

综述

巨噬细胞刺激蛋白的研究进展

张凯丽, 孙 晨*

(中国海洋大学海洋生命学院, 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003)

摘要: 巨噬细胞刺激蛋白(macrophage-stimulating protein, MSP)又称肝细胞生长因子样蛋白(hepatocyte growth factor-like protein, HGFL), 是受体酪氨酸激酶RON(recepteur d'origine nantais)的配体, 主要分布于脊椎动物中, 其前体为单链无活性结构, 经酶水解后形成具有活性的 α 链和 β 链, 两条链之间由二硫键相连。由于MSP的结构在不同物种间具有高度的保守性, 其功能也具有一定的相似性。近年来大量研究发现, MSP作为RON重要的配体参与信号转导、细胞增殖与迁移、免疫系统、线粒体调控和癌症发生。本文主要对MSP的演化、作用机制及发挥的主要功能做简要概述, 为相关研究工作提供一定的参考。

关键词: 巨噬细胞刺激蛋白; 受体酪氨酸激酶; 发育; 免疫反应; 肿瘤发生

Research progress of macrophage-stimulating protein

ZHANG Kaili, SUN Chen*

(College of Marine Life Sciences, Institute of Evolution & Marine Biodiversity,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Macrophage-stimulating protein (MSP), also known as hepatocyte growth factor-like protein (HGFL), is a ligand of RON (recepteur d'origine nantais) receptor tyrosine kinase, and mainly distributed in vertebrates. Its precursor, Pro-MSP, is a single-chain inactive protein which undergoes enzymatic hydrolysis to convert into an active MSP, which consists of α chain and β chain linked by a disulfide bond. The structure of MSP is highly conserved across different species, and its functions also exhibit a certain degree of similarity. In recent years, a multitude of studies have revealed that as a significant ligand of RON, MSP participates in processes such as signal transduction, cell proliferation and migration, immune system regulation, mitochondrial control, and the development of cancer. In this review, we briefly summarize the evolution, mechanisms of action and main functions of MSP, and provide a reference for related research endeavors.

Key Words: macrophage-stimulating protein; receptor tyrosine kinase; development; immune response; tumor occurrence

巨噬细胞刺激蛋白(macrophage-stimulating protein, MSP)也称为肝细胞生长因子样蛋白(hepatocyte growth factor-like protein, HGFL, HLP, HGFLP), 由MST1(macrophage-stimulating

1)基因编码, 是一种血清来源的生长因子, 属于纤溶酶原相关生长因子家族。MSP主要由肝脏产生, 以单链、无活性的MSP前体形式分泌到血液。机体发生凝血或局部炎症反应时, 无活性的MSP前

收稿日期: 2024-04-11

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2020MC050)

第一作者: E-mail: 1242063206@qq.com

*通信作者: E-mail: sunchen@ouc.edu.cn

体经过多种酶系统水解转化为具有活性的MSP, 激活的MSP包含 α 链和 β 链两部分, 由一个二硫键连接形成异二聚体^[1-3]。其中, β 链与特异性受体酪氨酸激酶RON(recepteur d'origine nantais)结合, 引起该受体的激酶结构域和羧基末端对接位点中多个酪氨酸残基的自磷酸化, 使细胞内酪氨酸激酶激活, 介导下游信号转导^[4]。除巨噬细胞外, MSP还影响破骨细胞、肝细胞、上皮细胞、内皮细胞等多种细胞, 通过介导不同的下游信号通路在调控炎症反应、发育、代谢、组织修复、癌症等多种生理和病理过程中发挥重要作用。

1 MSP的发现

MSP最初发现于1976年, 被认为是一种能够刺激小鼠腹腔巨噬细胞趋化反应、迁移和伸展的血清蛋白, 随后在人血清中分离到该蛋白质, 并对其理化性质进行了分析, 发现该蛋白质在人血清中的浓度不高于75 ng/mL, 具有热不稳定性^[5]。对MSP进行赖氨酰内肽酶水解, 并对其水解后的片段进行序列比对发现, 其中两个片段与含kringle结构域的蛋白家族成员高度相似^[6]。在人肝癌细胞系HepG2中克隆得到MSP的cDNA序列, 其编码的蛋白质序列中含有四个kringle结构域, 这种结构域组成与凝血酶原(prothrombin)、纤溶酶原(plasminogen)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等kringle蛋白家族成员类似^[3]。Han等^[7]在筛选人类基因组DNA文库时鉴定到一条基因序列, 该基因编码的蛋白质含有四个kringle结构域和一个丝氨酸蛋白酶样结构域(serine protease-like domain), 这与肝细胞生长因子中的结构域相似, 因此将其命名为肝细胞生长因子样蛋白。随后研究证明, 该HGFL与MSP具有相同的相对分子质量和氨基酸组成, 且能够激活巨噬细胞, 表明HGFL与MSP是相同的分子^[7,8]。

2 MSP的结构

人的无活性MSP蛋白前体pro-MSP是一个单链蛋白, 相对分子质量为80 000, 由711个氨基酸残基组成, 经胰蛋白酶样蛋白酶水解后转化为具有活性的MSP, 酶解位点位于pro-MSP蛋白的483位精氨酸残基(Arg483)和484位缬氨酸残基(Val484)之

