

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0304-02

Herstatin, EGFR 家族的天然抑制因子

胡品良 综述; 郭 宁 审阅 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100039)

[摘 要] Herstatin 是 HER2 mRNA 被选择性地剪切而产生的 HER2 截短的版本,其序列包括 HER2 第 I 及 II 胞外区结构域的 340 个氨基酸和第八内含子编码的 79 个氨基酸,是一种可溶的 HER2 自身抑制因子。Herstatin 能与 HER2 和 EGFR 高亲和力结合,抑制 EGFR 家族成员异源或同源二聚化,降低受体酪氨酸磷酸化水平,有选择地抑制 AKT 信号传递系统,进而能抑制肿瘤细胞增殖及其抗凋亡效应。Herstatin 可能具有潜在的临床应用价值。

[关键词] Herstatin; 表皮生长因子受体家族; 信号传导; 肿瘤治疗

[中国图分类号] R979.5 [文献标识码] A

* 表皮生长因子受体家族包括 EGFR(epidermal growth factor receptor, 又称 erbB-1, HER1), HER2(erbB-2), HER3(erbB-3)和 HER4(erbB-4)。他们广泛表达于上皮、间质及神经组织,在细胞增殖和分化中起重要作用。EGFR 和 HER2 在许多上皮来源的肿瘤组织中过表达,因此以它们为靶点的肿瘤治疗研究已成为该领域的热点,如 HER2 人源化抗体 Herceptin 已被 FDA 批准用于乳腺癌的临床治疗^[1]。最近研究发现,HER2 mRNA 加工过程中可选择性地剪接,产生一种可溶性的物质—Herstatin。Herstatin 能抑制 HER2 表达,能与 HER2 和 EGFR 以高亲和力特异性结合,抑制 EGFR 家族成员形成异源或同源二聚体,降低受体酪氨酸磷酸化水平,抑制 AKT 活化,是目前发现的第一个 HER2 天然抑制因子。

1 Herstatin 的产生及结构

Herstatin 是 HER2 基因转录后 mRNA 选择性剪接形成的结果。HER2 第八内含子区具有典型的内含子剪接位点“GT—AG”结构及分支位点 CTGA,但由于某种原因第八内含子区未被剪接。在翻译出 HER2 的第 I、第 II 胞外区的 340 个氨基酸后,继续翻译第八内含子编码的 79 个氨基酸,并剪除了 HER2 胞外区第 III、第 IV 结构域、跨膜区及胞内域部分。Herstatin 共有 419 个氨基酸残基,未糖基化时分子量约为 50 kD,糖基化后分子量约为 68 kD。在胎肝、胎肾中可检测到 Herstatin 的表达,非肿瘤源性的 HEK-293, IOSEVAN 和 HBL100 细胞中亦较易检测到,提示 Herstatin 可能在胎儿发育中具有一定的功能。高表达 HER2 的肿瘤细胞 SKOV-3, SKBR-3 和 BT474 中, Herstatin 表达量很低,甚至无法检出^[2]。将 Herstatin 转染已建立的 EGFR 和 HER2 高表达细胞系,则无法获得 Herstatin 的稳定表达^[3]。

2 Herstatin 与 HER2 和 EGFR 高亲和力结合

Herstatin 能与细胞表面 HER2 结合,干扰 HER2 同源或异源二聚体的形成。同位素竞争抑制试验发现,Herstatin 与 HER2 受体呈高亲和力结合,亲和常数为 14 nmol/L,而 C 末

端的 79 个氨基酸亦能与 HER2 结合,亲和常数为 61 nmol/L。吸附实验证实,Herstatin 及其 C 末端的 79 个氨基酸还能与 EGFR 结合。C 末端的 79 个氨基酸虽有结合 EGFR 和 HER2 能力,却不能阻止受体二聚体形成,对 HER2 高表达细胞的克隆形成也无明显作用^[2]。Herstatin 不能与 HER3 结合^[4]。

