

# 肿瘤中 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的研究进展

肖业臣<sup>1</sup>, 黄亚东<sup>2</sup>, 李校堃<sup>3</sup>, 苏志坚<sup>2</sup>

关键词: TGF- $\beta$ 1; Smad; 信号传导; 肿瘤

中图分类号: R730 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)08-0616-03

## 0 引言

转化生长因子 (transforming growth factor) 是一个多功能的生长因子超家族, 其主要作用包括调节细胞增殖和分化, 参与胚胎发育调节, 促进细胞外基质 (ECM) 形成和抑制免疫反应等。TGF 至少有 5 种异构体 (TGF- $\beta$ 1 ~ 5), 另外激活素 (activin)、抑制素 (inhibin)、骨形态发生蛋白 (bone morphogenesis protein, BMP) 也属于该家族。其中 TGF- $\beta$ 1 最为常见, 几乎参与了所有的病理和生理过程, 并与多种临床疾病有着密切的关系<sup>[1]</sup>。

TGF- $\beta$ 1 生物学活性的发挥有赖于正常的信号传导途径, TGF- $\beta$ 1 首先被细胞表面的受体 T $\beta$ R 识别并结合, 使其构象发生改变, 然后被另一受体 T $\alpha$ R 识别形成三者的复合物。此时, T $\alpha$ R 的胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域可将 T $\beta$ R 的胞内丝氨酸/苏氨酸磷酸化, T $\beta$ R 被激活, 磷酸化的 Smad2 或 Smad3 进入细胞核, 与 Smad4 结合, 形成复合物, 然后再与核内的各类转录因子结合, 调控靶基因的转录。I-Smad 能够阻碍受体介导的 Smad4 磷酸化, 启动受体复合物的泛素化降解, 抑制信号传导, 从而起到负调控的作用<sup>[2]</sup>。

## 1 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路与肿瘤的发生发展

TGF- $\beta$ 1 信号途径在发育和生长过程中发挥着重要作用, 与肿瘤的发生发展有着密切关系。在 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路中任何一个环节的变化, 都会导致信号转导通路的异常。

在核中, smad 结合 DNA 的能力很弱, 它需要其他转录因子的协助。异常的 TGF- $\beta$ 1 信号已经在很多疾病中被阐明, 如癌症和纤维化<sup>[3]</sup>。对于癌症, TGF- $\beta$ 1 表现出 2 种不同或相反的作用。在肿瘤发生

初期, 它通过诱导生长抑制, 起到了肿瘤抑制子的作用, 然而在肿瘤发生后期, TGF- $\beta$ 1 起到了促进肿瘤血管生成, 促进肿瘤细胞浸润、入侵、转移和免疫抑制的作用<sup>[4]</sup>。因此这一途径细胞间的组分失活都会导致细胞对 TGF- $\beta$ 1 诱导的生长抑制和凋亡信号失调。结果细胞生长失去控制, 诱发细胞癌变, 促进肿瘤的恶化。目前已经在前列腺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌、胰腺癌、白血病等肿瘤中, 发现有 TGF- $\beta$ 1 信号传导途径中至少一个成分的改变<sup>[5]</sup>。

Yakicier 等<sup>[6]</sup>发现 TGF- $\beta$ 1 信号通路在肝组织中也发生了改变, 在 35 例肝细胞癌和非肿瘤的肝组织中, 发现有 3 个肿瘤表现了体细胞突变, 其中 2 个 Smad4 基因突变 (Asp332 Gly 和 Cys401 Arg), 1 个 Smad2 基因突变 (Gln407 Arg), 所有这 3 个突变都是 A T  $\rightarrow$  G C 转换。推测这种突变发生的机制可能类似于线粒体 DNA 氧化应激所致的突变。但 Ijichi 等<sup>[7]</sup>对 8 株肝癌细胞系 TGF- $\beta$ 1/smads 信号的研究中发现, 肝癌细胞系的信号通路完整, 没有发现异常, 表明 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的异常现象在肝癌中存在着个体差异。在人的精原细胞瘤中, 发现 Smad4 的羧基端存在突变, 进而严重削弱了 TGF- $\beta$ 1 信号途径, 以及 activin 和 BMP 信号通路, 这是目前第一次报道的 Smad4 在精原细胞瘤中发生的插入突变<sup>[8]</sup>。

