

文章编号: 1001-098X(2002)06-0249-04

TPO基因及其应用研究

邢岩

摘要: TPO (甲状腺过氧化物酶) 是甲状腺细胞膜上的一种糖蛋白, 是合成甲状腺激素的关键酶。深入研究其基因结构及转录调控对甲状腺疾病和放射性碘治疗具有重要意义。

关键词: 甲状腺; 过氧化物酶; 放射性碘治疗

中图分类号: R817.5, Q554*.6 **文献标识码:** A

The research and application of TPO's gene

XING Yan

(Department of Nuclear Medicine, First Hospital of West China Medical Centre, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Thyroperoxidase (TPO) is a glycosylated protein bound to the apical plasma membrane of thyrocytes. It is the key enzyme in the synthesis of thyroid hormones. Its gene structure and transcriptional regulation have been deeply studied. This article reviews the development of TPO's gene structure, function, transcriptional regulation, the relationship between TPO with thyroid diseases and radioactive iodide therapy.

Key words: thyroid; peroxidase; radioactive iodide therapy

TPO(甲状腺过氧化物酶)是一种糖基化血红素蛋白, 位于甲状腺细胞顶缘的细胞膜上, 具有催化活性的区域面向充满胶质的滤泡腔。TPO是催化甲状腺激素合成的关键酶, 它参与了两个重要的反应: TG(甲状腺球蛋白)酪氨酸残基的碘化和碘化酪氨酸的偶联作用, 从而产生T₃和T₄。TPO是甲状腺微粒体抗原的重要组成部分之一, 与AITD(自身免疫性甲状腺疾病)的发生、发展密切相关。

1 TPO基因的克隆

Magnusson RP等于1986年用抗猪过氧化物酶的多克隆抗体从λgt11甲状腺cDNA文库中分离出2kb的hTPO(人甲状腺过氧化物酶)cDNA克隆, 序列分析显示hTPO与猪甲状腺过氧化物酶的序列有68%的同源性。Shioko K等人进一步从λgt11 cDNA文库中分离出2种类型hTPO的cDNA, 其中较长的一种命

名为phTPO-1, 有3 084个碱基和一个开放阅读框架, 编码933个氨基酸残基的蛋白质, 分子质量103 026, 推测其氨基酸序列中有5个连接天冬酰胺的糖基化位点; 另一种cDNA命名为phTPO-2, 它从第605个碱基下游开始与phTPO-1几乎完全相同, 仅有一个碱基对不同, 并在序列中间少了171个碱基对, 编码的蛋白质有876个氨基酸残基, 分子质量为96 734。这两种phTPO在甲状腺组织中都有表达。Shioko K等^[1]还通过体细胞杂交发现, TPO基因位于人2号染色体短臂上(2q11)。

2 TPO的两种亚型

由于剪接机制不同, TPO有TPO1和TPO2两种亚型, TPO1具有催化活性, 有15%位于细胞膜上; 而TPO2全部位于细胞内, 与TPO1相比, TPO2的半衰期很短而且不具有催化活性。在免疫沉淀反应中, 13种TPO单克隆抗体中有一半不能识别TPO2, 因此推断TPO2的分子结构发生了一些变化, 由于折叠不良, TPO2被内质网摄取并很快分解^[2]。

3 TPO基因转录的调控

收稿日期: 2002-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170281)

作者简介: 邢岩 (1977-), 女, 四川绵阳人, 四川大学华西医院核医学科 (成都, 610041) 硕士研究生, 主要从事分子核医学方面的研究。

审校者: 四川大学华西医院核医学科 匡安仁

Marc A等^[3]从hTPO 5'端分离出一个900 bp的片段,当把这一片段转染犬甲状腺细胞时,发现它能促进TSH(促甲状腺激素)和cAMP对报道基因转录的调控,这一片段被认为是hTPO的启动子。在此基础上通过基因缺失和突变分析,研究了hTPO启动子的结构和功能的关系:TPO启动子中没有经典的CRE(cAMP应答元件)回文结构(TGACGTCA),而是在上游的154位到145位间有一个类似CRE的基序,这个基序的缺失不会导致cAMP激活TPO基因转录作用的丧失,说明这个基序在cAMP激活基因转录中是不必要的;而启动子中上游的119位到105位的一个片段能识别犬甲状腺细胞的核酸粗提物并与其结合,这一片段的缺失和突变会抑制TPO转录,而加入cAMP类似物Forsklin(一种腺苷酸环化酶的激活剂)后这种结合作用会增强,因此推断cAMP调节的转录因子可能作用于这一片段。

