

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001622

转化生长因子 β 及骨形成蛋白通路调节肺动脉血管平滑肌细胞异常增殖

任周新¹, 李建生¹, 余海滨², 梅晓峰¹, 刘学芳¹, 沈俊岭²

(1. 河南中医药大学呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046;

2. 河南中医药大学第一附属医院心脏中心, 郑州 450000)

【摘要】转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族由多种细胞因子组成, 主要的配体分为 TGF- β 和骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMPs) 两类。近年来发现, TGF- β 和 BMPs 刺激调节肺血管平滑肌的增殖, 相互之间存在拮抗, 表现为 Smads 依赖和 Smads 不依赖 2 种方式; 个体基因的变异可能导致 TGF- β 和 BMPs 对肺血管平滑肌细胞增殖产生不同甚至相反的效应。本文就转化生长因子- β 及骨形成蛋白通路调节肺动脉血管平滑肌细胞异常增殖进行综述。

【关键词】肺动脉高压; 转化生长因子- β ; 骨形成蛋白; 平滑肌细胞增殖

【中图分类号】R363.2⁺1

【文献标识码】A

【收稿日期】2017-03-27

Regulation of TGF- β and BMPs signal pathways on abnormal proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells

Ren Zhouxin¹, Li Jiansheng¹, Yu Haibin², Mei Xiaofeng¹, Liu Xuefang¹, Shen Junling²

(1. Henan University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province; 2. Department of Heart Center, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】The transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily is composed of many cytokines, mainly including of TGF- β s and bone morphogenetic proteins (BMPs). Recently, antagonism effect between TGF- β s and BMPs on proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells is showed. Furthermore, individual genes variation might cause to different, even opposite effects of TGF- β s or BMPs on the proliferation. This article reviewed the regulation of TGF- β and BMPs signal pathways on abnormal proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells.

【Key words】pulmonary artery hypertension; transforming growth factor- β ; bone morphogenetic protein; proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 以肺血管阻力增加为主要特征, 临床死亡率高^[1]。肺动脉高压的形成和发展涉及复杂的细胞因子及其信号转导, 如前列腺素、血栓形成素、一氧化氮、5-羟色胺等借助于网络化的转导路径, 干预肺动脉血管的舒缩、调控血管内皮细胞和平滑肌细胞的增殖或凋亡和促进微血栓形成, 最终导致动脉内膜纤维

化、血管内皮细胞丛样增生、中膜增厚和肺微小动脉缩小, 诱导或促进肺动脉高压的形成或发展^[2-3]。对肺动脉高压患者的遗传学研究发现, 骨形成蛋白受体-2 (bone morphogenetic protein receptor type 2, BMPR2) 基因突变在家族性肺动脉高压患者中可高达 70%^[4], 在特发性肺动脉高压患者中为 10%~40%^[5]; 还发现转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族信号转导通路中某些重要分子的编码基因也可能存在变异, 这些分子包括 Smad4、Smad9、endoglin 及 activin receptor-like type 1 等^[6]; 无论是特发性肺动脉高压患者还是遗传性肺动脉高压患者, 循环血液中含有异常增高的 TGF- β 1 水平^[7]。上述研究表明, TGF- β 超家族成员及其涉及的信号通路参与肺动脉高压的疾病过程。

作者简介:任周新, Email: renzhouxin123@126.com,

研究方向: 中医药基础与应用研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号: 81473650); 国家中医临床基地业务建设第二批科研专项课题资助项目 (编号: JDZX2015156)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1534.086.html>
(2018-04-08)