最近,EGFR 和 HER3 的晶体结构研究揭示,其胞外区第 II 结构域介导 EGFR 及 HER3 形成同源二聚体或与家族其他成员形成异源二聚体^[5-6]。HER2 胞外区第 II 结构域亦参与介导其与 EGFR, HER3 形成异源二聚体,但不介导 HER2 同源二聚体的形成^[7]。Herstatin 具有 HER2 胞外区第 II 结构域,它有可能通过该区域与 EGFR 家族相互作用。计算机模拟分析发现,Herstatin C 末端 79 个氨基酸与 HER2 相互作用力比胞外区第 II 结构域似乎更强,但仍有待实验证实。

同时,Herstatin 同 EGFR 的结合不改变表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和转化生长因子- α (transforming growth factor α , TGF- α)与 EGFR 的亲合力,Herstatin 与 EGF, TGF- α 之间不存在竞争抑制效应,提示它们与 EGFR 的结合位点可能不同^[3]。

3 Herstatin 抑制 EGFR 家族二聚体化及受体酪氨酸磷酸化水平

原核和真核表达的 Herstatin 与细胞表面的 HER2 相互作用后,可阻止 HER2 二聚体的形成,HER2 二聚体形成量与 Herstatin 的浓度呈反比关系。当 Herstatin 浓度达 200 nmol/L 时,HER2 同源二聚体量减少了 90%。同时,HER2 受体酪氨酸磷酸化水平亦随 Herstatin 浓度的增加而递减^[3]。

对于 EGFR 转染的 CHO 细胞, Herstatin 可抑制 EGF 诱导的 EGFR 二聚化和受体自身酪氨酸磷酸化水平。用 Herstatin 转染高表达 EGFR 的 NIH3T3 细胞后,EGF 诱导的 EGFR 磷酸化水平及受体内化率降低,而 EGFR 内化是受体自身磷酸化的关键步骤之一。

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(863 计划) (2001AA21-5081)、国家自然科学基金(30070858)资助

HER3 胞内域较短,缺乏自身磷酸化的能力,它的磷酸化过程依赖于与其他 EGFR 家族成员形成异二聚体。当 Herstatin 转染高表达 HER2 和 HER3 的 CHO 细胞时,Herstatin 可阻碍 HER2 和 HER3 间异源二聚体的形成,进而抑制 heregulin 诱导的 HER3 磷酸化^[3]。HER3 与 EGFR 家族成员异源二聚化是肿瘤细胞无限增殖的重要原因^[8],Herstatin 有阻碍 HER3 异源二聚化的作用,这可能是 Herstatin 抑制肿瘤细胞增殖的因素之一。

Herstatin 对受体酪氨酸磷酸化的抑制作用也表现出一定的特异性,检测其对同为酪氨酸家族受体成员的成纤维细胞生长因子 2 受体(fibroblast growth factor-2 receptor, FGF-2R)和胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor, IGF1R)的影响,发现 Herstatin 对 FGF-2R 和 IGF1R 的二聚化和受体酪氨酸磷酸化水平无影响^[4]。

4 Herstatin 对细胞存活及增殖的影响

软琼脂集落形成实验证实,用纯化的 Herstatin 处理 NIH3T3 细胞,当作用浓度为 200 nmol/L 时,NIH3T3 细胞克隆形成抑制率达 90%。用表达 Herstatin 的 HEK-293 和 COS-7 细胞培养上清作用于 HER2 过表达的 SKOV-3 细胞和 NIH3T3 细胞,亦可使其克隆形成降低数倍^[3]。

采用 MTT 法分析发现,HER2 转染的 CHO 细胞中,由于 HER2 的高表达,使细胞的增殖率上升 60%;当转染 Herstatin 后,CHO 细胞的增殖率则显著下降。在增殖的细胞中,Herstatin 表达量极低,而 Herstatin 高表达的细胞则不能增殖。将 HER2 及 Herstatin 与含 β -半乳糖苷酶的质粒共转染细胞,测定 β -半乳糖苷酶表达的水平并判定细胞的存活率,可观察到 HER2 过表达的细胞内 β -半乳糖苷酶水平较高,细胞的存活率亦较高,而在表达 Herstatin 的细胞中, β -半乳糖苷酶水平则下降了 7 倍,细胞存活率亦低。对于高表达 EGFR 的细胞,Herstatin 也有同样的抑制效应^[4]。

