

TGF- β /smads 与腹膜纤维化及调节机制系列研究

余学清

(中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

作者简介: 余学清,男,教授,现任中山大学附属第一医院副院长,主要从事慢性肾脏疾病进行性发展机制及防治研究。主要学术任职:国务院学位委员会学科评议组成员,中华肾脏病学会副主任委员,卫生部和广东省肾脏病重点实验室主任,国际肾脏病学会全球发展委员会委员、亚太肾脏病学会执行理事,《American Journal of Kidney Diseases》编委。至今获得各级科研基金 27 项,包括国家自然科学基金杰出青年基金,国家自然科学基金面上项目,科技部国际合作重大专项,教育部创新团队项目,教育部跨世纪优秀人才基金,卫生部临床学科重点项目,卫生行业公益性项目,广东省自然科学基金团队项目等。发表论文 216 篇,其中 SCI 收录 61 篇。获得科研成果奖 5 项,其中国家科技进步二等奖 1 项。E-mail:yuxq@mail.sysu.edu.cn.



余学清

摘 要: 腹膜纤维化是维持性腹膜透析(腹透)病人最重要的并发症,是导致腹膜结构和功能改变的主要原因,也是影响腹透病人长期存活和预后的重要因素。TGF- β 是一种多功能的生长因子,也是多种器官和组织纤维化的关键因子。我们针对 TGF- β 及其信号蛋白 Smads 在腹膜纤维化中的作用机制及调控因素进行了下述几方面的研究:① TGF- β 在腹膜纤维化中的作用及机制;②上调表达 smad7 在腹膜纤维化防治中的作用;③TGF- β /Smad 在急性腹膜炎中的作用及机制;④调节 TGF- β 作用的信号通路及机制。我们系列研究的结果表明,TGF- β 1/Smads 信号通路在腹膜纤维化的过程中发挥了至关重要的作用,上调表达抑制性信号蛋白 Samd7 对于腹透相关腹膜纤维化的防治具有潜在临床应用价值。

关键词: 转化生长因子 β ; 信号蛋白 smads; 腹膜纤维化

中图分类号: R69 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0161-05

A Series Studies on Mechanism of TGF- β /Smads in Peritoneal Fibrosis and Regulating Pathway

YU Xue-qing

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Peritoneal fibrosis is the most important complication in maintenance of peritoneal dialysis (PD), also the main reason of the changes in peritoneal structure and function, the important factor affecting the long-term survival and prognosis in PD patients. TGF- β is a multifunctional growth factor and also a key factor in organ and tissue fibrosis. We had carried out the following series studies focused on the mechanism and regulatory factors of TGF- β and its signaling proteins- Smads, in peritoneal fibrosis: ①the role and mechanism of TGF- β in peritoneal fibrosis; ②Over-expressed Smad7 in prevention and treatment of peritoneal fibrosis; ③the role and mechanism of TGF- β /Smad in acute peritonitis; ④crosstalk between TGF- β and other signaling pathways. The Results showed that, TGF- β 1/Smads signaling pathway played a crucial role in the process of peritoneal fibrosis, and over-expression of inhibitory signaling protein Samd7 had potential clinical value in prevention and treatment of PD-related peritoneal fibrosis.

Key words: transforming growth factor- β ; signaling protein smads; peritoneal fibrosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 161-165]

收稿日期: 2010-02-03

基金项目: 卫生部临床学科重点项目(卫规财函[2007]353); 卫生部行业公益性项目(200802083); 美国百特基金会 Extramural Grant Program; 广州市科技局重大专项(2004Z2-E0041)

腹膜透析(Peritoneal dialysis, PD)是肾脏替代治疗的主要方法之一。PD 作为终末期肾脏病一体化治疗的初始选择方式有很多优点:延缓残余肾功能下降速度,中分子物质清除效果好,提供持续超滤,利于血压控制与液体平衡,病人有更独立的生活方式,就业率高等,尤其 PD 开始的前 3~5 年有较好的生存率和生活质量^[1-2]。然而 PD 过程中,腹膜长期与含糖非生理性的腹透液持续接触、以及腹膜炎的反复发生均可介导腹膜纤维化的发生,导致超滤失败,是病人退出腹膜透析的主要原因之一,也是制约腹膜透析发展的主要障碍,目前尚无有效的解决办法^[3-4]。因此探讨腹膜透析相关腹膜纤维化的发生发展机制、从而寻找有效的治疗措施,是目前亟待解决的一个重要课题。腹膜纤维化是维持性腹透病人最重要的并发症,是导致腹膜结构和功能改变的主要原因,也是影响腹透病人长期存活和预后的重要因素。探讨腹膜纤维化的发生机制及防治措施对于防止腹膜纤维化具有重要的科学意义和临床实用价值。已有的研究显示, TGF- β 是多种器官和组织发生纤维化的关键因子,主要通过其下游信号蛋白 Smads 的活化发挥作用。研究表明多种器官和组织的纤维化如肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化以及腹膜纤维化的发生发展均与 TGF- β /Smad 信号蛋白活化,诱导上皮或间皮细胞向肌成纤维细胞的转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度积聚有关^[5-6]。我们针对 TGF- β 及其信号蛋白 smads 在腹膜纤维化中作用机制及调控因素进行了系统的研究,揭示了 TGF- β /smads 在腹膜纤维化中的主要作用和机制,为进一步探讨防止腹膜纤维化的措施奠定了坚实的基础和理论依据。