1 TGF- β 超家族及其 Smads 依赖信号通路

TGF- β 超家族是一组具有相似结构的细胞因子,具有复杂而广泛的生物学功能,包括 TGF- β s、BMPs、activins、inhibins、mullerian inhibitory substance、growth/differentiation proteins、decapentaplegic gene product、nodal 等近 30 个细胞因子^[8]。TGF- β 超家族涉及的信号通路大致分为 Smad 依赖信号通路和非 Smad 依赖信号通路,主要以 Smad 依赖信号路径传递信息。完整的 Smad 依赖信号路径包括配体、膜受体、细胞质内信号转导分子(主要是 Smad 分子)和跨核膜转运信号分子。主要的配体有 TGF- β 1 和 BMPs 分子;相应的膜受体包括 I 型受体(T β R-I)、II 型受体(T β R-II)和 III 型受体(T β R-III,也称附属受体 sub-receptor,包括 Betaglycan 和 Endoglin),均属单个跨膜 α 螺旋受体^[9]。T β R-I 和 T β R-II 受体的结构分成 4 部分:信号肽、亲水性胞外区、跨膜区和富含丝氨酸/苏氨酸激酶的胞内区;T β R-III 胞内段不含激酶活性区,不直接参与信号的转导,主要调节配体与 T β R-I 或 T β R-II 的结合。在信号转导中,配体首先直接与 T β R-II 结合形成复合物,同时配体构象发生改变,被 T β R-I 识别并结合形成 T β R-II-配体-T β R-I 三聚体复合物;接着,复合物中的 T β R-I 被 T β R-II 磷酸化,磷酸化的 T β R-I 活化其底物将信号放大,并进一步向下游传递,这是受体与配体最主要的结合方式,即募集式;另外,T β R-I 和 T β R-II 同时与配体相互作用,没有先后次序关系,称为协同式^[10]。

Smads 蛋白是 T β R-I 的直接作用底物,介导配体与受体作用的信号从细胞质传递到细胞核,激活或抑制靶基因的转录。Smads 家族从结构和功能上分为 3 个亚族:受体调节的 Smads(receptor-regulated Smads,R-Smads)、共同通路型 Smads(common-partner Smads,Co-Smads)和抑制性 Smads(inhibitory Smads,I-Smads)^[11]。R-Smads 有 Smad 1、2、3、5、8 五个成员,被 T β R-I 激酶磷酸化后与 Co-Smads 结合形成复合物,进入核内调节特定基因的表达;其中 Smad 1、5、8 主要被 BMPR 磷酸化激活,介导 BMP 的生物效应,Smad 2、3 被 T β R 磷酸化激活,介导 TGF- β 的效应。Co-Smads 包括 Smad 4 和 Meden,是 TGF- β 和 BMP 介导通路共享的信号分子;Smad 4 羧基端不含 SSXS 结构,不能被磷酸化,不特异性介导信号传导,能够与磷酸化后的 R-Smad 结合,转导信号。I-Smads 包括 Smad 6、7,可直接与活化的 T β R-Smads/Co-Smads 复合物进入细胞核,在协同效应分子的帮助下,与效应基因位点结合,调控其表达。

2 TGF- β 或 BMP 激活对动脉血管平滑肌细胞增殖的影响

目前认为肺动脉平滑肌细胞异常增殖是肺动脉高压病理机制的关键环节,是肺动脉血管重构的重要机制。Smads

依赖的信号通路主要由配体 TGF- β 或 BMP 激活,在血管平滑肌细胞中,TGF- β 1 激活 T β R-I 的激活素受体样激酶-5(ALK5)和 T β R-II 受体而 BMP-4 激活 T β R-I 的 ALK3(也称为 BMP1 受体的一种),分别通过磷酸化 Smad2/3 或 Smad1/5/8 的 C-末端共识基序,与 Smad4 形成复合物,转位至细胞核调节不同的靶基因^[12]。活化的 Smad3 识别带有 AGAC 核心基序的多种启动子序列,涉及的 TGF- β 1 的靶基因包括纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF);BMP-4 识别分化抑制因子 dominant negative helix-loop-transcription factors 1-4(ID 1-4),其中 ID1 启动子的 Smad 结合元件(Smad binding element,BRE)是 Smad1/5 反应的特征性标志物^[13]。

