

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)相关结合蛋白

辛洪启 林 剑 洪 岸
(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

摘要 有四种不同类型的细胞表面或细胞外基质中的蛋白质分子在结合碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、辅助其发挥生物功能活性方面起着重要的作用。它们是:(1)细胞膜上的具有酪氨酸激酶活性的 FGF 受体家族(FGFRs);(2)细胞外基质中的硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族(HSPGs);(3)细胞内富含半胱氨酸的 FGF 受体(CFR);(4)分泌型的 FGF 结合蛋白(FGF-BP)。本文试图从它们在 bFGF 生物功能发挥中可能起到的作用对它们进行简单综述。

关键词 bFGF, FGFR, HSPG, CFR, FGF-BP

成纤维细胞生长因子蛋白家族(Fibroblast growth factors, FGFs)至今已有 21 个成员^[1], 它们中研究较为深入的主要有 FGF-1(aFGF)、FGF-2(bFGF)、及 FGF-7(KGF)。其中尤以 bFGF 的应用前景最为诱人, 因为 bFGF 具有多种生物学的活性、如刺激新生血管的形成、促进胚胎组织的发育和分化、参与创伤的愈合和组织再生、神经营养和调节内分泌作用、维持细胞的存活调节凋亡的发生等。bFGF 各项功能的发挥离不开它与各类受体以及结合蛋白的相互作用。这些受体和蛋白质包括:(1)具有酪氨酸激酶活性的膜受体(FGF Receptors, FGFRs), 其中可能还存在一些游离的 FGFR 片段;(2)位于膜上和细胞间基质中的一系列硫酸乙酰肝素蛋白多糖(Heparan Sulfate Proteoglycans, HSPGs);(3)富含半胱氨酸的 FGF 受体(Cysteine-rich FGF Receptor, CFR);(4)分泌型的 FGF 结合蛋白(FGF-Binding Protein, FGF-BP)。各种受体和蛋白质在 bFGF 功能发挥的过程中可能起着不同的作用, 或者协同作用以使 bFGF 的功能更好地发挥, 迄今对它们的各方面研究有了很多进展, 本文简单地将它作一综述:

1 具酪氨酸激酶活性的膜受体(FGFR)

FGFRs 是一类跨膜蛋白质, 属于酪氨酸激酶受体。发现有 4 种不同的 FGFR(FGFR1-FGFR4), 虽

然不同的 FGFR 介导的生物学功能各不相同、不同的结构差异可能是导致功能不同的基础, 但所有 FGFR 都由三个主要部分组成: 细胞外段、跨膜区和细胞内段。FGFR 的细胞外段一般由 3 个免疫球蛋白样功能区, 信号肽结构和酸盒组成, 细胞外段用于结合配体 FGF, 不同配体(指不同的 FGF)的结合位点不同^[2]。胞内段都含有两个酪氨酸激酶的活性, 用于催化自身的酪氨酸残基或靶蛋白上的酪氨酸残基磷酸化^[3]。

FGFRs 有三个独特的性质:(1)重叠识别和多特异性, 即一种受体可以以相似的亲和性和几种 FGF 结合;一种 FGF 也可以相似形式和几种 FGFR 结合。(2)FGF 和其受体的结合依赖于细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖。(3)由于 mRNA 拼接方式的不同, 同一基因可产生多种不同的细胞结合性或分泌性受体^[4]。

FGFRs 是 bFGF 发挥生物学活性的基础, bFGF 的促细胞有丝分裂、转化、分化以及维持细胞存活的功能均有各种不同 FGFR 的参与。bFGF 与 FGFR 作用的机制了解比较清楚, 一般认为其信号传导的过程主要有两步: 首先是 bFGF 和 FGFR 结合, 在 HSPG 的介导下形成受体二聚体, 使 FGFR 细胞内段自身的酪氨酸残基或靶蛋白酪氨酸残基发生磷酸化而被激活, 受体二聚体的形成是 FGFR 活化的重要条