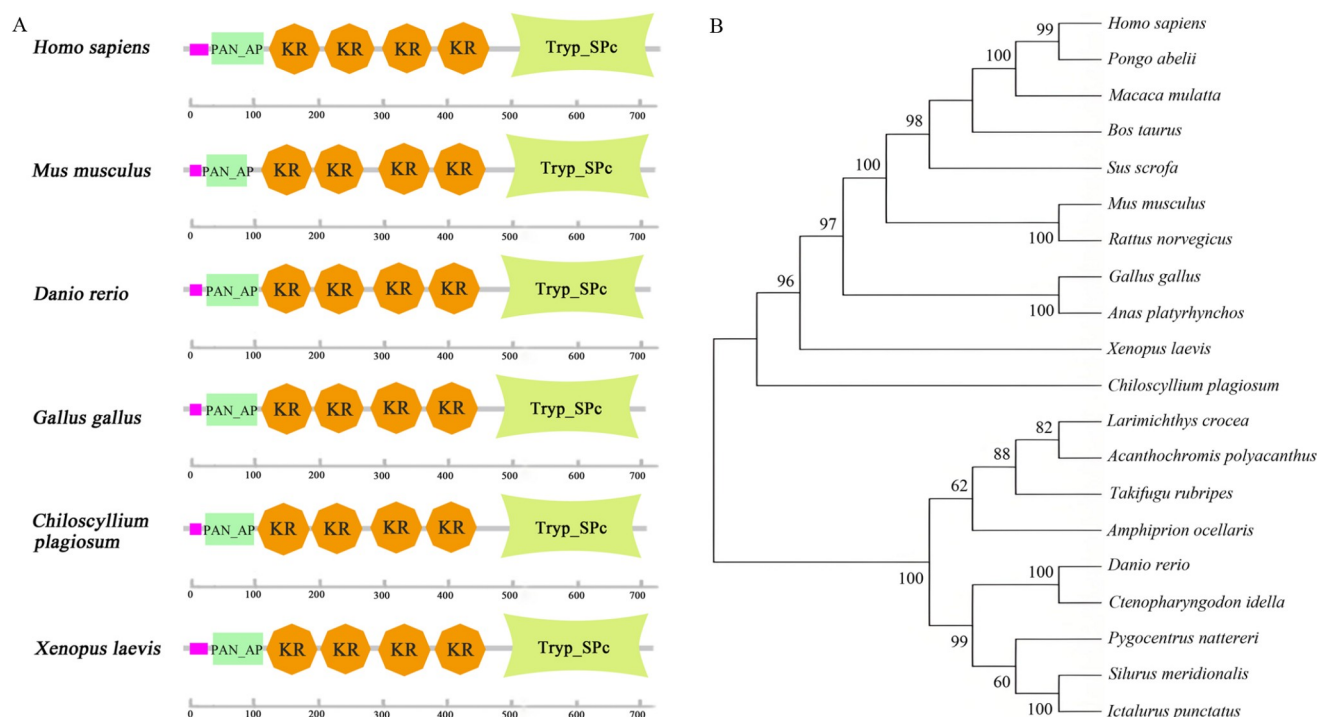
间^[2,5,9]。激活的MSP由 α 链和 β 链两部分组成, 由分别位于两条链上的468位和588位半胱氨酸残基(Cys468和Cys588)形成的链间二硫键连接, 组成异二聚体。其中, α 链由465个氨基酸残基组成, 相对分子质量为53 000, 包含一个与纤溶酶原预激活肽(plasminogen preactivation peptide, PAP)对应的氨基末端结构域(也称为发夹环, hairpin loop)、四个kringle结构域, 以及一个终止于裂解位点的片段。kringle结构域最初发现于牛凝血酶原中, 由大约80个氨基酸折叠成一个三重二硫化物连接的环。除凝血酶原外, 纤溶酶原、尿激酶、肝细胞生长因子等蛋白质中均有该结构域^[10]。MSP的 β 链则由228个氨基酸残基组成, 相对分子质量为25 000, 包含一个丝氨酸样蛋白酶结构域(serine-like protease domain)。但是, 由于催化三联体突变, 即蛋白质发挥催化活性必需的活性位点: 组氨酸(His522)、天冬氨酸(Asp568)和丝氨酸(Ser661)在MSP中分别被替换为谷氨酰胺(Gln522、Gln568)和酪氨酸(Tyr661), 该部分不具有酶活性, 仅保留了蛋白水解的活化机制^[3,7,10]。通过Smart网站预测人、小鼠、斑马鱼、鸡、爪蟾等物种MSP的结构域(图1A)都具有四个kringle结构域; 其他物种的MSP分子与人类的MSP具有高度的相似性。通过进化树分析(图1B), 人、小鼠等较高等物种聚成一簇, 而鱼类聚成一簇, 说明MSP在进化上具有较高保守性。

3 MSP的作用机制

一方面MSP可作为一种趋化剂以激活巨噬细胞调控细胞因子, 或作为上游信号分子, 调控信号通路; 另一方面, MSP作为RON唯一配体, 其发挥功能需要同RON结合^[11]。MSP与受体RON相互作用, 经由一些复杂的过程激活多个信号级联反应, 这一过程包括前MSP蛋白水解转化、MSP的 α 链和 β 链与RON胞外结构域的协同结合、RON的构象改变以及激酶结构域的自磷酸化和激活^[4,12,13]。

3.1 Pro-MSP蛋白水解转化

如上所述, 无生物活性的单链前体pro-MSP在血液中循环, 通过胰蛋白酶样蛋白酶水解后, 酶解为 α 链、 β 链两部分, 经链间二硫键连接形成异二聚体, 转化为具有活性的MSP分子。



A: Smart预测不同物种MSP的结构域; B: MSP在不同物种间的进化树分析

图1 MSP生物信息学分析

3.2 RON的结构

RON蛋白是一个异二聚体,成熟的RON蛋白由一条相对分子质量为35 000的 α 链和一条相对分子质量为145 000的 β 链通过二硫键连接而成。 α 链有284个氨基酸,构成信号素(semaphorin, SEMA)结构域的一部分。 β 链有1 096个氨基酸,包括一个大的胞外结构域、一个短的跨膜段、一个含有酪氨酸激酶结构域和一个羧基末端尾部的细胞质部分。SEMA结构域在MSP的 β 链上有一个高亲和力结合位点的配体结合袋^[14]。酪氨酸激酶结构域的酪氨酸残基(Tyr1238和Tyr1239)和羧基末端尾部的酪氨酸残基(Tyr1353和Tyr1360)在调控中起重要作用。人类RON受体的基因位于第7号染色体7q21-23区,在多种组织的上皮细胞中都有组成性表达。在正常组织和癌组织中经常观察到编码全长RON和短形式RON的两种转录本,这两种转录形式是分别由位于RON不同区域的两个启动子启动的。经典的RON启动子位于主要起始位点上游,负责启动全长RON转录本转录,其中包含多个调控元件;而另一个启动子则负责起始短形式RON转录本转录,并由其编码一个缺失大多数细胞外氨基酸的、氨基末端截断的RON分子^[15-19]。