血管平滑肌细胞对 TGF- β 1 的增殖反应存在争议,有研究发现 TGF- β 1 抑制血清诱导的健康人近端和远端肺动脉血管平滑肌细胞的增殖,但促进自发性肺动脉高压患者的血管平滑肌细胞的增殖^[15-16];BMPR-II 基因变异,BMP 信号通路活性降低的遗传性 PAH 患者(HPAH)的肺动脉血管平滑肌细胞对 TGF- β 1 诱导的抗增殖作用不敏感,但这些平滑肌细胞中 TGF- β 1/Smad 通路的活性没有明显的变化^[16],提示 TGF- β 1 通过其他的信号通路产生抑制增殖的作用;低氧能够诱导人远端动脉平滑肌细胞的增殖,增加 TGF- β 1 的分泌,低氧激活 MARK 途径促进细胞增殖时,也能激活 COX-2 的表达抑制细胞增殖,TGF- β 1 通过增加 COX-2 的表达,抑制低氧条件的平滑肌细胞的增殖,另外,发现 BMP-4 能够部分减少 TGF- β 1 增加 COX-2 表达的作用^[17]。与上述研究结果相反,一些研究报告支持 TGF- β 1 促进肺动脉血管平滑肌的增殖。TGF- β 1 刺激商业化的人肺动脉血管平滑肌细胞,能够诱导常规培养条件下的细胞增殖,细胞形态由收缩型转变为分泌型,类似于临床的表现,但发现过高的剂量减少了 TGF- β 1 的促增殖效应^[18];来自正常大鼠的平滑肌细胞正常培养或低氧刺激得到 TGF- β 1 促增殖类似的结果^[19]。源于自发性高张力(spontaneously hypertensive rats,SHR)大鼠主动脉平滑肌细胞的报告显示,TGF- β 1 促进静止期、收缩型 SMC 细胞的增殖,持续时间较长,具有依赖于 PDGF-AA 和不依赖于 PDGF-AA 的 2 种机制^[20]。

一些学者把这些矛盾的结果归咎于细胞来源的差异。如 Morrell^[16]报告:对于血清诱导的近端肺动脉血管平滑肌细胞增殖,TGF- β 1 对来自正常人和继发性肺动脉高压(secondary pulmonary hypertension)患者的样本产生抑制作用,但促进原发性肺动脉高压(primary pulmonary hypertension,PPH)患者样本的增殖,认为差异性的原因可能在于 PPH 细胞 BMPR-II 的变异或功能降低以及 TGF- β 超家族信号通路中信号分子表达的异常。

尽管临床研究发现,PAH 患者的血管平滑肌细胞对 BMP4 介导的 Smad1/5 信号通路的反应微弱,ID 基因转录能

力减少;BMPR-II 受体数量下调^[14-15],似乎 BMPs 信号通路的下调导致平滑肌细胞增殖。但 BMPs 体外对 PASMC 增殖的影响,也存在不同的研究结果,主要体现在抑制或没有影响。Willette 等^[21]报告 BMP-2 对人主动脉血管平滑肌细胞的增殖没有明显的影响。Yang 等^[22]报告 BMP-4 活化 PASMCs 的 Smad1、p38MAPK 和 ERK1/2 通路,但这些通路对细胞增殖产生不同的反应;Smad1 通路活化产生抗增殖作用而 p38MAPK 和 ERK1/2 通路活化产生促增殖作用,BMP-4 对细胞增殖的影响取决于这些通路的综合影响;对正常人的细胞产生抑制效果,但对于 IPAH 的细胞未表现抑制效应^[19],甚至促进 BMPR II 变异的细胞的增殖,可能在于后者的 Smad1 信号通路存在功能不足,p38MAPK 和 ERK1/2 通路活化占优势的结果,原因在于正常人和 IPAH 患者样本中基因的差异性^[23]。除了样本中基因差异可能影响结果外,也可能存在其他的影响因素,Corriere 等^[23]应用转染的方法证实 BMP-4 抑制平滑肌细胞的增殖但直接与细胞共培养却未能发现抑制作用,认为可能是实验用血清的干扰。BMPs 抑制血管平滑肌增殖得到较多报告的支持^[23-25],发现存在复杂的机制,如 BMP-2 抑制 PDGF 诱导的人主动脉 SMC 的增殖与 p21 的诱导有关^[26];BMP-4 抑制 PDGF-BB 诱导的正常人肺动脉 SMC 的增殖、减少细胞合成 Collagen-I,但却不能抑制 PDGF-BB 诱导的 IPAH 患者的肺动脉 SMC 的增殖和 Collagen-I 合成增加,这些细胞中存在 PKA 通路的变异,即 serine369 位点的 calpain-2 磷酸化^[27],提示 BMP-4 的抑制增殖作用与其抑制 PKA 介导的通路有关;应用转录组学和蛋白组学的研究方法,发现 PDGF-BB 诱导的正常肺动脉 SMC 细胞增殖中存在 PDGF 信号与 BMPR2/Smads 信号之间的串扰(crosstalk),发现 PDGF 诱导的 miR-376b 上调介导了 BMPR2 的下调,从而引发下游靶点的表达变化,促进平滑肌细胞的增殖^[28]。

