

FGF-2/FGFR 信号转导途径与肿瘤的关系 及在乳腺癌发生中的作用

方剑武^① 黄思罗^① Michel Crepin^② 刘会生^① 徐涛^① 刘剑峰^{①③*}

(^① 华中科技大学生物物理研究所, 武汉 430074; ^② Laboratoire de Recherche Oncologie Moleculaire Humaine (EA 445), UFR Leonard de Vinci, Universite Paris-nord, 74, rue Marcel Cachin, 93012, Bobigny, France; ^③ CNRS-UPR 9023 Mecanismes Moleculaires des Communications Cellulaires CCIPE, Montpellier, 34090, France. * 联系人, E-mail: jfliu@mail.hust.edu.cn)

摘要 碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)是一种能调节细胞分裂、增殖、迁移及分化的多效生长因子。研究表明, FGF-2 在肿瘤生长和新血管生成中起重要的作用。FGF-2 诱导的生物学效应很大程度上是依赖于 TPK 受体(酪氨酸激酶受体)和胞内二级信使分子(mitogen activated protein kinase)等蛋白分子组成的功能性信号转导网络来实现的, 该网络中不同信号转导通路的活化状态对应着各种不同的生物学效应。本文将阐述在肿瘤及乳腺癌发生过程中 FGF-2 诱导的信号转导途径的作用机理方面的研究进展。

关键词 FGF-2 MCF-7 恶性肿瘤 乳腺癌 新血管生成 信号转导

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。近年来, 在世界范围内, 乳腺癌的发病率呈明显上升趋势。

研究人员发现, 在乳腺癌细胞中, 碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)及其受体都具有高水平的表达, 而 FGF-2 是一个具有促癌细胞分裂增殖及促血管生成作用的癌症相关蛋白分子, 因此, 关于 FGF-2 诱导的信号转导途径与肿瘤的关系及在乳腺癌发生中的作用是我们亟待研究的问题。

1 FGF-2 及其受体的结构和生物学特性

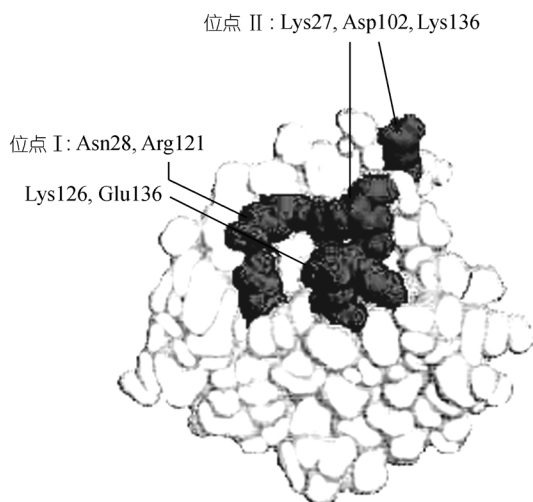
1.1 FGF-2

早在 1974 年, Gospodarowicz 等人^[1]从牛垂体中分离纯化出一种对成纤维细胞系 Balb/c3T3 具有促分裂增殖效应的多肽, 并命名为成纤维细胞生长因子(FGF)。1986 年, Abraham 等人^[2]首次测出了人 FGF-2 的 cDNA。通过 X-射线晶体衍射技术研究发现, FGF-2 是一个由 12 个反向平行 β 片层结构组成的三角锥形结构。根据氨基酸序列分析, 其 N 端和 C 端都存在肝素结合区域, 分别为位点 I (Asn28, Arg121, Lys126 和 Glu135)和位点 II (Lys27, Asp102 和 Lys136)两个区域^[3](图 1)。合成肽段法初步证明, FGF-2 受体结合区存在于 β_2 , β_3 , β_9 和 β_{10} 4 个片层结构中 Phe38-His58 及 Tyr115-Trp123 两个肽段内。FGF-2 共有 18, 22, 22.5, 24 和 34 kD 5 种存在形式, 它们具有不同的翻译起始位点。18 kD 的 FGF-2 含有 146 个氨基酸, 从 FGF-2 编码序列上游 AUG 密码子起始翻译, 定位于细胞浆

内, 能够促进细胞迁移、分裂和增殖。而由不同的 CUG 密码子起始翻译形成的 22, 22.5, 24 和 34 kD FGF-2 则定位于细胞核, 可能与细胞生长和凋亡有关, 与细胞迁移似乎没有关系。Jasodhara 等人^[5]研究发现, FGF-2 对神经祖细胞(NPC)具有的促分裂增殖效应决定于一段 10 个氨基酸组成的序列。提示 18 kD 的 FGF-2 与高分子量(HMW)的 FGF-2 在这一段序列上可能存在差异。与其他生长因子不同, FGF-2 缺少引导分泌的胞质序列, 不能进行外分泌, 所以正常条件下只能通过自分泌或者旁分泌的方式微量存在于血清或者体液中。Qi 等人^[6]发现, 胚胎干细胞发育到神经外胚层前体的过程中必须涉及自分泌性的 FGF-2。通常认为 FGF-2 只有通过细胞死亡、物理化学损伤、辐射或者感染等引起的细胞膜损伤或溶解而被释放到胞外, 最新研究表明, FGF-2 是通过一种 ATP 驱动的多肽泵跨膜转运的^[7]。

1.2 FGF 受体

FGF 受体 (FGFR) 属于酪氨酸激酶受体家族中的一类。FGFR-1 是由 Lee 等人^[8]通过亲和色谱的方法最早分离出来的成员。FGFR 至少有 5 个家族成员。其中 FGFR-1 和 FGFR-2 是 FGF-2 的高亲和力受体。FGFR 根据分子量分为两类: 145 和 125 kD。研究表明, 145 kD 左右大小的 FGFR 可能介导 FGF-2 诱导的细胞生长抑制作用^[9], 提示 125 kD 左右大小的 FGFR 可能介导 FGF-2 诱导细胞生长增殖作用。所有 FGFRs 的

图 1 FGF-2 的晶体结构模型^[4]

基本结构均包括: 胞外区、跨膜区和酪氨酸激酶区. 但 FGFRs 不同的拼接方式造成不同成员可能含有不同数目的(2 或 3 个)类 Ig 环, 如图 2 所示. 位于第 1 个环和第 2 个环之间的连续 8 个氨基酸组成的“酸盒”是所有 FGFRs 均具有的保守结构. 这一保守结构似乎与 FGFRs 的功能有着重要的关系^[10].