3.3 RON的激活

MSP分子具有两个受体结合位点。高亲和力的结合位点位于MSP的 β 链上,它与RON的SEMA结构域的同二聚体形成的界面结合^[20,21]。MSP的 α 链上有一个低亲和力的结合位点,这个结合位点在RON细胞外序列中的位置是未知的。研究证实,激活RON需要MSP的 α 链和 β 链的结合。目前认可度较高的模型是一个MSP分子与两个RON分子相互作用,导致受体二聚化^[16]。蛋白质结构分析表明,MSP的 β 链之间的分子间相互作用不会产生受体结合界面,这表明受体结合不需要MSP的 β 链二聚化。相反,MSP单体利用 β 链上的高亲和力结合位点与RON同型二聚体形成的SEMA结构域的界面结合,然后MSP的 α 链上的低亲和力结合位点可以与之结合。MSP的 β 链和 α 链的顺序结合是激活RON所必需的^[22,23]。RON激活导致Tyr1238和Tyr1239在激酶域A环(Phe1227-Pro1250)上的自磷酸化。这些调控残基的磷酸化随后激活激酶活性,导致羧基末端对接位点的Tyr1353和Tyr1360进一步磷酸化^[23]。对接位点与下游信号蛋白相互作用,MSP-RON作为信号枢纽,能够破坏黏连蛋白与整合素- $\beta 4$ 的相互作用,进而促进细胞增殖和存活,

以及迁移和侵袭等^[24,25]。

4 MSP的功能

4.1 MSP与发育

MSP对动物体的发育起关键作用。研究发现, MSP会影响胚胎发育, 尽管缺失*Msp*基因的小鼠可以长到成年, 几乎没有明显的表型异常; 但是*Msp*受体*Ron*的完全缺失会导致小鼠胚胎早期死亡。*Ron*^{-/-}小鼠胚胎在发育的胚泡阶段可以存活, 但在植入子宫后不久便出现死亡。而*Ron*^{+/-}小鼠在大体形态、体重增加、存活率和生育能力方面没有明显异常, 能够正常存活^[26]。

MSP对胚胎发育的影响主要体现在两方面。一方面, Huitema等^[27]发现, *Msp*对胚胎的影响体现在骨骼矿化和钙稳态中, 受体*Ron*被证明在控制钙稳态的器官中特异性表达, *ron-2*的敲除也延缓了胚胎骨的形成。在含有10 mmol/L钙的培养基中生长的*msh*突变胚胎能够导致正常的成骨细胞成熟和骨形成, 推测*Msp/Ron*信号通路调节钙稳态以影响胚胎发育。此外, 原位杂交和免疫组织化学分析表明, *RON*存在于植入胚胎周围的胎盘外锥细胞和滋养层巨细胞区域。MSP结合激活*RON*受体后, 会增加SM9-1和SM-10滋养层细胞系的侵袭及存活率, 可能有助于滋养层功能和生存能力的植入^[28]。

另一方面, MSP结合受体后, *RON*通过其激酶催化结构域内的自磷酸化被激活, 导致一系列效应, 包括细胞运动、黏附、增殖、管状形态发生和细胞凋亡^[29,30]。研究发现, *RON*受体酪氨酸激酶在所有气管基底细胞上表达, 并且其配体MSP促进基底细胞生长, MSP激活*RON*受体后能显著增加纤毛的搏动频率, 通过增强纤毛细胞的运动进而促进纤毛黏液的运输^[31]。*Msp*缺失的小鼠表现出终末乳芽(*terminal end bud*, *TEB*)上皮细胞周转显著改变、增殖减少、细胞凋亡增加和*TEB*直径减少的现象, 乳腺中信号转导与转录激活因子3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, *STAT3*)的mRNA水平以及该蛋白的磷酸化水平较低。这说明MSP是乳腺导管形态发生的积极调节因子。乳腺发育除了与乳腺上皮细胞生长有关, 还与炎症浸润细胞-巨噬细胞有关, *Msp*^{-/-}乳腺中巨噬细胞数量显著减少, 抑制导管伸长。MSP可控

制发育中乳腺上皮细胞的周转、*STAT3*激活, 乳腺上皮特异的*STAT3*激活能够调节发育中的乳腺腺泡中巨噬细胞的募集数量, 进一步促进早期乳腺发育^[32]。除此之外, MSP在不影响细胞存活和增殖的情况下促进小胶质细胞迁移, 小胶质细胞能够促进神经系统的发育, 促进神经元的存活^[33]。MSP是感觉神经元和交感神经元亚群在发育过程中不同时间的靶向神经营养因子。神经生长因子依赖的感觉神经元随着年龄的增长对MSP的反应越来越强烈, 而交感神经元对MSP表现出早期反应^[34]。

4.2 MSP与免疫

MSP参与细胞免疫, 进而参与组织免疫反应。内皮细胞暴露于氧化应激, *Msp*的表达会显著升高, 而内皮细胞的活力和存活率就会迅速增加, 以应对氧化应激^[35]。一方面, MSP通过影响细胞的迁移、增殖能力调节伤口愈合。MSP能抑制小鼠胚胎成纤维细胞转录因子核因子- κ B (*transcription factor nuclear factor-kappaB*, *NF- κ B*)信号通路, 通过*NF- κ B*信号通路调控促炎因子。体外研究中, 使用不同浓度的MSP处理成纤维细胞, 发现MSP可以促进成纤维细胞迁移、I型和III型胶原的合成, 以及基质金属蛋白酶1 (*matrix metalloproteinase 1*, *MMP-1*) mRNA的表达^[36]。此外, 实时定量RT-PCR分析显示, MSP处理显著地增加了白细胞介素 (*interleukin*, *IL-6*)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, *GM-CSF*) 和诱导型一氧化氮合酶 (*inducible nitric oxide synthase*, *iNOS*) 的表达。这些发现首次证明MSP具有调节小胶质细胞炎症作用的潜力^[33]。研究发现, MSP/*RON*参与先兆子痫 (*preeclampsia*, *PE*) 的发生, 先兆子痫作为一种免疫相关疾病, 是妊娠期高血压疾病的一种, 能够危害孕妇及后代的短期或长期健康。胎盘发育不良是先兆子痫发病的重要原因, 滋养层分化受阻会导致螺旋动脉重塑受阻, 进而导致血管内皮损伤^[37]。MSP的低表达抑制了HTR-8/SVneo细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成。*PE*患者, 特别是早发性*PE*患者的血液和胎盘组织中MSP的降低, 导致滋养层细胞侵袭减少, 这在*PE*的发病机制中起着重要作用^[38,39]。

