

• 综述 •

TGF- β /Smads 信号通路与胰腺纤维化

姜婷婷 许小凡 张红

【摘要】 胰腺星状细胞(PSC)是胰腺纤维化发生发展的关键细胞,转化生长因子 β (TGF- β)是促进PSC活化以及细胞外基质合成的主要因子。TGF- β /Smads信号转导通路在PSC活化、进而在胰腺纤维化形成中具有重要的作用,本文着重就TGF- β /Smads信号转导通路在胰腺纤维化中的分子机制做一综述。

【关键词】 胰腺; 纤维化; 星形细胞; 转化生长因子 β ; Smad蛋白质类

The role of TGF- β /Smads signaling pathway in the pancreatic fibrosis JIANG Ting-ting, XU Xiao-fan, ZHANG Hong. Basic Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
Corresponding author: ZHANG Hong, Email: zhangh1227@163.com

【Abstract】 Pancreatic stellate cell (PSC) is the key cell in the development of pancreatic fibrosis. As a critical promoting factor, transforming growth factor β (TGF- β) and its relative pathway TGF- β /Smads play the important role in the pancreatic fibrosis by promoting the activation of PSC and the synthesis of extracellular matrix (ECM). In this review, we focus on the molecular mechanism about TGF- β /Smads pathway in the pancreatic fibrosis.

【Key words】 Pancreas; Fibrosis; Astrocytes; Transforming growth factor beta; Smad proteins

慢性胰腺炎的病因有多种,但其病理过程基本类似。各种病理因素持续或反复作用于胰腺,可导致腺泡细胞炎性损伤、释放出多种趋化因子、诱导炎细胞在胰腺的浸润并释放多种细胞因子,从而激活胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSC)并使其转变为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)、引发细胞外基质(extracellular matrix, ECM)生成增多而降解减少,最终导致大量的ECM沉积在胰腺中造成胰腺纤维化^[1]。研究发现转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)激活PSC的过程中,Smad蛋白发挥重要作用,因此,深入研究TGF- β /Smads信号转导在胰腺纤维化中的作用具有重要意义。

一、TGF- β 及其受体

TGF- β 是一组调节细胞生长和分化的细胞因子超家族,目前已发现该家族至少有30多个成员,主要包括TGF- β 、激活素(activin)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、生长分化因子(growth differentiation factor, GDF)等^[2]。在哺乳动物至少发现有TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 1 β 2四个亚型,其中TGF- β 1较其他同分异构体更丰富地存在于哺乳动物的细胞和组织中,它对细胞的生长、分化和免疫功能具有广泛的调节作用,也是TGF- β 家族中研究最多的细胞因子^[2-4]。

TGF- β 具有广泛的生物学效应,如可以调节免疫细胞的增殖、分化、表型,抑制多数免疫活性细胞的增殖;抑制淋巴细胞的分化;对上皮或神经外胚层来源的细胞起抑制作用,而对

间充质起源的细胞起促进作用;还可抑制某些细胞因子产生等。尽管研究发现,TGF- β 参与了众多生理病理过程,但其最突出的作用是参与组织器官纤维化的发生,因此有关TGF- β 促进纤维化机制的研究也较为深入^[5-8]。

TGF- β 通过以下几方面促进纤维化的发生:(1)刺激ECM生成细胞合成大量ECM^[5-7];(2)抑制ECM降解酶的活性^[5,7];(3)促进ECM生成细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),并转化为MFB^[5,7-8];(4)通过促进整合素表达,刺激活化的星状细胞产生大量ECM^[6];(5)可与血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等细胞因子协同作用共同促进纤维化的发生^[5,8]。

TGF- β 需与特异性受体TGF- β 受体(the transforming growth factor beta receptor, T β R)结合进而发挥其生物学效应。在已知的5种TGF- β 受体中,I型受体(T β R I)和II型受体(T β R II)均为跨膜蛋白,是主要的信号传导受体。T β R I和T β R II的跨膜区含丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶结构域,具有Ser/Thr蛋白激酶活性,是细胞内信号转导所必需的^[7]。TGF- β 首先与T β R I结合,再与T β R II结合,形成稳定的复合体。T β R II在跨膜区和激酶区间有一段特殊的序列称为GS域,GS域是T β R II引起T β R I中Ser和Thr磷酸化的作用位点。当TGF- β 与T β R II-T β R I结合可刺激T β R I中的Ser/Thr位点发生磷酸化,即将TGF- β 信号由细胞外传递至细胞内。T β R III不是Ser/Thr受体家族成员,它分为膜结合型和游离型。膜结合型T β R III无信号转导活性,但可增加TGF- β 与T β R I的亲合力;而游离型T β R III则阻止TGF- β 与其受体结合,负向调节TGF- β 功能^[8]。最近对TGF- β 受体下游分子细胞内信号转导的研究已有了较大进展,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.24.123

