

碱性成纤维细胞生长因子促进神经损伤修复的研究进展*

张超¹ 项丽娜¹ 陈德培¹ 吕鑫鑫¹ 赵宜桐¹ 王璐瑶¹ 肖健^{1,2} 张宏宇^{1,2**}

(1 温州医科大学药学院 温州 325035 2 浙江省生物技术制药工程重点实验室 温州 325035)

摘要 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是成纤维细胞生长因子家族(FGFs)的成员之一。它是哺乳动物和人体中一种非常微量的活性物质,因其具有广泛的生理功能和重要的临床应用价值受到了国内外学者的高度重视。bFGF生物活性的多效性以及神经营养的广谱性,为其从基础走向临床提供了保证。而bFGF如何发挥神经损伤修复作用的功能和机制,仍有待进一步的发现及研究,这也是目前国内外探索 and 开发bFGF新临床药物的研究热点之一。针对bFGF的生物学特点及其在神经损伤修复中的功能,特别是在中枢神经系统和外周神经系统疾病中的研究进展进行了综述。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子 神经损伤 修复 信号通路

中图分类号 Q819

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是成纤维细胞生长因子(FGFs)家族的主要成员之一。它也是成纤维细胞生长因子家族中第一个被发现的成员。1975年Gospodarowicz^[1]首先报道运用理化方法从牛的大脑和垂体中分离纯化出碱性成纤维细胞生长因子。80年代,bFGF的氨基酸序列得到澄清。90年代,国内外相继运用基因工程方法成功获得重组bFGF,有力推动了关于bFGF的研究^[2]。bFGF的生物学作用极其广泛,在血管形成、创伤愈合、组织修复与再生和神经组织生长发育过程中起着十分重要的作用^[3],正因其广泛的生理功能和重要的临床应用价值而被国内外学者高度重视。近年来bFGF已广泛临床应用于各种创伤、难愈性溃疡等疾病的治疗,而近来研究者发现bFGF在神经系统中也具有广泛的生理学活性,具有潜在的临床应用价值,故其在神经损伤修复方面的作用越来越引起人们的关注。

1 bFGF的生物学特点

bFGF是一种由155个氨基酸构成的具有促有丝

分裂活性的多肽,主要来源于中胚层和神经外胚层,可诱导神经分化^[3]。bFGF在生物进化上具有高度的保守性,在各种动物中具有很高的同源性,这说明bFGF是动物机体发育重要的内源性因子和调控蛋白。且bFGF有很强的肝素亲和力,其N末端区域是结合肝素的重要部位,与肝素结合后,对温度、酸的稳定性增强,同时也不易受蛋白酶降解^[4]。正因为bFGF有上述生物学特性,使其具有较好的成药稳定性,对制药环节的工艺要求相对较低。这也是它成为FGF家族中临床应用最早,研究最成熟的药物的原因之一。

2 bFGF在神经组织中的作用机制

bFGF通过与FGF受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)结合进行细胞信号转导,FGFRs是一类穿膜的酪氨酸激酶受体,介导FGF信号传递入细胞中,其基本结构包括胞外区、跨膜区和酪氨酸激酶区^[5]。bFGF有两种细胞膜表面受体,即FGFR1-IIIb和FGFR1-IIIc。bFGF与受体FGFR1-IIIc的亲和力很高,是其特异性配体^[6]。bFGF与受体结合后,促使受体处于细胞内的C端酪氨酸残基磷酸化,磷酸化的受体具有酪氨酸蛋白激酶活性,并与一系列靶蛋白发生作用,

收稿日期:2015-03-29 修回日期:2015-04-06

* 国家自然科学基金资助项目(81200958,81472165)

**通讯作者,电子邮箱:st_hyz@126.com

引发信号级联反应,从而发挥其生物学功能^[7-8]。bFGF与受体结合后可能通过以下信号通路产生作用:①蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 途径。② Ras/Raf/MEK/ERK 路径。③ 蛋白酪氨酸激酶 (Janus kinase, JAK)/信号转导子及转录激活子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 途径。④ 磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 途径。

