

结缔组织生长因子对血管生成和细胞功能的调节

云 云 张红锋*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 结缔组织生长因子(CTGF)是CCN家族的主要成员,是研究较多的CCN蛋白之一。CTGF能促进细胞的增殖、存活、迁移和黏附,调节血管生成分子(bFGF, VEGF)以及一些影响胞外基质完整性和稳定性的分子(胶原、MMPs和TIMPs)的活性。CTGF可以在多个控制位点采取直接或间接的机制调控细胞功能和血管生成。结合新的发现和新的视点,阐述CTGF对细胞功能和血管生成的调控作用以及与肿瘤生长的关系。

关键词 结缔组织生长因子; CCN; 血管生成; 肿瘤生长; 迁移和黏附

上世纪90年代初Bork等^[1]发现CTGF、CYR61、NOV等蛋白质在结构上都存在胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)、Von Willebrand因子、血小板反应蛋白等结构域,他将这些蛋白质归为以CCN缩写的一类蛋白质家族。CCN家族成员在结构上高度相关,除了上述3种蛋白质以外,还有最新发现的WISP1/elml、WISP2/opI和WISP3(WISP, Wnt-inducible secreted protein)。CCN蛋白属于膜结合蛋白,包含4个不连续的结构域,即IGF结合结构域(IGFBP)、寡聚结构域(VWC)、细胞黏附结构域(TSP-1)和二聚化结构域(CT)^[2]。多种因素能诱导CCN蛋白的表达,例如TGF- β 、骨形态发生蛋白(BMPs)等。CCN蛋白与细胞外周环境中的其他蛋白质相互作用,并通过与整合素的结合参与到多种关键的信号通路中(图1)^[2]。

近年来,一些强有力的证据证实了结缔组织生长因子(CTGF)是血管生成和细胞功能的重要调节分子。CTGF能促进细胞的增殖、存活、迁移和黏附,这些作用主要通过细胞表面整合素调节。CTGF具有天然的血管生成活性,可与其他血管生成蛋白在多种不同水平相互作用调节血管生成。CTGF在内皮细胞的表达模式支持了它对正常内皮细胞动态平衡的重要调节作用^[3]。

1 CTGF的结构和生物学特征

CTGF是富含半胱氨酸的多肽,含349个氨基酸残基。编码人CTGF的基因内含5个外显子和4个内含子。CTGF包含4个功能结构域(图2)^[4]。

CTGF在多种细胞类型中可被TGF- β 诱导产

生。TGF- β 被认为是具有致纤维化作用的重要细胞因子之一,其促纤维化作用可能主要通过诱导结缔组织生长因子CTGF的表达来完成。早期研究证实TGF- β 以一种受体激活的方式启动了细胞内信号转导过程。活化后的TGF- β 受体激活胞浆中的Smads,从而启动胞内信号转导过程^[5]。TGF- β 主要在转录水平调节CTGF表达。对CTGF的诱导需要CTGF启动子上Smad结合结构域和邻近的TEF反应元件(图3)^[4]。血管内皮生长因子(VEGF)也可以调控CTGF的表达。Kondo等^[6]提出VEGF对CTGF的诱导是转录后水平调控,CTGF mRNA水平的上升是由于VEGF诱导了CTGF mRNA的稳定机制。

CTGF是胞外基质(ECM)相关蛋白和细胞表面分子的桥梁分子,它可以利用整合素作为信号传递受体,诱导不同环境中细胞内的信号级联反应包括激酶激活和基因转录。CTGF调节细胞黏附、迁移、增殖、分化和存活的所有功能均能通过细胞与基质特别是整合素受体相互作用来实现^[7]。

2 CTGF对细胞功能的调节

2.1 细胞表面整合素受体

整合素是一类重要的细胞黏附分子受体,分布在大多数体细胞的表面。结构上由 α 和 β 亚基以非共价键结合形成跨膜异二聚体。整合素作为一种信号传递分子介导细胞内外双向信号传递,参与细胞的多种生理功能^[8]。而CTGF作为一种胞外分泌蛋

