

转化生长因子- β 族信号的转导

张 平

(浙江中医学院病理学教研室, 杭州 310053)

王金泉

(解放军 475 医院病理科, 杭州 310004)

摘要 TGF- β 族细胞因子通过各自信号转导产生多种生物学效应, 其基本过程是: 信号沿 TGF- β 族配体 $\rightarrow$ 受体 $\rightarrow$ SMAD 蛋白 $\rightarrow$ 转录因子 $\rightarrow$ DNA 表达的次序转导. 在 TGF- β 族各因子刺激各自具有蛋白激酶活性的两型膜受体时, 各因子先结合 II 型受体, 结合配体的 II 型受体再激活 I 型受体. 活化的 I 型受体磷酸化通路特异性 SMAD, 后者与公用性 SMAD 结合后从胞浆移至核内, 核内 SMAD 通过与转录因子结合和直接与 DNA 结合调节基因的表达.

关键词 TGF- β , 信号转导, SMAD (MAD)

学科分类号 Q73

从昆虫到人类的转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) β 族, 已发现有 25 种以上相关蛋白, 包括 TGF- β 类、骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 类、活素 (activin) 类、抑素 (inhibin) 类、苗勒氏抑制物 (müllerian inhibitory substance) 及结节物 (nodal), 胶质细胞源性嗜神经因子 (glial-derived neurotropic factor), Dpp (Decapentaplegic)、Vg1 蛋白等. 它们在广泛的动物体内参与调节各胚层的发育、器官的形成、上皮组织的增生、细胞外基质的合成、免疫反应等多种生物学过程^[1]. 现认为, TGF- β 族各类因子都经过其各自的信号转导引起不同的生物学效应, 而信号转导的基本过程相似, 均通过 TGF- β 族配体 $\rightarrow$ 膜受体 $\rightarrow$ MAD (增强子 mother against dpp 的基因产物) 类蛋白 $\rightarrow$ 转录因子 $\rightarrow$ 基因表达等步骤来

控制不同细胞的生长、分化、凋亡, 以表现不同的生物学效应^[1,2]; 转导其间, TGF- β 族信号还受其他细胞因子信号的影响^[3].

1 参与信号转导的膜受体

TGF- β 族信号转导的第一步是其各因子 (配体) 与相应的细胞膜受体结合. TGF- β 族膜受体大多属丝氨酸/苏氨酸激酶, 根据其结构与功能的不同, 可分 I 型及 II 型受体. 两型受体并列于细胞膜, 其细胞外小区段内富含半胱氨酸残基; 细胞内的大部分为激酶区段, 其中 I 型受体激酶区外侧有一段富含甘氨酸及丝氨酸残基称 GS 区, 是受 II 型受体磷酸化激活的部位. TGF- β 族各类因子大多有各自特异的 I、II 型受体, 如 TGF- β 类受体为 T β R-I 及 T β R-II (表 1)^[2].

表 1 参与 TGF- β 族各类信号通路的信息分子

分类	II 型受体	I 型受体	通路特异性 SMAD	抑制性 SMAD	公用性 SMAD	转录因子	靶基因启动子
TGF- β	T β R-II	T β R-I	Smad2 (或 Smad3)	Smad6 (或 Smad7)	Smad4 Smad4 Smad4	TFE3 SP-1 AP-1	<i>PAI-1</i> <i>JunB</i> <i>p15</i> <i>p21</i> 胶原酶基因 I
BMP	BMPR-II ActR-II ActR-II B	BMPR-I A MPR-I B ActR-I	Smad1 (或 Smad5 Smad8, 9)	Smad6 (或 Smad7)	Smad4 Smad4 Smad4		<i>Xom</i> <i>Xvent-1</i> <i>Msx-1</i>
Activin	ActR-II ActR-II B	ActR-I ? ActR-I B	Smad2 (或 Smad3)	Smad6 (或 Smad7)	Smad4 Smad4	FAST-1 FAST-2	<i>Mix.2</i> <i>goosecoid</i>
Dpp	Punt	Thick veins Saxophone	MAD				<i>Vg</i> <i>Shn</i>