其中 PI3K/AKT 信号通路被认为是 bFGF 在神经组织中发挥主要作用的主要信号通路。当 bFGF 结合 FGFR 后,引起 FGFR 的自身磷酸化,然后与 PI3K 通过调节亚基结合,使 PI3K 活化,进而导致其磷酸化肌醇磷脂产物增加。PI3K 的磷酸化磷脂产物与蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的 pH 结构域结合,使 PKB 向质膜转位,发生变构。在 PI3K 依赖激酶 I 的作用下,引起其苏氨酸残基和丝氨酸残基磷酸化,使 PKB 活化后脱离质膜进入胞质和胞核,引起细胞生存、代谢、骨架重组等重要的生物学事件^[9]。研究发现,bFGF 可通过作用于靶细胞引发 PI3K 信号通路级联反应,激活下游 ERK1/2、AKT、GSK3 β 通路,抑制内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 反应,从而减少神经组织病变和神经细胞凋亡^[10]。此研究结果提示,bFGF 具有应用于脊髓损伤和脑中风等一系列神经损伤疾病的潜在可能。

3 bFGF 在神经再生与修复中的作用

3.1 bFGF 调节多种神经细胞的功能状态

大量实验证明,bFGF 对神经组织存在广泛的营养和保护作用,它能够通过促进神经细胞的分化、迁移而产生神经保护作用。Dehghan 等^[11]通过 Balb/c 小鼠实验证明,bFGF 能通过促进少突胶质细胞的增殖、分化和迁移,在受损神经轴突周围产生新的髓鞘磷脂,从而起到神经营养和保护作用。另有研究表明,bFGF 能够激活神经胶质细胞的有丝分裂活性,促进星形胶质细胞的迁移和纤溶酶活剂的释放;调节胶质细胞纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达及谷氨酸和 S-100 蛋白的合成等。bFGF 能促进多种神经细胞的增殖和分化,猜测其在神经再生中具有重要作用。Gu 等^[12]通过比较各种生长因子对大鼠背根神经节的作用证实,bFGF 比其他生长因子如神经生长因子 (NGF) 和神经调节蛋白 (NRG) 等对神经胶质细胞和施旺细胞的促分裂作用强很多^[12]。上述研究都表明,bFGF 具有较强的神经营养作用,并能促进多种神经细胞增殖分化,这都为利用外源 bFGF

治疗神经损伤疾病提供了新思路。

3.2 bFGF 在周围神经组织损伤中的修复作用

bFGF 能促进轴突近端神经残端产生分支,影响神经细胞、施旺细胞和成纤维细胞的增殖分化,在周围神经损伤和再生过程中扮演着重要的角色^[13]。bFGF 及其受体在背根神经节和周围神经均高度表达,同其他神经营养因子如 NGF、BDNF 等协同作用,发挥促周围神经再生的作用。已有实验表明,外源性 bFGF 对于保护受伤感觉神经元和轴突横断再生都有明显作用^[14]。Oliveira 等^[15] (2014) 通过对成年 Wistar 大鼠舌下神经进行单边横断处理,分别于 3 天和 11 天后处死,通过免疫组化和尼氏染色发现舌下神经横断侧比另一侧 bFGF 含量明显升高,证明神经胶质细胞通过旁分泌产生 bFGF 对舌下神经产生保护作用。Duobles 等^[16]通过免疫组织化学和免疫印迹方法检测发现在大鼠坐骨神经损伤后,周边的施旺细胞和背根神经节 (DRG) 卫星细胞对于 bFGF 和钙离子结合蛋白 S100 β 的表达量都明显升高,之后发现 S100 β 蛋白能促进损伤神经周边细胞分泌 bFGF 从而修复受损神经。这预示着 bFGF 和 S100 β 蛋白的联合作用能在周围神经损伤修复过程中发挥重要作用。另外 Shimizu 等^[17]通过建立人脑和周围神经细胞株模拟体内血-神经屏障 (BNB),发现 bFGF 能通过上调 claudin-5 蛋白从而修复 BNB,并推测在周围神经组织中受损后,外周神经末梢会分泌 bFGF 产生促进轴突再生的作用,这个发现为 bFGF 改善血-神经屏障 (BNB),促进周围神经组织再生提供了新思路。

