

成纤维细胞生长因子与其受体相互作用及其抑制剂的研究进展*

范洪宽 周慧** 李惟

(吉林大学生命科学学院, 长春 130023)

摘要 成纤维细胞生长因子 (FGF) 有许多重要的生理功能, 并与肿瘤的形成有关. 为了弄清 FGF 与成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 相互作用的机制, 人们对 FGF 和 FGFR 的各个结合结构域进行了深入、细致的研究, 定位了 aFGF、bFGF 的肝素结合区、bFGF 的受体结合区、FGF 受体的肝素结合区、配体结合区和 FGF 受体相互结合区, 提出了两个 FGF 与 FGFR 相互作用的模型, 在此基础上设计了 FGF 的核酸类、糖类和多肽类抑制剂, 为寻找新一代抗癌药物打下了理论基础.

关键词 成纤维细胞生长因子, 受体, 肝素, 抑制剂

学科分类号 Q78

成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族包含至少 19 个成员, 其中 aFGF (FGF-1) 和 bFGF (FGF-2) 发现得最早, 研究得比较清楚, 此外还有 KGF (FGF-7)、FGF-8、FGF-9、KGF-2 (FGF-10)、FGF-11 和癌基因产物 int-2 (FGF-3)、hst-1 (FGF-4)、FGF-5、hst-2 (FGF-6) 等. 这些结构功能相关的多肽类生长因子对多种细胞有不同的促有丝分裂作用, 它们在促进血管生成、创伤愈合和组织损伤修复过程中作用巨大, 同时在胚胎发育以及肿瘤形成过程中也有重要作用. 因此对 FGF 与成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 的相互作用以及其信号传递进行研究, 将有利于揭示肿瘤形成机制, 并可能成为寻找抗肿瘤药物的新靶点.

1 成纤维细胞生长因子的结合结构域

通过对 aFGF 和 bFGF 的三维结构进行研究, 人们发现 aFGF 的肝素结合位点为 24~28, 113~116 两段区域, bFGF 的肝素结合位点为 27~31, 116~119 两段区域. 关于 bFGF 的受体结合区, Baird 等^[1]发现含有 bFGF 的 25~69, 94~121 的氨基酸残基的两段短肽可竞争 bFGF 与其受体结合, 更短一些的短肽含 bFGF 的 35~51, 107~116 两段区域, 不如前者有效, 但也可以竞争 bFGF 与其受体结合. 这两段区域被认为是 bFGF 与其受体的结合结构域. 而 Seddon 等^[2]将 bFGF118~122 区域的 5 个氨基酸用相应的 aFGF7 个氨基酸代替, 证实此处为 bFGF 与受体的结合位点. Ray 等^[3]认为 bFGF68~77 的 10 个氨基酸为 bFGF 与在神经

祖细胞上受体的结合位点. 对于 aFGF 的受体结合位点, 至今仍不清楚.

2 成纤维细胞生长因子受体的结合结构域

成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 分为高亲和力受体和低亲和力受体两种, 高亲和力受体即 FGFR, 低亲和力受体为细胞表面的肝素硫酸蛋白多糖 (HSPG). 目前已经发现了 4 种 FGFR, 分别为 FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3、FGFR-4, 他们多为单链的糖蛋白分子, 分子质量为 110~150 ku, 这些受体属酪氨酸激酶类受体, 由细胞外区、跨膜区和细胞内区组成. 细胞外区为 2~3 个免疫球蛋白样结构域, 在第一个结构域和第二个结构域间带有一个酸性盒子. 细胞内区有胞浆近膜区 (juxtamembrane domain) 和 2 个酪氨酸激酶区.

FGFR 的第一个免疫球蛋白样结构域 (Ig I) 的保守性最差, 约为 21%~38%. 一般认为 Ig I 与配体结合无关, 单独表达的第一和第三免疫球蛋白样结构域 (Ig I 和 Ig III) 不能与配体 FGF 结合^[4]. 但也有研究者认为第一、第二、第三免疫球蛋白样结构域 (Ig I, Ig II, Ig III) 均对配体结合起作用^[5].

