胱氨酸对LAP-1和TGF- β 1的结合非常重要。此外, 第33位的半胱氨酸与LTBP的结合有关^[17]。LTBP具有15~19个表皮生长因子(EGF)样重复和多个半胱氨酸残基。LTBP的另一个功能是在高尔基体与L-TGF- β 结合使SLC快速分泌。然而LTBP被广泛研究的功能是使L-TGF- β 定位到细胞外基质, 从而形成一个细胞外基质中的TGF- β 库^[18]。

TGF- β 与LAP和LTBP结合时不能直接与受体结合, 需要从复合物中释放出活性形式的TGF- β 。在体外可以通

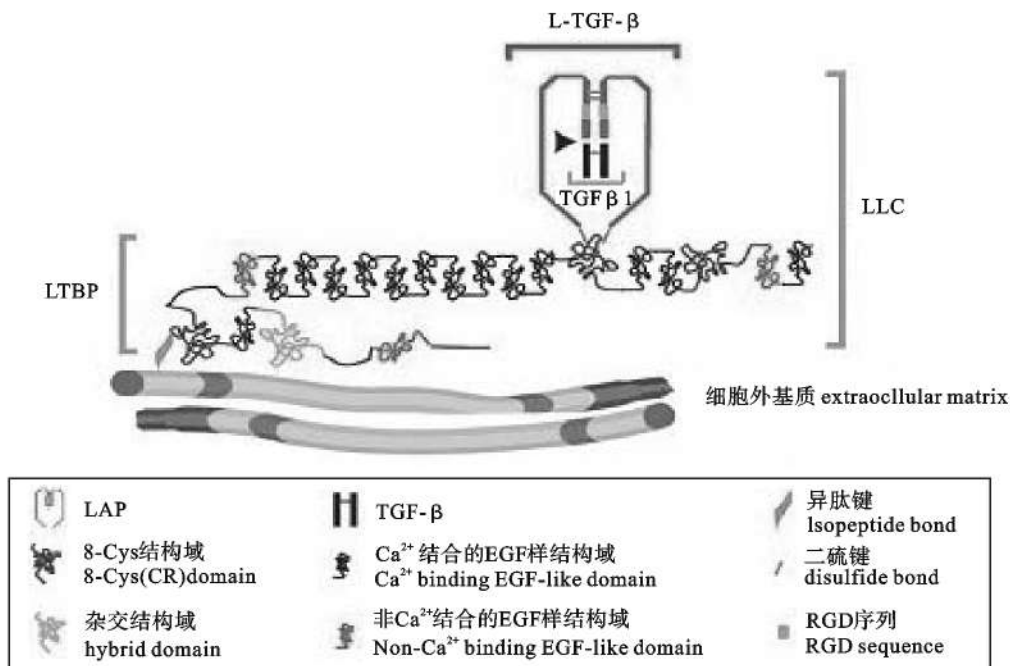


图1 TGF- β 大潜在复合物(LLC)示意图^[15]

Fig. 1 TGF- β large latent complex(LLC)

过 pH(2 和 8)、加热(100 ℃)或某些蛋白酶等条件使其释放^[15]。至于在体环境是通过什么机制释放出活性的 TGF- β , 目前并没有确切的定论。但是学者们提出了几种假说, 包括: 1) 通过反式谷氨酰胺酶水解活化假说^[15]; 2) 通过与血小板反应素物理接触改变 LAP 构想假说^[19]; 3) 表皮细胞 $\alpha v\beta 6$ 整合蛋白机械牵引假说^[20-21]。