FGFRs 胞内的 2 个酪氨酸激酶域之间是由 15 个氨基酸组成的一小段没有催化活性的序列. 研究表明, 这一序列中含有可磷酸化的酪氨酸的数目暗示着 FGFRs 促分裂活性的高低; 相对应的是 FGFR-4 的促分裂活性在 4 个成员中也是最低的^[11], 并且位于 FGFR-1 上的 2 个酪氨酸残基对维持 FGFR-1 的功能是必不可少的^[12].

1.3 HSPG 介导的 FGF-2 和 FGFRs 的结合

肝素硫酸盐蛋白多糖(HSPG)是由重复的二糖单

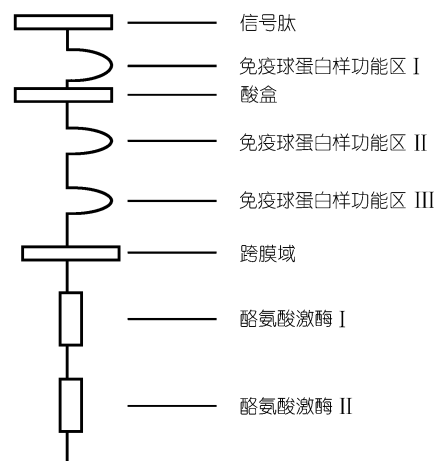
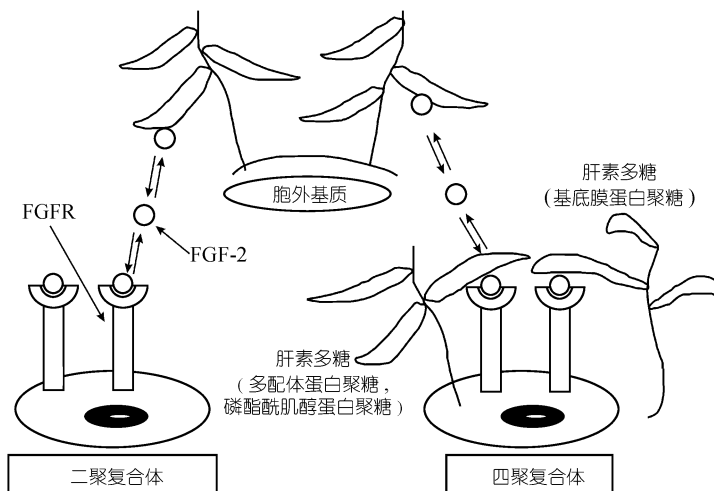


图 2 FGF-2 受体(3 环)结构示意图

位组成的. 目前已经可以用 X-射线观测到 FGFs 通过 HSPG 和 FGFRs 结合的结构变化^[13]. 总而言之, 具有活性的 FGF-2 可以选择性地和一种带有疏水信号的载体蛋白 HSPG 发生可逆性结合, 这种含有疏水信号的载体蛋白能够将 FGF-2 从胞外储蓄区转运到细胞膜受体 FGFR 上, 并且防止 FGF-2 在这一过程中被降解或失活(图 3).

2 涉及 FGF-2 信号转导途径的蛋白分子及其生物学功能

FGF-2 信号转导途径涉及的蛋白质分子很多, 并且不断有新的分子被发现. 但由于涉及这一过程的蛋白质基本都集中在细胞内, 所以我们只对胞内信号转导途径中涉及的较为重要的蛋白质进行介绍.

图 3 HSPG 对 FGF-2 的调节模式图^[4](部分修改)

2.1 Rasp21

Rasp21 在 FGF-2 诱导的 Ras/MAPK 信号转导通路中起着承前启后的作用, 属于核心蛋白之一, 它可以被 Grb2 激活, 也可以激活 MAPKKK, 进而激活 MAPK, 调节转录因子 Elk-1 的活性. 该蛋白与乳腺癌细胞的增殖有关, 研究表明, 该蛋白的过度表达使 FGF-2 抑制乳腺癌细胞生长, 最终导致乳腺癌细胞迁移或凋亡.

2.2 Rho GTPase

Rho GTPase 是 Ras 超级家族成员之一, 但具有与 Ras 蛋白完全不同甚至是相反的作用. 研究发现, 许多至关重要的细胞进程, 如通过 c-jun-N-末端激酶 (JNK) 信号通路的转录调节、诱导凋亡、细胞周期调控及维持细胞的转化表型等都涉及到 Rho GTPase. 至于 FGF-2 诱导的乳腺癌细胞信号转导途径中 Rho GTPase 所扮演的角色, 目前还不清楚, 可能对 JNK/SAPK 通路具有调控作用, 对细胞的表型维持和改变以及诱导细胞凋亡也有一定的作用.

2.3 PLC γ (磷脂酶 C γ)

PLC γ 在 FGFR-1 上的结合位点之一是 Tyr766, 该位点突变以后并不影响信号转导过程的发生. 它的水解产物 1,4,5-三磷酸酰肌醇 (PIP3) 可以导致 Ca^{2+} 从钙库中释放; 二脂酰甘油 (DG) 的积累可以激活蛋白激酶 C (PKC)^[14]. 虽然从间接的证据可以表明 PLC γ 对 FGF-2 的促分裂和促增殖有促进作用, 但该蛋白的异常表达可能使胞内 Ca^{2+} 浓度平衡失控, 最终引起细胞凋亡.

2.4 Src 家族激酶

Src 家族激酶是一种潜在的 FGFR 底物, 专一性抑制剂为 PP1^[15]. Src 通过色氨酸和酪氨酸的磷酸化和去磷酸化来精细调控其激酶活性. 同时, Src 也是 FAK 激酶 (focal adhesion kinase) 的底物之一, 而 FAK 激酶与细胞的迁移有关, 提示 Src 在 FGF-2 诱导的细胞迁移中有一定的作用.

