

Eph-ephrin 介导反向信号传递的研究进展*

王 琳 郑国光**

(中国医学科学院 血液学研究所血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)
北京协和医学院

摘要 双向信号传递是细胞间通讯领域中新近阐明的机制, 酪氨酸激酶受体-配体 (Eph-ephrin) 介导的双向信号传递是此机制中的一个重要代表. Eph 酪氨酸激酶家族受体及其配体 ephrin 家族成员是在神经发育、血管新生等方面起重要作用的分子, 通过 Eph 向细胞内传递的信号称为正向信号, 通过其配体 ephrin 的信号称为反向信号. Ephrin 家族又可根据分子结构分为 2 个亚家族, 其中 ephrinB 为跨膜蛋白, 可通过酪氨酸磷酸化依赖和 PDZ 结合结构域介导 2 种方式向胞内传递反向信号, 活化 FAK、JNK、Wnt 等信号通路, ephrinA 为糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白, 也具有反向信号传递功能.

关键词 细胞间通讯, ephrin, Eph, 反向信号, 信号传递
学科分类号 Q26

双向信号传递是细胞间通讯领域中新近阐明的机制, Eph-ephrin介导的双向信号传递是此机制中的一个重要代表. 以ephrin为配体, 由Eph酪氨酸激酶受体向细胞内传递的信号符合对经典信号传递的认识, 为正向信号 (forward signal); 以Eph作为配体, 由ephrin传递的信号与上述信号方向相反, 为反向信号 (reverse signal). 本文仅就Eph-ephrin的结构功能、反向信号的传递机制及生物学功能作简要综述.

1 结构及功能

1.1 Eph受体及ephrin配体的结构特点

1987年, 从产生红细胞生成素的肝癌细胞系中克隆出一种新的酪氨酸激酶受体, 命名为Eph受体^[1], 随后相继克隆出其他成员, 组成了目前最大的酪氨酸激酶受体家族, 其中人类及哺乳动物包括14个成员. 按照其序列同源性及与配体亲和力分为 2 个亚家族: EphA (EphA1~EphA8) 和 EphB (EphB1~EphB6). 它们的胞外区由配体结合球形结构域、富含半胱氨酸结构以及 2 个纤维连接蛋白 III 型重复序列 (fibronectin type III repeats) 组成, 胞浆部分有 4 个结构功能单位: 含有 2 个酪氨酸残基的近膜区、经典蛋白酪氨酸激酶结构域、SAM 结构域以及 PDZ 结合模序 (PDZ-binding motif)^[2].

Ephrin配体是从脂筏中发现的一种膜结合型蛋

白, 人和哺乳动物中有 8 种亚型, 也被分成 2 个亚家族 ephrinA 和 ephrinB: 前者有 5 个成员 (ephrinA1~ephrinA5), 本身不具有跨膜结构域, 而是通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidyl inositol, GPI) 锚定在细胞膜上; 后者有 3 个成员 (ephrinB1~ephrinB3), 均有一个跨膜结构域和很短的胞内区. 通常, EphA 亚家族受体与 ephrinA 亚家族配体结合, 而 EphA4 既可以与 ephrinA 结合又可以与多数 ephrinB 结合, ephrinA5 除了结合 EphA 外还可结合 EphB2^[2,3] (图1).

1.2 Eph受体的信号传递及功能

Eph及ephrin均为膜蛋白, 其活化依赖细胞间近距离接触, 并存在双向信号传递. 目前, 通过Eph受体的正向信号已经研究得比较深入^[4]. 当Eph受体激活后, 发生自身磷酸化, 然后磷酸化激活Ras、Rac、Rho、Rap1及FAK等信号分子, 进而通过相应的信号通路来调节细胞的生物学效应^[5~8], 不仅参与正常组织中血管生成、组织边界形成、细胞迁移、轴突导向和塑型以及骨稳态调节等^[9,10], 还在肿瘤等病理条件下也发挥相应作用^[11]. Ephrin介导反向信号已经提出并初步阐明, 下文着重讨论.