1 TGF- β /Smads 的生理功能

TGF- β 转化生长因子 β (transforming growth factor β) 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 ECM 形成和抑制免疫反应等,是促进多种组织与器官纤维化的关键性因子。TGF- β 超家族成员主要有 5 种异构体(TGF- β 1~ β 5), TGF- β 1~ β 3 广泛存在于哺乳类动物。腹膜间皮细胞可合成 TGF- β 1 和- β 2 (但不合成 TGF- β 3)。TGF- β 具

有三种受体类型: TGF- β receptor I (T β R I)、TGF- β receptor II (T β R II)、TGF- β receptor III (T β R III)。T β R I、T β R II 具有膜结合丝氨酸/苏氨酸的活性。T β R II 可直接结合配体,随后 R I 与 R II 受体结合,并磷酸化受体胞内结构域,进而传递信号。

TGF- β 1 存在众多的下游信号通路,而且不同通路之间存在着交互和功能整合,形成了极为复杂的信号传导网络,其中 Smads 通路在调控 TGF- β 1 介导的 ECM 积聚过程中处于十分重要的地位。Smads 家族按功能可分成 3 类:第一类是 R-Smads (Receptor activated Smads),包括 Smad 1-3、Smad5、Smad8,第二类 Co-Smads (Common Smads),包括 Smad4、Smad10;第三类为 I-Smads (Inhibitory Smads),包括 Smad6、Smad7。其中 Smad2、Smad3、Smad4、Smad7 参与 TGF- β s 的信号转导。

Smad2/3 属受体调节型 Smads,它的磷酸化是 Smad 通路激活的最重要一步及标志,细胞内 p-Smad2/3 表达的多少即意味着该通路激活的程度。Smad7 属抑制型 Smads,它能反馈性抑制 Smad 通路,进而抑制 TGF- β 1 介导的 ECM 的合成^[7]。

2 TGF- β 在腹膜纤维化中的作用及机制

TGF- β 1 是重要的介导细胞对组织损伤的强效致纤维化因子,表现为:①对纤维化形成细胞的初始激活作用,②促进 ECM 的产生,③改变分泌基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制剂的活性,④增强靶细胞对细胞因子的反应性等。TGF- β 对肝炎肝损伤后肝纤维化(硬化)及其他脏器纤维化如心脑血管硬化、肺纤维化、肾纤维化、皮肤纤维瘢痕等形成均具有重要起始促进作用。

我们的研究发现, TGF- β 在腹膜纤维化过程中也具有重要作用。在腹膜炎模型大鼠腹腔局部不仅大量炎症细胞浸润并高表达 TGF- β 1,腹膜间皮细胞也高表达 TGF- β 1,并且腹腔液中 TGF- β 1 的水平显著升高而血液中 TGF- β 1 的水平显著降低,提示腹腔局部是腹腔 TGF- β 1 的主要来源^[8-9]。同样,在大鼠腹膜纤维化模型的研究中也发现,随着腹膜纤维化的进程,腹膜组织中 TGF- β 及其信号蛋白 Smads 的表达水平显著增高,包括浸润的炎症细胞和腹膜间皮细胞^[6,10]。上述结果提示 TGF- β 可能参与了腹膜纤维化的发生发展过程。