调节TPO基因转录的三种甲状腺特异转录因子分别为TTF1(甲状腺转录因子1)、TTF2(甲状腺转录因子2)、Pax8,它们分别属于不同的转录因子家族:TTF1是同源蛋白家族(homeo protein),TTF2是配对蛋白家族(paired protein),Pax8是分叉蛋白家族(forkhead protein)^[4]。TTF1结合在hTPO基因启动子上游第50、第105和第145位;TTF2结合于第90位;Pax8在TPO启动子序列中只有一个结合位点,含有15个核苷酸,且与TTF1位点重叠。TTF1对hTPO基因转录调节作用较弱;TTF2是TSH和胰岛素调节TPO基因转录的主要介质;将表达Pax8的载体与TPO-荧光素酶共同转染HELA细胞株,发现Pax8能使TPO的转录活性提高20~50倍,核蛋白P300可作为共激活因子增强Pax8对基因转录的调节^[4]。

hTPO基因转录还可由一个位于基因上游大约5.5kb的增强子元件调节,这个元件包含在一个230 bp片段中。TTF1连在增强子元件中上游123位到141位的一个名为E2的序列并激活TPO的增强子元件。Claudio E等^[7]报道,Pax8也能与E2位点连接并激活TPO增强子。

4 TPO的调节

4.1 TSH

TSH作用于甲状腺细胞膜TSH受体,使TPO转录和表达增加,这一作用是通过cAMP通路完成的。Forskolin可模仿这一作用。TSH对TPO转录的激活可

被cAMP依赖性蛋白激酶抑制剂抑制,表明这一调节机制可能包括蛋白质磷酸化^[8]。TSH对TPO转录和表达的调节作用是快速的(1 h)。TSH还可调节细胞内TPO的分布,将TPO贮存池从核周围区域移到顶端的细胞膜附近^[9]。

4.2 细胞因子

Napolitano G等^[10]对鼠FRTL-5细胞株的研究发现,TGF- β (转化生长因子 β)能抑制TPO、TG、NIS(甲状腺钠/碘同向转运体)和TSHR(促甲状腺激素受体)基因的表达,可能是因为TGF- β 抑制了甲状腺转录因子TTF-1表达。Miyazaki A等^[11]研究发现,TNF- α (肿瘤坏死因子 α)和IFN- α (α -干扰素)能抑制甲状腺特异基因TPO和TG表达,可能因为TNF- α 和IFN- α 抑制TTF-2基因表达及其与DNA的连接。

4.3 碘

Penel C等^[9]对猪甲状腺细胞培养研究发现,高浓度的碘(1~50 mmol/d)能降低TPO水平。Uytersprot N等^[12]在甲状腺肿大伴甲状腺功能减退犬试验中观察碘化钾对细胞增殖和甲状腺特异基因表达的影响,发现当给予30 mg/kg的碘化钾24 h后,TPO的表达增加,48 h后TPO的表达下降,从而推断在TSH的慢性刺激下,一定剂量的碘可抑制TPO的表达。

4.4 胰岛素

胰岛素和TSH一样可增加TPO和TG基因转录和表达。Ortia L等^[13]对FRTL-5细胞株的研究发现,在培养基中加入胰岛素或IGF-1(胰岛素样生长因子-1)时,细胞中TTF2 mRNA水平升高,TTF2作为顺式作用元件与TPO启动子连接从而促进TPO基因的转录与表达。他们还发现较高浓度(10 mg/mL)的胰岛素与较低浓度(100 ng/mL)的IGF-1产生同样的刺激作用,从而推测胰岛素是通过IGF-1受体信号传递途径激活了TTF2的表达。

4.5 其他

Da-Costa VM等^[14]对动物模型的研究发现,年轻雄鼠的甲状腺细胞中TPO和TG基因表达高于同年龄的雌鼠,而随着年龄增长,雄鼠的TPO和TG基因表达逐渐下降,因而推测TPO的表达与雄激素的分泌水平有关。

5 TPO的临床意义

5.1 TPO与甲状腺疾病

研究发现,大多数AITD病人的血液中都含有能

甲状腺球蛋白、微粒体抗原和促甲状腺素发生反应的抗体。TPO是甲状腺微粒体抗原的一个重要组成部分,它可能作为自身抗原参与了补体介导的细胞毒性作用,在一些甲状腺疾病中患者的TPO水平发生了改变。