基金项目:国家自然科学基金(81102725);陕西省教育厅自然科学基金(2010JK479, 11JK0692)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院基础医学院

通讯作者:张红, Email: zhangh1227@163.com

特别是 TGF- β 受体激酶的底物, Smad 蛋白作为转录因子将细胞信号传递到细胞核, 也被广泛研究。

二、Smads 蛋白家族

Smads 蛋白家族为 TGF- β 胞内信号转导分子, 已发现 Smads 蛋白家族至少有 9 个成员, 按其功能分为 3 类^[9-10]: (1) 通路限制型 Smads (pathway-restricted Smads, R-Smads), 包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8; (2) 共介导型 Smad (common-mediator Smad, Co-Smad), 即 Smad4, 其 MH1 域具有转录激活和核定位功能; (3) 抑制型 Smads (inhibitor Smads, I-Smad), 包括 Smad6 和 Smad7。当 TGF- β 与其受体 T β R II T β R 结合、使 T β R 发生磷酸化后, 可与细胞质中 R-Smads 短暂作用。R-Smads-COOH 端 MH2 域含一个特征性的 Ser-Ser-X-Ser 序列 (SSXS motif), 其 Ser 残基可被 T β R 磷酸化, 从而激活 Co-Smad。磷酸化后的 Smad2 或 Smad3 与 Smad4 结合形成异源复合体, 转位到细胞核内, 与核内转录因子作用, 调控相应基因的转录。I-Smad-COOH 端无磷酸化位点, 可通过竞争性地与活化的 T β R 牢固结合而抑制 R-Smads 的磷酸化。Smad6、Smad7 的基因受 TGF- β 调控, 但其产物又反过来抑制 TGF- β 的作用, 起负反馈调节作用。

Smads 复合物进入细胞核后, 通过 Smad3/Smad4 的 MH1 发夹 (hairpin) 样结构与靶基因启动区的特异性 Smad 结合元件 (Smads binding element, SBE) 结合, 调控下游基因转录, JunB、纤溶酶原激活物抑制因子-1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、VII型胶原蛋白、血小板源性生长因子-B 链 (PDGF-B) 及 Smad7 基因启动区均存在 SBE; 与其他转录因子如 c-Fos/Jun、TFE3、ATF2、PEBP2/CBF 等协同作用以刺激或抑制下游基因的转录。

三、TGF- β /Smads 信号通路与胰腺纤维化

1. 胰腺纤维化发生机制: 纤维化是机体由刺激因素引起损伤后的自身修复过程, 以保持组织结构的相对完整, 并行使有效功能。当刺激因素持续或反复存在时, 将导致机体修复过度甚至失控。过量的 ECM 沉积在组织内, 引起器官纤维化甚至硬化, 器官组织结构完全破坏, 最终导致功能丧失。

胰腺纤维化是慢性胰腺炎的特征病理表现。目前关于胰腺纤维化的发生尚无一致意见, 学者们也提出了多种理论试图阐明其机制。研究表明, 胰腺纤维化的进程是有害因素导致胰泡细胞炎症损伤、释放多种趋化因子、诱导炎细胞迁移至胰腺浸润并释放多种细胞因子、PSC 被活化并转变为 MFB、活化的 PSC 大量分泌以胶原纤维为主的 ECM, 最后导致 ECM 过度沉积和组织重建^[11]。目前大量研究显示 PSC 是胰腺纤维化发生发展过程中的关键细胞^[12-15], 其在胰腺纤维化过程中具有重要作用。在正常的胰腺组织中, PSC 处于静息状态, 其代谢及功能并不活跃, 不具备促纤维化作用。病理情况下, 氧化应激、炎症反应等因素刺激静息态的 PSC 发生活化, 使其不仅发生形态改变而且进入细胞周期进行增殖, 合成分泌细胞因子、趋化因子和生长因子, 如 TGF- β 、IL-1、IL-6、PDGF、结缔组织生长因子 (Connective tissue growth factor, CTGF), 这些因子又可进一步促发胰腺的炎症反应和促进 PSC 活化, 使 PSC 呈持续