2.5 SHP-2

它是一种含磷酸化酪氨酸的 SH2 区域的磷酸酶, 重要的调节信号转导下游的酪氨酸激酶活性的蛋白分子^[16]. 在 FGF-2 诱导的细胞中 SHP-2 显示出能和 FRS2 结合的功能, 并且其 N-末端的 SH2 区域对 Ras 通路的活性是至关重要的. 它与 FRS2 结合的二聚体

的存在似乎与 MAPK 活化的持久性有关, 也和 FGF-2 诱导的最终结果有关.

Shb, Grb2, FAK, p85, pp70S6, P38, PP60^{src}, JNK, PI3-K, Crk 和 FRS2 等蛋白分子, 均在 FGF-2 诱导的信号转导过程中起着非常重要的作用.

3 FGF-2 诱导的信号转导途径

研究表明, 该信号转导途径是正常细胞生长分化所必需的, 参与血管新生、胚胎发育^[17]、骨骼形成和伤口愈合等生理过程. 该途径具体过程如下: FGF-2 通过 HSPG 结合到 FGF 酪氨酸激酶受体 (FGFR) 上, 导致该受体内在的酪氨酸激酶活性增强, 进而能与具有 Src 原癌基因家族同源区 (SH2) 的蛋白结合. 例如 NCK, 磷脂酶 C γ (PLC γ), SHC, Src, 受体底物 2 (FRS2), Cyclin D2, 调节蛋白 Crk, P^{21ras}GTP 酶激活蛋白 (GAP) 和 PI13-激酶的调节亚基等, 均能在细胞受 FGF-2 刺激后结合到 FGF 受体上, 并且使自身的酪氨酸残基发生磷酸化, 分别激活不同的信号传递路径 (图 4). 此外, Krejc 等人^[18]报道, 在 B-CLL 和 CML 两种白血病细胞中也发现 FGF-2 诱导的信号转导途径与该细胞增殖有关.

4 FGF-2 与癌症的关系

作为一种促生长因子, FGF-2 与癌症的关系一直是研究热点之一. 胰腺癌、甲状腺乳头状瘤、肝癌、乳腺癌、肺腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肾癌、结肠腺癌以及原发性和转移性黑色素瘤细胞中都具有高水平的 FGF-2 及其受体的表达量^[19~21]. 徐卫明等人^[22]采用免疫组织化学和计算机辅助图像分析技术发现, FGF-2 表达与肿瘤内微血管密度、PCNA 标记指数和 DNA 倍体含量呈正相关. 卞修武等人^[23]采用原位杂交技术对 SHG-44 细胞增殖活性、中间丝蛋白共存、肿瘤蛋白、血管生成因子和细胞周期调控相关蛋白表达水平进行了检测, 发现 SHG-44 细胞存在 FGF-2、肿瘤蛋白表达异常和细胞周期的失控. Fujimoto 等人^[24]用 ELISA 法和反转录-聚合酶链式反应-Southern blot (RT-PCR-Southern blot) 法检测发现, 晚期原发性卵巢癌、子宫内膜癌和宫颈癌患者 FGF-2 的 mRNA 表达水平显著升高, 但与组织类型无关, 认为新血管的形成有助于肿瘤细胞的生长和浸润转移. 提示 FGF-2 可能是晚期癌症高度恶化的标志之一, 与肿瘤的加速生长及转移有重要关系.

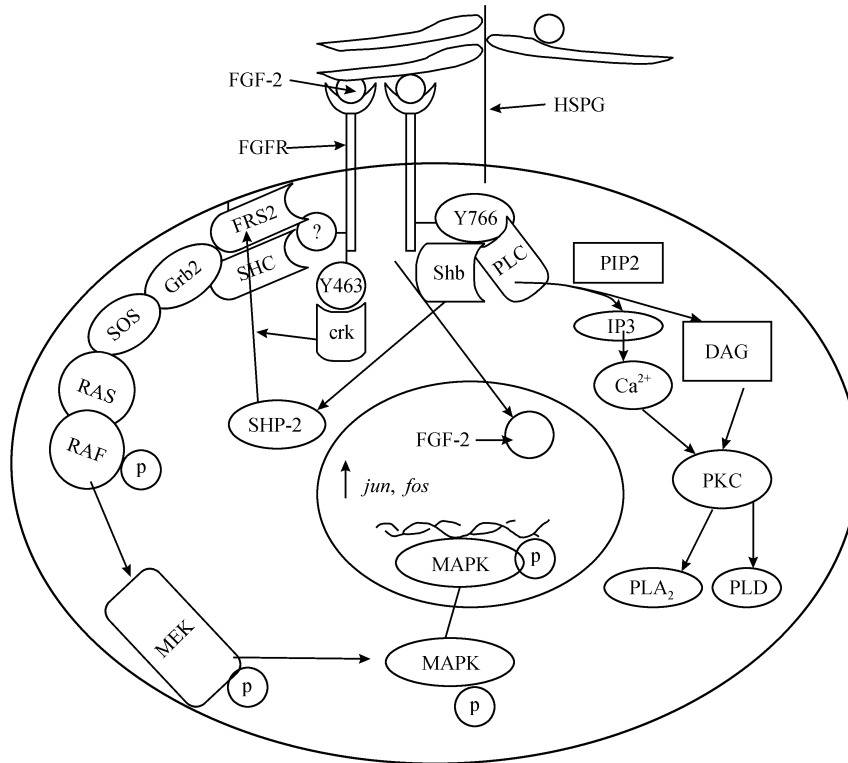


图 4 FGF-2 胞内信号转导途径示意图^[4](部分修改)

为了更清楚地说明其转导过程,只选择部分底物加以说明,如 MAPK 示促分裂原蛋白激酶, DAG 示二脂酰甘油, *jun* 和 *fos* 示转录因子, PLA₂ 示磷脂酶 A₂, PLD 示磷脂酶 D, SHC 示 Src 同源域蛋白

相反, Holland 等人^[25]发现 FGF-2 在小鼠体内能促进胶质细胞的增殖和转移,但并不诱导神经胶质瘤发生.说明 FGF-2 可能不是诱导细胞恶化的唯一生长因子,其他生长因子和激素的表达可能直接或间接影响 FGF-2 或者 FGFR 的作用. Sturla 等人^[26]在 Ewing's 恶性肉瘤细胞中证实 FGF-2 诱导细胞死亡而不是细胞癌化,并提出可能不同细胞系里 FGF-2 诱导的细胞死亡的数量级不同,而 Ewing's 恶性肉瘤细胞与其他癌细胞相比来源于不同时期的原始细胞,具有不同的细胞内质,因而出现上述矛盾的结果.还有研究结果表明^[9], FGF-2 可明显诱导胚肺二倍体成纤维细胞抗癌基因——*Rb* 基因的表达,间接提示 FGF-2 有抑癌或抗癌作用.

