

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00783

• 综述 •

Smurf1 调节因子在骨形态发生蛋白诱导骨生成中的作用

袁恒锋, 何崇儒, 高金巍, 徐卫东*

第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

[摘要] 骨形态发生蛋白(BMP)是明确具有诱导成骨作用的生长因子。其通过结合靶细胞表面受体,活化细胞内一系列 Smad 蛋白,经 Smad 蛋白介导,将信号转导至细胞核内,在一系列辅助因子的作用下,启动成骨基因的表达。细胞内源性 Smurf1 对这一整个过程起抑制作用。本文就 Smurf1 调节因子在骨形态发生蛋白诱导骨生成中的作用做一综述。

[关键词] 骨形态发生蛋白质类; Smad 蛋白质类; Smurf1

[中图分类号] R 336 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0783-03

Role of Smurf1 in bone morphogenetic protein-induced osteogenesis

YUAN Heng-feng, HE Chong-ru, GAO Jin-wei, XU Wei-dong*

Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Bone morphogenetic proteins (BMPs) are confirmed growth factors that can induce osteogenesis. They can bind to the surface receptors of target cells and activate a series of intracellular Smad proteins, which then transduce the signal into cell nuclear; and with the assistance of a series of cofactors, the osteogenic gene expression can be triggered. Endogenous Smurf1 plays an inhibitory effect on the above process. This paper reviews the role of Smurf1 in bone morphogenetic protein-induced bone formation.

[Key words] bone morphogenetic proteins; Smad proteins; Smurf1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 783-785]

骨形态发生蛋白(BMP)是一类转化生长因子(TGF)- β 超家族成员的多功能分泌型信号分子,参与调节多种细胞的增殖、分化和程序性死亡,在组织器官形成、胚胎发育和损伤组织的修复中起关键作用^[1]。Smad 蛋白是 BMP 细胞内信号转导和调节分子,可直接将 BMP 细胞外信号从细胞膜转导入细胞核,构成 BMP/Smad 信号转导通路,而细胞内源性的 Smad 泛素调节因子 1(Smad ubiquitin regulatory factor 1, Smurf1)对这一整个过程起抑制作用^[2]。

1 BMP/Smad 通路相关成员

1.1 BMP BMP 是从骨基质分离提纯的一类能高效诱导骨、软骨组织发生的酸性糖蛋白,除 BMP-1 外,其余均属于 TGF- β 超家族成员^[1],目前已有 20 余种成员。BMP 在体内以自分泌和旁分泌的形式诱导骨、软骨及骨相关结缔组织的形成,BMP 基因的重组蛋白在体外诱导间充质细胞分化的功能也得到了有效的验证。BMP 是一种二聚体分子,可以通过 2 个相同的链合成,也可以由 2 个不同的链以二硫键结合而成^[3]。BMP 是以一种大的前体蛋白的形式合成的,包括信号肽部分、前结构域和羧基末端区,羧基端含有 7 个保守的半胱氨酸残基,这些对于结合成正确的二聚体具有重要意

义,蛋白水解酶将羧基末端从前体蛋白切割下来即形成有活性的同二聚体前体或异二聚体。需要指出的是,由于 BMP 诱导成骨时,先形成软骨再形成骨,所以 BMP 对于软骨的形态发生同样具有重要作用。BMP-2 是目前研究最为广泛、诱导成骨活性最强的 BMP 家族成员之一,其通过激活 Smads 信号转导和调节成骨基因转录发挥成骨作用,上调 60 余种基因的表达^[4]。BMP-2 信号转导方式是首先与细胞膜 II 型受体结合,II 型受体磷酸化 I 型受体,后者激活下游的 Smads 蛋白,磷酸化激活的 Smads 蛋白转入细胞核,参与涉及软骨和骨形成基因的转录调控。

1.2 Smad 蛋白 Smad 蛋白家族是 BMP 信号转导蛋白,Smad 蛋白的名称来源于 Drosophila mothers against dpp (Mad)和 C. elegans Sma 的融合^[5],其一级结构可以分为 3 个功能区:N 区、中间连接区(也称 L 区)和 C 区。N 区和 C 区高度保守,分别称为 MH1 (Mad homology domain-1)和 MH2,富含脯氨酸。MH2 是功能效应区,MH1 是 MH2 的功能抑制区。目前为止,对于 L 区的功能尚不清楚。Smad 蛋白的 MH1 和 MH2 区通常呈结合状态,当受体与配体结合被活化后两者解离,形成 Smad 复合体向核内移行,在核内蓄积引起诸如 Runx2 靶基因的转录^[6]。

[收稿日期] 2010-12-21

[接受日期] 2011-02-22

[基金项目] 上海市基础研究重点项目(08JC1406700)。Supported by Grant from Key Basic Research Programs of Shanghai (08JC1406700)。

