

心肌素在平滑肌细胞分化及表型调节中的作用

余俊, 阮秋蓉

(华中科技大学同济医学院基础医学院病理学教研室, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌素; 血浆反应因子; 心肌素相关转录因子; 平滑肌祖细胞

[摘要] 平滑肌细胞在动脉粥样硬化的发生和进展过程中起了重要作用。粥样斑块中的平滑肌细胞不仅来源于中膜平滑肌, 还可以从骨髓干细胞分化而来。平滑肌细胞的分化是高度可逆的, 并在多种局部环境因素的参与作用下发育。平滑肌细胞表达多种标志表明它们在分化成熟中的相对状态。但是没有单个细胞分化特异性标志能将平滑肌细胞与其它完全区别开。心肌素及与其相关的血浆反应因子共刺激因子、ETS 家族三元复合物(EIK-1)和心肌素相关转录因子对平滑肌细胞分化起到一定作用。因此平滑肌祖细胞概念的提出, 为动脉粥样硬化防治提供了一种新的治疗策略。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

1 心肌素的结构特征和平滑肌选择性标志基因表达的分子机制

心肌素是由 807 个氨基酸残基组成, 因最初发现其在成年心肌特异性表达及为心肌基因表达所必需而被命名为心肌素。心肌素含有 SAP 结构域、碱性域, 类似亮氨酸拉链的两亲性 ALPH 和伸展的谷氨酰胺残基。心肌素分子中保守的 N 端结构域(NTD)对转录激活及其与血浆反应因子(serum response factor, SRF)相互作用是非必须的; 心肌素 C 端的转录激活结构域(TAD)对平滑肌和心肌基因表达至关重要, 缺少这一结构域可使其失去活性, 但心肌素的 TAD 域发挥转录激活作用则与靶基因的特异性无关。碱性域是心肌素与 SRF 相互作用所必需的, 该区域缺失会使心肌素的成肌活性丧失, 心肌素的 SAP 域的突变同样降低其成肌活性^[1]。

平滑肌特异性/选择基因的表达依赖多种顺式作用元件和反式作用因子复杂的联合作用。其中顺式作用元件中 CarG 盒十分重要, 其特异性的序列为[CC(A/T)6GG]。反式作用因子有 SRF、心肌素相关转录因子(myocardin-related transcription factors, MRTF)和心肌素。CarG 盒、SRF 及心肌素三者之间存在密切相关的相互作用^[2]。

2 动脉粥样硬化中平滑肌细胞的变化

2.1 平滑肌细胞的来源

在血管损伤修复过程中, 来源于中膜平滑肌细胞经过短暂的可逆细胞表型转化参与动脉粥样硬化的病损过程。Simper 等^[3]研究发现也可能有外周血或骨髓干细胞的参与动脉粥样硬化的病损过程。Han 等^[4]在动物模型中发现来源于骨髓或外周血的单个核细胞, 能够参与新血管的形成和

修复血管损伤。但绝大部分的动物模型在造模过程中都对中膜平滑肌造成过度损伤, 这样使外周血和骨髓来源的单个核细胞能够高频插入内膜下。并且骨髓干细胞来源的平滑肌细胞并未表达 SM-MHC 和 smoothelin, 也就是说这种细胞与成熟平滑肌细胞在表型上还是有一定的区别。因此与其说这种细胞是一种骨髓源性的平滑肌细胞, 倒不如将此看作是一种与胚胎期未成熟的平滑肌细胞或成纤维母细胞极其类似的平滑肌样细胞^[5]。此外, 也不能完全排除血液前体细胞与血管壁残留的平滑肌融合而表现为平滑肌样细胞的可能性。有人认为, 在病损中出现的平滑肌样细胞增殖并非来自于外周血或骨髓中的多潜能干细胞, 而是来源于血管壁中原本就存在平滑肌细胞亚群^[6]。这些所谓的平滑肌细胞亚群, 具有不同细胞形态和功能, 每一个亚群都是分化完全并相对稳定。这些细胞在受到损伤刺激等特定条件下能再进入细胞循环而发生表型调节和转化而形成平滑肌样细胞。但这一理论目前尚缺乏有力的实验依据, 且目前在体内尚未发现可将这些终末分化的平滑肌细胞亚群区分开来的特异性细胞表面标志物。

