

SM22 α : 血管平滑肌细胞分化的分子标志

程云会, 韩梅*, 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要: SM22 α 是一种分化型血管平滑肌细胞(VSMC)的标志基因, 编码一种 22 kDa 的收缩调节蛋白。由于 SM22 α 基因结构短小, 表达具有 VSMC 特异性、调控机制较为清楚, 因而被广泛用于 VSMC 发育分化的研究。利用该基因的表达调控特征, 设计可在 VSMC 中高表达目的蛋白的人工启动子, 是心血管病基因治疗的新策略。

关键词: SM22 α ; 血管平滑肌细胞; 分化; 转录调节

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-281-04

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)发育与分化是一个极其复杂的多基因调控过程。近年研究证实, 一些心血管病(如高血压、动脉粥样硬化等)所伴随出现的 VSMC 增殖、迁移及表型转化等一些细胞事件与 VSMC 分化过程有许多相似之处, 因此, 深入理解 VSMC 发育分化的调控机制将有助于揭示此类心血管病的病理本质。然而, 由于 VSMC 的胚胎起源复杂、多样, 加之缺少 VSMC 特异性标志基因等原因影响了该方面的研究^[1]。SM22 α 是近年发现的 VSMC 标志基因之一, 因其仅在收缩型 VSMC 中高表达, 故更具有分化表型特异性。该基因在 VSMC 分化及收缩功能中的作用日益引起人们的关注。

1 SM22 α 基因及其产物结构

SM22 α 是一种 VSMC 表型标志基因, 因其编码一种 22 kDa 的平滑肌特异性蛋白而得名。该基因曾分别被命名为: transgelin、mouse p27、SM22 α 和 WS3-10。小鼠 SM22 α 基因全长约为 6.2 kb, 定位于第 9 号染色体的 D9Mit154 和 D9Mit330 位点间, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成。SM22 α 的 cDNA 全长约为 1.1 kb, 含一个编码 201 个氨基酸残基肽链的开放阅读框^[2]。SM22 α 蛋白由一条含 201 个氨基酸残基的多肽链构成, 其氨基末端含有一个 calponin 同源性功能域(calponin homology, CH), 羧基末端含有一个 calponin 样重复基序(calponin-like repeat, CLR)。SM22 α 结构在不同种属间高度保守, 无脊椎动物如线虫(unc-87)和果蝇(mp20)中也已发现 SM22 α 的同源物, 说明其在生物进化中可能具有重要的意义, 但其生理功能尚不很清楚^[3]。

SM22 α 既不象平滑肌 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, SM α -actin)存在多种组织亚型, 也不象 caldesmon、metavinculin 和平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC)具有不同剪切亚型, 因而有利于进行表达模式分析; 又因 SM22 α 基因片段较短, 适于基因克隆策略; 加之 SM22 α 仅在收缩型 VSMC 中表达。这些特点使得 SM22 α 成为研究 VSMC 分化和表型转化的最佳标志基因^[4]。

2 SM22 α 的表达调控

SM22 α 的表达调控具有时空秩序性、组织细胞特异性和细胞表型特异性, 这些特征与 SM22 α 基因所拥有的特异性顺式调控元件与转录因子的相互作用有密切关系。

2.1 SM22 α 启动子区中的顺式调控元件

小鼠 SM22 α 基因转录起始点上游 -445 bp 的启动子区具有决定该基因组织特异性表达的功能, 可激活报告基因在 SM22 α 转基因鼠的主动脉 VSMC、原代培养的 VSMC 及平滑肌细胞系 A7r5 中特异性高表达, 说明该启动子序列中包含了 SM22 α 在 VSMC 中高表达所需的全部顺式调控元件。Dnase I 足纹分析和电泳迁移率改变分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)显示, 在 SM22 α 的 -445 bp 启动子中, 含有 6 种顺式调控元件, 其中包括两个血清应答因子结合位点(CArG 盒)、3 个 YY1 的结合位