收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-04-05

* 通讯作者。Tel: 021-62233549, Fax: 021-62233754, E-mail:

hfzhang@bio.ecnu.edu.cn

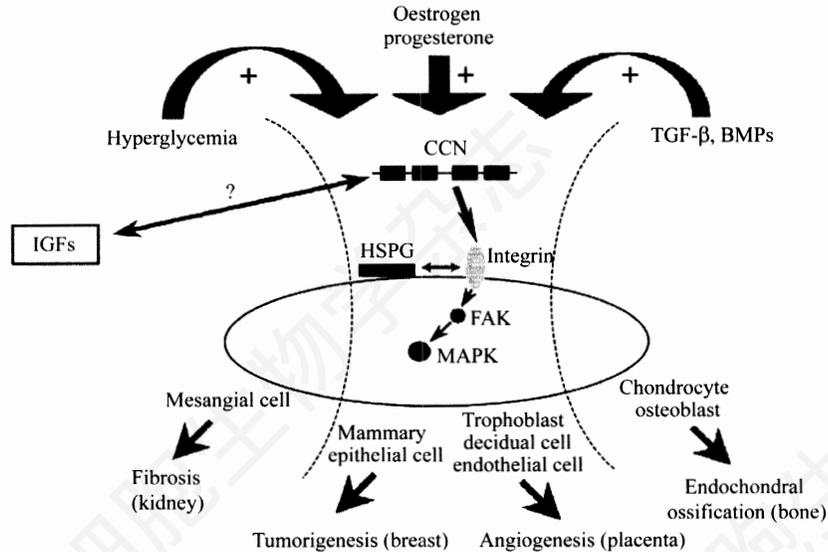


图1 CCN蛋白参与调控的关键信号通路^[2]

CCN蛋白被TGF- β 、BMPs等细胞因子诱导分泌后，与细胞表面整合素受体相互作用激活了局部黏着斑激酶(FAK)和促分裂原活化激酶(MAPK)信号通路。目前已经报道CYR61/CCN1、CTGF/CCN2和NOV/CCN3可以作用于成纤维细胞或内皮细胞的表面受体，诱导下游信号级联反应，产生了各种不同的生物学效应。

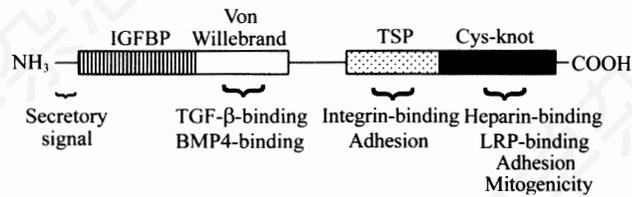


图2 CTGF的4个功能结构域^[4]

CTGF由4个主要的蛋白质结构域组成，包括胰岛素样生长因子结合结构域(IGFBP)、Von Willebrand因子C型重复结构域(VWC)、血小板反应蛋白1型重复结构域(TSP-1)以及生长因子半胱氨酸群(CT)。



图3 CTGF的转录元件^[4]

黑色部分表示CTGF的启动子区，白色部分为CTGF基因的编码区，3'端UTR区域以灰色部分表示。TGF对CTGF的诱导作用需要Smad和TEF两个启动子元件。3'端UTR中的CAESAR元件参与CTGF转录后的抑制。其他的调控元件还包括Sp1和TATA框。

白，主要通过和细胞表面整合素受体相互作用实现其生物学功能^[7]。由于整合素信号与其他信号协同作用，使得整合素调控的CTGF信号通路具有相当的可塑性。已经鉴定 $\alpha v\beta 3$ ， $\alpha v\beta 5$ ， $\alpha IIb\beta 5$ ， $\alpha 6\beta 1$ 等几种整合素受体在不同细胞表面可与CTGF相互

结合。此外细胞表面的硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)可以作为整合素的辅助受体促进整合素与CTGF的相互作用^[9]。

2.2 CTGF促进细胞存活

Gao等^[10]报道CTGF可以诱导原代培养的大鼠肝脏星型细胞(HSC)中I κ B α 的磷酸化和降解，促进了NF- κ B在核中积累，被激活的NF- κ B然后与DNA上的NF- κ B结合位点相互作用，促发基因的转录。CTGF促进了血清饥饿状态的HSC细胞的存活，保护了细胞免受由于NF- κ B信号通路受阻而引起的细胞死亡。这个过程需要整合素 $\alpha v\beta 3$ 的参与。在HSC细胞中，整合素 $\alpha v\beta 3$ 是CTGF的主要信号传递受体，整合素 $\alpha v\beta 3$ 的参与可以抑制HSC细胞的凋亡。在HSC细胞被激活过程中，CTGF和整合素表达上调，而HSC细胞被激活的持续性纤维化表型至少部分是由于CTGF与整合素结合引发了NF- κ B的存活信号^[10]。