近期有报道 MG63 骨肉瘤细胞分泌到胞外的热休克蛋白 HSP90 β 会抑制潜在 TGF- $\beta 1$ 的激活^[22]。

2 TGF- β 受体及信号通路

TGF- β 受体的发现, 最早是通过将¹²⁵I- TGF- β 化学交联到细胞表面的结合蛋白, 再用凝胶电泳的方法分离交联上的配体受体复合物, 发现大多数细胞有 3 种膜表面的 TGF- β 结合蛋白, 根据电泳的迁移率命名为 I 型, II 型和 III 型^[23-24]。TGF- β I 型受体(TGF- β Receptor I, T β R I)和 II 型受体(TGF- β Receptor II, T β R II)主要介导 TGF- β 的信号转导, 这 2 种受体均为有单跨膜结构域的丝氨酸-苏氨酸激酶, 氨基酸序列具有相当大的同源性^[25]。一般 T β R I 比 T β R II 氨基酸序列要少。对人 T β R II 氨基酸分析表明含有一个信号肽、一个 136 个氨基酸的 N-糖基化的胞外结构域和一个主要是由激酶结构域组成的胞内结构域。2 种受体胞外部分含有多个半胱氨酸, 包括一个由 3 个半胱氨酸组成的半胱氨酸簇, 表明受体自身的折叠和与配体的结合需要有很多二硫键。T β R I 和 T β R II 均会形成同源二聚体, 该二聚体的形成不依赖于配体结合。T β R I 在激酶结构域之前有一个 SGSGSLP 的高度保守序列标签(GS 结构域)^[25]。T β R I 和 T β R II 示意图见图 2-a。从目前研究结果来看, 脊椎动物的 TGF- β 受体在结构上非常保守。

TGF- β III 型受体(TGF- β Receptor III, T β R III), 又称 β 蛋白聚糖, 在很多种类的细胞中都有表达, 是表达量最高的 TGF- β 受体。T β R III 也是跨膜受体, 但是缺少酶的基序, 不能直接与配体结合。因此认为 T β R III 在 TGF- β 信号中发挥间接功能^[25]。

成熟的 TGF- β 二聚体到达目标细胞表面时, 与 T β R II 同源二聚体结合, T β R II 激酶活性使其自身磷酸化, TGF- β -T β R II 复合物向 T β R I 二聚体靠近, 并磷酸化 T β R I 而激活其激酶活性。因此活化的配体受体复合物是一个异源的六聚体, 由 1 个 TGF- β 二聚体以及 T β R I 和 T β R II 各自的同源二聚体组成^[27]。随后 T β R I 磷酸化细胞内的 Smad 蛋白。脊椎动物 Smad 蛋白可以分为 3 个亚族: 受体活化型 Smad(R-Smad)、通用介导型 Smad 4(Co-Smad)和抑制型 Smad(I-Smad, Smad 6 和 Smad 7)^[28]。R-Smad 包括 BMP 活化型(Smad 1、Smad 5、Smad 8)和 TGF- β 活化型(Smad 2、Smad 3)。R-Smad 和 Co-Smad 是由 2 个 Mad 同源结构域(MH1 和 MH2)组成, 通过连接区连接(图 2-b)。I-Smad 没有明显的 MH1 结构域, 只有 MH2 结构域。非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)有 2 种 Smad 4, Smad 4 α 和 Smad 4 β , 由

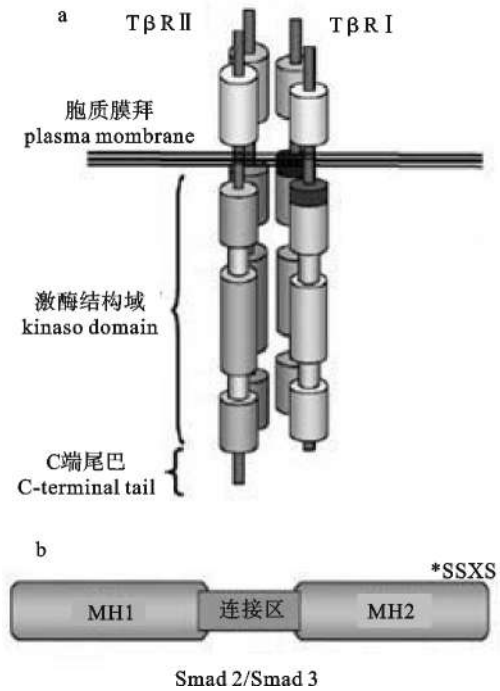


图2 T β RI/T β RII 四聚体示意图(a), R-Smad 2 和 R-Smad 3 结构示意图^[26], MH, Mad 同源结构域(b)

Fig. 2 Proposed basic tetrameric complex of T β RI/T β RII(a), basic schematic of R-Smad 2 and R-Smad 3 structure, MH, Mad Homology domain(b)

