

released from transferrin? Some relevant hypotheses including membrane iron channel, iron carrier-mediated transport, the involvement of H⁺-ATPase, MIP system and function of free radical reactions in the process are discussed.

Finally, some important aspects for further investigation are suggested.

Key words reticulocyte, endosome, membrane iron carrier, transferrin-bound iron, non-transferrin-bound iron, H⁺-ATPase, free radical

白介素 6 的信号转导及其相关疾病的治疗策略

段聚宝 王嘉玺

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 IL-6 是一种多功能的细胞因子, 同时 IL-6 的过度表达与一些疾病的发生和发展有密切关系. IL-6 通过一个双链受体系统作用于靶细胞. 实验结果表明, IL-6 与 80 ku 的配基结合链 IL-6R 和信号转导子 gp130 构成一个相互作用的异六聚体模式, 通过 gp130 的二聚体化引发胞内的信号转导. IL-6 胞内的信号转导途径有两种: Jak-STATs 路径和 Ras-MAPK 级联反应路径. 靶向 IL-6 信号转导的药物设计和筛选研究将为 IL-6 相关疾病的治疗奠定坚实的基础.

关键词 白介素 6, 信号转导, IL-6 相关疾病

IL-6 是一种多功能的细胞因子, 在对某些疾病具有潜在治疗价值的同时也与一些疾病的发生和发展有密切关系^[1]. 这些 IL-6 相关疾病往往由于 IL-6 的过高表达导致的细胞生长和分化异常所引起, 而这与 IL-6 的信号转导是密不可分的. 目前, 靶向细胞因子信号转导的药物设计已为包括肿瘤在内的许多疾病的治疗提供了有力措施^[2], 因而探索 IL-6 的信号转导并在此基础上开展靶向 IL-6 信号转导的药物设计研究对于 IL-6 相关疾病的治疗具有重要意义. 本文拟对 IL-6 双链受体系统所介导的信号转导模式作一阐述, 并以其为靶子探讨 IL-6 相关疾病的治疗策略.

1 IL-6 的双链受体系统

IL-6 的双链受体系统包括 80 ku 的配基结合链 IL-6R 和作为信号转导子的非配基结合链 gp130. IL-6R 和 gp130 都属于造血生长因子受体家族, 胞外都有细胞因子结合区 (CBD). CBD 由两个纤维结合素 III 型组件 (各约 100

个氨基酸) 组成, 含有 4 个保守的半胱氨酸残基和 WSXWS 主型框架. IL-6R 的胞外有两个纤维结合素 III 型组件, 而 gp130 则有 6 个. IL-6R 胞外的 Ig 样区不是功能性 IL-6R 所必需, 缺失 Ig 样区的可溶性 IL-6R (sIL-6R) 仍可与 IL-6 结合并与 gp130 相互作用^[3]. IL-6R 的胞内区不具有酪氨酸激酶活性, 不能承担信号转导的功能, 从而决定了 sIL-6R 不同于一般可溶性受体, 它作为 IL-6 的激动剂起作用. 关于 IL-6 受体系统的详细分子特征见有关综述^[4].

2 IL-6 的信号转导

IL-6 的信号转导包括两个方面, 即胞外事件和胞内事件. 胞外事件指双链膜受体系统与 IL-6 之间的相互作用, 而胞内事件则指胞内信号产生、激活和传递途径.

2.1 胞外相互作用模式

IL-6 与靶细胞上的双链膜受体系统相互

作用是 IL-6 信号转导的第一个环节. 最初认为 IL-6 只能与 IL-6R 相互作用, IL-6 与 IL-6R 形成的复合物与 gp130 相互作用引起胞内的信号转导. 后来证明 IL-6 可以与 gp130 直接相互作用^[5], 也就是说 IL-6 与 IL-6R 和 gp130 之间均存在相互作用的界面. 由于 IL-6-IL-6R-gp130 复合物还没有被结晶, 因而它们相互作用的复合物的真实结构也不得而知. 根据 GH (生长激素) 与 IL-6、GHR (生长激素受体) 与 IL-6R 之间的序列和结构类似性, 人们以已知晶体结构的 GH-GHR 复合物为模板, 通过计算机辅助设计模拟了 IL-6-IL-6R-gp130 相互作用的三维模式^[6]. 与 GHR 复合物类似, IL-6 受体复合物被认为是由一个 IL-6 分子与 IL-6R 和 gp130 的细胞因子结合域桥连起来的异三聚体 (如图 1). IL-6 与 IL-6R 相互作用的界面由 IL-6 的 D 螺旋和 AB 环中的残

