

BMP 信号途径与心脏的形态建成

向志明, 朱传炳, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: Bone morphogenic protein (BMP) 是骨形态建成蛋白, 最初的研究显示它与骨骼及其相关组织的发育有关, 后来发现它在包括心脏在内的人类各种器官发育中都有着很重要的作用, 因此, 阐明 BMP 信号调控途径在心脏分化中的机制具有非常重要的意义. 最近, 研究发现了很多和 BMP 有关的生长因子, 并且得知了 BMP 信号的部分传递途径, 它通过诱导 *Nkx2.5*、*GATA-4* 来调控心脏分化, 如果掌握了其分子机制, 则可以治疗各种相关的心脏疾病, 使心脏损伤可以得到恢复.

关键词: BMP 信号传递途径, 心脏发育, Cre/loxP 系统

中图分类号: Q26

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S0-0014-04

BMP Signal Transduction Pathway and Cardiac Morphogenic Development

XIANG Zhi-ming, ZHU Chuan-bing, WU Xiu-shan

(Key Lab of MOE for Development and Protein Chemistry, College of Life Sciences,
Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The primary researches on Bone Morphogenic Protein (BMP) showed that it related to bone morphogenic development or its relevant organizations. Later, BMP was found to be very important in all kinds of organs' development of human beings, and it is the key factor specially in the heart development, so it is very important to illustrate the BMPs signal transduction pathway in the heart. Recent researchs have been found that many transforming growth factors about BMP and something about the signal pathway. Researches also showed that BMP regulated the differentiation of the heart through inducing *Nkx2.5*, *GATA-4*, so if its molecular mechanism is known, some heart diseases could to be cured.

Key words: BMP signal pathway; heart development; Cre/loxP system

(*Life Science Research*, 2004, 8(2): 014 ~ 017)

在哺乳动物中, 骨形态建成蛋白(BMP)信号途径的构成功能是什么, 目前这个问题只在模式动物如果蝇、蛙类、鱼类和鸟类中得到了部分解答^[1, 2]. 在

本文中, 我们对 BMP 及其相关蛋白的 DNA 分子、蛋白质结构与性质以及信号途径做了一定的研究, 并围绕它们以及下游基因在心脏发育中相互

收稿日期: 2004-05-15; 修回日期: 2004-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3017049, 30370644, 30213904); 教育部重点课题项目(02A028); 湖南省教育厅项目(02B017).

作者简介: 向志明(1977-), 男, 湖南新化人, 硕士研究生, 从事分子发育遗传学研究; 吴秀山(1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士, 通讯作者, 从事分子发育遗传学研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com.

关系,对心脏形态建成中的 BMP 信号途径做了一定范围的阐述.

1 BMP 蛋白及其相关蛋白

BMP 蛋白具有 WD40 结构域、二聚体、7 个 β 折叠,在每一个 BMP 蛋白单体中,都有一个半胱氨酸残余. BMP 蛋白属于 β 生长因子蛋白质家族^[3,4],含有同源度很高的保守域,至少有 6 种在心脏特异表达的 BMP 蛋白(-2, -4, -5, -6, -7 和 -10),BMP 有两种细胞膜受体.在哺乳动物中已经确认,即两种 BMP-I 型受体和一种 BMP-II 型受体,受体都是二聚体为一个功能单位,通过磷酸化作用来传递信号. BMP 受体在与配体结合后,其胞质段的丝氨酸-苏氨酸激酶结构域活性升高,能持续作用,使得 II 型受体磷酸化 I 型受体(仅仅只有 II 型受体能够接受胞外信号,然后通过磷酸化的方式将信号传递给 I 型受体).磷酸化后的 I 型受体又能使转录因子 Smad 磷酸化,并与之构成复合物进入核内,启动下游靶基因的表达^[2]. Smad1、Smad5、和 MADH6 都可以为 BMP 受体所激活,与 Smad4 构成复合物,进入细胞核,启动基因转录.而 Smad6、Smad7 是其他 Smads 的抑制因子^[5,6],起着分子开关的作用.