收稿日期: 2003-07-18; 修回日期: 2003-09-15

国家自然科学基金(30270499)和河北省自然科学基金(303454)资助

课题

* 通讯作者, E-mail: WJK@hebm.edu.cn



图1 小鼠 SM22 α 基因上游 -445 bp 启动子结构

核心序列上方为基序或与其结合的核转录因子的名称, 下方是基序相对于基因 5' 端转录起始点的定位。*: 功能已知。

点、两个 Sp1 和 AP2 的结合位点、一个 TGF- β 调控元件和一个 TATA 盒(图 1)。突变分析证实, 近 3' 端 CArG 盒、5' 端 YY1 结合位点和 TGF- β 调控元件是维持 SM22 α 基因组织表达特异性的关键元件^[5]。

2.2 参与 SM22 α 表达调控的转录因子

2.2.1 血清应答因子(serum response factor, SRF)

SRF 属 MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF) 盒转录因子家族, 已证实 SRF 与 CArG 元件结合后, 通过其保守的 MADS 结构域自发募集其他转录因子与 SRF 或 CArG 的侧翼序列结合, 形成有活性的多聚蛋白复合物, 参与所有已知的 SMC 特异基因的表达调控, 在心肌、骨骼肌和平滑肌的分化过程中具有十分重要的作用。小鼠 SM22 α 启动子 -445 bp 中含有两个 SRF 结合位点(CArG 盒), 它们在 SM22 α 基因转录调控中的作用不完全相同。突变分析显示, 在瞬时转染的 SMC 中, 两个 CArG 盒的突变均能使 SM22 α 启动子的活性降低, 但 3' 端 CArG 盒的突变使其降低更为明显。人的 SM22 α 启动子 5' 端 CArG 盒突变后几乎不影响该基因的转录活性。在 SM22 α 转基因鼠中, 近 3' 端的 CArG 盒突变可导致 SM22 α 启动子活性完全丧失, 但近 5' 端的 CArG 盒突变仅降低 SM22 α 在胚胎肌节中的表达活性, 对其在平滑肌中的表达模式无影响。以上结果证实, 近 3' 端的 CArG 盒对 SM22 α 启动子活性至关重要^[5]。然而, 仅有 SRF 与 CArG 的结合不足以使 SM22 α 启动子活化, 大鼠主动脉 SMC 核蛋白结合分析显示^[6], 近 3' 端的 CArG 盒除与 SRF 和 YY1 结合外, 尚有其他 4 种核蛋白参与其中, 提示 SRF 与其他转录因子通过特异性的组合方式来共调控 SM22 α 基因的组织特异性表达。

2.2.2 阴阳因子 1 (Yin-Yang 1, YY1) YY1 是一个含锌指结构的多功能反式作用因子, 因其在不同情况下起增强或抑制基因转录的双重作用而得名。YY1 可通过多种机制参与基因转录调控, 例如在嵌入或重叠部位, YY1 通过与其他活化因子竞争结合 DNA 的机制, 可抑制或促进 SRF 与 c-fos 血清应答元件(serum response element, SRE)的结合^[9]。SM22 α 启动子 -445 bp 区域中含有 3 个 YY1 的结合位点, 它们在 SM22 α 转录中的作用似乎也有阶段性和方向

性。对 3 个 YY1 的结合位点分别突变, 可使 SM22 α 启动子在主动脉 SMC 中的活性分别降低 45%、35% 和 40%。若将 3 个结合位点同时突变, 则启动子活性降低 80%。将 YY1 与 SM22 α 启动子报告基因共转染原代培养的大鼠主动脉 SMC, 则报告基因表达活性与共转染 YY1 质粒的量呈正相关^[6]。