Ig I 和 Ig II 之间有一个由 13 个氨基酸组成的

* 国家自然科学基金资助项目 (39670853).

** 通讯联系人.

Tel: 0431-8921591, E-mail: liwei@mail.jlu.edu.cn

收稿日期: 2000-06-26, 接受日期: 2000-08-23

酸性盒子 (26 EDDDDDSSSEE 38)。实验证明酸性盒子也与 FGF 结合无关。表达缺失酸性盒子的 FGFR 不影响其配体结合功能^[4]，缺失 Ig II 的 FGFR，不论其有无酸性盒子存在，都不能与 FGF 结合^[6]。但 Chellaiah 等^[7]提出 Ig I 和 Ig II 的过渡区和 Ig II-Ig III 区域分别是 FGFR 的两个配体结合区。

IgII 和 IgIII 的保守性较好，约为 63%~82%，被认为是 FGFR 与 FGF 结合的关键部位。IgII 的 N 端 18 个氨基酸 (71 KMEKKLHAVPAAKTVKFK 88) 为 FGFR 的肝素结合部位^[8]，人工合成的这段短肽 (K18K) 能与 3 H 标记的肝素结合，也能与 FGF 结合的肝素结合。这段短肽还能抑制 FGF 与重组的和正常细胞上的 FGFR1 结合。同时 K18K 的抗体也能抑制 FGF 与细胞表面的 FGFR 结合。缺失 K18K 的 FGFR 不能与肝素结合。这一系列的实验把 FGFR 的肝素结合区定位于 Ig II 的 N 端。

FGFR 的 Ig III 由 3 个外显子编码，其 mRNA 可以交替拼接，使 Ig III 的 C 端成为高可变区，也使得 FGFR 有许多变种存在。研究表明，各个变种均与 aFGF 有较好的结合，但与 bFGF 的结合变化较大。说明各受体间变化较大的 Ig III 对 aFGF 与其受体结合贡献不大，Ig II 才是受体的 aFGF 和肝素的结合位点。将 Ig II 与酸性盒子共同表达，保持了肝素和 aFGF 与 FGFR 的结合力，而仅仅表达 Ig III 则不能与 aFGF 结合^[6]。bFGF 和 KGF 与受体结合则不仅需要 Ig II 还需要 Ig II-Ig III 的过渡部分和部分 Ig III。Xu 等^[5]提出了一个受体结合模型，认为 Ig II 的 A-bl₁-B、bl₂-D 和 E-bl₃-F 结构域和 Ig II-Ig III 的过渡结构域和 Ig III 的 B-fl₁-C 结构域是受体结合的关键部位 (图 1)。

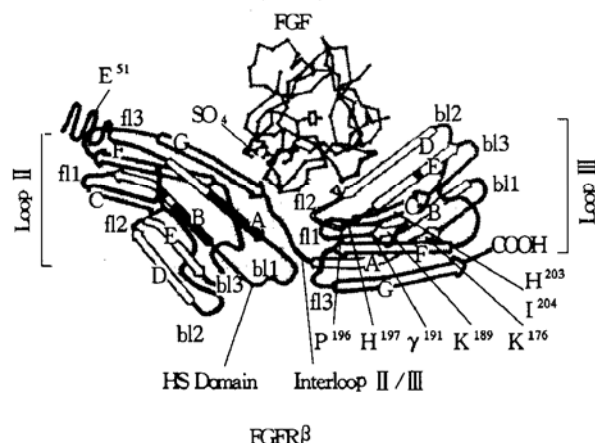


Fig. 1 The ligand binding domain of FGFR

图 1 FGFR 配体结合结构域

而 Fen 等^[9]对由于肝素保护而免受蛋白水解酶水解的 FGFR 片段进行分析，发现 Ig II 的 N 端、Ig II-Ig III 的过渡区和一小部分的 Ig III 的 N 端参与 FGFR 与配体的结合。我室利用噬菌体肽库对 aFGF 进行筛选，得到的保守序列与 Ig II 的 N 端和 C 端的两段序列一致，这说明 Ig II 的两端很可能是 aFGF 的结合位点^[10]。

