

特约综述

抑制性 Smad 蛋白对 TGF- β 超家族信号转导的调控及其生理意义

严晓华¹ 章隽宇² 陈晔光^{1*}(1 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; ² 南昌大学生命科学学院, 南昌 300031)

摘要 转化生长因子- β (transformation growth factor- β , TGF- β) 是一类在结构上相关的转化生长因子, 目前发现在哺乳动物有超过 30 个细胞因子可能属于 TGF- β 超家族。它们广泛参与各种细胞作用, 并因此在胚胎发育与维持组织平衡中发挥重要功能。TGF- β 超家族可以通过依赖或不依赖 Smad 蛋白的方式传递信号; 其信号转导过程受到多层次的精确调控。其中, 抑制性 Smad 蛋白 (inhibitory Smads, I-Smads), 包括 Smad6 和 Smad7, 是 TGF- β /BMP 信号转导过程的关键负调控分子, 并且介导 TGF- β /BMP 信号与其它信号转导通路之间的 crosstalk。根据生化实验的研究结果, Smad7 是 TGF- β 超家族广谱的抑制剂, 而 Smad6 主要是特异性针对 BMP 亚家族的。近年来, 利用基因敲除、RNA 干扰或者转基因的方法, 人们对 I-Smads 的生理作用有了越来越多的了解, 同时也发现 Smad7 与 TGF- β 介导的生理过程 (如细胞增殖与凋亡, 免疫监督与心血管发育等) 具有紧密的联系。此外, I-Smads 还被发现与 TGF- β 相关疾病密切相关, 并有可能成为疾病治疗的靶点。

关键词 TGF- β ; 信号转导; Smad6; Smad7; crosstalk

TGF- β (transformation growth factor- β) 是一类在结构上相关的转化生长因子, 是一个拥有为数众多的细胞因子成员的大家族, 包括 TGF- β , 活化素 (Activin)、骨形成蛋白 (bone morphogenic proteins, BMPs) 等。TGF- β 家族成员具有广泛的细胞功能, 比如调节细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞迁移和细胞间粘连。另外, 它们在胚胎发育, 免疫监督以及干细胞自我更新和分化中也起着重要的作用^[1-3]。TGF- β 家族主要通过 Smad 蛋白传递信号, 并在不同层面上受到多种多样精确的调控。抑制性 Smad 蛋白 (inhibitory Smads, I-Smads), 包括 Smad6 和 Smad7, 是 TGF- β 信号的关键调控分子^[4,5]。本文主要介绍 TGF- β 家族信号转导过程, 抑制性 Smad 蛋白对 TGF- β 信号的调控及其生理意义。

1 TGF- β 超家族成员及其信号转导过程

1.1 TGF- β 家族成员及其基本结构特征

在不同的物种中, 已经发现有超过 60 个细胞因子属于 TGF- β 超家族。在人类中, 至少存在 29 个 TGF- β 成员; 而且根据基因组预测, 此数目有可能达

到 42 个^[2]。在这些成员中, 包括 3 个 TGF- β , 5 个 Activin, 至少 8 个 BMPs, 以及 Nodal、inhibin、GDFs (growth and differentiation factors) 和抗 muellerian 激素 (AMH 或者 MIS) 等。根据序列, 结构及信号转导过程的差异, 这些因子被分为两个亚家族, 其中 TGF- β 、Activin 和 Nodal 等属于同一个亚家族, 而 BMPs, GDFs 和 AMH 等组成另一个亚家族。TGF- β 和 BMPs 是这两个亚家族中最有代表性也是研究最为详细的成员。

尽管 TGF- β 超家族成员在信号转导过程和生理功能方面有差异, 但在序列和结构上也有共同的特征。它们都拥有 7 个保守的半胱氨酸, 其中 6 个位于一个被称为半胱氨酸结 (cystein knot) 的结构中, 形成 3 个分子内二硫键^[6]; 另一个半胱氨酸残基参与形成分子间的二硫键, 这对 TGF- β 家族成员的二聚化具有重要意义^[7]。

很多不同类型的细胞都能合成 TGF- β 超家族成员的前体。以 TGF- β 为例, 在合成时 C 端成熟多肽

* 通讯作者。Tel: 010-62795184, Fax: 010-627943761, E-mail: ygchen@tsinghua.edu.cn

的前面还有一个很大的多肽^[8]。当这个多肽被切掉后,两个成熟多肽通过二硫键形成二聚体并被释放到细胞外。在细胞外,TGF- β 二聚体通常和胞外基质的LTBP (latent TGF- β binding protein)相连接,并处于非活化的状态。在需要时,通过蛋白酶水解或者构象变化,TGF- β 即被活化^[9]。与此不同的是,BMPs通常是以活性形式分泌的,但其活性受到多种胞外抑制剂的抑制,如noggin、chondin和DAN等^[10]。

1.2 TGF- β 的经典信号转导途径

TGF- β 配体活化以后,便可以结合细胞表面的丝氨酸/苏氨酸激酶型受体并通过胞内Smad蛋白传递信号(图1)。在人体中共有12个TGF- β 家族受体,包括7个I型受体(ALK1, ALK2, ALK3/BMPRIA, ALK4/ActRIB, ALK5/T β RI, ALK6/BMPRIIB和ALK7)和5个II型受体(T β RII, ActRIIA, ActRIIB, BMPRII和MISRII),其中,ALK2, ALK3和ALK6以及BMPRII和MISRII通常被认为是传递BMP亚家族信号的,而剩下的传递TGF- β 亚家族的信号。事实上,在体内配体与受体的组合比这更复杂^[1, 2]。这两种受体都具有

胞外配体结合区,跨膜区和胞内激酶区3个部分,其中II型受体的激酶活性被认为是持续活化的,而I型受体在没有配体时激酶是没有活性的。I型受体在胞内区激酶段前有一段保守的富含甘氨酸/丝氨酸的区段,被称为GS区,可以被II型受体磷酸化而导致I型受体的激活。

对于TGF- β 家族的两个亚家族而言,配体结合受体的方式上还有所差异^[1]。TGF- β 亚家族的很多配体通常和II型受体有高亲和力,却不能直接结合I型受体,当配体二聚体和两个II型受体结合后,再募集两个I型受体,形成稳定的配体-受体复合体。但BMPs配体与II型受体的亲和力较弱,而与I型受体有更高的亲和力,只有当BMPs结合I型受体后,II型受体才能结合上去并形成稳定复合体。还有一些配体需要同时与两种受体的胞外结构域结合,比如TGF- β 2或者BMP-7。因为现在发现的TGF- β 家族配体远远多于II型受体和I型受体,因此认为II型/I型受体的不同组合为配体结合以及胞内信号转导提供了多样性及选择性。配体与受体的结合通常还受