Sugimoto 等人^[27]研究了 FGF-2 对 24 株人肿瘤细胞生长的影响,发现 FGF-2 对其中 6 株细胞的生长有促进作用,而对其他的细胞株没有作用.他们由此认为,影响大多数肿瘤细胞株生长的是内源性 FGF-2,而不是外源性 FGF-2. Sabine 等人^[28]通过组织病理学研究经典肿瘤细胞 MB(成神经管细胞瘤),发现

FGF-2 对其生长具有抑制作用,但对另一衍生细胞系 HSJ 肿瘤没有作用,提示 FGF-2 诱导的生物学效应与每个研究小组的分析样品大小、来源、恶性化程度、细胞模型、FGF-2/FGFR 的来源以及其他生长因子、激素的表达,甚至是与细胞贴壁与否和胞内 FGF-2 的实际浓度都有关.

4.1 FGF-2 与新血管生成

大量研究表明,新血管生成是正常细胞恶性转化的早期分子事件之一. FGF-2 促进内皮细胞增长、分化和迁移,进而形成新血管.在此过程中, FGF-2 调节胶原酶、蛋白酶、尿激酶型纤溶原激活剂(uPA)和整合素(integrins)的活性,导致血管基膜的降解,细胞得以侵入周围的基质,迁移、增殖和分化,最终形成新的毛细血管网络.具体调节机制为:在 FGF-2 刺激下, uPA 增多, uPA 激活转化生长因子 β (TGF- β)的活性. TGF- β 对 FGF-2 诱导的细胞生物学效应具有调节作用,随着浓度的升高, FGF-2 诱导效应会由促进变为抑制;同时, TGF- β 对自身也具有有一种反馈调节作用,最终影响 FGF-2 诱导的新血管生成.这一调

节机制利于肿瘤细胞的增殖、侵袭,促进肿瘤的迁移,但也不排除一定时期抑制肿瘤生长的可能.提示这可能是 FGF-2 诱导的生物学效应出现矛盾的根源之一. Hajime 等人^[29]发现 FGF-2 可以促淋巴血管生成,并且阻断 VEGF 受体-3 信号通路,可以抑制 FGF-2 在鼠角膜中的促血管生成作用.提示 FGF-2 的促血管生成作用受细胞内其他生长因子的信号转导通路调节,同样增加了出现相互矛盾的实验结果的可能性.

4.2 FGF-2 与癌细胞分裂和增殖

资料表明, FGF-2 对中胚层和神经外胚层的细胞具有强烈的促分裂活性. 体外实验发现, 一些恶性肿瘤细胞可在不含蛋白的培养基中增殖并表达 FGF-2 mRNA, 值得注意的是, FGF-2 反义寡核苷酸可以通过影响内源型 FGF-2 的合成而抑制它们的生长.

Pamela 等人^[30]研究发现, TPA 可通过 p38 MAPK 依赖途径抑制 FGF-2 对成纤维细胞增殖的效应, 但对 FGF-2 刺激的 PC12 细胞没有作用. 后者不存在 p38 MAPK 依赖途径, 虽然 PC12 不是肿瘤细胞, 但提示 FGF-2 对癌细胞的促分裂增殖效应可能也受 p38 MAPK 活化途径存在与否的调节, 这可能也是出现矛盾结果的原因之一.

Yamazaki 等人^[31]通过免疫组织化学法和原位杂交法检测了 20 例人胰腺癌组织, 发现 FGF-2 在肿瘤细胞中分别有 50% 和 60% 的强阳性表达率. FGF-2 诱导过的肿瘤细胞增殖水平明显高于阴性对照组. 并且发现 FGF-2 mRNA 阳性表达和 FGF-2 的分布相一致.

4.3 FGF-2 与癌细胞迁移和凋亡

George 等人^[32]发现, 在结肠癌发病过程中检测到的 FGF-2 水平的升高伴随着癌细胞的迁移. 研究表明, 18 kD 的 FGF-2 对细胞造成的最终效应为诱导癌细胞的迁移(migration)或者凋亡(apoptosis). 其机理可能是一方面通过刺激内皮细胞增殖, 另一方面诱导内皮细胞表达 VEGF 和 FGF-2 受体, 分泌蛋白溶解酶、基质溶解素和纤溶酶原激活剂等, 并使抑癌基因编码蛋白血栓黏合素(thrombospondin, Ts)失活, 使复杂的蛋白水解系统失衡, 导致基膜和其他胞外基质 ECM 降解, 为内皮细胞出芽、迁移开道, 也为肿瘤血道转移创造了条件. Cavallaro 等人^[33]研究发现, 在缺乏神经细胞黏和分子 N-CAM 的肿瘤细胞中, FGF-2 可以通过活化 p42/44MAPK 诱导该肿瘤细胞基质融

合启动其迁移, 但并不能诱导神经突细胞的生长. 提示 FGF-2 在神经突细胞中可能缺乏促进生长的 p38 MAPK 信号转导途径, 而 p42/44MAPK 可能与 FGF-2 诱导的肿瘤细胞迁移有关.

研究发现, 高分子量的 FGF-2 对细胞造成的最终效应仅为刺激癌细胞的生长, 对癌细胞的迁移似乎没有作用. 而癌症的治疗首先就是要阻止癌细胞的迁移, 所以, 比较不同种类 FGF-2 对不同癌细胞的作用差异, 也能够使我们更深入地了解以 FGF-2 信号转导通路为目标的肿瘤治疗理论.

5 乳腺癌中 FGF-2 诱导的信号转导途径

FGF-2 在乳腺癌中是血管生成因子和促有丝分裂原. 体外实验结果表明, 乳腺癌细胞含有大量的 FGF-2 及其受体, 外源性的 FGF-2 可以促进或者抑制乳腺癌细胞的生长, 说明 FGF-2 可以通过自分泌或旁分泌机制影响乳腺癌细胞的生物学行为.

