

- 1240:277-284.
- [6] Lewis, J G. et al., 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:3176-3181.
- [7] Lin, Q S. Yang, J P. and Wang, D., 1995, *Biopolymer and Bioproducts (Structure, Function and Applications)* Published for the Organising Committee, 11th FAOBMB Symposium by Samakkhisan (dokya)Public Comany Limited, 46-53.
- [8] Farhood, H., 1992, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1111**:239-246.
- [9] Watanabe, Y. et al., 1994, *J. Biochem.*, **116**:1220-1226.
- [10] Ciccarone, V. et al., 1994, *Forcs*, **15**(3):80-83.
- [11] Mizuguchi, H. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**:402-407.
- [12] Wang, D. Jing, N H. and Lin, Q S., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**:450-455.
- [13] Liu, F. et al., 1996, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1278**:5-11.

碱性成纤维细胞生长因子(Basic FGF)的结构、功能、释放机理及其与肿瘤发生的关系

王楠 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

目前,对 FGF 家族中的 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)的研究已日益引起人们的关注。bFGF 在体内功能多样,在细胞的增殖、分化、胚胎的发育以及肿瘤的发生与转移中均起重要的作用。但由于 bFGF 缺乏一段可供分泌于胞外的信号肽序列,使得人们难于理解 bFGF 在体内是如何行使功能的。本文着重介绍 bFGF 的结构、功能、释放机理、及其在肿瘤发生中的作用。

bFGF 的蛋白质结构及其特征

bFGF 最早是从牛垂体中提纯到的一个 146 个氨基酸、分子量为 16.5 KDa、PI 值为 9.6 的蛋白质^[1]。以后人们发现 bFGF 在体内分布广泛,存在于神经组织、骨骼、生殖器官、腺体、白细胞等以及多种肿瘤细胞中。

当人和牛的 bFGFcDNA 被克隆以后,人们发现了一个处于合适位置的起始密码子 AUG,由此可转录出一个 155 个氨基酸的蛋白质^[2]。此外,从三个上游的起始密码子 CUG 也

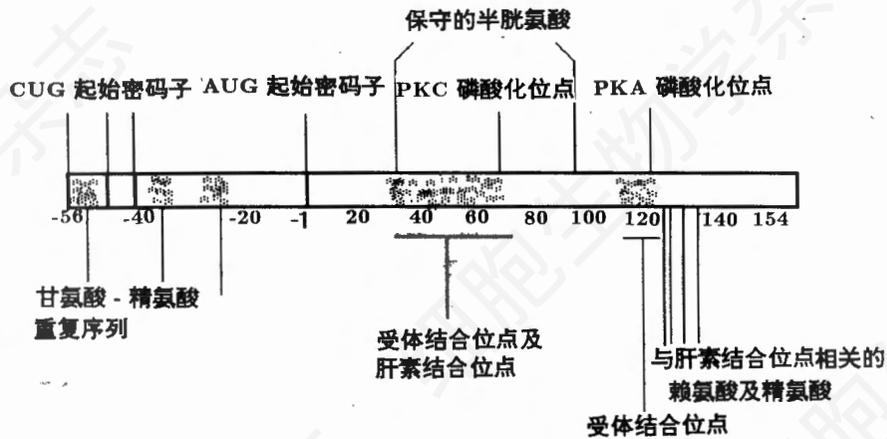
可以依次转录出三种高分子量的 bFGF 蛋白^[3]。现在已知人的 bFGF 有四种表达形式:18KDa(从 AUG 起始转录)、22KDa、22.5 KDa、24KDa(从 CUG 起始转录)^[4]。其中后三种高分子量蛋白的氨基酸序列除了 N 端有一段长短不一的延伸之外,其余部分与 18KDa 的蛋白相同。这四种形式的 bFGF 分子有脑及许多不同的细胞系中均有表达,可能与不同的亚细胞分布有关。18KDa 的分子主要分布于细胞质中,而高分子量的分子则多分布于细胞核内及核糖体中^[5],这表明 N 端的延伸序列中可能包含一段核定位序列。如果将高分子量 bFGF 的 N 末端接到正常的胞内蛋白上,可使这种融合蛋白定位于核内^[6]。利用定点突变选择性地抑制胞质或核内 bFGF 亚型分子表达的实验表明,这些 bFGF 亚型分子在细胞内的功能是不一样的。胞内的 bFGF 可以增强细胞的迁移、介导 FGF 受体的下行调节以及细胞在软琼脂中的生长。这些效应在 FGF 受体显性失活突变存在的情况下可被抑制。而细胞核内的 bFGF 亚型分子只能介导细胞在软琼脂中以及