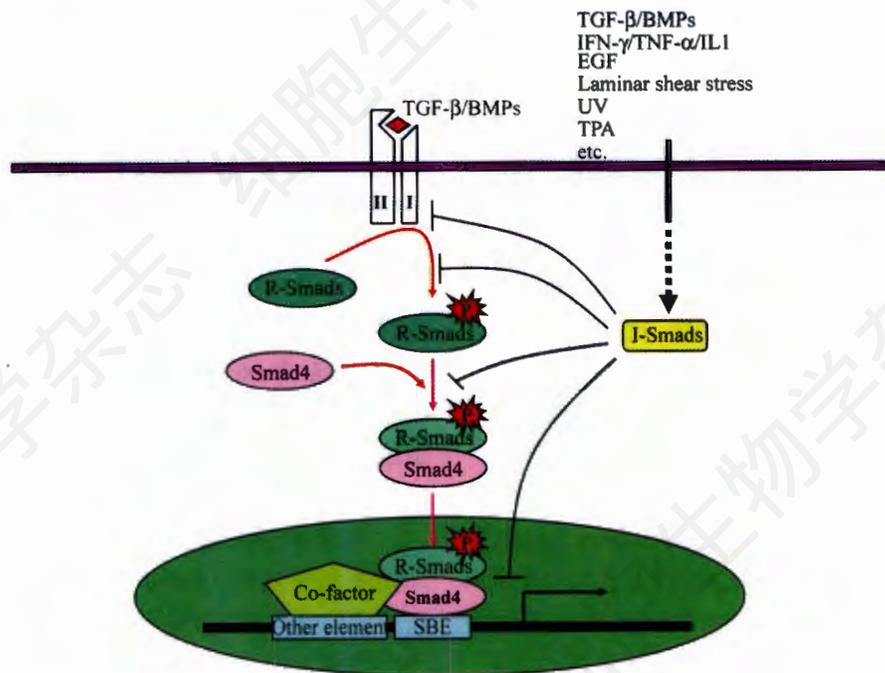


Fig.1 The TGF- β /Smad signaling pathway and its regulation by inhibitory Smads

Once the TGF- β superfamily cytokines are activated, they bind to two types of serine/threonine kinase receptors on the cell membrane and together form a heteromeric complex, leading to the activation of the type I receptors and subsequent signal transduction mediated by Smad proteins. Unlike R-Smad and Smad4, inhibitory Smads antagonize TGF- β /Smad signaling by several different mechanisms. (1) They can bind to the activated type I receptors in competition with R-Smads and inhibit R-Smad phosphorylation. (2) They can also recruit ubiquitin E3 ligases and promote ubiquitination and degradation of type I receptors. (3) Protein phosphatase like GADD34-PP1c can be recruited by Smad7 and dephosphorylate the TGF- β type I receptor. (4) In addition, Smad6 was also reported to interact with phosphorylated Smad1, and thus preventing Smad1-Smad4 complex formation and BMP signaling. (5) In the nucleus, I-Smads can block transcription by cooperation with repressors or interfering with the functional Smad-DNA complex.

到其它膜蛋白的调节, 比如被称为 TGF- β III 型受体的蛋白聚糖 β -glycan, 它能够调节 TGF- β 与受体的结合, 这对 TGF- β 2 而言尤为关键。在内皮细胞中, endoglin 也起着类似的作用。Cripto 以及 CFC-EGF 家族的其它成员同时存在分泌蛋白及膜蛋白两种形式, 能介导 Nodal、Vg1、GDFs 以及 Activin 等配体与受体的结合。配体-受体复合体形成以后, I 型受体中的 GS 区将被 II 型受体磷酸化, 同时激酶活性被活化。活化的 I 型受体募集并磷酸化下游的 R-Smad 蛋白并传递信号。

配体结合到受体后不仅启动了信号传递, 同时可以诱导配体-受体的内吞作用^[11]。一方面这可以将受体转运到内吞体, 并最终转移到溶酶体或者蛋白酶体进行降解; 另一方面也可能促进 R-Smads 与受体在内吞体上的结合并传递信号。内吞体上的受体还可以循环到细胞膜上并被再次利用。

Smad 蛋白是 TGF- β 家族成员信号转导过程中的关键分子, 它们参与 TGF- β 超家族所发挥的大部分细胞作用与生理功能^[7,12]。Smad 蛋白可以分为 3 类, 受体调节的 Smad 蛋白(R-Smad), 公共 Smad 蛋白(Co-Smad, Smad4)和抑制性 Smad 蛋白(Smad6/7)。R-Smad 和 Co-Smad 蛋白都具有两个保守的结构域, 即分别位于 N 端的 MH1 结构域和 C 端的 MH2 结构域, 中间间隔一个短的连接区。MH2 结构域主要负责 Smad 与受体的结合, Smad 异源复合体的形成, 细胞质锚定以及靶基因转录的调控等, 而 MH1 结构域具有细胞质锚定, 入核转运, DNA 结合(Smad2 例外, 只有在其它转录因子的辅助下, 它才能结合 DNA)以及调控基因转录的作用, 同时它还能对 MH2 结构域的功能进行负调控。

一旦 R-Smad 蛋白 C 端的 SXS 基序被 I 型受体磷酸化, 它们便从受体复合体上解离下来, 与 Co-Smad 蛋白形成复合物, 转移至核内, 并和其它转录因子一块调控靶基因的转录。在人体中共有 5 个 R-Smad 蛋白存在, 其中, Smad2/3 响应 TGF- β 亚家族的信号, 而 Smad1/5/8 响应 BMP 亚家族的信号, 但这并不是绝对的, 比如在很多情况下 TGF- β 的信号通过 ALK5 传递, 但在血管内皮细胞中, TGF- β 能激活 ALK1, 激活下游的 Smad1/5。而最新的研究表明, 在哺乳动物上皮细胞中 TGF- β 可以通过 ALK5 直接激活 Smad1/5^[13]。

I 型受体的 GS 区可能介导受体和 R-Smad 的相互作用, 但这种作用的特异性却取决于 I 型受体激酶结构域的 L45 环(L45 loop)和 R-Smad MH2 结构域中的 L3 环的相互作用, 但也不排除 R-Smad 蛋白中有其

它序列元件在这种特异性作用中起作用^[2]。R-Smad 与 I 型受体之间的结合还受到胞内其它蛋白的调控, 比如一些含有 FYVE 结构域的蛋白, SARA、enodofin 和 Hrs/Hgs^[11,14]。FYVE 结构域可以将这些蛋白质锚定在内吞体上, 其中 SARA 能同时与 Smad2/3 和 TGF- β 受体相互作用, 并作为骨架蛋白促进 Smad2/3 与受体的结合及其磷酸化。同样地, Hrs 与 Smad2 结合, 并与 SARA 协同促进 Activin 介导的 Smad2 活化。Endofin 能与 Smad4 结合, 有利于将 Smad4 募集到内吞体上, 与 SARA 合作促进 R-Smad/I 型受体的相互作用, R-Smad 的磷酸化以及 R-Smad/Smad4 异源三聚体的形成, 从而促进 TGF- β 信号传递。也有研究认为 endofin 可以通过募集 Smad1 到 BMP 受体并促进信号传递^[15]。