3.3 bFGF 在中枢神经系统损伤中的修复作用

bFGF 在多种中枢疾病中的作用近来取得诸多新进展,备受国内外研究者关注。bFGF 是基本的神经源性细胞因子,在促进成年小鼠多元神经干细胞的增殖和分化上都有着决定性作用^[18-19],这都预示着 bFGF 在中枢神经损伤后具有良好的促神经再生作用。Yang 等^[20]先是在体外通过光感基因调控技术促进星形胶质细胞分泌 bFGF,发现 bFGF 显著促进人类胚胎干细胞分化为多巴胺能神经元。之后又发现通过特定的光激发小鼠脑黑质中内源星形胶质细胞分泌 bFGF 可以促进多巴胺能神经干细胞的分化从而促进帕金森病后的大脑功能恢复。这个发现为通过靶向刺激星形胶质细胞分泌 bFGF 来治疗帕金森症提供一个新策略。此外 Sun 等^[21]通过大鼠对比实验发现给予创伤性脑损伤的大鼠注射外源性 bFGF 能显著提高大鼠脑部室管膜

下区和齿状回的神经细胞增殖,7天后,给予bFGF的大鼠认知功能明显提高,4周后有大量的新生细胞产生,其中大部分为神经细胞。之后,Zhang等^[22]分别利用大鼠脊髓损伤模型和PC12细胞,从体内和体外水平证实了bFGF可通过PI3K/Akt/mTOR信号通路,通过调节细胞自噬、凋亡,而增加大鼠脊髓损伤后神经元细胞的存活率,从而达到治疗脊髓损伤的目的。这为开发bFGF作为临床治疗中枢神经损伤疾病药物提供了理论基础。bFGF在中枢神经损伤后,参与神经再生和修复的过程,并起到了关键作用,不管是神经退行性疾病还是创伤引起的神经损伤,展现了bFGF在促神经修复领域广阔的应用前景。

4 问题和展望

bFGF是一种促细胞分裂的肝素结合蛋白,可诱导多种细胞的增殖与分化,对神经系统有重要作用^[23]。目前大量研究表明,bFGF不管在中枢神经系统或周围神经系统都有着有效的促神经再生作用。其对于多种神经元细胞的促增殖分化、迁移作用^[24],预示着bFGF在神经损伤疾病上具有广阔的临床应用前景。bFGF应用于外伤治疗的药物已上市多年并广受好评,而针对其在神经损伤上的应用研究,在动物实验上已初见成效。由于其体内用药的安全性一直未能得到很好的解决,故其在神经创伤修复的研究尚未进入临床实验。

bFGF在体内有非常强的促有丝分裂活性,这个特性使其在体内应用时有促肿瘤发生的危险^[25-26],解决这个问题可以极大地提高bFGF体内用药的安全性。为此,李晓萍等^[27]同样利用基因工程技术,将hbFGF第108位的丝氨酸用中性氨基酸丙氨酸代替,构建了促分裂活性降低的bFGF突变体(mhbFGF),这为解决bFGF体内强促有丝分裂活性的问题迈出了第一步。

与其它蛋白质类药物一样,bFGF也存在限制其临床应用的其他缺陷,包括稳定性差、体内半衰期短以及在一定程度上引起免疫反应等。而蛋白质的化学修饰可通过以某些物质如聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、肝素等作为修饰剂与蛋白质的活性基团发生反应,达到改善蛋白质性质,如解除异体蛋白质免疫原性、毒副作用以及增加活性、提高稳定性、延长体内半衰期的目的^[28]。而蛋白质的随机修饰产生的往往是不同修饰程度及不同修饰位点的产物混合物,这些混合物一般难以分开。同样的,利用基因工程技术,将人碱性成纤维细胞生长因子(hbFGF)的个别氨基酸替换,可得到高表达量的