* 国家自然科学基金资助项目(30470897).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23909053, E-mail: zhenggtjchn@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-02, 接受日期: 2007-05-29

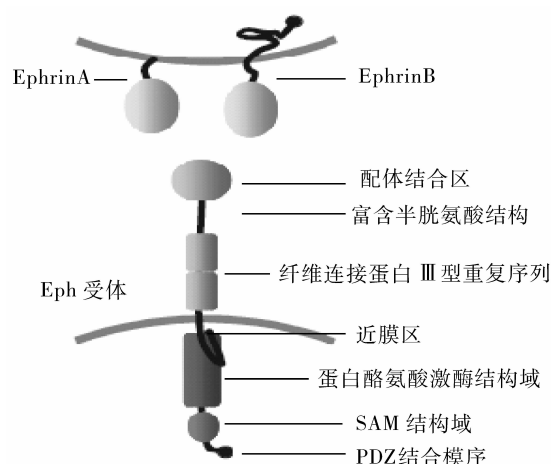


Fig. 1 Structure of Eph receptors and ephrins [12]

图 1 Eph 受体及 ephrin 配体的结构 [12]

2 Ephrin介导反向信号传递的机制

2.1 EphrinB亚家族介导的反向信号

EphrinB胞内区有5个保守的酪氨酸残基,提示可能与信号传递相关。早年的研究发现, ephrinB1胞内区对转染EphB-Trk嵌合受体的NIH-3T3细胞的转化起负调控作用,提示ephrinB1可能还有其他的生物学功能[13]。随后的研究表明, EphB受体的胞外部分可引起ephrinB胞内酪氨酸残基磷酸化,提示ephrinB可以通过其胞内磷酸化的酪氨酸残基向下游传递信号[14]。此外, ephrinB胞内区还包括一个PDZ结合结构域,可以通过募集含有PDZ结构域的信号分子实现酪氨酸磷酸化非依赖的信号传递(图2)。

2.1.1 酪氨酸磷酸化依赖的反向信号传递。

用可溶性Eph受体刺激原代神经元细胞或内皮细胞可以引起ephrinB胞内酪氨酸残基磷酸化水平升高[15]。研究鸡源ephrinB1信号传递机制发现, 312、317、332位酪氨酸残基是其胞内区主要磷酸化位点[16]。EphrinB的磷酸化在其反向信号传递中起非常重要的作用,但它本身无激酶活性,需要其他激酶参与,但目前尚未完全阐明哪些激酶参与此过程。已有报道, SFKs (Src-family kinases) 是ephrinB磷酸化的正向调节因子, Eph受体刺激可将SFKs快速募集到ephrinB附近,将其酪氨酸残基磷酸化,进而引发酪氨酸磷酸化依赖的信号传递,此过程可被SFKs抑制剂PP2所阻断[15,17]。

磷酸化的ephrinB需要募集其他信号分子完成

信号传递,具有SH2-SH3结构的衔接蛋白Grb4 (growth-factor-receptor-bound protein 4)是一个重要成员,可通过其SH2结构域与ephrinB中磷酸化的酪氨酸残基相互作用[18]。目前已经确定ephrinB1和ephrinB2募集Grb4的位点: Grb4结合到非洲爪蟾ephrinB1分子胞内碳末端第298位磷酸化的酪氨酸残基[19],而ephrinB2(301~333)合成肽通过第304位磷酸化的酪氨酸残基与Grb4相结合[20]。虽然目前尚不清楚ephrinB3如何募集Grb4,但ephrinB3磷酸化介导的反向信号可以激活Rac1,促进神经胶质瘤细胞的迁移[21]。Grb4通过其SH3结构域结合一些下游信号分子,它们包括原癌基因c-Cbl相关蛋白(CAP)、Axin蛋白、Abi-1蛋白、发动蛋白(Dynamin)、核内不均一核糖核蛋白体K(hnRNPK)、及p21活性蛋白激酶(Pak1)等[18]。

