

·综述·

黏着斑激酶在急性肺损伤中的研究进展

刘名倬 朱峰 郭光华

黏着斑激酶(FAK)是介导细胞外基质(ECM)与细胞之间黏附的重要调节分子,是细胞内整合素以及其他多条信号传导通路的交汇点,具有调节细胞增殖、分化与发育,介导细胞黏附和迁移,阻止细胞凋亡等生物学活性的功能,与组织纤维化和炎症的发生发展有密切联系,在多种疾病的发生发展中起关键作用,在肺组织损伤修复过程中亦具有重要作用。本文就 FAK 在急性肺损伤(ALI)中的研究进展加以综述。

1 FAK

1.1 FAK 的结构:FAK 因与细胞黏附关系密切,故命名为黏着斑激酶。它是存在于细胞内并广泛表达的非受体酪氨酸激酶(NRPTKs),相对分子质量 125 000。FAK 包括 N- 端非催化区、中央激酶催化区和 C- 端非催化区 3 个功能区,每个区域包含约 400 个氨基酸。①N- 端非催化区含有与整合素 β 亚单位、表皮生长因子受体 2(EGFR - 2)以及血小板衍生生长因子受体(PDGFR)等受体结合的埃兹蛋白 - 根蛋白 - 膜突蛋白(FERM)同源区结构域,采用荧光能量共振转移的方法证实该结构域可通过其内的多元 KAKTLR 序列直接与激酶区相互作用^[1]。该区域的 Tyr397 是 FAK 中最主要的自主磷酸化位点,可结合含 SH2(Src Homology 2)和 SH3 结构域的多种蛋白质分子,如 Tyr397 磷酸化后募集 Src,可导致 Tyr576 磷酸化并通过 p190RhoGAP 调节 RhoA 信号途径。②中央激酶催化区是高度保守的氨基酸残基区域,可以使如 Crk 相关的酪氨酸激酶底物(CAS)、促癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src 和磷脂酰肌醇 3- 羟基激酶(PI3K)等相应蛋白质的酪氨酸残基磷酸化。该区域的 Tyr576、Tyr577 依赖 Src 家族的磷酸化,调节激酶活性,并在 Tyr397 后磷酸化^[2-3],同时在该区和 N- 端之间有一可结合 SH3 结构域的 Pro1^[4]。③C- 端非催化区含有黏着斑靶向序列(FAT)以及 2 个位于 FAT 与激酶区之间的富含脯氨酸的富集区 Pro2 和 Pro3,其中 Pro2 主要介导并结合含有 SH3 结构域的衔接蛋白 P130cas(V-Crk-associated tyrosine kinase substrate);而 Pro3 则主要介导并结合黏着斑激酶鸟苷三磷酸酶调节因子 /Arf 鸟苷三磷酸酶激活蛋白(GRAF /ASAP)。FAK 可通过 FAT 结构域结合踝蛋白(Talin)、桩蛋白(Paxillin)、黏着斑蛋白(FAP)。FAT 结构域还可以直接作用于 Rho - 家族 G 蛋白激酶,介导其磷酸化。与 N- 端区酶活性调节作用相类似,C- 端区还可能负向调节 FAK 激酶活性^[5];该区域磷酸化的 Tyr925 可与接头蛋白 Grb2(Growth

receptor boundprotein 2) 结合,调节丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)^[6]。通过质谱分析 FAK 显示,不仅有酪氨酸磷酸化位点可被激活,而且丝氨酸和苏氨酸也参与其中^[7]。

1.2 FAK 的主要生物功能

1.2.1 调节细胞发育:因 FAK 含有与各种生长因子受体结合的 FERM,所以 FAK 在细胞发育过程中具有重要的作用。Shen 等^[8]通过敲除 FAK 基因发现,小鼠出现以心血管系统缺陷和中胚层轴面缺陷为主要缺陷的胚胎致死性突变。王华等^[9]根据大鼠肺发育过程中 FAK 规律性的变化推测,FAK 在肺发育过程中发挥重要作用,认为它可能与毛细血管网、呼吸管腔和气管上皮发育的形成密切相关,并参与肺泡上皮细胞的增殖与分化。

