

· 综 述 ·

姜黄素抑制转化生长因子 β 信号通路
对脊髓损伤修复作用的研究进展

高梦丹 林敬铨 童 亮 张金一 刘学红

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种以高发病率和致残率为特点的神经系统损伤性疾病,在美国每年有超过 10 000 的人口患 SCI,中国 SCI 发病率也呈逐年上升趋势^[1,2]。脊髓在遭受机械损伤后,出现原发性和继发性的病理生理改变:原发性损伤包括脊髓裂伤、挫伤、压迫伤和震荡性损伤等,直接造成不可逆的组织结构破坏和细胞坏死,临床上难以治疗^[3];在原发性损伤后数分钟到数小时内出现的继发性损伤,包括免疫炎症反应、胶质瘢痕增生、细胞凋亡、组织水肿、轴突脱髓鞘、自由基产生和脂质过氧化等病理生理变化,可进一步扩大原发伤的范围^[4]。星形胶质细胞(astrocytes, AS)反应性增生形成的胶质瘢痕是阻碍轴突再生的关键因素,转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 与瘢痕形成有着密切的关系,SCI 后 TGF- β 信号通路活化,脊髓组织中胶质细胞、神经元等多种细胞内的 TGF- β 水平上调,通过调控靶基因的转录促进胶质瘢痕增生。胶质瘢痕除了形成机械屏障,还能产生抑制性分子抑制轴突的生长,最终导致神经功能永久性丧失的严重后果。姜黄素是从姜黄科植物根茎中提炼的天然植物多酚,能通过抑制 TGF- β 信号通路减少胶质瘢痕的产生,对 SCI 修复具有重要意义。本文就 TGF- β 信号通路、TGF- β 信号通路在 SCI 中的作用机制以及姜黄素抑制 TGF- β 信号通路在 SCI 中的作用方面作一综述。

1 TGF- β 信号转导通路

TGF- β s 与活化素、生长分化因子等 40 多个成员共同组成 TGF- β 超家族。哺乳动物中 TGF- β s 主要有 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 三种亚型,几乎所有类型的细胞均可合成和分泌无活性的 TGF- β 以及表达相

应受体,在增生分化活跃的组织细胞中 TGF- β 水平相对较高^[5,6]。

1.1 TGF- β 信号转导通路的组成

TGF- β 信号通路通过 Smad 蛋白依赖的经典途径和非经典途径调节多种细胞活动,非经典途径包括丝裂原活化蛋白激酶、Rho 相关蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 等信号通路^[7]。经典的 TGF- β 信号转导通路主要由 TGF- β s、TGF- β 受体以及中介蛋白 Smads 等组成。TGF- β 受体主要为 I 型 TGF- β 受体(TGF- β receptor I, T β R I)和 II 型 TGF- β 受体(TGF- β receptor II, T β R II)^[6]。胞浆中调控 TGF- β 信号通路的 Smads 可分为受体调节型 Smad (receptor-regulated Smads, R-Smads, 即 Smad2 和 Smad3)、共调节型 Smad (即 Smad4)、抑制性 Smads (即 Smad7)^[5,8]。

1.2 TGF- β 信号转导通路的经典活化过程

TGF- β 信号通路的活化是将信号由细胞膜转导至胞浆,再转导至细胞核的过程。TGF- β 经酸化、蛋白酶水解或激活剂等途径活化后,与细胞表面的受体结合并启动 TGF- β 信号转导过程。TGF- β 结合 T β R II 后又招募 T β R I,由此形成三聚体复合物。同时,T β R I 的甘氨酸/丝氨酸富集区域被 T β R II 磷酸化,活化的 T β R I 又磷酸化 R-Smads,将信号由胞膜转导至胞浆。随后,R-Smads 与 Smad4 结合形成 Smad4-R-Smads 复合物,并转位至细胞核与特定靶基因结合,调节靶基因的转录^[9,10]。

