

◇ 综 述 ◇

TGF- β 诱导肿瘤细胞上皮-间充质转化的调节及信号转导机制研究进展

任周新^{1,2}, 沈俊岭^{1,2}, 李 亚¹ 综述 余海滨¹ 审校

摘要 上皮-间充质转化(EMT)是源于上皮细胞的恶性肿瘤细胞获得迁徙和侵袭能力的重要生物学过程。恶性上皮性肿瘤细胞和基质细胞分泌的转化生长因子 β (TGF- β)诱导和促进了肿瘤细胞的EMT过程。有研究表明TGF- β 借助于Smad依赖性或非Smad依赖性信号转导通路,诱导或抑制EMT过程关键基因的表达;细胞外及细胞膜的多种因子则对上述信号转导过程产生调节作用。结果提示,在TGF- β 诱导的肿瘤细胞的EMT过程,涉及一个复杂而精细的信号转导调控网络。

关键词 转化生长因子 β ; 上皮-间充质转化; 信号转导

中图分类号 R 735.2; R 730.231

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)01-0124-05

2014-07-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81302921); 河南中医学院第一附属医院临床研究支持项目(编号:2013KJ12)

作者单位: ¹ 河南中医学院第一附属医院; ² 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000

作者简介: 任周新,男,高级实验师;

余海滨,男,副主任医师,副教授,责任作者, E-mail: yhbzzz@163.com

上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,是肿瘤侵袭和转移过程的重要启动步骤;转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)是肿瘤细胞EMT过程的重要诱导因子。在TGF- β 的介导下,上皮肿瘤细胞获得了更多的间充质的表型、丧失了上皮细胞的表型,导致侵袭和迁移能力的提升^[1],从而加速了肿瘤的扩散和发展,见图1。近年来针对TGF- β 诱导的EMT过程中的信号转导和调节机制进行了大量的研究,取得了一定的进展,笔者就这些研究结果作一综述。

1 TGF- β 信号通路

TGF- β 超家族包括TGF- β 、活化素(activin)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、多种生长与分化因子(growth and differentiation factors, GDFs)等成分,这些成分对细胞的生长、生存、分化和迁移具有调节作用;在胚胎形成和成年组织的局部内环境稳态的维持中,TGF- β 也具有重要的作用。

The study of correlation between allergen and chronic sinusitis with nasal polyps

Chen Jianwen, Sun Jingwu, Wang Yingfeng

(Dept of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract We retrospectively analyzed 218 allergen skin prick tests(SPT) of the patients with chronic sinusitis with or without nasal polyps(CRSwNP/CRSsNP) before the operation. The proportions of positive SPT in CRSwNP and CRSsNP were compared respectively. The distributions of allergens were the same in all groups. The positive rate of SPT in CRSwNP was higher than that in CRSsNP, with statistical significance($P < 0.05$). The positive rate of SPT in CRSsNP was higher than that of the control group, without statistical significance. The recurrence rate in CRSwNP was higher than that in CRSsNP, with statistical significance. The recurrence rate in the allergen-positive patients was higher than the allergen-negative patients, with statistical significance.

Key words chronic sinusitis; polyps; allergen

用^[2]。TGF- β 与某些疾病之间存在密切的联系,如自身免疫性疾病、心血管疾病和肿瘤^[3]。在肿瘤形成的早期阶段,TGF- β 通过抑制肿瘤细胞的生长以及促进细胞的凋亡产生抑制效应;但在随后肿瘤的进展阶段,却促进肿瘤的发展,这种作用与其诱导肿瘤细胞的 EMT 有关。例如,上皮肿瘤细胞获得了更多的间充质的表型并丧失了上皮细胞的表型,导致侵袭和迁移能力的增强^[1],加速了肿瘤的扩散和发展。此外,TGF- β 的促肿瘤形成作用还涉及实体瘤的基质细胞,机制涉及对血管形成的刺激、免疫监视的抑制以及炎症细胞的募集。