另一方面, MSP改变细胞形态、调控细胞因子

的生成以参与免疫应答。MSP能够改变巨噬细胞的形态,使细胞呈细长形状,液泡数量明显增加,MSP通过激活补体C3b受体CR1引发吞噬作用,吞噬经C3b活化的红细胞^[6,40],并抑制经内毒素刺激或细胞因子刺激的巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶mRNA的表达^[41]。在培养的人肾小球内皮细胞中,MSP处理诱导RON下游信号传导细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和AKT激酶的磷酸化,并诱导F-肌动蛋白的重组。在有镰状细胞病的小鼠中注射RON激酶抑制剂,显著减少肾小球肥大、毛细血管扩张和充血以及内皮损伤现象^[42]。*msp*^{-/-}斑马鱼表现为肠道嗜酸性粒细胞增多,肠道炎症标志物*mmp-9*表达增加,肠杯状细胞活化。此外,*msp*^{-/-}斑马鱼更容易导致固有层内免疫细胞的浸润和增殖增加,并促进了一些突变体的肠道促炎细胞因子反应^[43]。MSP预处理巨噬细胞导致STAT1酪氨酸磷酸化水平降低,*Msp*可能通过其下调*Il-12*的产生来抑制细胞介导的免疫反应,从而抑制巨噬细胞的经典激活^[44]。

4.3 MSP与线粒体调控功能

MSP作为重要的信号分子调控信号通路以影响线粒体功能,进而引发疾病。自身免疫性疾病,其特征是生物体不能耐受自己的细胞和组织,导致淋巴细胞和抗体产生异常免疫反应。类风湿性关节炎是一种影响骨骼和关节的慢性全身性自身免疫性疾病^[45],H₂O₂能够激活类风湿性关节炎相关成纤维细胞样滑膜细胞(rheumatoid arthritis-related fibroblast-like synoviocytes, RA FLSs)中的caspase3/9和Bax,诱导线粒体凋亡途径。研究发现,敲降MSP显著降低了RA FLSs中氧化应激诱导的线粒体功能障碍和细胞凋亡^[46]。*Sirt1*在H₂O₂处理的RA FLSs中表达显著降低,但在敲降MSP且用H₂O₂处理的RA FLSs中表达更高;*Sirt1*特异性抑制剂或腺苷酸活化蛋白激酶[(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)]拮抗剂预处理显著降低了H₂O₂处理的敲降MSP的RA FLSs的生存能力和线粒体功能^[46]。这些发现表明,氧化应激相关的MSP上调和激活通过抑制AMPK-Sirt1信号通路促进RA FLSs的线粒体功能障碍和细胞凋亡,所以MSP-AMPK-Sirt1通路可能是治疗类风湿性关节炎的潜在靶点。此外,MSP

可激活c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路,后者诱导氧化应激、三磷酸腺苷代谢紊乱、线粒体膜电位降低和心肌细胞死亡^[47]。

脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤与线粒体损伤有关,脑IR损伤降低了神经胶质细胞的线粒体膜电位和线粒体代谢,同时增强了这些细胞中线粒体活性氧的产生和线粒体钙水平。*Msp*的缺失通过改善线粒体功能和减少线粒体损伤进一步减轻脑IR损伤。研究发现,有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)或ERK通路在脑IR损伤后的野生型神经胶质细胞中被抑制,但在*Msp*敲除的神经胶质细胞被重新激活。脑IR损伤与大脑中MSP的上调有关,而MSP的基因消融可以减轻脑IR损伤后的线粒体损伤并维持大脑功能^[48]。此外,MSP还被证明是高血糖诱导的线粒体损伤和内皮细胞功能障碍的关键介质,MSP的增加会损害线粒体功能,并通过JNK打开线粒体凋亡通路,激活内皮细胞死亡^[49]。

MSP作为一种新型的线粒体自噬上游调节因子,通过抑制线粒体自噬活性来加剧心脏和癌症细胞凋亡。肥胖相关的非酒精性脂肪性肝与线粒体应激和肝细胞凋亡有关。*Msp*的基因消融减轻了高脂饮食介导的肝损伤并维持了肝细胞的活力。研究表明,*Msp*敲低逆转了Parkin相关的线粒体自噬,后者保护线粒体和肝细胞免受高脂饮食刺激。此外,进一步研究发现,MSP通过AMPK途径调节Parkin的表达;AMPK的阻断抑制了Parkin相关的线粒体自噬,并使肝细胞线粒体凋亡恢复。由于MSP上调,非酒精性脂肪性肝与Parkin相关的线粒体自噬缺陷密切相关,这一发现可能为脂肪肝的新治疗模式铺平道路^[50]。MSP是应激性肝脏炎症和脂质积聚的有效抑制剂,表明MSP在非酒精性脂肪肝中具有关键的调节作用^[51]。

4.4 MSP与癌症

MSP最初被鉴定为一种引起巨噬细胞趋化和活化的血清蛋白^[40],不仅参与炎症反应,还与癌症相关。目前研究证据表明,MSP与其受体RON是肿瘤发生的关键因素。

RON是间质表皮转化因子(mesenchymal to epithelial transition factor, MET)原癌基因家族成员,与MET具有同源性及功能相似性。研究发现,