突变型的bFGF^[29],这为解决bFGF化学修饰后纯化难度增加的解决提供了一个新思路。

最新的研究也开始关注开发bFGF用于神经损伤的新剂型上,如开发新型纳米包载材料,或新型生物亲和凝胶载体材料等方式。bFGF生物活性的多效性以及神经营养的广谱性,为其从基础走向临床提供了保证,bFGF对于神经损伤再生的研究,是对神经损伤治疗领域的一个新的探索和拓宽。希望在不久的将来,bFGF给药形式和稳定性等核心问题会很快得到解决,最终作为神经损伤治疗药物用于临床治疗之中。

参考文献

- [1] Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(7): 2515-2520.
- [2] Gospodarowicz D. Biological activity *in vivo* and *in vitro* of pituitary and brain fibroblast growth factor. *Symposium on Fundamental Cancer Research*, 1984, 37:109-134.
- [3] Xiang Q, Xiao J, Zhang H, et al. Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Journal of the International Society for Burn Injuries*, 2011, 37(5): 886-895.
- [4] Nguyen T H, Kim S H, Decker C G, et al. A heparin-mimicking polymer conjugate stabilizes basic fibroblast growth factor. *Nature Chemistry*, 2013, 5(3): 221-227.
- [5] Itoh N. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(10): 1819-1825.
- [6] Nakayama T, Mutsaers N, Tosato G. FGF2 posttranscriptionally down-regulates expression of SDF1 in bone marrow stromal cells through FGFR1 IIIc. *Blood*, 2007, 109(4): 1363-1372.
- [7] Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, et al. Inhibition of caspase-mediated anoikis is critical for basic fibroblast growth factor-sustained culture of human pluripotent stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(49): 34054-34064.
- [8] Lee J G, Kay E P. PI 3-kinase/Rac1 and ERK1/2 regulate FGF-2-mediated cell proliferation through phosphorylation of p27 at Ser10 by KIS and at Thr187 by Cdc25A/Cdk2. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011, 52(1): 417-426.
- [9] Tong B, Lu D, Wei Z, et al. Gleditsioside B, a triterpene saponin isolated from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis* Lam., abrogates bFGF-induced endothelial cell migration through preventing the activation of MMP-2 and FAK via inhibiting ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Vascular Pharmacology*,

