

胸腺素 $\beta 4$ 对细胞迁移和转分化的影响及在眼科的研究进展

陈红芮, 曹 阳

作者单位: (430022) 中国湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科

作者简介: 陈红芮, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼、白内障。

通讯作者: 曹阳, 博士, 副主任医师, 研究方向: 青光眼、白内障。

ytsao@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2011-08-04 修回日期: 2011-10-27

Effect of thymosin beta4 on cell migration, transdifferentiation and research progress in ophthalmology

Hong-Rui Chen, Yang Cao

Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Yang Cao, Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. ytsao@public.wh.hb.cn

Received: 2011-08-04 Accepted: 2011-10-27

Abstract

• As a major G-actin-sequestering protein, thymosin beta4 (thymosin $\beta 4$, T $\beta 4$) is in almost mammalian cells. It has a number of physiologic functions, including the promotion of cell migration, stem cell differentiation, angiogenesis, inhibition of cell apoptosis and immune regulation, which plays an important role in the wound healing, tumor metastasis, inflammation control and so on. This review summarizes relative studies about T $\beta 4$, including its properties in cell migration, transdifferentiation and research progress in ophthalmology.

• KEYWORDS: thymosin beta4; cell migration; transdifferentiation; ophthalmological disease

Chen HR, Cao Y. Effect of thymosin beta4 on cell migration, transdifferentiation and research progress in ophthalmology. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2141-2143

摘要

胸腺素 $\beta 4$ (thymosin beta 4, T $\beta 4$) 作为一种主要的 G-肌动蛋白偶联蛋白存在于绝大多数哺乳动物细胞, 具有促进细胞迁移、干细胞分化、血管形成, 并抗细胞凋亡、调节免疫功能等多种生物学作用, 在创伤修复、肿瘤转移、控制炎症等过程中发挥重要作用。我们就 T $\beta 4$ 对细胞迁移和转分化的影响及其在眼科的研究进展进行综述。

关键词: 胸腺素 $\beta 4$; 细胞迁移; 转分化; 眼科疾病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 12. 026

陈红芮, 曹阳. 胸腺素 $\beta 4$ 对细胞迁移和转分化的影响及在眼科的研究进展. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2141-2143

0 引言

细胞迁移和转分化是众多生理病理过程中涉及到的细胞行为, 如创伤修复、肿瘤转移、纤维化疾病等。近年来胸腺素 $\beta 4$ (thymosin beta4, T $\beta 4$) 在创伤修复、肿瘤转移中的作用受到了广泛关注。结合目前眼科研究现状, 我们将就 T $\beta 4$ 对细胞迁移和转分化的影响及其在眼科的研究进展作一介绍。

1 胸腺素 $\beta 4$ 的一般生物学特性

T $\beta 4$ 最早由 Low 等^[1]从小牛胸腺中提取得到, 为 43 个氨基酸组成的小分子蛋白, 分子量为 4982Da, 等电点为 5. 1, N-端以 N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (ac-SDKP) 为代表结构。T $\beta 4$ 常以动态、无固定结构的构象存在于胞浆中, 可溶于 pH = 4. 5 ~ 7. 5, 温度 5 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C 范围的水溶液, 并不表现出成熟的二级结构。作为一种重要的 G-肌动蛋白偶联剂, T $\beta 4$ 以 1: 1 的方式与 G-肌动蛋白结合, 并通过 17LKKTET22 序列诱导其本身的折叠及 N 和 C 末端螺旋结构的形成^[2]。当前发现的 β 族胸腺素有 16 种之多, 其中人类细胞中发现有 T $\beta 4$, T $\beta 10$ 和 T $\beta 15$ 的表达。所有 β 族胸腺素中以 T $\beta 4$ 含量最多, 分布最广, 约占整个 β 族胸腺素的 70% ~ 80%, 广泛存在于除红细胞以外的真核细胞中, 且在血小板中高度表达^[3]。目前研究表明, T $\beta 4$ 具有多种生物学作用, 包括促进细胞迁移和干细胞分化及血管形成、抗细胞凋亡、调节免疫功能等, 参与促进创伤愈合、控制炎症反应以及肿瘤的发生与发展转移等多种病理生理过程^[4-8]。