1.2.2 介导细胞在 ECM 的黏附和迁移:Jeong 和 Kim^[10]敲除小鼠 FAK 基因后发现,体外的成纤维细胞迁移能力下降明显,而 FAK Y397 磷酸化位点是介导细胞迁移的关键部位,这可能与细胞外信号调节激酶(ERK)途径活化和 PI3K 激酶活化有关。此外,温进坤等^[11]通过对大鼠血管新生内膜的实验研究证实了整合素 β 3-FAK 是介导细胞在 ECM 中迁移和黏附的重要途径,其活性与血管平滑肌细胞的迁移呈正相关。整合素 β 3 先通过与 ECM 成分的相互作用,再与胞内 FAK 联系,募集黏着斑(FA)上的信号分子,依次活化细胞骨架蛋白,最终引发细胞收缩和迁移。许丽等^[12]以反义 FAK 寡核苷酸(ODNs)经脂质体转染细胞,观察了其对照内 FAK 表达、磷酸化和对细胞黏附、迁移的影响,证实 FAK 是 ECM 诱导气道上皮细胞黏附、迁移的重要信号分子,其活化促进了气道上皮细胞的黏附和迁移,在气道上皮细胞损伤后修复过程中起重要作用。Long 等^[13]研究证实介导上皮生长因子受体和 FAK 的 Src-384 可促进 FAK 和 c-Src 的磷酸化,进而促进细胞迁移。

1.2.3 调节细胞增殖:几乎所有组织细胞的增殖都有 FAK 的参与,如肺上皮细胞、造骨细胞等。Lin 等^[14]实验证明 FAK 通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抑制人肺动脉平滑肌细胞凋亡,通过 c-Jun 氨基末端激酶 - 细胞周期依赖性蛋白激酶 2(JNK-CDK2)信号途径促进其增殖。气道上皮细胞在受到破坏后会通过整合素家族和 JNK 的激活,随着包含多种 ECM 的基底膜迁移。Bijian 等^[15]对肾小球的研究证实,ECM 与整合素结合后,在生长因子的作用下可激活 FAK,通过 PI3K 或 MAPK 活化促进细胞增殖。Tavora 等^[16]对肿瘤新生血管的研究发现,小鼠体内 FAK 的敲除减少了血管内皮生长因子(VEGF)诱导的新生血管生成,同时体外实验也发现,在 FAK 敲除并且离体的 ECM 中,用 VEGF 诱导的 Akt 磷酸化减弱,细胞增殖减弱,凋亡增加。

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.08.017

基金项目:国家自然科学基金(30960400)

作者单位:330006 江西,南昌大学第一附属医院烧伤科(刘名倬、郭光华),重症医学科(朱峰)

通信作者:郭光华,Email:guogh2000@hotmail.com

1.2.4 阻止细胞凋亡:所有细胞都需要黏附于ECM才能存活,一旦与ECM分离就会发生不同程度的凋亡。对于黏附于ECM的细胞来说,FAK磷酸化的增加是抑制细胞凋亡的关键因素^[40]。可见FAK的持续表达是抑制细胞凋亡的重要环节之一。FAK作为caspase-3的底物,可通过激活PI3K以及伴随而来的核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路和诱导凋亡蛋白抑制剂的合成,最终通过抑制caspase-3级联放大反应并将凋亡蛋白水解,抑制细胞凋亡^[17]。Boosani等^[18]使用FAK抑制剂发现内皮细胞caspase-3活性增加,继而FA崩解,最后导致细胞凋亡增加。Ahn和Park^[19]研究发现,X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)敲除的内皮细胞在剪切应力的作用下,FAK在Y576的磷酸化减少,使得FAK向细胞核转位,引起FAK与Src的空间分隔,ERK的激活减少,最终促进了细胞凋亡。

1.2.5 与纤维化的关系:大量研究表明,FAK磷酸化可促进肝、肺、血管及心脏等器官的纤维化,但有报道称心肌细胞中持续性、限制性失活或选择性敲除心室肌细胞中的FAK,也可促使心肌纤维化。其原因主要与FAK基因敲除时间的长短、主动脉的压迫程度和实验动物的遗传背景不同有关^[20]。

1.2.6 与肺水肿和炎症的关系:Yuan等^[21]研究表明,内皮细胞中的FAK在中性粒细胞的聚集过程中被激活,通过细胞内复杂的级联放大反应改变内皮骨架和黏附连接,进而促进炎症因子的释放和内皮细胞间隙的增大,产生液体外漏。

2 FAK与ALI

正常肺内皮系统通过对液体、离子和蛋白的选择性调节来保持肺血管内外平衡^[22]。ALI重要特征之一是因失控的炎症反应和紧随的肺内皮屏障毁损带来的内皮通透性增加而导致的致命性肺水肿^[23-24]。有证据表明,ALI时内皮细胞对机械和炎症刺激的反应由作为位置特异性磷酸化的FA介导,而FAP特异性的相互作用与内皮细胞屏障功能变化相关^[25]。FAP的相互作用均由FAK通过磷酸化FA衔接蛋白-桩蛋白来调节。

