

【基础研究】

FGFs 几乎在所有组织中表达,FGFs 的功能特

异性主要取决于其相应受体,即 FGFRs 的组织特异性。有研究表明,许多疾病与 FGFR 突变相关^[2]。另外,多种肿瘤的发生与 FGFRs 异常表达有关^[3]。应用 FGFR 抑制剂在体内外实验中均能有效抑制前列腺癌发展^[4]。尽管 FGFRs 抑制剂在肿瘤治疗中展示出了巨大的应用潜力,但由于 FGFRs 在机体组织中的广泛表达,且在胚胎发育等生理过程中具有重要作用,明确 FGFR 的组织特异性及其相应抑制剂的靶向器官已成为 FGFR 抑制剂开发的首要问题^[5]。

FGFs 家族中大部分为自分泌或旁分泌因子,它们由靶组织自身合成分泌,并作用于组织局部^[6]。但在 FGFs 家族中有一类特殊的亚家族,即 FGF19 亚家族。新近研究表明,它们不仅能够像 FGFs 家族其他成员一样具有自分泌或旁分泌功能,还可能通过 FGFs-FGFRs-Klotho 三聚体形式发挥内分泌功能^[7]。即它们可以由一个组织器官合成分泌后进入血液循环,到达另一远方拥有相应 FGFR 的靶组织,并在远方靶组织通过 Klotho 辅助与 FGFR 相结合,从而发挥生物学效应^[8-9]。由此推测,相对于 FGFs 家族的其他成员,FGF19 亚家族可能具有更广泛的组织作用空间,而 FGF19 亚家族细胞因子的组织特异性将更多取决于 FGFRs 的分布特异性^[10]。

FGFRs 由 5 种基因编码,分别为 FGFR1 ~ 5。其中 FGFR1 为自分泌或旁分泌型生长因子 FGF1 及内分泌型生长因子 FGF21 等的主要受体,作用最为广泛^[10]。FGFR1 首先在脂肪组织中被发现,有研究表明^[11],其可能在血管新生、糖脂调节、新陈代谢等方面发挥作用。以往研究已证实,其与肺鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌等癌症的发生发展存在密切关系^[12]。药理学研究显示,应用 FGFR1 单克隆抗体,可不通过 β -Klotho 辅助因子,模拟 FGF21 效应,从而达到降低血糖、调节代谢等作用^[13]。同时,FGFR1 作为 FGF1 等非 Klotho 依赖性自分泌或旁分泌因子的相应受体,在肿瘤的发生发展中起到一定作用^[14]。制备 FGFR1 靶向抗体可能对抑制肿瘤进展发挥重要效应,为制备肿瘤靶向药物开启一条新思路。另外,明确 FGFR1 组织特异性,进一步研发非 Klotho 依赖性 FGFR1 靶向抗体,将为内分泌型 FGFs 开辟更广泛的作用空间。故本研究重点对 FGFR 家族中的 FGFR1 组织特异性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠 6 只,8 周龄,体质量 (190 ± 10) g,由北京大学医学部实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器 FGFR1 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉优尔生公司,FGFR1 抗体购自英国 Abcam 公司,TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,单脱氧核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, NTP)、反转录酶 (moloney murine leukemia virus, M-MLV)、RNA 酶抑制剂购自美国 Promega 公司,Oligo(dT) 购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物与取材 按照中华人民共和国卫生部实验动物管理规定(55 号文件,2001)执行。实验前 24 h 禁食,自由饮水,大鼠常规条件饲养 4 周后用 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠麻醉,心脏取血处死。手术器械经 120°C 高温高压灭菌,取大鼠脂肪、肝脏、心脏、主动脉、肾脏、骨骼肌等组织。

1.3.2 实时定量荧光聚合酶链式反应 (real time-polymerase chain reaction, RT-PCR) 测 FGFR1 mRNA 相对水平 TRIzol 法处理组织样品,提取总 RNA 后反转录为 cDNA。进行 PCR 扩增,目的基因 FGFR1 引物上游序列为 5'-GCACCTGAGGCATTGTTTG-3',下游序列为 5'-TACTGGGCTTGTCCATTTCG-3'。目的基因扩增 30 个循环,以磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参对照,计算 FGFR1 mRNA 相对含量 ΔCt 。