2 胸腺素 $\beta 4$ 对细胞迁移的作用

细胞迁移行为在众多病理生理过程中起着重要作用, 包括肿瘤转移、溃疡愈合、组织修复等。T $\beta 4$ 作为肌动蛋白结合剂, 通过与肌动蛋白结合, 形成空间位阻的方式阻碍肌动蛋白单体以盐键聚集, 维持细胞内肌动蛋白聚合与解聚的动态平衡, 而这一平衡正是影响细胞迁移的关键^[9]。Ryu 等^[10]通过细胞划痕实验发现, 加用 T $\beta 4$ 处理的细胞移行明显增加, 而特异性 T $\beta 4$ siRNA 处理的细胞, 其移行明显减弱, 结果表明 T $\beta 4$ 具有增加细胞运动性的作用。

Philp 等^[11]建立动物皮肤创伤模型, 分组给予不同剂量 T $\beta 4$ 处理大鼠皮肤伤口。采用 RT-PCR, Western-blot 和酶谱法 3 种技术手段检测到 MMP-2 和 MMP-9 表达, 且表达量在 T $\beta 4$ 处理组明显高于对照组。随后, Philp 等将参与皮肤创伤修复过程中的主要细胞, 包括单核细胞、成纤维细胞、角质形成细胞和内皮细胞作为研究对象, 体外培养上述 4 种细胞, 给予不同剂量 T $\beta 4$ 处理, 检测基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达, 其结果表明: 与对照组相比, 4 种

细胞在接受不同浓度 T β 4 处理后均不同程度表达 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9, 且呈剂量依赖性表达增加。MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族中的明胶酶, 是该家族中分布最为广泛的两个亚型, 两者的作用底物包括 I, III, IV, V 型胶原以及明胶、纤维连接蛋白、弹力蛋白、蛋白聚糖等, 主要参与细胞外基质 (ECM) 溶解、基底膜降解, 在细胞移行中发挥重要作用^[12]。Cierniewski 等^[13]以结肠癌细胞作为实验对象, 发现 T β 4 一方面通过影响肿瘤细胞骨架增加细胞能动性, 另一方面通过激活 MMPs (MMP-2, MMP-9, MMP-7) 参与基底膜溶解, 介导肿瘤细胞转移。

此外, T β 4 可以通过上调层粘连蛋白-5 (LM-5) 基因的表达影响细胞移行。LM-5 存在于角膜、结膜、皮肤和其他组织的基底膜, 并可作为介导角质形成细胞黏附和迁移的配体之一, 在细胞迁移与黏附等病理生理学行为中有着重要作用。Sosne 等^[14]用 T β 4 作用于角膜上皮细胞, 采用基因表达分析发现 LM-5 γ 2 链和转化生长因子- β (TGF- β) 的表达较对照组明显增高, 并通过 RT-PCR 和蛋白质水平验证了这一结论。通过时间分析, T β 4 诱导 LM-5 表达升高出现在 2h, 峰值出现在 6h; 而 TGF- β 的同一作用出现在 4h, 并在 8h 达到峰值。采用抗体阻断 TGF- β 后, T β 4 作用组仍可表现出 LM-5 表达增高, 表明 T β 4 能促进上皮细胞移行, 但促进 LM-5 的表达途径可能不同于 TGF- β 。Li 等^[15]选取体质量 200 ~ 250g 的成年雄性大鼠, 分为对照组和实验组, 在其背部做 8mm 深皮肤伤口, 实验组再分为三个亚组, 给予不同剂量的 T β 4 处理 (2, 8, 16mg/50mL), 对照组以 PBS 处理, 于处理后 2, 4, 7d 通过免疫组织化学方法检测 LM-5 的变化。在处理 2d, 实验组仅表达极少量的 LM-5, 明显低于对照组, 但从第 4d 开始, 实验组 LM-5 表达显著增加, 并在第 7d 达到高峰。据此推测 T β 4 在创伤早期可抑制 LM-5 的表达, 晚期则上调其表达, 修复基底膜, 促进上皮细胞迁移, 加速伤口愈合。

3 胸腺素 β 4 对细胞转分化的作用

表皮细胞间充质样转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 即上皮细胞在一定条件下转分化为间充质细胞。这一动态过程最初被认为仅发生于胚胎发育的早期, 但目前的研究表明, 这一转分化过程还可发生于某些特殊的疾病或微环境中, 如肿瘤的发展与转移、纤维化疾病和慢性炎症^[16, 17]等。上皮细胞发生间充质样转化后, 即转化为肌成纤维细胞, 能表达后者特征表型标志 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), 并伴随波形蛋白 (vimentin)、腱糖蛋白 (tenascin)、胶原蛋白 I/III 等间质细胞标志物表达升高, 以及上皮钙粘蛋白 (E-cadherin) 和细胞角蛋白 (cytokeratin) 等上皮细胞标志物表达减少。