- 2013, 58(1-2): 118-126.
- [10] Wang Z, Wang Y, Ye J, et al. bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischemia/reperfusion via activation of PI3K/Akt/ERK1/2 pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2015, 19(3): 595-607.
- [11] Dehghan S, Javan M, Pourabdolhossein F, et al. Basic fibroblast growth factor potentiates myelin repair following induction of experimental demyelination in adult mouse optic chiasm and nerves. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2012, 48(1): 77-85.
- [12] Gu Y, Xue C, Zhu J, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) facilitates differentiation of adult dorsal root ganglia-derived neural stem cells toward Schwann cells by binding to FGFR-1 through MAPK/ERK activation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, 52(4): 538-551.
- [13] Matsumine H, Sasaki R, Tabata Y, et al. Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014.
- [14] Grothe C, Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anatomy and Embryology*, 2001, 204(3): 171-177.
- [15] De Oliveira G P, Duobles T, Castelucci P, et al. Differential regulation of FGF-2 in neurons and reactive astrocytes of axotomized rat hypoglossal nucleus. A possible therapeutic target for neuroprotection in peripheral nerve pathology. *Acta Histochemica*, 2010, 112(6): 604-617.
- [16] Duobles T, Lima T S, Levy B D, et al. S100beta and fibroblast growth factor-2 are present in cultured Schwann cells and may exert paracrine actions on the peripheral nerve injury. *Acta Cirurgica Brasileira/Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, 2008, 23(6): 555-560.
- [17] Shimizu F, Sano Y, Abe M A, et al. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(1): 255-266.
- [18] Rai K S, Hattiangady B, Shetty A K. Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *The European Journal of Neuroscience*, 2007, 26(7): 1765-1779.
- [19] Werner S, Unsicker K, Von Bohlen, et al. Fibroblast growth factor-2 deficiency causes defects in adult hippocampal neurogenesis, which are not rescued by exogenous fibroblast growth factor-2. *Journal of Neuroscience Research*, 2011, 89(10): 1605-1617.
- [20] Yang F, Liu Y, Tu J, et al. Activated astrocytes enhance the dopaminergic differentiation of stem cells and promote brain repair through bFGF. *Nature Communications*, 2014, 5:5627.
- [21] Sun D, Bullock M R, McGinn M J, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 2009, 216(1): 56-65.
- [22] Zhang H Y, Wang Z G, Wu F Z, et al. Regulation of autophagy and ubiquitinated protein accumulation by bFGF promotes functional recovery and neural protection in a rat model of spinal cord injury. *Molecular Neurobiology*, 2013, 48(3): 452-464.
- [23] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(3): 235-253.
- [24] Laestander C, Engström W. Role of fibroblast growth factors in elicitation of cell responses. *Cell Proliferation*, 2014, 47(1): 3-11.
- [25] Samatar A A, Poulikakos P I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(12): 928-942.
- [26] Claperon A, Therrien M. KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3143-3158.
- [27] 李晓萍, 李校堃, 苏志坚, 等. 一种促分裂活性降低的 h b F G F 突变体的表达及纯化. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 49-52.
- Li X P, Li X K, Su Z J, et al. Expression and purification of basic fibroblast growth factor mutant with reduced mitogenic activity. *China Biotechnology*, 2005, 25(2): 49-52.
- [28] Chen X, Park R, Shahinian A H, et al. Pharmacokinetics and tumor retention of 125I-labeled RGD peptide are improved by PEGylation. *Nuclear Medicine and Biology*, 2004, 31(1): 11-19.
- [29] 李晓萍, 李校堃, 苏志坚, 等. 人碱性成纤维细胞生长因子突变体的高效表达. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(5): 32-35.
- Li X P, Li X K, Su Z J, et al. High level expression of a human basic fibroblast growth factor mutant. *China Biotechnology*, 2005, 25(5): 32-35.

The Development of the Study on bFGF Promote the Nerve Injury Repair

ZHANG Chao¹ XIANG Li-na¹ CHEN De-pei¹ LÜ Xin-xin¹ ZHAO Yi-tong¹ WANG Lu-yao¹
XIAO Jian^{1,2} ZHANG Hong-yu^{1,2}

(1 College of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

(2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology Pharmaceutical Engineering, Wenzhou 325035, China)

Abstract Basic fibroblast growth factor(bFGF) is part of the fibroblast growth factor (FGFs) family. bFGF is unique in that it is expressed both in the animal and human model but has also garnered attention for its extensive physiological functions and important clinical applications. Current evidence suggests that bFGF may play a prominent role in nerve cell regeneration, due to its pluripotent effects and neurotrophic action. Although it is already extensively studied in various disease states, there still remains much to be discovered about the functions and mechanisms in nerve regeneration of bFGF. The following review summarizes the current knowledge on bFGF with a special emphasis on central nervous system and peripheral nervous system disease.

Key words Basic fibroblast growth factor Injury of nerve Repair Signaling pathway

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

曹谊林 昌晓红 陈必强 陈红星 仇华吉 邓 宁 丁久元 杜 伟 顾 军 郭 宁
胡云峰 姜 韬 瞿 涤 郎志宏 李佳慧 李 寅 李元广 连婕妮 梁前进 林雪松
刘红梅 刘志敏 刘志培 卢文玉 马 岚 潘 皎 潘武宾 钱世钧 沈金玉 沈亚领
田平芳 王健伟 王静云 王锡锋 王云山 吴 洁 习欠云 向 华 徐寒梅 杨培龙
杨献光 叶兴国 叶志强 易 犁 张博润 张 巍 张艳丽 张 钊 张正斌 赵建龙
赵世光 郑永唐