

黏着斑激酶与细胞迁移

安君艳 张晓岚*

(河北医科大学第二医院, 河北省消化病研究所, 河北省重点实验室, 石家庄 050000)

摘要 细胞迁移过程始于细胞前端板状伪足的形成、外周黏附的建立、细胞体的收缩和尾部的解离。黏着斑激酶是一种非受体酪氨酸蛋白激酶, 通过其激酶活性和“脚手架”的功能在细胞迁移的各个过程中发挥关键作用。现重点介绍黏着斑激酶介导的信号转导通路及其在调控细胞迁移方面的研究进展。

关键词 黏着斑激酶; 细胞迁移; 信号通路

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体酪氨酸蛋白激酶, 通过多种信号通路参与调节细胞生长、发育、细胞周期调控、细胞骨架重组、黏附和迁移等过程。近年来国内外学者对 FAK 在细胞迁移中的具体作用进行了较为广泛深入的研究, 现综述如下。

1 FAK的结构特征

目前, 对 FAK 的结构了解的已比较清楚。FAK 基因定位于人染色体的 8q24, cDNA 全长 4 285 bp, 编码 1 052 个氨基酸, 进化过程中高度保守, 各种生物来源的 FAK 有高达 90% 的同源性。功能区分为三个: N 端区、激酶区和 C 端区, 每个区域约 400 个氨基酸。其 N 末端为一个 FERM 同源结构域(band 4.1-ezrin-radixin-moesin), 可以同其他蛋白酪氨酸激酶以及细胞骨架相关蛋白埃兹蛋白相互作用^[1]; 其 C 末端包含两个脯氨酸富集区, 能和含有 SH3 结构的蛋白结合, 使 FAK 参与调节细胞骨架运动。此外, FAK 的 C 末端区域还包括一个黏着斑靶向(focal adhesion targeting, FAT)序列, 可作为踝蛋白及桩蛋白的结合位点, 并与鸟嘌呤核苷酸交换因子如 p190RhoGEF (一种 RhoA 特异性的 GDP/GTP 交换因子)相互作用, 这可促进后者的磷酸化并与 RhoA 的活性增强有关^[2]; 激酶区的 6 个磷酸化位点是 FAK 发挥信号转导功能的关键部位, 其中 Tyr397 是其主要的自磷酸化位点^[3]。

2 FAK活化的调节

FAK 的激活需要 Tyr397 残基的自磷酸化。在未激活的 FAK 内, N 端区和 C 端区结构域相互连接,

掩蔽了催化结构域和 Tyr397。整合素与细胞外间质(extracellular matrix, ECM)配体结合后, 促使黏着斑形成, 其 β_1 、 β_3 和 β_5 亚基的胞质端与 FAK 的 N 端区结合, 触发 FAK 的构象改变, 使激酶结构域处于活化状态, 同时 Tyr397 自身磷酸化。磷酸化的 Tyr397 是 Src 家族的高亲和力结合位点, 可消除 Src 的自体抑制, Src 被激活, 进而催化 FAK 的 Tyr407、Tyr576、Tyr577、Tyr861 和 Tyr925 磷酸化, 使 FAK 完全活化。Tyr576 和 Tyr577 位于激酶结构域的活化环内, 是 Tyr397 和 FAK 完全磷酸化的必需条件; 磷酸化的 Tyr925 是 Grb2 衔接蛋白的结合位点, 介导 FAK 与 Grb2/SOS 信号复合体的相互作用; Tyr861 磷酸化与 H-Ras 诱导的 NIH3T3 细胞迁移以及 TGF- β_1 诱导的鼠乳房上皮细胞的间充质化有关, 此外, Lunn 等^[4]的研究表明 Tyr861 的磷酸化在抵抗高渗应激引起的上皮细胞凋亡方面发挥关键作用; Tyr407 可能是其他 SH2 蛋白的结合部位, 亦有学者认为其可负性调控 FAK 的活性和功能^[5]。此外, FAK 的活化还依赖于细胞骨架的完整性, 如经细胞松弛素 D 处理的细胞 FAK 的激活明显受限, 支架蛋白(桩蛋白和张力蛋白)也可能在整合素激活 FAK 中起作用。