在结肠癌和胰腺癌中, Smad2 和 Smad4 都发现在 MH1 区域有一个保守的精氨酸发生错义突变, 在人类肿瘤中, 已经发现 Smad2 和 Smad4 在频繁突变, 这些突变并没有降低 Smad 的活性, Smad2 的磷酸化, 以及 Smad2/Smad4 的异聚体, 核转位都能正常, 然而同野生型细胞相比, 突变的 Smads 蛋白通过泛素连接酶 UbcH5 家族的遍在蛋白化而被迅速降解。这也提出了一个肿瘤发生的新机制, 由于 Smad 蛋白的遗传缺陷而导致通过泛素化介导的降解<sup>[9]</sup>。

TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路与肾癌的发生也密切相关。免疫组化实验发现, TGF- $\beta$ 1、T $\beta$ R I 和 T $\beta$ R II 的免疫活性在肾癌中比正常癌旁组织中更强, 然而 Smad2 和 Smad4 则较弱。在肿瘤区域, T $\beta$ R II、

收稿日期: 2005-07-14; 修回日期: 2006-06-12

基金项目: 国家 973 计划重大专项 (G1999054204)

作者单位: 1. 510275 广州, 中山大学生命科学院; 2. 暨南大学医药生物技术研究开发中心; 3. 温州医学院药学院

通讯作者: 黄亚东, E-mail: ydhuang2004@126.com

作者简介: 肖业臣 (1976-), 男, 博士, 主要从事肿瘤分子生物学研究

T<sub>RI</sub>和 TGF-1 免疫组化阳性表达较弱,而 Smad2 和 Smad4 的阳性表达较强。表明 T<sub>RII</sub> 和 Smad 蛋白的表达降低参与了肾细胞癌的发生, TGF / smad 信号通路的改变可能是肾癌发生的重要因素<sup>[10]</sup>。

Ijichi 等<sup>[7]</sup>对 11 株结肠癌细胞, 10 株胃癌细胞, 9 株胰腺癌细胞 TGF / smad 信号的研究中发现, 91 % 结肠癌细胞, 67 % 胰腺癌细胞和 40 % 胃癌细胞的信号都受到了不同程度的减弱。在结肠癌和胰腺癌中, T<sub>RII</sub> 和 Smad4 失活, 在 TGF 反应缺陷的胃癌细胞系中, 表达正常的 T<sub>RII</sub> 和 Smad4, 不能恢复信号通路, 说明在一些胃癌中, 还有新的分子或机制参与该信号的阻断。

在食管癌细胞中, 发现 32.2 % 的肿瘤正常表达 Smad4, 42.6 % 的肿瘤中 TGF-1 正常表达。手术后生存率显示 Smad4 低表达的病人比正常表达的病人有较差的临床结果。综合分析, 发现 Smad4 的表达可以反应肿瘤进展和淋巴结转移的情况<sup>[11]</sup>。

TGF-Smad 信号的持续时间对于 TGF 反应的专一性也是非常重要的, 在胰腺癌细胞系 PT45 和 Panc-1 中, 有活性的 Smad 复合物在核中仅仅存在 1-2h, 而在胰腺癌细胞系 HaCaT 和 Colo-357 中, 则高达 6h 研究表明在 PT45 和 Panc-1 细胞系中, 这种信号的削弱, 是由于 TGF<sub>RI</sub> 的低水平表达, 导致了与细胞周期的停滞相关的基因发生了改变<sup>[12]</sup>。

马凡氏综合征 (Marfan's syndrome) 是一种先天性遗传性结缔组织疾病, 在日本 4 个不同的马凡氏综合征病人家系中, 发现了 T<sub>RII</sub> 的突变<sup>[13]</sup>。子宫颈癌是威胁女性健康最频繁的肿瘤之一, 在 41 个原发癌组织中, 24.4 % 的样品表现了 Smad4 蛋白的缺失, 63.4 % 的样品表现了 Smad4 表达降低, 可见 Smad4 基因的改变是子宫颈癌发生一个重要因素<sup>[14]</sup>。研究发现, 卡波济氏肉瘤 (Kaposi's KS) 是由于病毒的 K8 开放阅读框编码的转录因子, 能抑制 TGF-1/Smad 介导的转录活性和拮抗 TGF 的生长抑制效应, 从而导致肿瘤的发生<sup>[15]</sup>。邵步云等<sup>[16]</sup>在人的胶质瘤中也发现了 smad4 和 smad7 的表达异常, 推测可能跟肿瘤的恶性进展有关。

