·文献综述·

BMP4 对眼部细胞调控作用的研究进展

梁家铭[1,2],汪 倩[1],刘晓贺[2],王淑荣[1],张 妍[1]

基金项目:吉林大学白求恩支持计划(No.470110000520);吉林大学优秀青年教师培养计划(No.419080500586)
作者单位:[1](130041)中国吉林省长春市,吉林大学第二医院激光近视矫治中心;[2](130000)中国吉林省长春市,吉林大学临床医学院
作者简介:梁家铭,男,本科,研究方向:眼部新生血管。
通讯作者:张妍,博士,副主任医师,研究方向:角膜新生血管.zhangy66@jlu.edu.cn
收稿日期:2017-02-25 修回日期:2017-04-07

Research progress on the regulation of BMP4 on ocular cells

Jia-Ming Liang[1,2], Qian Wang[1], Xiao-He Liu[2], Shu-Rong Wang[1], Yan Zhang[1]

Foundation items: Bethune Project of Jilin University (No. 470110000520); Training Plan for Outstanding Young Teachers of Jilin University (No.419080500586)
[1]Laser Myopia Correcting Center, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China; [2]Clinical Medical College of Jilin University, Changchun 130000, Jilin Province, China
Correspondence to: Yan Zhang. Laser Myopia Correcting Center, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. zhangy66@jlu.edu.cn
Received: 2017-02-25 Accepted: 2017-04-07

Abstract

• Bone morphogenetic proteins (BMPs) belongs to the transforming growth factor beta (TGF-β) superfamily, which was isolated from the decalcified bone matrix by Urist in 1965. As one of the members of BMPs family, BMP4 not only promotes the differentiation and development of chondrocytes, but also plays an important role in the regulation of eye cells. BMP4 can mediate apoptosis of retinal vascular endothelial cells and inhibit angiogenesis, and is expressed in adult corneal epithelium, corneal cells and corneal endothelial cells. Also, participated in the layered corneal epithelium cells proliferation. In this paper, the recent advances in the study of BMP4 in ocular tissues are summarized, and the function of BMP4 in different developmental stages of eye is briefly reviewed.
• KEYWORDS: bone morphogenetic protein 4; regulation; cell

Citation: Liang JM, Wang Q, Liu XH, *et al*. Research progress on the regulation of BMP4 on ocular cells. *Guoji Yanke Zazhi* (*Int Eye Sci*) 2017;17(5):901-903

摘要

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)属转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员,是1965年由Urist等首先从脱钙骨基质提取物中分离得到的一种具有独特异位骨和软骨诱导活性的酸性蛋白质。BMP4作为BMPs家族成员之一,不仅促进软骨细胞的分化和发育,还对眼部细胞起着重要的调控作用,其在角膜上皮细胞、角膜细胞和角膜内皮细胞中表达,可以介导视网膜血管内皮细胞的凋亡并抑制血管的生成,且对角膜上皮细胞的发育起着重要作用等。本文总结近年来BMP4在眼部组织的研究进展,对BMP4在眼不同发育阶段的功能情况做一简要综述。
关键词:骨形态发生蛋白4;调控;细胞
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.5.25

引用:梁家铭,汪倩,刘晓贺,等.BMP4对眼部细胞调控作用的研究进展.国际眼科杂志2017;17(5):901-903

0 引言

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是细胞外蛋白,通过结合细胞表面的蛋白受体发挥作用。BMP4可以抑制肿瘤细胞生长[1],在肺干细胞分化中起重要作用[2],也可以介导视网膜新生血管内皮细胞凋亡,抑制血管新生[3]。研究发现BMP4在眼发育阶段如晶状体、视网膜以及眼睑发育中发挥重要作用[4-6]。BMP4及其受体在成人角膜上皮细胞、角膜细胞和角膜内皮细胞上表达,并调节细胞的增殖和凋亡,也参与角膜上皮的细胞分层、角膜细胞创伤后的趋化和增殖[7-9]。本文总结BMP4在眼部不同组织中调控作用的研究进展,并对BMP4在眼不同发育阶段的作用情况做一简要综述。