粘着斑激酶(FAK)是一种非受体酪氨酸激酶,通过多条信号通路对细胞的粘附、迁移、生存等方面起调节作用。EphrinB1募集Grb4后,可使FAK第397位酪氨酸残基磷酸化水平升高,从而增强其催化活性[18]。此外,还可能存在一个负反馈环路: ephrinB通过Grb4募集CAP蛋白,而后者可通过其羧基端SH3结构域与FAK结合,降低FAK磷酸化水平[22]。

JNK (c-Jun NH2-terminal kinases)家族,是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,参与调节细胞生长、分化、死亡等多种生命过程,与多种疾病的发生密切相关。EphrinB1的反向信号通过2条不同途径激活JNK信号通路: a. 不依赖酪氨酸残基的磷酸化,直接激活JNK信号通路,其具体机制尚不清楚[23]; b. EphrinB1募集Grb4后, Axin蛋白可与Grb4的SH3结构域相互作用而活化, Axin属于G蛋白信号途径调节蛋白(regulator of G protein signaling, RGS)家族的成员,活化的axin蛋白激活JNK,进而活化该信号通路[24]。

Wnt信号通路调节细胞生长、分化和迁移,在肿瘤发生、发展中有重要意义, β -catenin是经典Wnt信号通路中的核心分子。活化的ephrinB募集Grb4后,可进一步募集Axin[18], Axin是 β -catenin降解复合物中的重要成员,通过下调胞浆 β -catenin的水平,对Wnt信号通路起负调节作用。

此外,通过Grb4募集来的其他信号分子也可分别通过不同的信号通路对细胞起调节作用。如, CAP蛋白还可通过Cbl分子作用于泛素结合酶,促进信号分子的泛素化降解[18],间接调节不同信号途

径, Abi-1蛋白通过结合Sos1、Sos2干扰MAPK信号途径, 负调控MAPK通路^[25], hnRNPK和Pak1均可激活Rac蛋白, Dynamin调节膜泡的运输(membrane trafficking), 上述信号通路的具体机制仍不明确^[18].

2.1.2 PDZ结合结构域介导的信号传递.

EphrinB胞内区碳末端的PDZ结构域结合模序可与含PDZ结构域的蛋白质相互作用. 胞浆蛋白PDZ-RGS3 (regulator of G-protein signaling) 是ephrinB的一个下游信号分子, 在调节细胞迁移中起作用. PDZ-RGS3蛋白羧基端还能调节G蛋白异源3聚体的结构域, 此结构域可在G蛋白催化环路下游与G蛋白偶联的受体结合, 逆转G蛋白活化状态为非活化状态, 即Ga-GTP又转变成稳定的G蛋白3聚体复合物^[26]. PDZ-RGS3激活的具体机制仍不明确.

此外, PDZ结合结构域还可负调控酪氨酸磷酸

化信号传递, ephrinB通过它可募集一种特殊的蛋白 PTP-BL (protein tyrosine phosphatase-basophil-like). 后者本身有磷酸酶活性, 不仅将ephrinB分子去磷酸化, 还可使SFK去磷酸化而处于失活的状态, 负调节ephrinB的反向信号^[15]. 推测, 酪氨酸磷酸化依赖的信号传递和PDZ结合结构域依赖的信号传递之间的转换可能存在一个开关机制.

2.2 EphrinA介导的反向信号

虽然ephrinA没有跨膜区, 但是也有信号传递潜能(图2). 用EphA受体刺激人ephrinA5, 可募集Src家族成员Fyn到细胞膜特定区域, 使2种膜蛋白(分子质量分别是60 ku和80 ku左右) 酪氨酸磷酸化, 介导细胞粘附及形态改变^[27]. 另外, 鸡源ephrinA2定位于脂筏, 活化后也可募集Fyn到脂筏区域, 磷酸化一个分子质量为120 ku的蛋白质, 而使另一个分子质量为80 ku的蛋白质磷酸化水平下降, 并促进整合素依赖的粘附作用^[28].

