

FGF21 蛋白 抗类风湿性关节炎研究



李思明 编著

FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21
ANTI-RHEUMATOID ARTHRITIS RESEARCH



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

FGF21 蛋白抗类风湿性关节炎研究

李思明 编著



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

FGF21 蛋白抗类风湿性关节炎研究/李思明编著. —北京: 科学技术文献出版社, 2017. 6

ISBN 978-7-5189-2738-8

I. ①F… II. ①李… III. ①类风湿性关节炎—治疗—研究 IV. ①R593.220.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 120360 号

FGF21 蛋白抗类风湿性关节炎研究

策划编辑:杨茜 责任编辑:张红 杨茜 责任校对:张叫咪 责任出版:张志平

出 版 者	科学技术文献出版社
地 址	北京市复兴路 15 号 邮编 100038
编 务 部	(010) 58882938, 58882087 (传真)
发 行 部	(010) 58882868, 58882874 (传真)
邮 购 部	(010) 58882873
官 方 网 址	www.stdp.com.cn
发 行 者	科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者	虎彩印艺股份有限公司
版 次	2017 年 6 月第 1 版 2017 年 6 月第 1 次印刷
开 本	850 × 1168 1/32
字 数	205 千
印 张	9.75
书 号	ISBN 978-7-5189-2738-8
定 价	42.00 元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

前 言

成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 是近期发现的体内又一个代谢调节因子, 属于成纤维细胞生长因子家族, 其特异性作用于肝脏、脂肪、胰岛细胞, 且不依赖于胰岛素、有效、安全地调节血糖血脂的能力深得研究人员青睐。除此之外, 在动物实验上可以有效改善胰岛素抵抗, 降低胰岛素浓度, 显著降低血清中三酰甘油、胆固醇和低密度脂蛋白的含量, 显示其具有缓解慢性炎症的潜能。FGF21 在改善机体炎症方面的作用越来越多地引起人们的关注, 临床报道在败血症和全身炎症反应综合征患者血清中 FGF21 表达量显著升高。在类风湿性关节炎患者的血清和滑膜液中, FGF21 的水平也明显升高, 这提示了 FGF21 和类风湿性关节炎的密切关系。在最近的研究中, 人们发现 FGF21 在改善类风湿性关节炎症状方面有着很好的效果, 并对 FGF21 抗类风湿性关节炎的作用和作用机理进行了一系列研究。

本书参考了相关领域的大量文献和资料, 对 FGF21 的生物学功能, 特别是 FGF21 抗类风湿性关节炎作用的研究新进展做了详细的介绍。本书共八章, 第一章和第二章对 FGF21

的生物学活性和活性改造的研究近况做了详细介绍；第三章、第四章介绍了类风湿性关节炎研究进展和 FGF21 参与调节的炎症相关通路研究进展，包括 NF- κ B、氧化应激、Th17 及其效应因子 IL-17 的研究进展；第五章介绍了 FGF21 在妊娠期糖尿病中的作用；第六章重点介绍了 FGF21 治疗类风湿性关节炎的作用效果研究；第七章详细介绍了 FGF21 对类风湿性关节炎小鼠的抗氧化和 I κ B α /NF- κ B 信号通路的调节机制，以及 FGF21 通过抑制 Th17 细胞治疗类风湿性关节炎的作用机理；第八章对 FGF21 蛋白的生产制备技术和应用于类风湿性关节炎的前景做了讨论和展望。

本书由李思明博士编写，另外本书是在于引航博士、杨永碧硕士、徐文娟硕士的大力帮助和支持下完成的，在这里对他们表示深深的谢意！由于时间的紧迫和作者本身水平有限，本书难免有些不完善的地方，恳请各位读者批评指正！