上述结果提示,鉴于 TGF- β 或 BMP 介导复杂的信号转导,某些样本基因位点的变异可能导致 TGF- β 或 BMP 对血管平滑肌增殖产生不同的反应。

3 TGF- β 和 BMP 信号通路对血管平滑肌细胞增殖的相互拮抗效应

TGF- β 和 BMP 信号通路具有某些共用的信号分子,如 Smad4、6、7,调节血管平滑肌增殖。因此,某些学者提出了这 2 条通路对平滑肌细胞的增殖可能具有拮抗作用,该作用可能是 2 条通路激活不同 Smad 产生的效应的拮抗,也可能发生在 Smad 蛋白下游通路某些 DNA 结合蛋白之间的拮抗^[17]。在一些 PAH 鼠类模型中,观察到 TGF- β 1 信号的亢进和 BMP 信号低下^[29-30];临床自发性 PAH 患者 BMPR II 变异而高分泌的 TGF- β 1 水平,都进一步提示在肺动脉 SMC 细胞中这 2 种信号之间可能存在相互的作用和影响。Upton 等^[31]报道,来自非 PAH 或遗传性 PAH (heritable PAH, HPAH) 并伴随 BMPR II 患者的外周血管的 HPAH,单独应用 BMP-4 增加细胞表达

ID1 和 ID2,而 TGF- β 1 增加 PAI-1 和 CTGF 表达;同时加入两者,随着 TGF- β 1 剂量的增加,ID1 和 ID2 的转录减少;TGF- β 1 的抑制作用由 ALK-5 和 Smad3 介导但独立于 Smad3 的 C-末端的磷酸化,认为 TGF- β 1 和 BMPs 对 Smad 信号通路的激活的相互拮抗影响血管平滑肌细胞的增殖。另外的研究则发现,BMPR-II 基因变异、BMP 信号通路活性降低的遗传性 PAH 患者 (HPAH) 的肺动脉血管平滑肌细胞中 TGF- β 1/Smad 通路的活性没有明显的变化,可能由于某些基因位点的变异,TGF- β 1 产生抑制增殖的作用而 BMP-4 显示出促进增殖的效果,两者的效应也相互拮抗,但与 Smad 通道无关,表现在 Cox-2 表达调节的拮抗^[16-17]。这些结果提示 TGF- β 和 BMP 信号通路导致的血管平滑肌细胞增殖的拮抗关系可能有依赖 Smad 和不依赖 Smad 通路等多种机制。BMPR II 基因不同位点的变异可能对 TGF- β 和 BMPs 的调控作用产生重要的影响。

4 展 望

尽管已经发现 TGF 超家族所涉及的信号通路在肺动脉平滑肌细胞增殖具有重要的影响,但考虑到无论是 TGF- β 还是 BMPs 介导复杂的信号通路,产生复杂甚至是相反的效应;这些通路相互促进或抑制的结果决定配体对平滑肌增殖的效应,而某些个体的特殊位点基因突变也可能反转 TGF- β 或 BMPs 效应。这些提示临床应用相关 TGF 药物应考虑个体基因的差异性,同时还应注意 2 个配体对肺动脉平滑肌细胞增殖的拮抗作用,同时对两者所涉及的信号通路进行干预,可能取得更好的治疗效果。