TGF- β 与细胞膜 I 型和 II 型 serine/threonine 激酶受体(TGF- β R I/II)结合,改变 TGF- β R I/II 的结构,磷酸化并激活胞质内的 TGF- β R I 激酶,催化受体活化型 Smads(如 Smad2、Smad3)并使其活化,然后与 Smad-4 结合形成复合物,进入并积聚于细胞核,在细胞核与其他的转化因子结合,调节特定基因的表达。此外,该 TGF- β 受体活化后,还能磷酸化其他信号通路蛋白,影响其他信号的转导。如磷酸化 Shc 的 tyrosine 活化 Ras/MAP-激酶通路;磷酸化 Par6 的 tyrosine 导致上皮极性复合物失活。此外,

该 TGF- β 受体复合物形成一个募集泛素激酶 TRAF6 的信号支架,后者启动 Jun N-terminal 激酶和 P38 MAP-激酶的信号瀑布^[4]。

另外,TGF- β 还有非-Smad 信号转导通路,涉及 phosphatidylinositol 3'-激酶, the tyrosine kinase Src 和小 GTPase Rho。另外,TGF- β RI 也可能被基质金属蛋白酶 TACE 裂解,该裂解方法依赖于泛素连接酶 TRAF6 和蛋白激酶 C 裂解后的 TGF- β RI 的细胞内部分被转座到细胞核,调节肿瘤细胞的侵袭能力^[5]。

2 TGF- β 和肿瘤 EMT

肿瘤细胞进入不同的组织,需要经历一系列的迁移过程。如从原位癌突破局部上皮细胞基底膜,侵入周围组织;通过循环系统转移;在特定位置从循环系统中转移到新的宿主环境。

与肿瘤有关的 EMT 的实验结果存在某些争议,原因在于 EMT 过程的短暂、具有可逆的性质以及较难识别人类肿瘤样本中的正在进行 EMT 转化的肿瘤细胞。某些研究^[3]提示肿瘤的发展过程与 EMT 有关。EMT 是指在特定的生理和病理情况下,具有极性的上皮细胞向间充质细胞转化的现象。