目 录

第一章 成纤维细胞生长因子 (FGF21) 的生物学功能	1
一、成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族及其受体	1
二、FGF21 的生物学活性	11
第二章 FGF21 的活性改造	38
一、蛋白质工程研究的核心内容	38
二、IgG 研究背景	41
三、基因突变技术的研究现状	43
四、FGF21 的改造策略	43
五、FGF21 的筛选标准	46
第三章 类风湿性关节炎研究进展	52
一、类风湿性关节炎发病机理	53
二、类风湿性关节炎临床症状	55
三、治疗类风湿性关节炎的药物	56
第四章 FGF21 参与调节的炎症相关通路研究进展	63
一、慢性炎症对代谢性疾病的影响	63

二、NF- κ B 的研究进展	70
三、氧化应激的研究进展	76
四、Th17 及其效应因子 IL-17 的研究进展	79
第五章 FGF21 在妊娠期糖尿病患者体内的表达	89
一、研究背景	89
二、材料和方法	91
三、实验结果	94
四、讨论	100
第六章 FGF21 对类风湿性关节炎的治疗效果研究	104
一、S-hFGF21 基因的构建、表达、纯化和活性 分析	104
二、FGF21 治疗类风湿性关节炎的体内药效学 研究	122
三、FGF21 与抗体和地塞米松对 RA 小鼠治疗效果的 比较	134
第七章 FGF21 对类风湿性关节炎小鼠的调节机制	141
一、FGF21 抗氧化和 I κ B α /NF- κ B 信号通路的调节 机制	141
二、FGF21 对 LPS 刺激的 RAW264.7 产生炎症反应的 抑制作用	153
三、FGF21 调控 Th17-IL17 轴作用机制	157

第八章 讨论和展望	163
一、FGF21 蛋白的制备	163
二、动物模型的选择	172
三、几种生理状态下 FGF21 表达量变化的差异	182
四、FGF21 抗类风湿性关节炎活性	195
五、FGF21 通过 Th17/IL-17 轴调控免疫系统	204
六、FGF21 调控自噬的抗炎机制	212
附录 1 主要仪器设备和试剂	215
附录 2 作者相关研究论文	221
附录 3 参考文献	279

第一章 成纤维细胞生长因子 (FGF21)的生物学功能

成纤维细胞生长因子 (FGF) 最早在大脑和垂体中被发现, 因其能促进成纤维细胞生长的性质而被命名。迄今为止, FGF 家族共发现 23 个成员, 在发育组织及成熟组织中均有广泛表达。它们具有多种生物学活性, 如促进胚胎分化发育、促进细胞有丝分裂、促进伤口愈合组织再生、参与内分泌调节等。FGF21 是日本学者 Tetsuya Nishimura 2000 年在鼠胚胎中发现的 FGF 家族的一个新成员, 是一种具有 209 个氨基酸残基的多肽。FGF21 主要在肝脏中特异性表达, 肾脏、骨骼肌和脂肪组织等中也有表达。

一、成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族及其受体

(一) 成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族

成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 是一类通过与细胞膜特异性受体结合发挥作用、调节细胞生长的肽类分子, 曾被称为肝素亲和生长因子 (heparin binding growth factor, HBGF)。自 20 世纪 70 年代中期起已进行了大量广泛的



研究。早期研究使用的 FGFs 主要来自牛脑和脑垂体的提取液，是大约 150 个氨基酸结构的酸性或碱性成纤维细胞生长因子（aFGF；FGF1 或 bFGF；FGF2）。

哺乳动物中发现的 FGF 家族共包括 23 个成员，即 FGF1 ~ FGF23。FGF 家族成员之间的氨基酸序列同源性为 25% ~ 50%，其每个成员都有几十个氨基酸的中心区域，该中心区域在不同的成员中有高度的同源性（30% ~ 70%）。结构分析表明，此中轴折叠成 12 条逆向平行的 β 链，它们又进一步形成圆柱状的结构。部分 FGF 家族成员 N 末端有大约 30 个氨基酸残基组成的典型信号肽序列，使得它们可通过内质网—高尔基复合体的经典途径（即自分泌和旁分泌）被分泌到细胞外。它们中大多数（FGF3 ~ FGF8、FGF10、FGF15、FGF17 ~ FGF19 及 FGF21 ~ FGF23）依靠信号肽分泌到细胞外。FGF9、FGF16 和 FGF20 则没有该功能区，即没有明显的可剪接的 N 端信号肽，但仍能分泌出细胞。FGF1 和 FGF2 虽然也不具有信号肽，但是它们可以通过细胞膜的微小破裂或细胞死亡释放到细胞外。FGF22 有一个可剪接的 N 端信号肽，但仅附着于细胞表面并不分泌。FGF11 ~ FGF14 没有信号肽存在，不以受体依赖的方式作用于细胞内。这些 FGFs 可能作为组织特异性的蛋白—激酶信号模型的胞内组成部分，与其他的 FGFs 同源，结构相似，但功能不同。