5.1 FGF-2 与乳腺癌

FGF-2 在鼠乳腺癌细胞中已经被鉴定为原癌基因, 但还没有证据表明 FGF-2 在人乳腺癌细胞中是癌基因. 尽管如此, 通过免疫组织化学、Western 印迹法及 RT-PCR 等方法, 发现乳腺恶性肿瘤细胞都有 FGF 受体的表达, 并能接受 FGF-2 的刺激. Moleskey 等人^[34]采用能特异性阻断 FGF 自分泌和旁分泌作用的药物——缩戊糖多聚硫酸盐, 有效地抑制分别用转染 FGF-1, FGF-4 基因的 MCF-7 乳癌细胞株在切除卵巢的裸鼠体内所形成的肿瘤的生长, 充分证明内源性和外源性的 FGF 均可促进乳腺癌细胞的生长. 可以猜测 FGF-2 在人乳腺癌细胞中极有可能也是原癌基因. Hsiung 等人^[35]发现, 出现在乳液中的 FGF-2 含量直接与乳腺癌的发生有关, 种族和生理方面的因素不影响这一规律.

有趣的是, Liu 等人^[36]及其他小组均发现, FGF-2 可以刺激某些乳腺细胞的分裂增殖, 但抑制另外一些乳腺癌细胞的分裂增殖. 进一步研究发现, FGF-2 对 MCF-7-ras 乳腺癌细胞(与 MCF-7 细胞株相比具更强的侵袭力, Ras 蛋白有高度的表达)的抑制分裂作用伴随着促细胞迁移效应. 通过研究, Liu 等人^[37]查明, Nck 和 Rac-1 等组成的功能性蛋白网络是 FGF-2 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞 DNA 合成所必需的. 提示 FGF-2 可能是通过 Rac-1/Nck 信号网络调节乳腺癌细胞的生长和迁移.

最近发现一种分子量为 30 kD 的 Cyclin D₂ 蛋白质分子也参与了这一过程^[38], 并可能是一个重要的调控靶点. Anne-Sophie 等人^[39]通过蛋白质组学的方法, 利用高分辨率二维电泳技术结合计算机 2D 自动放射分析和质谱分析(MALDI-TOF, MS-MS)等技术手段发现 HSP90, HSP70, PCNA 和 TCTP 4 种蛋白质分子在 FGF-2 诱导的乳腺癌细胞 MCF-7 中有高表达, 进而发现这 4 种蛋白与 FGF-2 诱导的乳腺癌细胞增殖有关. 随后, 用同样的方法发现, 14-3-3 σ 对乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 具有抑分裂促迁移的作用, 提示 14-3-3 σ 可能与 FGF-2 诱导的信号途径存在一个相互调节的关系^[40]. 奇怪的是, FGF-2 促进人乳腺癌细胞 MCF-7 和 T-47 细胞生长^[41,42], 却抑制人乳腺癌 MDA-MB-134 细胞. Fenig 等人^[43]研究发现, FGF-2 通过与高亲和受体结合来介导对乳腺癌细胞的抑制作用, 并且该过程不依赖 Ras 信号通路. 提示在人乳腺癌 MDA-MB-134 细胞中的 Ras 信号通路可能不参与 FGF-2 诱导的细胞信号转导过程. Liu 等人^[36]采用生物化学及分子生物学手段发现, FGF-2 对人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MCF-7-ras 细胞有相反的生物学效应, 是由于两种细胞中的促分裂激活蛋白激酶(MAPK)途径的活化水平不同造成的, 为我们试图解决上述矛盾提供了一个很好的方向. 但是, 这种解释还存在很大的局限性. 首先, 实验结果并没有在其他细胞系中普遍化, 而且该实验中所用的细胞 MCF-7-ras 是人为构建的, 与恶性癌细胞正常生理状态之间的差异可能存在; 再次, MAPK 活化水平是不是解释这一矛盾的惟一指标, 这些问题还有待进一步研究.

5.2 FGF-2 与乳腺相关的癌基因

FGF-2 及其受体与乳腺癌存在着十分密切的关系, 乳腺癌基因是正常基因组中的组成成分, 它是通过编码细胞内某些信息传递物质而调节细胞的生长和分化的. 目前我们所知道的与 FGF-2 有关的乳腺癌基因只有 *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* 和 *c-myb* 等. 其中 *c-fos* 和 *c-jun* 在正常细胞中表达量很少, 辐射、高血压和应激反应均可以诱导这些基因的早期过度表达, 所以也称为立即早期基因(IEG). FGF-2 在胞外刺激乳腺癌细胞以后, 通过其受体酪氨酸活化以激活胞内其他信号蛋白, 如 GRB₂, SHC, PLC γ 和 JNK₁ 分别激活 PLC γ /PIP₂/PKC, Ras/MAPK 途径和 JNK/SAPK 途径, 最终导致细胞核内 *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* 和 *c-myb* 等

转录因子的活化, 使细胞 DNA 合成增加, 进而造成细胞增殖和分化.

已有的研究资料表明, *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* 和 *c-myb* 这些基因可能诱导 FGF-2 mRNA 的表达, 而 p53 通过转录后水平抑制 FGF-2 表达, FGF-2 mRNA 翻译能力与内源性 p53 表达呈负相关^[44]. 其中 Fos 和 Jun 可以结合成稳定的异源二聚体转录因子蛋白-1 (AP-1), 识别 FGF-2 基因序列中的 TRE 位点, 启动 FGF-2 基因转录. AP-1 可能是 FGF-2 在核内的靶点分子, FGF-2 可以诱导 AP-1 的表达. 许多转录因子是通过调节 FGF-2 基因调控区启动子的活性而实现的, 静息状态下细胞内 *c-jun* 是以磷酸化的形式存在, 当外界因素改变并足以激活 PKC 通路的时候, 活化的 PKC 通过直接磷酸化激活 Raf-1, 使丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化, 触发 MAPK 磷酸化等一系列激酶级连反应, 使 *c-jun* 特异区域发生磷酸化, AP-1 和 DNA 结合的活性增高, 于是与 FGF-2 的基因启动子区域的 TRE 位点结合, 启动并激活其转录过程.

c-myc 和 *c-myb* 是基因表达调控中的一类反式作用因子, 其表达产物为 DNA 结合蛋白, 具有转录因子活性, 促进与乳腺癌细胞增殖有关的基因开放, 使细胞周期有序运行, 为乳腺癌细胞增殖提供保障. 而 FGF-2 属于启动因子, 可以促进相应的启动基因如 *c-myc* 的表达, 进而促进乳腺癌细胞的增殖. 也有报道称 FGF-2 与癌基因 *hst*, *int-2* 和 *hst/k-fgf* 等的表达产物具有高度同源性. 综合以上结果, 提示在基因水平上 FGF-2 参与了乳腺癌的生成过程.