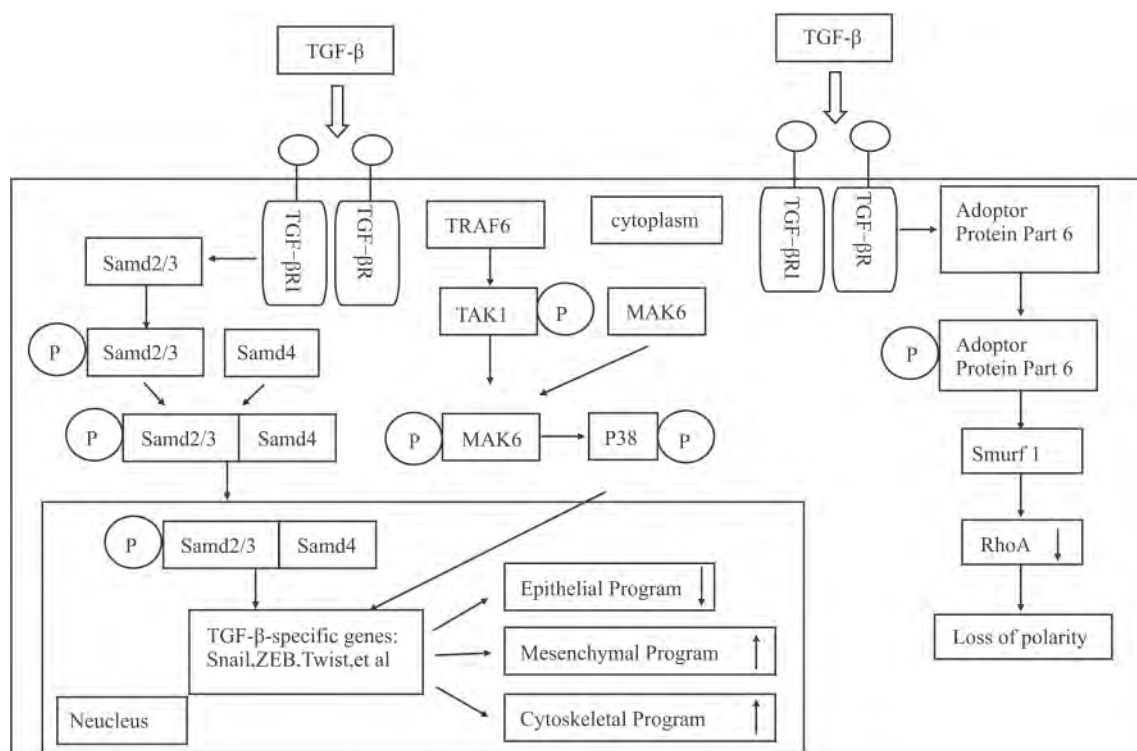


图1 TGF- β 介导 EMT 的信号通路及细胞发生 EMT 变化示意图

EMT 现象最早于 1982 年被发现,研究显示胚胎期和成年期晶状体的上皮细胞在三维胶原凝胶中培养可形成伪足,随后转变为间充质样细胞^[6]。目前认为 EMT 是启动肿瘤转移反应的关键步骤,可参与多种肿瘤(前列腺癌、食管癌及胃癌等)的侵袭、转移过程。

TGF- β 是 EMT 产生的初始诱导者,之后发生了广泛的上皮细胞核的重新编程,产生出 progenitor-like 特征,细胞之间的连接发生了改变,以至于原本正常的上皮细胞之间的连接变得易于弯曲和可塑,造成细胞从上皮组织的脱离^[3]。上述现象是细胞内外一系列结构变化的结果。在细胞内,微丝、微管和中间丝发生了结构变化,而在细胞外,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)也发生了结构改变,这些变化促进了细胞之间形成新的膜连接方式;另外,细胞外基质中的细胞因子、趋化因子等生物活性分子组成和数量也发生了相应的变化。所有这些变化为肿瘤入侵提供了适宜的微环境,而且为肿瘤向周围血管内渗提供了关键步骤。

3 细胞外和细胞膜因子共同调节 TGF- β 诱导的 EMT

沉积于 ECM 中的静止形式的 TGF- β 通过蛋白裂解方式、与基质和细胞膜蛋白的相互作用方式被活化,活化后与受体结合产生信号^[7]。如电离辐射能够活化静止状态的 TGF- β ,诱导乳腺癌肿瘤细胞产生 EMT^[8]。此外,TGF- β 表达的调控、相关受体以及信号介质等,均能够调节肿瘤细胞对 TGF- β 的反应能力以及 EMT 反应的强弱。如 CCN5 蛋白(一种在细胞质与细胞核之间的往来穿梭的蛋白质),在细胞核内,该蛋白与 HDAC1 连接,抑制 TGF- β R II 的表达,因此限制了 TGF- β 信号通路的作用,产生抑制 TGF- β 诱导 EMT 的效应^[9]。与之相反,具有促进生长作用的同源框转录因子 Six1 通过转录方式诱导 TGF- β R I 表达,因此 Six1 活化具有提高 TGF- β 诱导 EMT 的效能^[10]。

最近的研究^[11]表明:其他类型的蛋白,如 SCUBE3,能够与 TGF- β R II 结合,促进肺癌细胞中的 EMT 反应并提高癌细胞的侵袭能力。Klotho 是一种肾转膜蛋白,当 Klotho 的细胞外决定区伸出细胞膜时,能够与 TGF- β R II 结合、阻止信号的转导,抑制 EMT 反应;Klotho 不仅仅拮抗 TGF- β ,而且拮

抗 Wnt 和胰岛素样生长因子 1 信号通路。鉴于这两条信号通路直接或间接地促进了 EMT,因此,Klotho 能够同时阻断多条诱导 EMT 信号通路,具有较为广泛的作用途径^[12]。

与其他研究的广度和深度相比,TGF- β 细胞外和细胞膜调节因子的研究较为薄弱,有必要深入开展这方面的研究工作,确认抑制和促进 TGF- β 的调节因子,了解这些因子的作用机制和效应。然后,从中选择出适宜的研究对象作为药物研究的新靶点,建立一条治疗肿瘤迁徙和扩散新的药物研究途径。

4 TGF- β 诱导 EMT 的信号转导

TGF- β 诱导 EMT 的信号转导涉及一个相互交织、精细调节的蛋白质网络,不仅 Smad 而且非 Smad 通路均可诱导 EMT 的发生,其详细的动力学调节机制正在研究中^[13]。

4.1 Smads 参与 TGF- β 诱导的 EMT 反应

Smads 蛋白存在于胞质中,含有高度保守的 N 端功能域(Mad-Homology domain 1, MH1)和 C 端功能域(MH2),前者可与 DNA 的 CAGAC 序列结合,后者则与转录辅激活蛋白或辅阻遏物相互作用。这两个功能域之间存在一个富含脯氨酸的连接区,含有多个磷酸化位点,属于 Smads 的负调控区。Smads 介导由胞膜受体转导入胞核内的 TGF- β 信号转导,是细胞内 TGF- β 信号转导的关键环节。