在核内, Smad 蛋白具有 DNA 结合的选择性, 通过与其它转录因子的协同作用, 它们结合到靶基因的启动子上, 并调控基因转录^[7]。Smad 蛋白复合物与靶基因启动子或者增强子的特异性 DNA 序列结合。Smad 结合元件(SBE)与 Smad3-Smad4 复合物的 MH1 结构域结合, 它们首先在体外被鉴定, 后在 PAI1 基因的启动子得到验证。研究发现, DNA 序列 5'-AGAC-3' 或其互补序列是单一 Smad 结合位点^[16]。SBE 通常包含这个核心序列的直接重复或反转重复。与此不同的是, 磷酸化的 Smad1 蛋白偏向于与富含 GC 的序列结合, 它们通常与侧向的 AGAC 或者 GTCT 元件同时出现, 以便与 Smad1-Smad4 复合物具有更高的亲和力^[17]。Smad 蛋白与 SBE 通常只有低亲和力的结合, 对于靶基因的转录调控, 还需要其它 DNA 结合因子的参与。已经发现有多种转录因子能与 Smad 蛋白结合, 并调控依赖 Smad 蛋白的转录^[2]。转录因子 FOXH1 (forkhead box H1, FAST1) 首先被发现能与 Smad 蛋白结合, 它能将磷酸化的 Smad2 以及 Smad4 募集到 Activin 响应元件(ARE)。此外, 与 Smad 蛋白相互作用的转录因子还可能促进 TGF- β 通路与其它信号通路的整合, 比如 p53、 Δ AP1 与 SP1 等^[7]。

在没有信号时, Smad 蛋白频繁穿梭于细胞质和细胞核之间, 只有当受体被活化以后, R-Smad 蛋白的磷酸化以及 Smad 蛋白的核内聚集才能维持^[18,19]。但 R-Smad 蛋白的磷酸化状态也是暂时的, 在核内它们能被去磷酸化, 导致 R-Smad/Smad4 复合物解体以及细胞质转运^[20]。Smad 蛋白在细胞质和细胞核之间进行依赖于磷酸化的穿梭对于 TGF- β 信号的动态调控具有重要意义。

1.3 不依赖于 Smad 蛋白的 TGF- β 信号转导途径

除了经典的 Smad 信号通路外, 很久以来大家就

知道有一些 TGF- β 超家族成员介导的细胞作用或生理功能并不依赖于 Smad 蛋白^[21]。有证据表明, Smad4 对于老鼠乳腺, 肝以及胰腺的发育并不是不可或缺的^[3,22], 而 R-Smad 蛋白传递的信号可以不依赖于 Smad4。在一些响应 TGF- β 的细胞如造血细胞, 间充质细胞和上皮细胞中, TIF1 γ 能代替 Smad4, 并以依赖 TGF- β 刺激的方式与 Smad2/3 聚会并传递信号, 这在红细胞的分化中发挥着重要作用。与 TIF1 γ 类似, 在老鼠角化细胞中, TGF- β 激活的 Smad2/3 与 I κ B 激酶 α (IKK α) 结合并控制原癌基因 Myc 的抑制基因 MAD1 的表达以及角化细胞的分化^[23]。此外, 在血管平滑肌细胞中, BMP 激活的 Smad1 和 TGF- β 激活的 Smad2/3 能与 microRNA 处理复合物 DROSHA 的一个亚基 p68 结合, 并控制 miR-21 的转录和产生^[24]。在我们的研究中也发现, SARS 相关冠状病毒的核蛋白(N 蛋白)能与 Smad3 特异性结合, 干扰 Smad3/Smad4 复合物的形成并在核内促进 Smad3-p300 的结合, 这为 N 蛋白通过控制 TGF- β 信号, 阻断 SARS-CoV 感染的宿主细胞的凋亡同时促进组织纤维化提供了有力证据, 也为 Smad3 传递信号可以独立于 Smad4 提供了新的支持^[25]。

在一些情况下, TGF- β 家族能激活 MAPK 信号通路, 包括 ERK、JNK 以及 p38 信号通路^[26], 其详细机制开始被阐明。最近发现, 泛素 E3 连接酶 TRAF6 可以与 T β RI 结合, 导致 TRAF6 的自身泛素化, TAK1-p38 MAPK 的激活并促进细胞凋亡, Smad7 可能在 TRAF6/TAK1 与 T β RI 之间发挥骨架蛋白的作用^[27,28]。Lee 等^[29]也报道被配体活化的 T β RI 能使 ShcA 蛋白的酪氨酸和丝氨酸残基发生磷酸化, 并激活下游的 ERK MAPK。除此以外, TGF- β 还可以激活 Rho-Rock1、PI3K/Akt、蛋白磷酸酶 PP2A 以及 Cdc42/Rac1-PAK2 复合物等^[3,5]。而在上皮细胞中, T β R-II 可以使与 T β RI 结合的 Par6 释放出来并促进其磷酸化, 导致细胞间紧密连接解散以及 EMT 转变^[30]。另外, BMP 的 II 型受体也可以直接调控 LIMK1 (肌动蛋白骨架调控激酶 1)^[31]。这种信号转导的可塑性为 TGF- β 超家族发挥多种不同的细胞及生理功能提供了理论基础。

2 抑制性 Smad 蛋白对 TGF- β 信号转导的负调控

从胚胎发育到维持正常细胞的功能平衡, TGF- β 超家族成员都发挥了重要的作用, 因此对其信号转导过程的调控也显得格外重要。无论是配体激活,

受体与 R-Smad 活化, 还是 R-Smad/Smad4 结合, 入核转运, DNA 结合以及转录过程等都受到严格的调控。其中, 抑制性 Smad 蛋白(I-Smads), 包括 Smad6 和 Smad7, 在 TGF- β 家族信号转导中发挥了关键的作用(图 1)。根据生化实验的研究结果, Smad7 被认为是 TGF- β 超家族的一个广谱抑制剂, 能同时抑制 TGF- β 和 BMP 亚家族的信号传递, 而 Smad6 通常是 BMP 亚家族特异性的^[5]。I-Smads 能够受 TGF- β 超家族成员比如 TGF- β 、Nodal 和 BMP 等的诱导而表达, 因此形成一个负反馈的机制^[32,33]。在结构上, I-Smads 在 C 端也有保守的 MH2 结构域并介导 I-Smads 与 I 型受体的结合, 但是在 N 端却体现出更大差异性, 不具备 R-Smad 和 Smad4 保守的 MH1 结构域; Smad6 与 Smad7 的 N 端也仅有 36.7% 的相似性^[34]。Smad7 也能与 DNA 直接结合, 但与 R-Smad 不同的是, 这是由其 MH2 结构域介导的^[35,36]。