低血清条件下的生长,并且在 FGF 受体显性失活突变存在的情况下不被抑制^[7]。

18KDa 的 bFGF 分子其氨基酸序列在不同的物种间如人、牛、兔等具有高度的保守性(89%—95%)。这表明 bFGF 几乎所有的区域对其功能都是重要的。几种高分子量形式的 bFGF 在其 N 末端氨基酸序列有较大的差

异^[8],表明这些区域对功能来说不是严格限制的。bFGF 的氨基酸序列中含有四个半胱氨酸,其中有两个 Cys 在 FGF 家族所有成员中都是保守的。但在体外实验中 Cys 突变为 Ser,并未改变 bFGF 的促有丝分裂活性^[9]。

已有的研究表明 bFGF 的蛋白质结构如下图所示:



(引自 Basilio, C. et al., 1992, *Advances in Cancer Research*, 59: 115—156)

从 bFGF 的 cDNA 序列来看各种形式的 bFGF 分子都缺乏一段可供分泌于胞外的信号肽序列^[2-10],因此 bFGF 不能通过典型的内质网/高尔基体途径分泌于胞外。已有实验表明,如果在 bFGF 的 cDNA 序列前加一段信号肽序列,bFGF 可被分泌到胞外^[11]。这表明 bFGF 如果要在体内正常行使功能,必须通过某些特殊的机制从胞质中释放出来。

bFGF 的另一重要性质是对肝素类物质的亲和性^[12-14]。目前人们已利用此性质来分离和纯化 bFGF^[14]。bFGF 除了分布于细胞中,还分布于许多细胞的胞膜及胞外基质(extracellular matrix)中。bFGF 可与胞膜及 ECM 中的肝素类物质 HSPGs (heparan sulfate proteoglycans)结合,这种低亲和力的结合有重要的生物学

作用:

1. bFGF 与 HSPGs 的结合是调节 bFGF 活性的一种手段。两者结合后 bFGF 转变为无活性形式,一方面可以避免过量的 bFGF 与膜上受体结合导致细胞恶性增殖。另一方面可以作为 bFGF 的储存库,需要时通过一些酶解作用将其从 ECM 中释放出来。

2. bFGF 与 HSPGs 的结合可增强其稳定性,保护其免遭热变性及蛋白酶的降解^[13]。

3. 固体的 HSPGs 可作为 bFGF 的携带者,扩大其作用范围。

4. 已有实验表明,bFGF 与 HSPGs 的结合是 bFGF 与高亲和性受体结合的必要条件^[15]。

除了上述提到的 HSPGs,bFGF 在膜上还

有一类高亲和性受体(分子量约为 110—160KDa),如图中所示,受体的结合活性主要集中在两个区域:第 32—76 和 114—123 位氨基酸。这类受体构成了一个受体家族。目前已知有四个成员,都是具有自身酪氨酸激酶活性的蛋白^[16]。结构上都含有一段信号肽序列,三个免疫球蛋白样环,以及一个疏水的跨膜结构。