FGF 可以被分为 FGF7、FGF10、FGF22 和 FGF9、FGF16、FGF20 等多个亚型。FGF 的各个亚型与各染色体定位之间无十分明显的关联性，人类 FGF 基因主要分布于整个基因组中，但也有一些 FGF 基因在基因组上呈群落分布，如 FGF3、FGF4 和 FGF19 位于染色体 11q13 区；FGF6 位于染色体 12p13 区；而



FGF17、FGF20 定位于染色体 8p21 - p22 区相互链接的位置上；FGF18 定位于 14p11 区；FGF21 定位于人 $\alpha 1, 2$ - 墨角藻糖基转移酶基因的 5'侧翼区。因此可推测 FGF 家族可能是在复制、进化和易位等复杂过程中形成的。人类 FGF 基因的编码区多数是由 3 个结构相似的外显子组成。但 FGF11 ~ FGF14 的编码区是由 5 个外显子构成的，FGF 基因编码区的大小为 5 ~ 100kb。

FGF 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物体内。通过基因组的解读，在果蝇和线虫体内分别找到 1 种 FGF (branchless) 和 2 种 FGF (egl - 17 和 let - 756)，斑马鱼 (zebra fish) 体内则有 4 种 FGF (FGF3、FGF8、FGF17、FGF18)，鸡体内有 7 种 FGF (FGF2、FGF4、FGF8、FGF12、FGF14、FGF18、FGF19)，然而在大肠杆菌和酵母等单细胞生物中未检测到 FGF，显示 FGF 家族成员在进化过程中种类逐渐呈增多趋势。根据蛋白质序列分析可将现有人源的 FGFs 分为 7 个亚家族 (图 1 - 1)。

(二) FGFs 的主要功能

FGFs 家族成员是一种具有广泛生物学效应的细胞因子，在促进胚胎发育、组织形成与修复、炎症、血栓形成、变异细胞生长、肿瘤发生与转移等生理及病理过程中起重要作用。对成纤维细胞、上皮细胞、血管内皮细胞有促增殖和分裂的作用。

在促进血管形成的过程中，FGFs 成员的参与甚至发挥了主导作用：①FGFs 激活内皮细胞；②分泌蛋白酶样物质降解基底膜和细胞外基质；③内皮细胞增生、迁移形成内皮细胞素；④促进分泌胶质，形成新的血管网络系统。