基组成 (位点 1). 与 gp130 的界面由 A、C 螺旋中的残基组成 (位点 2), 而 gp130 与 IL-6R 的细胞因子结合域的 E2 片层和 AB2 环中的残基则形成第三个界面. 这个模式已为 IL-6 和 IL-6R 的突变实验所证实^[7,8]. 但这个模式不能解释这样一个事实, 即引起 IL-6 胞内信号级联反应的关键——gp130 的二聚体化^[9]. 此外, 最近所构建的 IL-6 受体拮抗剂也对上述模式提出了问题, 因为对 IL-6 的螺旋始端和 AB 环中的残基 (称之为位点 3) 进行突变后, 突变体仍能与 IL-6R 结合, 但激活 gp130 的能力减弱了^[10]. 这说明除了异三聚体模式所描述的 IL-6 位点 1 和位点 2 外, 还可能有位点 3 与 gp130 形成相互作用的界面. 这些都体现了 IL-6R 系统作为一个特殊的受体系统其信号转导模式的复杂性.

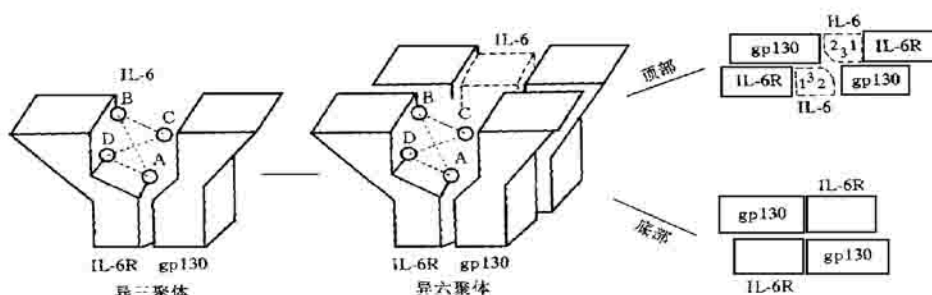


图 1 白介素 6 受体复合物模式图

A、B、C、D 代表 IL-6 的螺旋结构; 1、2、3 是 IL-6 与 IL-6R 和 gp130 的作用位点.

为了进一步认识 IL-6 信号转导胞外各组分相互作用模式, Paonessa 等^[11]在实验基础上提出了异六聚体复合物模式, 如图 1 所示. 他们将位点 2 和位点 3 突变的 IL-6 与 IL-6R 和 gp130 进行体外组装, 发现这些突变体与 IL-6R 有正常的亲和力, 但只能结合一个 gp130 分子, 而不能使其二聚体化. 所以 gp130 是通过与 IL-6 上两个不同的位点相互作用而实现二聚体化的. 进一步的免疫沉淀实验表明, 一个完整的装配好的 IL-6R 复合物是由两个 IL-