在配体与受体的反应中, TGF- β 族配体首先与相应的 II 型受体识别结合, 后者再与 I 型受体结合. 这种结合实际是受体依次被磷酸化激活而传递信息的过程, 即 II 型受体先经配体特异性结合而被磷酸化激活具有激酶的活性, 再由活化的 II 型受体磷酸化 I 型受体 GS 区, 使 I 型受体活化也具有激酶的活性^[2]. 受体中不同氨基酸残基的磷酸化, 影响信号的传递, 如在 TGF- β 类信号转导中, TGF- β 1 结合 T β R- II 时, 使 T β R- II 的 213 及 409 位丝氨酸磷酸化, T β R- II 即能再磷酸化激活 T β R- I 并与之形成异源四体可将信号传递下去; 如 416 位丝氨酸磷酸化, 则抑制 T β R- II 的活性^[4].

在 TGF- β 族各条通路的信号转导过程中, 配体与受体的反应性略有不同. 如 TGF- β 2 与 T β R- II 间的亲和力较低, 其间高亲和力的结合需 T β R- I 或一种 β 蛋白多糖 (betaglycan) 的协作^[5]; BMP 类对其 II、I 型受体的亲和力均较低, 只有在两种受体同时存在的情况下才能与 BMP 类因子牢固结合^[6]; T β R- II 及 ActR- II B 型受体内的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基均可自动磷酸化, 这些受体可能是具有双重功能的特异性激酶^[7]; 此外, 因转导过程中大多配体先激活 II 型受体, 后激活 I 型受体, 故 I 型受体决定了每条细胞内信号的特异性, 如 TGF- β 类因子的 I 型受体中激酶 IV、V 区段间 9 个氨基酸序列的变化可使其特异性信号出现分支路, 表现不同的生物学效应^[8].

细胞膜上受体分子的量或结构变化将影响信号的转导以至效应的改变. 如 T β R- II 表达的减少或主区缺失可阻止 TGF- β 的细胞生长抑制效应, 但不改变其对细胞外基质的影响^[9]; 这些变化说明 T β R- II 在抗细胞增生反应中的作用比在基质反应中更重要. T β R- I 中 GS 区氨基端的 165 位丝氨酸的突变可使其产生更强的生长抑制及基质积聚的信号^[10].

2 转导信号的胞浆蛋白——SMAD

受体激活后形成的异源四体复合物, 如何继续转导信号? 在果蝇 TGF- β 族因子 Dpp 作用机理的研究中发现了一个 dpp 基因的增强子 mad, 其产物 MAD 对 Dpp 调节中胚层或内胚层的发生十分重要, MAD 的突变与生化研究均证实其作用点在 Dpp 受体的下游, 为认识受体激活后的信号转导机理提供了线索. 随后在线虫、蛙类、小鼠及人类细胞浆中均确定了 MAD 蛋白的类似物, 因线虫的类

似物称 SMA, 而在脊椎动物将其统一命名为 SMAD^[11]. 现认为, TGF- β 族各类受体激活后, 均依靠这类 SMAD 中介蛋白将 TGF- β 族信号转导至核内^[11~13].

SMAD 类中介蛋白是由分子质量为 42~60 ku 不同蛋白质组成, 已发现有 Smad1、2、3~9 九种. 各种 SMAD 蛋白均由进化中高度保留的氨基及羧基端区 (即 MH1 及 MH2) 分别与中间的连接部 (linker) 相连; 其中 MH2 为效应区, 是受激酶磷酸化的部位; MH1 从物理空间上与 MH2 相互作用, 既可抑制 SMAD 分子内效应区的活性, 又可防止不同类 SMAD 间异源寡聚体的形成, 并能与 DNA 结合; 连接部富含脯氨酸, 其序列在进化中有变异, 也参与与 DNA 的结合; 而 MH2 的丝氨酸残基因受体介导的磷酸化可解除 MH1 的抑制作用. SMAD 在无活性状态下, 其 MH1 与 MH2 相互接触, 分子呈折叠状; 当被相应受体激活后, SMAD 分子打开, 并形成相关的异源 SMAD 寡聚体. SMAD 蛋白根据其在每条信号转导通路中不同的作用可分为三种^[11~13]:

a. 通路特异性 (pathway-specific) SMAD 是专门转导 TGF- β 族中某条信号通路的 SMAD, 包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 及 Smad8. 其中 Smad1 及 Smad5 或 Smad8 限于转导 BMP-2 或-4 类通路的信号; Smad2 及 Smad3 限于转导 TGF- β 和活素类通路的信号. 这些 SMAD 的 MH2 中, 大多含有丝 (丝氨酸)-丝-X-丝 (SSXS) 的结构, 其中最靠近羧基端的二个丝氨酸被相应的 I 型受体磷酸化后分子打开, 使 SMAD 直接与 I 型受体结合并被激活. 因此, 通路特异性 SMAD 是 I 型受体激酶的底物, 但目前尚不能排除其他激酶也可激活 SMAD.

b. 公用性 SMAD 主要是 Smad4, 它是 TGF- β 族各类信号转导过程中共同需要的介质. Smad4 分子的 MH2 中无 SSXS 的结构, 故不能被 TGF- β 及 BMP 类受体磷酸化或不能与之结合; Smad4 中 MH1 与 MH2 间相互作用, 可防止通路特异性 SMAD 与公用性 Smad4 间异源寡聚体的形成. Smad4 在 TGF- β 族信号转导过程中与活化的通路特异性 SMAD 形成异源寡聚体, 继而共同移位至核内, 并激活转录反应. 在 TGF- β 族各条通路的转导过程中, 由不同的通路特异性 SMAD 与 Smad4 形成各自的寡聚体 (表 1).

c. 抑制性 SMAD 主要有 Smad6 及 Smad7, 二

者的羧基端区与其他 SMAD 羧基端共有相似氨基酸序列, 而氨基端区 (二者有 36% 相同) 则不同于其他 SMAD; 它们也可与 I 型受体结合, 但结合反应的稳定性比通路特异性 SMAD 更强, 因而干预通路特异性 SMAD 被磷酸化, 使之不能与 Smad4 形成异源寡聚体; 是 TGF- β 、活素及 BMP 类信号转导的抑制剂。

编码 SMAD 的基因突变或缺失导致 TGF- β 族信号转导障碍, 阻止了 TGF- β 族因子抑制细胞生长的效应, 可能是癌变的一种机理, 如在人胰腺癌细胞中已发现缺失的 Dpc4 基因所编码的蛋白质就是人类 Smad4^[14]。除了 SMAD, 还有一些介质如亲免疫素 (immunophilin) FKBP12 也可结合到 I 型受体 GS 区, 防止非配体引起的 II 型受体对 I 型受体的自发磷酸化^[15]。

3 SMAD 对转录的调节

SMAD 调节转录包括二个过程: 既需与转录因子或辅助活化剂 (coactivator) 结合; 又需与靶基因启动子 DNA 在物理空间上的直接结合。启动子 DNA 还包含二种特异性序列, 其一与相关转录因子结合, 其二直接与 SMAD 结合^[11]。

如在活素类引起同源框基因 (homeobox gene) Mix.2 表达时, 激活的 Smad2 及 Smad4 聚合物 (Smad2/4) 既与侧翼样螺旋型 (winged-helix) 转录因子 FAST-1 结合, 又与靶基因 Mix.2 启动子 DNA 直接结合。该启动子 DNA 包含活素反应元件 (activin response element, ARE) 及 SMAD 结合元件 (smad binding element, SBE) 两种序列, 其中 ARE 被 FAST-1 结合, SBE 被 Smad4 结合, 而 Smad4 对 SBE 的特异性结合是根据它与 Smad2 相连、参与 Smad2/FAST-1 复合物形成时提供的信息。在活素类引起同源框基因 goosecoid 表达时, 激活的 Smad2/4 也以上述方式与 FAST-2 及靶基因 goosecoid 的启动子 DNA 结合。