2.1 I-Smads 在细胞质中对 TGF- β 信号的调控机制

I-Smads 对 TGF- β 家族信号转导的负调控具有多种不同的方式, 它们既可在细胞质又可在细胞核中发挥作用。Smad7 首先被证明能与 I 型受体形成稳定复合物, 抑制 R-Smads 与受体的结合、磷酸化以及与 Smad4 的聚合^[37]。Smad7 也能招募 HECT 类型的 E3 泛素连接酶, Smurf1 和 Smurf2^[4]。它们首先在细胞核中结合, 在 TGF- β 信号的刺激下转运出核并与活化的 I 型受体结合, 导致受体泛素化并通过蛋白酶途径降解, Smad7 自己也在这个过程中被降解。作为 adaptor, Smad7 还能招募其它一些 E3 泛素连接酶, 比如 Nedd4-2 以及 WWP1/Tiul1 等, 促进受体、R-Smads 以及 Smad4 的降解, 从而抑制 TGF- β 或者 BMP 的信号传递^[4,38]。利用相同的机制, Smad6 也能抑制 BMP 信号^[12]。另外, Smad7 可以招募磷酸酶 GADD34-PP1c 到 ALK5, 导致受体的去磷酸化^[39]。另外, 有报道 Smad6 还能与 Smad4 竞争性的结合磷酸化的 Smad1 并抑制 BMP 信号^[40]。MH2 结构域介导了 I-Smads 与 I 型受体的结合, 对于它们发挥信号抑制作用具有重要意义。此外, Smad7 的 N 端虽不直接与 I 型受体结合, 却能增强其 MH2 结构域与 TGF- β / 活化素受体的特异性结合及其抑制活性。尽管 Smad6 能同时抑制 BMP 的 ALK2、ALK3 和 ALK6, 但仍然是有选择性的, 它在抑制 ALK3/6 时具有更强的活性^[41]。

I-Smads 与 I 型受体的结合对其在细胞质中发挥功能起着重要的作用, 同时也受到很多其它蛋白的调

控^[41]。例如一个含有 WD 基序的蛋白质 STRAP, 它能与 I/II 型受体以及 Smad7 相互结合, 稳定 Smad7/II 型受体复合物, 因而与 Smad7 协同抑制 TGF- β 信号。AIP4 是一个 E3 泛素连接酶, 也能与 Smad7 结合并促进其降解, 但它同时能对 TGF- β 信号进行负调控, 这可能与 AIP4 也能增强 Smad7 与受体的结合有关。此外, FKBP12 是一个胞质蛋白, 它能与免疫抑制剂 Tacrolimus (FK506) 与 rapamycin 结合, 在 TGF- β 信号中被发现能与 I 型受体的 GS 区结合并抑制其磷酸化及信号转导。最近发现, 它也能作为 Smad7/Smurf1 的 adaptor 蛋白, 促进受体的泛素化和降解^[42]。近年来, 很多其它蛋白也陆续被发现能与 I-Smads 结合, 并通过 I-Smads 对 TGF- β 信号进行正调控或者负调控, 例如 Hic-5/ARA55^[43]、YAP65 (Yes-associated protein)^[44]、SIK (the salt-inducible kinase)^[45]和 Cas-L (Crk-associated substrate lymphocyte type)^[46]等等。

2.2 I-Smads 在细胞核中对 TGF- β 信号的调控机制

在细胞核中, I-Smad 对 TGF- β 信号也发挥了重要的调控功能。研究发现, Smad6 能与转录因子 Hoxc-8 结合并作为转录抑制物起作用; 它也能直接与 DNA 结合, 并招募转录辅阻遏物组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 而发挥转录抑制活性^[47]。很多转录抑制物中都有 PLDLS 基序, 通过此基序, Smad6 能与 CtBP 结合并与 BMP 靶基因 Id1 的启动子结合, 抑制其转录^[48]。

与 Smad6 一样, Smad7 也首先定位于核内^[2]。当 Smad7 与转录因子 Gal4 的 DNA 结合结构域融合后, 它能抑制 Gal4 报告基因的激活。它还能与转录因子 p300 以及 HDACs 等结合, 也暗示了它在核内的功能^[49]。最近我们发现, 在一些细胞系比如 Hep3B、HeLa、正常人肺表皮细胞 HPL-1 和水貂肺表皮细胞 Mv1Lu 的突变体 L17 等细胞中, 即使添加 TGF- β 刺激, 绝大部分 Smad7 仍然定位于核内并抑制 TGF- β 信号; 在 T β RI 缺失的 L17 细胞系中过量表达了添加核定位信号的 Smad7 也能抑制 TGF- β 信号, 表明 Smad7 可以不依赖于受体而在细胞核中发挥抑制活性^[35]。研究发现, Smad7 能与含有 Smad 结合元件 CAGA 的 DNA 片段结合。通过单分子力谱 (single-molecule force spectroscopy) 的方法也表明, 与 Smad4 一样, Smad7 也能与 Activin 响应元件 (activin response element, ARE) 以及 PAI-1 启动子结合^[36]。不同的是, Smad7 通过 MH2 结构域结合 DNA。实验表明, Smad7 能直接结合 DNA 并干扰功能性的 Smad-DNA 复

合物的形成^[35]。

2.3 I-Smads 的翻译后修饰以及对其活性的控制

翻译后修饰比如泛素化及乙酰化等, 对蛋白质功能具有重要意义, I-Smads 也不例外。除了 Smurf1/2 以及 AIP4 外, 以 axin 为 adaptor, Arkadia 也能诱导 Smad7 的降解^[50, 51]。另外, COP9 信号转导复合物的一个亚基 Jab1/CSN5 也被证明在调控 Smad7 稳定性方面发挥作用, 并能减弱 Smad7 对 TGF- β 信号的抑制^[52]。乙酰化修饰对 Smad7 的稳定性及功能也很关键。研究发现, 组蛋白乙酰化酶 p300 以及组蛋白去乙酰化酶 HDACs 和 SIRT1 均能与 Smad7 结合并控制其乙酰化状态^[4, 53]。Smad7 蛋白中被乙酰化的赖氨酸残基同时也能被泛素化, 乙酰化修饰能竞争性抑制其泛素化与降解。此外, 蛋白精氨酸 N-甲基转移酶 1 (protein arginine methyltransferase 1, PRMT1) 能对 I-Smads 进行甲基化修饰, 但其意义尚不清楚^[54]。尽管对 Smad6 的研究相对较少, 但有理由相信, 翻译后修饰对 Smad6 也具有重要意义。

3 抑制性 Smad 蛋白的转录调控及其在 TGF- β 信号通路与其它信号通路 crosstalk 中的作用

I-Smads 能被多种 TGF- β 超家族成员诱导产生^[5]。人源 Smad7 基因能被 TGF- β 、Activin、Nodal 以及 BMPs 等激活转录; 在其启动子中, 鉴定到了 Smad 结合元件 (SBE)^[33]。对于 TGF- β 而言, 激活 Smad7 的表达同时需要 Smad2/3 和 Smad4, 但对 Smad7 的有效诱导还需要其它辅激活因子的参与, 比如 CBP/p300, FoxH1, TFE-3 (transcription factor mE3), CBFA (PEBP2/core-binding factor A) 和 ATF2 等^[5]。有研究认为, AP1 和 SP1 也能促进 Smad7 的转录, 表明其它信号通路也参与了 Smad7 的转录调控。与 Smad7 类似, BMP/Smad 信号通路能诱导 Smad6 的转录。很多转录因子, 例如 CREB、OAZ 和 Runx2 等在诱导中起着协同性作用。而辅阻遏物 Ski 被认为能抑制 I-Smads 的转录^[55]。

除了 TGF- β /BMPs 外, 很多炎症因子例如 IL1、IFN- γ 和 TNF- α 等也能诱导 I-Smads 的表达 (图 1)。在不同的细胞系中, EGF、放射线以及 laminar shear stress 等对 Smad7 也具有诱导作用^[5]。另外, TPA 处理也被报道能诱导 Smad7, 但却抑制 Smad6 的表达^[56]。这些信号或者化学物质有可能通过 I-Smads 对 TGF- β /BMPs 信号进行调控。另一方面, I-Smads 也有可

能对其它信号通路进行调控。有意思的是, Smad7 能打散 TRAF2-TAK1-TAB2/3 复合体并抑制 TNF- α /NF- κ B 信号^[57]。与此类似, Smad6 能与哺乳动物 IL1 受体相关激酶 1 的 adaptor Pellino-1 结合, 抑制其信号并增强 TGF- β 介导的抗炎作用^[58]。因为 TGF- β 在免疫系统中具有重要作用, 因而 I-Smads 有可能介导了 TGF- β 信号和炎症因子信号之间的 crosstalk, 并在维持免疫平衡中发挥功能。

TGF- β 能激活 MAPK 信号, 而越来越多的证据表明 Smad7 可能在这个过程中发挥作用。研究发现, Smad7 有可能作为骨架蛋白介导 JNK 或者 p38 的激活及其诱导的细胞凋亡作用^[5]。最近有报道称, 作为 adaptor, Smad7 能促进 TRAF6/TAK1 与 ALK5 的相互作用, 介导 TGF- β 激活 p38 的过程^[27, 28]。也有报道称 Smad6 在 BMP2 诱导 TAK1/p38 的过程中发挥调控功能^[59]。

与 TGF- β 一样, Wnt 信号在胚胎发育、正常细胞与肿瘤细胞中均发挥了重要的作用, 在两种信号通路之间也存在多层次的 crosstalk, 比如 Smads 与 β -连环蛋白、Smads 与 TCF/LEF 等^[60]。另外, 爪蟾的 BAMBI 蛋白能抑制 TGF- β /BMP 信号并可能调控 BMP 在胚胎发育过程中的作用。最近发现, 与之同源的人 BAMBI 蛋白能与 Wnt 受体结合并促进 Wnt 信号转导^[61]。此外, Smad7 同样以多种方式介导 TGF- β 与 Wnt 信号通路之间的 crosstalk。前面提到, Axin 是 β -连环蛋白降解复合体的骨架蛋白, 同时它也能介导 Arkadia 对 Smad7 的降解。在人前列腺癌 PC-3U 细胞中, Smad7 能与 β -连环蛋白相互作用并共同调控 c-myc 的转录, 从而介导 TGF- β 诱导的细胞凋亡。最近发现, Smad7 能招募泛素 E3 连接酶 Smurf2 并降解 β -连环蛋白, 从而下调 Wnt 信号。也有研究认为, Smad7 能促进 β -连环蛋白与 E-钙黏着蛋白的结合并调控细胞间连接^[60]。

除此以外, 有证据显示 Smad7 参与了 TGF- β 激活 Rho GTPase Cdc42 和 RhoA 的过程^[62]。这些结果表明, I-Smads 不仅是 TGF- β 超家族信号转导的抑制剂, 同时介导了 TGF- β 信号与其它信号通路间的 crosstalk。

4 抑制性 Smad 蛋白的生理功能

TGF- β 超家族的细胞因子具有广泛的功能, 如调控细胞增殖与凋亡, 细胞连接与迁移以及胚胎发育过程等。TGF- β 对免疫系统具有重要的负调控作用, 而 BMPs 是骨发育及平衡的关键调控因子。I-Smads 在

这些作用中也发挥重要的调控作用。近年来, 通过基因敲除, RNA 干扰或者转基因的方法对 I-Smads 的生理功能有了越来越多的了解。

大量的研究表明, Smad7 对 TGF- β 介导的细胞作用或者生理过程具有重要的调控作用, 如细胞增殖与细胞周期阻滞、细胞凋亡、上皮细胞向间充质细胞转变 (Epithelial mesenchymal transition, EMT) 以及免疫监督等。TGF- β 能诱导多种类型细胞的凋亡, 包括 B 淋巴细胞、肝细胞、Mv1Lu、MDCK 及 COS7 等^[63]。研究发现, 通过激活 MAPK 信号通路或者抑制 NF- κ B 信号通路, Smad7 可以促进 TGF- β 诱导的凋亡作用。另一方面, Smad7 也可能抑制 TGF- β 诱导的 B 细胞或者胃上皮细胞的凋亡^[64]。这表明, Smad7 在细胞凋亡中的作用是细胞类型或者环境依赖的。EMT 在很多生理或病理中发挥重要的作用, 比如胚胎发育与形态建成、癌症的进程与转移以及成体器官的慢性退化或者纤维性疾病等^[65]。TGF- β 是最早被描述的 EMT 诱导因子^[66]。研究发现, Smad2/3 与 TGF- β 诱导的 EMT 具有密切的联系。而体外与体内的研究发现, 过量表达 Smad7 均能抑制依赖于 Smad3 的 EMT 进程。

TGF- β 是免疫系统的关键负调控分子。TGF- β 1 敲除的老鼠或者在造血系统中条件性缺失 T β RII 的老鼠都表现出免疫系统的多种缺陷或疾病^[67]。Smad3 缺失的老鼠其免疫调节也受到破坏, 表现为 T 细胞过度增殖, 黏膜免疫力下降及慢性炎症等。TGF- β 具有调节很多白细胞增殖、分化以及活化的功能, 比如 B 细胞、NK 细胞、树突状细胞、单核细胞与巨噬细胞、粒细胞和柱状细胞等^[68]。研究发现, Smad7 对 TGF- β 介导的免疫功能具有重要的调控作用: Smad7 基因外显子 I 缺失的老鼠表现出 Smad7 功能的部分丧失。突变的老鼠虽然能存活下来但个体比正常老鼠小; 而在突变的 B 细胞中 Smad2 磷酸化升高, TGF- β 异常活化, 同时表现出 IgA 重组的增加和自发凋亡作用增强等现象。

