

# 肝素结合表皮生长因子及其在恶性血液细胞中的表达与作用

袁向飞 陆敏\*

(中国医学科学院、中国协和医科大学血液学研究所, 血液病医院, 天津 300020)

**摘要** 肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)是EGF家族的成员之一,可以在多种组织和细胞中表达,参与多种病理生理过程。不管是它的前体蛋白(proHB-EGF)还是剪切后形成的sHB-EGF和HB-EGF-C都对细胞的生长和迁移具有重要的影响。但由于HB-EGF及其受体在血液系统肿瘤细胞中表达水平并不高,所以相关报道并不多见。随着相关研究的深入,HB-EGF在骨髓瘤和白血病细胞中的表达得到证实,而且对上述两种细胞具有诱导增殖的潜力,但具体机制大多仍未澄清。相信伴随着对这些机制的认识,会为骨髓瘤和白血病的治疗提供新的思路。

**关键词** 肝素结合表皮生长因子; ErbB; 骨髓瘤; 白血病

## 1 肝素结合表皮生长因子

肝素结合表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, HB-EGF)是EGF家族成员之一,作为在条件培养液中的U937细胞的分泌产物被首次确认,是20~22 kDa的糖蛋白<sup>[1]</sup>。它可以在多种组织和细胞中表达,比如:血管内皮细胞、炎症细胞、骨骼肌细胞、角质细胞和肿瘤细胞等,对多种细胞具有促丝裂素(mitogen)的作用<sup>[2]</sup>。

### 1.1 HB-EGF 的结构

像EGF家族的其他成员一样,HB-EGF最初作为膜结合蛋白被合成前体HB-EGF(proHB-EGF),proHB-EGF由208个氨基酸残基组成,包括信号肽、前肽、可溶性HB-EGF(sHB-EGF)、近膜区(juxtamembrane)、跨膜区(transmembrane)、胞浆区(cytoplasmic)等几个结构域(图1)<sup>[2]</sup>,此外在sHB-EGF区内还有白喉毒素(DT)结合区域(106~149残基之间),其中前肽在蛋白质合成后很快就被剪切掉<sup>[3]</sup>。随后,proHB-EGF在质膜上继续被基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease)或者ADAM(a disintegrin and metalloprotease)剪切成为sHB-EGF和胞内C末端残基(HB-EGF-C)两部分,该剪切作用会被G蛋白偶联受体信号等的激活而启动(图2)<sup>[4]</sup>。

### 1.2 sHB-EGF

sHB-EGF具有刺激细胞增殖和迁移的潜力,可以通过自分泌和旁分泌两种作用方式来实现。目前

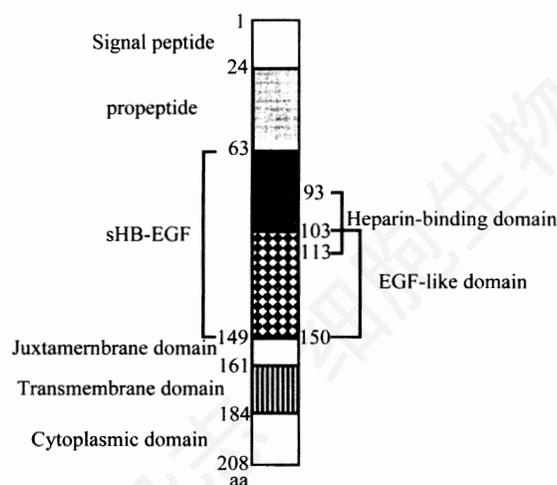


图1 proHB-EGF的结构<sup>[2]</sup>

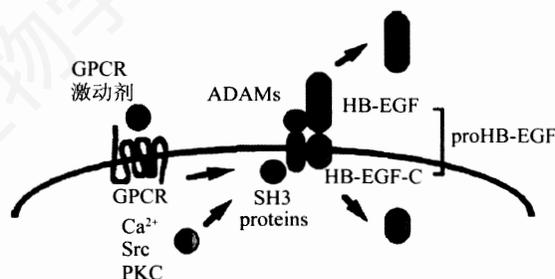
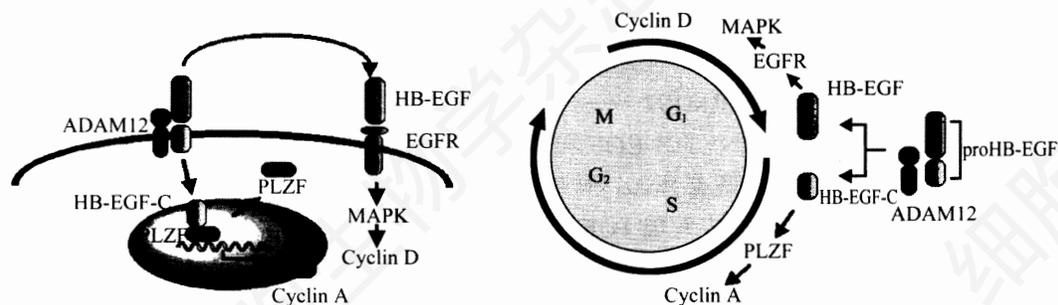