1 BMP4在眼前节结构角膜、虹膜和睫状体中的作用

Ueno等[10]检测人角膜中主要细胞类型里的转化生长因子家族成员BMP2、BMP4及其受体mRNA的表达,还检测了BMP2和BMP4对角膜成纤维细胞增殖和凋亡的影响,发现BMP2和BMP4刺激核因子κB(NF-κB)活化,当κB(NF-κB)活化被非选择性抑制剂放线菌素D或选择性抑制剂SN50抑制时,BMP2和BMP4刺激角膜成纤维细胞的凋亡。BMP2和BMP4都在不存在NF-κB激活抑制剂的情况下刺激角膜成纤维细胞的增殖,从而表明BMP2和BMP4可以调节角膜成纤维细胞的增殖和凋亡。Lee等通过鉴定圆锥角膜与正常人角膜细胞差异表达的基因发现,BMP4在圆锥角膜中比在正常角膜中表达更高[11]。已知BMP4在发育过程中介导神经嵴和其他类型细胞的凋亡。因为角膜细胞来源于神经嵴,所以BMP4刺激角膜成纤维细胞的凋亡,并且介导角膜细胞增殖和凋亡。圆锥角膜中BMP4的高表达提示,BMP4可能在圆锥角膜中角膜细胞的凋亡过程中起重要作用。

虹膜平滑肌发育的初始阶段,BMP4和BMP7在适当

的时间和部位表达来调节虹膜平滑肌发育,两个基因由在视杯神经上皮的边缘最尖端处细胞完成高度表达。BMP2 与 BMP4 密切相关[12],因此,也许 BMP4 也可以促进虹膜平滑肌的发育。除了它们在虹膜平滑肌发育中的特定作用之外,BMP4 和 BMP7 也调节晶状体和睫状上皮发育。因此推测一些由 BMP4 和 BMP7 突变引起的眼睛缺陷可能是由于虹膜平滑肌发育异常,这为治疗一些眼部疾病提供了新的方向。

睫状体形态发育是一个复杂的多步骤过程,Napier 等在小鼠胚胎晚期和出生后早期发育过程中发现 BMP4 在发育中的虹膜、睫状体和视网膜色素上皮内表达,并发现 BMP4 杂合子可致眼前段表现异常,显著的特征包括眼内压升高,小梁网和 Schlemm 管的阻塞或缺失,甚至在一些情况下不形成睫状体[13]。Zhao 等经随后的研究证明,在睫状体中 BMP4 的表达对于睫状体的正常发育是必需的,在 αA 晶状体蛋白启动子的控制下的 BMP 抑制剂 Noggin 的外源性表达导致小鼠睫状体缺失[14]。虽然睫状上皮在这些转基因小鼠出生后第 1d(P1)发育缺失,但是相邻的视网膜和虹膜似乎正常发育。Balenci 等发现,在成年小鼠和人眼视网膜边缘的睫状上皮内罕见的视网膜干细胞(retinal stem cells,RSCs)可以在不存在生长因子的情况下在体外分裂产生所有视网膜细胞类型[15]。BMP2、BMP4 和分泌的卷曲相关蛋白 2 是对 RSCs 的抗增殖作用的主要效应物。由于在体外观察到对小鼠和人类 RSCs 产生了类似诱导静止的现象,因此在体内靶向这些分子可以直接在盲人的眼睛中重新激活 RSCs。

2 BMP4 在晶状体、玻璃体和视网膜结构中的作用

脊椎动物晶状体发育是研究胚胎组织相互作用的经典系统,Furuta 等发现 $BMP4^{tm1}$ 无效突变的纯合子小鼠的晶状体缺失[16]。体外培养时,可经外源性加入 BMP4 到视泡中来挽救缺失的晶状体。由此可见 BMP4 对于晶状体的发育起着重要的作用,但还需通过调节下游基因,作为多重感应信号的一部分来实现。

通过对单倍体 BMP4 缺乏($BMP4^{+/-}$)的小鼠眼分析显示在所检查的大多数眼睛中存在玻璃体和晶状体混浊,视网膜血管系统在 $BMP4^{+/-}$ 眼中也是异常的。荧光血管造影显示在小血管中存在荧光素渗漏,异常的玻璃体血管导致晶状体和视网膜粘连加重,最终形成视网膜脱离,从而得出 BMP4 对晶状体玻璃体的正常发育起着重要的作用[17]。