BMPs 是首先作为促进骨形成的诱导因子被发现的^[10, 69, 70]。从早期胚胎发育到组织形成, BMPs 具有多方面的生物学功能, 它们对于骨骼的发育和功能, 以及在维持骨的平衡方面具有至关重要的作用, 同时能控制软骨的增殖和分化。研究发现, Smad6 能够调节 BMPs 介导的诱导软骨生长与分化的作用。利用 *Coll1a2* 启动子 / 增强子序列在软骨细胞中表达 Smad6 导致软骨生长的延迟。此外, 尽管 Smurf1 转基因老鼠的软骨没有出现明显的异常变化, 但当它与 Smad6

转基因老鼠交配后, 双转基因老鼠表现出与 Smad6 转基因老鼠相似的表现, 但是更严重。

BMPs 在心血管系统的发育与功能维持方面都具有重要作用^[71,72]。在早期胚胎发育中, BMPs 能在心脏形成区诱导中胚层向心肌细胞分化, 在第二心脏区也具有相同的作用。同时它们在心室的形成以及房室管和外流管道的 septoalvulogenesis 过程中也发挥作用。研究发现, 在 P19CL6 细胞中稳定表达 Smad6 可以抑制其向心肌细胞的分化。Calvin 等^[73]通过 LacZ 报告基因对老鼠的 Smad6 基因进行靶向突变并发现, Smad6 的表达主要集中于心血管系统, 其突变体具有多种心血管系统的异常, 包括流出管道隔膜缺陷、心脏瓣膜增生、动脉硬化以及血压升高等。

TGF- β 对于心血管系统的发育与功能也是必不可少的, 其表达与心血管系统密切相关^[72]。体外的研究表明 TGF- β 对内皮细胞与血管平滑肌细胞的生长与分化以及血管的形成等都有重要的作用。根据原位杂交的结果, Smad7 在小鼠胚胎和成体组织的主动脉和各种动脉中都有较高水平的表达; 在心脏的发育中, Smad7 主要在房室垫 (atrioventricular cushion) 的位置表达; 利用转基因的方法发现, Smad7 启动子在各种内皮细胞包括房室垫中都能启动报道基因的表达^[74]。Smad7 的错误表达对血管的发育具有明显的影响, 同时也导致血管畸形, 包括动静脉和血管内的分流^[75]。Smad7 MH2 敲除的小鼠表现出心脏发育的多种缺陷^[76], 比如室间隔缺损与致密性不全, 以及流出管道畸形等, 大部分 Smad7 突变体老鼠在子宫中即死去; 而成活下来的成体突变体老鼠心脏功能具有严重损坏, 也有心率不齐的表现。进一步的分析发现, Smad7 突变体老鼠中, 心脏房室垫中的 Smad2/3 磷酸化水平升高, 而 Smad1/5/8 的磷酸化水平没有变化; 同时, 这个区域的细胞凋亡也显著增加。鉴于 TGF- β 在心血管系统发育中的重要作用及其诱导细胞凋亡的能力, Smad7 基因的敲除很可能使 TGF- β 信号处于持续活化的状态。

5 抑制性 Smad 蛋白在 TGF- β 相关疾病中的作用

TGF- β 超家族在细胞及生物体内发挥了广泛的功能, 其信号转导的异常被证明与多种疾病相关^[72,77]。越来越多的证据表明, I-Smads 可能与这些疾病的发生具有密切的联系。在这方面, 对 Smad7 的研究积累了丰富的资料。

如上所述, TGF- β 是免疫系统的关键负调控因

子, 其信号转导过程的紊乱或活性变化可能对免疫功能造成重大影响, 如自身免疫病或者炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 等^[78,79] (表 1)。在 IBD 病人中 Smad3 的磷酸化水平很低, Smad3/Smad4 复合体的形成也受到影 响, 表明在炎症肠道中尽管 TGF- β 浓度很高, 但毫无疑问其信号转导受到了破坏。进一步分析发现, IBD 病人的组织具有高表达水平的 Smad7; 而且, 使用反义寡核苷酸把 Smad7 的水平降低以后, TGF- β 信号便加强, 一些炎症因子如 IFN- γ 或 TNF- α 的产生受到抑制, 从而使炎症得以控制。因此, Smad7 表达水平的异常升高可能是 TGF- β 介导的 IBD 疾病的主要原因。

此外, TGF- β 还具有促进纤维化的活性^[77,80]。TGF- β 激活的 Smad3 能诱导纤维状胶原蛋白的转录, 增强金属蛋白酶抑制蛋白的表达或者抑制基质降解酶的表达, 从而抑制胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解, 导致其在胞外的积累。TGF- β 信号的增强可能会导致很多组织的纤维化反应, 比如肾、肺以及肝等。在纤维化过程中通常还伴随 Smad7 表达水平的下降。纤维化反应对硬皮病 (scleroderma) 的发生具有重要的影响, 在其病人的皮肤中也缺乏 Smad7 的表达^[79,81]; 病人皮肤细胞对 TGF- β 响应能力也比正常细胞强。将 Smad7 重新转入硬皮病成纤维细胞后, TGF- β 信号便恢复到正常水平。这表明, 通过控制 TGF- β 信号, Smad7 表达水平的变化对硬皮病的发生具有重要影响。

TGF- β 具有诱导表皮细胞细胞周期阻滞与抑制细胞增殖的能力。但同时, 它也能通过调控细胞浸润, 转移, 免疫调控以及微环境修饰等过程促进肿瘤进程,

Table 1 The correlation of Smad7 with TGF- β related diseases: inflammatory bowel disease (IBD) and scleroderma

Tissues	IBD intestinal tissue	Scleroderma skin tissue
Expression of Smad7	Elevated	Decreased
Smad3 phosphorylation	Decreased	Elevated
TGF- β signaling	Decreased	Elevated
Results	Augmented inflammation	Augmented fibrotic response

Deregulation of TGF- β signaling has been shown to be associated with several major diseases, including IBD and scleroderma. Smad7 was found to be closely related to these diseases. In the intestinal tissue of IBD patients, the expression of Smad7 was always found to be very high, along with low phosphorylation level of Smad3 and decreased TGF- β signaling, leading to augmented inflammation. On the contrary, Smad7 has a low expression level in the Scleroderma skin tissue, and the phosphorylation of Smad3 and TGF- β signaling are elevated, resulting in tissue fibrosis.