2 个基因编码。虽然 2 种 Smad 4 的氨基酸具有 80% 的同源性, 但是其发育表达模式、亚细胞定位(Smad 4 α 主要在细胞质中, Smad 4 β 主要在细胞核中)和磷酸化水平截然不同。非洲爪蟾 Smad 4 β 具有强的腹部形成诱导功能^[29]。T β R I 磷酸化激活后使 R-Smad C 端 SSXS 基序磷酸化, SSXS 基序在所有 R-Smad 中都是高度保守的, 随后 R-Smad 与 T β RI 分离, 与 Smad 4 形成复合物后进入细胞核, 再与一些转录因子结合激活基因的转录^[2]。尽管 Co-Smad 4 能够帮助 R-Smad 进入细胞核, 但是 R-Smad 在没有 Co-Smad 4 的情况下也能进入到细胞核^[20,30]。R-Smad 蛋白招募至受体复合物是由辅助蛋白介导的, 例如 Smad 锚向受体活化蛋白(SARA)^[31]。TGF- β 与受体结合后, Smad 2 和 Smad 3 被 T β R I 磷酸化激活, 再与 Smad 4 一起形成复合体进入细胞核, 作用于 Smad 结合元件(Smad Binding Elements, SBE)。I-Smad 抑制 TGF- β 信号通过以下几种途径: 1) 与 R-Smad 竞争结合 T β R I; 2) 招募 E3 泛素连接酶 Smurf 1/2 使 T β R I 泛素化而随之降解; 3) 与 Smad 4 作用, 阻止 R-Smad-Smad 4 复合物的形成; 4) 直接抑制 Smad 引起的转录应答^[20,31]。一种重要抑制 Smad 功能的方式是招募 Smad 协同抑制因子, 如 c-Ski 和 SnoN^[32-33]。

TGF- β 信号的负调控有如下几个方面: 1) 通过 Smurf 途径使 TGF- β 受体降解; 2) 抑制 TGF- β 受体的活性; 3) 通过磷酸酶终止 Smad 信号; 4) 通过 E3 泛素连接酶关闭 R-

Smad 和 Smad 4; 5) 隔离 Smad 使其不参与活化的信号通路; 6) 抑制 Smad 的转录活性; 7) Smad 转录后修饰之间的竞争以及稳定性和活力之间的相互作用^[31]。有些 TGF- β 的负调节因子, 如 I-Smad 和 SnoN 都是 TGF- β 直接作用的基因的基因。

TGF- β 除了能激活 Smad 依赖性通路外, 也可以激活其他一些 Smad 非依赖性信号通路。已经证明, TGF- β 刺激细胞后能快速激活 Ras-Erk、TAK-MKK4-JNK、TAK-MKK3/6-p38、Rho-Rac-cdc42 MAPK 和 PI3K-Akt 通路, 但是详细的机制目前并没有阐明^[20]。TGF- β 引起的 Erk 和 JNK 途径的激活可以导致 Smad 的磷酸化并调节 Smad 的激活。此外, TGF- β 引起的 Ras/Erk MAPK 通路的激活会刺激 TGF- β 的表达, 从而放大 TGF- β 的应答和导致二次 TGF- β 应答^[34]。TGF- β 在 CD4 + T 细胞中对 IFN- γ 引起的信号和 Th1 基因表达的抑制作用是 Smad 3 非依赖性的, 但是 MEK/ERK 依赖性的^[35]。最近又在小鼠 (*Mus musculus*) 中发现 TGF- β 诱导 IKK, p38 和 JNK 的激活需要 TAK1 赖氨酸 158 残基^[36]。