辛洪启, 男, 在读硕士研究生, 导师: 林剑教授。

联系地址: 暨南大学生物工程研究所, 广州, 邮编: 510632

电话: 020 85220221, 85220220 转 17(实验室) 或 020 85225085(宿舍)

E-mail: hqxin@21cn.com

件^[5]。磷酸化后的 FGFR 结合多种细胞内的信号传导分子,活化多个信号传导途径。Ras/Raf/Merk/MAPK 信号传导途径在 FGF-2 发挥多种生物学效应中有重要的意义,FGF-2 的丝裂原作用、维持细胞存活作用都与之有关。FGF 引发的信号传递级联反应将信号传递到蛋白激酶 Erk1 (extracellular signal regulated protein kinase) 和 Erk2 后,这两种活化的蛋白激酶可以转移到细胞核中,调节 Myc、Fos 等一些早期转录因子的活性^[6],进而使细胞发生增殖和分化等反应^[7]。在一些实验中还观察到通过受体酪氨酸激酶受体途径,bFGF 可以维持细胞存活,抑制凋亡的发生^[8]。特定信号传导途径和信号分子的激活依赖于活化的 FGFR 的种类,一般认为 FGFR1 与细胞的分裂增殖相关,而 FGFR4 则与细胞的迁移相联系^[9,10]。

2 硫酸乙酰肝素糖蛋白(HSPG)

细胞的表面除 bFGF 的高亲和力结合位点(FGFR)外,还具有一种由硫酸肝素类物质组成的低亲和力结合位点。硫酸乙酰肝素糖蛋白是存在于细胞表面和细胞间质中的一系列蛋白聚糖,是细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的重要组成部分。细胞膜上的 HSPGs 可以以穿膜蛋白的形式存在(如 syndecans 和 glypicans),也可以以膜紧密结合形式存在(如 perlecan)。细胞基质中的 HSPGs 可以快速、可逆结合 bFGF,形成活性 bFGF 的储存池。因此细胞间质中的 HSPGs 浓度决定 bFGF 的转运速度和释放速度,而细胞表面的 HSPGs 和 FGFR 等 bFGF 结合位点的密度决定细胞对释放自细胞间质的游离型 bFGF 的竞争能力。

在 bFGF 与细胞表面产生的一种低亲和力结合复合物中包含有一种 HSPG,因此认为 HSPG 参与结合 bFGF。后来的研究发现 bFGF 生物学活性的多样性依赖 ECM 中 HSPG 的存在,细胞外基质中 HSPG 与 bFGF 结合后可以保护 bFGF 以免其受热、酸、蛋白酶等的降解,并且由 HSPG 将 bFGF 固定于 ECM 中,作为 bFGF 的存储仓库,当需要发生有丝分裂的作用时,依靠特殊的机理将 bFGF 释放出来^[11]。HSPG 调节 bFGF 的促有丝分裂活性主要在于 HSPG 与肝素一样介导 bFGF 与 FGFR 的结合以激活信号传导途径,认为肝素的激活作用是因为它能够诱导 bFGF-FGFR 结合后稳定二聚体的形成以及 bFGF 分子的相互作用^[7,12]。

但是看来 HSPG 的作用并非这么简单,它还可

能具有其他的一些功能。例如在无内源的 FGFRs 表达时,观察到 HSPG 介导 bFGF 有效地内化,伴随内化出现尿激酶血纤维蛋白溶酶原激活因子的活性升高。因此认为 HSPG 也可能作为 bFGF 信号转换的开关,并且存在一个与经 FGFR 传导不同的经 HSPG 的信号通道^[13]。

HSPG 调节 bFGF 功能的作用存在正调控和负调控两种情况。在 Raji Syndecar 1 细胞株中发现 HSPG 能够调节 aFGF 和 bFGF 与 FGFR 的结合以及信号传递,其中调节 bFGF 的信号传递为正调控的作用。但在乳房癌细胞的分化过程中,HSPG 却同时具有正调控和负调控 bFGF 的促有丝分裂活性^[14]。由此可见 HSPG 的调节作用在不同的细胞中不尽相同,这种调控的作用可能与 bFGF 竞争性的结合存在一定的关系。

