

碱性成纤维细胞生长因子研究进展

丁焕文 何锡煌*

(广州军区广州总医院创伤外科 广州 510010)

早在 30 年代末 Trowell 等就发现机体组织提取物中有一种能促进成纤维细胞生长的活性物质存在^[1],但是由于这种物质提纯极为困难,故其结构和性质一直未弄清楚,直到 70 年代中期, Gospodarowicz 比较了机体不同组织之间这种活性物质的含量,发现其在脑垂体中含量最高,并首次将其从脑垂体中初步提纯出来,因其能促进成纤维细胞增殖,故命名为成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)^[2]。后来发现 FGF 与肝素有特异性亲和力,据此特性引入肝素-Sepharose 亲和层析使得 FGF 纯化效果大为提高,采用 Gospodarowicz 介绍的硫酸铵盐析、CM-sephadex C-50 阳离子交换层析及肝素-Sepharose 亲和层析三步提纯方法可得到纯度达 90% 以上的 FGF^[3]。此后有关 FGF 的研究发展很快,现在 FGF 的一般理化性质、分子结构、生物学功能、作用机理等均已积累了大量资料。以往研究表明,FGF 虽然在体内含量甚微,但生理功能广泛,有很好的临床应用前景。

一、FGF 家族成员

酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是 FGF 家族的两个主要成员。两者结构和功能很相似,其氨基酸顺序同源性达 55%,作用于相同受体,均对热不稳定,易被蛋白酶降解等^[4]。但是,两者又有明显区别(见表 1)。

除 aFGF 和 bFGF 以外,FGF 家族还有 5 种结构相关蛋白,其中 hst 基因编码蛋白分别在 kaposi 肉瘤及人胃癌 DNA 转染的 NIH 3 T3 细胞中被发现^[5], int-2 基因编码蛋白存在于

表 1 bFGF 与 aFGF 的区别

	a FGF	b FGF
等 电 点	5.6	9.6
与肝素亲和力	弱	强
与肝素、结合后生物活性改变	增强	不变
体内分布	脑组织、视网膜、肾脏、骨	脑组织、视网膜、肾脏、骨、软骨、肾上腺、脑垂体、黄体、胎盘、早期胚胎

病毒引起的小鼠乳腺癌中^[6],角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)能特异性促进上皮细胞增殖^[7]。int-2 基因编码蛋白、hst 基因编码蛋白, FGF-5、KGF 分别由 243、206、267、194 个氨基酸组成,与 bFGF 分别有 44%、43%、43%、39% 的氨基酸顺序同源, hst 基因编码蛋白、FGF-5、KGF mRNA 均含有引导它们向细胞外分泌的信号序列,但 aFGF、bFGF、int-2 基因编码蛋白则缺乏这种信号序列^[4,7]。最近又发现了 FGF-6^[8]。

二、bFGF 的分子结构

bFGF、aFGF 基因分别位于人类第 4、5 对染色体上^[9]。两者结构相似,均为单拷贝基因,呈不连续状态,其功能区被两个内含子隔开分为三个外显子区域。bFGF 基因长度大于 38 kb,第一个内含子位于第 60 和 61 位密码子之间,第二个内含子位于第 94 和 95 位密码子之间^[10]。

bFGF mRNA 有两种形式,分别为 4.6 kb、2.2 kb,由 bFGF mRNA 反转录的 cDNA

* 第三军医大学西南医院骨科 (重庆 630038)

序列已研究清楚,在bFGF cDNA可读框架(open reading frame, ORF)中可见到一个常见的AUG起始密码、UGA终止密码,根据AUG与UGA之间密码子所推导出的氨基酸序列与以往组织中提纯的bFGF的氨基酸序列完全一致^[9]。此外于常见起始密码AUG前面三个不同位置尚有少见起始密码CUG存在,已证实该CUG密码分别起动了三种氨基末端延长形式(分子量分别为24、23.1、22 kD)的bFGF的合成^[11]。