2.2.3 Krüppel 样因子(Krüppel-like factors, KLFs)

KLFs 家族包括许多 Krüppel 相关转录因子, 其成员都有类似于 Krüppel 蛋白的三锌指结构, 与 GT 盒或 CACCC 元件有高度亲和性, 并通过多种机制相互调节彼此的活性, 从而在分化和发育中起多种不同作用。SM22 α 启动子 -445 bp 中含有一个 TGF- β 控制元件(TGF- β control element, TCE), 突变的 TCE 可使启动子活性完全丧失。在 TCE 核心序列中含有一个十分保守的 CACCC 基序 (GAGTGGG), 酵母单杂交试验证实胃肠富集 Krüppel 样因子(gut-enriched Krüppel-like factor, GKLF)可与 TCE 结合。GKLF 在增殖型 SMC 中高表达, 而在分化型 SMC 中表达量很低。共转染实验表明, GKLF 是一种转录负调控因子, 可抑制 SM22 α 启动子活性; 而其相关因子 BTEB2 (basic transcriptional element binding protein-2)可增强 SM22 α 启动子的活性^[7]。以上结果提示, Krüppel 样相关转录因子可能通过竞争结合 TCE 的方式参与 SM22 α 的表达调控。

2.2.4 Smad 蛋白 最近发现的 Smad 蛋白家族是 TGF- β 信号途径的胞内介导者, 在 TGF- β 家族胞内信号的传输过程中起枢纽作用。Smad 蛋白可将 TGF- β 信号直接从细胞膜转导入细胞核内, 调节靶基因的转录。Chen 等^[8]证实 TGF- β 对 SM22 α 启动子(-162~+41bp)的活化依赖于 Smad 蛋白。TGF- β 诱导 Smad1 和 Smad3 两种蛋白与通用介导分子 Smad 4 相互作用, 形成异源三聚体复合物。该三聚体复合物转移至细胞核内与 SM22 α 启动子中的 Smad 结合位点(Smad binding site, SBS)和 medea 盒结合, 进而激活该基因的转录。在 3 种 Smad 蛋白中, Smad3 对 SM22 α 基因的激活最为重要。

2.2.5 Myocardin Myocardin 是新近发现的一种 SRF 协同因子, 属 SAP(SAF-A/B, Acinus, PIAS)功能域转录因子家族, 因最早发现其在心肌发育过程

中起重要作用而命名。Du等^[9]研究证实胚胎发育过程中, Myocardin在血管和内脏SMC中的含量接近甚至高于心肌组织, 且呈现一种精确、渐进的调控方式。在非肌细胞中强制表达Myocardin可以激活包括SM22 α 在内的多种SMC特异性启动子。而转录突变的Myocardin或采用iRNA技术抑制该基因表达后, 则SMC中SM22 α 启动子的活性显著降低。因此, Myocardin是SM22 α 转录激活必不可少的调控因子。Myocardin对SM22 α 启动子的激活还有赖于SRF, 在SRF基因双敲除(SRF^{-/-})的胚胎干细胞中, Myocardin对SMC特异性启动子的激活作用消失, 重新导入外源性SRF或SRF的DNA结合功能域后, 其激活作用重新恢复。由于SRF的表达无组织特异性, 而Myocardin只在肌细胞中高表达, 推测Myocardin可能通过与SRF的相互作用而决定胚胎干细胞向肌细胞的定向分化。

2.2.6 NKx3.2和GATA-6 同源异型盒转录因子和包含锌指结构域的GATA家族转录因子在肌细胞的发育过程中起重要作用。序列分析证实, 除CArG元件外, 在包括SM22 α 在内的许多VSMC标志基因的启动子区中都含有一个TAAT序列和GATA盒, 它们分别是NKx类同源异型蛋白和GATA家族转录因子的结合位点。原位杂交显示NKx-3.2、SRF和GATA-6共定位于血管中层SMC中, 3种转录因子共转染可使SM22 α 的启动子活性增加28倍。Pull-down分析和免疫共沉淀实验显示这3种转录因子在体内、外都能形成复合物; 删除实验证实NKx-3.2的同源异型结构域直接与SRF的MADS结构域及GATA-6的锌指结构结合而形成三聚体复合物, 共同参与调节SM22 α 基因的表达活性^[10]。