2 TGF- β 信号通路在 SCI 中的作用

TGF- β 的生物活性在中枢神经系统中主要表现为促进胶质瘢痕形成。在 SCI 后,TGF- β 诱导胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)表达增加,胶质瘢痕增生显著^[10]。SCI 后,TGF- β_1 表达于血小板、神经元、反应性星形胶质细胞(reactive astrogliosis, RAS)以及免疫炎症细胞等,而 TGF- β_2 主要在 RAS 中高表达^[11]。

2.1 TGF- β 信号通路促进 SCI 后胶质瘢痕形成

基金项目:浙江省自然科学基金资助课题(No. LY15H170001);绍兴市公益性技术应用研究计划资助项目(No. 2013D10035)

作者单位:绍兴文理学院医学院组织学与胚胎学教研室(浙江 312000)

通讯作者:刘学红, Tel: 0575-88345877, E-mail: liuxueh6588@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180506. 131

SCI 后 1~3 天,损伤处坏死组织液化形成囊腔,AS 在损伤刺激作用下形成 RAS。在损伤后 4~8 周,在囊腔周围形成的由 RAS、ECM、成纤维细胞以及免疫细胞等构成的胶质瘢痕,是 SCI 后轴突再生障碍的主要原因。胶质瘢痕除了形成物理屏障,更重要的是产生抑制性分子(如 CSPGs)形成化学屏障^[11]。CSPGs 主要由 RAS 分泌产生,轴突延长至 CSPGs 丰富区域就会停止生长。Hsu JY 等^[12]发现与未损伤组织比较,损伤后 6 周小鼠脊髓组织中的 CSPGs 水平明显升高,轴突伸长停滞。

组织损伤后,AS 显著增生并分泌 TGF- β ,诱导 RAS 分泌大量 CSPGs,促进 ECM 过度沉积和瘢痕增生。据报道,TGF- β_1 水平较早升高,而 TGF- β_2 延迟升高,认为 TGF- β_1 调节早期炎症反应和损伤部位胶质瘢痕增生,TGF- β_2 主要与后期胶质瘢痕形成有关^[13]。SCI 的小鼠敲除 TGF- β_1 基因后,TGF- β_1 、ECM 和瘢痕组织等表达减少,神经功能部分恢复,后肢运动功能明显改善^[14]。Hellal F 等^[15]得出相似的结论,抑制 SCI 后 TGF- β_1 /Smad 信号通路能减少 ECM 沉积和胶质瘢痕增生。这些研究结果表明 TGF- β_1 既调控早期炎症反应,又参与后期胶质瘢痕的形成。在 AS 的体外培养过程中,向培养基内加入 TGF- β_1 ,培养 24 h 后检测到 TGF- β_1 和 TGF- β_2 浓度均升高^[16]。由此推断,SCI 后 AS 活化而释放的 TGF- β_1 又可反过来激活该细胞,促使其合成、分泌更多的 TGF- β ,形成正反馈效应导致胶质瘢痕过度增生。

2.2 TGF- β 信号通路促进 SCI 后胶质瘢痕形成的机制

SCI 后典型的 TGF- β 调节胶质瘢痕增生是通过 Smad2/3 信号通路实现的。研究发现,磷酸化发生在连接区域的 Smad3 主要表达于损伤后脊髓灰质内的 RAS,且 GFAP 的浓度也明显升高,认为 Smad3 在胶质瘢痕形成过程中起着重要的作用^[17]。在损伤的刺激作用下,RAS 产生并分泌无活性的 TGF- β 二聚体,TGF- β 经裂解、活化后以旁分泌和自分泌的方式与细胞膜表面受体结合,启动 TGF- β 信号通路的活化过程,激活下游 Smad 蛋白。具有转录活性的 Smad2 和 Smad3 活化后与 Smad4 结合成复合物,迅速从胞浆转位至细胞核,通过调控 CSPGs 的基因表达,促进 ECM 沉积与胶质瘢痕增生。然而,近年研究表明 TGF- β 经非经典途径调控 SCI 后胶质瘢痕,如 TGF- β 可通过非 Smad 依赖活化的下游磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路调节 SCI 后 CSPGs 的表达^[18]。由磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋

白激酶 B 通路诱导产生的轴突导向因子 Semaphorin7A 在 SCI 后高表达,影响后期 ECM 沉积和瘢痕形成^[19]。此外,还有研究发现粒-巨噬细胞集落刺激因子可抑制 SCI 后 RAS 中 TGF- β 介导的 Rho 相关蛋白激酶信号通路,减少 CSPGs 与胶质瘢痕的沉积^[20]。

3 姜黄素

姜黄素,即 1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮,是一种从姜科植物姜黄的干燥根茎中分离出来的橙黄色天然植物多酚,分子式为 $C_{12}H_{20}O_6$,分子量为 368.38。姜黄素是姜黄的主要活性成分,可有效地穿过血-脑屏障,具有多种生物学作用,如抗炎、抗氧化、抗纤维化、抗肿瘤、抗感染等^[21,22]。由于姜黄素药理学作用广泛,且不良反应小,临床上可应用于肿瘤、肝肺等脏器的纤维化、脑梗死、高血脂等多种疾病的治疗,多为片剂或粉末口服给药。近几年,姜黄素的神经保护作用引起了较大的关注。Ma J 等^[23]通过建立大鼠坐骨神经挤压损伤模型,腹腔注射不同剂量的姜黄素,治疗 4 周后与对照组比较,姜黄素组神经再生及运动功能明显改善,且高剂量姜黄素组促进神经再生的效果明显优于低剂量组。在神经系统损伤中,姜黄素作为神经保护药物具有较高的研究与治疗价值。

3.1 姜黄素对 TGF- β 信号通路的抑制作用

姜黄素通过抑制 TGF- β 信号通路阻断 TGF- β 诱导的 ECM 过度沉积和组织纤维化病程,从而抑制多种脏器增生性瘢痕形成。TGF- β_1 与纤维增生性疾病有着密不可分的关系,姜黄素主要对 TGF- β_1 有着显著的抑制效应。Yao QY 等^[24]研究发现在肝纤维化以及终末期肝硬化的病理改变过程中,肝细胞释放的 TGF- β_1 可使静止的肝星状细胞活化、转分化为肌成纤维细胞,从而促进胶原蛋白的产生和异常沉积,该过程是导致脏器纤维化和肝功能减退的关键环节。与单纯注射四氯化碳的控制组比较,姜黄素处理组的肝组织中 TGF- β_1 水平明显降低,可见姜黄素能通过抑制 TGF- β_1 的表达抑制脏器纤维化。此外,实验还发现姜黄素组大鼠肝组织中,Smad2、Smad3 和磷酸化的 Smad2 表达受抑制,而抑制性蛋白 Smad7 表达上调,若延长体内姜黄素治疗,可见 T β R II 水平也显著降低。Hu Y 等^[25]实验表明,TGF- β_1 引起细胞内纤溶酶原激活物抑制因子-1 和 α 平滑肌肌动蛋白的 mRNA 表达增加。蛋白印迹分析显示,姜黄素处理后 Smad2 的磷酸化受到明显抑制,而姜黄素对磷酸化的 Smad3 抑制作用不强。当姜黄素浓度达到 10 μ mol/L

时,可减少 R-Smad 在细胞核内的堆积。另有研究表明,TNF- α 能够通过激活成纤维细胞的胞外信号调节激酶通路提高 TGF- β_1 的表达水平,姜黄素可抑制 TNF- α 诱导的 TGF- β_1 基因表达,从而减轻肺纤维化反应^[26]。