Fen 等^[6]提出 Ig II 和 Ig III 的过渡区 (160 ERSPHRPILQAGLPANK 176) 是 FGFR 之间相互结合的位点。证据如下：a. 这段区域在四种 FGFR 中完全一致，序列的高度保守性预示着它在结构功能中的重要地位。b. 将受体的 Ig II、酸性盒子、胞浆近膜区和跨膜区表达，则受体能与肝素和 FGF 结合，但受体间不结合；若将上述部分与 Ig II-Ig III 过渡区共同表达，则受体间能结合。表达不含有过渡区的受体的突变体，则受体与配体的结合能力大大降低。c. 使细胞表达缺失过渡区的受体，可检测到受体与 aFGF 结合，但 aFGF 的促有丝分裂活性消失，说明过渡区与 FGF 结合无关，与 FGF 发挥活性有关。

3 成纤维细胞生长因子与其受体结合模型

成纤维细胞生长因子与受体结合过程还不十分清楚，一般认为在 FGF 和肝素的共同作用下，使 FGFR 二聚化，进而使受体内部酪氨酸激酶区自身磷酸化，引发 FGF 的生物活性。目前人们提出的 FGF 与受体结合模型主要有两种。

第一种模型认为，由单一的硫酸肝素分子与 FGFR Ig II 的肝素结合区结合，将两个相邻近的 FGFR 连接起来，形成一个松散的构象，由于 FGFR 的两个免疫球蛋白样结构域 (Ig II, Ig III) 的空间位阻，使得两个 FGFR 的胞浆近膜区和膜内的两个酪氨酸激酶区不能相互接近，而使 FGFR 处于无活性状态；当两分子的 FGF 与肝素和 FGFR 结合后，改变了 FGFR 的 Ig II 和 Ig III 的空间构象，形成了一个紧密靠近的构象，使 FGFR 二聚化，进而使 FGFR 胞内的酪氨酸激酶区相互靠近而自身磷酸化，从而启动 FGF 引起的信号传递。这个模型中 FGF 与 FGFR 是以 1:1 结合的^[11, 12]。Spivak-Kroizman 等^[13]对 aFGF 和 FGFR2 的胞外结构域进行研究，认为 FGF 与 FGFR 结合成 1:1 的复合物，在肝素的介导下形成 2:2 的复合物，从而引起 FGFR 的二聚化，激活 FGFR 的活性。Herr 等^[14]提出单一的蔗糖-8-硫酸

能引起 FGF 分子形成二聚体, 至少八个糖分子以上的肝素分子能促使 FGF 形成二聚体, 进而形成四聚体. FGF 的二聚体引起 FGFR 二聚化, 并激活 FGFR. 这两种观点都有力地支持了第一种模型.

第二种模型认为, 由一个有足够长度的肝素分子与 FGF 分子和 FGFR 结合, 形成 1: 1: 1 的不稳定的中间体, 然后再与另一个 FGFR 结合, 形成一个稳定的构象, 使 FGFR 二聚化, 引起 FGF 的生物活性, 其中 bFGF 的 ($^{110}\text{KYTSW}^{114}$) 位点为 bFGF 的第二个 FGFR 结合位点. 这种模型可以很好地解释为什么 FGF 上存在两个受体结合位点, FGF 与 FGFR 是以 1: 2 进行结合的^[15]. Yueh-Rong 等^[16]对 KFG、肝素和 KGFR 的结合进行了研究, 也提出了肝素: KFG: KGFR 为 1: 1: 2 的模型.

4 FGF 的抑制剂

一般来说 FGF 抑制剂的研究主要集中在核酸、糖和多肽三类物质上, 人们从 FGF 及其受体的一级结构及三级结构入手, 主要进行了一些小分子物质抑制剂的研究.