据bFGF cDNA序列分析,bFGF应由155个氨基酸组成,分子量约为18 kD^[11],但是从不同组织来源提纯的bFGF肽链长短不一,分子量均小于18 kD,如:牛脑垂体bFGF由146个氨基酸组成^[8],黄体bFGF最短,仅由130个氨基酸组成^[12]。bFGF羧基末端较氨基末端稳定,上述各种少于155个氨基酸的bFGF均为其氨基末端截取形式。现已证实含155个氨基酸的bFGF其氨基末端截取少于25个氨基酸时并不影响其生物学活性。Ueno等认为这种氨基末端截取形式的bFGF与提纯过程中的酶裂解有关,因为他在从胎盘组织提纯bFGF过程中加入蛋白酶抑制剂后,得到了含157个氨基酸的bFGF^[13]。

bFGF在生物进化上具有很强的保守性,如:人和牛bFGF只有两个氨基酸不同,其氨基酸顺序同源性达98.7%,鸟类和牛bFGF完全相同。但是aFGF的保守性较bFGF差,如:人和牛aFGF有11个氨基酸不同^[4,10]。

三、bFGF的生物学功能

在体外bFGF对广泛的中胚层和神经外胚层来源的细胞如:成纤维细胞、血管内皮细胞、骨细胞、软骨细胞、肾上腺皮质和髓质细胞、神经元、神经胶质细胞等均有明显的促细胞分裂增殖作用^[10];此外bFGF还能使一些培养细胞如:3T3细胞、垂体细胞^[14]等发生形态改变以及对多种中胚层来源的细胞具有趋

化作用^[15]。

在体内bFGF的生物学功能亦相当广泛,它能够:(1)促血管形成。(2)诱导中胚层形成。(3)促进肢体再生^[10]。(4)参与创伤修复过程,促软组织、软骨组织、骨组织等损伤修复^[16]。(5)具有神经营养作用,促进脑、脊髓组织损伤修复^[17]。(6)作用于中枢神经系统抑制胃酸、胃蛋白酶分泌,有利于溃疡愈合^[18]。(7)影响内皮细胞功能,控制高血压、动脉粥样硬化^[19]。(8)影响免疫细胞活性,调节免疫系统功能^[20]。

四、bFGF作用机制

bFGF、aFGF均通过与其靶细胞膜上受体结合而发生作用,因此细胞内合成的bFGF、aFGF必须分泌至细胞外才能发挥其生物学功能;但是从其cDNA序列来看,两者均缺少引导它们向细胞外分泌的信号序列,故bFGF、aFGF的分泌途径较为特殊。据已有的实验推测,bFGF可通过以下两条不常见的途径分泌,第一是通过细胞膜微小破裂而释放。第二是通过细胞的死亡而释放^[21]。

FGF受体(FGF receptor, FGFR)至少有四种形式,均由细胞外区(extracellular region)、跨膜区(transmembrane region)、胞浆内的近膜区(juxtamembrane domain)和酪氨酸激酶区(tyrosine kinase domain)组成。其中FGFR-1、FGFR-2因其mRNA交替拼接(alternate splicing)而存在多种变异型(variant)^[22]。由于每种FGFR均能和FGF家族每个成员结合,而不同FGFR的表达存在着组织细胞特异性。因此同一种FGF因作用于存在不同FGFR的靶细胞会产生不同的应答反应,而不同的FGF作用于存在相同FGFR的靶细胞又会产生相同的应答反应^[22]。

FGFR数目在不同靶细胞之间差异较大,约3000—8000个/细胞,如:牛主动脉内皮细胞含FGFR 3000个/细胞,而BHK细胞(baby hamster kidney-derived cell)则高达8000个/