目前研究发现, 涉及 EMT 的信号通路较多, 其中包括: Wnt/ β -catenin, ECM/ILK 和 TGF- β /Smad 途径^[18]。在一定干预和刺激下, 这 3 通路可活化, 开始 EMT 过程。其中, 糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 是 Wnt/ β -catenin 通路关键的中间介质, 能使 β -连环蛋白 (β -catenin) 磷酸化并介导其降解, 从而抑制其在胞浆和细胞核中的蓄积, 抑制 EMT。同时, GSK-3 β 也是 ILK 和 AKt 的作用底物, 后两者磷酸化 GSK-3 β 并使其失活, 从而促进 EMT。

现有的研究表明, 结肠癌 SW480 细胞中过度表达 T β 4, 并伴有 E-cadherin 表达的减少和胞浆中 β -catenin 的蓄积, 这两者均是 EMT 的重要标志。Huang 等^[19]通过实验发现, E-cadherin 的下调归因于 ZEB1 介导的转录抑制,

而 β -catenin 的蓄积则是由于整合素 ILK 和/或其下游效应器 Akt 介导的 GSK-3 β 失活所致。同时, Huang 等还借助免疫组织化学分析, 揭示结肠癌患者 T β 4 的表达水平与 E-cadherin, β -catenin 之间高度相关性。由此得出结论, T β 4 可通过上调 ILK 及其信号转导通路介导肿瘤细胞的 EMT, 从而促进结肠癌的进展。

张璟等^[16]通过 RNA 干扰技术沉默 T β 4 在肾小管上皮细胞的表达发现, T β 4 表达被其特异性 siRNA 阻断后加入 TGF- β 1 处理细胞, 通过 RT-PCR 和 Western-blot 检测, α -SMA 表达减少和 E-cadherin 增加, 与对照组相比较均有统计学意义。结果表明, RNA 干扰 T β 4 表达对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞转分化有明确的抑制作用。

但是, 对于 T β 4 对细胞的转分化作用也存在相反的报道。Ehrlich 等^[20]在 SD 大鼠背部做皮肤切口, 并用 T β 4 处理, 免疫组织化学发现肌成纤维细胞的数量明显少于对照组, Western-blot 检测 α -SMA 表达也明显低于对照组。实验数据表明, T β 4 抑制了肌成纤维细胞的出现, 即可能抑制了 EMT 过程。

4 胸腺素 β 4 在眼科的研究进展

目前, T β 4 在眼科疾病中的研究进展主要集中于眼表疾病, 如角膜损伤、炎症, 以及增殖性糖尿病视网膜病变 (PDR) 等。Sosne 等^[6, 21]利用角膜环钻建立大鼠角膜损伤模型, 用 T β 4 处理损伤角膜, 以 PBS 作为对照组, 结果与对照组相比较, T β 4 处理组角膜再上皮化的速度明显加快, 损伤修复范围明显增加, 同时伴有 IL-1, IL-6 mRNA 转录上调。这一结果表明, T β 4 除能促进角膜上皮细胞移行外, 还可通过调控角膜损伤修复过程中炎症细胞因子的表达减轻炎症损伤, 促进角膜修复。在进一步的小鼠角膜碱烧伤模型中, Sosne 等观察到中性粒细胞趋化因子 MIP-2 和 IL-1 转录水平下调, 表明 T β 4 可减少炎症部位中性粒细胞浸润, 控制炎症反应, 同时促进角膜上皮细胞移行, 进而促进损伤修复, 恢复角膜透明性。此外, T β 4 还可通过抑制 caspase 介导的细胞凋亡途径, 抑制乙醇诱导的角膜上皮细胞凋亡, 并促进损伤的修复。