3.2 姜黄素抑制 TGF- β 信号通路在 SCI 修复的作用

姜黄素抗增生性瘢痕的特性在脊髓损伤中表现为抑制胶质瘢痕形成,且该作用已被近几年的许多研究所证实:Wang YF 等^[27]将姜黄素溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),腹腔注射给药,在成年小鼠脊髓压迫性损伤后 14 天的模型中发现损伤区域周围的 GFAP 表达增加,而姜黄素处理组显示组织中 GFAP 水平明显降低。GFAP 是 AS 增生和胶质瘢痕形成的标志性蛋白,而姜黄素能够有效地抑制 GFAP 的表达,具有减少 SCI 后胶质瘢痕形成和促进轴突生长的作用。与仅用等量 DMSO 处理的对照组比较,姜黄素处理组损伤部位 GFAP/nestin 双标记的细胞明显减少,这表明姜黄素可抑制 SCI 后 AS 反应性增生的进程。

姜黄素对 CSPGs 的抑制作用是其抑制胶质瘢痕形成的最重要体现。研究表明单纯脊髓损伤组 2 周后,损伤处有 CSPG 阳性细胞大量聚集和 ECM 的明显沉积,在损伤中心尤为明显。而姜黄素处理组 TGF- β_1 表达降低,CSPGs 的产生和胶质瘢痕形成受到明显抑制。此外,姜黄素抗胶质瘢痕的作用具有剂量依赖的特点。该研究将姜黄素处理组分为 30、100、300 mg/kg 三个低、中、高剂量组,结果显示高剂量姜黄素组与中、低剂量组比较,损伤组织中 GFAP 和 CSPGs 浓度更低,TGF- β_1 、TGF- β_2 表达抑制更加明显,大鼠后肢运动功能改善更为明显^[28]。综上所述,姜黄素可通过下调 TGF- β 的表达减少细胞外 CSPGs 的沉积,抑制胶质瘢痕的化学屏障作用,刺激轴突生长。

姜黄素对 TGF- β_1 的抑制作用显著,其具体作用机制复杂多样:(1)姜黄素能够有效抑制 SCI 后 AS 反应性增生、肥大,减少 RAS 形成以及 TGF- β 的产生和分泌;(2)姜黄素很有可能通过降低胞浆中 Smad2、Smad3、磷酸化的 Smad2 和细胞核中 R-Smad 的水平,上调 Smad7 的水平,甚至达到一定浓度后下调 T β R II 的表达等途径阻断 TGF- β_1 /Smad 信号通路而发挥作用;(3)姜黄素对 SCI 诱导产生的促炎细胞因子 TNF- α 具有较强的抑制作用,也可能经该途径下调 TGF- β_1 的基因表达而抑制胶质瘢痕

增生。

4 展望

SCI 后,TGF- β 信号通路的激活及其在胶质瘢痕形成中的重要作用已被大量研究证实:TGF- β 能够促进瘢痕增生,阻碍损伤后轴突的再生和脊髓功能恢复。姜黄素是一种具有抗纤维化的天然植物成分,能够阻断 TGF- β 信号通路以及减少 SCI 后胶质瘢痕形成。应用姜黄素抑制 SCI 后 TGF- β 信号通路的活化、减少胶质瘢痕形成对脊髓功能的恢复具有较大的潜在价值,给临床提供新的治疗思路。