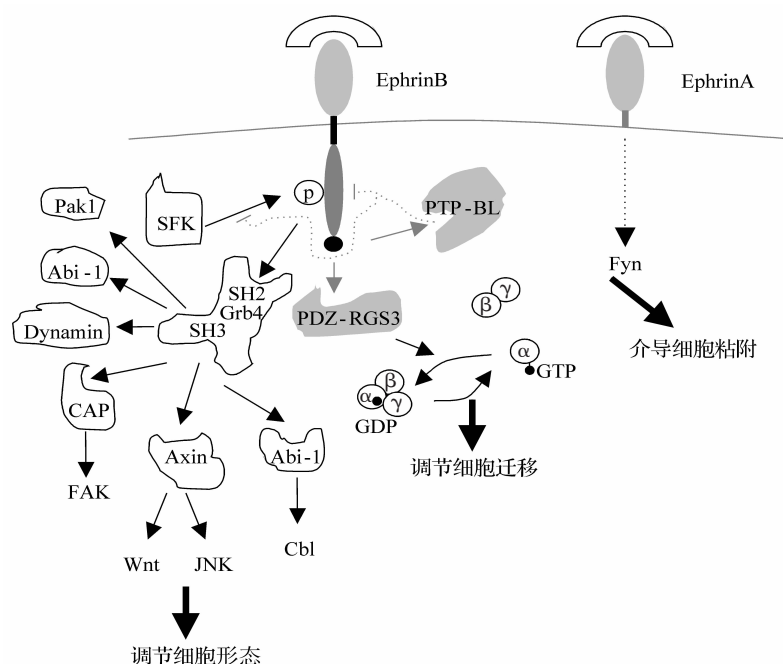


Fig. 2 Reverse signal transduction by ephrins

图2 ephrin介导的反向信号传递

3 Ephrin的功能

3.1 细胞的迁移

在哺乳动物后脑分节过程中, ephrin介导的反向信号可使表达Eph受体的细胞和表达ephrin的细胞互相排斥而处于不同部位, 这种作用有利于细胞边界的形成, 在轴突的塑型中也发挥重要作用. 在

基因敲除小鼠中, ephrinB2^{-/-}神经脊细胞的迁移形式发生了改变, 与野生型或ephrinB2胞内碳末端突变的细胞相比, 它的迁移形式比较弥散^[29]. EphrinB介导的反向信号还可抑制牙髓干细胞(human adult dental pulp stem cells, DPSCs)的粘附和伸展^[17]. 此外, 高表达ephrinB3的神经胶质瘤细胞易于发生迁移和浸润^[21].

3.2 血管新生

EphrinB2是胚胎期动脉内皮细胞的标志,在血管新生中也发挥重要作用. EphrinB2基因突变动物表现出不同程度心脏发育及功能障碍,如心脏肿胀、心室壁肌小梁数目减少等. 表达截断型ephrinB2的转基因小鼠,血管发育停滞在原始毛细血管丛阶段^[30]. Ephrin也参与肿瘤的血管新生,在

人乳腺癌荷瘤小鼠中,肿瘤组织出现表达ephrinB2的新生血管,这种血管密度低、体积大^[31].

3.3 肿瘤

在很多肿瘤细胞中ephrin的表达发生改变^[32](表1),其介导的反向信号传递可能在一些肿瘤的发生、发展中起一定作用,但其中存在复杂的作用机制,同时似乎具有细胞类型特异性.