FAK 的活性与外界刺激密切关联。与此一致, 如果在细胞中去除整合素介导的细胞黏附, FAK 就会迅速发生去磷酸化, 这一过程是由蛋白酪氨酸磷酸酶所介导的, 如第 10 号染色体缺失性磷酸酶张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome Ten, PTEN)。此外, 细胞还可通过

收稿日期: 2008-05-05 接受日期: 2008-09-05

河北省自然科学基金资助项目(No.C2008001133)

*通讯作者。Tel: 0311-66002951, E-mail: xiaolanzh@126.com

自发表达 FAK 的 C 末端 FRNK (FAK-related non-kinase, FRNK) 而达到抑制 FAK 磷酸化的目的^[6]。一般认为 FRNK 定位于黏着斑局部, 可与 FAK 竞争在 FAT 的结合位点, 从而使其免受整合素的调控并防止其活化。

3 FAK介导的信号转导通路

3.1 FAK-Ras-MAPK 通路

FAK 激活后与 Src 形成 FAK-Src 复合物。一方面磷酸化 Crk (CT-10-regulated kinase) 相关底物 (Crk-associated substrate, CAS) 和桩蛋白, 除可以调节细胞骨架外, 还产生其他含 SH2 的结构域蛋白如 Crk 的结合部位; 接头蛋白 Crk 的 SH3 区与 Ras 的鸟苷酸交换因子 C₃G 结合, 由此形成经 Crk 激活的 Ras-MAPK 途径^[7]。另一方面使 FAK 的 Tyr925 磷酸化, 为接头蛋白 Grb2 提供结合位点。Grb2 的 SH3 区与 Ras 的鸟苷酸交换因子 SOS (son of sevenless) 结合, 实现经 Grb2 激活 Ras-MAPK 的途径。活化的 MAPK 可激活多种转录因子, 如 c-fos、c-jun, 最终影响基因的表达。

3.2 FAK-CAS 通路

CAS 家族蛋白包括 p130CAS、人细丝增强子 1 (human enhancer of filamentation 1, HEF1) 及 Src 相互作用蛋白 / 胚胎 Fyn 的底物 (Src-interacting protein/embryonal Fyn substrate, Sin/Efs)。FAK 的 C 末端含有可以与 CAS 的 SH3 区域相结合的序列, 从而为 CAS 提供了结合位点。当细胞的 Src 与 FAK 结合后, 可最大限度的磷酸化 CAS 蛋白, 导致 Crk 家族衔接分子的再募集、小 GTP 酶的活化, 如 Rac1 或 Cdc42 和 JNK, 促进胞膜突起形成和细胞迁移。与 CAS 家族蛋白在细胞运动中作用相一致的是, 从 p130CAS 缺失的小鼠中分离的成纤维细胞表现为细胞迁移功能的缺失。HEF1 和 Sin/Efs 基因剔除小鼠模型还未见报道。在体外细胞实验中, Cox 等^[8]的研究证实 HEF1 可促进血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 刺激的胶质瘤细胞的迁移, 而采用 siRNA 下调 HEF1 的表达水平, 则可明显抑制 FAK 的促细胞迁移作用, 这说明 HEF1 可能作为 FAK 的下游信号分子而在细胞迁移中发挥促进作用。

3.3 FAK-PI3K 通路

FAK/PI3K 的结合是通过 FAK 的 Tyr397 直接连接到 PI3K p85 亚基的 SH2 和 SH3 结构域实现的。激活的 PI3K 催化磷脂酰肌醇-4 磷酸 (phosphatidyl inositol-

4-phosphate, PIP) 和磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸 (phosphatidylinositol phosphatidyl inositol-4,5-biophosphate, PIP₂) 的肌醇环 D3 位磷酸化, 分别生成 PI(3,4)P₂ 和 PI(3,4,5)P₃。这两种产物均与细胞骨架重组有关, 参与调节细胞的黏附、迁移、抗凋亡等行为。Reif 等^[9]系统研究了 FAK-PI3K-Akt 信号转导通路在肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 迁移、增殖和胶原生成中的作用, 发现用可表达 FAK 抑制蛋白 (其功能类似于 FRNK) 的腺病毒载体 Ad5FAK-CD 感染 HSC, 在显著降低 FAK 表达和磷酸化水平的同时, 也明显降低了 PI3K 的活性, 进一步的研究证实, 无论是用 Ad5FAK-CD 感染 HSC, 还是用 PI3K 的特异性抑制剂 LY294002 干预 HSC, 均可明显抑制 HSC 的 DNA 合成、黏附和迁移, 且二者的抑制效果极为相似, 说明 PI3K 可能作为 FAK 的下游信号分子在 HSC 的黏附和迁移中发挥不可替代的作用。