4.1 核酸类抑制剂

由于 FGF 能和硫酸肝素强烈结合, 而促进其活性, 由此说明 FGF 表面存在大量带正电荷的碱性氨基酸残基. Chavan 等用多磷酸化的腺苷酸、鸟苷酸和二腺苷酸等多阴离子核酸与 aFGF 结合进行研究, 找到了 aFGF 表面的 Tyr8、Gly20、His21、Thr61、Lys112、Lys113、Ser116、Arg119、Arg122、His124 与这些多阴离子核酸作用. Jellinek 等^[17]用 RNA 库对 bFGF 进行筛选, 得到了一系列具有保守序列的 RNA 分子, 他们能竞争抑制 bFGF 与 FGFR 以及其低亲和力受体的结合. Beutel 等找到了竞争抑制 bFGF 的寡核苷酸.

4.2 糖类抑制剂

FGF 能与肝素结合同样吸引着人们寻找 FGF 的糖类抑制剂. David 等^[18]自行合成了一系列的二糖、三糖和四糖及其衍生物, 测量它们对 FGF 的抑制作用, 结果发现了几个有很好抑制效果的二糖和三糖, 同时证明 FGF 可以和没有硫酸基团的糖结合, 说明在肝素与 FGF 作用中, 主要是糖与蛋白质的相互作用, 而电荷只在结合过程中起稳定作用. 他还用 X 射线衍射分析找到了 FGF 上的几个糖结合位点. Westman 等同样用大量的糖进行研究, 找出了一些二糖、三糖、四糖和非硫酸化的糖

能竞争抑制 FGF 活性. 而 David 则发现蔗糖-8-硫酸能很好地与 aFGF 结合, 稳定 aFGF 并与肝素竞争抑制.

4.3 多肽类抑制剂

蛋白质与蛋白质的相互作用很早就被人们所认识, 寻找 FGF 的肽类抑制剂被人们广泛接受, 但由于 FGF 与其受体的结合位点, 不同人研究结果不尽相同, 所以抑制剂研究进展缓慢. Yanyou 等用抗体库筛选 bFGF 的抑制剂, 找到了 Pro-(Pro/Ser)-Gly-His-(Tyr/Phe)-Lys 的一段抗原序列与 bFGF 的 13~18, 和 120~125 两段氨基酸序列相应, 能竞争抑制 bFGF 与受体结合. Cosic 等^[19]在理论分析基础上设计了一个 16 肽的 bFGF 抑制剂为 MWYRPDLDERKQQKRE, 实验证明有很好的抑制 FGF 功效. Ray 等^[3]合成一段短肽与 bFGF 的 68~77 的氨基酸序列相应, 短肽可以很好地抑制 bFGF 与神经祖细胞上的受体结合. 我室用噬菌体展示肽库对 aFGF 进行筛选, 得到了一系列相关的短肽序列, 人工合成的短肽 (PSPVSELSSGRMAYG) 可以较好地抑制 FGF 的促有丝分裂作用^[10].

由于 FGF 能促进肿瘤细胞生长, 研究 FGF 与受体的相互作用, 寻找 FGF 专一的抑制剂, 阻止 FGF 与受体结合进而阻止 FGF 的生物学功能, 就可以达到抑制和杀死肿瘤细胞的作用. 因此 FGF 抑制剂的研究, 将成为寻找新型抗癌药物的靶点.