现已知 bFGF 有多种修饰形式:核内亚型的甲基化、各种亚型的磷酸化、核糖基化以及核苷酸基化。这些修饰作用通常发生在细胞内,可能参与调节 bFGF 的生物学活性^[7]。已有实验表明:bFGF 可作为 PKC 及 PKA 的磷酸化底物^[17]。如图所示,bFGF 被 PKC 磷酸化的位点是 Ser72,而被 PKA 磷酸化的位点在 Thr120。体外实验中,PKA 的磷酸化似乎轻微地增强了 bFGF 对其受体的结合性,而 PKC 的磷酸化对受体的亲和性没有影响。由于已知磷酸化及去磷酸化参与调节体内多种重要的生物学功能,因此我们推测 bFGF 的磷酸化可能对 bFGF 在体内的功能实现也有重要的调节作用。

bFGF 的生物学功能

最早,人们发现 bFGF 可以刺激 3T3 细胞的增殖,以后的研究表明:bFGF 是中胚层、外胚层以及内胚层来源的多种细胞的强促有丝分裂因子^[18],它与细胞膜上的受体结合后可刺激细胞的增殖、分化。

bFGF 在体内的另一重要功能是诱导新血管的形成^[19],即 angiogenesis(新血管发生)不仅是指正常生理状态下如胚胎发育中的血管系统形成,而且还直接或间接参与许多病理反应如肿瘤的发生过程或组织损伤修复。体外实验表明 bFGF 可直接作用于血管内皮细胞,诱导其从基膜中脱离出来,向新血管发生原方向迁移,分裂增殖,形成新的内皮细胞索,最终形成毛细血管,但在体内如何诱导新血管的发生机制尚不清楚。

作为成纤维细胞生长因子和新血管发生因子,bFGF 还被认为在伤口愈合过程中发挥重

要作用。应用外源的 bFGF 可以促进肉芽组织的形成和切开伤口的愈合^[20]。但是包括 EGF, PDGF, TGF 在内的其它一些生长因子也具有促有丝分裂活性,所以 bFGF 和其它生长因子的协同作用在创伤愈合中也是十分重要的。

bFGF 在胚胎的早期发育过程中也起重要作用。我们已经知道胚胎中胚层是由内胚层产生的诱导信号诱导的,而 bFGF 在早期非洲爪蟾的胚胎发育中可作为一个胚胎中胚层诱导因子。如果将非洲爪蟾的动物极与囊胚分离,则分离的动物极只能形成内胚层。但如果与外源的 bFGF 共培育,则可以形成中胚层^[21]。Amaya 等人进一步发现非洲爪蟾的胚胎中表达的一个缺失了酪氨酸激酶活性的 FGF 受体可竞争性地抑制正常 FGF 受体的功能。在这种胚胎中 FGF 将无法诱导中胚层的形成,并导致后期原肠胚的形成及发育出现严重缺陷^[22]。bFGF 以及 FGF 家族其它成员不仅可以诱导非洲爪蟾中胚层的形成,而且它们传导的信号通路对形成后侧中胚层也是必需的。已有实验支持 bFGF 诱导中胚层的形成是通过激活 Ras-Raf-MAPkinase 级联途径传导其所需的信号的。另外,bFGF 在胚胎晚期及成体发育中也有较高水平的表达,可能参与一些分化过程如肌肉组织的分化。

此外,bFGF 还参与神经系统的分化与维持。在鹤鹑的胚胎早期,神经管和神经嵴的新生神经元中有 bFGF 的表达,后期在脊髓及脊根神经节中也有 bFGF 的表达。其中在脊髓中 bFGF 的表达在 10 天的胚胎中达到高峰,以后随孵育时间而逐渐降低,这表明 bFGF 可能在胚胎时期神经细胞的迁移及交联中起重要作用^[23]。在成人的脑组织中 bFGF 也有较高的表达,可能在神经生理中也有重要作用。

bFGF 的释放机理及在肿瘤发生中的作用

bFGF 不是一个典型的分泌蛋白,要在体

内行使各种功能,首先必需通过某些特殊的机制从胞内释放出来。这一点在研究肿瘤的发生及转移中尤其重要。但是目前人们对 bFGF 在体内的释放机理以及如何实现其多种功能尚不完全了解。