2.3 CTGF促进细胞增殖和分化

早期研究指出CTGF可持续活化p42/p44 MAPKs，促进成纤维细胞增殖。可能的机制是CTGF替换了与ECM结合的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)，提高了刺激靶细胞的bFGF有效浓度，从而放大了bFGF的有丝分裂原活性^[11]。

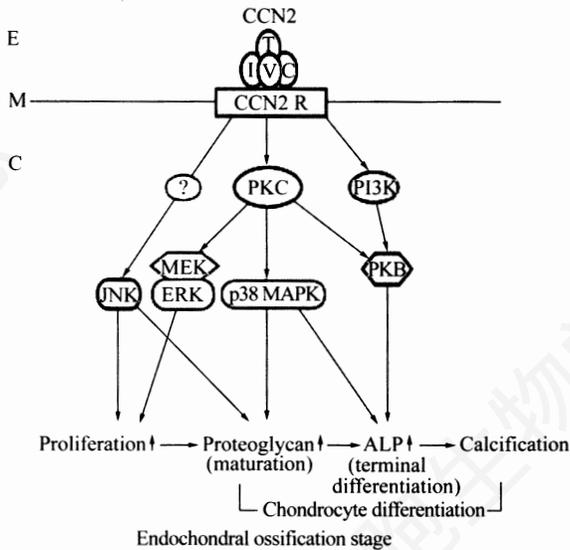


图4 软骨骨化过程中胞内信号^[12]

图中缩写分别表示：E，胞外基质区域；M，细胞膜；C，细胞基质；I，IGFBP结构域；T，TSP-1结构域；V，VWC结构域；C，CT结构域；CCN2R，CTGF的受体。PKC在CCN2信号中起到了关键的作用，它将CCN2的信号传递给ERK、p38 MAPK和PKB三种关键的激酶，从而促进了骨细胞的扩增和分化。PI3K信号通路对于软骨细胞的终末分化是必要的。此外，CCN2激活的JNK信号促进了软骨细胞的增殖和成熟。

CTGF与细胞表面受体(整合素、LDP-1、G蛋白偶联受体等)结合引发细胞内磷酸化信号促进软骨细胞的扩增、分化和成熟，这个过程分别需要ERK和p38 MAPK的调节。Yosimichi等^[12]再一次提出MAPK级联反应参与这个过程并发现JNK也可以调控CCN2引发的信号通路。文章进一步分析了CTGF信号通路上游激酶，并指出PKC作为多种信号通路的驱动分子促进了人软骨肉瘤细胞(HCS-2/8)扩增和分化；PI3K在细胞的终末分化中传递信号；JNK调控的信号通路促进了软骨细胞的成熟和分化(图4)。

2.4 CTGF介导细胞黏附于FN

早期报道证实了CTGF是一种细胞黏附因子。EDTA、含RGD的多肽以及整合素的单克隆抗体均能阻断整合素 $\alpha\beta 3$ 与CTGF结合从而阻断了CTGF对血管内皮细胞的黏附作用^[3]。

CTGF缺陷的小鼠胚胎成纤维细胞不能与纤连蛋白(fibronectin, FN, 调节成纤维细胞在组织发育和创伤愈合过程中黏附于临时的基质)黏附，其平滑肌肌动蛋白纤维形成受阻以及ERK和FAK的磷酸化水平下降，结果提示CTGF可能加强成纤维细胞的黏附作用^[13]。

酵母双杂交系统在HCS-2/8细胞系中筛选到FN是与CTGF相互结合的主要蛋白质，而且发现仅有CTGF的C末端结构域(C-terminal domain, CT)结构域可以直接与FN结合，该作用可被整合素 $\alpha\beta 1$ 的抗体阻断。这个发现第一次提出了CTGF的C末端的CT结构域直接与FN相互作用促进HCS-2/8的黏附，并需要整合素 $\alpha\beta 1$ 的参与^[14]。