在创伤愈合中，FGFs 可以促进成纤维细胞的功能，致胶原

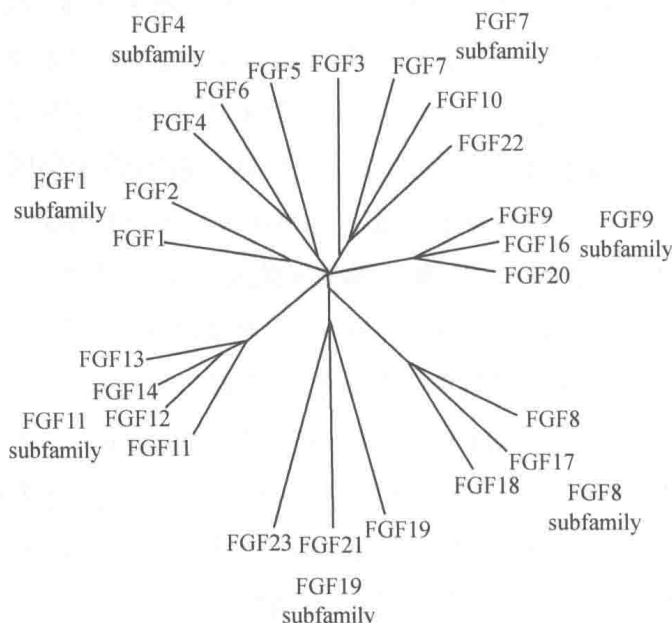


图 1-1 人源 FGFs 家族成员进化关系

纤维在创口中的沉积，促进愈合。FGF2 可通过以下途径促使损伤愈合：①促进损伤修复细胞的补充和增殖；②通过趋化作用和促细胞迁移作用导致巨噬细胞、间充质细胞、内皮细胞、成纤维细胞等向创伤部位聚集，启动创伤愈合过程；③促进新生血管的形成，为创伤修复提供丰富的血液供应；④促进细胞释放胶原酶和血纤溶酶激活物。

许多肿瘤细胞（神经胶质细胞癌、横纹肌癌、白血病、肺细胞癌和肝癌等）均能合成 FGFs，并受其调控。FGFs 也可能通过促进纤维蛋白溶解酶原及胶原酶激活物质的分泌参与肿瘤的侵袭与转移。其中 bFGF 对起源于中胚层、神经外胚层的细胞，内胚层衍生物有促进有丝分裂活性的作用；在体外 bFGF 的生物



学活性除能引起细胞的增殖反应外,还包括能调节细胞的能动性,细胞分化,神经组织生长和再生,中轴突的延伸和成活,肿瘤的发生,动脉粥样硬化的斑块形成、发展和转移过程等。

已有研究显示,FGFs与骨的形成有关。人类骨骼上的一些遗传性疾病与FGFRs的突变有关,如在FGFR2和FGFR3细胞外区增加或缺少Cys会导致一些骨骼发育疾病。FGFR3的穿膜区上加入一个Arg很有可能会导致新生儿佝偻病的发生。

(三) 成纤维细胞生长因子受体(FGFRs)及其内部信号传导系统

1. FGFRs的结构

大多数FGFs是一类穿膜的酪氨酸激酶受体,FGFs的生物活性是通过与FGFRs结合来启动细胞内信号转导。受体的活化导致受体酪氨酸自磷酸化作用的产生。FGF受体广泛存在于体内几乎所有组织中,通过复杂的信号传递路径对细胞的增殖、分化和移行进行调节。目前已经确定了至少5种独立编码的FGFRs,除FGFR5缺少细胞内酪氨酸激酶区外,FGFR1、FGFR2、FGFR3和FGFR4均受酪氨酸激活,且为单链的糖蛋白分子。由细胞外区、跨膜区和细胞内区组成。细胞外区为3个免疫球蛋白样结构域(I~III),在I与II之间有一个酸盒;跨膜区是一个穿膜螺旋;细胞内区是酪氨酸激酶区。FGFRs有3个特性:①重叠识别和多特异性,即一种受体能以相似的亲和性和几种FGF结合,同样,一种FGF也能以相类似的形式与几种FGFR结合;②FGF和其受体结合依赖于细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG);③自同一基因



可产生许多种细胞结合性和分泌性受体，它们可能通过与表面受体竞争配体来调节 FGFs 与 FGFRs 的亲合性。

根据 FGFRs 选择性拼接的差异，目前已知存在 7 种受体蛋白的亚型结构。例如，FGFR1 有 FGFR1b、1c、2b、2c、3b、3c、4 这 7 种，各自均有不同的配体特异性。同样 FGFR2 也可产生 FGFR2 - IIIb 和 FGFR2 - IIIc 两种受体亚型。FGFR2 - IIIb 主要在上皮细胞中表达，FGFR2 - IIIc 主要在间质细胞中表达。间质细胞表达的 FGF7 和 FGF10 能特异性地激活 FGFR2 - IIIb，而 FGF2、FGF4、FGF6、FGF8 和 FGF9 则特异性地激活 FGFR2 - IIIc，这种结合的特异性与细胞膜环境和硫酸乙酰肝素有关。其中，FGF10 与 FGFR2 - IIIb 有较高的亲和力，是特异性配体。当 FGFR2 胞外段发生点突变（S252W）时，促使 FGF7 和 FGF10 激活 FGFR2 - IIIc 和 FGF2、FGF6、FGF9 激活 FGFR2 - IIIb，促使表达这些配体的细胞自分泌信号激活。