尽管如此,还是至少有 15 种 BMP 蛋白在哺乳动物中被发现,而且 BMP-2、BMP-4^[7]彼此有着 83% 的氨基酸相同,如果对 BMP-4 进行活体的基因敲除实验,会导致胚胎晚期的腹鳍形成发生缺陷,胚胎会在 E6.5 到 E9.5 天内死亡. BMP-2 在胚胎发育中起着非常重要的作用,如果敲除小鼠的 BMP-2 基因,会导致胚胎羊膜畸形,心脏发育不全^[8],而 BMP-4 在小鼠的房室分隔过程中起着很重要的作用,因此, BMP-2/BMP-4 在胚胎发育中的作用是不可以忽视的.针对其他模式动物的研究,也确认了 BMP 蛋白在器官发育过程中的重要作用^[9].

能产生 TGF- β ^[2]的细胞含有许多潜在的无活性的 TGF- β 蛋白,一旦需要 TGF- β 可以被激活;与之不同的是,潜在的 BMP 分子就是激活态,它们本身不需要再次激活.然而,它们仍然需要受到调控,这种调节发生在它们与 BMP 受体结合之前, Noggin 就是它的一种负调控蛋白^[10],它可以与 OP-1/BMP-7、BMP-2/4 结合^[5],抑制其与受体的结合.用编码 Noggin 的反转录病毒去感染鸡胚的心脏能导致动静脉管分隔缺损,并且在神经

冠细胞迁移至房室内垫的过程中有缺陷,同时房室内垫中间叶细胞也不能正常增殖. Chordin (Xenopus) 蛋白也有类似的作用.不同生物的 BMP 有不同的抑制因子,此外, BMP 的转录受到别的基因调控,敲除小鼠的 *follistatin* 基因,会导致众多的现象,诸如皮肤、横膈膜、上颌和肋骨硬化,出生后不久死亡.研究表明 BMP 信号途径在细胞命运、体轴形成和形态发生中起了很大的作用,通过对果蝇、鱼、蛙心脏的一系列研究,发现心肌细胞特化和四腔室心脏的形成是通过 BMP 及其受体来介导的.鸟类的研究显示, BMP 的等位基因敲除的个体在原肠胚阶段就死亡.为了研究 BMP 在后期胚胎发育中的作用,科学家们用了很多方法,最典型的一个策略就是采用 Cre/loxP 系统,产生组织特异性的基因打靶,在心肌细胞中特异的敲除 *ALK3* 基因,将 Cre 酶用心肌特异 α -肌球蛋白重链基因的启动子驱动,使它能在 E11.5 时心房心室都高效表达,使胚胎发育通过原肠期,研究 BMP 在原肠胚阶段以后胚胎发育中的作用^[11].

2 BMP 受体 II 与分子机理在生物体内的重要性

BMP 有两种受体,受体 I 和受体 II,它们都是二聚体(是相同的二分子二聚二),具有丝氨酸-苏氨酸激酶活性.对于信号传导来说,这两种受体都是不可以缺少的,在 TGF- β 激活受体系统时,首先,并且必须是受体 I 最先磷酸化,然后受体 II 发生磷酸化.这两种受体很相似,它们位于细胞外有简短的,含有丝-苏氨酸保守序列的结构域,这是一个信号接受的区域,而在细胞内含有一段具丝氨酸-苏氨酸激酶活性的区域(一个具有重复的甘氨酸和丝氨酸的氨基酸序列).在哺乳动物中,已经鉴定了 7 种 I 型受体和 5 种 II 型受体^[3,4].

有关受体丝-苏氨酸激酶激活的分子机制,为多数生物学家所重视,研究表明,受体 I 最先磷酸化,然后与受体 II 构成聚合物,受体 II 的胞内 DS 结构域随后磷酸化,显现磷酸化酶活性,使信号得以传递.酵母双杂交测试受体 I,表明 FKBP12 是它激活的一个因子.利用 PCR 技术和酵母双杂交技术,以受体 I 的胞内部分为诱饵,我们可以得到具有 1 038 个氨基酸序列的产物,在其 C 端具有丰富的丝氨酸和苏氨酸,但是在

多数细胞含量很少。受体 II 在很多组织都可以得到表达, 诸如肌肉、大脑、心脏。还可以在体外培养的细胞中得到表达, 受体 II 可以和 BMP-2、BMP-4、BMP-7 结合, 但是很微弱, 只有在受体 I 存在时, 三者才可以形成稳定的聚合物。Bmpr II^{Δ E2/Δ E2} 小鼠表现为骨骼和心脏外流支缺陷, 心脏外流支开始正常, 但内垫不能膨大, 显示 BMPR II 在心脏外流支内垫的形成和半月瓣形态发生中具有一定的作用^[12]。

BMPR-I, 它也是由二种肽构成的二聚体, 如 BMPR-IA (or ALK-3) \ BMPR-IB (or ALK-6), 它们在同源区有大于 85% 的相似度, 而结构域末端的相似度则相对较低。BMPR-IA 在各种细胞可以表达, 包括 MC3T3-E1 造骨细胞, C2C12 细胞等, BMPR-IB 的表达范围要小得多。在心肌细胞中敲除 ALK3 基因会导致一些信号传导失效, 导致房室内垫发育畸形。这意味着在房室瓣的形成中, 这些信号是心肌发育不可以缺少的。用 Mox2-Cre 转基因小鼠在外胚层敲除 ALK3 基因, 胚胎能正常发育至原肠胚时期, 但用免疫组化的方法检验不到明显的心脏发育迹象^[11]。

BMP-7 可以和 BMPR-IB 稳定地结合, 二者与 BMP-4 的结合力相近, GDF-5 只与 BMPR-IB 结合, 然而, BMPR-IB 在信号的传递中起着主要作用。

3 BMPR 下游的信号传导——SMAD 蛋白

BMPR 使下游的分子磷酸化, 传递信号, 现在, 通过各种方法, 我们已经找出了 BMPRI 下游的信号蛋白 SMAD, 由 Sma 蛋白和 MAD (Mothers against dpp Mad) 蛋白构成的复合物, 从无脊椎动物到脊椎动物, 都发现了该家族成员, 并且基因名称和符号通用。其种类有 Smad (1、2、3、4、5、6、7) \ Mad (D) \ Dad (D), 对于这个蛋白的功能, 我们现在还无法得到其详细信息。但是我们知道, 被激活的 Smad 蛋白可以相互作用, Smad1/5、Smad4、TAK1 构成聚合物, 穿过细胞核膜, 与 Csx/Nkx2-5、GATA-4 作用, 启动心肌细胞基因转录, 作用于心脏, 影响其形态建成。

不同的 Smad 蛋白在不同的信号体系中以不同的方式相互协调, 所有的 Smad 蛋白除了 Smad7 和 Dad 以外, 都具有一个保守的 N 末端序列。Smad1 和 Smad 4 都具有 MH2 结构域^[5, 6, 13], 通过

免疫沉淀反应实验, Smad4 以一种多聚物形式存在。Smad 突变是致死性的。Smad 直接为受体 I 所激活, Smad7、Smad6 和 Dad 由第 3 种 Smad 组成, 它们在各种组织履行类似的生理功能, 它们是 TGF-β 的抑制因子, 阻止 Smad 传递信号, 它们可以和受体结合, 竞争性抑制了其他 Smad 的活性。Smad 6 是 BMP 的抑制因子, 当我们将它的 mRNA 注射入动物胚胎的背脊区域时, 发现胚胎的内脏发育不能够卷曲, 心脏发育受到抑制, 心脏小而且壁很薄^[13]。