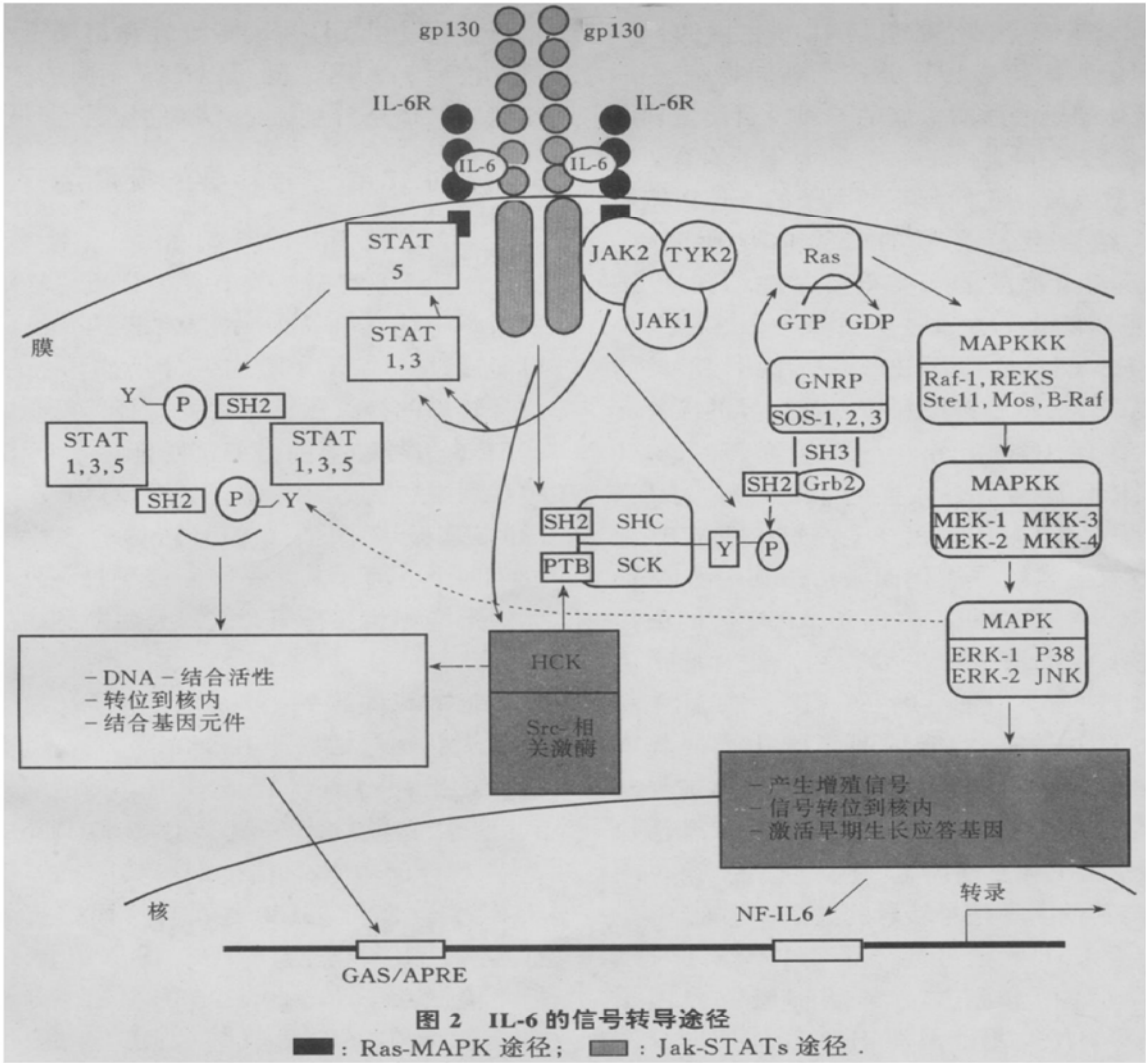
6 分子、两个 IL-6R 和两个 gp130 分子组成的六聚体复合物. Ward 等^[12]也报道了纯化的 IL-6-IL-6R-gp130 复合物的分子质量对应于 2:2:2 摩尔比所形成的六聚物. 这也支持了 IL-6 受体异六聚体复合物模式. 在这个模式中, IL-6 的位点 2 与 IL-6R 的 280/281 位残基所形成的突出部位指向同一个 gp130 而形成组合位点, 而另一个组合位点则由 IL-6 的位点 3 和 IL-6R 的一个未确定部分组成. 任何一个组合位点中 IL-6 或 IL-6R 的改变均能引起与其

相对的 gp130 结合力的丧失或减弱。这样, gp130 至少有两个与 IL-6 作用的位点和两个与 IL-6R 结合的位点, 而 gp130 胞外区的突变研究将有助于揭示这个推测。gp130 之间或 IL-6R 之间的二聚体化的界面则可能位于 CBD 区的第二个亚功能区的底部。这个异六聚体模式能更好地解释一些实验现象, 也揭示了 IL-6 受体拮抗剂拮抗作用的可能机理, 即它们不是影响了 IL-6R 和 gp130 的相互作用, 而是只能结合一个 gp130 分子却不能使其二聚体化,

从而导致信号转导能力的丧失。

2.2 胞内信号转导途径

胞外 IL-6 异六聚体复合物的形成包括 gp130 的二聚体化引起 gp130 胞内部分的酪氨酸磷酸化, 继而引发由胞内和核内许多因子参与的信号转导。对 IL-6 引起急性期蛋白基因转录的研究表明主要有两种胞内信号转导途径即 Ras-MAPK (丝裂原激活的蛋白激酶) 级联反应途径和 Jak-STAT (信号转导和转录激活子) 途径, (图 2)。