因此对肿瘤来说它是一把双刃剑^[3]。Smad7 与肿瘤的发生也有密切的关系。一项全基因组范围的研究表明 Smad7 与结直肠癌密切相关^[82]。过量表达的 Smad7 能抑制人乳腺癌与黑色素瘤的溶骨性转移^[3,83]。同时,它也抑制子宫内膜瘤,甲状腺肿瘤与肝细胞瘤等肿瘤的发生。但另一方面,也有证据显示在有的肿瘤中,Smad7 可能具有正调控的作用。例如,有报道称 Smad7 在胰腺癌中能抑制 TGF- β 介导的细胞周期阻滞及细胞凋亡,并促进肿瘤进程。由此可见,Smad7 与 TGF- β 一样,在肿瘤与癌症进程中具有复杂的作用。

6 小结及展望

从胚胎发育到维持成体组织的平衡,TGF- β 超家族因子具有广泛的细胞作用与生理功能。它们主要通过 Smad 蛋白传递信号,但同时也有越来越多的不依赖于 Smad 蛋白的信号通路被逐渐发现。其信号转导过程受到多层次的精确调控,其中 I-Smads 是 TGF- β /BMP 信号转导的关键调控分子,它们以负反馈环的形式并以多种不同的分子机制对信号进行调控,同时具有介导 TGF- β 超家族与不同信号通路之间 crosstalk 的作用。这些都为 TGF- β 超家族发挥多种生理功能提供了基础。近年来,随着对 I-Smads 作用机制及生理功能的了解,发现它们广泛参与 TGF- β 超家族介导的生理过程,如胚胎发育、骨的形成与平衡、心血管系统的发育与平衡以及免疫监督等。TGF- β 超家族信号转导的失调已经被证明与几种重要疾病相关,如免疫性疾病、组织纤维化以及癌症与肿瘤的发生等。越来越多的证据表明, I-Smads 与这些疾病具有重要的联系,其表达水平的变化很可能是这些疾病发生的直接原因之一。通过调控 I-Smads 的表达,可以对这些疾病起到缓解作用,这也暗示通过对 I-Smads 作用机制与生理功能的了解,有可能使其成为药物靶点并在 TGF- β 超家族相关疾病的治疗中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell*, 2003, 113(6): 685-700
- [2] Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 659-693
- [3] Massagué J. TGF β in cancer, *Cell*, 2008, 134(2): 215-230
- [4] Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction, *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 176-184
- [5] Park SH. Fine tuning and cross-talking of TGF- β signal by inhibitory Smads, *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(1): 9-16
- [6] Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules, *Mol Endocrinol*, 2001, 15(5): 681-694
- [7] Schmierer B, Hill CS. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970-982
- [8] Li MO, Flavell RA. TGF- β : a master of all T cell trades, *Cell*, 2008, 134(3): 392-404
- [9] ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signaling in vascular development and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 857-869
- [10] Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 550-553
- [11] Chen YG. Endocytic regulation of TGF- β signaling, *Cell Res*, 2009, 19(1): 58-70
- [12] Lönn P, Morén A, Raja E, et al. Regulating the stability of TGF β receptors and Smads, *Cell Res*, 2009, 19(1): 21-35
- [13] Liu IM, Schilling SH, Knouse KA, et al. TGF β -stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGF β switch, *EMBO J*, 2009, 28(2): 88-98
- [14] Miura S, Takeshita T, Asao H, et al. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA, *Mol Cell Biol*, 2000, 20(24): 9346-9355
- [15] Shi W, Chang C, Nie S, et al. Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling, *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 7): 1216-1224
- [16] Shi Y, Wang YF, 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
- [17] Gao S, Steffen J, Laughon A. Dpp-responsive silencers are bound by a trimeric Mad-Medea complex, *J Biol Chem*, 2005, 280(43): 36158-36164
- [18] Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity, *Mol Cell*, 2002, 10(2): 283-294
- [19] Xu L, Kang Y, Cöl S, et al. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus, *Mol Cell*, 2002, 10(2): 271-282
- [20] Lin X, Duan X, Liang YY, et al. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF β signaling, *Cell*, 2006, 125(5): 915-928
- [21] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling, *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584
- [22] Wang RH, Li C, Xu X, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression, *Cell Metab*, 2005, 2(6): 399-409
- [23] Descargues P, Sil AK, Sano Y, et al. IKK α is a critical coregulator of a Smad4-independent TGF β -Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2487-2492
- [24] Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation, *Nature*, 2008, 454(7200): 56-61
- [25] Zhao X, Nicholls JM, Chen YG. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor- β signaling, *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3272-3280
- [26] Hoover LL, Kubalak SW. Holding their own: the noncanonical

