

专论与综述

转化生长因子

施渭康

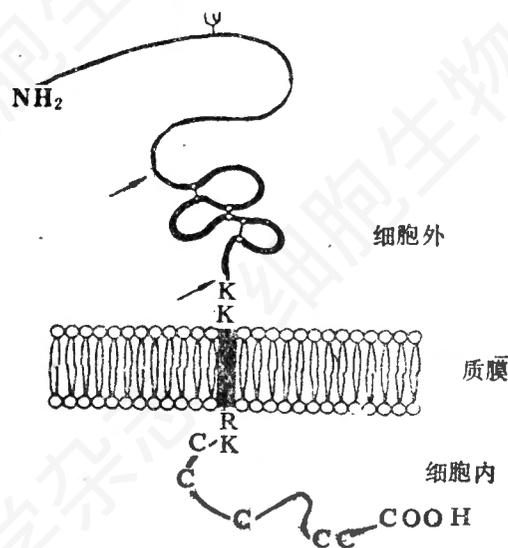
(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

转化生长因子(transforming growth factor, 简称 TGF)最初是指小鼠肉瘤病毒转化 3 T3 细胞系所产生的肉瘤生长因子^[1]。由于其能刺激正常细胞在软琼脂层锚着不依赖性生长, 故后被称为 TGF。进一步发现 TGF 包括 TGF α 和 TGF β 。虽然两者名字类似, 但结构和功能却彼此截然不同。越来越多的证据表明, TGF 除了能使正常细胞转化外, 在细胞增殖、生长和分化等基本活动中行使多种重要的调节作用和其他生物学效应。

一、TGF α

1. 结构和生物学效应 TGF α 是由 50 个氨基酸组成的多肽, 与表皮生长因子(EGF)的氨基酸顺序有 40% 的同源性^[2]。人 TGF α cDNA 克隆的研究表明, TGF α 是以 160 个氨基酸的前体蛋白(pro-TGF α)形式而被合成^[3]。pro-TGF α 整个分子由四部分组成, 即 23 个氨基酸组成的疏水性区域, 成熟生长因子和糖基化位点的区域, 跨膜疏水性区域和羧基端富含半胱氨酸区域。通过蛋白酶解, 从 pro-TGF α 分子的细胞外区域释放出成熟的小分子 TGF α (图 1)^[4]。对成熟型 TGF α 多肽片段进行活性分析比较, 证明第三对二硫键的片段(34—43 氨基酸残基)和 C 末端多肽(44—50 氨基酸残基)具有比其他部位片段更高的生物活性, 与 EGF 受体结合和使成纤维细胞 NRK-49 F 细胞的转化活性都较高。若第 38 位的酪氨酸被亮氨酸或组氨酸所代替, 则生物活性明显下降^[5]。pro-TGF α 也显示有生物学活性,

跨膜 pro-TGF α 能够诱导指示细胞上 EGF 受体的酪氨酸自身磷酸化^[6]。目前虽知有生物活性的 pro-TGF α 能够提供一种局部的和持续的自泌生长信号, 但其在体内的确切作用仍然还不清楚。

图 1 pro-TGF α 跨膜蛋白模式

通过三个半胱氨酸二硫键连接的 50 个氨基酸组成的成熟 TGF α (粗线), 箭头示蛋白酶裂解点。此外, pro-TGF α 还包括以成对碱性氨基酸(KK 和 RK)为界的疏水性跨膜区域和富含半胱氨酸(C)的 C 末端细胞质区域。N 末端有 23 个氨基酸疏水性信号顺序和糖基

化位点 ()。

TGF α 通过与 EGF 受体结合和相互作用而实施其生物学效应。至今还未发现有 TGF α 受体存在的证据。当然, 还不能排除 EGF 受体上存在着对 TGF α 和 EGF 两个各不相同的

配体结合区域的可能性。根据体外各种培养细胞系统的检测结果, $TGF\alpha$ 的效应基本上与 EGF 的相同; 在体内和器官培养条件下, 则 $TGF\alpha$ 的效应更强。如在软骨组织培养时, $TGF\alpha$ 比 EGF 更能刺激 Ca^{++} 释放, 低浓度的 $TGF\alpha$ 即能诱导形成新血管, 而同样浓度的 EGF 却不能^[7]。然而, 这两者在生物学活性的性质上未见有明显的差别。