参 考 文 献

- [1] Tamura Y, Channick RN. New paradigm for pulmonary arterial hypertension treatment[J]. Curr Opin Pulm Med, 2016, 22(5): 429-433.
- [2] Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(s1): 10-19.
- [3] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(s1): 20-31.
- [4] Machado RD, Aldred MA, James V, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension[J]. Hum Mutat, 2006, 27(2): 121-132.
- [5] Nicod LP. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension[J]. Swiss Med Wkly, 2007, 137(31-32): 437-442.
- [6] Ma L, Chung WK. The role of genetics in pulmonary arterial hypertension[J]. J Pathol, 2017, 241(2): 273-280.
- [7] Yan Y, Wang XJ, Li SQ, et al. Elevated levels of plasma transforming growth factor- β 1 in idiopathic and heritable pulmonary arterial hy-

- pertension[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 222: 368–374.
- [8] 王启伟, 朴英杰. Smad 蛋白与 TGF- β 超家族[J]. *解剖科学进展*, 2003, 9(4): 339–342.
- [9] 牛秀琰, 王 越, 梁国庆. 转化生长因子 β 的研究进展[J]. *医学综述*, 2004, 10(4): 209–210.
- [10] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. *Nature*, 1997, 390(6659): 465–471.
- [11] Denhler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71(5): 731–740.
- [12] Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, et al. Transforming growth factor- β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders[J]. *Chest*, 2005, 128(6S): 585–590.
- [13] Korchynskyi O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7): 4883–4891.
- [14] Yang J, Davies RJ, Southwood M, et al. Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells: implications for familial pulmonary arterial hypertension[J]. *Circ Res*, 2008, 102(10): 1212–1221.
- [15] Davies RJ, Holmes AM, Deighton J, et al. BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF- β in pulmonary artery smooth muscle cells: role of proinflammatory cytokines[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(6): L604–615.
- [16] Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic proteins[J]. *Circulation*, 2001, 104(7): 790–795.
- [17] Sheares KK, Jeffery TK, Long L, et al. Differential effects of TGF- β 1 and BMP-4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(5): L919–927.
- [18] Huang S, Chen P, Shui X, et al. Baicalin attenuates transforming growth factor- β 1-induced human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and phenotypic switch by inhibiting hypoxia inducible factor-1 α and aryl hydrocarbon receptor expression[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(10): 1469–1477.
- [19] Liu Y, Ma C, Zhang Q, et al. The key role of transforming growth factor- β receptor I and 15-lipoxygenase in hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1184–1202.
- [20] Stouffer GA, Owens GK. TGF- β promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 2048–2055.
- [21] Willette RN, Gu JL, Lysko PG, et al. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells[J]. *J Vasc Res*, 1999, 36(2): 120–125.
- [22] Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension[J]. *Circ Res*, 2005, 96(10): 1053–1063.
- [23] Corriere MA, Rogers CM, Eliason JL, et al. Endothelial Bmp4 is induced during arterial remodeling: effects on smooth muscle cell migration and proliferation[J]. *J Surg Res*, 2008, 145(1): 142–149.
- [24] Wong GA, Tang V, El-Sabeawy F, et al. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(5): E972–979.
- [25] Nakaoka T, Gonda K, Ogita T, et al. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11): 2824–2832.
- [26] Li XW, Du J, Hu GY, et al. Fluorfenidone attenuates vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension of rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(1): 58–69.
- [27] Cai P, Kovacs L, Dong S, et al. BMP4 inhibits PDGF-induced proliferation and collagen synthesis via PKA-mediated inhibition of calpain-2 in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, Epub ahead of print.
- [28] Chen J, Cui X, Qian Z, et al. Multi-omics analysis reveals regulators of the response to PDGF-BB treatment in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 781.
- [29] Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, et al. Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(5): 1072–1078.
- [30] Long L, Crosby A, Yang X, et al. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor- β signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease[J]. *Circulation*, 2009, 119(4): 566–576.
- [31] Upton PD, Davies RJ, Tajsic T, et al. Transforming growth factor- β (1) represses bone morphogenetic protein-mediated Smad signaling in pulmonary artery smooth muscle cells via Smad3[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 1135–1145.

(责任编辑: 冉明会)