腹膜纤维化最特征性的改变是腹膜的增厚,即细胞外基质的过度沉积。我们的研究显示高糖和 LPS 诱导的腹膜纤维化模型大鼠 4 周时腹膜组织明显增厚、胶原 I 表达明显上调,同时腹膜组织 TGF- β 1/Smad 信号通路高度活化,而阻断 TGF- β /Smad 信号通路则显著减轻大鼠腹膜的增厚和胶原 I 的上调表达^[6,11-12]。体外的研究证实,高糖透析液可以显著上调大鼠腹膜间皮细胞结缔组织生长因子(CTGF)的表达,其可能作为 TGF- β 下游的靶蛋白促进细胞外基质合成增加和降解减少,导致细胞外基质沉积,介导腹膜纤维化的发生^[11,13]。此外,高糖透析液和 LPS 均能促进腹膜 VEGF 的表达、促进腹膜新生血管的增生,从而增加腹膜转运的有效滤过面积,减少超滤量^[14]。

3 上调表达 Smad7 在腹膜纤维化防治中的作用

众所周知,TGF- β 主要通过其信号蛋白 Smads 尤其是受体调控蛋白 Smad2/3 发挥生物学效应,而抑制性信号蛋白 Smad7 可以通过抑制 Smad2/3 的活化、Smad3/Smad4 异源复合物的形成及核转位,阻断 TGF- β /Smad 信号通路的活化。其他学者的研究证实,上调表达 Smad7 可显著改善 Smad2/3 活化所致的囊性肺纤维化的形成。

我们在体外研究证实^[15-17],TGF- β 可显著刺激腹膜间皮细胞 Smad2/3 的上调表达和活化,同时,刺激部分炎症因子如 IL-1、TNF- α 、ICAM-1 等的上调表达,腹膜间皮细胞发生转分化,细胞外基质增多。基因转染上调表达 Smad7 可显著抑制 Smad2/3 的活化及入核,抑制腹膜间皮细胞的转分化,显示 Smad7 在防止腹膜间皮细胞转分化中的重要作用。

在大鼠腹膜纤维化模型^[18-19],我们的研究证实,基因转染上调大鼠腹膜组织表达 Smad7 不仅可以显著抑制高糖和 LPS 介导的大鼠腹膜纤维化模型腹膜组织 TGF- β 1/Smad 信号通路的高度活化,还可显著抑制腹膜间皮细胞的转分化过程、抑制细胞外基质的沉积、减少腹膜炎症细胞的浸润,预防或抑制大鼠腹膜纤维化的发生,改善腹膜功能。

进一步的研究发现^[20],在已经建立的大鼠腹膜纤维化模型,基因转染上调表达 Smad7 同样可

显著抑制腹膜组织 TGF- β /Smads 的表达及其信号蛋白的活化,抑制腹膜组织炎症细胞的浸润及上皮细胞的转分化,改善腹膜的超滤和溶质转运,部分逆转损害的腹膜功能,提示上调表达抑制性信号蛋白可能具有潜在的临床治疗价值。

4 TGF- β /Smad 在急性腹膜炎中的作用及机制

与腹膜纤维化模型结果相反,在大鼠急性腹膜炎模型中我们的研究发现^[9],基因转染 Smad7 上调表达后,可以显著抑制大鼠腹膜组织局部 TGF- β /Smad 的表达和信号蛋白的活化,但是,腹膜组织的局部炎症反应显著增强,表现炎症细胞浸润增多,甚至在局部形成小脓肿,炎症因子表达增高,腹膜超滤功能显著下降,提示 TGF- β /Smad 可能是一把双刃剑,在急性腹膜炎模型可能有不同的机制,即不是抑制炎症而促进炎症作用。而我们应用抗生素治疗仍然取得了比较好的效果,可较好地保护急性腹膜炎模型的腹膜功能^[21]。为此我们进行相关的机制研究^[16-17],结果发现,TGF- β 1 可通过抑制 NF- κ B 的活化产生抑炎作用,也通过 p38MAPK 信号通路的活化来产生促炎作用的。在急性腹膜炎状态,上调表达的 TGF- β 1 既可刺激腹膜间皮细胞转分化,进而发生纤维化,同时,又可抑制炎症细胞产生炎症因子,抑制炎症反应,上调表达 Smad7 过度抑制 TGF- β 1 的表达,不但没能抑制炎症反应,反而加重了炎症反应,提示将来在应用 Smad7 防治腹膜纤维化的过程中应密切注意急性炎症状态下可能产生的反效果^[22]。

5 调节 TGF- β 作用的信号通路及机制

5.1 MAPK 信号转导通路

MAPK 信号转导通路主要有细胞外信号调节激酶(extracellular regulated Kinase, ERK)、c-jun 氨基酸末端激酶(JNKs)和 p38 通路。我们的研究^[23-24]显示 JNK 信号通路的活化对 TGF- β 1 诱导的大鼠腹膜间皮细胞的转分化过程具有重要的调控作用:TGF- β 1 可以早期活化 JNK 信号通路并诱导大鼠腹膜间皮细胞发生转分化,而 JNK 的抑制剂能够抑制 TGF- β 1 诱导的大鼠腹膜间皮细胞 α -SMA、胶原 I 的表达上调以及 E-钙黏素的表达下