自身免疫性甲状腺病,如桥本氏甲状腺炎及Grave's病患者有高滴度的甲状腺自身抗体,并含有类似次级淋巴滤泡的淋巴组织,这些淋巴组织能与TPO和TG结合,参与了甲状腺自身免疫反应^[5]。

自身免疫性甲状腺炎是儿童和青少年获得性甲状腺功能减退的最常见原因,在这些病人中可伴有TPO抗体滴度的升高。Niedziela M等^[6]报道了一例10岁的女性患者,临床症状表现为生长迟缓,早熟及黏液性水肿,实验室检查示TPO抗体明显升高。

Deleu S等^[7]研究51例功能自主性甲状腺腺瘤患者发现,腺瘤组织中TPO mRNA和TPO蛋白水平较正常组织高。在分化良好的甲状腺腺瘤中发现有TTF1和Pax8的表达,而在未分化甲状腺腺瘤中两者不表达。进一步研究发现,TPO、TG、TSHR在分化差的滤泡性腺瘤、乳头状腺瘤和未分化腺瘤中也不表达,因此考虑可将TPO、TG的表达水平作为评估肿瘤分化程度的指标^[8]。Franke WG等^[9]对80例甲状腺腺瘤患者和18例功能自主性甲状腺腺瘤患者行甲状腺切除术,于第一次放射性碘治疗前后和第二次放疗之前对其血清TPO和TG水平进行了检测,发现大多数甲状腺腺瘤病人在放射性碘治疗后TPO和hTG很快升高,大约3d后TPO和hTG水平会下降,而功能自主性甲状腺腺瘤病人的TPO水平不升高。因此推测,可将血清TPO水平作为判断甲状腺细胞或肿瘤细胞破坏程度的指标。

在甲状腺先天性疾病中,TPO基因突变可导致先天性TPO表达缺陷,造成碘的有机化障碍,从而影响甲状腺激素合成,通过反馈机制刺激TSH分泌,TSH慢性刺激造成甲状腺滤泡上皮细胞肥大,这被认为是胎儿和新生儿先天性甲状腺肿的发病机制。Geraldo M等^[10]报道了1例巨大先天性恶变的甲状腺肿并伴有肺和骨转移的新生儿患者,其TPO基因第14个外显子2505~2511位的7个胞嘧啶序列中插入了1个胞嘧啶,使阅读框架发生移动,从而在第16个外显子上游产生了停止信号,由于第15个外显子序列发生改变,翻译的蛋白产物可能不能插入滤泡顶端的细胞膜上,TPO的催化活性

丧失。

5.2 TPO与¹³¹I治疗

TPO对甲状腺组织中碘的聚集是非常重要的。分化不良及未分化甲状腺肿瘤由于缺少TPO等甲状腺特异基因的表达,不能摄碘或摄取的碘快速流失,因此用¹³¹I治疗效果不佳。近年来,国外许多学者对未分化甲状腺肿瘤细胞和非甲状腺肿瘤细胞中转入hTPO基因是否能增强其摄碘能力进行了研究。Haberkorn U等^[21]在体外用从骨髓增生肉瘤病毒获得的双顺反子逆转录病毒作为hTPO和新霉素耐药基因的载体转染人未分化甲状腺癌C643和SW1736株,用逆转录病毒颗粒转染鼠Morris肝癌MH3924A株和鼠乳头状甲状腺癌L3株,结果发现,重组的细胞株表达TPO的能力比野生型肿瘤细胞高约1800倍,但其摄碘能力并没有显著增强,从而得出结论:只用hTPO转染非甲状腺肿瘤细胞还不足以提高肿瘤细胞摄碘能力,可能需要与其他参与摄碘的基因共同转染才能达到这一目的。