由于各种形式的 bFGF 都缺乏一段信号肽序列,所以人们最早认为细胞死亡或损伤是释放 bFGF 的最可能途径。稍后,McNeil 等人通过机械性诱发细胞膜破裂的方法证实短暂的、亚致死的细胞损伤也可以从内皮细胞释放 bFGF^[24]。但以后相当多的实验结果表明,正常生理状态下的细胞也可以释放少量但有很强生物学活性的 bFGF,以自分泌方式激活自身受体,产生各种生物学效应^[25]。但其释放机理仍不清楚。Paolo 等人 1991 年提出 bFGF 可以类似于 IL-1 β 及 L-14 等缺乏信号肽的生长因子通过胞吐作用从正常细胞中释放出来^[26,27]。已有实验表明,用重组的 bFGF 表达质粒转染 NIH3T3 细胞不能诱导细胞的转化,但在融合了一段分泌信号肽后就获得了这种能力。转化的 NIH3T3 细胞呈现特殊的形态改变,并有很强的致瘤性。此时检测到的 bFGF 是截去了信号肽序列的 18KDa 的蛋白质,主要位于细胞表面。这就暗示 bFGF 的释放可能与细胞转化与癌变有一定的相关性^[11]。

目前人们已逐渐认识到在实体瘤的发生过程中一个非常重要的步骤就是首先要获得新血管形成的能力。通常实体瘤在发生的最初阶段都局限在一个很小的范围内^[28],只有获得了充足的血液供应后,才开始恶性增殖。同时新血管的形成也为个别肿瘤细胞从肿瘤组织中脱落进入血液及淋巴循环发生转移提供了条件。

已有相当多的实验证明,多种肿瘤在发生过程中均能释放多种促新血管发生因子,促进新血管的形成。现在已从肿瘤中分离到多种促新血管发生因子,其中最早发现的一个后来被证实为 bFGF^[28]。bFGF 在体外可作为内皮细胞的促有丝分裂因子和趋化因子,诱导新血管的发生。但在体内是如何介导这一过程的详细

机制尚不完全清楚。但有一点是肯定的;bFGF 必需首先通过某些特殊的机制从胞内释放出来才能发挥作用。此外肿瘤细胞还可以通过激活某些酶解反应从 ECM 中释放出与 HSPGs 结合的 bFGF。最近,有人发现了一个可与 bFGF 结合的可分泌载体蛋白(BP),该蛋白包含一段疏水信号肽序列,可与 bFGF 以非共价键可逆结合。bFGF 与其结合可避免降解,保持其有丝分裂原活性^[29]。该蛋白可能是参与将 bFGF 从 ECM 中释放出来的一个重要的调节因子。

我们的工作表明:PMA(佛波醇十二烷酸乙酸酯)处理某些培养的肿瘤细胞,可以促进 bFGF 的大量分泌^[30]。由于 PMA 是细胞蛋白激酶 C 的强有效激活剂,而 bFGF 在体外实验中可以作为蛋白激酶 C 的天然磷酸化底物,鉴于蛋白质的磷酸化与去磷酸化在几乎所有的生物学过程中都起重要的调节作用,因此我们推测;bFGF 的磷酸化及去磷酸化可能作为其释放的一个调控信号,胞内的蛋白激酶 C 可能直接参与这调控作用。如果将 bFGF 第 73 位的 Ser(bFGF 被 PKC 磷酸化的一个位点)突变为 Ala,则 PMA 处理不能增强 bFGF 的释放,这也有力地支持了上述观点。

参 考 文 献

- [1] Esch, F. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**:6507-6511.
- [2] Abraham, J. A. et al., 1986, *Science*, **233**:545-548.
- [3] Moscatelli, D. et al., 1987, *J. Cell. Physiol.*, **131**:123-130.
- [4] Florkiewioz, R. Z. et al., 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**:3978-3981.
- [5] Renko, M. et al., 1990, *J. Cell. Physiol.*, **144**:108-114.
- [6] Bugler, B. et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, **11**:557-573.
- [7] Mason, I. J. et al., 1994, *Cell.*, **78**:547-552.
- [8] Brigstock, D. R. et al., 1990, *Growth Factors*, **4**:45-52.