调。JNK 通路的活化对 TGF- β /Smad 信号通路介导的 EMT 具有易化作用,而该作用很可能是通过磷酸化 Smad 蛋白中间的连接区来实现的。我们的研究还显示 TGF- β 1 的促炎作用是 p38 信号通路介导的;TGF- β 1 可以上调 PMCs 单核细胞趋化因子(MCP-1)的表达,而应该用抑制剂阻断 p38 的磷酸化可以显著抑制 TGF- β 诱导的 MCP-1 的上调表达,但是不能抑制 TGF- β /Smad 信号通路的活化,提示 p38 信号通路是作为 TGF- β 下游的信号通路介导其促炎作用的。

5.2 Notch 信号通路^[25]

Notch 信号通路是一条在多种细胞分化过程中起关键作用的通路。Notch 作为一种跨膜蛋白受体,由配体激活后调控 Hes 等基因的表达。我们的研究显示在正常腹膜组织中有 Notch 配体 Jagged-1 和 Notch 通路负性调节因子 Numb 的表达;而高糖诱导的大鼠腹膜纤维化模型中,腹膜组织 Jagged-1、Notch-1 和 Hes 的表达均上调、Numb 的表达下调,证明了腹膜纤维化过程中有 Notch 信号通路的活化。进一步的研究显示,TGF- β 1 能够以剂量和时间依赖的方式活化大鼠 PMCs 的 Notch 信号通路,证实 Notch 信号通路是 TGF- β 1 信号的下游。而阻断 Notch 信号可以减轻腹膜纤维化大鼠模型腹膜纤维化的程度、抑制 TGF- β 1 诱导的大鼠 PMCs α -SMA、COL- I 和 VEGF 的表达,表明 Notch 信号调节腹膜纤维化的机制是通过介导 TGF- β 1 诱导大鼠 PMCs 的转分化过程实现的。关于 Notch 信号通路与 Smad 信号通路之间的关系我们仍在研究之中。

我们系统研究了 TGF- β 1/Smads 腹膜纤维化过程中的表达及调控机制,结果表明,TGF- β 1/Smads 腹膜纤维化的过程中发挥了关重要,上调表达抑制性信号蛋白 smad7 对于腹膜透析相关腹膜纤维化的防治具有重要的潜在临床应用价值,也得到了国际专家的肯定^[26]。

参考文献:

- [1] 马祖等,郑智华,余学清,等. 血液透析和腹膜透析患者生存质量的多中心调查[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(6):400-405.
- [2] 郑智华,马祖等,郝元涛,等. 持续性非卧床腹膜透析患者生存质量影响因素的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2005,21(5):290-294.
- [3] 毛海萍,余学清. 透析患者残存肾功能的临床重要性