2.3 SM22 α 的表达调控

SM22 α 的表达具有时空性特点。在小鼠胚胎发育过程中, 除平滑肌(E9.5)组织外, SM22 α 还可在心肌(E8.0~E12.5)和骨骼肌(E9.5~E12.5)组织中出现一过性表达; 出生后则局限于平滑肌组织中表达。在VSMC发育过程中, SM22 α 的表达晚于SM α -actin, 而早于h1-calponin、caldesmon、SM-MHC和SM α -tropomyosin等平滑肌标志基因, 是VSMC分化的早期标志之一^[11]。在成年的VSMC中, SM22 α 表达具有表型特异性。正常血管壁中的分化型VSMC高表达SM22 α , 当血管内皮受损或将VSMC进行体外培养时, VSMC由收缩型转变为合成型, 此时SM22 α 的表达活性明显下降甚至消失。如果将培养的VSMC进行血清饥饿处理, 以诱导细胞再分化, 则细胞又重新表达SM22 α 。我室研究发现, SM22 α 的重新表达与CArG元件的活性有直接关

系。EMSA显示, 从血清饥饿24~48h的VSMC中提取的核蛋白与CArG顺式元件的结合活性最高, 提示血清饥饿可促进SRF的活化及其与CArG的相互作用。实验还发现SM22 α 转录活性与CArG元件与SRF的相互作用有正相关关系, 说明SM22 α 表达有赖于高活性的SRF与CArG顺式元件结合。这一特征明显不同于SM α -actin, 后者即使在合成型VSMC中也可检测到表达活性, 但此时很难检测及CArG与SRF的相互作用。SM22 α 表达的这种表型依赖性或许还与其他机制有关, 总之将其作为VSMC的表型标志物则具有更高的特异性和可应用性^[12]。

在SM22 α 转基因鼠中, SM22 α -445bp启动子区在主动脉VSMC中具有很强的转录激活作用。然而, 却不能诱导报告基因在成年动物的静脉及内脏SMC中表达^[13]。有研究者认为, 这种同一启动子在不同类型SMC中具有不同活性的现象是由于不同组织的SMC在胚胎发育过程中起源不同所造成的。在主动脉SMC中包含了可反式激活SM22 α -445bp启动子的所有核转录因子, 而静脉和内脏的SMC中则不具备这些条件。也有人认为要使SM22 α 在所有的SMC中表达尚需要其他调控序列的参与。Hoggatt等^[14]将telokin启动子区中的AT-CArG片段与SM22 α 启动子(-475~+61bp)连接, 新产生的AT-CArG/SM22 α 启动子可使报告基因在转基因鼠的主动脉和膀胱SMC中均高表达。另外, 在静脉和内脏SMC中, SM22 α 基因的甲基化也是导致其低表达的机制之一。

3 应用前景

利用SM22 α 基因表达的高度组织特异性特征进行心血管病的基因治疗已成为目前研究的热点。重组腺病毒载体的应用最为广泛, 并被成功地用于抑制VSMC增殖和血管新生内膜形成。虽然, 重组腺病毒载体已被成功地用于增殖性血管病的治疗研究, 但很难做到使靶基因局限于特定的平滑肌组织中表达。为了实现基因转移的组织特异性和时间特异性控制, 有人提出了运用平滑肌特异的内源性转录调控元件使靶基因定向表达的基因治疗策略, 这样不仅可保证靶蛋白定位、定时表达, 而且可减少宿主细胞对外源基因产物的反应。由于SM22 α 启动子在VSMC中具有较高活性, 对其调控序列研究也较清楚, 故是进行血管增殖性疾病基因治疗的首选工具。为了解决内源性的SM22 α 启动子活性偏低的问题, Ribault等^[15]将SM-MHC或骨骼肌肌酸激酶基因的增强子和SM22 α 启动子连接, 新产生的融合启动子具有与CMV启动子相同的转录活性, 可使