5 Herstatin 对 EGFR 信号传导系统的影响

EGFR 家族成员激活的信号主要通过 MAPK 和 PI3K/AKT 通路传递。一般来说,EGF 样生长因子同时激活这两条信号通路,而 2 条信号传导途径的作用相偶联。Azios 等^[4]人分析了 Herstatin 对 2 条信号系统的影响,发现 EGFR 过表达的 NIH3T3 细胞经 EGF 诱导后,在 Herstatin 存在时,AKT 的磷酸化水平仅为对照细胞的 2%,AKT 信号通路几乎完全被抑制。而 Herstatin 对 MAPK 系统的磷酸化水平则无明显影响,在同时表达 Herstatin 和 EGFR 的 NIH3T3 细胞中,EGF 仍可诱导形成含 EGFR、Shc 和 Grb2(growth factor receptor-bound protein 2)信号复合物。虽然 MAPK 通路未受到阻断,但 Herstatin 的表达可抑制细胞的 DNA 合成及增殖。Herstatin 对信号传导的抑制作用还表现出高度的特异性,它不能抑制由 FGF-2 激活 FGF-2R 引起的 AKT 磷酸化,仅抑制由 EGF 和 TGF- α 诱导的 AKT 磷酸化^[4]。

据以往报道,EGFR 激活后 MAPK 途径被认为是细胞有

丝分裂的主要信号通路。最近的研究结果提示,AKT 在启动细胞增殖及生存信号中的作用更为重要^[9-10]。实验证实,用 EGFR 抑制剂导致的细胞周期阻滞,不是因为 MAPK 信号系统被抑制,而是由于 PI3K/AKT 信号系统受到影响所致^[11]。在 Herstatin 存在下,TGF- α 对 MAPK 系统刺激不足以驱动细胞进入 S 期;EGF 对 MAPK 系统的刺激亦不能以促进细胞有效增殖。这主要是由于 AKT 的活性受到了强有力的抑制。上述研究为 AKT 在细胞增殖中的重要作用提供了佐证。

6 结 语

Herstatin 通过与 HER2 和 EGFR 高亲和力结合,阻碍 EGFR 家族成员间形成同源或异源二聚体,抑制受体磷酸化,及特异地阻断 AKT 信号途径,进而抑制细胞的增殖及抗凋亡能力。关于 Herstatin 的研究目前还不够深入,诸如 Herstatin 与 EGFR 和 HER2 的作用位点、与 EGFR 和 HER2 高亲和力结合的机制及对 PI3K/AKT 系统选择性抑制的机制等仍有待进一步阐明。Herstatin 在未来肿瘤治疗中的潜在作用将可能成为该领域中研究的一个新内容。

[参 考 文 献]

- [1] Wang SC, Hung MC. HER2 overexpression and cancer targeting [J]. *Semin Oncol*, 2001, 28(5, suppl 16): 115-124.
- [2] Doherty JK, Bond C, Jardim A, et al. The HER2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 10869-10874.
- [3] Justman QA, Clinton GM. Herstatin an autoinhibitor of the human epidermal growth factor receptor 2 tyrosine kinase, modulates epidermal growth factor signaling pathways resulting in growth arrest [J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(23): 2068-20624.
- [4] Azios NG, Romero FJ, Denton MC, et al. Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER2 and blocks EGF activation of the EGF receptor [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 5199-5209.
- [5] Cho HS, Mason K, Ramyar KX, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab [J]. *Nature*, 2003, 421(6924): 756-760.
- [6] Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether [J]. *Science*, 2002, 297(5585): 1330-1333.
- [7] Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 775-787.
- [8] Alimandi M, Romano A, Curia MC, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas [J]. *Oncogene*, 1995, 10(9): 1813-1821.
- [9] Walker F, Kato A, Gonez LJ, et al. Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(12): 7192-7204.
- [10] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 355-365.
- [11] Busse D, Doughty RS, Ramsey TT, et al. Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(10): 6987-6995.

[收稿日期] 2003 - 08 - 30

[修回日期] 2003 - 10 - 20