Maruyama 等研究了 BMP4 在大鼠视网膜发育过程中的表达情况[18]。胚胎期第 19d 在神经纤维层即发现了非常强烈的 BMP4 免疫反应(IR)。在出生后第 1d,内丛状层表现出非常强的 BMP4-IR。此后,在成年期大量 BMP4 持续表达。这些结果表明 BMP4 在视网膜中不仅在早期胚胎期、晚期胚胎和出生后期,甚至在成人中起关键作用。Pei 等还通过小鼠全胚胎培养系统中的异位 BMP4 表达来评价 BMP4 信号在神经视网膜和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)发育中的作用[19]。在神经视网膜显示特定标记,如 Vsx2(Chx10)和 Pax6 的显著下调。而在 RPE 中,色素沉着在不同阶段均受到影响。当眼组织在可见色素沉着阶段[30~32 体节期(ss)]之前暴露于 BMP4 时,色素沉着的发展被抑制,并且当在色素沉着开始后(34~35ss)暴露时,RPE 显示色素沉着减少。眼组织的进一步研究揭示了早期基因(例如视网膜中的 Rx,Six3)和 BMP4 处理的眼中的 RPE 中的 Wnt13、Otx2、Mitf 和其它下游色素沉着基因的表达显著变化,可以得出 BMP4 改变早期基因的表达,并在 RPE 和视网膜发育中的潜在作用。

3 BMP4 与早期胚眼发育

BMPs 在脊椎动物中的表达,表明这些分子在眼睛发育期间的重要功能,其中 BMP4 起着重要的作用,Trousse 等使用鸡胚作为模型系统,通过视神经囊泡培养以及在 BMP4 和其拮抗剂 Noggin 的局部反应结果证明了 BMP4 的局部活性以及可调节背部视杯细胞的程序性死亡[20]。此外,头蛋白能够减少视杯背侧部分的细胞增殖率,而 BMP4 增加视网膜培养中 BrdU 阳性细胞的数量。这些结果表明 BMP4 通过促进细胞增殖和程序性细胞死亡促进眼睛发育。Takuma 等在研究中清楚地表明 BMP4 和 Shh 构成背侧腹侧信号系统以及成纤维细胞生长因子 8,并得出 BMP4 信号控制整个眼发育[21]。

4 BMP4 与眼部疾病

4.1 BMP4 与增殖性玻璃体视网膜病变　增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)是视网膜脱离的严重视觉并发症,其特征在于形成收缩性纤维化膜,RPE 的上皮-间质转变(EMT)。Yao 等研究表明了 BMP4 在纤维化中的重要抑制作用,发现 BMP4 及其受体与 PVR 膜内的细胞角蛋白和 α-SMA 阳性细胞共标记[22]。此外,BMP4 的 mRNA 和蛋白表达水平降低,而 BMP4 受体 ALK2、ALK3 和 ALK6 在原发性 RPE 细胞中 TGF-β 诱导的 EMT 期间增加。外源 BMP4 抑制 TGF-β 诱导的上皮标志物下调,以及 RPE 细胞中 mRNA 和蛋白质水平的间充质标志物上调。此外,BMP4 减弱 TGF-β 诱导的凝胶收缩、细胞迁移和 Smad2/3 磷酸化,证实了 BMP4 在 RPE 细胞中通过 Smad2/3 通路抑制 TGF-β 介导的 EMT,这可能表明 PVR 的潜在治疗方向。

4.2 BMP4 与青光眼　青光眼是失明的主要原因,而其通常与高眼内压(IOP)相关,这是由眼内液引流阻力增加引起的。在一些家族中,眼前段的异常发育可导致青光眼,在大多数这样的家族中导致前段发育不全和青光眼的基因没有被鉴定。Chang 等测试了 BMP4 基因剂量对眼发育和发育性青光眼的重要性,结果发现 $BMP4^{+/-}$ 的小鼠眼前段发育异常,包括畸形,不存在或产生阻塞的小梁网和 Schlemm 管的引流结构[23]。具有严重引流结构异常的小鼠超过 80% 以上具有升高的 IOP,从而证明了 BMP4 的杂合缺陷导致眼前段发育不良和升高的 IOP。这些异常与发展性青光眼的人类患者中的异常相似,因此,BMP4 是与人类青光眼相关异常发育状况的强有力的候选基因。

原发性开角型青光眼(POAG)是人群中最常见的青光眼类型。作为 POAG 的易感因子测试的一组明显的基因是发育基因 forkhead box C1(FOXC1)、转化生长因子-β2(TGF-β2)和 BMP4。已知这些基因在眼前段的正常发育中起重要作用和/或涉及眼内压(IOP)调节和小梁网功能。这项研究调查 FOXC1、TGF-β2 和 BMP4 在 POAG 中的作用。虽然结果表明这些基因的共同变异在英国白种人中的 POAG 发病机制中没有显著的作用[24],但对疾病的治疗也指出新的方向。