2.5 CTGF促进细胞迁移

实验证明CTGF具有化学趋向性和化学运动性，直接促进了内皮细胞的转移^[15]。CTGF化学趋向性可被抗整合素 $\alpha\beta 3$ 的抗体阻断，表明该整合素亚型不仅参与细胞黏附也参与了细胞迁移^[16]。

最近发现CTGF在肾小球系膜细胞中诱导细胞迁移和细胞骨架重组，细胞骨架重组过程中FAK和paxillin去磷酸化，RhoA失活，Cdc42激活，以及PKC- ζ 和GSK-3 β 磷酸化，这些变化伴随着PKC- ζ 定位到细胞的前缘处。PKC- ζ 的抑制剂阻断了CTGF诱导PKC- ζ 所引起的细胞迁移，而且发现PKC- ζ 的突变(dominant negative)导致CTGF诱导的细胞迁移作用受阻。这些数据第一次提出CTGF通过局部黏附复合体的完全解聚和细胞极性的激活来调控细胞迁移^[17]。

3 CTGF对血管生成作用的调节

3.1 CTGF对血管生成的影响

最初在人脐静脉血管内皮细胞(HUVECS)中检测到CTGF的表达，后来发现动脉血管内皮组织、肺血管以及胚胎绒毛膜组织均有CTGF的表达^[18]，提示CTGF可能参与血管生成作用。大量实验证明CTGF参与整合素 $\alpha\beta 3$ 介导的血管内皮细胞黏附、促进游走、提高生长因子诱导的细胞增殖、诱导体内血管生成。CTGF的反义寡核苷酸和反义RNA均可抑制内源性CTGF引起的血管生成作用。将含有10 μg 重组的hCTGF的胶原颗粒皮下注射到老鼠背部或者将含有100 ng的重组小鼠CTGF植入大鼠角膜中，观察7天后发现强烈的血管生成反应^[19,20]。

CTGF通过其他机制间接的影响血管生成。例如，血管生成分子bFGF由于CTGF将其从ECM上替换下来而被协同提高^[3]。在血管生成过程中，VEGF165与CTGF结合并形成复合体后^[21]，VEGF165就不能与VEGF-R2相互作用，从而失去了促进毛细血管形成的能力。基质金属蛋白酶(MMP)可以选择性降解CTGF/VEGF165复合体中

CTGF的结构域,从而逆转了VEGF165的血管生成活性^[3]。

3.2 CTGF在组织损伤和修复中的作用

CTGF促进血管生成从而有利于损伤修复。正常生理周期中子宫内膜的内皮细胞表达CTGF有利于月经后的血管重塑^[22]。TNF受体p55-缺陷的Balb/c 3T3老鼠表皮切口处CTGF高表达并出现高水平的血管生成和胶原积累^[23]。提示CTGF在损伤愈合过程中调控了新血管形成。

4 CTGF的血管生成作用与肿瘤生长的关系

血管生成是体积超过1~3 mm³的实体瘤所必须的生物过程,而且血管网络的形成以及血液的供应是肿瘤生长和发展的限速步骤^[24]。

Yang等^[25]发现CTGF在促进肿瘤生长的前列腺基质细胞中组成型的表达,将反转录诱导CTGF表达的重组成纤维细胞与LNCap细胞在不同的胞外基质条件下共培养,发现表达CTGF并且显著促进了肿瘤生长的基质出现较高的微血管密度,表明在肿瘤反应性基质微环境中,CTGF可能是血管生成的关键调节分子。早期报道裸鼠的MDA231乳腺癌细胞株移植瘤和HT1080纤维肉瘤细胞株移植瘤中有高水平的新血管形成,其CTGF的蛋白质水平和mRNA水平也较其他非血管生成肿瘤高^[26]。CTGF在肿瘤细胞和肿瘤内皮中的分布与其潜在的致病机制和血管生成机制相一致,但是精确的机制还不是很清楚。

值得注意的是对于不同的组织或细胞类型,CTGF的生物学效应并不相同。动静脉血管内皮细胞表达CTGF可诱导血管生成,促进卵泡发生和胚胎发育。而血管平滑肌细胞CTGF的过表达则可能导致动脉硬化。神经系统中的化学损伤诱导星型胶质细胞分泌CTGF,参与胶质瘤的形成。而纤维原细胞中CTGF的过表达则导致了纤维增殖紊乱和器官纤维化。CTGF诱导的不同细胞效应至少部分与细胞表面不同的整合素受体有关^[9]。