3 TGF- β 及其受体在鱼类中的研究进展

3.1 TGF- β 1 在鱼类中的研究进展

TGF- β 在鱼类中的研究还处于初步阶段, 但是最近几年有关的研究也逐步增多, 主要集中在 TGF- β 1。

3.1.1 与免疫和疾病相关 目前研究表明, TGF- β 1 与鱼类的免疫功能有着巨大的关系。ZHAN 等^[37]从鲤 (*Cyprinus carpio*) 活化的头肾淋巴细胞中克隆得到第一个鱼类的 TGF- β 1 基因, 其 ORF 编码 376 个氨基酸, 包括与其他 TGF- β 蛋白一样的保守半胱氨酸。鲤 TGF- β 1 在头肾、脾、卵和肝脏的表达量很少, 但是用伴刀豆球蛋白 A (Con A) 激活头肾淋巴细胞后 TGF- β 1 mRNA 水平会明显上升。HARMS 等^[38]从杂交狼鲈 (*Morone saxatilis* \times *M. chrysops*) 头肾单核细胞中克隆到 TGF- β 1 基因, 其 mRNA 表达水平在外周血单核细胞中比脾和头肾中要高, 初步显示 TGF- β 1 的功能与免疫机制相关。笔者实验室也发现用聚胞胞苷酸 (Poly I: C) 或 Con A 刺激斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 头肾淋巴细胞后, TGF- β 1 表达量明显上升, 与在其他鱼中具有相似性^[39]。YANG 等^[40]报道从草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 中克隆到 TGF- β 1 cDNA 全长, 组织分布表明 TGF- β 1 mRNA 主要在胸腺、头肾和脾中大量分布, 并发现重组人 TGF- β 1 蛋白能诱导外周血淋巴细胞 (PBL) 增殖, 但是也能显著抑制植物血凝素 (PHA) 和脂多糖 (LPS) 刺激的 PBL 增殖, 而且和脂多糖一样能显著上调草鱼 MHC I mRNA 表达。HADDAD 等^[41]从金鱼 (*Carassius auratus*) 中克隆到 TGF- β 1 cDNA 序列。重组表达的金鱼 TGF- β 1 成熟肽以剂量依存的方式促进金鱼成纤维细胞系 (CCL71) 的增殖。此外, 重组的金鱼 TGF- β 1 能够下调 TNF- α 活化的巨噬细胞一氧化氮应答。这是首次对硬骨鱼 TGF- β 1 功能的报道。

CAI 等^[42]报道真鲷 (*Pagrus major*) 的 TGF- β 1 在诱导淋巴细胞迁移中具有两极特性。重组真鲷 TGF- β 1 以剂量依赖的方式显著促进头肾和外周血淋巴细胞的迁移, 但又能够抑制由 LPS 激活的淋巴细胞迁移。这是首次在鱼类中报道 TGF- β 1 在调节鱼类免疫功能中具有天生的两极特性。最近, YANG 等^[43]又报道在草鱼白细胞中 TGF- β 1 表现出对立的效应。TGF- β 1 能持续刺激外周血白细胞的活力和促炎症因子 (TNF- α 和 IFN- γ) 与 T/B 细胞标签 [Cd4-like (Cd41), Cd8 α , Cd8 β 和 Ig μ] 的产生, 但是在头肾白细胞中却相反。并表明 TGF- β 1 可能通过下调 ALK5 mRNA 和蛋白水平, 使草鱼白细胞对 TGF- β 1 的敏感性下降。再次证明在硬骨鱼免疫功能中 TGF- β 1 发挥正调控和负调控双功能。

除了从理论上研究 TGF- β 1 与免疫功能相关, 有直接的研究表明 TGF- β 1 与鱼类疾病有关。HARMS 等^[44]报道, 用海鱼杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 感染条纹狼鲈 (*M. saxatilis*), 其脾单核细胞 TGF- β 1 mRNA 表达比未感染组要低, 但是感染的杂交罗非鱼 (*Oreochromis spp.*) 和未感染鱼之间没有明显的变化。JOHNSON 等^[45]报道给大西洋油鲱 (*Brevoortia tyrannus*) 体腔注射去炎松导致其脾单核细胞 TGF- β 1 mRNA 水平受到抑制, 提示可能与大西洋油鲱发育过程中溃疡性皮肤病损害的机制有关。LILLEENG 等^[46]报道在用大豆粉饲养大西洋鲑 (*Salmo salar*) 时 TGF- β 1 明显下调, 提示有可能和大西洋鲑大豆肠病的发病机理有关。已经报道用来源于欧鲶 (*Silurus glanis*) 和褐篮子鱼 (*Siganus fuscus*) 的虹彩病毒 (family Iridoviridae) 刺激鱼的上皮瘤细胞后, 引起 TGF- β 1 短暂上升^[47]; 嗜冷黄杆菌感染 (*Flavobacterium psychrophilum*) 的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 脾脏 TGF- β 1 下调, 表明染病的鱼免疫系统变弱^[48]。最近又发现 TGF- β 与藻毒素引起的免疫毒性效应有关, 草鱼血和头肾淋巴细胞在藻毒素刺激后, TGF- β 1 mRNA 水平会上升^[49]。这些证据表明很多鱼类在受到病害侵袭时, TGF- β 1 的表达水平都会有所变化, 但是 TGF- β 1 具体是如何参与到疾病的过程中, 目前还没有阐明。