细胞。同一靶细胞膜上 FGFR 的数目亦并非恒定不变, 易受各种调节因素的影响, 如: BHK 细胞经 bFGF 作用后 FGFR 数目减少^[4]。

bFGF 与 FGFR 结合后可能通过以下途径将信号传至细胞核: (1) 激活腺苷酸环化酶与鸟苷酸环化酶。(2) 激活磷脂酶 C 通过肌醇脂代谢途径产生第二信使——三磷酸肌醇和甘油二酯, 导致蛋白激酶 C 激活、Ca²⁺ 内流。(3) 与 FGFR 相关联的酪氨酸激酶发生作用。(4) bFGF 与 FGFR 复合物的内部化 (internalization)^[23,24]

bFGF 与肝素、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 能在体内、外相互作用。bFGF 与肝素结合后发生以下改变: (1) 对温度、酸的稳定性增强。(2) 不易受蛋白酶降解^[25]。最近 Prestrelski 用红外分光光谱分析法研究发现 bFGF 和肝素结合后其构象发生改变。这种变化很局限, 位于 bFGF 红外光谱的酰胺 I 区。

ECM 中含有肝素硫酸盐蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 和糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAG), HSPG 和 GAG 中均含有结合状态的肝素分子, bFGF 可通过与 HSPG、GAG 中的肝素分子结合而存在于 ECM 中^[4]。

ECM 在体内起着贮藏 bFGF 的仓库作用, 能为 FGFR 被持续占有提供不断的配体来源。因为 Moscatelli 发现 bFGF 在与 FGFR、ECM 结合之间存在着相互平衡, 在体外细胞试验中用低 pH 的方法移走与 FGFR 结合的 bFGF 后, 与 ECM 结合的 bFGF 可向 FGFR 转移, 达到新的平衡^[26]。Presta 等的实验更进一步证实了上述结论, 他们发现内皮细胞经 bFGF 短时间 (30—60 min) 作用后用 PBS 清洗, 换以不含 bFGF 的培养液, 内皮细胞仍能产生血纤溶酶原激活物, 如果同时设法除去与 ECM 结合的 bFGF, 则内皮细胞产生血纤溶酶原激活物的功能消失^[27]。

ECM 可在肝素酶、血纤溶酶作用下释放

出与 HSPG、GAG 结合的 bFGF, 这种 bFGF-HSPG、bFGF-GAG 复合物不仅能像游离的 bFGF 一样与 FGFR 结合, 而且更加稳定, 不易被蛋白酶降解, 且因其在体内不再与 ECM 结合, 故较游离 bFGF 更易通过 ECM 向四周弥散。因此 bFGF 与 HSPG、GAG 结合对其在体内发挥作用有一定意义。

综上所述, bFGF、细胞、ECM 之间的相互作用可建立下述模型: bFGF 从其合成细胞释放后, 一部分与周围细胞或自身胞膜受体结合, 促进周围细胞或自身增殖、分化, 此为旁分泌或自分泌作用; 另一部分则与 ECM 结合, 在生理或病理状况下, ECM 中的 bFGF 在肝素酶、血纤溶酶作用下从 HSPG、GAG 分子内释放出来, 与周围靶细胞受体结合, 促进其增殖、分化, 此为迟发的旁分泌作用。

五、问题和展望

由于 bFGF 在组织中含量甚微, 仅依靠从组织中提取的方法耗费人力、物力太大而产量很有限, 因此长期以来有关 bFGF 的研究仅限于基础领域, 难以向临床应用发展。但是近几年随着生物工程技术的发展, 已能大量生产重组人 bFGF 以满足临床需要, 因此开展 bFGF 的临床应用研究是以后研究 bFGF 的主要方向。此外以下几方面亦有待于进一步研究: (1) 由于单一生长因子的体内作用有限, 且在生理状况下亦是多种生长因子相互作用而调节的, 故必须研究 bFGF 和其他生长因子之间的协同作用。(2) 由于 bFGF 易被蛋白酶降解, 且要求 bFGF 在体内发挥作用要时间长、持续占有其靶细胞受体, 因此研究一些能保护 bFGF 免受蛋白酶降解的良好载体以及使 bFGF 从载体上缓慢释放的装置等均具有较大意义。(3) bFGF 能和生物膜上的肝素分子结合, 故研究一种结合有 bFGF 的生物膜可作为一种新型的敷料。(4) 由于 bFGF 和某些癌基因编码蛋白具有同源性, 而且某些肿瘤组织中 bFGF 含量亦增多, 因此研究 bFGF 和肿瘤组