- [9] Fox, G. M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, **263**:18452-18458.
- [10] Abraham, J. A. et al., 1986, *EMBO, J.*, **5**:2523-2528.
- [11] Rogeli, S. et al., 1988, *Nature*, **331**:173-175.
- [12] Baskin, P. et al., 1989, *Biochemistry*, **28**:1737-1743.
- [13] Saksela, O. et al., 1990, *J. Cell. Biol.*, **110**:767-775.
- [14] Shing, Y. et al., 1984, *Science*, **223**:1296-1298.
- [15] Yayojn, A. et al., 1991, *Cell*, **64**:841-848.
- [16] Burgess, W. H. et al., 1989, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**:575-606.
- [17] Feige, J. J. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**:3174-3178.
- [18] Gospodarowicz, D. et al., 1987, *Endocr. Rev.*, **8**:95-114.
- [19] Folkman, J. et al., 1987, *Science*, **235**:442-447.
- [20] Davidson, J. M. et al., 1985, *J. Cell. Biol.*, **100**:1219-1227.
- [21] Kimelman, D. et al., 1988, *Science*, **242**:1053-1056.
- [22] Amaya, E. et al., 1991, *Cell*, **66**:257-270.
- [23] Kalchein, C and Neufeld, G., 1990, *Development*, **109**:203-215.
- [24] McNeil, P. L. et al., 1989, *J. Cell. Biol.*, **109**:811-822.
- [25] Sakaguchi, M. et al., 1988, *FEBS Lett.*, **233**:163-166.
- [26] Paolo, M. et al., 1991, *J. Cell. Biol.*, **47**:201-207.
- [27] Paolo, M. et al., 1992, *J. Cell. Physiol.*, **151**:81-93.
- [28] Folkman, J. et al., 1992, In *Cancer Medicine*. 3rd Ed.
- [29] Frank, C. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, **269**:28243-28248.
- [30] 王楠,徐永华,1998,实验生物学报, **31**(1):41-48.

心肌细胞的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换

刘恭鑫 杨英珍

(上海医科大学中山医院 上海市心血管病研究所卫生部病毒性心脏病重点实验室 上海 200032)

心肌细胞去极化, Ca^{2+} 跨膜内流; 肌浆网(SR)释放 Ca^{2+} , 触发细胞收缩; 随后 Ca^{2+} 被转运入肌浆网或运出胞外。如此周而复始, 使心肌细胞兴奋收缩偶联得以不断进行。在此过程中 Ca^{2+} 运入和运出胞浆是由细胞膜上的电压依赖性钙通道(VDCC)、肌浆网上的受体操纵性钙通道、细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体(NCE)及细胞膜与浆膜上的钙泵等所调控^[1]。其中细胞质膜上的 NCE 对细胞内钙平衡的维持起重要作用, 近年来对这一离子交换系统进行了较为广泛的研究, 本文就心肌细胞 NCE 的研究进展作一简要概述。

一、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体的特性

NCE 是一种双向转运载体。 Na^+ 运入细胞

伴随着 Ca^{2+} 运出细胞; Ca^{2+} 运入细胞伴随着 Na^+ 运出细胞。心肌细胞的 NCE 于 1968 年为 Baker 和 Seitz^[2] 等所认识, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 转运化学计量比是 $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ ^[3]。其转运方向由跨膜电化学势能所决定, 用方程式 $A = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} - E_m$ 表示, 其中 A 表示跨膜的总电化学势能, E_{Na} 和 E_{Ca} 分别是 Na^+ 和 Ca^{2+} 的平衡电位, E_m 是膜电位。若交换处于平衡状态时, $A = 0$, 此时的 E_m 称 E_q ; 由上方程式得 $E_q = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$ 。 E_q 即逆转电位, 在此电位时 NCE 将改变转运方向。心肌细胞的 E_m 为 -90mV , E_q 约为 -40mV , 因而静息时 NCE 呈正向转运模式 ($\text{Na}^+ \text{-in}/\text{Ca}^{2+} \text{-out}$), 即静息时 NCE 起外运 Ca^{2+} 的作

本文撰写曾蒙中国科学院上海细胞生物学研究所研究员顾全保先生指导, 谨表深切谢意。