3 富含半胱氨酸的 FGF 受体(CFR)

在以上两种比较普遍存在的 bFGF 结合蛋白之外,随着对 bFGF 研究的深入,又有新的结合 bFGF 的蛋白被发现。1989 年 Burrus 和 Olwin 在鸡胚中分离到一种 bFGF 的高亲和性受体,此受体与以往发现的 FGFR 及 HSPG 结构完全不同,它具有的一个典型特征是其胞外区段具有 16 个富含半胱氨酸的重复单位,因此将其命名为 CFR (Cysteine-rich FGF Receptor)^[15]。后来陆续在其它动物组织中发现与其相关的其它一些蛋白质:MG160 (a 160KD membrane sialoglycoprotein of Golgi apparatus)、ESL-1 (E-selectin ligand 1)、及 TGF 基因转化中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达的 TGF beta 前体分泌复合体中的 LTCP-1 (Latent TGF beta Complexed Protein 1)。它们与 CFR 的同源性均达 90% 以上^[16~18]。

CFR 在体内的表达可能随年龄的增长出现下调的趋势,但其配基(bFGF)却直接或间接地增加表达。因此 CFR 可能在受体水平调节 bFGF 的功能。Northern blot 和原位杂交的结果表明在鸡胚的发育过程中,大多数发育中的器官均有 CFR mRNA 的表达,特别在神经结构和视网膜中表达尤为突出,随增殖和分化的进行 CFR mRNA 的表达水平逐渐提高,在某段时期达到最高,以后则逐渐减少表达,等到视网膜基质形成后已检测不到 CFR 的 mRNA^[19]。在鸡胚组织中可以检测到几种 CFR 转录产物,说明 CFR mRNA 具有选择性拼接或者存在 CFR 相关的基因^[20]。

CFR 能与 aFGF、bFGF、FGF-4 等多个 FGF 家族

成员结合,但不能结合非 FGF 家族的生长因子,其结合的特性与 FGFR 跟 bFGF 的结合不同。并不一定需要 HSPG 的介导^[21]。Zhou Z 等利用各种缺失突变产生的 CFR 片段与 bFGF 的结合试验,得到 CFR 上的两个 bFGF 结合位点:一个非 HSPG 依赖性的位点和一个依赖 HSPG 的结合位点。试验还证明在正常的生理条件下,bFGF 直接结合 CFR 或在 HSPG 的介导下间接结合 CFR,在高离子强度或缺乏 HSPG 的条件下,bFGF 直接结合 CFR。这个直接结合的位点存在于 CFR 的 290aa. 和 740aa. 之间。实验同样观察到阻止 bFGF 结合到 FGFR 上的多肽片段同样阻止 bFGF 结合到 CFR,因此可能 bFGF 以同一区域结合 CFR 和 FGFR^[22]。

CFR 在细胞膜中不能检测,它一般定位于高尔基体膜上。有实验观察到 CFR 能够降低胞浆内 aFGF 和 bFGF 的积累,并将其定位在高尔基体的中部区域。因此认为 CFR 可能参与 FGF 细胞内的定向转运,从而从受体水平调节 FGF 对细胞的作用^[23],或者与 bFGF 的分泌有一定的关系,但具体的作用机理尚不清楚。

4 分泌型的 FGF 结合蛋白(FGF BP)

由于 bFGF 通常发现被固定于细胞的基质中,其溶解释放后激活受体从而发挥生物活性的机理并不是很清楚,近来发现鳞状上皮细胞分泌的一种蛋白质可能具有这方面的功能。FGF-BP 首先在 A431 人类上皮癌细胞中被纯化,分子量为 17KD,对 aFGF 和 bFGF 具有高度的亲和力^[24]。