5.3 乳腺癌中的 FGF-2 诱导的细胞信号转导途径

目前发现乳腺癌中 FGF-2 诱导的细胞信号转导途径共有以下 3 条:

(i) Ras/MAPK 通路. 在 HSPG 介导下, FGF-2 和 FGFR 的构象发生变化, 形成由 2 个 FGF-2, 2 个 FGFRs 和 1 个 HSPG 组成的五聚体. 由于 FGFR 是一类具受体功能的酪氨酸蛋白激酶, 五聚体的形成致使该受体的酪氨酸激酶域被激活. 激活后 FGFR 能够结合胞内的具有 SH2 结构的蛋白分子 GRB2 和 Shc 等, 继而结合在 FGFR 上面的 GRB2 可以与 SOS-1 蛋白形成具有激酶活性的聚合体, 从而介导 G 蛋白 Ras 的活化. 活化态的 Ras 在 GTP 酶激活蛋白 GAPs(如 Raf)催化下, 迅速水解 GTP, 激活 Raf 通路的下游蛋白激酶(MAPKKK), 进一步激活 MEK 蛋白(MAPKK)以及 MAPK, 最终影响转录因子 *c-fos* 等启动癌基因

的表达. Ras 蛋白的过度表达会造成乳腺癌细胞对 FGF-2 的刺激效应发生改变.

(ii) JNK/SAPK 通路. JNK/SAPK 途径传导细胞应激、细胞生长因子、紫外线、蛋白质合成抑制剂和渗透压应激等信号. 有资料表明^[45], JNK/SAPKs 活性的持续时间对于细胞的发育结果有重要影响. 在转染的细胞中过度表达活性 JNK 最终导致细胞凋亡, 而转染了 MEK 或 JNK 显性阴性突变体的细胞却能抵抗紫外线和 γ 射线而不发生凋亡. JNK/SAPK 途径胞外的激活过程与 Ras 通路差不多, Ras 蛋白被激活后, 激活的是另外的一些蛋白, 如 Rac 和 NCK 等, 这些蛋白进一步磷酸化 JNK/SAPK 蛋白, 继而激活转录因子 c-Jun(Ser63/Ser73), 使其结合到 TRE/AP-1 元件启动转录; 激活转录因子 ATF-2/CRE-BP1 (Thr69/Thr71), ATF-2 结合到 AP-1 启动转录; 还可激活转录因子 Elk1, 使其对启动细胞凋亡有重要作用. Liu 等人^[37]采用 Rho GTPase 蛋白 Rac-1 优势阴性突变体转染 MCF-7 细胞, 有效地抑制了 FGF-2 的促分裂增殖作用, 从而揭示了 Rac/JNK/SAPK 和 Ras/MAPK 信号级联途径的协同作用对 FGF-2 促分裂增殖的重要性.

(iii) PLC γ /PKC 和 Ca²⁺通路. PLC γ 涉及很多生长因子诱导的信号通路. 由于目前对乳腺癌这一通路的研究基本均起于 PLC γ 的磷酸化, 止于胞内 Ca²⁺ 的释放. 至于这一通路与乳腺癌细胞生长、增殖、迁移和凋亡的关系还不太清楚. 在内皮细胞, 巨粒细胞中的研究结果提示, PLC γ /PKC 和 Ca²⁺通路由于可以激活 MAPK, 可能参与乳腺癌细胞的增殖^[45], 但不是惟一的决定因素. PKC 和 Ca²⁺ 的浓度可能与乳腺癌细胞抗凋亡的能力有关, 但具体的作用机理还有待查明.

5.4 FGF-2 与乳腺癌细胞迁移和凋亡的关系

研究表明, 金属蛋白酶(MMPs)与癌细胞的增殖以及癌细胞的扩散转移有关, Liu 等人^[46]检测了 FGF-2 刺激过的乳腺癌细胞 MCF-7 和 MCF-7-ras 中 MMP-9 和 MMP-2 的表达量, 发现 FGF-2 在 MCF-7-ras 细胞系中诱导 MMP-9 表达量大幅升高, 而对 MMP-2 的表达量却没有影响, 进一步还查明该诱导过程可能通过依赖 Ras/MAPK 信号转导途径的蛋白激酶C(PKC)介导. 由此可以推测 FGF-2 诱导 MCF-7-ras 细胞的最终结果可能是细胞的迁移而非细胞死亡. Faridi 等人^[47]发现胞内 FGF-2 表达量与乳腺癌细胞的迁移和恶化有重要关系, 表达量越高越预示该乳腺