2. 自泌作用 最初, $TGF\alpha$ 是从肉瘤病毒转化的细胞培养液中分离得到。以后发现 $TGF\alpha$ 不仅存在于其他多种转化或肿瘤细胞中, 也存在于胚胎组织。因而, 曾认为 $TGF\alpha$ 是转化细胞中表达的一种胚胎性生长因子。 $TGF\alpha$ 的发现和其在转化细胞中异常表达使人们提出了生长因子自泌机制的假设, 用以解释肿瘤细胞过度生长的现象^[8]。近来证明, 正常成体细胞也表达和合成 $TGF\alpha$ 。正常小鼠角质细胞(keratinocyte)在体外持续增殖, 必须依赖于 EGF/ $TGF\alpha$; 另一方面, EGF 或 $TGF\alpha$ 又进一步促进并明显增高角质细胞 $TGF\alpha$ mRNA 表达水平^[9]。这种 $TGF\alpha$ 分子自身诱导作用被认为是细胞增殖信号传及组织各细胞必不可少的一种扩增机制。正常细胞既能产生、又能对 $TGF\alpha$ 起反应, 表明正常细胞类似于转化细胞, 也存在着自泌方式的生长调节机制。事实上, 除了 $TGF\alpha$ 以外, 其他生长因子如血小板生长因子(PDGF)^[10], 胰岛素样生长因子(IGFs)^[11] 和白细胞介素(IL-2)^[12] 等也是许多细胞自泌刺激的例证。因此, 自泌作用已不再被看作只是导致转化细胞恶性增殖的一种途径, 也是正常细胞生长调节的一种重要方式。

二、 $TGF\beta$

1. 结构及其相关分子 $TGF\beta$ 是由 112 个氨基酸组成的多肽为亚单位, 并通过二硫键相连的双聚体分子, 分子量 25 kd。还原剂可破坏这种生长因子的双聚体性质, 从而失去生物学活性^[13]。根据 $TGF\beta$ 基因克隆和顺序分析, 证明合成的 $TGF\beta$ 是一类无活性的前体蛋

白, 由 390 个氨基酸组成。这种前体蛋白分子的 C 端经过酶解, 得到含 112 个氨基酸的 $TGF\beta$ 单体。同时还证明 N 末端内部有几个糖基化位点^[14]。这表明 $TGF\beta$ 合成本身乃是一个甚为复杂的过程。

近来研究发现, 有不少蛋白分子或基因的结构和功能与 $TGF\beta$ 的密切相关。人血小板的 $TGF\beta_1$ 与猪血小板和牛骨的 $TGF\beta_2$ 两者都具有非常类似的生物学活性和受体结合特性^[15]; 从人、猪和鸡基因库克隆到的 $TGF\beta_3$ 基因, 以及从鸡软骨细胞基因库克隆到的 $TGF\beta_4$ 基因均与 $TGF\beta_1$ 基因有高度的同源性^[16]。我们也曾从小鼠胚胎癌细胞分离到分子量为 15 kd 的 $TGF\beta$ 样性质的多肽分子, 能抑制貂肺上皮细胞 CCL/64 株的生长, 在 EGF 存在时, 可以诱导成纤维细胞在软琼脂层形成集落, 并刺激其 DNA 合成^[17]。此外, 与 $TGF\beta$ 分子结构明显相似的蛋白还包括: 影响雌性生殖器官发育的缪勒氏管抑制物质(MIS)^[18]; 与骨形成相关的骨形态发生蛋白(BMP)^[19]; 在研究果蝇、瓜蟾和小鼠早期发育相关基因过程中, 又分别发现了 dpp 基因复合体^[20], Vgl^[21] 和 Vgr-1 基因^[22], 这些基因的顺序与 $TGF\beta$ 的有不同程度的同源性。因此, 上述种种蛋白分子或基因自然而然组成 $TGF\beta$ 家族。尽管其中一些因子的生物学功能目前还不十分清楚, 但初步结果表明它们与细胞生长、分化或胚胎早期发育中的组织、形态发生有着密切联系。

最近, 我们用免疫组织化学技术证明, 着床前小鼠胚胎 $TGF\beta_1$ 很丰富; 着床后 $TGF\beta_1$ 与内胚层和中胚层分化有关, 特别是对胚外组织及衍生于中胚层或间质细胞的一些组织的发生和发育起着重要作用^[23]; 原位杂交也表明 $TGF\beta_1$ mRNA 位于胚胎骨、肝、巨核细胞和一些间质组织的衬垫上皮^[24], $TGF\beta_2$ mRNA 也位于邻近有上皮的间质组织。这些结果提示 $TGF\beta_1$ 和 $TGF\beta_2$ 的定位特征表明它们在上皮细胞/间质细胞相互作用中扮演着重要角色; 同时也指出小鼠早期胚胎发育期间的