5 展望

CTGF能直接刺激细胞黏附、迁移、扩增和存活,其血管生成特性则主要反映在它翻译后的调控水平,例如与ECM结合、蛋白质降解以及调节其他血管生成分子(bFGF, VEGF)和影响ECM稳定性和完整性的分子(如胶原, MMPs和TIMPs)的活性上。参与血管生成作用的一些步骤被不同的细胞类型所利用而参与到其他一些生物过程中,如发育、分化和纤维化,而CTGF的作用机制可能是靶向一些特殊的细胞类型使其向某一个过程发展。我们推测,CTGF能够通过整合素激发细胞内部的信号级联反应,也能够通过调节整合素与生长因子之间的串话效应,从而引起该处生长因子的释放,还可以与生长因子直接结合相互作用。显然,任何一种作用机制的模型都将可能受到细胞周围环境其他调节分子的影响,当前的挑战是如何把所有可能性均放置在某个适当的背景中形成统一的假说来解释CTGF在体内的调控机制。

参考文献(References)

- [1] Bork P. *FEBS Lett*, 1993, **327**: 125
- [2] Brigstock DR. *J Endocrinol*, 2003, **178**: 169
- [3] Brigstock DR. *Angiogenesis*, 2002, **5**: 153
- [4] Leask A et al. *Biochem Cell Biol*, 2003, **81**: 355
- [5] Kretzschmar M et al. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, **8**: 103
- [6] Kondo S et al. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5**: 129
- [7] Rachfal AW et al. *Vitam Horm*, 2005, **70**: 69
- [8] Ratnikov BI et al. *J Thromb Haemost*, 2005, **3**: 1783
- [9] Schober JM et al. *Blood*, 2002, **99**: 4457
- [10] Gao R et al. *Cell Commun Signal*, 2005, **3**: 14
- [11] Kolesnikova TV et al. *Oncogene*, 1998, **16**: 747
- [12] Yosimichi G et al. *Bone*, 2006, [Epub ahead of print]
- [13] Chen Y et al. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 5635
- [14] Hoshijima M et al. *FEBS Lett*, 2006, [Epub ahead of print]
- [15] Babic AM et al. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 2958
- [16] Kireeva ML et al. *Exp Cell Res*, 1997, **233**: 63
- [17] Crean JK et al. *FASEB J*, 2004, **18**: 1541
- [18] Moussad EE et al. *Mol Genet Metab*, 2000, **71**: 276
- [19] Shimo T et al. *J Biochem (Tokyo)*, 1999, **126**: 137
- [20] Babic AM et al. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 2958
- [21] Inoki I et al. *FASEB J*, 2002, **16**: 219
- [22] Uzumcu M et al. *Mol Hum Reprod*, 2000, **6**: 1093
- [23] Mori R et al. *FASEB J*, 2002, **16**: 963
- [24] Folkman J. *Nat Med*, 1995, **1**: 27
- [25] Yang F et al. *Cancer Res*, 2005, **65**: 8887
- [26] Shimo T et al. *Oncology*, 2001, **61**: 315

Regulation of Angiogenesis and Cell Function by Connective Tissue Growth Factor

Yun Yun, Hong-Feng Zhang*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Connective tissue growth factor (CTGF), which has been investigated more, is a member of the CCN family of proteins. CTGF can promote cell growth, migration, adhesion and survival. It can also regulate the production and/or activity of other angiogenic molecules (e.g. bFGF, VEGF) as well molecules that affect the integrity or stability of the ECM (e.g. MMPs, TIMPs). CTGF can participate in a variety of direct and indirect mechanisms by which angiogenesis and cell function are regulated at multiple control points. Here, we elucidated the regulation of angiogenesis and cell function by CTGF and its correlation with tumor growth combining with new discoveries and new insights.

Key words connective tissue growth factor; CCN; angiogenesis; tumor growth; migration and adhesion

Received: February 16, 2006

Accepted: April 5, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233549, Fax: 86-21-62233754, E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn