

Fox L在TGF- β /Smad通路中对肝星状细胞活化的影响

熊飞, 李昌平

■背景资料

肝纤维化是一个可逆的瘢痕修复过程, 是所有肝病末期并发症的基础, 逆转纤维化的研究将对肝病的治疗产生革命性的影响, 而在肝纤维化中肝星状细胞的激活是整个的肝纤维化的核心事件, 而其激活主要依赖于TGF- β /Smad通路。

熊飞, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 论文的文献检索分析及撰写由熊飞完成, 选题与审校由李昌平完成。

通讯作者: 李昌平, 教授, 646000, 四川省泸州市太平路25号, 泸州医学院附属医院消化内科。lichangping1965@sina.com
电话: 0830-3165003 传真: 0830-2392753

收稿日期: 2009-04-06 修回日期: 2009-07-17

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

Role of forkhead L2 in transforming growth factor-beta /Smad signaling pathway-mediated activation of hepatic stellate cells

Fei Xiong, Chang-Ping Li

Fei Xiong, Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. lichangping1965@sina.com

Received: 2009-04-06 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

Abstract

Hepatic fibrosis is characterized by an abnormal hepatic deposition of extracellular matrix (especially collagen). As hepatic fibrosis progresses, cirrhosis will develop. Hepatic stellate cells are the major source of the extracellular matrix (ECM). The activation of hepatic stellate cells is the central event in the development of hepatic fibrosis. The transforming growth factor-beta (TGF- β)/Smad signaling pathway plays an important role in regulating the synthesis of ECM in stellate cells. Recent studies found that forkhead L2 (Fox L2), belonging to the forkhead family, was able to act as a molecular chaperone for Smad complex. Thus, it may enhance the stability between Smad complex and target genes.

Key Words: Fox L2; TGF- β /Smad signaling pathway; Hepatic stellate cell; Helix-turn-helix

Xiong F, Li CP. Role of forkhead L2 in transforming growth factor-beta /Smad signaling pathway-mediated

activation of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2396-2399

摘要

肝纤维化是肝脏内弥漫性细胞外基质(特别是胶原)过度沉积的结果, 如果肝纤维化进行性发展, 常演变为肝硬化。而肝星状细胞的激活则是肝纤维化的核心事件, 是细胞外基质分泌的主要细胞, 其中的TGF- β /Smad通路是肝星状细胞内主要的信号传导通路之一, 在细胞外基质的合成中起着重要作用。由于在该信号通路下游Smad复合物只能与靶基因形成松散连接, 所以必然存在着相应的协同蛋白质使整个复合物紧密连接, 而最近研究发现, Fox L转录因子中的Fox L2可能与整个Smad复合物形成了分子伴侣关系, 他有可能加强了Smad复合物与靶基因的结合的稳定性。

关键词: Fox L2; TGF- β /Smad通路; 肝星状细胞; 螺旋-转角-螺旋

熊飞, 李昌平. Fox L在TGF- β /Smad通路中对肝星状细胞活化的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2396-2399

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2396.asp>

0 引言

肝星状细胞在肝纤维化的形成过程中据核心地位^[1-2], 他的激活, 增殖并合成分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等多种物质, 使ECM合成和降解失衡, 在肝脏内过度沉积, 使肝脏结构发生改变, 导致肝纤维化的发生^[3-4]。转化生长TGF- β /Smad(transforming growth factor-beta/Smad, TGF- β /Smad)通路则是肝星状细胞内的主要信号通路, 在胶原等ECM的合成与分泌中起着重要作用^[5], 他的下游信号通路包括了一组被称为Smad的双功能分子家族, 在纤维化发生的许多肝星状细胞的下游信号通路中, 其细胞内和细胞外信号都集中于Smad, 从而进一步微调和增强TGF- β 的作用^[6-7], 但Smad复合物与靶基因结合是松散结合^[8], 必然存在相应的协同蛋白质使其紧密连接, 而Fox L中的Fox L2可能扮演

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

了这一角色^[9], 本文将对这一问题进行综述.

1 Fox L基因及其相关蛋白质

Fox基因能编码一类被命名为forkhead box的转录因子, 这类转录因子都含有一个非常保守的110个氨基酸的DNA结合区域, 被称作forkhead box. 该功能域又被形象的称为winged helix, 通常由3个 α -螺旋构成, 中间用2个多聚肽环进行连接, 为经典的螺旋-转角-螺旋结构^[10], 类似于噬菌体的DNA阻抑结构^[11]. 从酵母菌到人类的真核生物中都能发现forkhead box转录因子, 他们在细胞的多种生物学效应中, 如代谢, 生长, 癌症的发生, 以及衰老中都扮演着极为重要的角色, 根据保守的forkhead box结构域的不同, 这类蛋白质被分成了17个亚家族(A-Q)^[12]. 其中的Fox L被分为了Fox L1和Fox L2, 2种转录因子在forkhead box上的微小差别导致他们在功能上的差异^[13]. Fox L1又名Fkh6, 其基因定位于16q24, 长度是3.189 kb, 他编码的蛋白质拥有345个氨基酸, 位于细胞核中, 通常定位于肠道中间叶细胞^[14]. 但最近研究发现, 肝脏受损后均会刺激干细胞转化为肝细胞和胆管扁平细胞, 干细胞的位移和其子细胞会高度表达Fox L1转录因子, 他很有可能是肝干细胞的一种全新标志物, 由于干细胞是通过旁分泌对邻近的肝星状细胞和成纤维细胞产生影响, 所以实际上他有可能参与肝纤维化的形成过程, 但是研究中也发现, 在肝星状细胞和成纤维细胞中没有发现Fox L1的高度表达, 这有可能暗示其高表达的干细胞来源于肠道, 同时也说明Fox L1可能并不参与肝星状细胞的活化^[15]. Fox L2定位于3q23, 长度为2.736 kb, 其蛋白质产物含有376个氨基酸, 研究表明其是睑裂狭小、倒转型内眦赘皮和上睑下垂综合征(blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome, BPES)的致病基因, 但在卵巢早衰患者中也可检测到Fox L2基因突变, 所以他可能是卵巢发育中的一种早期调控因子. 该转录因子可以与Smad3的MH2区结合, 能够协同激活素, 进行正性调控^[9].

2 TGF- β /Smad通路

受体耦联丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase, STK)信号传导主要指TGF- β /Smad通路, 该通路特点是其受体具有STK活性, 通路由TGF- β 及其受体, 以及受体底物Smad蛋白家族信号分子等组成^[16].

TGF- β 是一种分泌性的多肽信号分子, 广泛存在于从线虫到哺乳动物中. 由至少40种细胞因子组成, 可进一步划分为亚家族, 包括: TGF- β 亚族, 如TGF- β 1-6; 激活素亚家族, 如activinA和activinB; 抑制素亚族, 如inhibinA和inhibinB; 骨形态形成蛋白亚族(bone morphogenetic protein, BMPs), 如BMP2和BMP4; 米勒抑制物(mullerian inhibitory substance, MIS). TGF- β 结合的受体依据结构和功能不同被分为3型: TGF- β R I, TGF- β R II及TGF- β R III^[17-18]. 通常情况下, TGF- β R I和TGF- β R II均为单次跨膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体, 胞质区含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域, 具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性; 而TGF- β R III通常不具备激酶活性, 不直接参与信号传导, 主要调节TGF- β 与受体的结合^[19,22]. TGF- β R I和TGF- β R II在结构上有相似之处, 但TGF- β R II的相对分子质量较大, 约为75 kDa, 这使得他的内外区结构较长^[21], 不过他们最显著的区别是TGF- β R I的胞质区蛋白激酶结构的N端, 存在一个含丝氨酸和甘氨酸的结构域, 被称为GS结构域. 该结构域有多个磷酸化位点, 其中主要识别点是一段保守的Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly序列^[21].

受体底物Smads蛋白质家族是一类连接受体到基因序列的信号分子, 目前发现了至少9种, 根据其结构和功能的不同分为3类: (1)受体调节型Smad, 包括Smad1, 2, 3, 5, 8, 这一类蛋白质家族多在特定的TGF- β 超家族成员的信号通路中起作用; (2)共同介质型, Smad4, 能够和R-Smad形成二聚体, 参与所有的TGF- β 信号传导. (3)抑制型Smad, 主要是Smad7, 6, 是一类可以发挥负性调控机制的信号分子^[23-24].

R-Smad的基本结构, 由3部分组成: MH1、连接区及MH2区. MH1区主要与靶基因结合; MH2区则主要与Smad和受体结合, 以及参与形成Smad多聚体; 而连接区相对多变, 富含脯氨酸, 他将MH1区和MH2区连接到一起, 有多个磷酸化位点, 能够通过磷酸化抑制Smad的转录, 为其负调控区^[25,31].

虽然TGF- β /Smad通路含有不同种类的细胞因子, 但是各条通路的传导途径基本一致, 下面将对该通路过程进行简要的概述. 以TGF- β 因子为例, TGF- β 通常以无活性的形式分泌, 通过TGF- β 激活酶激活, 首先与细胞表面的已经自我磷酸化的TGF- β R II形成二聚体, 然后TGF- β R I识别此二聚体, 并与之结合形成由

■研发前沿

目前肝纤维化的细胞学及分子水平的发生机制是研究热点, 对肝星状细胞的活化也是研究的重点之一. 由于在肝星状细胞TGF- β /Smad信号通路下游, Smad复合物与靶基因的连接是松散连接, 所以近些年的研究发现Fox L中的Fox L2可能促进Smad复合物与靶基因连接的稳定性.

■创新盘点

本文主要从分子水平阐述在肝星状细胞TGF- β /Smad信号通路下游, Fox L2如何利用其自身的螺旋-转角-螺旋结构促进Smad复合物与靶基因连接的稳定性.

■名词解释

螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix): 为蛋白质的二级结构, 其基本特征为两端均是数个 α -螺旋, 中间用 β -转角连接, 常常作为用蛋白质与靶基因的连接结构。

TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β 组成的受体异聚体复合物, 此时TGF- β RI中的GS区得以磷酸化, 激活STK, 使得TGF- β RI的空间结构改变更有利于激活, 然后R-Smad在膜偶联相关蛋白-Smad受体激活相关蛋白(smads anchor for receptor activation, SARAs)的介导下, 连接到上述受体异聚体复合物, 并同时被磷酸化, 磷酸化的R-Smad和Smad4结合, 形成复合物, 将信号转位到细胞核中. 该复合物通过Smad4与Smad3的MH1区的发夹样结构与靶基因发生松散的连接, 而后在局部的环境影响下, MH2区的转录激活序列与靶基因形成紧密的结合, 最终实现整个信号传导^[26-28,30].

3 Fox L2对肝星状细胞的潜在影响

在整个肝纤维化的进程中, 位于Disse腔中的肝星状细胞在肝纤维化的过程中起着关键作用. 肝星状细胞是ECM的主要来源, 他的活化需要2个时相, 即启动阶段和持续阶段^[30]. 其激活则是通过了TGF- β /Smad通路进行的, 通过TGF- β 作用于该信号通路, 使Smad复合物与靶基因的結合, 开始转录的过程. 最近研究中发现Fox L2与Smad3的复合物有可能共同作为一种转录调控元件, 同时调控卵泡素的合成, 由于在该研究中Fox L2与Smad3结成了分子伴侣关系, 这极有可能暗示在肝星状细胞的活化中, 需要借助Smad3信号分子的TGF- β 也许同样需要Fox L2的参与^[9]. 所以推测Fox L2在肝星状细胞的TGF- β /Smad通路中可能有2方面的作用.

3.1 加强R-Smad复合物与靶基因结合的稳定性在TGF- β /Smad通路的下游, R-Smad/Co-Smad的复合物通过MH1区与DNA上的Smad蛋白结合元件(smads binding element, SBP)发生松散结合, 由于该结构通常是位于包括I型胶原纤维, PAI-I等的启动子中, 实际而言, 他通过SBP识别了启动子, 诱导了RNA聚合酶II与启动子的结合, 从而开始整个转录的过程, 但是如果只是松散的连接, 那么R-Smad/Co-Smad的复合物将随时可能从DNA的大沟上滑脱, 将无法有效启动整个转录过程, 最后使肝星状细胞活化处于停滞状态^[32], 而根据Blout *et al*的研究发现^[9], Fox L2是通过与Smad3结合共同发挥效应, 由于在肝星状细胞的活化中, TGF- β 发挥效应也借助与Smads信号传导, 那么很可能Fox L2将会促使Smad3/Smad4的复合物与靶基因最终紧密连接, 从而诱导RNA聚合酶II与靶基因启动子的连接,

开启整个转录过程^[9]. 而从Fox这一类蛋白质家族来看, 他们通常有一个螺旋-转角-螺旋结构, 从结构决定蛋白质的功能来说, 他本身就像一个大钳子, 能够牢固的钳持在DNA的大沟中^[10], Fox L2实际上有可能通过此结构加强了Smad复合物与靶基因的连接. Fox家族中的FoxO1连接到DBE1 DNA的X线晶体衍射结构, 虽然在一级结构上与Fox L2有所差别, 但都拥有类似的螺旋-转角-螺旋结构, 从该结构可以看到2个 α -螺旋分别与DNA链的磷酸骨架和氨基酸侧链通过氢键连接, 正好形成一个夹角, 从而使FoxO1能够与靶基因牢固结合, 而从中也可以推测出拥有同样螺旋-转角-螺旋结构的Fox L2也有可能是通过类似方式与靶基因结合^[33].

3.2 稳定DNA链的作用 在TGF- β /Smad通路中, 需要使染色质松弛, 即染色体重塑的过程^[34]. 这个过程中可能会使组蛋白与DNA的相互作用减弱, 但是假设组蛋白在转录中不在与靶基因连接, 那么必然需要有类似结构的蛋白质能够起到暂时保持DNA链的空间稳定作用, 使转录能够正常进行. 由于组蛋白中也存在与Fox L2相似的螺旋-转角-螺旋结构, 所以Fox L2的连接也有可能起到暂时稳定DNA链的作用.

4 结论

逆转整个肝纤维化, 在控制原发病的基础上, 其基本的核心思想就是如何控制肝星状细胞的活化, TGF- β /Smad通路则是激活肝星状细胞主要信号通路之一, 如果能够通过相应实验证实Fox L2在整个通路中所起到的作用, 将对未来研究抗肝纤维化的药物及其作用靶点, 提供有益的信息.

5 参考文献

- 1 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 2 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- 3 Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-768, viii
- 4 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 5 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 6 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells.

- J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 7 Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 9945-9954
 - 8 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
 - 9 Blount AL, Schmidt K, Justice NJ, Vale WW, Fischer WH, Bilezikjian LM. FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription. *J Biol Chem* 2009; 284: 7631-7645
 - 10 Hansen IA, Sieglaff DH, Munro JB, Shiao SH, Cruz J, Lee IW, Heraty JM, Raikhel AS. Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochem Mol Biol* 2007; 37: 985-997
 - 11 Pabo CO, Lewis M. The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature* 1982; 298: 443-447
 - 12 Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000; 14: 142-146
 - 13 Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 1495-1500
 - 14 Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schütz G. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997; 11: 1583-1595
 - 15 Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondell K, Kaestner KH, Greenbaum LE. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 2009; 49: 920-929
 - 16 ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273
 - 17 Jayaraman L, Massague J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 40710-40717
 - 18 Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Doré JJ Jr, Leof EB. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4750-4759
 - 19 Luwor RB, Kaye AH, Zhu HJ. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and brain tumours. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 845-855
 - 20 Lenferink AE, Magoon J, Pepin MC, Guimond A, O'Connor-McCourt MD. Expression of TGF-beta type II receptor antisense RNA impairs TGF-beta signaling in vitro and promotes mammary gland differentiation in vivo. *Int J Cancer* 2003; 107: 919-928
 - 21 Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 1997; 16: 1970-1981
 - 22 Doi H, Shibata MA, Kiyokane K, Otsuki Y. Downregulation of TGFbeta isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2003; 33: 7-16
 - 23 Massagué J. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996; 85: 947-950
 - 24 Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
 - 25 Nicolás FJ, Hill CS. Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene* 2003; 22: 3698-3711
 - 26 Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002; 7: 1191-1204
 - 27 Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647
 - 28 Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6954-6967
 - 29 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
 - 30 Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 176-184
 - 31 Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369
 - 32 Lönn P, Morén A, Raja E, Dahl M, Moustakas A. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* 2009; 19: 21-35
 - 33 Brent MM, Anand R, Marmorstein R. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure* 2008; 16: 1407-1416
 - 34 Aalfs JD, Kingston RE. What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 548-555

■同行评价

本综述对肝纤维化逆转的一些作用机制的研究提供了重要的实验基础, 值得进一步研究。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-08-18)