RON在机体多种细胞中低表达, 过表达RON及其三种突变体的小鼠胚胎成纤维细胞系NIH3T3产生了转化表型, 显示出致癌潜力和高度的致瘤性, 表明*Ron*在过度表达或突变激活时可能是一种侵袭性癌基因^[29]。RON在多种癌症中异常表达, 在乳腺癌、结肠癌、肺癌、膀胱癌和卵巢癌中均发现RON表达升高。根据不同类型的癌症, 高表达的发生率从32.8%到59%不等^[52-55]。*Ron*在约50%的原发性乳腺癌中异常高水平表达, 但是*Ron*在乳腺上皮细胞中几乎检测不到, 而其在乳腺良性病变(包括腺瘤和乳头状瘤)中的表达则保持不变^[54]。MSP与RON受体结合, 后者激活丝氨酸/苏氨酸激酶1和MAPK信号传导以诱导乳腺癌细胞生长^[56]。相较于正常结直肠黏膜中的表达量, RON在大多数原发结直肠腺癌样本中表达量显著升高^[52]。进一步的研究显示, RON的高表达在酪氨酸残基的自磷酸化过程中具有组成性活性^[52-55,57]。在膀胱癌样本中, RON的异常表达水平与组织学分级、肿瘤大小、非乳头状轮廓和肿瘤分期呈正相关^[53]。在卵巢癌的研究中发现, *RON*和*MET*癌基因分别在约55%和56%的原发性人卵巢癌样本中表达, 且在42%的人卵巢癌中显著共表达。RON和*MET*在细胞表面能够形成非共价复合物, 并在细胞内信号传导中相互作用, 介导癌细胞的运动性和侵袭性, 表明*MET*和RON共表达可能促进卵巢癌的发展^[57]。另外, MSP也被报道可能影响人类小细胞肺癌的骨向性, 因为MSP的表达在骨转移病灶中上调, MST1R/RON受体酪氨酸激酶在所有基底细胞中都有表达, 并确定其配体MST1/MSP是气管支气管基底细胞的一种新的有丝分裂信号, 是鳞状细胞癌的新型标志物^[58], 这些结果为RON在不同类型的正常和肿瘤组织中的表达水平提供了有价值的信息, 具有重要的病理意义。在某些类型的癌症中, 改变的RON表达水平是一个明显的特征, 可能具有预后或诊断价值。

MSP-RON信号传导对不同类型癌症的侵袭性生长很重要。在小鼠乳腺肿瘤的自发转移模型中, MSP促进了肿瘤向各种器官转移, 尤其是向骨骼的远端转移^[59]。MSP-RON通路在组织微环境, 特别是肿瘤免疫微环境中发挥着重要作用^[60]。肝转移瘤的免疫组织化学分析显示, 在MSP转染后产生

的病变中, 肿瘤相关微血管密度和肿瘤浸润性巨噬细胞显著增加。MSP能促进小鼠巨噬细胞和内皮细胞的体外迁移, 表明MSP可能是影响肿瘤间质性质的主要决定因素之一, 并产生促进癌症转移的有利微环境^[61]。CC趋化因子配体20(C-C motif chemokine ligand 20, CCL20)与CC趋化因子受体6(C-C motif chemokine receptor 6, CCR6)的相互作用被揭示为促进癌症发展的关键因素, CCL20能促使结直肠癌细胞产生MSP, 并触发MSP受体的磷酸化; 直接阻断MSP与其受体的相互作用, 可以抑制CCL20依赖的细胞增殖, 表明MSP能够调节CCL20介导的细胞增殖进而调控癌症发生^[62]。

MSP促进乳腺癌细胞的侵袭性表型, 而阻断RON表达能够消除细胞侵袭性^[63], 例如, 抑制RON表达能有效清除肺部转移性乳腺癌细胞^[64]; 而*RON*特异性的小干扰RNA能显著影响癌细胞的增殖、运动, 并导致癌细胞凋亡增加, 几乎可以完全消除MSP诱导的结肠癌细胞迁移^[65]。在胃癌中, 尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)和尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)水平的增加对于维持侵袭性和转移性表型至关重要, MSP可通过MAPK、激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)和NF- κ B信号通路诱导诱导人胃癌细胞中*uPAR*的表达, 进而刺激胃癌细胞的侵袭性^[66]。在实验性转移模型中, RON蛋白改变的两个细胞系在肺部形成了高度侵袭性的肿瘤, 表明*RON*在过表达或被突变激活时可能是一种侵袭性癌基因^[29]。类似的, RON及其剪接变异体的过表达在胃癌的细胞侵袭和转移中起重要作用^[63]。MSP在胰腺细胞系中激活RON可进一步激活ERK和AKT通路, 并诱导上皮细胞-间充质转化发生, 细胞迁移、侵袭增加^[63,67,68], 而RON受体抑制剂则可抑制细胞迁移和侵袭表型^[69]。此外, 酪氨酸激酶抑制剂以及针对RON受体的特定单克隆抗体, 均能抑制三阴性乳腺癌和胰腺导管腺癌等多种肿瘤细胞的生长和增殖^[70,71]。

在尿路上皮细胞系中, RON的过表达可导致细胞增殖、运动和存活增加^[53]。RON还在这些细胞中与*MET*和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)发生作用; 在19%的膀胱癌

患者中, RON和MET共表达与其生存率或无转移生存率降低显著相关^[53]; 在33%的膀胱癌患者中发现RON和EGFR共表达, 并与侵袭、复发风险和患者生存率降低显著相关^[72]。在卵巢癌患者中, RON的表达水平也与生存率降低有显著相关性^[69]。RON的过表达与MET的同时表达之间存在相关性, 并且MSP或HGF在体外刺激卵巢癌细胞系可导致其运动性和侵袭性增加^[57]。MSP也在胶质母细胞瘤细胞系中表达, 能增加细胞迁移; 而一种新的可溶性受体剪接变体RON Δ 90, 可以抑制MSP诱导的RON磷酸化和胶质瘤细胞迁移和随机运动^[73]。

RON的表达与原发肿瘤的分期相关。研究发现, Ron在前列腺腺癌和转移性淋巴结中高度表达; 血管生成趋化因子的水平与Ron的表达正相关, Ron的下调导致体内血管生成因子的产生减少、NF- κ B激活降低, 以及内皮细胞趋化性降低。敲低Ron也导致肿瘤生长和微血管密度下降, 表明RON可能在前列腺癌血管生成过程中发挥重要作用^[74]。研究发现, 癌细胞与异常糖基化机制有关, RON的N-二等分糖基化的缺失是癌症患者肿瘤发生和预后较差的直接原因。特别是在胃癌中, 异常的RON糖基化增强了RON的激活^[75]。除此之外, RON和HGF在乳腺癌细胞中的共同过表达, 通过自分泌介导的RON激活/RON依赖性分泌组改变和巨噬细胞RON的旁分泌激活, 促进乳腺癌干细胞的自我更新, 进而促进肿瘤发生^[76]。