图2 ADAMs对proHB-EGF的剪切示意图<sup>[4]</sup>

收稿日期: 2005-01-18 接受日期: 2005-05-25

\* 通讯作者。Tel: 0572-2058578, E-mail: minlu001@yahoo.com

图3 sHB-EGF与HB-EGF-C对细胞周期的调控作用<sup>[7]</sup>

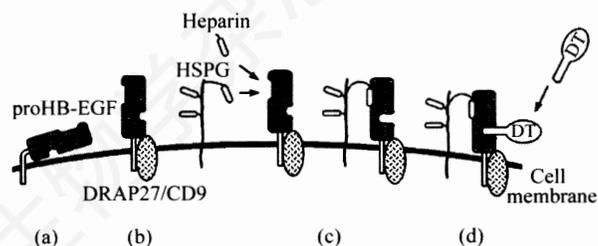
认为它共有3个受体：EGF receptor/erbB1/HER (EGFR), erbB4/HER4, NRDC(N-arginine dibasic convertase)。它可以直接结合并激活 erbB1 和 erbB4 的同二聚体，或者通过与 erbB1 和 erbB4 结合间接激活各自与 erbB2 形成的异二聚体，使 erbBs 发生自身磷酸化，启动下游的 MAPK 等信号通路，实现对一些基因转录的调控，影响细胞增殖和迁移。另外一些细胞表面的 HSPGs(heparan sulfate proteoglycans) 可以增强 sHB-EGF 与 EGFR 的结合及其活性<sup>[4,5]</sup>。NRDC 可以与 sHB-EGF 在细胞表面发生高度特异性的结合，并且增强 sHB-EGF 通过 EGFR 诱导的细胞迁移作用。上述的特异性很可能是通过 sHB-EGF 的肝素结合结构域来实现的，又鉴于 NRDC 自身缺乏激酶模体(motif)，很难具有下游的信号转导，以致增强迁移作用的机制不明<sup>[6]</sup>。sHB-EGF 还可以诱导其他生长因子和生长因子受体的转录，比如 TNF- $\alpha$ 、M-CSF 受体<sup>[3]</sup>。

### 1.3 HB-EGF-C

近来的研究显示 HB-EGF-C 并不是无用的剪切产物。剪切作用之后，HB-EGF-C 从质膜定位至胞浆，随后通过与核内的 PLZF(promyelocytic leukemia zinc finger protein)发生相互作用致使其出核，由于 PLZF 是转录阻遏物和细胞周期负性调节物，因而 HB-EGF-C 可以逆转 PLZF 造成的 cyclin A 的低表达和 S 期进入延迟。同时 sHB-EGF 亦可由 MAPK 通路调节 cyclin D 的表达，促进 G<sub>1</sub> 期的进程，二者协同促进细胞的增殖(图 3)<sup>[7]</sup>。

### 1.4 proHB-EGF

proHB-EGF 不仅仅是 sHB-EGF 的剪切前体，而且可以以近分泌的方式对细胞间的相互作用产生重要影响。尽管共培养实验证明福尔马林处理过的高表达 proHB-EGF 的细胞具有促进表达 EGFR 的细胞 (EP170.7 细胞)增殖的作用<sup>[8]</sup>，但若未经福尔马林处

图4 proHB-EGF与DT结合作用示意图<sup>[11]</sup>

(a)未结合 DT 的 proHB-EGF; (b)proHB-EGF 与 DRAP27/CD9 形成复合体; (c)肝素或 HSPG 诱导 proHB-EGF 变构; (d)DT 与 proHB-EGF 结合。

理，proHB-EGF 则出乎预料地表现出生长抑制和促凋亡作用<sup>[9]</sup>。有人推测这可能是由于 proHB-EGF 能够与 CD9、整联蛋白(integrin) $\alpha_3\beta_1$  和 HSPGs 等膜蛋白形成复合体，之后诱导 EGFR 的寡聚化产生凋亡和生长抑制信号，这是 sHB-EGF 和福尔马林固定的 proHB-EGF 都不会具有的生物活性<sup>[9]</sup>。新近的研究还显示 proHB-EGF 会增强细胞间的接触，阻止细胞的迁移；而 sHB-EGF 却有削弱细胞间作用，促进迁移的能力<sup>[10]</sup>。这些都揭示了 proHB-EGF 具有相异于 sHB-EGF 独特活性。