3.1.2 与生殖相关 TGF- β 1 除了与免疫和疾病相关之外, 另一个主要功能是与生殖相关。KOULI 等^[50]从斑马鱼 (*Danio rerio*) 的卵巢中克隆到 TGF- β 1 的 cDNA 序列, TGF- β 1 成熟肽区域与其他物种的相似度达到 70% ~ 85%。并发现 TGF- β 1 能以剂量依赖和时间依赖的方式显著抑制促性腺激素和 17 α , 20 β -二羟孕酮诱导的卵母细胞成熟, 首次在鱼类中证明 TGF- β 1 能调节卵母细胞的成熟。同时证明, TGF- β /Smad 信号通路在斑马鱼卵巢中存在。TAN 等^[51]报道 TGF- β 1 能够抑制膜黄体酮受体 [membrane progesterin receptors (mPRs)] β , 而不能抑制受体 α , 以此来调节卵母细胞的成熟。JIN 等^[52]报道在斑马鱼卵母细胞中 TGF- β 信号需要依赖动力蛋白轻链 *zkm23*。研究 TGF- β 1 在生殖中的作用对鱼类的繁殖育种有着重大意义。

3.1.3 与肝脏功能相关 最近, HOBIE 等^[53]报道二甲基亚硝铵处理的青鳉(*Oryzias latipes*), 肝脏 TGF- β 1 表达升高, 并且随着二甲基亚硝铵处理浓度的升高, 胆囊上皮细胞、中间细胞、不成熟肝细胞和少量的成熟肝细胞中 TGF- β 1 蛋白水平上升, 显示 TGF- β 1 与肝功能有关。

3.1.4 TGF- β 1 序列特点 从已经克隆到的鱼类 TGF- β 1cDNA 序列分析发现, 序列具有很高的保守性, 与其他脊椎动物相似。它们均具有保守的 9 个半胱氨酸(草鱼和鲤在第 7 个保守半胱氨酸位点处被精氨酸代替), 这也是 TGF- β 成员的一个标志性特征。其中的 8 个半胱氨酸以成对的方式形成分子中心区的 4 对链内二硫键, 结合第 9 个半胱氨酸形成链间二硫键, 一起形成 TGF- β 二聚体。前体肽均具有特征性标志成熟肽起始的 KEX-Furin 样蛋白酶识别位点 RXXR。并且都具有整合素结合位点 RGD, RGD 能够与整合素特异结合, 例如能够与 α v β 6 特异结合, 从而使潜活型的 TGF- β 1 活化^[15]。而在大海马(*Hippocampus kuda*)TGF- β 1 序列中则由 RSD 取代了 RGD^[54], 其中丝氨酸和甘氨酸具有相似的物理性质, 都为亲水性的中性氨基酸, 但转换的具体原因还不清楚。