MSP与其受体RON能够促进肿瘤生成, 但也有研究表明MSP能抑制癌症发生。正常情况下, 线粒体产生ATP以确保癌细胞的生长; 然而当暴露于辐射、化疗和受免疫调节后, 线粒体凋亡被激活并促进癌症死亡。IL-24会引发线粒体膜电位降低、线粒体ROS积累、ATP供应不足, 触发线粒体凋亡; 而线粒体自噬可以在溶酶体的作用下清除受损的线粒体, 抑制线粒体凋亡^[77]。MSP过表达通过抑制ERK-Mfn2途径来抑制线粒体自噬活性, 进而通过加剧线粒体应激, 增强了IL-24诱导的食管癌细胞的死亡^[77]。在肺癌中, MSP过表达可以激活线粒体分裂, 后者促进癌细胞死亡^[78]。肿瘤的代谢状态与肿瘤分化也受MSP的调控^[79,80]。MSP不仅在肝细胞癌中高表达, 而且能够激活 $\gamma\delta$ T细胞, 增强它们的活性, 并通过直接和间接的方式导致癌

细胞的死亡, 这为治疗肝细胞癌提供了新策略^[81]。

综上, MSP多数情况下会促进肿瘤细胞转移或生长, 进而促进肿瘤发展, 但是其也会作为信号分子调控其他信号分子, 起到抑制肿瘤的作用, 但具体的抑制机制相关报道较少。

5 小结与展望

MSP为巨噬细胞刺激蛋白, 其前体是无生物活性的单链结构, 同时也是参与众多细胞生长、迁移、生成作用的调控因子, 其唯一受体RON作为信号通路中的枢纽, 被MSP激活后通过结合下游信号分子参与机体发育、凋亡、免疫等生物过程。此外, MSP和RON还在癌症发生过程中发挥重要作用, 可作为癌症的新型标志物。然而, MSP/RON调控癌症的具体分子机制尚未明确。进一步深入挖掘其在免疫炎症、发育等过程中的作用机制, 将有助于加深我们对免疫学相关领域的认识, 为癌症的诊断治疗提供新的方向和思路, 具有潜在的临床价值。

参考文献

- [1] Sanjeev D, Dagamajalu S, Shaji V, et al. A network map of macrophage-stimulating protein (MSP) signaling. *J Cell Commun Signal*, 2023, 17(3): 1113-1120
- [2] Wang MH, Yoshimura T, Skeel A, et al. Proteolytic conversion of single chain precursor macrophage-stimulating protein to a biologically active heterodimer by contact enzymes of the coagulation cascade. *J Biol Chem*, 1994, 269(5): 3436-3440
- [3] Yoshimura T, Yuhki N, Wang MH, et al. Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on chromosome 3. *J Biol Chem*, 1993, 268(21): 15461-15468
- [4] Wang J, Steinbacher S, Augustin M, et al. The crystal structure of a constitutively active mutant RON kinase suggests an intramolecular autophosphorylation hypothesis. *Biochemistry*, 2010, 49(37): 7972-7974
- [5] Leonard EJ, Skeel AH. Isolation of macrophage stimulating protein (MSP) from human serum. *Exp Cell Res*, 1978, 114(1): 117-126
- [6] Skeel A, Yoshimura T, Showalter SD, et al. Macrophage stimulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *J Exp Med*, 1991, 173(5): 1227-1234

- [7] Han S, Stuart LA, Degen SJF. Characterization of the DNF15S2 locus on human chromosome 3: identification of a gene coding for four Kringle domains with homology to hepatocyte growth factor. *Biochemistry*, 1991, 30(40): 9768-9780
- [8] Shimamoto A, Kimura T, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor-like protein is identical to macrophage stimulating protein. *FEBS Lett*, 1993, 333(1-2): 61-66
- [9] Wang MH, Gonias SL, Skeel A, et al. Proteolytic activation of single-chain precursor macrophage-stimulating protein by nerve growth factor-gamma and epidermal growth factor-binding protein, members of the kallikrein family. *J Biol Chem*, 1994, 269(19): 13806-13810
- [10] Danilkovitch-Miagkova A. Macrophage-stimulating protein. *Encyclopedia of Cancer*, 2009. doi: 10.1007/978-3-540-47648-1_3486
- [11] Skeel A, Leonard EJ. Action and target cell specificity of human macrophage-stimulating protein (MSP). *J Immunol*, 1994, 152(9): 4618-4623
- [12] Yokoyama N, Ischenko I, Hayman MJ, et al. The C terminus of RON tyrosine kinase plays an autoinhibitory role. *J Biol Chem*, 2005, 280(10): 8893-8900
- [13] Carafoli F, Chirgadze DY, Blundell TL, et al. Crystal structure of the β -chain of human hepatocyte growth factor-like/macrophage stimulating protein. *FEBS J*, 2005, 272(22): 5799-5807
- [14] Chao KL, Tsai IW, Chen C, et al. Crystal structure of the sema-PSI extracellular domain of human RON receptor tyrosine Kinase. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41912
- [15] Yao HP, Zhou YQ, Zhang R, et al. MSP-RON signalling in cancer: pathogenesis and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(7): 466-481
- [16] Bardella C, Costa B, Maggiora P, et al. Truncated RON tyrosine kinase drives tumor cell progression and abrogates cell-cell adhesion through e-cadherin transcriptional repression. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5154-5161
- [17] Angeloni D, Danilkovitch-Miagkova A, Ivanov SV, et al. Gene structure of the human receptor tyrosine kinase RON and mutation analysis in lung cancer samples. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29(2): 147-156
- [18] Angeloni D, Danilkovitch-Miagkova A, Ivanova T, et al. Hypermethylation of Ron proximal promoter associates with lack of full-length Ron and transcription of oncogenic short-Ron from an internal promoter. *Oncogene*, 2007, 26(31): 4499-4512
- [19] Del Gatto F, Gilbert E, Ronsin C, et al. Structure of the promoter for the human macrophage stimulating protein receptor gene. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1263(1): 93-95
- [20] Ma Q, Zhang K, Yao HP, et al. Inhibition of MSP-RON signaling pathway in cancer cells by a novel soluble form of RON comprising the entire sema sequence. *Int J Oncol*, 2010, 36(6): 1551-1561
- [21] Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, et al. Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the β -catenin pathway. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(17): 5857-5868
- [22] Wang MH, Julian FM, Breathnach R, et al. Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP β chain. *J Biol Chem*, 1997, 272(27): 16999-17004
- [23] Xiao ZQ, Chen YQ, Wang MH. Requirement of both tyrosine residues 1330 and 1337 in the C-terminal tail of the RON receptor tyrosine kinase for epithelial cell scattering and migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(2): 669-675
- [24] Côté M, Miller AD, Liu SL. Human RON receptor tyrosine kinase induces complete epithelial-to-mesenchymal transition but causes cellular senescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 219-225
- [25] Yu PT, Babicky M, Jaquish D, et al. The RON-receptor regulates pancreatic cancer cell migration through phosphorylation-dependent breakdown of the hemidesmosome. *Intl J Cancer*, 2012, 131(8): 1744-1754
- [26] Muraoka RS, Sun WY, Colbert MC, et al. The Ron/STK receptor tyrosine kinase is essential for peri-implantation development in the mouse. *J Clin Invest*, 1999, 103(9): 1277-1285
- [27] Huitema LFA, Renn J, Logister I, et al. Macrophage-stimulating protein and calcium homeostasis in zebrafish. *FASEB J*, 2012, 26(10): 4092-4101
- [28] Hess KA, Waltz SE, Chan EL, et al. Receptor tyrosine kinase ron is expressed in mouse reproductive tissues during embryo implantation and is important in trophoblast cell function1. *Biol Reprod*, 2003, 68(4): 1267-1275
- [29] Peace BE, Hughes MJ, Degen SJF, et al. Point mutations and overexpression of Ron induce transformation, tumor formation, and metastasis. *Oncogene*, 2001, 20(43): 6142-6151
- [30] Iwama A, Yamaguchi N, Suda T. STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *EMBO J*, 1996, 15(21): 5866-5875
- [31] Sakamoto O, Iwama A, Amitani R, et al. Role of macrophage-stimulating protein and its receptor, RON tyrosine kinase, in ciliary motility. *J Clin Invest*, 1997, 99(4): 701-709
- [32] Gurusamy D, Ruiz-Torres SJ, Johnson AL, et al. Hepatocyte growth factor-like protein is a positive regulator of early mammary gland ductal morphogenesis. *Mech Dev*, 2014, 133: 11-22
- [33] Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, et al. Regulation of

- cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP)/macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia. *Biomed Res*, 2008, 29(2): 77-84
- [34] Forgie A, Wyatt S, Correll PH, et al. Macrophage stimulating protein is a target-derived neurotrophic factor for developing sensory and sympathetic neurons. *Development*, 2003, 130(5): 995-1002
- [35] Lu K, Zhao J, Liu W. Macrophage stimulating 1-induced inflammation response promotes aortic aneurysm formation through triggering endothelial cells death and activating the NF- κ B signaling pathway. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(4): 374-382
- [36] Zhao J, Hu L, Gong N, et al. The effects of macrophage-stimulating protein on the migration, proliferation, and collagen synthesis of skin fibroblasts *in vitro* and *in vivo*. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(5-6): 982-991
- [37] Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, et al. Preeclampsia: Pathophysiology and clinical implications. *BMJ*, 2019, 366: 12381
- [38] Zhang Y, Yang H, Zhang Y, et al. circCRAMP1L is a novel biomarker of preeclampsia risk and may play a role in preeclampsia pathogenesis via regulation of the MSP/ RON axis in trophoblasts. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2020, 20(1): 652
- [39] Chen H, Zhang Y, Jia J, et al. Macrophage-stimulating protein is decreased in severe preeclampsia and regulates the biological behavior of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta*, 2021, 103: 33-42
- [40] Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol*, 2002, 56(6): 545-553
- [41] Wang MH, Skeel A, Leonard EJ. Proteolytic cleavage and activation of pro-macrophage-stimulating protein by resident peritoneal macrophage membrane proteases. *J Clin Invest*, 1996, 97(3): 720-727
- [42] Khaibullina A, Adjei EA, Afangbedji N, et al. RON kinase inhibition reduces renal endothelial injury in sickle cell disease mice. *Haematologica*, 2018, 103(5): 787-798
- [43] Witte M, Huitema LFA, Nieuwenhuis EES, et al. Deficiency in macrophage-stimulating protein results in spontaneous intestinal inflammation and increased susceptibility toward epithelial damage in zebrafish. *Zebrafish*, 2014, 11(6): 542-550
- [44] Morrison AC, Wilson CB, Ray M, et al. Macrophage-stimulating protein, the ligand for the stem cell-derived tyrosine kinase/RON receptor tyrosine kinase, inhibits IL-12 production by primary peritoneal macrophages stimulated with IFN- γ and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 2004, 172(3): 1825-1832
- [45] Engin B, Sevim A, Cesur SK, et al. Eruptions in life-threatening rheumatologic diseases. *Clin Dermatol*, 2020, 38(1): 86-93
- [46] Wang Y, Yang Q, Shen S, et al. Mst1 promotes mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidative stress-induced rheumatoid arthritis synoviocytes. *Aging*, 2020, 12(16): 16211-16223
- [47] Ouyang H, Li Q, Zhong J, et al. Combination of melatonin and irisin ameliorates lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction through suppressing the Mst1-JNK pathways. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6647-6659
- [48] Zhou D, Zhang M, Min L, et al. Cerebral ischemia-reperfusion is modulated by macrophage-stimulating 1 through the MAPK-ERK signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 7067-7080
- [49] Qin R, Lin D, Zhang L, et al. Mst1 deletion reduces hyperglycemia-mediated vascular dysfunction via attenuating mitochondrial fission and modulating the JNK signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 294-303
- [50] Zhou T, Chang L, Luo Y, et al. Mst1 inhibition attenuates non-alcoholic fatty liver disease via reversing Parkin-related mitophagy. *Redox Biol*, 2019, 21: 101120
- [51] Chanda D, Li J, Oligschlaeger Y, et al. MSP is a negative regulator of inflammation and lipogenesis in *ex vivo* models of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Med*, 2016, 48(9): e258
- [52] Zhou YQ, He C, Chen YQ, et al. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene*, 2003, 22(2): 186-197
- [53] Cheng HL, Liu HS, Lin YJ, et al. Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*, 2005, 92(10): 1906-1914
- [54] Maggiora P, Marchio S, Stella MC, et al. Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene*, 1998, 16(22): 2927-2933
- [55] Lee WY, Chen HH, Chow NH, et al. Prognostic significance of co-expression of RON and MET receptors in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2222-2228
- [56] Millar R, Kilbey A, Remak SJ, et al. The MSP-RON axis stimulates cancer cell growth in models of triple negative breast cancer. *Mol Oncol*, 2020, 14(8): 1868-1880
- [57] Maggiora P. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res*, 2003, 288(2): 382-389
- [58] Van de Laar E, Clifford M, Hasenoeder S, et al. Cell