Table 1 Expression of ephrins in tumors

表 1 Ephrin 在部分肿瘤中的表达

Ephrin 亚型	肿瘤细胞中的表达
EphrinA1	乳腺癌和黑色素瘤高表达; 结肠癌和肺癌低表达
EphrinA2	肾脏肿瘤高表达; 结肠癌低表达
EphrinA3	肺癌、肝癌及结肠癌高表达; 肾脏肿瘤低表达
EphrinA4	肝癌和恶性胶质瘤高表达
EphrinA5	肝癌、结肠癌、恶性胶质瘤和肾脏肿瘤低表达
EphrinB1	卵巢癌高表达; 肺癌和肾脏肿瘤低表达
EphrinB2	肝癌、卵巢癌、黑色素瘤和肾脏肿瘤高表达; 肺癌和结肠癌低表达
EphrinB3	肺癌、结肠癌、神经胶质瘤和肾脏肿瘤高表达; 肝癌低表达

3.4 骨稳态的调节

破骨细胞和成骨细胞相互协调是维持骨动态平衡的关键, ephrin也参与了这一过程的调节. 破骨细胞表达ephrinB2和ephrinB1, 而成骨细胞既表达Eph受体也表达ephrin. 破骨细胞和成骨细胞可以通过细胞表面的ephrinB2和EphB4相互作用, 正向信号促进成骨细胞的分化, 反向信号抑制破骨细胞的分化, 通过这种双向的信号传递维持骨的稳态^[10].

4 结 语

细胞间通讯是细胞生存和功能所必需的, 对其认识由单向扩展到双向, 更深刻地阐明了细胞间相互作用的本质, 更有助于理解复杂的生命现象. Eph-ephrin的作用机制是双向信号研究领域中的一个典型例子, 其机制和生物学功能虽未完全阐明, 但已为研究其他分子间的相互作用提供了崭新的思路. 此外, ephrin在肿瘤的发生和肿瘤血管新生等方面的作用尤为引人注目, 可能为研究肿瘤发生机制提供新的线索及为肿瘤治疗提供新的靶点.

参 考 文 献

- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, *et al.* A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the Eph gene. *Science*, 1987, **238** (4834): 1717~1720
- Himanen J P, Nikolov D B. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem*

Cell Biol, 2003, **35**(2):130~134

- Himanen J P, Chumley M J, Lackmann M, *et al.* Repelling class discrimination: Ephrin-A5 binds to and activates ephB2 receptor signaling. *Nat Neuro Sci*, 2004, **7**(5):501~509
- 张曙光, 药立波, 苏成芝. Eph受体家族及其配体的信号转导途径及功能. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(4):498~501
- Zhang X G, Yao L B, Su C Z. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(4):498~501
- Nakada M, Niska J A, Tran N L, *et al.* EphB2/r-ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion. *Am J Pathol*, 2005, **167**(2):565~576
- Lawrenson I, Wimmer-Kleikamp S H, Lock P, *et al.* Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of ephA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt5):1059~1072
- Carter N, Nakamoto T, Hirai H, *et al.* Ephrin-A1 induced cytoskeletal re-organization requires Fak and p130 (cas). *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(8):565~573
- Prevost N, Woulfe D S, Tognolini M, *et al.* Signaling by ephrinB1 and Eph kinases in platelets promotes Rap1 activation, platelet adhesion, and aggregation via effector pathways that do not require phosphorylation of ephrinB1. *Blood*, 2004, **103**(4):1348~1355
- Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of eph and ephrin signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**(7):475~486
- Mundy G R, Eleftheriou F. Boning up on ephrin signaling. *Cell*, 2006, **126**(3):441~443
- Surawska H, Ma P C, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, **15** (6):419~433
- Murai K K, Pasquale E B. 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci*, 2003, **116** (Pt 14): 2823~2832