另外，proHB-EGF 还是白喉毒素(diphtheria toxin, DT)的特异性受体。DRAP27/CD9 与 proHB-EGF 形成蛋白质复合物，使 proHB-EGF 稳定地停留在细胞表面，也增加了 proHB-EGF 的 DT 结合位点，肝素或者 HSPG 与 proHB-EGF 的肝素结合结构域结合，使 proHB-EGF 发生变构，从而增强了 proHB-EGF 与 DT 的亲合力，最后 DT 与 proHB-EGF 的 EGF 样结构域产生特异性的结合(图 4)<sup>[11]</sup>。proHB-EGF 的晶体结构研究表明，肝素结合结构域与 EGF 样结构域相距很近，未结合 HSPG 的肝素结合结构域使 EGF 样结构域以不利于与 DT 结合的构型存在，在与 HSPG 结合后使 EGF 样结构域变构，以

利于与 DT 结合<sup>[12]</sup>。多年前就有文献报道了 DT 的抗肿瘤活性，但这是否出自 DT 分子的毒性还未有定论<sup>[13]</sup>，后来 Mitamura 等<sup>[14]</sup>证明了 CRM197——一种没有毒性的 DT 突变体可以通过干扰 HB-EGF 和 EGFR 的相互作用抑制细胞的增殖。还有 Buzzi 等<sup>[13]</sup>在使用 CRM197 治疗的肿瘤患者血清中发现 TGF- $\alpha$  的水平明显增加，外周血的嗜中性细胞数量也显著增加，产生抗肿瘤效果。他们推测其机制是由于肿瘤表面的 HB-EGF 与 DT 结合，致使肿瘤发生变异，引起嗜中性细胞的动员和 TGF- $\alpha$  的释放，启动抗肿瘤的细胞免疫机制。

## 2 HB-EGF 及其受体在恶性血液细胞中的表达与作用

HB-EGF 在正常心肺组织的发育中有重要的作用，而且还参与一些病理生理过程，比如：损伤愈合、胚泡植入、SMC 增生以及各种肿瘤<sup>[5]</sup>。已有的资料表明 HB-EGF 会在肝癌、结肠癌、膀胱癌和前列腺癌等肿瘤中大量表达并促进肿瘤的生长与血管形成<sup>[15]</sup>。下面就自身的研究领域，重点关注 HB-EGF 及其受体在血液系统恶性肿瘤细胞中的表达与作用。

### 2.1 HB-EGF 及其受体在骨髓瘤细胞中的表达及作用

De Vos 等<sup>[16]</sup>于 2001 年以 Atlas assay 方法在 3 个骨髓瘤细胞系(XG-1, XG-7, XG-14)中发现了 HB-EGF 基因的显著高表达，随后他们又以 RT-PCR 方法在上述细胞系中扩增出了 HB-EGF 的基因。结合之前骨髓瘤细胞表达 ErbB1 的报道，他们推测 HB-EGF 在骨髓瘤细胞中很有可能如在其他肿瘤细胞中一样发挥自分泌生长因子的作用。而且后来利用 HB-EGF 的中和抗体证明它会有效地抑制 XG-1 细胞系的生长。

接着 Wang 等<sup>[17]</sup>在高表达 HB-EGF 和 ErbB1 的骨髓瘤细胞系 XG-1 和 XG-14(同时也高表达 CD9)中发现：HB-EGF 的拮抗剂会遏制外源性 IL-6 诱导的细胞生长；在缺少外源性 IL-6 的条件下，重组 HB-EGF 支持细胞的长期生长，但是这种生长可以被 ErbB1、IL-6 或者 gp130/IL-6 转导复合体的抗体抑制。揭示了 HB-EGF 与 IL-6 协同刺激骨髓瘤细胞生长的作用，这种协同作用很可能与 gp130/HB-EGF/CD9/ErbB1 低亲和力复合物的形成有关(图 5)。另外他们还指出尽管自分泌的 HB-EGF 和 IL-6 都少得不