TGF β 可能以自泌和侧泌方式调节细胞生长和分化。

2. 细胞受体 各种正常和转化细胞表面都有专一性的、亲和力有所不同的 TGF β 受体。解离常数为 25—140 PM, 每个细胞约有 2,000—40,000 个受体, 这决定于不同的细胞系^[25]。已经发现, TGF β 专一性地与细胞表面三种类型受体起反应。低分子量 I 型受体是细胞接受 TGF β 信号所必需的。另两类 II 型和 III 型虽知能与 TGF β 起作用, 但它们在转导 TGF β 信号中的意义还不清楚。已有报告指出 GTP 结合蛋白可能参与 TGF β 信号的转导。用 TGF β 处理小鼠成纤维细胞, 则 GTP[vS] 结合和 GTP 酶活性明显增高; 同样, 用 TGF β 处理貂肺上皮细胞抗 TGF β 突变株, 则 GTP[vS] 结合或 GTP 酶活性并不增加^[26]。根据在缺失 TGF β I 型受体的细胞突变株方面的工作, 也证明 I 型受体是转导 TGF β 信号所必需的。除了细胞表面 TGF β 受体类型变化以外, TGF β 受体数目改变也会影响细胞对 TGF β 的反应性。激活的 T 细胞, 亲和力高的 TGF β 受体数目增加, 随之 TGF β 表达和合成也相应增加。早已有报告指出, T 细胞用 IL-2 处理时, 则出现 IL-2 受体高表达并伴随 IL-2 的合成和分泌; 一旦高亲和力 IL-2 受体达到足够数目并与配体特异地相结合时, 即发生 DNA 合成和细胞分裂。然而, 用 TGF β 处理 T 细胞时, 却抑制了 IL-2 受体诱导合成 IL-2 的上调节(μ p-regulation)^[27]。因此, T 细胞对正(IL-2)和负(TGF β)信号的反应决定于细胞所表达的专一性受体数目; 同时, 受体数目也可能被存在的生长因子本身所调变。

3. 生物学功能 TGF β 显示多种生物学活性^[28]: (1) 刺激培养在软琼脂层中成纤维细胞集落性生长, 甚至也能刺激单层培养的成纤维细胞生长。据 TGF β 促有丝分裂活性的动力学研究, 证明 DNA 合成始于 TGF β 处理细胞后 36 小时, 同时引起细胞原癌基因 c-sis 表达和 PDGF 样物质合成。因此, TGF β 对成纤

维细胞的促有丝分裂效应很可能是由于 c-sis 基因诱导而间接产生的。(2) TGF β 与其他一些生长因子相比, 具有一种不寻常的特性; 即对有些细胞又显示抑制其生长和诱导分化的作用。例如, 诱导支气管上皮细胞终末分化。但也有抑制脂肪细胞调和成肌细胞分化的报告。(3) 调节细胞外基质成份的合成和降解, 参与创伤愈合和胚胎形态发生过程。(4) 抑制多种类型细胞增殖, 包括上皮细胞、内皮细胞, 淋巴样和髓性细胞等。最近我们实验室也证明 TGF β 对培养的人肝癌(BEL-7402)和鼻咽癌(CNE 1)细胞的生长有抑制作用, 并对 EGF 促进上述癌细胞的生长效应产生拮抗作用(徐永华等, 待发表资料)。TGF β 对细胞增殖抑制效应是可逆的, 故而不可能是细胞毒的结果。生长迅速的小鼠角质细胞经 TGF β 处理 1 小时, c-myc 基因表达明显减少, β -肌动蛋白和 c-fos 基因的表达却不受影响^[29], 表明 TGF β 抑制基因表达具有专一性。由此可见, TGF β 选择性地控制基因表达可能是其调节细胞生长的一个重要方面。

4. 调节细胞生长 TGF β 表达和合成对调控细胞生长和分化是至关重要的。TGF β_1 能以 TGF α 类似方式自身调节 mRNA 的转录。许多培养的正常和转化细胞由于 TGF β_1 存在而使自体 TGF β_1 mRNA 扩增 2—3 倍, 小鼠成纤维细胞系 AKR-2B 甚至高达 20—25 倍。TGF β_1 表达似乎有组织专一性, 成年小鼠脾、肺和胎盘含有高水平 mRNA。