有学者证实FAK与蛋白激酶C δ (PKC δ)和p190RhoGAP的相互影响是通过抑制小GTP酶Rho活性以维持细胞黏附,而小GTP酶Rho能分解黏附连接,说明FAK在肺细胞黏附及内皮屏障中具有非常重要的作用^[26]。其中1-磷酸鞘氨醇(S1P)途径通过肌动蛋白和连接蛋白的重组加强内皮屏障,而FAK作为S1P的效应蛋白,诱导肌动蛋白重排,对于稳定黏附连接保障血管内皮屏障功能起到了重要作用^[27]。Zhao等^[28]通过观察敲除FAK基因的内皮细胞发现,内皮屏障完整性受到破坏,血管内皮钙黏着蛋白异常分布,且在Y658的磷酸化减少。Zhao等^[29]通过对小干扰RNA(siRNA)调控抑制FAK的表达发现,S1P诱导的内皮屏障加强作用减弱。这些研究结果均说明FAK对屏障完整性的维持有重要作用。

可是进一步的证据揭示了在活性氧簇(ROS)诱导的ALI中FAK对内皮细胞有损害作用^[30]。用H₂O₂处理的内皮细胞的通透性显著升高,并伴有FAK表达以及Tyr397磷酸化的增加;而H₂O₂诱导的屏障功能毁损在转染有FAK相关的非激酶细胞中却明显减轻。在这些细胞中,FAK活化的下游效

应也随之减轻,包括 β -联蛋白和桩蛋白的磷酸化^[30-31]。这些发现表明,ALI的血管通透性增加可以通过以抑制FAK表达为目标的治疗策略来缓解。

Petroni等^[32]在用脂多糖(LPS)诱导的ALI模型中,采用调控siRNA使FAK表达沉默,减少了肺中胶原蛋白的沉积,并且第一次证明了Toll样受体的刺激与FAK有关。另外,Pyk2作为FAK家族中的一员,Duan等^[33]将其抑制剂TAT-Pyk2-CT用于气管滴入LPS诱导的ALI大鼠模型中,发现该抑制剂减少了中性粒细胞的肺内浸润。也有学者使用人工合成的肽片段精-甘-天冬-丝氨酸(RGDS)发现,通过抑制整合素信号途径和MAPK途径可以减轻LPS诱导的大鼠肺部炎症反应,减少支气管肺泡灌洗液(BALF)中促炎因子的含量,并证实了 α v整合素是RGDS特异靶点^[34]。

Desai等^[35]证明,周期性的机械牵拉损伤可以抑制FAK磷酸化,而减少细胞迁移和黏附,这从一个新的角度说明机械通气的治疗作用。但同时结合上述作者关于FAK对维持内皮屏障具有保护作用的实验结论^[26-29]又有了新的疑问:抑制FAK的磷酸化,细胞与ECM的黏附减少,使得ECM与内皮细胞间隙增大,更有利于液体渗漏,从而加重了肺水肿;并且FAK有促进肺动脉增殖的作用,对于减少渗漏具有一定作用。这与当前“实验研究应用FAK抑制剂治疗ALI具有良好的效果”有所矛盾。笔者推测:可能与FAK抑制剂抑制炎症反应的作用更强烈有关;或者是与研究对象(如细胞、大体动物等)不同有关;也可能是FAK在内皮细胞屏障中承担不同的功能,或者是因为这些功能又是由不同信号途径和其他酶调节引起的有关。

3 展望

目前针对ALI的治疗主要有机械通气、吸入一氧化氮(iNO)、激素、干细胞以及肺移植等手段^[36];而FAK在ALI产生的炎症反应和肺水肿中具有关键的调节作用,目前关于其抑制剂在实验中已证实具有显著的抗炎、抗肺水肿作用。然而,也应当注意到,FAK在内皮通透性中的作用还未完全阐明,而且有证据显示,FAK表达的降低与激动剂诱导的内皮屏障毁损增加以及体外屏障修复延长显著相关。因此,在对ALI的干预中,抑制FAK的潜在作用可能最终还是取决于抑制的程度和时机。但是,FAK作为多个信号途径的交叉点,在ALI未来的研究及相关临床应用中具有广阔的前景,值得进一步关注。

参考文献

- [1] Papusheva E, Mello de Queiroz F, Dalous J, et al. Dynamic conformational changes in the FERM domain of FAK are involved in focal-adhesion behavior during cell spreading and motility. *J Cell Sci*, 2009, 122: 656-666.
- [2] Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, et al. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem*, 2006, 99: 35-52.
- [3] Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, et al. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 2003, 8: d982-996.
- [4] Medley QG, Buchbinder EG, Tachibana K, et al. Signaling between focal adhesion kinase and trio. *J Biol Chem*, 2003, 278: 13265-