3.4 FAK-STAT1 通路

信号转导和转录激活 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 通路是从细胞表面受体到基因调控的信号转导通路。除了 JAK 激酶可直接磷酸化 STAT 外, 多种酪氨酸蛋白激酶也可与 STAT 结合并使其活化, 进而介导细胞的黏附、迁移和增殖等生物学行为。Xie 等^[10]的研究证实 FAK 可直接与 STAT 结合并使其活化, 但这种结合具有 STAT1 特异性且依赖于 FAK 的 C 端结构域。STAT1 激活导致细胞黏附下降和迁移增强。

3.5 FAK-Rho/ROCK 通路

FAK C 端区的脯氨酸序列是 FAK 相关的 GTP 酶调节因子 (GTPase regulator associated with FAK, Graf) 的高亲和力结合位点。与 FAK 结合的 Graf 可以作为 Rho GTP 酶的负性调节因子, 进而影响肌动蛋白张力纤维和黏着斑的聚集过程, 最终调节细胞的黏附和迁移^[11,12]。Rac 和 Cdc42 的活化与 FAK 抑制 Rho 的活性是肌动蛋白细胞骨架动态变化的重要联系点^[13]。

4 FAK与细胞迁移

细胞迁移在许多生理和病理过程中发挥重要作用, 如胚胎发育、免疫防御、损伤修复、血管新生以及肿瘤侵袭和转移等。目前公认的细胞迁移过程是细胞前端板状伪足的形成、新黏附的建立、细胞体的收缩和尾部的解离^[14], 在此过程中涉及到肌动蛋白细胞骨架的聚合、解聚和重新组装, 受复杂的信号转导通路的调节, 其中 FAK 及其介导的下游信号

分子在上述各个过程中发挥重要作用。FAK 缺失或过度表达的各种实验证实 FAK 对整合素刺激的细胞迁移是必要的,一方面其可通过直接磷酸化某些蛋白,如踝蛋白、桩蛋白以及 CAS 家族蛋白而发挥其催化活性,另一方面可参与黏着斑的动态组装,通过其作为“脚手架”分子功能而发挥作用^[15]。

4.1 板状伪足的形成

板状伪足的形成是细胞迁移的第一步,与肌动蛋白的聚合有关,主要受 Rac 调节。生长因子、细胞因子和细胞外间质可诱导 Rac 发挥作用,抑制 Rac 的活性将抑制细胞的迁移能力。

以往认为 Rac 的激活途径主要有以下 3 种:①酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体通过 PI3K 途径激活 Rac。Rac 在被酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体激活时必须要有 PI3K 的参与,抑制 PI3K 的活性将阻止 Rac 的顺利激活;② Crk/DOCK180 和 CAS 也是 Rac 激活和板状伪足形成的通路。SOS1 是 Ras、Rac 的交换蛋白,可能在 Crk 激活 Rac 中发挥作用。SOS1 还通过另外两个接头蛋白 EPS8、E3GB1 参与 Ras 到 Rac 通路的激活;③在具有 β_3 亚基的整合素, Rac 的激活依赖非 Rac 依赖性的整合素在细胞膜上的聚集以及钙蛋白酶的功能。