Ras-MAPK 途径的关键环节是 Grb2 与 SOS 蛋白通过 SH3 (Src 同源区 3) 之间的相

互作用激活 Ras, 从而引发 MAPK 的磷酸化级联反应。这与 EGF (表皮生长因子) 等生

长因子和激素的酪氨酸激酶活性受体所介导的胞内信号转导途径类似^[2]。Ras-MAPK 途径的早期信号是 Jak、酪氨酸激酶活性因子和 Src 相关激酶引起的磷酸化, 而此途径的靶子是核因子 NF-IL6。NF-IL6 最初被确定为 IL-6 基因中 IL-1 应答元件结合的一个核因子, 现在认为它还与多种急性期蛋白基因启动子中的应答元件结合。这些基因与急性期反应、免疫应答、感染应答有重要关系。NF-IL6 属转录因子中亮氨酸拉链家族, 可被 MAPK 在苏氨酸上磷酸化而激活, 与 DNA 结合激活转录^[13]。

Jak-STATs 途径是包括 IL-6 在内的许多细胞因子胞内信号转导的一个共同途径。Jak 是非受体酪氨酸激酶家族的一员, 目前发现有 Jak1、Jak2、Jak3 和 Tyk2, 每个分子均有 2 个酪氨酸激酶域。它们与不同因子的受体以特异的方式结合且被受体的二聚体化所激活。STAT 是 Jak 激酶的一类重要底物, STAT 被 Jak 激酶磷酸化后, 通过与另外一个 STAT 分子的 SH2 (Src 同源区 2) 相互作用, 形成同聚或异聚体, 然后转位到核内与特异的应答元件结合。就 IL-6 信号转导系统而言, gp130 的二聚体化激活与之相连的 Jak 激酶 (Jak1、Jak2 和 Tyk2), 然后 STAT1、STAT3 和 STAT5 被酪氨酸磷酸化而激活, 其中 STAT3 (又称 P89 或急性期应答因子 APRF) 的激活似乎在某些组织中占主导作用, 且对低剂量 IL-6 敏感^[14, 15]。激活的 STAT1、STAT3 和 STAT5 通过 SH2 功能域的磷酸化形成具有 DNA 结合能力和转位能力的同二聚体或异二聚体^[16], 进入核内与 GAS (γ -干扰素激活位点) 或 APRE (急性期蛋白应答元件) 结合。

2.3 与其他因子信号转导的关系

由于 IL-6 的信号转导子 gp130 为多种细胞因子 (如白介素 11、睫状神经营养因子 CNTF 等) 所共用, 因而 IL-6 受体所介导的信号转导模式可能具有一定的代表性。这表现在胞外异六聚体复合物的形成和胞内 Jak-STAT 信号转导途径上^[11, 15]。白介素 12 (IL-12) 的 40 ku 亚基与 IL-6R 同源, 35 ku 亚基

与 IL-6 同源, 它也能与其受体亚基 IL-12R (与 gp130 高度同源) 形成 2+2 受体复合物^[17], 相当于 IL-6 受体系统的异六聚体复合物。正是这种信号转导模式的类似决定了 IL-6 与其他细胞因子的功能相似性。但 IL-6 作为一种多功能的细胞因子其特异性又体现在哪里呢? 首先是受体介导的特异性。两个不同的配基尽管可以激活同样的 STAT, 但激活的程度和动力学特征均有差异, 而且 IL-6 还可以激活其他的信号转导途径如 Ras-MAPK 途径, 这些途径之间也有交互作用 (图 2)。其次是 STAT 蛋白相互作用的特异性和启动子水平的特异性。STATs 之间可以形成不同的二聚体, 这些二聚体可分别激活不同的应答元件^[18]。

3 靶向 IL-6 信号转导的疾病治疗策略

在 IL-6 相关疾病如多发性骨髓瘤 (MM)、肾细胞癌、关节炎、骨质疏松症等病变组织中均存在 IL-6 的异常表达^[11], 而且很可能通过一个自分泌或旁分泌作用导致 IL-6 信号转导的持续激活。因而, 任何能阻断或干扰 IL-6 信号转导的措施都可能在治疗 IL-6 相关疾病中得到应用。基于我们对 IL-6 信号转导的认识, 靶向 IL-6 信号转导的治疗策略不外乎两个方面, 其一是阻断或干扰胞外异六聚体的形成和相互作用; 其二是阻断胞内的信号转导路径。