[作者简介] 袁恒锋,硕士生,住院医师。E-mail: yuanhengfengggg@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873393, E-mail: xuwdshanghai@126.com

Smad 蛋白家族分为 9 个亚型,即 Smad1~9。根据其功能又可分为 3 个亚组,即受体调节型 Smads(R-Smads),包括 Smad1、2、3、5、8、9;共同中介型 Smads (Co-Smads),在哺乳动物中仅发现 Smad4;抑制型 Smads (I-Smads),包括 Smad6 和 7。Smad1、5、8 是 I 型受体的直接底物,C 末端保守的 SSXS 模序的最后 2 个丝氨酸被磷酸化而活化,活化的 Smad1、5、8 与 Smad4 作用形成复合体,进入细胞核激活或启动 BMP 反应基因,或与其他 DNA 结合蛋白作用。Smad6、7 通常位于核内,作为抑制或关闭 BMP 受体激酶介导的对 Smad1、5、8 磷酸化传递,同时,Smad6、7 还可通过直接抑制 I 型受体磷酸化而终止 BMP 下游信号传递。

1.3 Smurf1 Smurf1 属于 E3 泛素连接酶家族。泛素标记需要被降解的蛋白质,继而使被标记的蛋白在蛋白酶体中被降解。E3 泛素连接酶主要负责特异性识别靶蛋白底物。Smurf1 主要通过和 Smad1、5 作用,引发 Smad 蛋白及与它们相互作用的蛋白质的泛素化和降解^[7]。

Smurf1 含有 1 个 HECT 结构域和 2 个 WW 结构域。在 HECT 结构域的羧基端有一个高度保守的半胱氨酸残基,该半胱氨酸与泛素之间可形成硫酯键,一旦将这个高度保守的半胱氨酸残基突变为丙氨酸或甘氨酸后,Smurf1 便完全丧失其泛素化和降解特定蛋白质的活性^[8]。WW 结构域是 Smurf1 的另一个重要特征,定位于其第 236 到 311 位氨基酸之间,含有大约 30 个氨基酸,其中包含高度保守的 2 个色氨酸和 1 个脯氨酸,具有与富含脯氨酸的小肽 (PPXY 结构) 相结合的能力。研究发现,当 Smad 蛋白的 PY 结构(富含脯氨酸和酪氨酸的结构域)发生突变,便失去了与 Smurf1 蛋白相互作用的能力,并由此抑制 Smad 蛋白的降解^[9]。CKIP-1 特异性作用于 WW 结构域从而增强 Smurf1 的活性^[10]。不同 WW 结构域表现出对不同底物的选择。

2 Smurf1 对成骨信号通路的抑制作用

BMP 通过结合靶细胞表面 2 种丝氨酸/苏氨酸激酶受体(即 BMP I 型、II 型受体)而向胞内传递信号^[11]。BMP 与持续表现激酶活性的 II 型受体结合后,I 型受体能够特异性地识别结合了 II 型受体的 BMP,并为之结合成为三聚体复合物,I 型受体因此而发生自身磷酸化。I 型受体再通过磷酸化 Smad1 或 Smad5 使其活化,被激活的 Smad1 或 Smad5 结合 Smad4 进入胞核,与 PDR II-BF1 结合形成一个活性转录调节复合体。该复合体具有与核内启动元素特异性的结合,继而调节特定基因转录的功能^[12]。

2.1 Smurf1 介导 BMP 受体的降解 Smurf1 通过介导 BMP I 型受体的降解,影响 BMP/BMPR-I s/BMPR-II s 三聚体的形成,进而从起始抑制 BMP 信号通路的下传^[13]。Smurf1 同 Smad6/7 在细胞核内结合,然后共同出核被运送到细胞膜上引发 BMP I 型受体的降解。Murakami 等^[14]发现,仅有 Smad6/7 或者 Smurf1 降解 BMP I 型受体的能力大为下降,提示这种降解功能是由两者形成的复合物共同完成的。那么,该复合物是如何出核的呢? 研究发现,Smurf1 蛋白的羧基端区域具有一个细胞核输出信号(nuclear export signal,NES),NES 可以与出核因子 CRM1(chromosome ma-

intenance region 1)相互作用。CRM1 属于 importin- β 相关核转运受体家族,能够特异性地与 NES 结合并介导含有 NES 信号的蛋白质(如 Smurf1)的出核运输^[14]。一旦 Smurf1 蛋白 NES 区域发生突变,Smurf1/Smad7 复合体的出核运输运动便受到阻断。