近年来的研究证实 FAK 在 Rac 的激活中也起着重要作用。Hsia 等^[16]采用 FAK^{-/-} 及 FAK^{+/+} 的成纤维细胞,系统研究了 FAK 在介导细胞迁移和侵袭中的作用及其与 Rac 活化的关系。结果表明,在无血清条件下,仅可在 FAK^{+/+} 成纤维细胞中检测到 Rac 的活化,但总 Rac 水平在两种细胞中的表达则无明显差异;在血清刺激下,两种细胞中均可检测到 Rac 的活化,但在 FAK^{-/-} 的成纤维细胞中 Rac 的活化水平明显降低。为了进一步研究 FAK 表达在促进 Rac 活化中的作用,研究者采用表达 FAK 的重组腺病毒转染 FAK^{-/-} 的成纤维细胞,发现 FAK 的再表达可明显促进内源性 Rac 的活化,而采用 Tyr397 突变的腺病毒转染则观察不到这一现象,说明 FAK 的磷酸化水平对 Rac 的活化起着不容忽视的作用。

另外,亦有研究表明在某些细胞系中 FAK 对细胞的迁移速度并无明显影响。Braren 等^[17]的研究结果显示,FAK 基因缺失可导致内皮细胞肌动蛋白骨架和黏着斑结构异常,影响细胞伪足的形成,并进而破坏细胞的铺展能力,但对细胞的迁移速度无明显影响; Tilghman 等^[18]采用 RNA 干扰技术,观察特异性阻断 FAK 表达对 REF52 细胞迁移能力的影响,发现与对

照组相比,FAK siRNA 处理组的细胞迁移时不能形成宽大的伪足结构,而代之以多个突起的形成,但迁移速度无明显降低。

4.2 细胞与基质黏附

板状伪足通过黏着斑与 ECM 发生黏着,细胞头部与 ECM 的黏附形成提供了细胞迁移的锚定力。而细胞迁移过程中细胞和 ECM 之间的接触是呈动态变化的,有新黏附的形成也有黏附的解离,只有这样才能使细胞顺利的向前运动。

FAK 通过其“脚手架”的分子功能和催化活性在黏着斑的动态组装和解体中发挥重要作用。Slack-Davis 等^[19]采用一种针对 FAK 激酶区的小分子抑制剂 PF-573,228,在多种细胞系中进行研究后发现,PF-573,228 可呈剂量依赖性的降低 FAK 及其下游分子桩蛋白的磷酸化水平,同时明显抑制了纤维连接蛋白(fibronectin, FN)诱导的细胞平面和跨膜迁移能力。进一步对 PF-573,228 处理后的细胞进行观察发现,其局部黏着的解聚速度较对照组明显减慢,表现为黏附时间的延长和迁移能力的降低。Hsia 等^[20]的研究发现 FAK^{-/-} 的成纤维细胞中,有大量的应力纤维和局部黏着形成,从而限制了细胞的运动能力,FAK 的再表达则有效逆转了这一现象,进一步说明 FAK 参与了细胞局部黏着的解离。

然而, Rovida 等^[21]的研究结果则有所不同,研究者采用 siRNA 阻断细胞外信号转导激酶 5 (extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5) 的表达,发现 HSC 的迁移能力不仅没有降低,而且明显增加,并发现 ERK5 剔除的细胞中黏着斑多位于细胞的前缘,而对照组中黏着斑多位于细胞的腹侧面,这与细胞迁移能力的改变相一致;进一步的研究表明,ERK5 的基因沉默可以明显降低 FAK 的磷酸化水平,故推测 FAK 的低磷酸化水平可以通过影响黏着斑的动态组装而促进细胞的迁移。由此可见,FAK 在细胞迁移中的具体作用尚有争议,仍需大量研究加以证实。

4.3 细胞体收缩

细胞体的收缩依赖于肌动蛋白产生的收缩力,受 FAK 的调节。FAK925 位点的酪氨酸磷酸化能够募集含有 SH2 的 Grb2,导致 SOS-Ras-Raf-MEK-ERK 途径的激活,磷酸化肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和钙蛋白酶(calpain),最终使肌动蛋白和肌球蛋白收缩^[22]。此外, Bianchi 等^[23]的研究表明:FAK 上的某些丝氨酸位点,如 Ser722 通过糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)

和蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1)的介导以磷酸化的方式也参与了细胞迁移的调节。Jacamo 等^[24]的研究亦证实 FAK 的 Ser843 可通过负性调控 Tyr397 的磷酸化水平而降低多种细胞系的铺展和迁移能力。