2. FGFRs 的活化

(1) FGFRs 的二聚体化：受体二聚体化是 FGFs 信号传递中的一个重要步骤，也是 FGFR 活化的重要条件。二聚体化既可在同 FGFR 之间，也可在不同 FGFR 之间产生，即 FGFR1 和 FGFR2 之间也可产生二聚体。该步骤需细胞表面 HSPG 的参与，不同组织的细胞外间质一定区域上的 HSPG 的生物合成为表达 FGFRs 的细胞提供了支架，从而使这些细胞移行过来。肝素具有一个规则的结构域，在该结构域中是一些高度分化的糖基元。这些糖基元具有一些独特的羟基、硫酸基、羧酸基。HSPG 可能作为重要的功能分子将单体 FGF 呈递给 FGFR，从而促进受体二聚化及活化。而 HSPG 寡聚糖结合 FGF 部位极小，不能支持



FGF 介导的受体活化。为此,需要更长的寡聚糖单位且硫酸化模式不同。同其他生长因子/受体相比较,FGFR 二聚化的机制尚未完全明了。它们可能是通过促进配体诱导受体二聚体化来激活 FGFs/FGFRs 信号传递。

(2) FGFRs 的自磷酸化:受体二聚化是酪氨酸激酶活化的首要条件,FGF 与 FGFR 胞外段结合导致受体二聚化,使受体胞内段酪氨酸激酶活性区发生自身磷酸化,从而 FGFs 的信号通过一系列细胞内蛋白质级联反应传递给细胞核,使 *c-fos* 等基因的转录开始启动,进而细胞发生增殖和分化反应,这一过程存在于多种生长因子受体中,已被证实。磷酸化一般发生在两类不同的酪氨酸残基上。一类是位于 FGFRs 的激酶区内,激酶区内一个保守的酪氨酸残基位点及其相邻位点上的磷酸化导致激酶的活性升高,因此它是一个调节受体激酶 V_{max} 的敏感位点;另一类位于激酶区外信号蛋白分子中,这些分子一般都含有 Src 同源性 2 (SH2) 结构域。SH2 结构域由大约 100 个氨基酸构成,它们折叠成由一个大袋和一个小袋组成的双尖塞状结构。被磷酸化的酪氨酸 (PTyr) 插入大袋中,而位于 PTyr + 3 处的 Ile 插入小袋中,其中最重要的是与酪氨酸 C 端相连的 3~6 个残基,它们与 SH2 和其靶分子的序列特异性亲和结合有关。

3. FGFRs 信号转导途径

(1) PLC- γ 途径:被激活后的 FGFR,通过不断与 PLC- γ 分子上的 SH2 结构域结合来快速吸纳该分子,激活的 PLC- γ 水解其底物 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 [PtdIns (4,5) P₂] 形成 2 个二级信号:二酰基甘油和 1,4,5-三磷酸肌醇 [Ins (1,4,5) P₃]。Ins (1,4,5) P₃ 通过与细胞内特异性受体



结合而刺激细胞内的钙储释放 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合，从而激活 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶。此外， Ca^{2+} 与二酰基甘油都能激活蛋白激酶 C 家族中的成员。由 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 水解产生的二级信号除了磷酸化和激活转录因子外，还刺激了多种细胞内的反应。