激活状态。持续激活后的 PSC 胞体展开突出延长, 增殖活跃, 细胞内脂滴消失, 产生胶原等大量 ECM 成分, 表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 而后的产生标志着 PSC 转化为 MFB。MFB 具有能引起收缩的微丝样结构, 因此可迁移至组织损伤区并分泌 ECM 以修复损伤^[12], 当刺激持续存在时, ECM 的合成会超过 ECM 降解, 胰腺纤维化就会发生并且持续加重。研究发现, PSC 活化与其细胞内的信号转导通路失调有关, 从而引起 ECM 合成与降解失衡, 导致胰腺纤维化的发生。

2. TGF- β /Smads 通路失调与胰腺纤维化: 近来研究显示, TGF- β 及其受体在胰腺纤维化中发挥重要的作用。Smads 蛋白, 作为将 TGF- β 受体信号传导到细胞核的转录因子, 也被广泛关注。TGF- β /Smads 信号可能通过调节 Smads 蛋白家族各成员间的相互作用进而参与 PSC 的活化和胰腺纤维化的发生。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类重要的降解 ECM 的酶, 其活性可有效被基质金属蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 抑制。Peng 等^[16]在研究冬虫夏草菌丝体提取物对肝纤维化的影响中发现, 肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 受到四氯化碳刺激后大量表达转录因子 p-Smad3, 由 p-Smad3 组成的异源复合体进入细胞核后, 可使 HSCs 表达上调 TIMP-1 和 TIMP-2, 下调 MMP-2 和 MMP-9 的分泌, MMPs/TIMPs 比值降低, 导致 ECM 的产生与降解失衡并大量沉积, 继而导致肝纤维化的发生。Warburton 等^[17]采用 Smad3 基因敲除的小鼠进行研究, 发现 Smad3 基因敲除小鼠对纤维化具有明显的抵抗作用, 经博来霉素处理的野生型小鼠肺脏纤维坏死的面积和肺组织中的 α -SMA、CTGF、I 型与 III 型胶原纤维和 TGF- β 的表达均高于 Smad3 基因敲除的小鼠, 提示 Smad3 在组织纤维化中起促进作用。在受到损伤刺激的胰腺组织中, 过度的 TGF- β 通过磷酸化级联反应使表达在 PSC 的 T β R 磷酸化, 从而活化下游的 R-Smads 蛋白分子, 使信号在胞内逐级转导直至转入细胞核内, 上调多种目的基因表达, 最终导致组织修复过程中胶原和纤维蛋白沉积^[18]。Jun 信号能够抑制 TGF- β 基因的表达, 调节介导自分泌 TGF- β 的生物反应, 因此 Jun 信号与 TGF- β /Smads 信号可能有交叉联系。转录因子 c-Jun 是 Jun 的主要底物, 常山酮可以导致小鼠体内及体外培养的成纤维细胞合成胶原蛋白减少, 其机制与抑制 c-Jun 的活化有关^[19]。Zion 等对体外培养 PSC 和通过腹腔注射雨蛙肽制备的胰腺纤维化模型小鼠, 给予溴氯哌啶酮刺激。研究发现运用溴氯哌啶酮可抑制胰腺组织中 Smad3 蛋白磷酸化并使 c-Jun 氨基末端激酶磷酸化。通过 Western Blot 检测小鼠胰腺组织以及体外培养的 PSC 中 MMP-2 的表达。与造模组小鼠相比, 溴氯哌啶酮治疗组小鼠在雨蛙肽作用初始导致 MMP-2 表达下降, 但在溴氯哌啶酮作用 4 周后小鼠 MMP-2 的表达明显升高; 用雨蛙肽预先刺激 PSC, 与对照组相比, 溴氯哌啶酮刺激的 PSC 上调表达 MMP-2。运用天狼星红染色观察胰腺组织, 溴氯哌啶酮治疗小鼠较雨蛙肽造模小鼠, 胶原蛋白的表达显著下调。溴氯哌啶酮还可增加胰腺炎相关蛋白 1 (pancreatitis-associated protein 1, PAP-1) 的合成, 从而进一步