1.3.3 总蛋白提取及测定 动物处死后迅速摘取待测组织,以每 10 mg 组织加入 100 μL 蛋白裂解缓冲液的比例在冰浴条件下剪碎组织,然后应用玻璃匀浆器匀浆。 4°C 条件下 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液行蛋白定量,加入原液 1/4 体积的 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液, 100°C 煮沸 15 min 后置于冰上,按双金鸡宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。

1.3.4 ELISA 测定 FGFR1 蛋白相对表达 取标准化浓度组织蛋白样品按 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.3.5 免疫组织化学法测定 FGFR1 蛋白表达 实验动物处死后快速取出所需组织,放入 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛中固定,常规脱水,石蜡包埋切片备用。常规水化脱蜡,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗、体积分数 3% 过氧化氢氧化、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗原修复、二抗来源血清封闭、FGFR1 一抗孵育、PBS 冲洗、二抗孵育、二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 染色、苏木精复染、中性树胶封固,镜检。其中染色呈棕黄色为阳性。

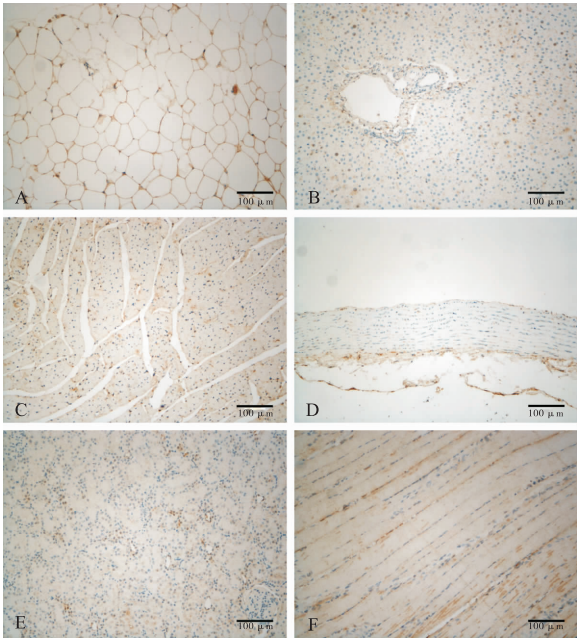
1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差

($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠各组织中 FGFR1 mRNA 表达 FGFR1 mRNA 在大鼠脂肪、肝脏、心脏、血管、肾脏、肌肉中均有表达,其 ΔCt 值分别为 $2.623\ 0 \pm 0.524\ 9$ 、 $1.003\ 0 \pm 0.077\ 2$ 、 $6.755\ 0 \pm 0.278\ 4$ 、 $1.613\ 0 \pm 0.320\ 1$ 、 $4.833\ 0 \pm 0.421\ 5$ 、 $6.123\ 0 \pm 0.348\ 7$ 。FGFR1 mRNA 在各组织中的表达从高至低依次为心脏、肌肉、肾脏、脂肪、血管和肝脏组织;FGFR1 mRNA 在各组织中的表达比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 大鼠各组织中 FGFR1 蛋白表达 光镜下观察可见,免疫组织化学法阳性染色呈棕黄色(图 1)。FGFR1 蛋白在大鼠脂肪、肝脏、心脏、血管、肾脏、肌肉组织中均有表达,主要分布于细胞膜。大鼠脂肪、肝脏、心脏、血管、肾脏、肌肉组织中 FGFR1 蛋白表达量分别为 ($10.670\ 0 \pm 1.197\ 0$)、($0.356\ 0 \pm 0.105\ 5$)、($0.860\ 0 \pm 0.163\ 9$)、($5.152\ 0 \pm 0.801\ 4$)、($0.186\ 0 \pm 0.046\ 7$)、($2.110\ 0 \pm 0.161\ 9$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,FGFR1 蛋白在各组织中的表达量从高至低依次为脂肪、血管、肌肉、心脏、肝脏和肾脏组织;大鼠各组织中 FGFR1 蛋白表达量比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。



A:脂肪组织;B:肝脏组织;C:心脏组织;D:血管组织;E:肾脏组织;F:肌肉组织。

图 1 FGFR1 蛋白在各组织中的表达(免疫组织化学, $\times 20$)
Fig.1 Expression of FGFR1 protein in different tissues (immunohistochemistry, $\times 20$)