- roles of Smad proteins, *Sci Signal*, 2008, 1(46): pe48
- [27] 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, *Nat Cell Biol*, 2008, 10(10): 1199-1207
- [28] Yamashita M, Fatyol K, Jin C, *et al.* TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β , *Mol Cell*, 2008, 31(6): 918-924
- [29] Lee MK, Pardoux C, Hall MC, *et al.* TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA, *EMBO J*, 2007, 26(17): 3957-3967
- [30] Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, *et al.* Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity, *Science*, 2005, 307(5715): 1603-1609
- [31] Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, *et al.* Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1, *J Cell Biol*, 2003, 162(6): 1089-1098
- [32] Afrakhte M, Morén A, Jossan S, *et al.* Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members, *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(2): 505-511
- [33] Stopa M, Anhof D, Terstegen L, *et al.* Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF- β)-induced activation of Smad7. The TGF- β response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation, *J Biol Chem*, 2000, 275(38): 29308-29317
- [34] Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, *et al.* The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor- β signaling, *J Cell Biol*, 2001, 155(6): 1017-1027
- [35] Zhang S, Fei T, Zhang L, *et al.* Smad7 antagonizes transforming growth factor β signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation, *Mol Cell Biol*, 2007, 27(12): 4488-4499
- [36] Shi X, Chen F, Yu J, *et al.* Study of interaction between Smad7 and DNA by single-molecule force spectroscopy, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(4): 1284-1287
- [37] Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling, *Cell*, 1997, 89(7): 1165-1173
- [38] Chen YG, Meng AM. Negative regulation of TGF- β signaling in development, *Cell Res*, 2004, 14(6): 441-449
- [39] Shi W, Sun C, He B, *et al.* GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF β type I receptor, *J Cell Biol*, 2004, 164(2): 291-300
- [40] Hata A, Lagna G, Massagué J, *et al.* Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor, *Genes Dev*, 1998, 12(2): 186-197
- [41] Goto K, Kamiya Y, Imamura T, *et al.* Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors, *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20603-20611
- [42] Yamaguchi T, Kurisaki A, Yamakawa N, *et al.* FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7-Smurf1 complex on activin type I receptor, *J Mol Endocrinol*, 2006, 36(3): 569-579
- [43] Wang H, Song K, Krebs TL, *et al.* Smad7 is inactivated through a direct physical interaction with the LIM protein Hic-5/ARA55, *Oncogene*, 2008, 27(54): 6791-6805
- [44] Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, *et al.* Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF- β /Smad signaling, *Oncogene*, 2002, 21(32): 4879-4884
- [45] Kowanzet M, Lonn P, Vanlandewijck M, *et al.* TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling, *J Cell Biol*, 2008, 182(4): 655-662
- [46] Inamoto S, Iwata S, Inamoto T, *et al.* Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor- β signaling by inhibiting Smad6 and Smad7, *Oncogene*, 2007, 26(6): 893-904
- [47] Bai S, Shi X, Yang X, *et al.* Smad6 as a transcriptional corepressor, *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 8267-8270
- [48] Lin X, Liang YY, Sun B, *et al.* Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription, *Mol Cell Biol*, 2003, 23(24): 9081-9093
- [49] Grönroos E, Hellman U, Heldin CH, *et al.* Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination, *Mol Cell*, 2002, 10(3): 483-493
- [50] Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, *et al.* Arkadia amplifies TGF- β superfamily signalling through degradation of Smad7, *EMBO J*, 2003, 22(24): 6458-6470
- [51] Liu W, Rui H, Wang J, *et al.* Axin is a scaffold protein in TGF- β signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia, *EMBO J*, 2006, 25(8): 1646-1658
- [52] Kim BC, Lee HJ, Park SH, *et al.* Jab1/CAN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation, *Mol Cell Biol*, 2004, 24(6): 2251-2262
- [53] Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, *et al.* The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability, *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 21797-21803
- [54] Inamitsu M, Itoh S, Hellman U, *et al.* Methylation of Smad6 by protein arginine N-methyltransferase 1, *FEBS Lett*, 2006, 580(28-29): 6603-6611
- [55] Denissova NG, Liu F. Repression of endogenous Smad7 by Ski, *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 28143-28148
- [56] Tsunobuchi H, Ishisaki A, Imamura T. Expressions of inhibitory Smads, Smad6 and Smad7, are differentially regulated by TPA in human lung fibroblast cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 712-719
- [57] Hong S, Lim S, Li AG, *et al.* Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2, *Nat Immunol*, 2007, 8(5): 504-513
- [58] Choi KC, Lee YS, Lim S, *et al.* Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1, *Nat Immunol*, 2006, 7(10): 1057-1065
- [59] Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, *et al.* Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7, *Genes Cells*, 2001, 6(12): 1091-1099
- [60] Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways, *Cell Res*, 2009, 19(1): 71-88
- [61] Lin Z, Gao C, Ning Y, *et al.* The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/ β -catenin signaling, *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33053-33058
- [62] Edlund S, Landström M, Heldin CH *et al.* Smad7 is required for TGF- β -induced activation of the small GTPase Cdc42, *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 9): 1835-1847
- [63] Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(1): 15-34
- [64] Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis, *Cell Tissue Res*, 2002, 307(1): 1-14
- [65] Ahmed S, Nawshad A. Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to trans-

- forming growth factor- β signaling, *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3): 131-145
- [66] Zavadil J, Böttinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions, *Oncogene*, 2005, 24(37): 5764-5774
- [67] Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms, *Immunity*, 2006, 25(3): 455-471
- [68] Li MO, Wan YY, Sanjabi S, *et al.* Transforming growth factor- β regulation of immune responses, *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 99-146
- [69] Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, *et al.* Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis, *J Bone Miner Metab*, 2006, 24(2): 95-99
- [70] Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(3): 279-285
- [71] Monzen K, Nagai R, Komuro I. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation, *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(6): 263-269
- [72] Bobik A. Transforming growth factor- β s and vascular disorders, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(8): 1712-1720
- [73] Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, *et al.* A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system, *Nat Genet*, 2000, 24(2): 171-174
- [74] Zwijsen A, van Rooijen MA, Goumans MJ, *et al.* Expression of the inhibitory Smad7 in early mouse development and upregulation during embryonic vasculogenesis, *Dev Dyn*, 2000, 218(4): 663-670
- [75] Vargesson N, Laufer E. Smad7 misexpression during embryonic angiogenesis causes vascular dilation and malformations independently of vascular smooth muscle cell function, *Dev Biol*, 2001, 240(2): 499-516
- [76] Chen Q, Chen H, Zheng D, *et al.* Smad7 is required for the development and function of the heart, *J Biol Chem*, 2009, 284(1): 292-300
- [77] Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases, *Nephrology (Carlton)*, 2005, 10(1): 48-56
- [78] Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Smad7 in TGF- β -mediated negative regulation of gut inflammation, *Trends Immunol*, 2004, 25(10): 513-517
- [79] Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease, *Trends Mol Med*, 2002, 8(8): 361-363
- [80] Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response, *Int J Exp Pathol*, 2004, 85(2): 47-64
- [81] Dong C, Zhu S, Wang T, *et al.* Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 3908-3913
- [82] Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, *et al.* A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk, *Nat Genet*, 2007, 39(11): 1315-1317
- [83] Fidler IJ. Blockade of the TGF- β superfamily by Smad7: breaking a link in the metastatic chain, *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(23): 1714-1715

Regulation of TGF- β Superfamily Signaling by Inhibitory Smads

Xiao-Hua Yan¹, Jun-Yu Zhang², Ye-Guang Chen^{1*}

¹Department of Biological Science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²Department of Biology, Nanchang University, Nanchang 300031, China)

Abstract The transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily is a large group of structurally related growth factors, and by now more than 30 members have been identified in mammals. They play pivotal roles in embryonic development and in homeostasis of adult tissues. The TGF- β superfamily cytokines can transduce their signal through Smad-dependent or -independent pathways, and the signaling transduction processes are finely regulated at multiple levels. Inhibitory Smads (I-Smads), including Smad6 and Smad7, are key negative regulators in TGF- β /BMP pathways, and also function to integrate TGF- β family signals with other cellular signaling pathways. Biochemical experiments have revealed that Smad7 is a general antagonist to all the TGF- β superfamily members, while Smad6 is specific to block BMP signaling. In recent years, the physiologic functions of I-Smads start to become clear by utilizing the approaches of gene knockout, RNA interference or transgenic models. Smad6 seems to mainly regulate BMP-mediated physiological processes, while Smad7 may play a more important role in TGF- β -mediated processes, such as cell proliferation and death, immunity regulation as well as development of the cardiovascular system. The observation that I-Smads are closely related to several kinds of diseases indicates that they may be the potential therapeutic targets.

Keywords TGF- β ; signal transduction; Smad6; Smad7; crosstalk

*Corresponding author. Tel: 86-10-62795184, Fax: 86-10-62794376, E-mail: ygchen@tsinghua.edu.cn