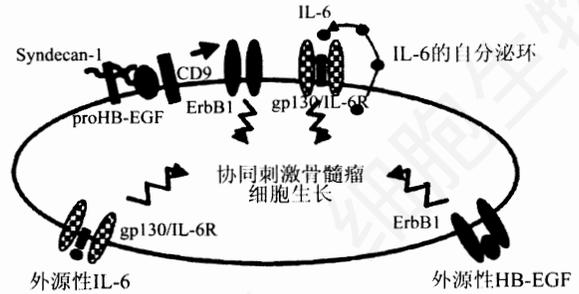


图5 CD9/HB-EGF/ErbB1与IL-6/IL-6R/gp130途径对骨髓瘤细胞生长的协同刺激作用<sup>[17]</sup>

足以支持自身的生长，但它们对触发外源性细胞因子的促生长作用极为关键。

作为骨髓瘤的生长因子，IL-6 激活 JAK/STAT 通路；IL-6 和 IGF-1 共同激活 MAPK 和 PI3K/AKT 通路；而 HB-EGF 诱导 AKT 的磷酸化，却没有诱导 STAT3 和 MAPK。令人不可思议的是，观察 HB-EGF 处理后 15 min 至 24 h 的细胞都未见 MAPK 的磷酸化。至于 PCL $\gamma$ 、PKC、Sarc 激酶等通路是否参与了 HB-EGF 诱导的骨髓瘤细胞的生长，还没有定论<sup>[18,19]</sup>。

根据来自正常外周血 B 细胞产生的多克隆浆母细胞不表达 ErbB，以及 ErbB 的抑制剂也不影响浆母细胞的产生等现象，推测 ErbB 只在骨髓浆细胞表达，或者作为浆细胞的原癌基因。还有另外一些实验证明骨髓瘤患者的骨髓环境，特别是单核细胞和基质细胞会产生 HB-EGF，而早期的骨髓瘤细胞却很少表达 HB-EGF 基因<sup>[19]</sup>。由此可以说明 HB-EGF 的自分泌作用可能并不是直接发生的，而是受到了骨髓环境的影响。

### 2.2 HB-EGF 及其受体在白血病细胞中的表达及作用

早先关于单核细胞、CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞和嗜酸性细胞会产生 HB-EGF 的报道，使 Vinante 等<sup>[20]</sup>怀疑其他造血系统的正常或肿瘤细胞也会产生 HB-EGF，于是就对一些急性髓系白血病细胞系进行了研究，结果见表 1。

从表 1 的结果可以看出除了 B 细胞系(L428 和 Raji)不能表达 HB-EGF 外，其他的髓样细胞和 T 细胞系都能表达。对于表达 HB-EGF 的细胞经 DNA 电泳测定它们所表达的都是 605 bp 的完整 HB-EGF mRNA，都可以被 DT 的毒性杀死，并且它们产生的 HB-EGF 都可以促进 Balb/c 3T3 细胞的增殖，这

**表1 基础条件下 HB-EGF、HER-1、HER-4 和 CD9 在各细胞系的表达<sup>[20]</sup>**

细胞株	HB-EGF mRNA	白喉毒素敏感性	HER-1	HER-4 mRNA	CD9
U973	+	+	-	+	-
THP-1	+	+	-	-	+
ML-3	+	+	-	+/-	-
HL-60	+	+	-	+/-	-
K562	+	-	-	-	+
Jurkat	+	+	-	-	+
Karpas299	+	+	-	+	-
L540	+	+	-	-	-
L428	-	-	-	-	-
Raji	-	-	-	-	-
2C8	-	-	-	-	Nd

Nd: 表示没有试验。

种增殖效应可以被 HB-EGF 抗体抑制。这些都足以说明白血病细胞系中表达的 HB-EGF 具有完整的活性<sup>[20]</sup>。

ErbB1 在这些细胞中都没有被检测到, 但是用 RT-PCR 可以检测到 U973 和 Karpas299 有 ErbB4 mRNA 的表达<sup>[20]</sup>, 一些刺激因子据报道也会诱导 ErbB4 在 THP-1 细胞中的表达<sup>[21]</sup>。估计除了直接的旁分泌和自分泌作用之外, HB-EGF 还有可能通过诱导第二因子来起作用, 比如 VEGF<sup>[22]</sup>。

此外在一些 HB-EGF 表达阴性的白血病细胞中发现, 它们可以被 TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、ATRA 和  $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$  诱导产生 HB-EGF, 其机制的关键很可能在于 HB-EGF 基因启动子上的 NF- $\kappa$ B 和 AP1 结合位点<sup>[20]</sup>, 还有人认为与 Ras 通路的激活有关<sup>[3]</sup>。据称, 实际上 TNF- $\alpha$  可以动员 NF- $\kappa$ B; 维生素 A、维生素 D 的受体可以识别 AP1 结合位点, 并以自身的  $\beta$  亚基与其结合; 而 GM-CSF 激活 Ras 和 Raf-1 以及 MAPK 通路。