## 2 TGF-1/Smads 信号通路在肿瘤治疗中的应用

### 2.1 针对 TGF-1 和其受体开展的肿瘤治疗

TGF-1 是一种有效的免疫抑制剂, 它除了诱导肿瘤的免疫抑制外, 还刺激肿瘤血管生成。肿瘤细胞逃逸 TGF-1 介导的生长抑制, 或者是由于 TGF 受体的缺失, 或者是 TGF-1 信号的失调。所以

TGF-1 的失活或者其产物的抑制在很多动物模型中证实是肿瘤治疗的有效方法, 如采用抗 TGF-1 抗体, TGF-1 小分子抑制剂, Smad 抑制剂, 反义基因治疗等。逆转 TGF-1 诱导的免疫抑制将是一种新的非常有前景的肿瘤治疗方案, 将有望用于一些疑难疾病的治疗中<sup>[17]</sup>。

Hjelmeland 等<sup>[18]</sup>发现 TGF-1 的小分子抑制剂 SB-431542 能阻断 Smad 的磷酸化和核转位, 能够抑制血管内皮生长因子和血纤维蛋白溶酶原抑制剂 1 的表达, 能抑制神经胶质瘤的形态改变和细胞增殖、迁移及血管生成。

在胰腺癌中, 由于 TGF 信号路径中 Smad4 的突变, 而使这种肿瘤抑制活性丧失, 用选择性的激酶抑制剂 (SD-093) 封闭 T<sub>R</sub> 活性, 能够强烈抑制胰腺癌细胞的浸润和转移, 而不影响它们的生长特性、形态或 E-cadherin 和 F-actin 的亚细胞分布<sup>[19]</sup>。

TGF<sub>R</sub> 激酶抑制剂 SD-208 对于治疗人的恶性神经胶质瘤和其他与 TGF 活性异常有关的病变有重要的意义, 口服的 SD-208 通过抑制脑和脾脏中的 Smad 磷酸化, 能堵塞 TGF 信号的自分泌和旁分泌作用, 强烈抑制 Smad 复合物的形成和 TGF 引起的浸润和迁移<sup>[20]</sup>。

TGF 诱导的上皮细胞到间充质细胞的转换, 涉及了癌症的发展, 纤维化和其他病变, 通过 ATP 的竞争抑制剂吡啶化合物来牢固的结合 T<sub>RI</sub> 受体的激酶, 可以抑制这一信号通路, 有望用来治疗相关的人类疾病<sup>[21]</sup>。

三萜系化合物 CDDO (2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oic acid) 和它的衍生物 CD-DO-Im 在 nmol 浓度下, 可以增加 TGF 依赖的基因表达, 譬如血纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂 1 和 T<sub>RII</sub>, 它们能够延长 Smad2 的活性, 显著增加 Smad3 激活 Smad 结合元件 CA/GA-荧光素酶的能力, 它们还能够逆转 Smad7 的抑制活性, CDDO 和 CD-DO-Im 还能增强 actin 和 BMP 的信号路径。增强转录共激活子 p300-CBP 相关因子的表达, 同 TGF 具有协同作用, 这对于治疗 TGF 异常的疾病具有重要应用前景<sup>[22]</sup>。

### 2.2 针对 Smad4 基因开展的肿瘤基因治疗

TGF 能够抑制正常上皮细胞的增殖, 但肿瘤细胞却能频繁的产生抗性, 正是由于 Smad4 作为肿瘤抑制基因频繁地在肿瘤中失活, 恢复 Smad4 基因的功能目前已经成为肿瘤基因治疗的热点。

在裸鼠中, Smad4 在结肠癌和胰腺癌中的表达能够抑制肿瘤生长。Smad4 功能的恢复影响了血管生成, 降低了血管内皮生长因子的表达, 增加了血

小板反应素 1 的表达。通过 Smad4 来调控肿瘤血管生成开关可以作为肿瘤抑制的一种新方法<sup>[23]</sup>。在 Smad4 缺失的胰腺癌 CFPac-1 细胞中,利用腺病毒过表达 Smad4 基因,可以降低铆定不依赖生长超过 50%,抑制异种肿瘤生长<sup>[24]</sup>。

用重组腺病毒载体将 Smad4 基因转染到 Smad4 缺失的乳腺癌细胞 MDA-MB-468 中,TGF 信号恢复了血纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂 1 和 p21 基因的表达,Smad4 表达的细胞在 S 期适度缩短,但没有诱导凋亡。而 Smad4 表达的细胞分散生长,悬浮培养的时候,能迅速失巢凋亡(anoikis)。进一步说明 Smad4 的缺失与肿瘤的恶变存在着紧密的相关性<sup>[25]</sup>。