体内和体外研究^[14]显示,R-Smads 和 Smad4 介导 TGF- β 诱导的 EMT 反应中的受体的下游信号转导。需要注意的是不同的 Smad 分子具有不同的作用。例如,特异性地去除 Smad3 的角化细胞,产生自发性的鳞状细胞癌;另外,对化学性刺激诱发的皮肤肿瘤,去除 Smad3 后产生抑制肿瘤的保护作用,后者进一步确定 Smad3 介导了众多的致瘤信号传递^[15]。与之相反,角化细胞中去除 Smad2,在化学刺激后,加速细胞的癌变^[15];上述产生的 Smad2-表达阴性的鳞状癌细胞具有 EMT 众多标志的病态分化的特性,E-cadherin 的表达受到抑制^[15]。对于小鼠的皮肤,Smad2 保护上皮细胞避免 EMT。这些研究表明,对于皮肤细胞,Smad3 诱导或促进 EMT 而 Smad2 则抑制 EMT 或维持上皮特征。

与上述的 Smad2 抗 EMT 的保护作用相一致,在人类肾上皮细胞中,使 Smad2 表达沉默或 SARA(一种细胞内的接头蛋白,能够促进 Smad2 连接到 TGF-

β R I 和促进磷酸化过程) 沉默, 促进 EMT 的发生^[16]。SARA 的丢失, 通过泛素连接酶 Smurf2 和蛋白体的降解, 促进 Smad2 的泛素化。WWP2 连接酶也能调节 R-Smad 水平, 影响 EMT 反应^[17]。另有研究^[18]显示, 纤维化肺脏上皮细胞中的 EMT 依赖于 TGF- β 受体与 integrin $\alpha 3 \beta 1$ 受体之间的相互作用, 使磷酸化 Smad2-磷酸化 β -catenin-转录复合因子活化, 在体内和体外产生促 EMT 作用。

核 Smad 复合物的生物学效应受到蛋白激酶的影响。JNK1 有多种同型异构体, 在 TGF- β 引起的 EMT 反应中, 产生不同的影响。JNK2 似乎对 TGF- β 诱导的 EMT 有抑制作用, 如缺乏 JNK2 的细胞对 TGF- β 刺激表现出强烈的 EMT 反应^[3]; JNK1 则显示出促进 EMT 的效应, 如抑制 JNK1 的表达能够显著减轻多种刺激剂诱导的肺气管上皮细胞的 EMT 反应^[19]。JNK1 似乎对带有 AP-1 家族成员的 Smad 转录复合物 (Jun/Fos) 具有催化作用, 该复合物作用的目标基因具有重要的促进肿瘤细胞侵袭以及 EMT 的作用^[20]。另外, TGF- β 诱导转移相关蛋白-1 (metastasis-associated protein 1, MTA-1) 表达, MTA-1 与 AP-1 复合物相互协作, 引起 FosB 的转录^[21]。FosB 与 HDAC2 形成复合物抑制多种乳腺细胞表达 E-cadherin, 介导了 EMT 过程。

除了蛋白激酶, 特异性的 sumo-E3 连接酶 PIAS1 也能调节 TGF- β 诱导的 EMT 反应。TGF- β 下调 PIAS1 并且减少核抑制蛋白 SnoN (一个已知的 Smad 辅助因子) 的 sumo 化修饰^[22]。Sumoylation 的不足打破了原有的平衡, 最终使 SnoN 降解, 导致 TGF- β 诱导的 Smad 复合物能够产生 EMT 过程所必需的基因调节作用。与之相反, E3 泛素连接酶 TIF1 γ 使 Smad4 泛素化, 导致核 Smad 复合物的破坏, 因此产生拮抗 TGF- β 诱导的 EMT 的作用^[23]。