TGF β 本身结构改变也是调节其对细胞生长作用的一种方式。许多工作者指出, 培养细胞合成分泌的或血小板释放的 TGF β 为无活性形式的蛋白, 不能与细胞表面受体起反应, 因而也不会激起上述各种生物学效应。所以, TGF β 激活是其行使生物学效应的必需过程。在实验室条件下, 酸化细胞条件培养液或以酸性缓冲液提取组织中的 TGF β , 均可获得活化形式的 TGF β 。由此推想, 无活性 TGF β 是一种结合其他多肽的复合蛋白。用全长 TGF β_1 基

因转染 CHO 细胞, 随后扩增 TGF β_1 蛋白合成, 结果发现 25 kd 成熟形式的 TGF β_1 是以非共价键与其前体蛋白 N 末端糖肽部分相连, 形成 110 kd 无活性形式的复合物^[30]。酸化可以破坏这些非共价键的相互作用, 释放出活性形式 TGF β_1 。另外, 实验也证明, 通过蛋白酶 (例如血纤维蛋白溶酶) 能酶解 N 末端糖肽内部结构, 引起无活性形式复合蛋白的构型变化, 最终释放出成熟 TGF β , 甚至 N 末端糖肽内部糖基化改变也能使 TGF β 激活。总之, 无活性状态 TGF β 复合蛋白构型变化有可能激活 TGF β , 释放出有活性的成熟 TGF β 。其他一些生长因子如 EGF, 神经生长因子 (NGF) 和 IGFs 等也存在无活性形式的前体蛋白。这些前体蛋白激活和释放出成熟形式生长因子的机制可能各不相同。但是, 一些包括 TGF β 在内的生长因子无活性前体蛋白及其激活机制的存在无疑在调节生长因子效应中起着重要作用。

三、结 语

近年来, 已被分离和特化的各种生长调节

因子日益增多。多数资料证明, 有独特生物学活性的多种生长因子的协同作用是细胞正常增殖的必需条件; 生长刺激和抑制两类因子之间的平衡调节作用是细胞正常生长的基础。仅就创伤愈合和胚胎正常发育过程而言, 同样有包括 TGF β 在内的多种生长因子参与协同作用, 其中 TGF β 参与调节细胞外基质成份的合成和降解。其他的生物学效应也有类似现象, TGF 在介导细胞对各种环境刺激反应过程中, 可能于某一或几个环节起着重要的正/负调节作用。无论正或负生长调节因子的表达, 合成, 翻译后加工或活性等异常, 都有可能致使细胞发生转化。图 2 是以 TGF α 和 TGF β 分别为细胞生长的正/负调节信号, 阐明正常和异常生长的调节模式。已有证据表明, 一些转化细胞对正或负信号的反应性确已发生了改变。即使如此, 但转化细胞中丧失正常生长控制的有关机制目前所知甚少。因此, 欲要了解细胞转化的实质性问题, 有必要首先致力于研究并充分弄清包括 TGF 在内的生长因子在正常细胞中的作用。最近, 我们成功地构建了猪 TGF β_1 质粒, 并

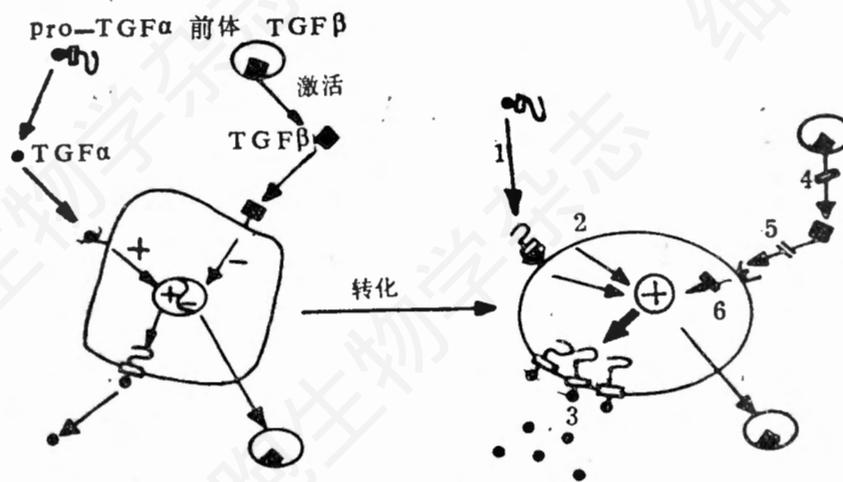


图 2 上皮细胞正/负生长控制的调节模式^[28]