4.3 BMP4 与年龄相关性黄斑变性　年龄相关性黄斑变性(AMD)是老年人失明的主要原因,其主要病理改变是多种原因导致 RPE 细胞凋亡。随着 AMD 进展,它可以发展成两种不同形式的晚期 AMD:(1)“干性”萎缩性 AMD,其特征在于 RPE 衰老和 RPE 损失;(2)“湿性”新生血管 AMD,其特征在于脉络膜血管异常生长的 RPE 激

活。DanHong 等发现 BMP4 在萎缩性和新生血管性 AMD 中差异表达[25]。在萎缩性 AMD 中,BMP4 在 RPE 中高度表达,并且通过 Smad 和 p38 途径介导氧化应激诱导的 RPE 衰老。相比之下,在新生血管性 AMD 损伤中,RPE 中的 BMP4 表达低。Zhu 等[26]在体外研究发现更多详细的机制参与 BMP4 介导的 RPE 细胞衰老氧化应激。在氧化应激下,RPE 细胞增加 BMP4 的表达,进一步激活其下游信号通路诱导 p53 和 $p21^{Cip1/WAF1}$,但通过 Smad 和 p38 MAPK 途径抑制磷酸化 Rb。p53 表达的上调和磷酸化 Rb 表达的下调触发 PRE 细胞衰老,这种 BMP4 介导的 RPE 细胞衰老可以被 BMP4 拮抗剂或 p38 抑制剂部分阻断,可能作为一个新的治疗目标抑制氧化应激和衰老,从而进行性影响干性 AMD。已知 BMP4 参与决定个体 AMD 晚期形式的分子开关,Xu 等在研究小鼠新生血管中 BMP4 下调的机制时,发现 TNF 这种重要的血管生成刺激因子,在培养的人类胎儿 RPE 细胞、ARPE-19 细胞和鼠眼后杯外植体中的 RPE 细胞中显著下调 BMP4 的表达[27]。当 TNF 表达增高时,小鼠 CNV 损伤中 BMP4 表达下降,而当 TNF 水平降低时,BMP4 表达又开始增高。通过研究发现 BMP4 启动子中两个特异性蛋白 1(Sp1)结合位点是 BMP4 表达的必需条件,而 TNF 通过调节 Sp1 磷酸化,降低 Sp1 对 BMP4 启动子的亲和力从而降低 BMP4 的表达。TNF 对 BMP4 表达下调机制的建立有助于确定 AMD 治疗的新靶点。

5 小结

最新研究表明 BMP4 还与多种眼部疾病有关,如:BMP4 的单倍体不足可能是 Frias 综合征的临床表现的原因[28];BMP4 是视网膜营养不良和大脑异常的主要基因[29];BMP4 可能通过刺激 VEGF 从 RPE 细胞释放在调节与糖尿病性视网膜病变(DR)相关的眼血管生成中发挥作用等[30]。BMP4 的生物学功能[31]还在人类先天性腭裂、骨折、骨质疏松、骨缺损、牙科疾病、先天性心脏病以及幽门狭窄等疾病的治疗方面将具有较大的应用前景。总之,随着研究手段的逐步成熟与增多,BMP4 对眼部组织的作用逐渐明了,随之,许多眼病的发生机制也将被阐明。