目前靶向胞外 IL-6 和受体复合物的研究较多, 主要包括以下几个方面: a. 利用生长因子或化合物调节 IL-6 或 IL-6R 的表达; 或利用反义核酸技术来调节 IL-6 和 IL-6R 的表达^[19, 20]。b. 抗体与拮抗剂: 其中抗体包括抗 IL-6、IL-6R 和 gp130 的抗体, 而拮抗剂则包括三种, 其一是能同 IL-6 竞争结合 IL-6R, 但不能激活 gp130 的 IL-6 的突变体分子; 其二是能同 IL-6R 竞争结合 IL-6, 但不能同 gp130 相互作用的 sIL-6R 的突变体分子; 再者是可溶性 gp130 分子。它们的基本原理都是干扰或阻遏胞外异六聚体复合物的形成。一般对于细胞因子来说, 其相应的抗体或可溶性受体

都可作为 CBP (细胞因子结合蛋白) 而拮抗因子的作用^[21]; 但对 IL-6 来说则不同, sIL-6R 由于其自身结构的特殊性只能作为 IL-6 的激动剂. 而 sIL-6R 的突变体分子则可能作为 CBP 分子拮抗 IL-6 的作用. 拮抗剂相对于抗体来说, 其优点是 与 IL-6 形成的复合物较小, 宜于从体内清除, 但与 IL-6 的亲和力一般不如抗体. 因而, 有待于构建与 IL-6 具高亲和力的 sIL-6R 的突变体分子作为 IL-6 的拮抗剂以用于临床治疗. 为此, 我们已构建了 sIL-6R 双突变体分子 C277D/H280I, 并在大肠杆菌和昆虫细胞中实现了功能性表达 (另文发表). 由于 gp130 分子为许多细胞因子受体系统所共有, 因而可溶性 gp130 (sgp130) 拮抗作用的特异性是一个值得考虑的问题. 总之, 对 IL-6、IL-6R 和 gp130 结构与功能的研究将有助于构建并筛选出有效的 IL-6 的拮抗剂.

此外, 针对胞内信号转导途径的治疗研究也有了很大进展. 1995 年 8 月在美国旧金山信号转导治疗会议上, 许多学者报道了靶向 Jak-STAT 和靶向 MAPK 的药物开发以及抗-Ras 疗法等方面的进展. 但是必须认识到每种策略和方法都有其自身的优势和不足. 针对因子或受体的抑制因子, 不需要进入细胞, 特异性较强; 而靶向信号转导下游的因子则可以阻遏多种因素引发的信号转导. 相信随着我们对 IL-6R 系统结构和功能研究的不断深入和对 IL-6R 所介导的信号转导途径的进一步认识, 靶向 IL-6 信号转导的疾病治疗必将呈现一个新的局面.

参 考 文 献

1 Hirano T, Akira S, Taga T *et al.* Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today*, 1990, **11** (12): 443~ 449

2 Langdon S P, Smith J F. Inhibition of cell signalling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 1995, **21**: 65~ 89

3 Duan J B, Wang J X, Han J H *et al.* Cloning, expression and purification of ligand-binding region of human IL-6R in *E. coli* and its preliminary functional identification. *Science in China, Series B*, 1995, **38** (11): 1321~ 1331

4 Taga T, Kishimoto T. Role of a two chain IL-6 receptor

system in immune and hematopoietic cell regulation. *Critical Reviews in Immunology*, 1992, **11** (5): 265~ 280

5 D'Alessandro F, Colamonici O R, Nordan R P *et al.* Direct association of IL-6 with a 130-kDa component of the IL-6 receptor system. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 2194~ 2153

6 Lahm A. The molecular design of human IL-6 receptor antagonists. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 762

7 Savino R, Lahm A, Salvati A L *et al.* Generation of IL-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J*, 1994, **13**: 1357~ 1367

8 Savino R, Ciapponi L, Lahm A *et al.* Rational design of a receptor super antagonist of human interleukin 6. *EMBO J*, 1994, **13**: 5863~ 5870

