

TGF- β /Smad 信号转导通路和白内障发生的研究进展

李华 综述 汤欣 审校

【摘要】 晶状体是重要的屈光间质,其透明性的维持主要依赖晶状体上皮细胞(LECs)。LECs 的正常发育、增生、分化和凋亡主要依靠细胞因子及信号转导通路等的调控,LECs 的病理状态最终导致白内障的发生。转化生长因子- β (TGF- β)是晶状体在生理及病理状态下重要的调节因子,Smad 蛋白家族是 TGF- β 在细胞内信号转导的重要因子。TGF- β /Smad 信号转导通路在诱导白内障的发生中起到重要的作用。就 TGF- β /Smad 信号转导通路参与调节晶状体病理过程的细胞生物学作用进行综述。

【关键词】 转化生长因子- β ; Smad 蛋白; 白内障

Recent advantages on TGF- β /Smad signaling transduction pathway and cataract Li Hua, Tang Xin. Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin Eye Institute, Tianjin Eye Hospital, Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Tang Xin, Email: tangprofessor@aliyun.com

【Abstract】 The crystalline lens is an important refraction tissue in the eye, and its transparency mainly relies on the lens epithelial cells (LECs). The normal development, proliferation, differentiation and apoptosis of LECs are mainly regulated by cytokine and signal transduction pathways, the pathological change may lead to cataract. Transforming growth factor- β (TGF- β) is recognized by the important regulator factor of physiological and pathological conditions in lens. Smad proteins family are important factors of TGF- β signaling transduction. TGF- β /Smad signalling pathway plays an important role in the induction of cataract. This article reviewed the participation of TGF- β /Smad in the regulation of the key cellular processes leading to lens pathology.

【Key words】 Transforming growth factor- β ; Smad proteins; Cataract

晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)在维持晶状体透明性和内环境的稳定上起着重要作用。先天因素、紫外线、外伤、手术刺激等引起 LECs 的异常增生、凋亡,LECs 从上皮样外观向成纤维细胞样转变,即上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[1],常引起晶状体囊膜皱缩而失去透明性。LECs 的正常发育、增生、分化和凋亡主要依靠细胞因子及其介导的细胞信号转导等的调控。正常情况下,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)可调节晶状体囊膜蛋白的产生,在病理状态时大量合成和分泌,调节细胞的移行、增生、凋亡和组织修复等^[2],在诱导白内障的形成过程中发挥重要作用。TGF- β 主要通过 Smad 蛋白进行细胞内信号转导,调节不同 Smad 蛋白表达可以影响 TGF- β 的作用。就 TGF- β /Smad 信号转导通路在 LECs 生理、病理过程中作用的研究进展进行综述。

1 TGF- β /Smad 信号转导通路

TGF 超家族成员包括 TGF- β 、活化素、骨形成蛋白(bone

morphogenic proteins, BMPs)等,其主要生物学作用有调节细胞迁移、增生、凋亡,促进细胞外基质合成和组织修复,调节细胞分化以及发育等^[3]。TGF- β 包括 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 、TGF- β_4 和 TGF- β_5 ,其中 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 在房水、LECs 中均有表达,但主要成分及活性最强的是 TGF- β_2 ^[4]。TGF- β 可诱导结缔组织生长因子、成纤维细胞生长因子的合成,还可诱导自身增加。正常情况在房水中 TGF- β 主要以无活性形式存在,病理状态可影响血-房水屏障的功能,从而激活 TGF- β 发挥作用。LECs 同时表达 TGF- β 受体 I (TGF- β receptor I, T β R I) 和 T β R II,其跨膜区含丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶结构域,具有细胞信号转导所必需的 Ser/Thr 蛋白激酶活性^[5]。

Smad 蛋白是 T β R 作用的直接底物,是将信号由细胞质传递至细胞核的重要中介^[6]。Smad 蛋白根据功能的不同可分为三类:(1)受体调节型 Smads (receptor-activated Smads, R-Smads)^[7],包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8,可被活化的 T β R I 识别,是 T β R 复合物下游作用的靶分子,其中参与 TGF- β 信号转导的是 Smad2 和 Smad3,Smad1、Smad5 和 Smad8 则主要通过 BMPs 受体磷酸化,介导 BMP-7 信号转导。(2)共同通路型 Smads (common-mediator Smads, Co-Smads),主要是 Smad4,其功能是与磷酸化的 R-Smads 形成复合物,并共同转运至细胞核^[8]。(3)抑制型 Smads (inhibitory Smads, I-Smads)^[9],主要包括 Smad6 和 Smad7,对 TGF- β 信号转导起负调控作用,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.018