### 3 展望

目前, 人们正在致力于评价 ErbB 抑制剂对多发性骨髓瘤病人的临床疗效, 而且已经开始在动物模型中研究 ErbB 抑制剂是否可以阻断骨髓瘤细胞的生长<sup>[23]</sup>。由于 IL-6 与 HB-EGF 有协同作用, 人们怀疑用 IL-6 的单克隆抗体也可以取得同 ErbB 抑制剂

相似的疗效。另外, 根据骨髓环境对骨髓瘤细胞生长的影响, 一种蛋白酶抑制剂——PS341, 用来治疗多发性骨髓瘤, 被寄予厚望<sup>[24]</sup>。

由于 HB-EGF 及其受体在白血病细胞系中的表达量不高, 所以它们与白血病发生的关系, 至今研究得并不深入, 诸如何种白血病细胞会受 HB-EGF 的影响; 在受影响的白血病细胞中什么细胞因子会被诱导; 还有其中发生的信号转导, 都有待于进一步的研究。鉴于已经证实 HB-EGF 抗体对某些白血病细胞的生长抑制作用, 以及可能存在的与多种其他因子的协同作用, HB-EGF 抗体与其他因子抗体的联合应用有望为白血病的治疗提供新的方案。此外, 很多白血病细胞表达 proHB-EGF, 与 DT 结合后产生细胞毒性, 而 DT 本身是不可用于临床治疗的, 所以 DT 的无毒性突变体也有望用于白血病的治疗。还有 DT 与 GM-CSF 和 IL-3 的融合蛋白, 据说对白血病细胞有选择性, 而且效果不错<sup>[20]</sup>。

### 参考文献 (References)

- [1] Higashiyama S *et al. Science*, 1991, **251**: 936
- [2] Iwamoto R *et al. Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, **11**: 335
- [3] Harris RC *et al. Exp Cell Res*, 2003, **284**: 2
- [4] Nanba D *et al. Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, **15**: 13
- [5] Nishi E *et al. Growth Factors*, 2004, **22**: 253
- [6] Nishi E *et al. EMBO J*, 2001, **20**: 3342
- [7] Nanba D *et al. J Cell Biol*, 2003, **163**: 489
- [8] Higashiyama S *et al. J Cell Biol*, 1995, **128**: 929
- [9] Iwamoto R *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 25906
- [10] Singh AB *et al. J Cell Sci*, 2004, **117**: 1365
- [11] Shishido Y *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 29578
- [12] Takazaki R *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 47335
- [13] Buzzi S *et al. Cancer Immunol Immunother*, 2004, **53**: 1041
- [14] Mitamura T *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 1015
- [15] Ongusaha PP *et al. Cancer Res*, 2004, **64**: 5283
- [16] De Vos J *et al. Blood*, 2001, **98**: 771
- [17] Wang YD *et al. Oncogene*, 2002, **21**: 2584
- [18] Klein B *et al. Int J Hematol*, 2003, **78**: 106
- [19] Mahtouk K *et al. Blood*, 2004, **103**: 1829
- [20] Vinante F *et al. Blood*, 1999, **93**: 1715
- [21] Mograbi B *et al. Eur Cytokine Netw*, 1997, **8**: 73
- [22] Abramovitch R *et al. FEBS Lett*, 1998, **425**: 441
- [23] Rebouissou C *et al. Blood*, 1998, **91**: 4727
- [24] Richardson PG *et al. N Engl J Med*, 2003, **348**: 2609

## The HB-EGF and Its Expression and Function in the Malignant Blood Cells

Xiang-Fei Yuan, Min Lu\*

(*Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China*)

**Abstract** HB-EGF is a member of EGF family, which is expressed in various tissues and cells, and involves in many pathologic and physiological processes. ProHB-EGF and its products of cleavage including sHB-EGF and HB-EGF-C play roles in the proliferation and migration. However, there have been few reports about the relationship between the HB-EGF and malignant blood cells because of the low levels expressions of HB-EGF and its receptors. Recent studies have confirmed the expression of HB-EGF in myeloma and leukemia cells. HB-EGF has the potency of inducing these cells to proliferate, but unfortunately, the mechanisms are unclear. Understanding of these mechanisms is essential in order to develop new methods to treat leukemia and myeloma.

**Key words** HB-EGF; ErbB; myeloma; leukemia

Received: January 18, 2005 Accepted: May 25, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-572-2058578, E-mail: minlu001@yahoo.com