携带的 IFN- γ 基因局限于 VSMC 中高表达, 并产生明显抑制 VSMC 增殖的生物学效应。利用 SM22 α 的同一启动子区在不同类型 SMC 中活性不同的特点, 通过重组细胞特异性调节元件, 可设计产生一种在特定平滑肌组织中表达靶蛋白的人工启动子, 这对以 VSMC 异常增殖为特征的高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心血管病的基因治疗将具有更大的应用价值。

SM22 α 是一种分化型 VSMC 的标志基因。由于该基因结构短小、表达特异性高、调控机制较为清楚, 因而作为一种分子模型被广泛用于 VSMC 基因表达调控的研究。随着基因治疗技术的日臻成熟, SM22 α 启动子必将成为心血管病基因治疗领域的一种强有力工具。

参 考 文 献

- [1] SUZUKI T, NAGAI R, YAZAKI Y. Mechanisms of transcriptional regulation of gene expression in smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1998, **82**(12): 1238 - 1242.
- [2] SOLWAY J, SELTZER J, SAMAHA F F, *et al.* Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(22): 13460 - 13469.
- [3] MORGAN K G, GANGOPADHYAY S S. Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins [J]. *J Appl Physiol*, 2001, **91**(2): 953 - 962.
- [4] MOESSLER H, MERICKSKAY M, LI Z, *et al.* The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice [J]. *Development*, 1996, **122**(8): 2415 - 2425.
- [5] SOLWAY J, FORSYTHE S M, HALAYKO A J, *et al.* Transcriptional regulation of smooth muscle contractile apparatus expression [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**(5): S100 - S108.
- [6] STROBECK M, KIM S, ZHANG J C, *et al.* Binding of serum response factor to CARG box sequences is necessary but not sufficient to restrict gene expression to arterial smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19): 16418 - 16424.
- [7] ADAM P J, REGAN C P, HAUTMANN M B. Positive- and negative-acting Krüppel-like transcription factors bind a transforming growth factor β control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22 *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(48): 37798 - 37806.
- [8] CHEN S, KULIK M, LECHLEIDER R J. Smad proteins regulate transcriptional induction of the SM22 α gene by TGF- β [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(4): 1302 - 1310.
- [9] DU K L, IP H S, LI J, *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): 2425 - 2437.
- [10] NISHIDA W, NAKAMURA M, MORI S, *et al.* A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem*, 2002, **277**(9): 7308 - 7317.
- [11] 李琦, 温进坤, 郑斌. 血管平滑肌细胞表型调节机制的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2003, **34**(1): 27 - 31.
- [12] 韩梅, 温进坤, 郑斌等. 血清饥饿可诱导人血管平滑肌细胞再分化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**(2): 250 - 255.
- [13] XU R, HO Y S, RITCHIE R P, *et al.* Human SM22 α BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284**(4): H1398 - H1407.
- [14] HOGGATT A M, SIMON G M, HERRING B P. Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues [J]. *Circ Res*, 2002, **91**(12): 1151 - 1159.
- [15] RIBAUT S, NEUVILLE P, MÉCHINE-NEUVILLE A, *et al.* Chimeric smooth muscle-specific enhancer/promoters: valuable tools for adenovirus-mediated cardiovascular gene therapy [J]. *Circ Res*, 2001, **88**(5): 468 - 475.

SM22 α : A Maker of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation

CHENG Yun Hui, HAN Mei*, WEN Jin Kun

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: SM22 α is one of vascular smooth muscle cell (VSMC) marker genes, and encodes a 22 kDa contraction-associated protein. SM22 α gene is characterized by simple structure and restricted expression in differentiated VSMC. Thus, it has widely been used to study the regulatory mechanisms of VSMC-specific gene expression. On the basis of the features of its expression, recombinant promoters containing SM22 α regulatory region have been developed, and serve as a tool for gene therapy to trigger the target protein expression in VSMC.

Key words: SM22 α ; vascular smooth muscle cell; differentiation; transcriptional regulation

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (303454)

*Corresponding author, E-mail: WJK@hebm.u.edu.cn