3.2 TGF- β 其他成员在鱼类中的研究进展

TGF- β 家族的成员除了 TGF- β 1, 常见的还有 TGF- β 2 和 TGF- β 3。SUMATHY 等^[55]第一次从鲤中克隆得到 TGF- β 2 基因, 根据推测的氨基端列与人的 TGF- β 2 基因比对, 显示鲤 TGF- β 2 前体蛋白和成熟蛋白与人的 TGF- β 2 的前体蛋白和成熟蛋白相似度分别为 81% 和 93%。LAING 等^[56]从钝吻鲟(*Acipenser baeri*)、虹鳟和欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中克隆到部分核苷酸序列, 证明 TGF- β 3 在辐鳍亚纲的硬骨鱼中存在。LAING 等^[57]进一步在鳎(*Pleuronectes platessa*)中证明同时存在多种 TGF- β 基因。CHEAH 等^[58]报道在斑马鱼中克隆到 TGF- β 3 cDNA 全长, 显示该基因是由 7 个外显子组成, 定位在 14q24 号染色体连锁群 17 的一部分。在转录起始位点的上游具有 1 个刺激蛋白 1 [Stimulating protein 1 (Sp1)] 和 2 个 TATA 结合蛋白(TBP)的结合位点。TGF- β 3 在发育的胸鳍中大量表达, 而没有在哺乳动物前肢中有类似的报道, 表明 TGF- β 3 在鱼类早期发育中具有新的功能。FUNKENSTEIN 等^[59]报道在金鲷(*Sparus aurata*)中发现一种新的 TGF- β , 其基因由 7 个外显子组成, 预测编码 420 个氨基酸。基因组成与小鼠和鸡的 TGF- β 2 相似, 但氨基酸比对发现是一种新的在鱼类中特有的 TGF- β , 命名为 TGF- β 6, 并发现 TGF- β 6 能通过营养水平调节骨骼肌生长。目前还没有在其他脊椎动物中有关于 TGF- β 6 的报道。

3.3 TGF- β 受体在鱼类中的研究进展

对于鱼类 TGF- β 受体的研究还很少。最早是 KOHLI 等^[50]在斑马鱼卵巢中克隆到 TGF- β 1 的同时也克隆出 T β R II 的 cDNA 序列, 这是第一次在鱼类中报道的 T β R II, 其激酶结构域与其他物种高度保守。MAEHR 等^[60]报道在虹

鳟中克隆到 2 种 TGF- β 受体(T β R I 和 T β R II)。从得到的虹鳟 T β R I 和 T β R II 序列发现, 其具备 T β R I 和 T β R II 受体家族的所有特点, 包括 1 个富含半胱氨酸的胞外结构域、1 个跨膜结构域和 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, 并且激酶结构域高度保守。组织分布显示 T β R I 在胸腺和脾脏高表达; T β R II 在皮肤、胸腺和后肾中高表达, 表明 2 种受体与免疫功能相关。同时 2 种受体在肌肉中都有很高表达, 说明其与生长发育有关。同时, 研究了各种刺激剂(LPS、Poly I; C、PHA、PMA、CI)刺激头肾淋巴细胞后对 2 种受体 mRNA 水平的影响, 显示 PHA、PMA、CI 能下调 2 种受体的表达, 首次深入了解 2 种受体在鱼类免疫过程中的调节情况。但是对 TGF- β 受体在鱼类中的研究还有待进一步深入。

4 小结

TGF- β 是一类非常重要的细胞因子, 在脊椎动物的多种生理活动中都有所涉及。每年在哺乳动物中关于 TGF- β 系统相关的研究数以百计, 其重要性可见一斑。而目前在硬骨鱼中对 TGF- β 通路的研究还处于初级阶段, 其中大部分的研究都集中在 TGF- β 家族中的成员 TGF- β 1。对 TGF- β 1 的研究主要集中在免疫疾病和生殖方面, 最近也有涉及肝脏方面, 而对 TGF- β 家族其他成员的研究较少。到目前为止, 对于 TGF- β 受体在硬骨鱼中的研究只有在斑马鱼和虹鳟中有过报道。

由于进化过程中基因组复制的原因, 鱼类中很多基因的拷贝数不同于哺乳动物。笔者实验室在尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)中分离出 2 种 TGF- β 2 和 2 种 TGF- β 3, 并且在功能上也有差异(待发表)。因此, 硬骨鱼中 TGF- β 系统还有很多是没有涉及到的, 有待进一步研究。

由于 TGF- β 系统的重要性, 未来在硬骨鱼中的研究, 应该在理论研究的同时, 紧密联系实际生产, 向着抗病、促生长和繁殖育种等方向发展。

参考文献:

- [1] GU J, GU X. Evolutionary analysis of functional divergence in TGF- β signaling pathway[J]. Inf Sci, 2002, 145(3/4): 195 - 204.
- [2] CHIN D, BOYLE G M, PARSONS P G, et al. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? [J]. Br J Plast Surg, 2004, 57(3): 215 - 221.
- [3] DOBACZEWSKI M, CHEN W, FRANGOGIANNIS N G. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4): 600 - 606.
- [4] WALSH T E. TGF-beta and microvessel homeostasis[J]. Microvasc Res, 2010, 80(1): 166 - 173.
- [5] ARJAANS M, OUDE M T, TIMMER-BOSSCHA H, et al. Transforming growth factor (TGF)-beta expression and activation mechanisms as potential targets for anti-tumor therapy and tumor imaging