同理, 在 TGF- β 类诱发纤维蛋白溶酶原活化素抑制剂 1 (PAI-1)、癌蛋白 JunB 基因表达时, Smad3/4 既与转录因子基部螺旋形环状螺旋蛋白 (basic helix-loop-helix protein) TFE3 协作, 又与 PAI-1 及 JunB 靶基因的启动子 DNA 结合。这些启动子 DNA 包括 SBE 及结合 TFE3 的序列。如在 TGF- β 诱发 I 型胶原酶基因表达时, Smad3/4 既与癌基因蛋白 Jun 及 Fos 组成的转录因子 AP-1 结合, 又与胶原酶基因启动子 DNA 结合。该启动子 DNA

包含有转录因子 AP-1 结合序列亦称 TPA (12-O-tetradecanoyl 13-acetate) 反应元件 (TPA-response element, TRE) 及 SBE。在 TGF- β 诱导细胞周期素依赖激酶 (CDK) 抑制剂 p15 及 p21 表达时, 活化的 SMAD 须与转录因子 Sp-1 协作。另外, SMAD 调节转录时, 尚需辅助活化剂如 CBP 及 P300 的共同作用。

在果蝇 Dpp 类信号转导中, MAD 分子内 MH1 及部分连接部可直接结合到遗迹 (vestigial, vg) 基因的“扇形”增强子中富含 G、C 的 DNA 序列; 但分子内 MH2 可抑制 MH1 与扇形增强子的结合; 只有 Smad4 或其他辅助因子与 MAD 形成异源聚合物, 消除了 MH2 的影响或通过几个 MAD 分子中 MH1 的共同作用, 才能增强与 DNA 的亲合力, 调节 vg 的转录^[16]。

活化的 SMAD 与启动子 DNA 的结合原先被认为是间接的, 现经 PCR 技术鉴定确有 SMAD 直接结合的 DNA 序列: 能与 Smad3 及 4 结合的最适 DNA 序列为 GTCTAGAC, 其次为 TGAGTCAGAC, 前者是一段双股 DNA 中碱基排列相同而方向相反的回文序列 (palindromic sequence), 可以认为 GTCT=AGAC; 后者也含有 AGAC, 故目前认为 AGAC (或 GTCT) 是结合 SMAD 的最适 DNA 序列。转录因子 AP-1 的结合序列为 TGAGTCAGAC, 故上述 TGAGTCAGAC 既能被 SMAD、又能被 AP-1 结合。结晶学分析表明, Smad3 中能特异性结合 DNA 碱基序列的是 MH1 区内由 11 个氨基酸组成的 β 发夹 (hairpin), 此结构被包埋在 DNA 的大沟内, 恰与 GTCT 序列接触^[11, 12]。

4 影响 TGF- β 族信号转导的其他网络信号

有机体细胞呈现生长、分化、增生、凋亡或癌变等不同演变过程, 是受许多正常或异常生长因子或细胞因子信号网络交叉调节的结果。TGF- β 族信号在转导过程中, 也受到其他生长因子信号网络的交叉调节, 阻止或改变转导通路, 影响其固有的生物学效应。已发现与 TGF- β 族信号转导过程有交叉调节作用的其他信号系统如下。

分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 类信号系统, 是细胞受分裂原刺激后由多级激酶连锁激活的信号转导通路, 每条通路由 MAPK、MAPKK (MAPK 的激酶) 及 MAPKKK (MAPKK 的激酶) 组成, 其转导信号与 TGF- β 族信号对细胞发生交叉调节作用^[3]。已发现由 EGF (或 HGF) 激活其

受体酪氨酸蛋白激酶产生的 MAPK 类信号 (细胞外信号调节蛋白激酶, ERK) 也可磷酸化上述 BMP 类信号通路特异的 Smad1, 但由于 Smad1 中磷酸化部位的不同, 产生的效应也不同. TGF- β 族信号转导引起的磷酸化位于 Smad1 中 MH2 的 SSXS 结构区, 使 Smad1 从胞浆进入核内, 其效应是抑制细胞增生; 而由 EGF 或 HGF 激活其酪氨酸激酶产生的 ERK 信号引起的磷酸化部位在 Smad1 连接部的 PXSP 区, 结果阻止其进入核内, 抑制其调节转录的活性, 因而可对抗 BMP 的生物学效应^[17].