参 考 文 献

- [1] Tsumuraya T, Ohtaki H, Song D, et al. Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC-AP)[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 35.
- [2] Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury[J]. Clin Epidemiol, 2014, 6: 309-331.
- [3] Hanada M, Tsutsumi K, Arima H, et al. Evaluation of the effect of tranilast on rats with spinal cord injury[J]. J Neurol Sci, 2014, 346(1-2): 209-215.
- [4] Saxena T, Loomis KH, Pai SB, et al. Nanocarrier-mediated inhibition of macrophage migration inhibitory factor attenuates secondary injury after spinal cord injury[J]. ACS Nano, 2015, 9(2): 1492-1505.
- [5] Imamura T, Oshima Y, Hikita A. Regulation of TGF- β family signaling by ubiquitination and deubiquitination[J]. J Biochem, 2013, 154(6): 481-489.
- [6] Kamato D, Burch ML, Piva TJ, et al. Transforming growth factor- β signaling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation[J]. Cell Signal, 2013, 25(10): 2017-2024.
- [7] Lynch J, Fay J, Meehan M, et al. MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF- β signaling pathway[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(5): 976-985.
- [8] Itoh S, Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway[J]. Growth Factors, 2011, 29(5): 163-173.
- [9] Fang J, Xu H, Yang C, et al. Molecular mechanism of activation of transforming growth factor Beta/Smads signaling pathway in its related gene-

- positive prostate cancers[J]. *J Pharm Sci Pharmacol*, 2014, 1(1): 82–85.
- [10] Yu Z, Yu P, Chen H, et al. Targeted inhibition of KCa3.1 attenuates TGF- β -induced reactive astrogliosis through the Smad2/3 signaling pathway[J]. *J Neurochem*, 2014, 130(1): 41–49.
- [11] Lagord C, Berry M, Logan A. Expression of TGF- β_2 but not TGF β_1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(1): 69–92.
- [12] Hsu JY, McKeon R, Goussev S, et al. Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(39): 9841–9850.
- [13] Buss A, Pech K, Kakulas BA, et al. TGF- β_1 and TGF- β_2 expression after traumatic human spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2008, 46(5): 364–371.
- [14] Xiyang YB, Lu BT, Ya-Zhao, et al. Expressional difference, distributions of TGF- β_1 in TGF- β_1 knock down transgenic mouse, and its possible roles in injured spinal cord[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2014, 239(3): 320–329.
- [15] Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, et al. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury[J]. *Science*, 2011, 331(6019): 928–931.
- [16] Jeong SR, Kwon MJ, Lee HG, et al. Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 312–322.
- [17] Joko M, Osuka K, Usuda N, et al. Different modifications of phosphorylated Smad3C and Smad3L through TGF- β after spinal cord injury in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 549: 168–172.
- [18] Jahan N, Hannila SS. Transforming growth factor β -induced expression of chondroitin sulfate proteoglycans is mediated through non-Smad signaling pathways[J]. *Exp Neurol*, 2015, 263: 372–384.
- [19] Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, et al. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar[J]. *Glia*, 2010, 58(14): 1748–1756.
- [20] Choi JK, Park SY, Kim KH, et al. GM-CSF reduces expression of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) core proteins in TGF- β -treated primary astrocytes[J]. *BMB Rep*, 2014, 47(12): 679–684.
- [21] Ruttala HB, Ko YT. Liposomal co-delivery of curcumin and albumin/paclitaxel nanoparticle for enhanced synergistic antitumor efficacy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 128: 419–426.
- [22] Zhu HT, Bian C, Yuan JC, et al. Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 59.
- [23] Ma J, Liu J, Yu H, et al. Curcumin promotes nerve regeneration and functional recovery in rat model of nerve crush injury[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 547: 26–31.
- [24] Yao QY, Xu BL, Wang JY, et al. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor- β_1 signaling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 156.
- [25] Hu Y, Liang H, Du Y, et al. Curcumin inhibits transforming growth factor- β activity via inhibition of Smad signaling in HK-2 cells[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 31(4): 332–341.
- [26] Sullivan DE, Ferris M, Nguyen H, et al. TNF- α induces TGF- β_1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 1866–1876.
- [27] Wang YF, Zu JN, Li J, et al. Curcumin promotes the spinal cord repair via inhibition of glial scar formation and inflammation[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 560: 51–56.
- [28] Yuan J, Zou M, Xiang X, et al. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar[J]. *J Surg Res*, 2015, 195(1): 235–245.

(收稿: 2016–11–20 在线: 2018–06–13)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