- 及保护策略[J]. 中华肾脏病杂志,2007,23(7):471-473.
- [4] 孙玉玲,Yung S, 余学清,等. 氨基酸腹膜透析液与传统腹膜透析液对腹膜间皮细胞功能的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2004,20(1):37-41.
- [5] 窦献蕊,余学清,李晓艳,等. TGF- β 1 及其信号蛋白在大鼠腹膜纤维化模型腹膜组织中的表达及可能作用[J]. 中华医学杂志,2005,85(37):2613-2618.
- [6] 常洁,姜宗培,张海燕,等. NADPH 氧化酶介导血管紧张素 II 诱导的腹膜间皮细胞转分化及细胞外基质积聚[J]. 中华肾脏病杂志,2007,23(5):328-333.
- [7] 段文娟,余学清,窦献蕊,等. 上调表达 Smad7 显著抑制 TGF- β 介导的大鼠腹膜间皮细胞 Smad2 的表达[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(10):1873-1878.
- [8] 王 欣,余学清,贾占军,等. 转化因子 β 1 及其信号蛋白在大鼠急性腹膜炎模型腹膜组织中的表达及作用[J].中华肾脏病杂志, 2004, 20(6): 391-395.
- [9] Wang X, Nie J, Jia Z, et al. Impaired TGF- β signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. Coli in rats [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(2): 399-412.
- [10] 窦献蕊,余学清,王文健,等. 一种新的大鼠慢性腹膜纤维化动物模型的建立[J]. 中华肾脏病杂志,2004, 20(6):446-449.
- [11] 杨琼琼,叶任高,阳晓,等. 含糖透析液对慢性腹膜透析大鼠腹膜功能及间皮细胞形态的影响[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(8):1377-1380.
- [12] 窦献蕊,余学清,郝文科,等. 上调表达 smad7 对大鼠腹膜纤维化模型腹膜间皮细胞转分化的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2006,22(10):612-616.
- [13] 郭群英,李晓艳,余学清,等. 腹膜透析液诱导结缔组织生长因子在大鼠腹膜间皮细胞表达[J]. 中华肾脏病杂志,2006,22(2):114-118.
- [14] 彭卫生,周巧玲,余学清,等. 不同浓度葡萄糖透析液及 LPS 对腹膜透析大鼠腹膜组织 VEGF 及血管增生的影响及其意义[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(17):2085-2088.
- [15] 杨琼琼,余学清,段文娟,等. TGF- β 1 显著上调其信号蛋白 Smad2 在腹膜间皮细胞中的表达[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(10):1790-1793.
- [16] 冯明亮,王 欣,李晓艳,等. 转化生长因子 β 1 对脂多糖刺激大鼠腹膜间皮细胞上调表达促炎症因子的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2007,23(3):194-198.
- [17] 叶 玲,陈伟英,王 欣,等. 转化生长因子 β 1 在大鼠腹膜间皮细胞中的促炎作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2009,25(6):420-424.
- [18] Nie J, Hao W, Dou X, et al. Effects of Smad7 overexpression on peritoneal inflammation in a rat

- peritoneal dialysis model [J]. *Perit Dial Int*, 2007, 27 (5): 580-588.
- [19] Nie J, Dou X, Hao W, et al. Smad7 gene transfer inhibits peritoneal fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2007, 72 (11): 1336-1344.
- [20] Sun Y, Zhu F, Yu X, et al. Treatment of established peritoneal fibrosis by gene transfer of Smad7 in a rat model of peritoneal dialysis [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 30(1): 84-94.
- [21] 贾占军,余学清,王欣,等. 抗生素治疗对急性腹膜炎大鼠腹膜组织炎症因子表达及腹膜转运功能的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(7): 1298-1304.
- [22] 王欣,余学清,贾占军,等. 超声介导上调 Smad7 表达对腹膜炎大鼠腹膜炎症和功能的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23(2): 76-81.
- [23] Liu Q, Mao H, Nie J, et al. Transforming growth factor β 1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells [J]. *Perit Dial Int*, 2008, 28(Suppl 3): S88-95.
- [24] 刘庆华,余学清,聂静,等. JNK 对转化生长因子 β 1 所致大鼠腹膜间皮细胞转分化的调控作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24(7): 487-492.
- [25] Zhu F, Li T, Qiu F, et al. Preventive effect of notch signaling inhibition by a γ -secretase inhibitor on peritoneal dialysis fluid-induced peritoneal fibrosis in rats [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2): 650-659.
- [26] Fraser D. SMAD7: At the interface of TGF- β and proinflammatory signaling [J]. *Perit Dial Int*, 2007, 27 (5): 523-525.

(编辑 刘清海,张恩健)

(上接第 160 页 from page 160)

- 2005, 31(4): 857-859.
- [39] Li CM, Kosmorsky G, Zhang K, et al. Optic atrophy and sensorineural hearing loss in a family caused by an R445H OPA1 mutation [J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 138(3): 208-211.
- [40] Gao Q, Liu Q, Ma P, et al. Effects of direct intravitreal dopamine injections on the development of lid-suture induced myopia in rabbits [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244(10): 1329-1335.
- [41] Cui D, Trier K, Chen X, et al. Distribution of adenosine receptors in human sclera fibroblasts [J]. *Mol Vis*, 2008, 14(9): 523-529.
- [42] Lin Z, Chen X, Ge J, et al. Effects of direct intravitreal dopamine injection on sclera and retina in form-deprived myopic rabbits [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2008, 24(6): 543-550.
- [43] Zhong XW, Ge J, Deng WG, et al. Expression of pax-6 in rhesus monkey of optical defocus induced myopia and form deprivation myopia [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(5): 722-726.
- [44] Yang Z, Lan W, Ge J, et al. The effectiveness of progressive addition lenses on the progression of myopia in Chinese children [J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2009, 29(1): 41-48.
- [45] Yin Q, Hu A, Liang Y, et al. A two-site, population-based study of barriers to cataract surgery in rural china [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(3): 1069-1075.

(编辑 张恩健,刘清海)