4 BMP 在心脏内最重要的两个靶基因 (Csx/Nkx2-5 和 GATA-4)^[14]

Csx/Nkx2-5 是具有 NK-2 同源框的转录因子, 它特异性地在胚胎早期表达, 表达于心脏和心脏起源性细胞。当两个心脏原基对称地位于中胚叶前面时, 在鼠中敲除该基因, 心脏形成, 但是心脏发育停滞于环化期, 它可能会诱导中胚层正常细胞转化为具有心脏性质的细胞, GATA-4 是心脏 GATA 的亚科, 在脊椎动物中已经发现了 6 个 GATA 转录因子, 每个都具有保守的 DNA 结合位点, 其中 GATA-4, -5 和 -6 在心脏特异性表达, GATA-4 与 WGATAR 促进子区域结合, 具有心脏特异性, 它与 Csx/Nkx2-5 同时表达, 在鸡胚试验中发现, BMP-2 可以诱导这两个基因表达, 而 Noggin 却抑制它们的表达。

总之, BMP 对胚胎的发育是必须的, 但是, 它在胚胎发育中起作用的时间不是最早的, 而是在胚胎发育中期的某一段时间, 其中 BMP 家族的一些成员, 对心脏的发育的调控有着重要的影响。此外, BMP 通过 Ecsit-ement 与 Toll 信号系统作用, 及与其他信号途径的作用, 还有待研究。

参考文献 (References):

- [1] WALTERS M J, WAYMAN G A, CHRISTIANA J L. Bone morphogenetic protein function is required for terminal differentiation of the heart but not for early expression of cardiac marker genes[J]. Mechanisms of Development, 2001, 100: 263-273.
- [2] KAWABATA M, MIYAZONO I K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins[J]. Cytokine Growth Factor Reviews, 1998, 1: 49-61.
- [3] MATZUK M M, LU N, VOGEL H, et al. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin[J]. Nature, 1995, 374: 360-363.

- [4] TEN D P, MIYAZONO K, HELDIN C H. Signaling via hetero oligomeric complex of type I and type II serine: threonine kinase receptors[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8: 139-145.
- [5] HAYASHI H, ABDOLLAH S, QIU Y, *et al.* The MAD related protein Smad6 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling[J]. *Cell*, 1997, 89: 1165-1173.
- [6] NAKAO A, AFRAKHTE M, MORE A, *et al.* Identification of Smad6- a TGF- β inducible antagonist of TGF- β signaling[J]. *Nature*, 1997, 389, 631-635.
- [7] FAINSOD A, DEISSLER K, YELIN R. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP- 3[J]. *Mech*, 1997, 63: 39-50.
- [8] ZHANG H, BRADLEY Allan. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development[J]. *Development*, 1996, 122: 2977-2986.
- [9] KAI J, KULESSA H, TOMPKINS K, *et al.* An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart[J]. *Genes & Development*, 2003, 17: 2362-2367.
- [10] ALLEN S P, BOGARDI J P, BARLOW A J, *et al.* Misexpression of noggin leads to septal defects in the outflow tract of the chick heart development[J]. *Biology*, 2001, 235: 98-109.
- [11] GAUSSIN V, MISHINA T V P Y, HANKS Mark C, *et al.* Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3[J]. *PNAS*, 2002, 99: 2878-2883.
- [12] NAGAI K M, RYOZO, KOMURO IsseI. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation[J]. *TCM*, 2002, 12(6): 263-269.
- [13] IMAMURA T, TAKASE M, NISHIHARA A, *et al.* Smad5 inhibits signalling by the TGF superfamily[J]. *Nature*, 1997, 389: 622-626.
- [14] ZAFFRAN S, FRASCH M. Early signals in cardiac development[J]. *Circulation Research*, 2002, 8: 457-469.