细胞正常生长调节中, TGF α 提供生长刺激信号, TGF β 提供生长抑制信号。下列环节失常可能诱使细胞转化: (1) pro-TGF α 聚积在邻近细胞的质膜中, 提供了持久和局部高强度的正刺激信号; (2) EGF/TGF α 受体变化, 使受体后正信号转导途径中某些环节活化; (3) TGF α mRNA 水平扩增, 使正信号增加; (4) 丧失激活 TGF β 前体蛋白的能力; (5) TGF β 受体缺失; (6) 受体后负信号转导途径变化。上述任何一个或几个环节发生变化, 会引起正/负生长信号不平衡, 使上皮细胞转化。

获得了转染有这种外源 TGF β_1 基因的小鼠多能胚胎干细胞 EST-1 系；初步结果表明 EST-1 细胞类似于其亲本胚胎干细胞 ES-5 系，在体内有广泛的分化潜能；但其瘤性生长速度远比 ES-5 细胞慢得多。另一方面，EST-1 细胞在体外对维生素 A 酸等诱导的反应性也不同于 ES-5 细胞，前者多分化为成纤维细胞，后者主要为神经胶质细胞。这些均提示外源 TGF β_1 在调节 ES 细胞体内生长和体外分化细胞类型中起着作用^[31]。EST-1 细胞系建立也为分析 TGF β 在正常个体发育中的功能提供了条件。

参 考 文 献

- [1] DeLarco, J., and Todaro, G. J., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4001—4005.
- [2] Marquardt, H., et al. 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4684—4688.
- [3] Derynck, R., et al. 1984, *Cell*, 38: 287—297.
- [4] Bringman, T. S., et al. 1987, *Cell*, 48: 429—440.
- [5] Peng, S-F., et al., 1990, In "First APO-CB Congress Abstracts". pp. 396 Nov. 3-7, 1990. Shanghai, China.
- [6] Brachmann, R., et al. 1989, *Cell*, 56: 691—700.
- [7] Derynck, R., 1986, In "Oncogenes and growth control". eds, Kahn, P. and Graf, T., pp 58—63, Springer-Verlag, Berlin.
- [8] Sporn, M. B., and Todaro, G. J., 1980, *N. Eng. J. Med.* 303: 878—880.
- [9] Coffey, R.J. Jr., et al. 1987, *Nature*, 328: 817—820.
- [10] Betsholtz, C., et al. 1984, *Cell*, 39: 447—457.
- [11] Clemmons, D. R., and Van Wyk, J. J., 1985, *J. Clin. Invest.* 75: 1914—1918.
- [12] Smith, K. A., 1982, *Immunobiology*, 161: 157—173.
- [13] Assoian, R. K., et al. 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 7155—7160.
- [14] Gentry, L. E., et al. 1988, *Mol. Cell Biol.*, 8: 4162—4168.
- [15] Cheifetz, S., et al. 1987, *Cell*, 48: 409—415.
- [16] Jakowlew, S. B., et al. 1988, *Mol. Endocrinol.*, 2: 1185—1195.
- [17] 施渭康、姚 鑫, 1989, 实验生物学报, 22 (2): 213—223.
- [18] Cate, R. L., et al. 1986, *Cell*, 45: 685—698.
- [19] Wozney, J. M., et al. 1988, *Science*, 242: 1528—1534.
- [20] Padgett, R. W., et al. 1987, *Nature*, 325: 81—84.
- [21] Weeks, D. L., and Melton, D. A., 1987, *Cell*, 51: 861—867.
- [22] Lyons, K., et al. 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 4554—4558.
- [23] 施渭康等, 1990, 实验生物学报, 23(4): 495—507.
- [24] Wilcok, J. N., and Derynck, R., 1988, *Mol. Cell Biol.* 8: 3415—3422.
- [25] Wakefield, L. M., et al. 1987, *J. Cell Biol.* 105: 965—975.
- [26] Howe, P. H., and Leof, E. B., 1987, *Biochem. J.* 261: 879—886.
- [27] Kehrl, J. H., et al. 1986, *J. Exp. Med.* 163: 1037—1050.
- [28] Lyons, R. M., and Moses, H. L., 1990, *Eur. J. Biochem.* 187: 467—473.
- [29] Coffey, R. J. Jr., et al. 1988, *Mol. Cell Biol.* 8: 3088—3093.
- [30] Gentry, L. E., et al. 1987, *Mol. Cell Biol.* 7: 3418—3427.
- [31] Lu, J. H., et al. 1990, In "First APOCB Congress Abstracts". pp 385, Nov. 3—7, 1990, Shanghai, China.