Wang 等^[22]以 PDR 患者作为实验组, 以非 PDR 患者作为对照组, 通过玻璃体切割术检测所有实验对象血浆和玻璃体中 T β 4 表达。结果显示, 血浆和玻璃体中均检测到 T β 4 表达, 且实验组表达量显著高于对照组, 同时伴有血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 等促血管纤维化因子表达升高。在糖尿病纤维血管膜中观察到了 T β 4 和 CD31 共表达, T β 4 和 VEGF mRNA 在纤维血管膜中的表达显著上调。在以 SD 大鼠糖尿病模型为对象的动物实验中, T β 4, VEGF 和神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) mRNA 表达水平与对照组相比较明显上调。由此得出结论: T β 4 在糖尿病视网膜新生血管增殖膜形成中起着重要作用。

5 结语

综合以上研究成果, 目前 T β 4 已被证明在促进创伤愈合、控制炎症反应、抗细胞凋亡以及细胞迁移和转分化等诸多生物学过程中发挥着重要作用, 且在角膜损伤修复中表现出了巨大的潜力, 但其相关机制仍需进一步的研究。眼科众多疾病发生、发展过程中涉及到了相关细胞的迁移、增殖和转分化, 如角膜损伤、后发性白内障、青光眼术后滤过道瘢痕化、增殖性玻璃体视网膜病变等。T β 4 作为一种广泛存在的 G-肌动蛋白偶联蛋白是否参与了这些过程, T β 4 可否作为众多眼科疾病治疗的靶点之一, 这些

问题仍需要大量的基础实验研究加以论证。因此,通过研究 T β 4 对细胞迁移、转分化的影响,可为干预多种眼科疾病的发生、发展探索一条新的途径。

参考文献

- 1 Low TL, Hu SK, Goldstein AL. Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(2):1162-1166
- 2 Crockford D, Turjman N, Allan C, et al. Thymosin beta4: structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1194:179-189
- 3 Huff T, Muller CS, Otto AM, et al. beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(3):205-220
- 4 Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1112:171-188
- 5 Qiu P, Wheeler MK, Qiu Y, et al. Thymosin beta4 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation, IL-8 expression, and the sensitizing effects by its partners PINCH-1 and ILK. *FASEB J* 2011;25(6):1815-1826
- 6 Sosne G, Szliter EA, Barrett R, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation *in vivo* following alkali injury. *Exp Eye Res* 2002;74(2):293-299
- 7 翟晓梅, 聂兴举, 秦泽莲, 等. 胸腺素 β 4 基因片断 mRNA 在人瘢痕及皮肤组织中的表达定位. *中国微创外科杂志* 2007;7(12):1217-1220
- 8 Sosne G, Siddiqi A, Kurpakus-Wheater M. Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(4):1095-1100
- 9 Hannappel E. beta-Thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1112:21-37
- 10 Ryu YK, Im YS, Moon EY. Cooperation of actin-sequestering protein, thymosin beta-4 and hypoxia inducible factor-1alpha in tumor cell migration. *Oncol Rep* 2010;24(5):1389-1394
- 11 Philip D, Scheremeta B, Sibliss K, et al. Thymosin beta4 promotes matrix metalloproteinase expression during wound repair. *J Cell Physiol* 2006;208(1):195-200
- 12 Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing-coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(5):373-398
- 13 Cierniewski CS, Papiewska-Pajak I, Malinowski M, et al. Thymosin beta4 regulates migration of colon cancer cells by a pathway involving interaction with Ku80. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1194:60-71
- 14 Sosne G, Xu L, Prach L, et al. Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. *Exp Cell Res* 2004;293(1):175-183
- 15 Li Y, Wang G, Yu H, et al. Expression of laminin 5 in rat skin wounds regulated by recombinant thymosin beta4. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2008;22(11):1306-1310
- 16 张璟, 卓文磊, 王彦, 等. RNA 干扰阻滞胸腺素 β 4 表达对 TGF- β 1 诱导人肾小管上皮-肌成纤维细胞转分化的抑制作用. *解放军医学杂志* 2008;33(9):1092-1095
- 17 Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39(3):305-318
- 18 Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 2009;40(10):1365-1376
- 19 Huang HC, Hu CH, Tang MC, et al. Thymosin beta4 triggers an epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma by upregulating integrin-linked kinase. *Oncogene* 2007;26(19):2781-2790
- 20 Ehrlich HP, Hazard SR. Thymosin beta4 enhances repair by organizing connective tissue and preventing the appearance of myofibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1194:118-124
- 21 Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo*. *Exp Eye Res* 2001;72(5):605-608
- 22 Wang JY, Lu Q, Tao Y, et al. Intraocular expression of thymosin beta4 in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2011;89(5):396-403