- [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 135(2): 123–132.
- [9] FROLIK C A, DART L L, MEYERS C A, et al. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(12): 3676–3680.
- [7] LI M O, SANJABI S, FLAVELL R A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 455–471.
- [8] BURT D W, LAW A S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily[J]. *Prog Growth Factor Res*, 1994, 5(1): 99–118.
- [9] O'REILLY M A, GEISER A G, KIM S J, et al. Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(28): 19938–19943.
- [10] BIRCHENALL-ROBERTS M C, RUSCETTI F W, KASPER J, et al. Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(9): 4978–4983.
- [11] GOVINDEN R, BHOOLA K D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta[J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 98(2): 257–265.
- [12] DUBOIS C M, LAPRISE M H, BLANCHETTE F, et al. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(18): 10618–10624.
- [13] OLSEN B R. Morphogenesis: collagen it takes and bone it makes [J]. *Curr Biol*, 1996, 6(6): 645–647.
- [14] MUNGER J S, HARPEL J G, GLEIZES P E, et al. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation [J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1376–1382.
- [15] ANNES J P, MUNGER J S, RIFKIN D B. Making sense of latent TGF-beta activation[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 2): 217–224.
- [16] KOVACINA K S, STEELE-PERKINS G, PURCHIO A F, et al. Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor-beta 1 precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 160(1): 393–403.
- [17] SAHARINEN J, TAIPALE J, KESKI-OJA J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1 [J]. *EMBO J*, 1996, 15(2): 245–253.
- [18] TAIPALE J, MIYAZONO K, HELDIN C H, et al. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(1/2): 171–181.
- [19] MURPHY-ULLRICH J E, POZATEK M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11(1/2): 59–69.
- [20] LI M O, WAN Y Y, SANJABI S, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 99–146.
- [21] ANNES J P, CHEN Y, MUNGER J S, et al. Integrin α V β 6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1 [J]. *J Cell Biol*, 2004, 165(5): 723–734.
- [22] SUZUKI S, KULKARNI A B. Extracellular heat shock protein HSP90 beta secreted by MG63 osteosarcoma cells inhibits activation of latent TGF-beta1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(3): 525–531.
- [23] CHEIFETZ S, WEATHERBEE J A, TSANG M L, et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors[J]. *Cell*, 1987, 48(3): 409–415.
- [24] CHEIFETZ S, LIKE B, MASSAGUE J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(21): 9972–9978.
- [25] DERYNCK R, FENG X H. TGF-beta receptor signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1333(2): F105–F150.
- [26] RUNYAN C E, PONCELET A C, SCHNAPER H W. TGF-beta receptor-binding proteins: complex interactions[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(12): 2077–2088.
- [27] ZI Z, CHAPNICK D A, LIU X. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(14): 1921–1928.
- [28] HELDIN C H, MIYAZONO K, TEN D P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. *Nature*, 1997, 390(6659): 465–471.
- [29] MASUYAMA N, HANAFUSA H, KUSAKABE M, et al. Identification of two Smad4 proteins in *Xenopus*. Their common and distinct properties[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 12163–12170.
- [30] LUTZ M, KNAUS P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(12): 977–988.
- [31] ITOH S, TEN D P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 176–184.
- [32] DEHEUNINCK J, LUO K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling[J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 47–57.
- [33] LUO K. Ski and SnoN; negative regulators of TGF-beta signaling [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 65–70.
- [34] DERYNCK R, ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577–584.
- [35] PARK I K, LETTERIO J J, GORHAM J D. TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(13): 3283–3290.