参考文献

1 Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet* 2012;205(6):267-277
2 Lee JH, Bhang DH, Beede A, *et al*. Lung stemc ell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4 - NFATc1 - Thrombospondin-1 axis. *Cell* 2014;156(3):440-455
3 Lynch AM, Wagner BD, Mandava N, *et al*. The relationship of novel plasma proteins in the early neonatal period with retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(11):5076-5082
4 Boswell BA, Musil LS. Synergistic interaction between the fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein signaling pathways in lens cells. *Mol Biol Cell* 2015;26(13):2561-2572
5 Rubinstein TJ, Weber AC, Traboulsi EI. Molecular biology and genetics of embryonic eyelid development. *Ophthalmic Genet* 2016;37(3):252-259
6 Huang J, Liu Y, Oltean A, *et al*. Bmp4 from the optic vesicle specifies murine retina formation. *Dev Biol* 2015;402(1):119-126
7 Zhang Y, Yeh LK, Zhang S, *et al*. Wnt/β-catenin signaling modulates corneal epithelium stratification via inhibition of Bmp4 during mouse development. *Development* 2015;142(19):3383-3393
8 Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, *et al*. Platelet lysate and chondroitin sulfate loaded contact lenses to heal corneal lesions. *Int J Pharm* 2016;509(1-2):188-196
9 Pereira da Silva L, Miguel Neves B, Moura L, *et al*. Neurotensin decreases the proinflammatory status of human skin fibroblasts and increases epidermal growth factor expression. *Int J Inflam* 2014;2014:248240
10 Ueno M, Asada K, Toda M, *et al*. Gene signature-based development of ELISA assays for reproducible qualification of cultured human corneal endothelial rells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(10):4295-4305
11 Allison P, Espiritu D, Camenisch TD. BMP2 rescues deficient cell migration in Tgfbr3(-/-) epicardial cells and requires Src kinase. *Cell AdhMigr* 2016;10(3):259-268
12 Macé M, Galiacy SD, Erraud A, *et al*. Comparative transcriptome and network biology analyses demonstrate antiproliferative and hyperapoptotic phenotypes in human keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6181-6191
13 Jensen AM. Potential roles for BMP and Pax genes in the development of iris smooth muscle. *Dev Dyn* 2005;232(2):385-392
14 Napier HR, Kidson SH. Molecular events in early development of the ciliary body: a question of folding. *Exp Eye Res* 2007;84(4):615-625
15 Zhang R, Huang H, Cao P, *et al*. Sma-and Mad-related protein 7 (Smad7) is required for embryonic eye development in the mouse. *J Biol Chem* 2013;288(15):10275-10285
16 Balenci L, Wonders C, Coles BL, *et al*. Bone morphogenetic proteins and secreted frizzled related protein 2 maintain the quiescence of adult mammalian retinal stem cells. *Stem Cells* 2013;31(10):2218-2230
17 Huang J, Liu Y, Oltean A, *et al*. Bmp4 from the optic vesicle specifies murine retina formation. *Dev Biol* 2015;402(1):119-126
18 Mao M, Smith RS, Alavi MV, *et al*. Strain-dependent anterior segment dysgenesis and progression to glaucoma in Col4a1 mutant mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(11):6823-6831
19 Maruyama Y, Mikawa S, Hotta Y, *et al*. BMP4 expression in the developing rat retina. *Brain Res* 2006;1122(1):116-121
20 Huang J, Liu Y, Oltean A, *et al*. Bmp4 from the optic vesicle specifies murine retina formation. *Dev Biol* 2015;402(1):119-126
21 Müller F, Rohrer H, Vogel-Höpker A. Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* 2007;134(19):3483-3493
22 Kobayashi T, Yasuda K, Araki M. Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation. *Dev Growth Differ* 2010;52(4):351-363
23 Yao H, Li H, Yang S, *et al*. Inhibitory effect of bone morphogenetic protein 4 in retinal pigment epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep* 2016;6:32182
24 Ito YA, Walter MA. Genomics and anterior segment dysgenesis: a review. *Clin Exp Ophthalmol* 2014;42(1):13-24
25 Mookherjee S, Banerjee D, Chakraborty S, *et al*. Association of IL1A and IL1B loci with primary open angle glaucoma. *BMC Med Genet* 2010;11:99
26 Zhu D, Deng X, Xu J, *et al*. What determines the switch between atrophic and neovascular forms of age related macular degeneration? - the role of BMP4 induced senescence. *Aging (Albany NY)* 2009;1(8):740-745
27 Zhu D, Wu J, Spee C, *et al*. BMP4 mediates oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell senescence and is overexpressed in age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2009;284(14):9529-9539
28 Xu J, Zhu D, He S, *et al*. Transcriptional regulation of bone morphogenetic protein 4 by tumor necrosis factor and its relationship with age-related macular degeneration. *FASEB J* 2011;25(7):2221-2233
29 Martínez-Fernández ML, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, *et al*. Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet A* 2014;164A(2):338-345
30 Bakrania P, Efthymiou M, Klein JC, *et al*. Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am J Hum Genet* 2008;82(2):304-319
31 Khan MP, Khan K, Yadav PS, *et al*. BMP signaling is required for adult skeletal homeostasis and mediates bone anabolic action of parathyroid hormone. *Bone* 2016;92:132-144