(2) Ras/Raf/MEK/ERK 途径：该路径是 FGFs 诱导多种细胞增殖的重要路径。其最初激活是鸟嘌呤核苷酸交换因子 SOS 被移至胞膜使其靠近小 G 蛋白 Ras，促进鸟嘌呤核苷酸在 Ras 上的交换而使 Ras 成为 RasGTP 形式。SOS 在膜上的补充需要与接头蛋白 Grb2 的 Src 同源性 3 (SH3) 结构域结合形成 Grb2/SOS 复合物。该复合物可以直接通过 Grb2 的 SH2 结构域与 FGFRs 的 PTyr 位点相连，从而将 SOS 移至胞膜；也可以先和 Shc (另一种接头蛋白) 形成复合物，再通过 Shc 上的 PTyr 结合结构域与受体相连。Grb2/SOS 在细胞膜上的补充还能通过和与膜连接的 FRS2 α 结合。受体激活后，FRS2 α 的酪氨酸便被磷酸化。Ras 一旦处于 GTP 连接的激活状态，它便与一些效应蛋白如 PI-3、Raf 反应而激活细胞内的一些生理过程。被激活的 Raf 通过将 MEK 活性环上的丝氨酸残基磷酸化而将其激活。MEK 再将 ERK 活性环上的酪氨酸和苏氨酸残基磷酸化而激活 ERK。被激活的 ERK 能够磷酸化许多与胞质和胞膜相连的底物，此外它被快速地转运入细胞核去磷酸化和激活转录因子。

(3) JAK/STAT 途径：FGF 与 FGFR 结合后，FGFR 的自身磷酸化使 JAK 活化。活化的 JAKs 使受体磷酸化，形成特异性信号蛋白的吸附位点，包括 STAT (signal transducer and activator of transcription, 信号转导子和转录活化子) 蛋白。STAT 蛋白能使



C 端保存的酪氨酸残基磷酸化。STATs 被磷酸化后即脱离它所在的受体，形成稳定的同源或异源二聚体的形式并定位于细胞核，与 GAS 增强子家族成员结合并激活靶基因的转录。

除以上 3 条主要的路径外，FGF/FGFR 信号传递还有其他的一些路径。这些路径之间及其与其他生长因子的路径之间可以相互作用形成网络调节一些细胞的生理过程，如图 1-2 所示。

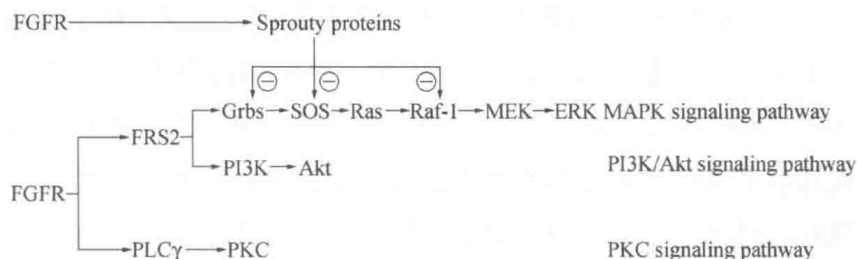


图 1-2 FGF/FGFR 信号传递路径

注：FGFR 相关的信号通路，“⊖”代表抑制。

在体外实验中，FGF21 同其他 FGF 分子一样能够刺激 FGFR 底物 2 α(FRS2 α)、MAPK、MAP2K1、RAF1、AKT1 及 GSK 等蛋白磷酸化，但是 FGF21 与其他 FGF 家族成员有一个很大的不同点，它不需要肝磷脂参与其信号传导，加上 FGF21 在体外与已知 FGF 受体亲和力很低，这使研究人员一度认为 FGF21 不通过受体或通过未知受体传递信号。但是我国科研人员王文飞等成功地分离出 FGF21 处理脂肪细胞时所形成的 FGF21/受体复合物，证明 FGF21 同样通过 FGF 受体传递信号，并检测出其中含有 FGFR2 III C。同时，Ogawa Y 等证明 Beta - klotho 取代肝磷脂成为 FGF21 信号传导协助因子。Beta - klotho 是一种跨膜蛋白，主要在肝脏、脂肪和胰脏中表达，其结构与 klotho 相似，两者