基金项目:国家自然科学基金项目(81270984)

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院
天津市眼科研究所 天津市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者:汤欣,Email:tangprofessor@aliyun.com

阻断信号通路。

TGF- β 首先与细胞膜表面的 2 个 T β R II 结合,与 T β R I 结合并磷酸化而活化。活化的 T β R 通过激活 R-Smads,并与 Co-Smads 结合形成复合物转入细胞核内,激活的复合物和 DNA 结合辅助因子结合,启动细胞内信号级联反应,使信号在细胞内逐级传递直至转位细胞核内,调控目的基因表达^[10]。I-Smads 在 TGF- β 作用下由细胞核转位至细胞质,可与 R-Smads 竞争 T β R,从而发挥对 TGF- β 的负调控作用。

2 TGF- β /Smad 通路与白内障

在生理条件下,TGF 参与调节 LECs 细胞外基质的合成,在调节层黏连蛋白、IV 型胶原、蛋白多糖等的表达中起重要作用^[11]。外伤、手术刺激、眼内炎症等因素影响导致房水中大量合成和分泌 TGF- β 并被激活,引起晶状体前囊膜下混浊^[12],促使 LECs 在损伤修复过程中诱导 EMT,引起后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO)^[13]。三类 Smad 蛋白在白内障形成中发挥的作用不同,并且彼此间相互作用。

2.1 TGF- β 与白内障

TGF- β 的表达变化能够干扰正常晶状体结构,诱导 LECs 发生异常的生长和分化^[14],并发生凋亡,导致晶状体发生前囊膜下混浊。Yao 等^[15] 研究发现低质量浓度 (10 pg/ml) TGF- β_2 即可呈现抑制 LECs 增生作用,但只有高质量浓度 TGF- β_2 (100 pg/ml) 才能诱导细胞凋亡。进一步实验证明,TGF- β_2 参与了 LECs 氧化损伤过程,高质量浓度 TGF- β_2 上调了 LECs 中活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的表达,使细胞内还原型谷胱甘肽减少,诱导 LECs 的凋亡。应用 ROS 清除剂能够完全阻断这一过程,说明 ROS 参与了 TGF- β_2 诱导的细胞凋亡过程。

Wormstone 等^[16] 对白内障术后发生 PCO 的囊袋进行检测,发现内源性 TGF- β_2 活性增高,并通过 Smad 信号通路参与了白内障术后 LECs 纤维化的过程。体外培养人 LECs 给予外源性 TGF- β_2 刺激后也导致 EMT 发生,给予 TGF- β_2 单克隆抗体孵育后,TGF- β_2 的作用受到阻断,PCO 的发生和发展也受到抑制^[17]。Saika 等^[18] 检测表明,白内障术后囊膜愈合过程中有 TGF- β /Smad 信号转导通路参与,在未损伤 LECs 细胞质中可见 Smad3/4 复合物,在受损 LECs 修复过程中却发现 Smad3/4 位于细胞核,而使用 TGF- β 抗体可以阻断 Smad 蛋白的活化。证明了内源性 TGF- β 信号转导过程有 Smad 蛋白参与其中,在白内障术后创伤修复中参与了调节 LECs 的行为。

2.2 R-Smads 与白内障

TGF- β 激活 Smad3 信号路径促进白内障的发生^[19]。Robertson 等^[20] 利用腺病毒重组体将 TGF- β_1 注射入野生型小鼠的前房内,导致前囊下白内障的发生,而敲除 Smad3 基因小鼠可延缓白内障的发生。Shirai 等^[21] 将鼠角膜局部碱烧伤诱导前囊下白内障敲除小鼠 Smad3 基因可减弱但并未完全遏制 EMT 的发生。推测可能与碱烧伤后前房炎症使 TGF 持续表达及水平升高,绕过被干扰的 Smad3 通路而通过 Smad2 通路启动 EMT 的发生有关,持续前房炎症导致 Smad2/3 活化的时间明显延长,进一步验证了这一推断。

Smad2 和 Smad3 是发生 PCO 的重要媒介,其中 Smad2 在 EMT 中介导 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的表达^[22],而 Smad3 参与 EMT 主要转录因子的表达。Smad3 是 TGF- β 信号转导通路的下游关键因子,于外伤后迅速被激活,抑制 Smad3 有利于阻止外伤后晶状体囊的纤维化^[23]。Saika 等^[24] 研究表明,敲除 Smad3 可以延缓小鼠 LECs 极性的丧失,抑制 EMT,减少细胞外基质 I 型胶原的表达,从而削弱 LECs 的纤维化程度。Snail 是 EMT 中重要的转录因子^[25],Smad3 在 LECs 受损后使核内 Snail 表达上调,说明 Smad3 在 EMT 中起关键作用。