FGF BP 可能起到一个释放 bFGF、促进细胞分裂和肿瘤形成的分子开关的作用。在表达 FGF-BP 的鳞状细胞癌和结肠癌细胞系中,发现 FGF-BP 诱导有生物活性的 bFGF 的释放^[25]。在表达 FGF-BP 的细胞株培养过程中观察到 bFGF 的组成性表达,并能使细胞在软琼脂上形成克隆,因此认为 BP 起着溶解 bFGF 与 HSPG 的结合作用,使 bFGF 能够释放出来,发挥其促肿瘤生长促血管形成作用^[26]。而且研究还发现 EGF 可以通过 Mek/Erk 的通路上调 FGF-BP 的表达,从而发挥其促进肿瘤新血管生成的作用^[27]。研究还发现只在出生前的皮肤和肠道中,患者的鳞状细胞癌组织中,不同来源的鳞状细胞中以及一些克隆癌细胞株中检测到高水平 FGF-BP mRNA 的表达,而在正常成体组织和许多非鳞状癌细胞组织中未见 FGF-BP mRNA 的表达^[25,28]。

通过四环素调节 SW-13 中的 FGF BP mRNA 的

表达的启动系统,可以抑制 FGF-BP 的表达。在没有添加四环素时,SW-13 中 FGF-BP 的高度表达能促使细胞克隆化并促进肿瘤的生长。加入四环素抑制 FGF-BP 的表达则观察到细胞不能形成克隆。对异种移植的已形成的肿瘤,尽管加入四环素抑制了 FGF-BP 的表达,也不能对肿瘤的生长、迁移起任何作用。因此 FGF-BP 的表达可能只是在肿瘤发生的早期起重要作用,对已经形成的肿瘤组织并不产生影响^[29]。

一些调节细胞生长和分化的药物能够调节 FGF-BP mRNA 的表达。如视黄酸(RA)能够在转录和转录后的水平上调节 FGF-BP 基因的表达^[30]。佛波酯则通过对 FGF-BP 基因上的某些正调序列和负调序列的作用而促进 FGF-BP 基因的表达^[31]。可以认为这些药物正是通过增加 FGF-BP 的表达而进一步使 bFGF 释放,发挥其调节细胞生长和分化的作用。

5 结语

成纤维细胞生长因子由于其对生物体多种类型细胞的促生长分裂活性以及它在医药方面潜在的应用价值日益为人们所重视。由于 bFGF 作用途径以及信号传导方式的复杂性,对于 bFGF 在这些方面的详细内容了解并不是很清楚。一般认为 bFGF 信号的传导至少需要 FGFR 和 HSPG 的参与,大部分的研究都集中在如何增加或者降低 FGF 与 FGFR 的结合以达到促进或者抑制组织细胞生长的目的。CFR 和 FGF-BP 的发现以及对它们研究的进一步开展丰富了 bFGF 作用途径和转运方式的内容,提供了控制 bFGF 效应发挥的新的途径和方式。

参考文献

- [1] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1492: 203- 206.
- [2] Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, et al. *Oncogene* 1991 Dec 6: 12 2255- 62.
- [3] Yayon A, Zimmer Y, Shen GH, et al. *EMBO J* 1992 May 11: 5 1885- 90.
- [4] Wang LY, Ederson SP, Yu YL, et al. *Biochemistry* 1996 Aug 6 35: 31 10134- 42.
- [5] Schlessinger J. *Trends Biochem Sci* 1988 Nov 13: 11 443- 7.
- [6] Klint P, Claesson Welsh L. *Front Biosci*. 1999; 4: 165- 177.
- [7] Olwin BB, Rapraeger A. *J Cell Biol* 1992 Aug 118: 3 631- 9.
- [8] Tilly J. L., Billig H, Kowalski K. I. et al. *Mol Endocrinol*, 1992 Nov, 6: 11, 1942- 50.
- [9] Feng SJ. *Cancer Research* 1997, 57, 5369- 5378.
- [10] Johnston CL et al. *Biochem J*, 1995 Mar, 306(Pt 2): , 609- 16.