3 讨论

FGFRs 是一类可与 FGFs 特异性结合的受体蛋白,属于酪氨酸激酶受体第 4 型^[15]。FGFR 多为单链跨膜糖蛋白分子,相对分子质量为 $110\ 000 \sim 150\ 000$,其氨基酸排列具有相同的空间结构,同源性达 $55\% \sim 72\%$ ^[16]。虽然不同 FGFR 介导的生物学功能各不相同,但 FGFR 均由细胞外段、跨膜区和细胞内段 3 个主要部分组成^[17]。

FGFR 的细胞外段(N 端)长 $346 \sim 356$ 个氨基酸,由 2~3 个免疫球蛋白结构域(Ig I~III)、信号肽结构和“酸性盒子”3 部分组成。FGFR 的第 1 个免疫球蛋白结构域是高度变异的,与配体结合无关。FGFR 的显著标志是在 Ig I 与 Ig II 之间存在的 1 个称为“酸性盒子”的酸性丝氨酸富集序列。酸性盒子也与 FGF 结合无关,表达缺失酸性盒子的 FGFR 不影响其配体结合能力。Ig I 和酸性盒子在受体自动抑制过程中发挥作用。Ig II 和 Ig III 的保守性较高,为 $63\% \sim 82\%$,是 FGFR 与 FGF 结合的关键部位。其中 Ig II 在各个 FGFR 中高度保守,该序列是与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)的结合部位,而 Ig III 是与 FGFs 的结合部位^[18]。FGFR 跨膜段是一个高度保守的螺旋样穿膜结构,长约 21 个氨基酸。其细胞内段包括高度变异的近膜区和酪氨酸激酶活性区,长 $410 \sim 425$ 个氨基酸,是 FGF 发挥生物学功能的基础。另外有研究发现,体内合成的 FGFR 上具有信号肽结构域,提示 FGFR 是可以被分泌的^[19]。目前,发现可以被分泌至细胞外的 FGFR 仅有 FGFR1 1 种。游离的 FGFR1 仅有细胞外段,并常伴有 Ig I 缺失,但仍保持与 FGF 的结合能力,由此推断这种形式的 FGFR1 也参与了 FGFs 的活性调节^[20]。因此,深入了解 FGFR1 的组织特异性对研究 FGFs 的调节作用具有重要意义。

本研究分别在基因及蛋白水平对 FGFR1 在大鼠体内的分布情况及表达水平进行研究,结果显示,在大鼠脂肪、肝脏、心脏、血管、肾脏、骨骼肌中均有 FGFR1 mRNA 和蛋白表达,但各组织中表达量存在一定差异。其中 FGFR1 在脂肪组织中呈高表达,而在肝脏组织中则表达较低。既往研究显示,脂肪组织是 FGF21 的主要作用组织^[21]。同时有实验发现,虽然在肝脏及脂肪组织中均可检测到 FGF21 的

存在,但仅有脂肪组织可以对 FGF21 产生反应,而肝脏组织则不能对 FGF21 产生信号传导^[22]。本实验通过对脂肪及肝脏组织中 FGFR1 表达量的测定及比较可以解释为何 FGF21 主要在脂肪组织发挥调节作用,而在肝脏组织中效应微弱^[23]。

同时本研究发现,FGFR1 在血管组织中表达量较高。FGFR1 是 FGF1 的主要结合受体,既往研究表明,FGF1 在促进新生血管形成,参与冠状动脉侧支循环建立等过程中发挥重要作用^[24]。但与此同时,FGF1 具有促进细胞增殖作用,这也导致了如经皮冠状动脉介入术后血管再狭窄等不良反应的发生^[25]。如何利用 FGFR1 在血管组织的高表达,调控 FGF1 在血管形成的双向性,为临床手术及药物治疗开拓了新思路。

另外本实验数据表明,各组织中 FGFR1 mRNA 及蛋白的表达水平并不完全平行。同一受体基因可能剪切产生多种细胞结合型和分泌型受体。有研究报道,在如眼玻璃体液等体液中均发现截短型 FGFR^[26]。这种 FGFR 仅有细胞外段,但它可与细胞膜上的 FGFR 竞争结合 FGFs,因此,可能对 FGFs 起调节作用。由此推断,FGFR1 在各种组织中也可能存在转录后修饰调节。