2.2 Smurf1 介导 Smad1 和 Smad5 蛋白的降解 Zhu 等^[15]早期在非洲蟾蜍胚胎中证实了 Smurf1 可以介导 Smad1 的降解。Zhao 等^[16]通过检测成骨细胞中 Smurf1 对 Smad1 降解的介导作用,发现在成肌/成骨前体细胞 C2C12 细胞系中,Smurf1 可以剂量依赖性地介导 Smad1 的降解,并且 Smurf1 介导 Smad1 的降解是以一种蛋白酶体依赖性的方式进行的。研究发现,一旦 Smurf1 的催化位点发生突变,其对 Smad1 的降解作用将明显变弱。同时蛋白酶体抑制剂可以剂量依赖性地逆转 Smurf1 对 Smad1 的降解作用。许多不同的蛋白酶体抑制剂也可以增强内源性 Smad1 蛋白的水平。

Ying 等^[17]通过在 C2C12 细胞系中过表达 Smurf1 发现 Smad5 蛋白的水平明显降低,并且这种降低可以被乳胞素(lactacystin,一种蛋白酶体抑制剂)逆转,尽管他同时发现过表达 Smurf1 后细胞内的 Smad1 蛋白并未发生明显变化,这可能与 Smurf1 介导 Smad 蛋白降解需要一定的蛋白阈值量有关,而此时细胞中的 Smad1 蛋白处于相当低的水平。另一方面,通过 RNA 干扰技术沉默 C2C12 细胞内源性的 Smurf1 后,Smad5 蛋白的水平明显上升。

2.3 Smurf1 介导转录因子 Runx2 蛋白的降解 Runxs 是新发现的一类调控间充质干细胞向成骨方向分化的特异性转录因子,包括 Runx1、2、3。Runx2 通常也称作 Cbfa1(核结合因子),其作为 BMP-2 的靶基因,是成骨细胞分化、骨发育的重要调节因子,在成骨细胞分化过程中起着重要作用^[18]。Runx2 在 BMP 信号通路中同 Smad1 蛋白结合形成一种复合物,共同激活下游靶基因的表达。

由于转录因子 Runx2 蛋白结构中含有 Smurf1 可识别的 PY 结构,Zhao 等^[16]研究了 Smurf1 在 C2C12 和成骨前体细胞系 2T3 中对 RUNX2 蛋白降解的介导作用,通过免疫共沉淀实验证实了 Smurf1 蛋白和 Runx2 蛋白之间的相互作用。Smurf1 可以剂量依赖性地降低细胞中原本十分稳定表达的 Runx2 蛋白水平,并且这种降解现象是蛋白酶体依赖性的。Smad6 在与 Runx2 结合的过程中,可以增强这一降解作用。同时,Ducy 等^[19]通过共转染 Smurf1 和 Runx2 到 C2C12 细胞中,发现 Runx2 的表达水平和功能明显降低,而共转染缺乏催化活性的突变型 Smurf1 和正常的 Runx2 基因到 C2C12 细胞中,突变的 Smurf1 对 Runx2 的活性没有明显影响。Bellido 等^[20]将 Smurf1 转染到成骨细胞 OB-6 细胞系的实验中也发现了类似的结果。

3 Smurf1 抑制成骨细胞分化和骨形成

为了确定 Smurf1 对成骨细胞分化的影响,Zhao 等^[21]成功地构建了稳定转染 Smurf1 表达质粒的成骨前体细胞 2T3 的亚克隆细胞系(2T3/Smurf1)。与作为对照的 2T3/Vector 单克隆细胞系相比,2T3/Smurf1 单克隆细胞系的碱性磷酸酶活性下降了 80% 以上。同时,在 2T3/Smurf1 单克隆细胞系

中,几种成骨特异性标志基因如 Osterix、Runx2、I型胶原和骨钙素的表达量降低。在成骨细胞终末分化时,过表达 Smurf1 可以抑制矿化骨节结的形成。与这些结果相一致,当瞬时转染突变的 Smurf1 表达质粒到 C2C12 细胞中时,BMP-2 诱导的碱性磷酸酶活性升高,该细胞系骨钙素的表达也增强。

在小鼠 C2C12 细胞系中过表达 Smurf1 会促进 C2C12 细胞向成肌方向分化,并阻断 BMP 诱导的成骨分化。而通过 RNA 干扰技术沉默 C2C12 细胞内的 Smurf1 则可以促使该细胞系向成骨方向分化。此外,Kaneki 等^[22]发现肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 可以通过上调成骨前体细胞中 Smurf1 和 Smurf2 的表达而诱发 Runx2 蛋白的降解,进而抑制骨形成。而特异性沉默 Smurf1 和 Smurf2 则可以阻止 TNF 发挥其诱导 Runx2 进行降解的功能。在体实验方面,Zhao 等^[21]将带 Flag 标记的 Smurf1 基因定位到小鼠成骨细胞中表达建立了转基因小鼠系,该转基因小鼠系小梁骨容量、骨形成率和成骨细胞的数量都明显下降,并且该鼠系成骨细胞的增殖和分化都被抑制。与这些结果一致,Yamashita 等^[23]发现 Smurf1 基因敲除小鼠的骨形成明显增强,其骨矿质密度、小梁骨容量和骨形成率都升高。