- [11] Nugent M A, Iozzo R V. J Biochem Cell Biol. 2000, 32(2): 115–120.
- [12] Waksman G, and Herr A B. Nature Struct Biol 1998, 5: 527– 530.
- [13] Gleizes PE, Noaillac-Depeyre J, Amalric F, et al. Eur J Cell Biol 1995 Jan 66: 1 47-59.
- [14] Delehedde M, Deudon E, Boilly B, et al. Exp Cell Res 1996 Dec 15 229: 2 398– 406.
- [15] Burnus LW, Olwin BB. J Biol Chem 1989 Nov 5 264: 31 18647– 53.
- [16] Gonatas JO, Mezitis SG, Stieber A, et al. J Biol Chem 1989 Jan 5 264: 1 646– 53.
- [17] Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, et al. Nature, 1995, 373 (6515): 615– 620.
- [18] Olofsson A, Hellman U, Ten Dijke P, et al. Biochem J, 1997, 324 (pt2): 427– 434.
- [19] Fayein NA, Head MW, Jeanny JC, et al. J Neurosci Res 1996 Mar 1 43: 5 602– 12.
- [20] Burnus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, et al. Mol Cell Biol 1992, 12 (12): 5600– 5609.
- [21] Walker A, Turnbull JE, Gallagher JT. J. Biol. Chem. 1994, 269(2): 931– 935.
- [22] Zhou Z, Zuber ME, Burnus LW, et al. J Biol Chem, 1997, 272(8): 5167– 5174.
- [23] Zuber ME, Zhou Z, Burnus LW, et al. J Cell Physiol, 1997, 170(3): 217– 227.
- [24] DQ Wu, MK Kan, GH Sato, et al. J. Biol. Chem. 1991 266: 16778 – 16785.
- [25] Czubayko F Liaudet Coopman ED, Aigner A, et al. Nat Med, 1997, 3 (10): 1137– 1140.
- [26] Czubayko F, Smith RV, Chung HC, et al. J. Biol. Chem. 1994 269: 28243– 28248.
- [27] Harris VK, Coticchia CM, Kagan BL, et al. J Biol Chem, 2000, 275, 15: 10802– 10811.
- [28] Kurtz A Wang HL, Darwiche N, et al. Oncogene, 1997, 14(22): 2671– 2681.
- [29] Liaudet– Coopman ED, Schulte AM, Cardillo M, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 229(3): 930– 937.
- [30] Wellstein A, Liaudet Coopman ED. J. Biol. Chem. 1996 271: 21303 – 21308.
- [31] Harris VK, Liaudet– Coopman ED, Boyle BJ, et al. J Biol Chem, 1998, 273(30): 19130– 19139

Binding proteins of basic fibroblast growth factors

Xin Hong-qi Lin Jian Hong An

(Bioengineering Institute, Jifan University Guangzhou 510632)

Abstract Four distinct types molecule in cell surface or extracellular interact with basic fibroblast growth factors (bFGF) that can regulate bFGF signaling and biological activity. They are: (i) FGF receptor tyrosine kinases (through FGFR-1 to FGFR-4); (ii) heparan sulfate proteoglycan (HSPG); (iii) a cysteine-rich FGF receptor (CFR); (iv) a secretive FGF-binding protein (FGF-BP); In this article, we try to introduce their functions that involved in the bioactivity of FGFs.

Key words FGFs, FGFR, HSPG, CFR, FGF-BP

(接第38页)

Interaction Between Membrane Proteins and Cytoskeletal Proteins

Zhou Yan Wang Huar jin Hu Xiao-yan Peng Xiao zhong Yuan Jiarr gang

Abstract Interactions between membrane proteins and cytoskeletal proteins play important roles in cellular morphology maintenance, cell adhesion and signal transductions. Members of protein 4.1 superfamily containing 4.1/JEF domains and MAGUK family containing PDZ domains can bind to various membrane proteins and cytoplasmic proteins and then establish contacts between them. These proteins and contacts are essential to the structural and functional maintenance of cells and cell interactions.

Key words Protein 4.1 superfamily MAGUK