需要说明的是,大多数 FGFs 通过 HSPGs 以 FGF/HSPG/FGFR 三聚体的形式与细胞表面的 FGFR 相结合,随后三聚体二聚化,形成 1 个 FGF-FGFR 功能单元,从而激活效应细胞活性^[27]。而 FGF19 亚家族与 HSPGs 亲和力较低,需要依靠 Klotho 家族蛋白作为必需的辅助因子方可与 FGFRs 结合^[28]。另外,FGFs 配体与受体结合具有重叠识别和多特异性,即 1 种 FGFR 可以被几种不同的 FGFs 激活,1 种 FGF 也可以激活多种 FGFRs^[29]。其中 FGFR1 是 FGF1、FGF2、FGF5 和 FGF21 等的高亲和性受体^[30]。同时,FGFs 家族成员间可以彼此竞争对方的受体。因此,FGFs 与 FGFR 的结合还受多种因素的影响,如作为结合辅助因子的 HSPG/Klotho 的组织特异性、FGFs 信号系统的多重性以及 FGFs 间的相互竞争等,尚需进一步研究。

FGFR1 作为 FGFRs 家族中作用最为广泛的成员,在许多生物学过程中发挥重要作用。多种 FGFs 只有通过与 FGFR1 相结合方可激活细胞内信号传导通路,从而发挥生物学效应,故 FGFR1 的分布特异性决定了众多 FGFs 的组织特异性。同时,FGFR1

作为一个独立的细胞因子在多种先天性疾病中发挥决定性作用^[31]。另外有研究表明,FGFR1 是某些癌症的驱动基因,并且以“细胞自治”的方式维持肿瘤细胞的恶性特征,促进肿瘤的发生发展^[32]。但也有研究证实,FGFR1 在某些肿瘤疾病中具有抑制病程发展的作用^[33]。这些研究结果使得 FGFR1 成为具有药物开发潜力的癌症治疗新靶点^[34]。本研究确认了 FGFR1 在大鼠体内各组织器官的分布情况,为进一步研究 FGFs 的作用特异性提供了依据。同时对明确 FGFR1 作为一个独立细胞因子本身在各组织中的调控机制以及肿瘤靶向药物的研制具有一定意义。

参考文献:

- [1] OLADIPUPO S S, SMITH C, SANTEFORD A, *et al.* Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (37): 13379-13384.
- [2] MILLER A V, KAVANAUGH S I, TSAI P S. Disruption of the suprachiasmatic nucleus in fibroblast growth factor signaling-deficient mice[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 8(2): 7-11.
- [3] FENG S, ZHOU L, NICE E C, *et al.* Fibroblast growth factor receptors; multifactorial-contributors to tumor initiation and progression[J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(1): 13-31.
- [4] GRYSHCHENKO A A, BDZHOLA V G, BALANDA A O, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylthieno[2,3-d]pyrimidine-4-amines as inhibitors of FGFR1[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(9): 2287-2293.
- [5] SAICHAEMCHAN S, ARIYAWUTYAKORN W, VARELLA-GARCIA M. Fibroblast growth factor receptors; from the oncogenic pathway to targeted therapy[J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(1): 40-62.
- [6] SHI Y J, TSANG J Y, NI Y B, *et al.* FGFR1 is an adverse outcome indicator for luminal A breast cancers[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 5063-5073.
- [7] ZHANG W, XUE D, HU D, *et al.* Secreted klotho protein attenuates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* via inactivation of the FGFR1/ERK signaling pathway[J]. *Growth Factors*, 2015, 33(5/6): 356-365.
- [8] 付坤, 辛毅, 史雨晨, 等. 成纤维细胞生长因子 21 对大鼠血管平滑肌钙化的影响及机制[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(10): 879-886.
- [9] 王柏川, 叶剑. 地塞米松对大鼠晶状体上皮细胞成纤维细胞生长因子受体表达的影响[J]. *眼科新进展*, 2007, 27(10): 750-753.
- [10] FISCHBACH A, ROGLER A, ERBER R, *et al.* Fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene amplifications are rare events in bladder cancer[J]. *Histopathology*, 2015, 66(5): 639-649.