2.2 平滑肌的表达分化

在探究平滑肌细胞表型转化在血管疾病中所起的作用研究中, 遇到最大的困难是不能充分将标志平滑肌细胞分化相对时期的分化标志与其它类型细胞系表面特异标志区分开来。因为所有的平滑肌细胞标志物除了 SM-MHC 以外, 其它都可以至少是暂时的在发育或病理刺激下, 表达于其它类型细胞^[7]。

以往的研究进展过分集中于对分化的收缩型平滑肌细胞标志物的确认。然而平滑肌细胞在不同的病理生理条件刺激下会表现出许多不同的功能。并且这些功能在不同的血管类型的发育/成熟和对血管损伤做出反应时会发生改变和转化。因此只从平滑肌的收缩功能的表面标志物这一点去认识平滑肌的表型转化和去分化, 势必会缺少说服力。现在有研究认为在确认平滑肌收缩性细胞的分化标志的同时, 还可以同时关注对平滑肌细胞的表型调节具有意义的阳

[收稿日期] 2006-10-13 [修回日期] 2007-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30570725)

[作者简介] 余俊, 硕士研究生, 研究方向为平滑肌与动脉粥样硬化的关系, E-mail 为 yujunyulei@yahoo.com.cn。通讯作者阮秋蓉, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

性标志物的表达。平滑肌细胞表型调节最具有意义的阳性标志物是非肌性 MHC 异型, 命名为 NM-B MHC 或 Smemb。Smemb 的表达与动脉损伤或动脉粥样硬化中内膜下出现的平滑肌有关联。当代表平滑肌细胞收缩状态的基因由于受到外界刺激表达受到抑制时, 上述因素则会积极的调节 Smemb 的表达上调。Smemb 这种标志物对平滑肌细胞表型调节或胚胎平滑肌细胞具有相对特异性。

3 心肌素及其相关因子对平滑肌细胞分化的调节机制

3.1 心肌素和三元复合因子竞争结合血浆反应因子来调控平滑肌基因的表达

平滑肌细胞可在分化型细胞和增殖型细胞间相互转化, 这通常是由细胞所处的微环境发生改变所引起的。SRF 可募集肌限制性因子如转录共刺激因子心肌素、ETS 域家族三元复合物, 从而分别激活平滑肌细胞的分化基因和增殖基因^[8]。心肌素可以促进平滑肌细胞的分化。EIK-1 是三元复合因子之一, 是一种成肌抑制因子, 与心肌素的作用正好相反, 对平滑肌分化基因的表达具有抑制作用。EIK-1 通过 B 盒与 SRF 结合, 从而将心肌素从 SRF 上置换出来。EIK-1 与 SRF 的复合物再结合到启动子的 CarG 盒上, 从而抑制平滑肌的表达。由此推论, 生长和分化信号通过调节 SRF 对抗性共因子的结合来调节平滑肌基因的表达^[9]。

3.2 心肌素相关转录因子的作用机制

MRTF-A 的转录定位于细胞核, 对 Rho 信号起反应, 也可以使 actin 多聚化。肌特异性 actin 结合蛋白(STARS) 能通过 Rho 途径激活 SRF。STARS 激活 MRF 的核转位从而激活 SRF, 而 Rho 和 actin 多聚化可介导 STARS 依赖性的 MRF 的核转位^[10]。MRTF 的 N 末端含有一段被称为 RPEL 域的保守氨基酸序列。这段氨基酸序列通过与 actin 相连将 MRF 固定在胞质中。而 STARS 能够使 actin 多聚化, 将单体 G-actin 从 MRF 的连接中置换出来。从而使 MRF 进入核内。RPEL 域是 STARS 对 MRF 起作用所必须的。心肌素的 RPEL 域与 MTRF-A 和 MTRF-B 的 RPEL 域不同, 心肌素的 RPEL 域不能将其定位于胞质中, 所以心肌素总是定位于细胞核内, 并且心肌素的转录活性也不会被 STARS 增强^[11, 12]。