- surface marker profiling of human tracheal basal cells reveals distinct subpopulations, identifies MST1/MSP as a mitogenic signal, and identifies new biomarkers for lung squamous cell carcinomas. *Respir Res*, 2014, 15(1): 160
- [59] Welm AL, Sneddon JB, Taylor C, et al. The macrophage-stimulating protein pathway promotes metastasis in a mouse model for breast cancer and predicts poor prognosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7570-7575
- [60] Huang L, Fang X, Shi D, et al. MSP-RON pathway: potential regulator of inflammation and innate immunity. *Front Immunol*, 2020, 11: 569082
- [61] Sato S, Hanibuchi M, Kuramoto T, et al. Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(3): 333-344
- [62] Nandi B, Del Valle JP, Samur MK, et al. CCL20 induces colorectal cancer neoplastic epithelial cell proliferation, migration, and further CCL20 production through autocrine HGF-c-Met and MSP-MSPR signaling pathways. *Oncotarget*, 2021, 12(24): 2323-2337
- [63] Zhou D, Pan G, Zheng C, et al. Expression of the RON receptor tyrosine kinase and its association with gastric carcinoma versus normal gastric tissues. *BMC Cancer*, 2008, 8(1): 353
- [64] Ekiz HA, Lai SCA, Gundlapalli H, et al. Inhibition of RON kinase potentiates anti-CTLA-4 immunotherapy to shrink breast tumors and prevent metastatic outgrowth. *Oncoimmunology*, 2018, 7(9): e1480286
- [65] Xu XM, Wang D, Shen Q, et al. RNA-mediated gene silencing of the RON receptor tyrosine kinase alters oncogenic phenotypes of human colorectal carcinoma cells. *Oncogene*, 2004, 23(52): 8464-8474
- [66] Park JS, Park JH, Khoi PN, et al. MSP-induced RON activation upregulates uPAR expression and cell invasiveness via MAPK, AP-1 and NF- κ B signals in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 175-181
- [67] Thomas RM, Toney K, Fenoglio-Preiser C, et al. The RON receptor tyrosine kinase mediates oncogenic phenotypes in pancreatic cancer cells and is increasingly expressed during pancreatic cancer progression. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6075-6082
- [68] Camp ER, Yang A, Gray MJ, et al. Tyrosine kinase receptor RON in human pancreatic cancer. *Cancer*, 2007, 109(6): 1030-1039
- [69] Yao HP, Suthe SR, Hudson R, et al. Antibody-drug conjugates targeting RON receptor tyrosine kinase as a novel strategy for treatment of triple-negative breast cancer. *Drug Discov Today*, 2020, 25(7): 1160-1173
- [70] Yao HP, Hudson R, Wang MH. RON receptor tyrosine kinase in pancreatic ductal adenocarcinoma: pathogenic mechanism in malignancy and pharmaceutical target for therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2): 188360
- [71] Hsu PY, Liu HS, Cheng HL, et al. Collaboration of RON and epidermal growth factor receptor in human bladder carcinogenesis. *J Urol*, 2006, 176(5): 2262-2267
- [72] Ferrandina G, Martinelli E, Petrillo M, et al. Prognostic role of the recepteur d'origine nantais (RON) expression in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(2): 237-243
- [73] Eckerich C, Schulte A, Martens T, et al. RON receptor tyrosine kinase in human gliomas: expression, function, and identification of a novel soluble splice variant. *J Neurochem*, 2009, 109(4): 969-980
- [74] Thobe MN, Gurusamy D, Pathrose P, et al. The Ron receptor tyrosine kinase positively regulates angiogenic chemokine production in prostate cancer cells. *Oncogene*, 2010, 29(2): 214-226
- [75] Koh XY, Koh XH, Hwang L, et al. Therapeutic anti-cancer activity of antibodies targeting sulfhydryl bond constrained epitopes on unglycosylated RON receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 2019, 38(48): 7342-7356
- [76] Hunt BG, Jones A, Lester C, et al. RON (MST1R) and HGFL (MST1) Co-Overexpression Supports Breast Tumorigenesis through Autocrine and Paracrine Cellular Crosstalk. *Cancers*, 2022, 14(10): 2493
- [77] Zhang J, Sun L, Li W, et al. RETRACTED: Overexpression of macrophage stimulating 1 enhances the anti-tumor effects of IL-24 in esophageal cancer via inhibiting ERK-Mfn2 signaling-dependent mitophagy. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108844
- [78] Xie Y, Lv Y, Zhang Y, et al. LATS2 promotes apoptosis in non-small cell lung cancer A549 cells via triggering Mff-dependent mitochondrial fission and activating the JNK signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 679-689
- [79] Furth N, Pateras IS, Rotkopf R, et al. LATS1 and LATS2 suppress breast cancer progression by maintaining cell identity and metabolic state. *Life Sci Alliance*, 2018, 1(5): e201800171
- [80] Edwards KS, Ashraf S, Lomax TM, et al. Uncoupling protein 3 deficiency impairs myocardial fatty acid oxidation and contractile recovery following ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 2018, 113(6): 47
- [81] Du B, Yu R, Geng X, et al. The function of MSP-activated γ δT cells in hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124: 110893