NIS也是一种跨膜糖蛋白,具有主动运输碘的能力。TPO可催化TG的酪氨酸残基碘化从而使碘在甲状腺细胞中滞留,未经TPO有机化的碘很快就从细胞中流失,因此,细胞内碘的浓度取决于NIS介导的碘流入和TPO抑制的碘流出的平衡。用表达NIS基因的载体转染黑色素瘤、卵巢腺瘤、肺癌、前列腺癌等肿瘤已获成功,但碘从转染后的细胞中快速流失,碘在肿瘤细胞中的有效半衰期短,不能获得理想的疗效。Huang M等^[22]用RT-PCR(逆转录-PCR)技术获得NIS和TPO的cDNA,将NIS和TPO的基因克隆到含有巨细胞病毒启动子的质粒载体,再用Effetene法将含有NIS和TPO DNA的质粒转染到NSCLC(非小细胞肺癌)细胞中,结果发现肿瘤细胞对¹³¹I的摄取能力增加了,¹³¹I在肿瘤细胞中的滞留时间延长了,而且肿瘤细胞的凋亡也增加了。Boland A等^[23]在巨细胞病毒早期启动子控制下建立了一种编码人TPO基因的重组腺病毒,用这一病毒转染非甲状腺肿瘤细胞可产生一种具有TPO活性的蛋白,使联合转染NIS和TPO基因的细胞对碘的有机化增强。TPO与NIS基因联合转染肿瘤细胞介导¹³¹I治疗,可能为肿瘤的内照射治疗建立一种全新的方法。

参考文献:

- [1] Shioko K, Tomio K, McBride OW, et al. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(16): 5555-5559.
- [2] Niccoli P, Fayadat L, Panneels V, et al. Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (47): 29487-29492.
- [3] Març A, Gilbert V, Daniel C, et al. Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter[J]. *Eur J Biochem*, 1992, 203 (3) 467-473.
- [4] Lourdes O, Pedro AB, Mariastella Z, et al. The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NT-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (21): 15213-15221.
- [5] Mariastella Z, Helen FL, Dimitri P, et al. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12 (9): 4230-4241.
- [6] Rossana DL, Stefania M, Enrico Z, et al. Role for p300 in Pax8 induction of thyroperoxidase gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (44): 34100-34105.
- [7] Claudio E, Stetania M, Adolfo S, et al. Pax8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene[J]. *Biochem J*, 1998, 331(1): 37-40.
- [8] Gerard CM, Lefort A, Christophe D, et al. Distinct transcriptional effects of cAMP on 2 thyroid specific genes :thyroperoxidase and thyroglobulin[J]. *Horm Metab Res Suppl*, 1990, 23: 38-43.
- [9] Penel C, Gruffat D, Alquier C, et al. Thyrotropin chronically regulates the pool of thyroperoxidase and its intracellular distribution: a quantitative confocal microscopic study[J]. *J Cell Physiol*, 1998, 174 (2):160-169.
- [10] Napolitano G, Montani V, Giuliani C, et al. Transforming growth factor-beta1 down-regulation of major histocompatibility complex class I in thyrocytes :coordinate regulation of two separate elements by thyroid-specific as well as ubiquitous transcription factors [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14 (4): 486-505.
- [11] Miyazaki A, Shimura H, Endo T, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma suppress both gene expression and deoxyribonucleic acid-binding of TTF-2 in FRTL-5 cells[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(9): 4214-4220.
- [12] Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, et al. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 131 (2): 195-203.
- [13] Ortia I, Zannini M, Di-Lauro R, et al. Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor 1[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(37): 23334-23339.
- [14] Da-Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D, et al. Thyroid function and aging : gender-related differences[J]. *J Endocrinol*, 2001, 171(1): 193-198.
- [15] Armengol MP, Juan M, Lucas MA, et al. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 861-873.
- [16] Niedziela M, Korman E. Severe hypothyroidism due to autoimmune atrophic thyroiditis-predicted target height and a plausible mechanism for sexual precocity[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2001, 14(7): 901-907.
- [17] Deleu S, Allory Y, Radulescu A, et al. Characterization of autonomous thyroid adenoma: metabolism, gene expression, and pathology[J]. *Thyroid*, 2000, 10(2): 131-140.
- [18] Ros P, Rossi DL, Acebron A, et al. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis[J]. *Biochimie*, 1999, 81(4) : 389-396.
- [19] Franke WG, Zophel K, Wunderlich GR, et al. Thyroperoxidase: a tumor marker for post-therapeutic follow-up of differentiated thyroid carcinomas? Results of a time course study[J]. *Cancer Detect Prev*, 2000, 24(6): 524-530.
- [20] Geraldo M, Maria J, Cecilia L, et al. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83 (11): 4162-4166.
- [21] Haberkorn U, Altmann A, Jiang S, et al. Iodide uptake in human anaplastic thyroid carcinoma cells after transfer of the human thyroid peroxidase gene [J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28(5) : 633-638.
- [22] Huang M, Raj K, Takahiko K, et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2001, 8(8): 612-618.
- [23] Boland A, Magnon C, Filetti S, et al. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers[J]. *Thyroid*, 2002, 12(1): 19-26.