Li 等^[26] 研究显示,沉默 Smad2 基因抑制了 TGF- β_2 介导的细胞迁移能力和 α -SMA 产生的调节,并加强 Smad3 的活性;沉默 Smad3 基因阻碍了细胞增生及细胞外基质的沉积,并增强 Smad2 在细胞迁移中的作用;同时沉默 Smad2 和 Smad3 方可抑制 TGF- β_2 介导的 PCO 的形成,说明 Smad2、Smad3 各自发挥不同的作用,并同时相互作用,共同影响 PCO 的发生。

BMP-7 激活 T β R I 作用于 Smad1、Smad5 和 Smad8,与 Smad4 结合形成有活性的转录复合物,进入细胞核内,发挥相应的生物学效应。Saika 等^[27] 通过腺病毒载体使 BMP-7 在损伤的小鼠晶状体囊膜高表达,使 Smad1/5/8 磷酸化而活化,抑制 Smad2 磷酸化,部分拮抗 TGF/Smad 通路。BMP-7 可拮抗 TGF- β 的致纤维化效应,减少 TGF- β 诱导的 IV 型胶原的产生。实验证明 BMP-7 通过维持上皮细胞表型,逆转 EMT,促进 ECM 降解,影响 TGF- β /Smad 转导途径,对 PCO 起到预防及逆转作用。

2.3 Co-Smads 与白内障

胚胎时期 Smad4 广泛分布于晶状体囊泡、角膜外胚层细胞质内,随着胚胎发育,Smad4 逐渐向 LECs、角膜上皮、基质及内膜细胞核内转位。基因敲除 Smad4 小鼠导致眼前段发育不良以及白内障的发生^[28],Smad4 失活抑制细胞生长以及诱导的细胞凋亡可能是白内障发生的主要原因。此外,Smad4 还可通过抑制 α A-晶状体蛋白调控晶状体的分化。

Smad4 在对 LECs 增生、凋亡及调节细胞周期中具有重要作用。研究证明人 LECs 存在 Smad4,TGF- β_2 可促进其由细胞质转位至细胞核内,与凋亡基因启动子结合引起细胞凋亡。Cao 等^[29] 研究发现,H₂O₂ 诱导 LECs 细胞核内 Smad4 的积聚,上调 T β R 和凋亡基因的表达。H₂O₂ 与 TGF- β_2 单克隆抗体共孵育 LECs 后,细胞凋亡受阻,证明 TGF- β /Smad 途径参与了氧化损伤时 LECs 生长抑制过程。此外,Smad4 通过对细胞周期蛋白及 c-myc 的表达进行调控,使细胞周期停滞于 G₁/S 期^[30]。

Smad4 是 TGF- β 信号转导必需的中转分子。Dawes 等^[31] 在人 LECs 中使用 RNA 干扰技术敲除 Smad4 基因,削弱了 TGF- β_2 诱导的 Smad4 的核转位,而不影响 Smad2/3 的核转位,且 Smad7 表达不受影响;采用半定量 PCR 法分析敲除 Smad4 基因可减少 α -SMA 和纤维连接蛋白的表达,但对抑制 PCO 纤维膜基质收缩并无明显作用,实验结果表明敲除 Smad4 基因能有效减少 Smad4 基因的表达,部分阻断 TGF- β 信号转导通路,抑制 EMT 并减少细胞外基质的产生,从而延缓 PCO 的发展。

2.4 I-Smads 与白内障

Smad7 蛋白是 TGF- β /Smad 信号转导通路中的抑制性调控蛋白,对 TGF- β 信号转导途径起负性调控作用。通过腺病毒载体将外源性 Smad7 基因转入晶状体后,免疫组织化学法检查发现小鼠 LECs 细胞核内 Smad2 和 Smad3 减少,EMT 相关标志物表达降低,并抑制了晶状体前囊膜创伤处纤维化^[32]。

3 小结

TGF- β /Smad 信号转导系统在晶状体前囊下白内障和 PCO 中起着至关重要的作用,在分子及基因水平作用于信号通路的关键靶点是抑制白内障发生的关键。研究者应在充分研究 TGF- β /Smad 信号转导通路的基础上,建立调控白内障形成的信号转导网络,从而找到预防与治疗白内障的最佳靶位。