癌细胞的迁移扩散及恶化程度越高. 但 Randolph 等人^[48]发现 22~24 kD 的 FGF-2 组合物抑制 70% MCF-7 细胞迁移, 同时发现这一过程被雌激素受体(estrogen receptor)调控. Lan 等人^[49]发现, 24 kD 的 FGF-2 的 N 末端序列具有促进细胞增殖但抑制 MCF-7 细胞迁移和血管生成的作用; 并用 18 kD FGF-2 的抗体成功阻断 24 kD 的 FGF-2 的增殖作用, 但对其抑制癌细胞迁移没有任何影响; 用 24 kD FGF-2 的 N 末端序列的抗体成功阻断了其抑制细胞迁移作用, 但不能阻断其促细胞增殖作用, 提示 FGF-2 对乳腺癌细胞的刺激效应与细胞表达的 FGF-2 的种类以及细胞内其他分子对其的修饰结果有关. 经过统计可以发现这些矛盾的结果可能是由于各个实验中 FGF-2 的分子结构不同造成的, Liu 等人^[46]用的是 18 kD FGF-2, Randolph 等人^[48]用的是 22~24 kD FGF-2 组合物, 因此有理由推测由于不同的 CUG 翻译起点而出现的大分子量 FGF-2 所带有的 18 kD FGF-2 多出的那一小段氨基酸序列, 可能在 FGF-2 刺激乳腺癌细胞迁移或是诱导乳腺癌细胞凋亡中起着非常重要的作用. 不含多出那一段序列的 FGF-2 就会刺激细胞增殖直至癌细胞产生大量的 MMP-9, 发生迁移过程; 否则癌细胞迁移程度就会低得多, 但随着体内雌激素受体浓度的变化, 那一小段序列就会调节雌激素受体诱导的信号通路, 诱导癌细胞仍然发生迁移. 此外研究表明^[50], FGF-2 所诱导的细胞迁移效应好像伴随着 Src 信号转导通路的活化, 如 FGF-1 所诱导的细胞迁移需要 PP60^{Src} 蛋白的持续活化, 而在 FGF-1 所诱导的促细胞分裂增殖过程却没有类似的现象发生. 有报道表明^[51], FGF 所诱导的细胞迁移效应和 P38 MAPK 激酶以及 FAK 激酶的激活也有关系. 值得一提的是, 虽然 Anne 等人^[52]不是在乳腺癌细胞系中做的实验, 但他们发现 FGF-2 可以通过激活 Ras/MEK/MAPK 信号通路来抑制由 TNF α (肿瘤坏死因子, 可以激活 JNK)诱导的鼠纤维肉瘤细胞 L929 的凋亡, 但不影响 JNK 的活化效应, 这一结果似乎可以给我们很多启发. Bompard 等人^[53]利用蛋白-酪氨酸磷酸酶 PTPL1/FAP-1 反义转染乳腺癌细胞 MCF-7 发现可以阻断由 4-羟三苯氨诱导的细胞凋亡过程, 同时 MCF-7 中时间依赖性的 PTPL1/FAP-1 表达可以废除 IGF-1 的细胞存活作用, 提示 FGF-2 诱导的信号转导途径与蛋白-酪氨酸磷酸酶 PTPL1/FAP-1 可能存在着密切关系. 以上结果说明, FGF-2 的生物效应由

乳腺癌细胞所处的环境和条件决定, Ras 等信号通路可以影响 FGF-2 的刺激结果, 但绝对不是惟一有决定细胞生死去向的通路, 肯定存在另外的通路在影响着细胞, 这些通路在正常条件下可以相互协作造成 FGF-2 刺激后细胞增殖并迁移或死亡的效应, 当某些通路如 Ras 和 JUK 被过度活化以后, 将会把增殖并迁移的信号转变为凋亡信号, 造成乳腺癌细胞死亡. 需要指明的是, 仅有其中某一条通路(如 JNK 通路)的活化还不足以诱导细胞凋亡.

6 问题和展望

综上所述, 关于 FGF-2 在肿瘤及乳腺癌细胞中所诱导的信号转导机制的研究尚处在摸索阶段, 还有大量的问题需要解决, 尽管不断有新的发现, 如 Fürthauer 等人^[54]在斑马鱼中发现蛋白分子 Sef 调节由 Ras/Raf/MEK/MAPK 介导的 FGF 信号通路的活性. 但 FGF-2 在肿瘤细胞中诱导的信号网络是如何组成的? FGF-2 是否通过调节与诱导细胞增殖的信号通路, 抑或另一个完全不同的信号转导通路来诱导细胞迁移的机制? 这些通路是如何相互影响而调节细胞最终反应? 不同的实验组为什么会出现相互矛盾的结果? PLC γ 和 Ca²⁺在 FGF-2 介导的信号转导中的具体作用是什么等问题还不太清楚. 但前一阶段的工作已经为我们积累了经验, 奠定了基础, 相信不久的将来这一理论研究领域会有更大的突破.

在抗癌药物开发方面, 目前浙江大学和暨南大学已经开发出抗 FGF-2 抗体, 国际上的一些研究机构研究开发了肝素竞争型抑制剂、短肽抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂等抗乳腺癌肿瘤药物, 但这些药物总的来说只是在 FGF-2 信号网络的上游徘徊, 在中下游还有很大的探索空间, 只要我们能找到 FGF-2 诱导的信号通路中那些重要的开关蛋白, 就可以以其为目标蛋白, 进行新型抗癌药物的开发, 相信将会给生物制药领域带来巨大的发展空间. 同时, 对于进一步阐明乳腺癌的致病机理和改善乳腺癌的临床治疗方法也有着十分重大的意义.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 30100092).

参 考 文 献

- 1 Gospodarowicz D, Jones K L, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(6): 2295~2299
- 2 Abraham J A, Whang J L, Tumolo A, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J*, 1986, 5(10): 2523~2528
- 3 Faham S, Hileman R E, Fromm J R, et al. Heparin structure and interaction with basic fibroblast growth factor. *Science*, 1996, 271: 1116~1120
- 4 Matthew A N, Renato V I. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32: 115~120
- 5 Jasodhara R, Andrew B, Fred H G. A 10-amino acid sequence of fibroblast growth factor 2 is sufficient for its mitogenic activity on neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7047~7052
- 6 Qi L Y, Marios S, Dean G, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 183~186
- 7 杨蓉, 高艳萍, 刘惠喜. 碱性成纤维细胞生长因子及其受体与妇科肿瘤. 国外医学妇幼保健分册, 2002, 13(1): 25~27
- 8 Lee P L, Johnson D E, Cousens L S, et al. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*, 1989, 245: 57~60
- 9 洪岸, 林剑. 碱性成纤维细胞生长因子与肿瘤. *生命科学*, 2001, 13(4): 180~181
- 10 Chaudhuri M M, Moscatelli D, Basilico C. Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand receptor interactions. *J Cell Physiol*, 1993, 157: 209~216
- 11 Wang J K, Goldfarb M. Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. *Oncogene*, 1997, 14: 1767~1778
- 12 Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, et al. Identification of six novel auto phosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 977~989
- 13 Pellegrini L, David F, Burke F, et al. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ecto-domain bound to ligand and heparin. *Nature*, 2000, 407: 1029~1034
- 14 Berridge M J. Cell signaling. a tale of two messengers. *Nature*, 1993, 365: 388~389
- 15 Klint P, Kanda S, Kloog Y, et al. Contribution of Src and ras pathways in FGF-2-induced endothelial cell differentiation. *Oncogene*, 1999, 18: 3354~3364
- 16 Ktonks N, Neel B G. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatase. *Cell*, 1996, 87: 365~368
- 17 Zhang S C H, Wernig M, Duncan I D, et al. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (12): 1065~1087
- 18 Krejc P, Dvorakova D, Krahulcova E, et al. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemias. *Leukemia*, 2001, 15: 228~237
- 19 Rusnati M, Tulipano G, Urbinati C, et al. The basic domain in HIV-1 tat protein as a target for polysulfonated heparin-mimicking extracellular tat antagonists. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16027~16037
- 20 Karen M, Robert F. Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane, and kinase domains. *J Biol Chem*, 1996, 271: 25049~25057
- 21 Kilkenny D M, Hill D J. Perinuclear localization of an intracellular binding protein related to the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 is temporally associated with the nuclear trafficking