织发生、发展的关系仍有一定的理论和临床意义。(5)由于bFGF能促进所有参与创伤修复的细胞增殖,且具有明显的促进血管形成作用,而血管形成又是创伤修复过程必不可少的一个环节,因此研究bFGF在创伤愈合过程中的地位和作用对其临床应用具有较大意义。

摘 要

碱性成纤维细胞生长因子是一种在体内分布广泛、生理功能重要的生长因子,本文综合讨论了其家族成员、分子结构、生物学功能、作用机理和研究趋向等问题。

参 考 文 献

- [1] Trowell OA et al., 1939, *J Exp Biol.*, 16: 60.
- [2] Gospodarowicz D et al., 1975, *J Biol Chem.*, 250(7): 2525.
- [3] Gospodarowicz D et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 81: 6963.
- [4] Rifkin DB et al., 1989, *J Cell Biol.*, 109: 1.
- [5] Yoshida T et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 7305.
- [6] Dickson C et al., 1987, *Nature*, 326: 833.
- [7] Finch PW et al., 1989, *Science*, 245: 752.
- [8] Marices I et al., 1989, *Oncogene*, 4: 335.
- [9] Mergia A et al., 1986, *Biochem Biophys Res Commun.*, 138(2): 644.
- [10] Gospodarowicz D., 1990, *Clin Orthop Relat Res.*, 257: 231.
- [11] Florkiewicz RZ et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 86: 3978.
- [12] Gospodarowicz D et al., 1985, *Endocrinology*, 117(6): 2383.
- [13] Ueno N et al., 1986, *Biochem Biophys Res Commun.*, 138(2): 580.
- [14] Inoue K et al., 1991, *J Endocr.*, 130: 381.
- [15] Phillips GD et al., 1991, *Europ J Clin Invest.*, 197: 458.
- [16] Lobb RR et al., 1988, *Europ J Clin Invest.*, 18: 321.
- [17] Koshinaga M et al., 1993, *Exp Neurol.*, 120: 32.
- [18] Okumura T et al., 1991, *Biochem Biophys Res Commun.*, 177(2): 809.
- [19] Luevas P et al., 1991, *Science*, 254: 1208.
- [20] Johnson HM et al., 1985, *J Immunol.*, 134(5): 2824.
- [21] Muthukrishnan L et al., 1991, *J Cell Physiol.*, 148: 1.
- [22] Patstone G et al., 1993, *Dev Biol.*, 155: 107.
- [23] Gannoun-zaki L et al., 1991, *Exp Cell Res.*, 197: 272.
- [24] Zhang X et al., 1993, *J Biol Chem.*, 268(13): 9611.
- [25] Coltrini D et al., 1993, *Eur J Biochem.*, 214: 51.
- [26] Moscatelli DJ et al., 1988, *J Cell Biol.*, 107: 753.
- [27] Presta M et al., 1989, *J Cell Physiol.*, 140: 68.

神 经 营 养 因 子

黄 芳 费 俭 刘 晓 郭 礼 和

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

神经营养因子(Neurotrophin)是一类含量极少,对神经系统生命活动非常重要的、可溶性多肽因子。它们来源于靶细胞,逆向营养神经元,对脊椎动物神经系统的发生、发育、成

熟、衰老、死亡、疾病等有直接的作用,又因其是通过刺激酪氨酸激酶受体(Trk)的自身磷酸化进行信号传导,因此神经营养因子已成为倍受瞩目的研究热点。