4 结 语

骨组织的形成是一个由多种因素调节的复杂而有序的过程。从分子水平上看,骨组织的形成过程主要通过 BMP 信号通路来完成,BMP 是目前最肯定的具有诱导成骨作用的生长因子。大量研究证实,Smurf1 在 BMP 信号转导通路中起着重要的作用,主要通过诱导 BMP 受体、Smad1 和 Smad5 蛋白以及 Runx2 蛋白的降解来对 BMP 信号通路进行负调控。尽管目前对于 Smurf1 在体实验的研究尚处于起始阶段,但我们理由相信,随着基础研究的不断发展及临床的不断探索,Smurf1 将有助于拓展骨质疏松症、骨缺损等骨科疾病的新领域。

【参 考 文 献】

- [1] Chen D,Zhao M,Mundy G R. Bone morphogenetic proteins[J]. Growth Factors,2004,22:233-241.
- [2] Xing L,Zhang M,Chen D. Smurf control in bone cells[J]. J Cell Biochem,2010,110:554-563.
- [3] Lin Y,Martin J,Gruendler C,Farley J,Meng X,Li B Y,et al. A novel link between the proteasome pathway and the signal transduction pathway of the bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. BMC Cell Biol,2002,3:15.
- [4] Liu T,Gao Y,Sakamoto K,Minamizato T,Furukawa K,Tsukazaki T,et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines[J]. J Cell Physiol,2007;211:728-735.
- [5] Derynck R,Gelbart W M,Harland R M,Heldin C H,Kern S E,Massagu J,et al. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals[J]. Cell,1996,87:173.
- [6] Wang C,Chen L,Wang L,Wu J. Crystal structure of the MH2 domain of Drosophila Mad[J]. Sci China C Life Sci,2009,52:539-544.
- [7] Sangadala S,Metpally R P,Reddy B V. Molecular interaction between Smurf1 WW2 domain and PPXY motifs of Smad1, Smad5,and Smad6—modeling and analysis[J]. J Biomol Struct Dyn,2007,25:11-23.
- [8] Zhu H,Kavsak P,Abdollah S,Wrana J L,Thomsen G H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation[J]. Nature,1999,400:687-693.
- [9] Zhang Y,Chang C,Gehling D J,Hemmati-Brivanlou A,Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:974-979.
- [10] Lu K,Yin X,Weng T,Xi S,Li L,Xing G,et al. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1[J]. Nat Cell Biol,2008,10:994-1002.
- [11] Massagué J,Andres J,Attisano L,Cheifetz S,López-Casillas F,Ohtsuki M,et al. TGF-beta receptors[J]. Mol Reprod Dev,1992,32:99-104.
- [12] Mehler M F,Mabie P C,Zhang D,Kessler J A. Bone morphogenetic proteins in the nervous system[J]. Trends Neurosci,1997,20:309-317.
- [13] Chan M C,Nguyen P H,Davis B N,Ohoka N,Hayashi H,Du K,et al. A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor[J]. Mol Cell Biol,2007,27:5776-5789.
- [14] Murakami G,Watabe T,Takaoka K,Miyazono K,Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads[J]. Mol Biol Cell,2003,14:2809-2817.
- [15] Zhu H,Kavsak P,Abdollah S,Wrana J L,Thomsen G H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation[J]. Nature,1999,400:687-693.
- [16] Zhao M,Qiao M,Oyajobi B,Mundy G R,Chen D. E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem,2003,278:27939-27944.
- [17] Ying S X,Hussain Z J,Zhang Y E. Smurf1 facilitates myogenic differentiation and antagonizes the bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast conversion by targeting Smad5 for degradation[J]. J Biol Chem,2003,278:39029-39036.
- [18] Ducy P,Zhang R,Geoffroy V,Ridall A L,Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. Cell,1997,89:747-754.
- [19] Ducy P,Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene [J]. Mol Cell Biol,1995,15:1858-1869.
- [20] Bellido T,Ali A A,Plotkin L I,Fu Q,Gubrij I,Roberson P K,et al. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism[J]. J Biol Chem,2003,278:50259-50272.
- [21] Zhao M,Qiao M,Harris S E,Oyajobi B O,Mundy G R,Chen D. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation *in vitro* and *in vivo* [J]. J Biol Chem,2004,279:12854-12859.
- [22] Kaneki H,Guo R,Chen D,Yao Z,Schwarz E M,Zhang Y E,et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts[J]. J Biol Chem,2006,281:4326-4333.
- [23] Yamashita M,Ying S X,Zhang G M,Li C,Cheng S Y,Deng C X,et al. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation [J]. Cell,2005,121:101-113.