参考文献

- Martinez G, de Iongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(12): 1945-1963. doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.012.
- Wang Q, McAvoy JW, Lovicu FJ. Growth factor signaling in vitreous humor-induced lens fiber differentiation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(7): 3599-3610. doi:10.1167/iovs.09-4797.
- Massague J. TGFbeta in cancer[J]. *Cell*, 2008, 134(2): 215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001.
- Saika S, Yamanaka O, Okada Y, et al. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, 1: 376-390.
- Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(8): 385-394. doi: 10.1016/j.tcb.2009.05.008.
- Li Y, Wang M, Carra C, et al. Modularized Smad-regulated TGF β signaling pathway[J]. *Math Biosci*, 2012, 240(2): 187-200. doi:10.1016/j.mbs.2012.07.005.
- Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970-982. doi:10.1038/nrm2297.
- Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis[J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(1): 1-8.
- Luo L, Li N, Lv N, et al. SMAD7: a timer of tumor progression targeting TGF-beta signaling[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 8379-8385. doi: 10.1007/s13277-014-2203-7.
- Zi Z, Chapnick DA, Liu X. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(14): 1921-1928. doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.063.
- Sun CB, Teng WQ, Cui JT, et al. The effect of anti-TGF-beta2 antibody functionalized intraocular lens on lens epithelial cell migration and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 113: 33-42. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.024.
- de Iongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, et al. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation[J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 179(1-2): 43-55. doi:10.1159/000084508.
- Dewey S. Posterior capsule opacification[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2006, 17(1): 45-53. doi:10.1097/OI.icu.0000193074.24746.e6.
- Kondo T, Ishiga-Hashimoto N, Nagai H, et al. Expression of transforming growth factor beta and fibroblast growth factor 2 in the lens epithelium of Morioka cataract mice[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2014, 54(2): 104-109. doi:10.1111/cga.12042.
- Yao K, Tan J, Gu WZ, et al. Reactive oxygen species mediates the apoptosis induced by transforming growth factor beta(2) in human lens epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(1): 278-283. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.198.
- Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, et al. TGF-beta2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(7): 2301-2308.
- Wormstone IM, Tamiya S, Eldred JA, et al. Characterisation of TGF-beta2 signalling and function in a human lens cell line[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3): 705-714.
- Saika S, Okada Y, Miyamoto T, et al. Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGFbeta2 during wound repair[J]. *Exp Eye Res*, 2001, 72(6): 679-686. doi:10.1006/exer.2001.1002.
- Banh A, Deschamps PA, Gaudie J, et al. Lens-specific expression of TGF-beta induces anterior subcapsular cataract formation in the absence of Smad3[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(8): 3450-3460. doi:10.1167/iovs.05-1208.
- Robertson JV, Nathu Z, Najjar A, et al. Adenoviral gene transfer of bioactive TGFbeta1 to the rodent eye as a novel model for anterior subcapsular cataract[J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 457-469.
- Shirai K, Saika S, Tanaka T, et al. A new model of anterior subcapsular cataract: involvement of TGFbeta/Smad signaling[J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 681-691.
- Evans RA, Tian YC, Steadman R, et al. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 282(2): 90-100.
- Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response[J]. *Int J Exp Pathol*, 2004, 85(2): 47-64. doi:10.1111/j.0959-9673.2004.00377.x.
- Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, et al. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 651-663. doi:10.1016/S0002-9440(10)63153-7.
- Cho HJ, Baek KE, Saika S, et al. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(2): 337-343. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.035.
- Li J, Tang X, Chen X. Comparative effects of TGF-beta2/Smad2 and TGF-beta2/Smad3 signaling pathways on proliferation, migration, and extracellular matrix production in a human lens cell line[J]. *Exp Eye Res*, 2011, 92(3): 173-179. doi:10.1016/j.exer.2011.01.009.
- Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Adenoviral gene transfer of BMP-7, Id2, or Id3 suppresses injury-induced epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelium in mice[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(1): C282-C289. doi:10.1152/ajpcell.00306.2005.
- Liu Y, Kawai K, Khashabi S, et al. Inactivation of Smad4 leads to impaired ocular development and cataract formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(4): 476-482. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.065.
- Cao X, Li X, Hu J, et al. Hydrogen peroxide-induced cellular apoptosis is mediated by TGF-beta2 signaling pathway in cultured human lens epithelial cells[J]. *Int Ophthalmol*, 2010, 30(3): 229-237. doi:10.1007/s10792-009-9309-8.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, et al. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads[J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 226-231. doi:10.1038/nature02650.
- Dawes LJ, Elliott RM, Reddan JR, et al. Oligonucleotide microarray analysis of human lens epithelial cells: TGF β regulated gene expression[J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1181-1197.
- Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(10): 1259-1270. doi:10.1038/labinvest.3700151.

(收稿日期:2014-07-13)

(本文编辑:刘艳)