肿瘤的发生是一个多基因,多途径相互作用的过程,TGF/Smads 信号通路的异常是肿瘤的发生发展以及肿瘤的浸润和转移的重要因素,因此研究 TGF 信号转导与肿瘤的关系,对于阐明肿瘤的发生机理和肿瘤的治疗与预后都有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] Sporn MB, Pwberts AB, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor  $\beta$ : Biological function and chemical structure[J]. Science, 1986, 233(4763): 532-534.
- [2] Peter ten Dijke, Caroline S. Hill New insights into TGF- $\beta$  signaling[J]. TRENDS in Biochemical Science, 2004, 29(5): 265-273.
- [3] Massague J. TGF  $\beta$  signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67(7): 753-791.
- [4] Oft M, Heider KH, Beug H. TGF- $\beta$  signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis[J]. Curr Biol, 1998, 8(23): 1243-1252.
- [5] Iacobuzio-Donahue CA, Song J, Parmigiani G, et al. Missense mutations of MADH4: characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(5): 1597-1604.
- [6] Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, et al. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 1999, 8(34): 4879-4883.
- [7] Ijichi H, Ikenoue T, Kato N, et al. Systematic analysis of the TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway in gastrointestinal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(2): 350-357.
- [8] Bouras M, Tabone E, Bertholon J, et al. A novel SMAD4 gene mutation in seminoma germ cell tumors[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 922-928.
- [9] Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor  $\beta$  signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(9): 4820-4825.
- [10] Cardillo MR, Lazzereschi D, Gandini O, et al. Transforming growth factor  $\beta$  pathway in human renal cell carcinoma and surrounding normal-appearing renal parenchyma[J]. Anal Quant Cytol Histol, 2001, 23(2): 109-117.
- [11] Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, et al. Smad4 and Transforming Growth Factor 1 Expression in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus[J]. Clinical Cancer Research, 2002, 8(6): 1838-1842.
- [12] Nicolas FJ, Hill CS. Attenuation of the TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF- $\beta$ -induced growth arrest[J]. Oncogene, 2003, 22(24): 3698-3711.
- [13] Mizuguchi T, Colod-Beroud G, Akiyama T, et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome[J]. Nat Genet, 2004, 36(8): 855-860.
- [14] Baldus SE, Schwarz E, Lohrey C, et al. Smad4 deficiency in cervical carcinoma cells[J]. Oncogene, 2005, 24(5): 810-819.
- [15] Tomita M, Choe J, Tsukazaki T, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP protein represses transforming growth factor  $\beta$  signaling through interaction with CREB-binding protein[J]. Oncogene, 2004, 23(50): 8272-8281.
- [16] 邵步云, 陈谦学, 刘刚, 等. Smad4 和 Smad7 在人脑胶质瘤中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 2(3): 132-135.
- [17] Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- $\beta$  inhibitors[J]. Invest New Drugs, 2003, 21(1): 21-32.
- [18] Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, et al. SB-431542, a small molecule transforming growth factor  $\beta$ -receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 737-745.
- [19] Subramanian G, Schwarz RE, Higgins L, et al. Targeting endogenous transforming growth factor  $\beta$  receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5200-5211.
- [20] Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, et al. SD-208, a Novel Transforming Growth Factor Receptor I Kinase Inhibitor, Inhibits Growth and Invasiveness and Enhances Immunogenicity of Murine and Human Glioma Cells In vitro and In vivo[J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7954-7961.
- [21] Peng SB, Yan L, Xia X, et al. Kinetic characterization of novel pyrazole TGF- $\beta$  receptor I kinase inhibitors and their blockade of the epithelial-mesenchymal transition[J]. Biochemistry, 2005, 44(7): 2293-2304.
- [22] P, Heiss EH, Place AE, Risingsong R, et al. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor  $\beta$ /Smad signaling[J]. Cancer Res, 2003, 63(6): 1371-1376.
- [23] Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis[J]. Int J Gastrointest Cancer, 2002, 31(1-3): 47-59.
- [24] Peng B, Fleming JB, Breslin T, et al. Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(11): 3628-3638.
- [25] Ramachandra M, Atencio I, Rahman A, et al. Restoration of transforming growth factor  $\beta$  signaling by functional expression of smad4 induces anoikis[J]. Cancer Res, 2002, 62(21): 6045-6051.

[编辑:周永红]