- [11] SPOLCOVA A, HOLUBOVA M, MIKULASKOVA B, *et al.* Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes[J]. *Physiol Res*, 2014, 63(4):483-490.
- [12] HERO M, LAITINEN E M, VARIMO T, *et al.* Childhood growth of females with Kallmann syndrome and FGFR1 mutations[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 82(1):122-126.
- [13] LING L, TAN S K, GOH T H, *et al.* Targeting the heparin-binding domain of fibroblast growth factor receptor 1 as a potential cancer therapy[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:136.
- [14] BREWER J R, MOLOTKOV A, MAZOT P, *et al.* Fgfr1 regulates development through the combinatorial use of signaling proteins[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(17):1863-1874.
- [15] KUMAR B V, LAKSHMI N, KUMAR M R, *et al.* Design, synthesis and screening studies of potent thiazol-2-amine derivatives as fibroblast growth factor receptor 1 inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14(17):2031-2041.
- [16] BOEHM D, VON MASSENHAUSEN A, PERNER S. Analysis of receptor tyrosine kinase gene amplification on the example of FGFR1[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1233:67-79.
- [17] PARISH A, SCHWAEDERLE M, DANIELS G, *et al.* Fibroblast growth factor family aberrations in cancers: clinical and molecular characteristics[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(13):2121-2128.
- [18] KLEIN T, VAJPAI N, PHILLIPS J J, *et al.* Structural and dynamic insights into the energetics of activation loop rearrangement in FGFR1 kinase[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7877.
- [19] ZHUANG L, BLUTEAU G, TRUEB B. Phylogenetic analysis of receptor FgfrL1 shows divergence of the C-terminal end in rodents[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2015, 186:43-50.
- [20] KELLEHER F C, O'SULLIVAN H, SMYTH E, *et al.* Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(10):2198-2205.
- [21] BARIK M, BAJPAI M, MALHOTRA A, *et al.* Novel mutation detection of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene, FGFR2 III a, FGFR2 III b, FGFR2 III c, FGFR3, FGFR4 gene for craniosynostosis: a prospective study in Asian Indian patient[J]. *J Pediatr Neurosci*, 2015, 10(3):207-213.
- [22] ANTONELLIS P J, KHARITONENKOV A, ADAMS A C. Physiology and endocrinology symposium: FGF21: insights into mechanism of action from preclinical studies[J]. *J Anim Sci*, 2014, 92(2):407-413.
- [23] ASRIH M, ALTIRIRIBA J, ROHNER-JEANRENAUD F, *et al.* Ketogenic diet impairs FGF21 signaling and promotes differential inflammatory responses in the liver and white adipose tissue[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e126364.
- [24] 史雨晨, 柳景华. 成纤维细胞生长因子 21 在大鼠各组织中表达分布的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(7):574-577.
- [25] HOUSE S L, CASTRO A M, LUPU T S, *et al.* Endothelial fibroblast growth factor receptor signaling is required for vascular remodeling following cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(5):H559-H571.
- [26] KUO C H, SUNG M C, CHEN P K, *et al.* FGFR1 mediates recombinant thrombomodulin domain-induced angiogenesis[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 105(1):107-117.
- [27] 丁芝祥, 陈阳. FGFs 及其受体与后囊膜混浊的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(5):775-778.
- [28] 张静, 李晓莉, 王萌, 等. 成纤维细胞生长因子受体-癌症治疗新靶点[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17):3393-3397, 3352.
- [29] GALLEG0-ESCUREDO J M, GOMEZ-AMBROSI J, CATALAN V, *et al.* Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(1):121-129.
- [30] 周文雅, 王国文, 杨蕴, 等. 肉瘤中 FGFR 信号通路研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2015, 4(9):720-724.
- [31] JUNG S H, LEE H C, YU D M, *et al.* Heparan sulfation is essential for the prevention of cellular senescence[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3):417-429.
- [32] SARFATI J, BOUVATTIER C, BRY-GAULLARD H, *et al.* Kallmann syndrome with FGFR1 and KAL1 mutations detected during fetal life[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2015, 10:71.
- [33] MONACO S E, RODRIGUEZ E F, MAHAFFEY A L, *et al.* FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung with correlation of primary and metastatic tumor status[J]. *Am J Clin Pathol*, 2016, 145(1):55-61.
- [34] KATOH M, NAKAGAMA H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(2):280-300.
- [35] BUNNEY T D, WAN S, THIYAGARAJAN N, *et al.* The effect of mutations on drug sensitivity and kinase activity of fibroblast growth factor receptors: a combined experimental and theoretical study[J]. *E Bio Med*, 2015, 2(3):194-204.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)