信号转导-转录激活剂 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 也是调节细胞生长、分化的重要信息分子. 已知 γ 干扰素与 TGF- β 对细胞的某些功能具有拮抗作用, 原机理不明, 现证实: 干扰素是通过其受体与有关酪氨酸激酶 Jak₁ 参与 STAT₁ 的磷酸化, 激活的 STAT₁ 引起基因转录, 诱发抑制性 Smad7 的表达, 阻碍了 TGF- β 受体与 Smad3 的结合, 使 Smad3 不能活化, 即阻止了其下游一系列信号转导过程^[18].

此外, 在肢体发育过程中对 FGF 能阻止 BMP-2 抗增生作用的机理, 虽然还未研究, 可能与 EGF 相似. 因此, 无论 MAPK 类信号, 或 STAT 信号都通过影响 SMAD 类蛋白来控制 TGF- β 族信号转导, 可能 SMAD 蛋白是控制细胞命运的多个网络信号中的一个交叉作用点.

参 考 文 献

- Graff J M, Bansal A, Melton D A. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF β superfamily. *Cell*, 1996, **85** (4): 479~487
- Massague J. TGF β signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, 1996, **85** (7): 947~950
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, *et al.* Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science*, 1995, **270** (5244): 2008~2011
- Luo K X, Lodish H F. Positive and negative regulation of type II TGF β receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* 1997, **16** (8): 1970~1981
- Rodriguez C, Chen F, Weinberg R A, *et al.* Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)- β 2 to the types I and II TGF- β receptors. *J Biol Chem*, 1995, **270** (27): 15919~15922
- Liu F, Ventura F, Doody J, *et al.* Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (7): 3479~3486
- Lawler S, Feng X H, Chen R H, *et al.* The type II transforming growth factor- β receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem*, 1997, **272** (23): 14850~14859
- Feng X H, Derynck R. A kinase subdomain of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor determines the TGF- β intracellular signaling specificity. *EMBO J*, 1997, **16** (13): 3912~3923
- Sankar S, Mahooti Brooks N, Bensen L, *et al.* Modulation of transforming growth factor- β receptor levels on microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J Clin Invest*, 1996, **97** (6): 1436~1446
- Souchelnytskyi S, Ten Dijke P, Miyazono K, *et al.* Phosphorylation of ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *EMBO J*, 1996, **15** (22): 6231~6240
- Derynck R, Zhang Y, Feng X H. Smads: Transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell*, 1998, **95** (6): 737~740
- Shi Y, Wang Y F, Jayaraman L, *et al.* Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell*, 1998, **94** (5): 585~594
- Whitman M. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature*, 1997, **389** (6651): 549~551
- Dai J L, Turnacioglu K K, Schutte M, *et al.* Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res*, 1998, **58** (20): 4592~4597
- Wang T, Li B-Y, Danielson P D, *et al.* The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell*, 1996, **86** (3): 435~444
- Kim J, Johnson K, Chen H J, *et al.* Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*, 1997, **388** (6639): 304~308
- Kretzshmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1. *Nature*, 1997, **389** (6651): 618~622
- Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signaling by the interferon γ /STAT pathway. *Nature*, 1999, **397** (6721): 710~713

Signal Transduction of Transforming Growth Factor- β Family. ZHANG Ping (Department of Pathology, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China); WANG Jin-Quan (Department of Pathology, 475th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China).

Abstract Cytokines of the TGF- β family exert multiple biological effects by their signal transduction pathways that undergo a basic course as follows: ligands of TGF- β family $\rightarrow$ receptors $\rightarrow$ SMADs $\rightarrow$ transcription factors $\rightarrow$ DNA expression. In stimulating their own two type receptors with kinase activity the cytokines first bind to type II receptors and then the ligand-binding type II receptors activate type I receptors. The type I receptors phosphorylate pathway specific SMADs. These activated SMADs then associate with common SMAD and translocate from cytoplasm to nucleus where they regulate transcription either by associating with transcription factors and by binding directly to DNA.

Key words transforming growth factor- β (TGF- β), signal transduction, SMAD (MAD)