在肺腺癌 A549 细胞中, Smad3 与 HDAC6 的相互作用进一步表明 Smad3 在 TGF- β 诱导的 EMT 中具有促进作用^[24]。用药物抑制剂或 siMRA 抑制 HDAC6 或 Smad3 均会产生抑制 EMT 反应的效应。HDAC6 使微管中的微管蛋白脱去 α -乙酰基, 对细胞的迁移产生某种影响, 但是, 是否 HDAC6-Smad3 共调节也影响微管的运动或影响 EMT 的其他表现, 这些尚不明确。在 A549 细胞的 EMT 过程中, TGF- β 能够下调适配器蛋白胰岛素受体底物 1 (adaptor protein insulin receptor substrate 1, IRS1)^[25]。IRS1

的过度表达阻断 EMT 反应, 而用 RNAi 清除 IRS1 却能显著促进 EMT 反应, RNAi 的作用与提高 TGF- β 诱导 Snail1 和 Snail2 的表达并最终下调 E-cadherin 的表达有关。其详细的分子机制可能包括某种磷酸酶磷酸化 IRS1 或某种其他的降解机制, 或者同时涉及这两个机制^[3]。

4.2 非-Smad 的介导 TGF- β 诱导的 EMT 的路径

在上皮细胞中, TGF- β 通过磷酸化 adaptor protein Par6 形成了一条信号通路, 该通路将 TGF- β 受体直接与蛋白质的翻译后修饰和调节联系在一起^[26]。磷酸化的 Par6 募集泛素连接酶 Smurf1, 该酶降解小 GTPase RhoA, 导致肌动蛋白微丝结构的变化, 破坏了细胞间正常的紧密的连接。

受体连接的泛素连接酶 TRAF6 介导 lysine63-依赖的转化生长因子 β 激活激酶 1 (TGF-beta-activated kinase 1, TAK1) 的多泛素化反应。TRAF6 的酶促反应, 使 MAP-激酶-激酶磷酸化并被激活, 随后激活 p38MAP 激酶和 JNK MAP 激酶^[4]。和 TGF- β R II-Par6 通路类似, 该信号通路也不依赖 Smads, 参与乳腺上皮细胞的 EMT 反应^[27]。然而, TGF β 受体-TRAF6-TAK1 复合物, 除了通过 MAP 激酶途径还可能通过其他的效应器途径, 介导了促进 EMT 的信号转导。例如在初始的间皮细胞里, p38MAP 激酶通过抑制 TAK1 活性和抑制其下游的效应器——即核转录因子- κ B (NF- κ B)。NF- κ B 是一种重要的核转录因子, 其活化对于 TGF- β 诱导的 EMT 过程产生重要的影响^[28]。TRAF6 不仅泛素化和激活 TGF- β 信号下游的 TAK1, 而且也泛素化直接与之连接的 TGF- β R I^[5]。该泛素化促进 TGF- β R I 细胞外受体区 (ICD) 的裂解, 该区包括全部的激酶决定区, 随后促进裂解后的 ICD 区运输到细胞核。在核内, TGF- β R I ICD 通过与共激活因子 p-300 以及包含众多基因的染色质结合, 调节转录过程, 这些基因对 EMT 和肿瘤入侵有促进作用, 如 Snail 基因^[5]。TGF- β R I ICD 与核的 Smad 复合物共同作用于靶基因, 调节 TGF- β 诱导的 EMT 反应。

上述研究结果表明: TGF- β 借助于 Smad 依赖性或非 Smad 依赖性信号转导通路诱导或抑制 EMT 过程关键基因的表达; 细胞外及细胞膜的多种因子则对上述信号转导过程产生调节作用。提示 TGF- β 诱导的肿瘤细胞的 EMT 过程涉及一个复杂而精细的信号转导调控网络。对其中某些关键节点的有效