- [36] MAO R, FAN Y, MOU Y, et al. TAK1 lysine 158 is required for TGF-beta-induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation[J]. Cell Signal, 2011, 23(1): 222–227.
- [37] ZHAN Y, JIMMY K. Molecular isolation and characterisation of carp transforming growth factor beta 1 from activated leucocytes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(4): 309–318.
- [38] 平海林, 吴金英, 徐胜威, 等. 斜带石斑鱼转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 基因的克隆及表达分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(1): 92–98.
- [39] HARMS C A, KENNEDY-STOSKOPF S, HORNE W A, et al. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* \times *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(1): 61–85.
- [40] YANG M, ZHOU H. Grass carp transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1): molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes[J]. Mol Immunol, 2008, 45(6): 1792–1798.
- [41] HADDAD G, HANINGTON P C, WILSON E C, et al. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta [J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(6): 654–663.
- [42] CAI Z, GAO C, LI L, et al. Bipolar properties of red seabream (*Pagrus major*) transforming growth factor-beta in induction of the leucocytes migration [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(4): 695–700.
- [43] YANG M, WANG X, CHEN D, et al. TGF-beta1 exerts opposing effects on grass carp leukocytes: implication in teleost immunity, receptor signaling and potential self-regulatory mechanisms [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35011.
- [44] HARMS C A, HOWARD K E, WOLF J C, et al. Transforming growth factor-beta response to mycobacterial infection in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2003, 95(3/4): 155–163.
- [45] JOHNSON A K, HARMS C A, LEVINE J F, et al. A quantitative real-time RT-PCR assay to measure TGF-beta mRNA and its correlation with hematologic, plasma chemistry and organo-somatic indices responses in triamcinolone-treated Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus* [J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(5): 473–484.
- [46] LILLEENG E, PENN M H, HAUGLAND O, et al. Decreased expression of TGF-beta, GILT and T-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(1): 65–72.
- [47] HOLOPAINEN R, TAPIOVAARA H, HONKANEN J. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(6): 1095–1105.
- [48] ORIEUX N, DOUET D G, Le HENAFF M, et al. Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: characterization of metallothionein A and interleukin1-beta genes as markers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish[J]. Vet Microbiol, 2013, 162(1): 127–135.
- [49] RYMUSZKA A, ADASZEK L. Pro- and anti-inflammatory cytokine expression in carp blood and head kidney leukocytes exposed to cyanotoxin stress—an in vitro study[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(2): 382–388.
- [50] KOHLI G, HU S, CLELLAND E, et al. Cloning of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta 1 in oocyte maturation[J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 1931–1941.
- [51] TAN Q, ZAGRODNY A, BERNAUDO S, et al. Regulation of membrane progesterin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, activin, TGF-beta and BMP-15[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 312(1/2): 72–79.
- [52] JIN Q, GAO G, MULDER K M. Requirement of a dynein light chain in transforming growth factor beta signaling in zebrafish ovarian follicle cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(1): 233–240.
- [53] HOBBIE K R, DEANGELO A B, GEORGE M H, et al. Neoplastic and nonneoplastic liver lesions induced by dimethylnitrosamine in Japanese medaka fish[J]. Vet Pathol, 2012, 49(2): 372–385.
- [54] 平海林, 吴金英, 徐胜威, 等. 大海马转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 基因的克隆鉴定及功能研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1021–1031.
- [55] SUMATHY K, DESAI K V, KONDAIAH P. Isolation of transforming growth factor-beta2 cDNA from a fish, *Cyprinus carpio* by RT-PCR[J]. Gene, 1997, 191(1): 103–107.
- [56] LAING K J, PILSTROM L, CUNNINGHAM C, et al. TGF-beta3 exists in bony fish[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72(1/2): 45–53.
- [57] LAING K J, CUNNINGHAM C, SECOMBES C J. Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(3): 261–271.
- [58] CHEAH F S, JABS E W, CHONG S S. Genomic, cDNA, and embryonic expression analysis of zebrafish transforming growth factor beta 3 (TGF-beta3)[J]. Dev Dyn, 2005, 232(4): 1021–1030.
- [59] FUNKENSTEIN B, OLEKH E, JAKOWLEW S B. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta6) gene in fish: regulation in skeletal muscle by nutritional state[J]. BMC Mol Biol, 2010, 11: 37.
- [60] MAEHR T, WANG T, GONZALEZ V J, et al. Cloning and expression analysis of the transforming growth factor-beta receptors type 1 and 2 in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dev Comp Immunol, 2012, 37(1): 115–126.