9 Murakami M, Hibi M, Nakagawa N *et al.* IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 1993, **260**: 1808~ 1810

10 Brakenhoff J P J, de Hon F D, Fontaine V *et al.* Development of a human interleukin 6 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 86~ 93

11 Paonessa G, Graziani R, Deserio A *et al.* Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling. *EMBO J*, 1995, **14**: 1942~ 1951

12 Ward L D, Howlett G J, Discolo G *et al.* High affinity IL-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of IL-6, IL-6R, and gp130. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 23286~ 23289

13 Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T *et al.* Phosphorylation at threonine 235 by a ras dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 2207~ 2211

14 Luticken C, Wegenk U M, Yuan J *et al.* Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak 1 with IL-6 signal transducer gp130. *Science*, 1994, **263**: 89~ 92

15 Stahl N, Boulton T G, Farruggella T *et al.* Association and activation of Jak-Tyk kinase by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science*, 1994, **263**: 92~ 95

16 Rothman P, Kreider B, Levy D *et al.* Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors. *Immunity*, 1994, **1**: 457~ 468

17 Chua A O. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*, 1994, **153**: 128~ 136

18 Schindler C. Cytokine signal transduction. *Receptor*, 1995, **5**: 51~ 62

19 Lu C, Kerbel R S. IL-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor or autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol*, 1993, **120**: 1281~ 1287

- 20 Keller E T, Ershler W B. Effects of IL-6 receptor antisense oligodeoxynucleotides on *in vitro* proliferation of myeloma cells. J Immunol, 1995, **154**: 4091~ 4098
- 21 Klein B, Brailly H. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. Immunology Today, 1995, **16**: 216~ 220

Interleukin 6 Signal Transduction and the Strategies in Treatment for IL-6-related Diseases. DUAN Jubao, WANG Jiaxi (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Interleukin 6 is a multiple function cytokine, playing an important role in modulating immune response, hematopoeisis, acute phase reaction and so on. On the other hand, over-expression of IL-6 relates to the pathogenesis and development of many kinds of diseases. IL-6 exerts its effect on the target cell through a two-chain receptor system, one is the ligand-binding chain (IL-6R) and the other is the signal transducer gp130. IL-6, IL-6R and gp130

interact through a heterohaxmer module, sequentially triggers the signal transduction within the cell. There exist two signal transduction pathways: Jak-STATs pathway and Ras-MAPK cascade pathway. Any factor that can block or interfere with the signal transduction of IL-6 will be a considerable strategy in treatment for IL-6 related diseases. These strategies include growth factors, monoclonal antibodies, antagonists, antisense gene and so on. The study on the pharmaceutical design and selection targeting to signal transduction of IL-6 will promote the treatment for IL-6-related diseases. The two-chain receptor system of IL-6 and its signal transduction have been reviewed, and the strategies in treatment for IL-6-related diseases have been elucidated.

Key words interleukin 6, signal transduction, IL-6-related diseases

血管内皮生长因子受体的结构与功能*

张 曼 周爱儒¹⁾

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

摘要 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体是存在于血管内皮细胞, 介导内皮细胞增殖分化的跨膜受体. 研究较多的有两种 VEGF 特异受体: Flt 和 KDR. Flt 和 KDR 的基因结构及染色体定位已基本确定, 这二者均属 RTK III型受体, 结构相似. 细胞外区均有 7 个类似免疫球蛋白结构, 细胞内区催化域均有酪氨酸激酶插入区. 当 VEGF 与受体结合时, 引起受体自身的磷酸化, 发生细胞内反应. 在血管发生与生长、创伤修复、炎症、肿瘤和某些血管疾病中起重要作用.

关键词 血管内皮生长因子, 结构, 功能, 血管内皮生长因子受体

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是血管内皮的特异丝裂原, 具有促进内皮细胞增殖, 加速新血管形成的作用^[1]. 1992 年 Vries 和 Termain 分别证明了 Flt (the fms-like tyrosine kinase) 和 KDR

(kinase insert domain-containing receptor) 是 VEGF 的特异受体. VEGF 通过与受体特异结

* 国家教委博士点基金项目.
¹⁾ 北京医科大学生化与分子生物学系.
收稿日期: 1996-03-12, 修回日期: 1996-08-12