4.4 细胞尾部解离

细胞尾端和周围基质黏着的解离是细胞迁移的 1 个限速步骤,其调节机制依细胞类型和黏着的力量不同而不同。在迁移缓慢的细胞,其可能是通过钙蛋白酶不断的降解细胞尾部上局部黏着的成分实现的,而 FAK 可促进钙蛋白酶定位于局部接触部位和黏着斑^[25]。此外,FAK 和 GTP 酶对微管诱导的黏着斑分解均起重要作用,从而共同促进了细胞尾部的解离^[26]。

5 小结

FAK与细胞迁移密切相关,其可整合黏着斑处的各种物理和生物刺激来调控多种蛋白复合体的局部聚集和解离,并通过复杂的信号通路调控细胞的多种生物学功能。众所周知,细胞迁移的各个步骤在时间和空间上是协调的整体,在此过程中所涉及的多条信号转导通路之间也存在着广泛且复杂的交联机制,形成一个复杂的信号网络。然而,这些刺激因素如何激活 FAK,FAK 及其上下游的各种信号分子如何相互影响,FAK 的磷酸化调节到底对黏着斑与细胞迁移有何最终影响,以及如何利用 FAK 作为靶点促进或抑

制细胞的迁移,这些问题的解决还需要进行大量的研究工作。相信随着研究的逐步深入,必将为多种疾病,特别是肿瘤转移的防治提供重要的理论依据和治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Ceccarelli DF *et al.* *J Biol Chem*, 2006, **281**: 252
- [2] Zhai J *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 24865
- [3] Hamadi A *et al.* *J Cell Sci*, 2005, **118**: 4415
- [4] Lunn JA *et al.* *J Biol Chem*, 2007, **282**: 10370
- [5] Lim Y *et al.* *J Biol Chem*, 2007, **282**: 10398
- [6] Nagoshi Y *et al.* *Med Mol Morphol*, 2006, **39**: 154
- [7] Huang C *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 4619
- [8] Cox BD *et al.* *J Cell Biochem*, 2006, **99**: 35
- [9] Reif S *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 8083
- [10] Xie B *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 19512
- [11] Ren XD *et al.* *J Cell Sci*, 2000, **113**: 3673
- [12] Chen BH *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 33857
- [13] Hauck CR *et al.* *IUBMB Life*, 2002, **53**: 115
- [14] Ridley AJ *et al.* *Science*, 2003, **302**: 1704
- [15] Sieg DJ *et al.* *Nat Cell Biol*. 2000, **2**: 249
- [16] Hsia DA *et al.* *J Cell Biol*, 2003, **160**: 753
- [17] Braren R *et al.* *J Cell Biol*, 2006, **172**: 151
- [18] Tilghman RW *et al.* *J Cell Sci*, 2005, **118**: 2613
- [19] Slack-Davis JK *et al.* *J Biol Chem*, 2007, **282**: 14845
- [20] Hsia DA *et al.* *J Cell Biol*, 2003, **160**: 753
- [21] Rovida E *et al.* *J Hepatol*, 2008, **48**: 107
- [22] Glading A *et al.* *Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 2499
- [23] Bianchi M *et al.* *Biochem J*, 2005, **391**: 359
- [24] Jacamo R *et al.* *J Cell Physiol*, 2007, **210**: 436
- [25] Carragher NO *et al.* *Curr Biol*, 2003, **13**: 1442
- [26] Ezratty EJ *et al.* *Nat Cell Biol*, 2005, **7**: 581

Focal Adhesion Kinase and Cell Migration

Jun-Yan An, Xiao-Lan Zhang*

(Hebei Province Key Laboratory, Hebei Institute of Digestive Disease, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstracts The process of cell migration is initiated by protrusion at the leading edge of the cell, the formation of peripheral adhesions, the exertion of force on these adhesions, and finally the release of the adhesions at the rear of the cell. Focal adhesion kinase is intimately involved in the regulation of this process through its kinase activity and its function as a scaffolding molecule. This review focus is limited to the signal transduction pathways mediated by focal adhesion kinase and its role in regulation of cell migration.

Key words focal adhesion kinase; cell migration; signal pathway

Received: May 5, 2008 Accepted: September 5, 2008

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2008001133)

*Corresponding author. Tel: 86-311-66002951, E-mail: xiaolanzh@126.com