3.3 心肌素与组蛋白乙酰化转移酶和组蛋白去乙酰化转移酶相互作用调节平滑肌基因的表达

组蛋白乙酰化转移酶(P300)可诱导平滑肌组蛋白乙酰化。P300 的活化作用是通过心肌素而不是通过 SRF 起作用的。P300 通过与心肌素的 TAD 结合, 使组蛋白发生酰化从而激活 CarG 盒依赖的心肌和平滑肌基因的转录。

心肌素与 P300 之间存在蛋白与蛋白的直接作用即心肌素的 C 末端的 TAD 与 P300 的 CREB 结构域相互作用。而 HDAC 则作用于心肌素的 N 末端。组蛋白去乙酰化转移酶(HDAC5)可能通过将心肌素从 SRF 上解离下来抑制心肌素活性。P300 与 HDAC5 和心肌素不同的结构域反应表明它们可能同时与心肌素起作用。当 SRF 结合到 CarG 盒时, 心肌素结合到 SRF 上, 同时心肌素将 HDAC5 和 P300 募集到含有

CarG 盒的启动子附近。当目标基因需要被激活时, P300 介导的激活作用发挥作用。而在没有激活信号时, HDAC 是不发挥作用的^[13, 14]。

3.4 在多潜能的胚胎细胞中心肌素的人工强制表达并不足以介导平滑肌细胞的分化

心肌素作为 SRF 的共刺激因子, 是平滑肌细胞中多种 CarG 依赖性表达基因表达所必须的^[15]。仅心肌素却不足以介导平滑肌细胞系的多潜能干细胞中所有平滑肌细胞分化标志的表达。心肌素在平滑肌前体细胞 A404 中的人工表达可以促进 SM α actin、SM-MHC、SM22 α 、Caponin、Desmin 的表达。但是如果平滑肌祖细胞中某一个分化标志(如 smoothelin B)基因上游的启动子中只有一个 CarG 盒, 心肌素则不会介导该分化标志的表达^[16, 17]。心肌素显性失活的变异体能使 SM22 α 、SM-MHC 的表达受损, 但对于 smoothelin B 的表达却没有影响。

4 平滑肌细胞与动脉粥样硬化治疗的新策略

大量的研究表明, 平滑肌细胞的聚集在动脉粥样硬化、血管再通后狭窄和移植相关的血管病变中起到非常重要的作用。虽然针对中膜平滑肌细胞的迁移和增殖在致病过程中所起的作用做了大量研究, 但是至今仍未有建立有效地阻止血管阻塞重建的治疗方法。最近有研究表明, 骨髓来源的前体细胞能够生成血管细胞, 在特定的情形下参与动脉壁修复, 重建和损伤的形成。心肌素是迄今为止发现的最关键的促血管平滑肌细胞分化因子, 仅表达于胚胎发育时期和成年个体的血管等富含平滑肌的组织 and 心肌。小鼠胚胎干细胞和未分化胚胎癌细胞不表达心肌素, 在向平滑肌诱导的过程中出现了心肌素上系列平滑肌分化标志物基因和蛋白的表达并向平滑肌分化, 而非激活心肌分化基因的表达。