- 13 Brambilla R, Schnapp A, Casagrande F, *et al.* Membrane-bound lerk2 ligand can signal through three different Eph-related receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 1995, **14**(13):3116~3126
- 14 Bruckner K, Pasquale E B, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science*, 1997, **275** (5306):1640~1643
- 15 Palmer A, Zimmer M, Erdmann K S. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: Regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*, 2002, **9**(4):725~737
- 16 Kalo M S, Yu H H, Pasquale E B. *In vivo* tyrosine phosphorylation sites of activated ephrinB1 and EphB2 from neural tissue. *J Biol Chem*, 2001, **276**(42):38940~38948
- 17 Stokowski A, Shi S, Sun T, *et al.* EphB/ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading, and migration: implications for dental tissue repair. *Stem Cells*, 2007, **25**(1):156~164
- 18 Cowan C A, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*, 2001, **413**(6852):174~179
- 19 Bong Y S, Park Y H, Lee H S, *et al.* Tyr-298 in ephrinB1 is critical for an interaction with the Grb4 adaptor protein. *Biochem J*, 2004, **377**(Pt 2):499~507
- 20 Su Z, Xu P, Ni F. Single phosphorylation of Tyr304 in the cytoplasmic tail of ephrinB2 confers high-affinity and bifunctional binding to both the SH2 domain of Grb4 and the PDZ domain of the PDZ-RGS3 protein. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(9):1725~1736
- 21 Nakada M, Drake K L, Nakada S, *et al.* EphrinB3 ligand promotes glioma invasion through activation of Rac1. *Cancer Res*, 2006, **66** (17):8492~8500
- 22 Ribon V, Herrera R, Kay B K, *et al.* A role for cap, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem*, 1998, **273**(7):4073~4080
- 23 Xu Z, Lai K O, Zhou H M, *et al.* Ephrin-B1 reverse signaling activates JNK through a novel mechanism that is independent of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 2003, **278** (27):24767~24775
- 24 Luo W, Ng W W, Jin L H, *et al.* Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *J Biol Chem*, 2003, **278**(39):37451~37458
- 25 Aifa S, Aydin J, Nordvall G. A basic peptide within the juxtamembrane region is required for EGF receptor dimerization. *Exp Cell Res*, 2005, **302**(1):108~114
- 26 Lu Q, Sun E E, Flanagan J G. Analysis of PDZ-RGS3 function in ephrin-B reverse signaling. *Methods Enzymol*, 2004, **390**:120~128
- 27 Davy A, Gale N W, Murray E W, *et al.* Compartmentalized signaling by gpianchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, 1999, **13**(23):3125~3135
- 28 Huai J, Drescher U. An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kda protein. *J Biol Chem*, 2001, **276**(9): 6689~6694
- 29 Santiago A, Erickson C A. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development*, 2002, **129**(15): 3621~3632
- 30 Zhang J, Hughes S. Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol*, 2006, **208**(4):453~461
- 31 Noren N K, Lu M, Freeman A L, *et al.* Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(15):5583~5588
- 32 Surawska H, Ma P C, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, **15** (6): 419~433

Progress in The Reverse Signal Transduction Mediated by Eph-ephrin*

WANG Lin, ZHENG Guo-Guang**

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Bidirectional signal transduction is a newly elucidated mechanism in intercellular communication. The bidirectional signal transduction mediated by the Eph-ephrin is an important representative in this field. The Eph family receptor tyrosine kinases and their membrane-bound ligands, the ephrins, play pivotal roles in the development of nervous system, angiogenesis, etc. The signal transduction into cells by Eph receptors is the forward signal, whereas the signal transduction by ephrins is the reverse signal. Based on their molecular structures, the ephrins can be divided into two subclasses, i.e. ephrinA and ephrinB. The ephrinBs are transmembrane proteins, which can activate FAK, JNK and Wnt signal transduction pathways through phosphotyrosine-dependent signaling and PDZ-binding motif-dependent signaling. The ephrinAs are glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins, which can also mediate reverse signal transduction.

Key words intercellular communication, ephrin, Eph, reverse signal, signal transduction

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470897).

**Corresponding author. Tel: 86-22-23909053, E-mail: zhenggtjchn@yahoo.com.cn

Received: April 2, 2007 Accepted: May 29, 2007