降低了胰腺纤维化,提示 Smad3 信号的激活与胰腺纤维化密切相关^[13]。这些不同的实验表明 Smad3 可直接影响下游 TGF- β 信号,刺激器官组织纤维化的发生。

Smad4 是 TGF- β /Smads 信号转导通路所必需的转导分子。磷酸化后的 Smad2 或 Smad3 与 Smad4 结合形成异源复合体才能进入细胞核中,调节转录活动^[20]。Meng 等^[21]采用 Smad4 基因敲除小鼠,发现在正常小鼠条件性单侧输尿管梗阻的肾纤维化模型中,Smad4 能明显增强肾脏的炎症反应,组织内可见大量的 CD45⁺ 白细胞和 F4/80⁺ 巨噬细胞浸润,并产生 IL-1, TGF- β , 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 等细胞因子,进一步促进肾脏的炎症反应。而缺失了 Smad4 的小鼠可抑制 TGF- β 诱导的肾纤维化,降低成纤维细胞内 I 型胶原的表达。进一步的研究表明,Smad4 的缺失虽不影响 Smad3 蛋白的磷酸化和核易位,但 Smad4 与 Smad3 的结合减少却影响 Smad3 介导的 COL1A2 基因启动子的活性,下调 I 型胶原的表达,减少 ECM 的来源,从而抑制纤维化反应。Bran 等^[22]在皮肤瘢痕疙瘩的研究中发现病变组织中 Smad4 的含量明显增多。纤溶酶原激活抑制因子 1 (PAI-1) 属于 ECM 的成分,受 TGF- β 调控,可调节 ECM 的胶原含量。研究发现,PAI-1 启动子上接受 TGF- β 信号的反应区中有两个相邻的 Smad 结合位点,Smad3 和 Smad4 通过结合这两个位点启动 PAI-1 的转录,从而增加 ECM 的沉积,导致纤维化^[23]。Hama 等^[24]用 30 pM TGF- β 1 刺激 PSC 30 min 后,Western 印迹分析观察发现细胞核内 Smad4 的表达明显增加,而预先 48 h 给予 100 nmol/L 血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 处理的 PSC 细胞核内 Smad4 的表达明显减少。提示 TGF- β 1 可能通过促进 Smad4 的核转位,发挥诱导 PSC 活化的作用。

Smad7 属 TGF- β /Smads 信号转导通路中的抑制型分子,可与 Smad2、Smad3 竞争结合 T β R 或 Smad4,抑制 Smad2、Smad3 的磷酸化及阻断 TGF- β 信号转位至细胞核内,因此可抑制 TGF- β 信号介导的 PSCs 激活^[25]。PSC 静止状态下 Smad7 呈现高表达,Smad3 表达较低。用不同浓度的 TGF- β 刺激新鲜分离的 PSC 并培养 24 h 后,通过 PCR 和 Western 印迹分析检测发现,随着 TGF- β 剂量的增加,PSC 逐渐活化,细胞中的 Smad7 的表达逐渐下调,Smad3 表达升高,呈浓度依赖性^[26]。Smad7 还被认为能抑制 TGF- β 介导的 TIMP-1 的过度表达,减少胶原纤维的生成和 ECM 的大量沉积,从而抑制纤维化的发生^[27]。

虽然胰腺纤维化的发病机制还没有完全明确,但目前研究认为^[1,28-29]: 损伤刺激作用胰腺可导致 PSC 活化转变为 MFB,继而产生大量细胞外基质。PSC 的活化受到细胞内信号通路调节,作为最强的促纤维化细胞因子,TGF- β 及其下游的 Smads 蛋白在胰腺纤维化进展中的作用逐渐受到重视,深入研究 TGF- β /Smads 信号通路在 PSC 活化中的作用机制,不仅有助于进一步阐明胰腺纤维化的发病机制,也可为临床治疗慢性胰腺炎提供关键靶标。