- ofFGF-2 in proliferating epiphyseal growth plate chondrocytes. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 5078~5089
- 22 徐卫明, 朱贤立. 碱性成纤维细胞生长因子在幕上星形细胞瘤中的表达及其意义. *癌症*, 2000, 19(1): 61~65
- 23 卞修武, 陈自强, 郭德玉, 等. 人脑胶质母细胞瘤细胞质 SHG-44 中血管生成因子和细胞周期调的表达. *中华病理学杂志*, 1999, 28(3): 178~181
- 24 Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol*, 1996, 10(3): 193~197
- 25 Holland E C, Varmus H E. Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(3): 1218~1223
- 26 Sturla L M, Westwood G, Peter J S, et al. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in ewing's sarcoma1. *Cancer Res*, 2000, 60: 6160~6170
- 27 Sugimoto H, Nishino H. Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) on the growth of human tumor cell lines. *Hum Cell*, 1996, 9(2): 129~140
- 28 Sabine M D, Yves T, Rhoda L, et al. Antitumor activity of fibroblast growth factors (FGFs) for medullo-blastoma may correlate with FGF receptor expression and tumor variant-1. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 246~257
- 29 Hajime K, Cao R H, Brakenhielm E, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8868~8873
- 30 Pamela M. Phorbol esters inhibit fibroblast growth factor-2-stimulated fibroblast proliferation by a p38 MAP kinase dependent pathway. *Oncogene*, 2002, 21: 1978~1988
- 31 Yaamazaki K, Nagao T, Yamaguchi T, et al. Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2)-associated with proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Arch*, 1998, 431(2): 95~101
- 32 George M L, Tutton M G, Abulafi A M, et al. Plasma basic fibroblast growth factor levels in colorectal cancer: a clinically useful assay? *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(8): 735~738
- 33 Cavallaro U, Niedermeyer J, Martin F, et al. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 650~657
- 34 Meleskey S W, Ding I Y, Lippman M E. MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res*, 1994, 54(2): 523~530
- 35 Hsiung R, Zhu W, Klein G, et al. High basic fibroblast growth factor levels in nipple aspirate fluid are correlated with breast cancer. *Pathol Res Pract*, 2002, 198(1): 1~5
- 36 Liu J F, Issad T, chevel E, et al. Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem*, 1998, 15, 258(1): 271~276
- 37 Liu J F, Chevet E, Kebache S, et al. Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene*, 1999, 18(47): 6425~6433
- 38 Sophie A V E, Lemoine J, Chanel E S, et al. The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett*, 2000, 478: 209~215
- 39 Anne-Sophie V E, Xavier C, Michel C, et al. Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 2001, 262: 59~68
- 40 Anne-Sophie V E, Lemoine J, Bourhis X L, et al. Proteomic analysis reveals that 14-3-3s is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 2001, 61: 76~80
- 41 Stewart A J, Westley B R, May F E B, et al. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factor by estrogens. *Br J Cancer*, 1992, 66: 640~648
- 42 Peyrat J P, Bonnetterre J, Hondermarck H, et al. Basic fibroblast growth factor: mitogenic activity and binding sites in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, 43: 87~94
- 43 Fenig E, Szyper-Kravitz M, Yerushalmi R, et al. Basic fibroblast growth factor mediated growth inhibition in breast cancer cells is independent of ras signaling pathway. *Oncol Rep*, 2002, 9(4): 875~877
- 44 Galy B, Creancier L, Zanibellato C, et al. Tumor suppressor p53 inhibits human fibroblast growth factor 2 expression by a post-transcriptional mechanism. *Oncogene*, 2001, 20(14): 1669~1677
- 45 郑铭, 韩启德. 参与细胞凋亡的丝裂原活化蛋白激酶及其作用机制. *生理科学进展*, 2000, 31(2): 157~160
- 46 Liu J F, Crepin M, Liu J M, et al. FGF-2 and TPA induce matrix metallo- proteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(4): 1174~1182
- 47 Faridi A, Rudlowski C, Biesterfeld S, et al. Long-term follow-up and prognostic significance of angiogenic basic fibroblast growth factor (bFGF) expression in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 2002, 86(5): 761~767
- 48 Randolph S P, Lan D, Pamela M, et al. Inhibition of cell migration by 24 kD fibroblast growth factor-2 is dependent upon the estrogen receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 3963~3970
- 49 Lan D, Fernando D, Graham C, et al. Inhibition of cell migration and angiogenesis by the aminoterminal fragment of 24 kD basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 31056~31061
- 50 Odier F M, Valles A M, Denoyelle M, et al. PP60^{Src} is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol*, 1995, 131: 761~773
- 51 Tanaka K, Abc M, Sato Y. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and P38 mitogen-activated kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90: 647~654
- 52 Anne M G, Gary L, Johnson N, et al. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor α -mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996, 271(24): 14560~14566
- 53 Bompard G, Francoise V. Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cell. *J Biol Chem*, 2002, 277(49): 47861~47869
- 54 Fürthauer M, Lin W, Ang S L, et al. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signaling. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 170~174

(2003-02-11 收稿, 2003-04-21 收修改稿)