- 13270.
- [5] Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1692: 77-102.
- [6] Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 5623-5633.
- [7] Ciccimaro E, Hevko J, Blair IA. Analysis of phosphorylation sites on focal adhesion kinase using nanospray liquid chromatography/multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 3681-3692.
- [8] Shen TL, Park AY, Alcaraz A, et al. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *J Cell Biol*, 2005, 169: 941-952.
- [9] 王华, 常立文, 李文斌, 等. 大鼠肺发育过程中黏着斑激酶表达变化. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34: 703-706.
- [10] Jeong HW, Kim IS. TGF- β 1 enhances beta1g-h3-mediated keratinocyte cell migration through the alpha3beta1 integrin and PI3K. *J Cell Biochem*, 2004, 92: 770-780.
- [11] 温进坤, 韩梅, 程云会, 等. 整合素 β 3-黏着斑激酶信号途径的活化参与大鼠血管新生内膜的. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 1922-1925.
- [12] 许丽, 汪涛, 张珍祥, 等. 黏着斑激酶活性对气道上皮细胞黏附迁移的影响. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34: 297-300.
- [13] Long W, Yi P, Amazit L, et al. SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell*, 2010, 37: 321-332.
- [14] Lin CL, Zhang ZX, Xu YJ, et al. Focal adhesion kinase antisense oligodeoxynucleotides inhibit human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation and promote human pulmonary artery smooth muscle cells apoptosis. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118: 20-26.
- [15] Bijian K, Takano T, Papillon J, et al. Extracellular matrix regulates glomerular epithelial cell survival and proliferation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286: F255-266.
- [16] Tavora B, Batista S, Reynolds LE, et al. Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. *EMBO Mol Med*, 2010, 2: 516-528.
- [17] Hui AY, Meens JA, Schick C, et al. Src and FAK mediate cell-matrix adhesion-dependent activation of Met during transformation of breast epithelial cells. *J Cell Biochem*, 2009, 107: 1168-1181.
- [18] Boosani CS, Nalabothula N, Munugalavada V, et al. FAK and p38-MAP kinase-dependent activation of apoptosis and caspase-3 in retinal endothelial cells by alpha1 (IV)NC1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 4567-4575.
- [19] Ahn S, Park H. XIAP is essential for shear stress-enhanced Tyr-576 phosphorylation of FAK. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399: 256-261.
- [20] DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, et al. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res*, 2006, 99: 636-645.
- [21] Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, et al. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res*, 2012, 83: 82-88.
- [22] Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 2006, 86: 279-367.
- [23] 张秋金, 李银平, 黎檀实, 等. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素急性肺损伤. *中华危重病急救医学*, 2005, 17: 382-384.
- [24] 孙中吉, 卢青, 李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质. *中华危重病急救医学*, 2003, 15: 186-189.
- [25] Shikata Y, Birukov KG, Birukova AA, et al. Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling; role of Src and GIT. *FASEB J*, 2003, 17: 2240-2249.
- [26] Quadri SK. Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: role in regulating endothelial barrier function. *Microvasc Res*, 2012, 83: 3-11.
- [27] Belvitch P, Dudek SM. Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability. *Microvasc Res*, 2012, 83: 22-30.
- [28] Zhao X, Peng X, Sun S, et al. Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *J Cell Biol*, 2010, 189: 955-965.
- [29] Zhao J, Singleton PA, Brown ME, et al. Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium; role in barrier enhancement. *Cell Signal*, 2009, 21: 1945-1960.
- [30] Usatyuk PV, Natarajan V. Regulation of reactive oxygen species-induced endothelial cell-cell and cell-matrix contacts by focal adhesion kinase and adherens junction proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289: L999-1010.
- [31] Yang S, Yip R, Polena S, et al. Reactive oxygen species increased focal adhesion kinase production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Proc West Pharmacol Soc*, 2004, 47: 54-56.
- [32] Petroni RC, Teodoro WR, Guido MC, et al. Role of focal adhesion kinase in lung remodeling of endotoxemic rats. *Shock*, 2012, 37: 524-530.
- [33] Duan Y, Learoyd J, Meliton AY, et al. Inhibition of Pyk2 blocks lung inflammation and injury in a mouse model of acute lung injury. *Respir Res*, 2012, 13: 4.
- [34] Moon C, Han JR, Park HJ, et al. Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways. *Respir Res*, 2009, 10: 18.
- [35] Desai LP, White SR, Waters CM. Mechanical stretch decreases FAK phosphorylation and reduces cell migration through loss of JIP3-induced JNK phosphorylation in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297: L520-529.
- [36] 李晓华, 李福祥, 肖贞良. 严重急性呼吸窘迫综合征的治疗策略. *中华危重病急救医学*, 2013, 25: 186-189.

(收稿日期: 2013-02-28)

(本文编辑: 李银平)

欢迎订阅《中华危重病急救医学》杂志 CN 12-1430/R

2013 年《中国危重病急救医学》更名为《中华危重病急救医学》

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊 中华医学会主办

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-58 定价: 每期 14 元 全年 168 元

2013 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买, 电话: 022-23197150