干预可能为抑制肿瘤细胞的侵袭和迁徙提供新的治疗方法。

参考文献

- [1] Moustakas A , Heldin C H. Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor β [J]. *Semin Cancer Biol* , 2012 22(5-6) : 446 – 54.
- [2] Moustakas A , Heldin C H. The regulation of TGF β signal transduction [J]. *Development* , 2009 136(22) : 3699 – 714.
- [3] Gordon K J , Blobe G C. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease [J]. *Biochem Biophys Acta* , 2008 , 1782(4) : 197 – 228.
- [4] Sorrentino A , Thakur N , Grimsby S , et al. The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner [J]. *Nat Cell Biol* , 2008 10(10) : 1199 – 207.
- [5] Mu Y , Sundar R , Thakur N , et al. TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its clearance and nuclear translocation in cancer [J]. *Nat Commun* , 2011 2: 330.
- [6] Greenburg G , Hay E D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol* , 1982 95(1) : 333 – 9.
- [7] Ten Dijke P , Arthur H M. Extracellular control of TGF β signaling in vascular development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2007 8(11) : 857 – 69.
- [8] Andarawewa K L , Erickson A C , Chou W S , et al. Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition [J]. *Cancer Res* , 2007 67(18) : 8662 – 70.
- [9] Sabbah M , Prunier C , Ferrand N , et al. CCN5 a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor β signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol* , 2011 31(7) : 1459 – 69.
- [10] Micalizzi D S , Wang C A , Farabaugh S M , et al. Home oprotein Six1 increases TGF- β type I receptor and converts TGF- β signaling from suppressive to supportive for tumor growth [J]. *Cancer Res* , 2010 70(24) : 10371 – 80.
- [11] Wu Y Y , Peck K , Chang Y L , et al. SCUBE3 is an endogenous TGF- β receptor ligand and regulates the epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *Oncogene* , 2011 30(34) : 3682 – 93.
- [12] Doi S , Zou Y , Togao O , et al. Klotho inhibits transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice [J]. *J Biol Chem* , 2011 286(10) : 8655 – 65.
- [13] Xu J , Lamouille S , Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition [J]. *Cell Res* , 2009 19(2) : 156 – 72.
- [14] Moustakas A , Heldin C H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression [J]. *Cancer Sci* , 2007 98(10) : 1512 – 20.
- [15] Hoot K E , Lighthall J , Han G , et al. Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression [J]. *J Clin Invest* , 2008 118(8) : 2722 – 32.
- [16] Runyan C E , Hayashida T , Hubchak S , et al. Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenol-type [J]. *J Biol Chem* , 2009 284(37) : 25181 – 9.
- [17] Soond S M , Chantry A. Selective targeting of activating and inhibitory Smads by distinct WWP2 ubiquitin ligase isoforms differentially modulates TGF- β signaling and EMT [J]. *Oncogene* , 2011 30(21) : 2451 – 62.
- [18] Kim Y , Kugler M C , Wei Y , et al. Integrin α 3 β 1-dependent β -catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts [J]. *J Cell Biology* , 2009 184(2) : 309 – 22.
- [19] van der Velden J L , Guala A S , Leggett S E , et al. Induction of a mesenchymal expression program in lung epithelial cells by wingless protein (Wnt) / β -catenin requires the presence of c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK1) [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2012 47(3) : 306 – 14.
- [20] Alcorn J F , Guala A S , van der Velden J , et al. Jun N-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 [J]. *J Cell Sci* , 2008 12(Pt7) : 1036 – 45.
- [21] Pakala S B , Singh K , Reddy S D , et al. TGF- β 1 signaling targets metastasis-associated protein1 , a new effector in epithelial cells [J]. *Oncogene* , 2011 30(19) : 2230 – 41.
- [22] Netherton S J , Bonni S. Suppression of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition like phenotype by a PIAS1 regulated SUMOylation pathway in NMuMG epithelial cells [J]. *PLoS One* , 2010 5(11) : e13971.
- [23] Hesling C , Fattet L , Teyre G , et al. Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells [J]. *EMBO Rep* , 2011 12(7) : 665 – 72.
- [24] Shan B , Yao T P , Nguyen H T , et al. Requirement of HDAC6 for transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Biol Chem* , 2008 283(30) : 21065 – 73.
- [25] Shi J , Wang D M , Wang C M , et al. Insulin receptor substrate-1 suppresses transforming growth factor- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Res* , 2009 69(18) : 7180 – 7.
- [26] Vitoria-Petit A M , Wrana J L. The TGF β -Par6 polarity pathway: linking the Par complex to EMT and breast cancer progression [J]. *Cell Cycle* 2010 9(4) : 623 – 4.
- [27] Yamashita M , Fatyol K , Jin C , et al. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β [J]. *Mol Cell* , 2008 31(6) : 918 – 24.
- [28] Strippoli R , Benedicto I , Foronda M , et al. p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF- κ B during epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Cell Sci* , 2010 123(Pt 24) : 4321 – 31.