参 考 文 献

- [1] Shimizu K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*, 2008, 43: 823-832.
- [2] Weiss A, Attisano L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2013, 2: 47-63.
- [3] Mantel PY, Schmidt-Weber CB. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance//Suppression and Regulation of Immune Responses. Humana Press, 2011: 303-338.
- [4] Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 2011, 121: 233-251.
- [5] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011, 51: 600-606.
- [6] Ozaki I, Hamajima H, Matsubashi S, et al. Regulation of TGF- β 1-induced pro-apoptotic signaling by growth factor receptors and extracellular matrix receptor integrins in the liver. *Frontiers in Physiology*, 2011.
- [7] Kamato D, Burch M, Piva TJ, et al. Transforming growth factor- β signalling: Role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cellular Signalling*, 2013.
- [8] Colwell AS, Krummel TM, Longaker MT, et al. Fetal and Adult Fibroblasts Have Similar TGF- β -Mediated, Smad-Dependent Signaling Pathways. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006, 117: 2277-2283.
- [9] Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Research*, 2008, 19: 36-46.
- [10] Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGF β signaling. *Cell and Tissue Research*, 2012, 347: 21-36.
- [11] Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, et al. Chronic pancreatitis. *The Lancet*, 2011, 377: 1184-1197.
- [12] Phillips P. Pancreatic stellate cells and fibrosis. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*, 2012: 29-53.
- [13] Zion O, Genin O, Kawada N, et al. Inhibition of Transforming Growth Factor [beta] Signaling by Halofuginone as a Modality for Pancreas Fibrosis Prevention. *Pancreas*, 2009, 38: 427-435.
- [14] Masamune A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells-Multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatology*, 2013, 13: 102-105.
- [15] Apte M, Pirola R, Wilson J. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15: 2711-2722.
- [16] Peng J, Li X, Feng Q, et al. Anti-fibrotic effect of Cordyceps sinensis polysaccharide: Inhibiting HSC activation, TGF- β 1/Smad signalling, MMPs and TIMPs. *Experimental Biology and Medicine*, 2013, 238: 668-677.
- [17] Warburton D, Shi W, Xu B. TGF- β -Smad3 signaling in emphysema and pulmonary fibrosis: an epigenetic aberration of normal development? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2013, 304: L83-L85.
- [18] Menke A, Adler G. TGF β -induced fibrogenesis of the pancreas. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2002, 31: 41-46.
- [19] McGaha TL, Kodera T, Spiera H, et al. Halofuginone inhibition of COL1A2 promoter activity via a c-JunYdependent mechanism. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 2748-2761.
- [20] Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *Journal of Gastroenterology*, 2009, 44: 249-260.
- [21] Meng XM, Huang XR, Xiao J, et al. Disruption of Smad4 impairs TGF- β /Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis *in vivo* and *in vitro*. *Kidney International*, 2011, 81: 266-279.
- [22] Bran GM, Sommer UJ, Goessler UR, et al. TGF- β 1 antisense impacts the SMAD signalling system in fibroblasts from keloid scars. *Anticancer Research*, 2010, 30: 3459-3463.
- [23] Chen JP, Fan XM, Zhan XQ, et al. Effect of Budesonide on Smad4,

PDGF-A and PAI-1 in a rat model of pulmonary fibrosis. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2012, 28: 478.

[24] Hama K, Ohnishi H, Aoki H, et al. Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 340: 742-750.

[25] Lan HY, Chung ACK. Transforming growth factor- β and Smads. Contrib Nephrol, 2011, 170:75-82.

[26] Qian ZY, Peng Q, Zhang ZW, et al. Roles of Smad3 and Smad7 in rat pancreatic stellate cells activated by transforming growth factor-beta 1. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9: 531-536.

[27] Yan X, Chen Y. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling. Biochem J, 2011, 434: 1-10.

[28] 陈碧君, 孙子林, 李凤飞, 等. 胰腺星状细胞活化相关的信号转导通路. 生命科学, 2012, 24:583-587.

[29] Means AL. Pancreatic stellate cells: small cells with a big role in tissue homeostasis. Laboratory Investigation, 2013, 93: 4-7.

(收稿日期: 2013-12-02)

(本文编辑: 戚红丹)

姜婷婷, 许小凡, 张红. TGF- β /Smads 信号通路与胰腺纤维化 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (24): 11619-11622.