参 考 文 献

- 1 Baird A, Schubert D, Ling N, *et al.* Receptor and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (7): 2324~2328
- 2 Seddon A P, Aviezer D, Lu-Yuan L, *et al.* Engineering of fibroblast growth factor: alteration of receptor binding specificity. *Biochemistry*, 1995, **34** (3): 731~736
- 3 Ray J, Baird A, Gage F H, *et al.* 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** (13): 7047~7052
- 4 Jinzhao H, Mikio K, Fen W, *et al.* Substitution of putative half-cystine residues in heparin-binding fibroblast growth factor receptors. *J Biol Chem*, 1992, **267** (25): 17804~17808
- 5 Xu J, Nakahara M, Crabb J W, *et al.* Expression and immunochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. *J Biol Chem*, 1992, **267** (25): 17792~17803
- 6 Fen W, Mikio K, Kerstin M, *et al.* A homeo-interaction sequence in the ectodomain of the fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*, 1997, **272** (38): 23887~23895
- 7 Chellaiah A, Yuan W, Chellaiah M, *et al.* Mapping ligand binding domains in chimeric fibroblast growth factor receptor molecules. *J Biol Chem*, 1999, **274** (49): 34785~34794
- 8 Mikio K, Fen W, Jianming X, *et al.* An essential heparin-binding

- domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science*, 1993, **259** (5103): 1918~ 1921
- 9 Fen W, Mikio K, Jianming X, *et al.* Ligand-specific structural domain in the fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*, 1995, **270** (17): 10222~ 10230
 - 10 Fan H K, Li Y, Zhou H, *et al.* Selection of peptide ligands that bind to acid fibroblast growth factor. *IUBMB Life*, 2000, **49**: 545~ 548
 - 11 Mikio K, Fen W, Makiko K, *et al.* Divalent cations and heparin/heparan sulfate cooperate to control assembly and activity of the fibroblast growth factor receptor complex. *J Biol Chem*, 1996, **271** (42): 26143~ 26148
 - 12 Moy F J, Safran M, Seddon A P, *et al.* Properly oriented heparin decasaccharide-induced dimers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 1997, **36** (16): 4782~ 4791
 - 13 Spivak-Kroizman T, Lemmon M A, Dikic I, *et al.* Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell*, 1994, **79** (6): 1015~ 1024
 - 14 Herr A B, Ornitz D M, Sasisekharan R, *et al.* Heparin-induced self-association of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem*, 1997, **272** (26): 16382~ 16389
 - 15 Pantoliano M W, Horlick R A, Springer B A, *et al.* Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry*, 1994, **33** (34): 10229~ 10248
 - 16 Yueh Rong H, Rebecca N, John K S, *et al.* Heparin is essential for single keratinocyte growth factor molecule to bind and form a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. *Biochemistry*, 1999, **38** (8): 2523~ 2534
 - 17 Jellinek D, Lynott C K, Rifkin D B, *et al.* High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 11227~ 11231
 - 18 David M O, Herr A B, Marianne N, *et al.* FGF binding and receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science*, 1995, **268** (5209): 432~ 435
 - 19 Cosic I, Drummond A E, Underwood J R, *et al.* *In vitro* inhibition of the actions of basic fibroblast growth factor by a novel 16 amino acid peptide. *Mol Cell Biochem*, 1994, **130** (1): 1~ 9

The Interaction of Fibroblast Growth Factor/ Fibroblast Growth Factor Receptor and FGF Inhibitors*

FAN Hong-Kuan, ZHOU Hui**, LI Wei

(College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract The fibroblast growth factor (FGF) family contains at least nineteen members that play important roles in embryogenesis, vascularization, neuron system growth and in development and pathological states. In order to study the mechanism of interaction of FGF/FGFR, plenty of research work was focused on the study of structure and function of FGF and FGFR. Heparin binding domain of aFGF and bFGF, and receptor binding domain of bFGF have been identified. Heparin binding domain and ligands binding domain of FGFR also were localized. Based on the research, two models of interaction of FGF/FGFR were presented and many nucleotide, saccharides and peptide inhibitors were developed. The inhibitors may play an important role in the designing of anti-cancer drug.

Key words fibroblast growth factor, receptor, heparin, inhibitor

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39670853).

** Corresponding author. Tel: 86-431-8921591, E-mail: liwei@mail.jlu.edu.cn

Received: June 26, 2000 Accepted: August 23, 2000