平滑肌细胞的聚集在血管疾病的病理发生过程中起了重要作用, 已有的理论认为平滑肌细胞来源于邻近的中膜层, 具有迁移性和增殖性, 还能合成细胞外基质。虽然人们为了解中膜平滑肌细胞的迁移和增殖的分子机制作出了巨大的努力, 但是, 目前还没有建立防止血管重构有效方案。骨髓干细胞是多种细胞及组织多潜能前体细胞属成体干细胞, 没有明确的细胞表面标识, 没有明确的细胞形态学特征, 它包括造血干细胞、间充质干细胞和内皮祖细胞自我更新和分化潜能, 又能释放某些细胞因子促进血管新生^[18, 19]。有研究指出, 骨髓细胞在血管成形后再狭窄、支架置入血管病损和高脂导致的动脉粥样硬化等血管疾病的病理发生过程中起了重要作用^[20]。已有研究表明骨髓细胞可能具有产生血管前体细胞的潜能, 这些细胞能够归巢至受损的血管分化为肌细胞或内皮细胞, 从而参与血管的修复、重构和病损的形成。以血液中血管祖细胞的移动、归巢、分化和增殖为靶点, 结合心肌素对平滑肌细胞分化的影响, 可作为动脉粥样硬化的一个新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Wang DZ, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, et al.

- Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor [J]. *Cell*, 2001, **105** (7): 851-862.
- [2] Li SJ, Wang DZ, Richardson JA. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development [J]. *PNAS*, 2003, **100** (16): 9 366-370.
- [3] Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1 199-204.
- [4] Han CI, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation [J]. *J Vasc Res*, 2001, **38** (2): 113-119.
- [5] Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2001, **107** (11): 1 411-422.
- [6] Bochaton-Piallat ML, Clowes AW, Clowes MM, Fischer JW, Redard M, Gabbiiani F, et al. Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (6): 949-954.
- [7] Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation in vitro analysis [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (11): 1 189-196.
- [8] Wang ZG, Wang DZ, Dirk Hoekemeyer, John McAnally, Alfred Nordheim. Myocardin and ternary complex factors complete for SRF to control smooth muscle gene expression [J]. *Nature*, 2004, **428** (11): 185-189.
- [9] Zhou J, Hu G, Herring BP. Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (22): 9 874-885.
- [10] Koichiro Kuwahara, Tomasa Barrientos, Pipes GCT, Li SJ. Muscle-specific signaling Mechanism that links Actin Dynamics to serum response factor [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (8): 3 173-181.
- [11] Hinson JS, Medin MD, Lockman K, Taylor JM, Mack CP. Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, **292** (2): H1 170-180.
- [12] Li J, Zhu X, Chen M, Cheng L, Zhou D, Lu MM, et al. Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development [J]. *PNAS*, 2005, **102** (25): 8 916-921.
- [13] Cao DS, Wang ZG, Zhang CL, Jiyeon OH, Xing WB, Li SJ. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (1): 364-376.
- [14] Qiu P, Ritchie RP, Gong XQ, Hamamori Y, Li L. Dynamic changes in chromatin acetylation and the expression of histone acetyltransferases and histone deacetylases regulate the SM22 alpha transcription in response to Smad3-mediated TGF beta 1 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **348** (2): 351-358.
- [15] Du KL, Ip HS, Li J, Chen M, Dandre F, Yu W, et al. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (7): 2 425-427.
- [16] Tadashi Yoshida, Keiko Kawai, Kowase Gray K Owens. Forced expression of myocardin is not sufficient for induction of smooth muscle differentiation in multipotential embryonic cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (9): 1 596-601.
- [17] Rensen SS, Niessen PM, Long X, Doevendans PA, Miano JM, van Eys GJ. Contribution of serum response factor and myocardin to transcriptional regulation of smoothelins [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, **70** (1): 136-145.
- [18] Edward TH, Yeh MD, Sui zhang MD, Herry D, Wu MD, Martin Korbling, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo [J]. *Circulation*, 2003, **108** (10): 2 070-073.
- [19] 黄海怡, 黄佐, 胡国梁, 侯健. 骨髓单个核干细胞移植对慢性心力衰竭大鼠心肌修复的远期效果[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 451-455.
- [20] Masata Sata. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation [J]. *Trends Cardiovas Med*, 2003, **13** (6): 249-253.