

# 同源异型盒基因对血管平滑肌细胞的调控作用

聂磊 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** 同源异型盒基因是一类对生物体的生长、发育和分化从时间和空间上进行协调的调控基因。构成血管中膜的血管平滑肌细胞表型具有极大的可塑性。在一些病理性血管重构时, 血管平滑肌细胞可发生表型调变, 从分化型调变为去分化型, 具备增殖和迁移能力。在此过程中, 多种同源异型盒基因的表达发挥了重要的调控作用。现就同源异型盒基因与血管平滑肌细胞的表型调变、增殖和迁移的关系等方面的研究进展作一综述。

**关键词** 同源异型盒; 血管平滑肌细胞; 表型调变

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)在多种细胞因子和生长因子的刺激下, 可从具有收缩功能的分化型调变为具有迁移和增殖能力的类似于胚胎期的去分化型, 称之为表型调变。VSMC的表型调变是动脉粥样硬化、血管再狭窄等心血管疾病中VSMC迁移和增殖的关键环节, 故探讨VSMC表型调变、迁移和增殖等细胞生物学行为变化的分子机制已成为心血管领域的研究热点<sup>[1]</sup>。研究表明, 一系列同源异型盒基因(homeobox gene)的表达产物在VSMC表型调变、增殖和迁移过程中发挥着重要的调控作用。同源异型盒基因属于发育基因, 它是一类对生物体的生长和发育从时间和空间上进行协调的调控基因。这一类基因在进化过程中具有极大的保守性, 对于动物的胚胎发育具有至关重要的作用。同源异型盒基因所编码的产物绝大多数是转录因子, 其功能与无脊椎动物或脊椎动物胚胎发育、多种类型细胞的分化、迁移和增殖有关, 关于同源异型盒基因的研究一直是细胞生物学、发育生物学等研究的热点<sup>[2]</sup>。

## 1 同源异型盒基因与血管平滑肌细胞表型调变

### 1.1 同源异型盒基因

同源异型盒基因最初是在研究果蝇同源异型突变中发现的, 所谓同源异型突变是指一些在发育过程中的非正常转变, 这些转变往往使身体的某一位发育成结构或功能相似或相关的身体的另一部

分。例如, 如果果蝇触足基因(antennapedia)发生突变, 将导致果蝇的触须被正常发育的腿所取代<sup>[3, 4]</sup>。之后, 人们又陆续从多种动物, 包括哺乳动物的基因组中也发现了相似的基因序列。随着这类基因的相继克隆, 对其结构的分析结果显示, 在同源异型盒基因的DNA序列中都存在一个高度保守的同源区域, 约有180个碱基对, 这个区域即称为同源异型盒, 可编码60个氨基酸, 构成一个DNA结合结构域, 该结构域含有一个螺旋-转角-螺旋结构, 称之为同源异型结构域, 表达产物同源异型蛋白(homeoprotein)通过这一结构域与特定基因的启动子或增强子序列结合, 从而实现了对下游基因的转录调控作用<sup>[5]</sup>。目前发现的同源异型盒基因已超过200种, 部分同源异型盒基因在基因组中串联成簇排列, 在鼠类及人类分别发现了4簇共39个同源异型盒基因(同源异型盒基因在果蝇中命名为HOM基因, 在哺乳类命名为HOX基因)。这4簇HOX基因分别命名为HOX-A、HOX-B、HOX-C和HOX-D, 分别位于6、11、15及2号染色体(鼠类)或7、17、12和2号染色体(人类)上, 人类和小鼠的同源异型盒基因不管从数量上还是在染色体的排列顺序上都极为相似。每簇基因从5'→3'又含有1~13个数目不同的基因位点, 同源异型盒基因在染色体上

收稿日期: 2003-11-10 接受日期: 2004-02-18

国家自然科学基金(No.30270499)和河北省自然科学基金(No.303454)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0311-6265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

的排列顺序与其在体轴上的时空表达顺序性相吻合,即在胚胎早期发育中,5'→3'线性排列的同源异型盒基因在特定的时间与空间依次顺序表达,5'端基因最先在体轴前段表达,3'端基因则在体轴后段表达。在不同的时间和空间上某种同源异型蛋白在体轴各部位的含量呈现梯度分布,而这种分布受到严格的调控并呈现出明显的界限。因此,同源异型盒基因的产物是作为一类转录调节因子,参与调控体节形成、胚胎发育和细胞分化等多种生物学过程<sup>[4]</sup>。

根据同源异型蛋白的结构及其非同源异型结构域与DNA结合和/或与其他转录因子的相互作用的方式不同,可将其主要分为以下几种类型:HOX蛋白,含有一个六肽保守区(hexapeptide motif, HP),介导DNA与同源异型蛋白PBX之间的相互作用;MSX蛋白,在同源异型结构域的侧翼含有一段保守的氨基酸序列(extended homeodomain, EHD),但其功能尚不清楚;PAX蛋白,含有另外一个DNA结合结构域(paired box);SIX家族,氨基端含有一个称为六结构域(six domain)的保守结构域;LIM家族,含有一个称为LIM结构域的蛋白质结合区<sup>[4]</sup>。

同源异型蛋白作为转录因子可以特异性的调节基因的表达,控制细胞或器官的分化及细胞周期进程,与原癌基因具有相似的功能,而且其中有一部分同源异型盒基因本身就是原癌基因,其表达产物在调节个体发育、器官形成、细胞生长、分化、增殖、凋亡和迁移中起重要作用。同源异型盒基因中既包括细胞生长、分化的正调节基因又包括作用相反的负调节基因,它们的表达产物或促进细胞增殖,或促进细胞分化<sup>[2,3]</sup>。由于构成血管中膜的VSMC属于非终末分化细胞,其表型具有极大的可塑性,在一些病理条件下,如动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管病变时,VSMC可发生表型调变,从具有收缩功能的分化型调变为具有增殖活性的类似于胚胎期合成表型的去分化型。在此过程中,多种同源异型蛋白参与了相关基因的表达调控<sup>[3,5]</sup>。

## 1.2 同源异型蛋白对血管平滑肌细胞表型调变的调控作用

通过筛选大鼠VSMC的cDNA文库发现了一系列同源异型盒基因的表达与血管平滑肌细胞表型调变的调控相关,其中在正常成熟血管壁VSMC特异性表达或高表达的同源异型盒基因包括Prx1

(Mhox), Gax, Nkx-3.2, HoxA5, HoxA11和HoxB1等<sup>[3,6,7,8]</sup>,在胚胎期的VSMC或者发生表型调变的合成型VSMC特异性表达或高表达的同源异型盒基因包括Prx2, HoxB7, HoxC9和Hex等<sup>[3,9,10]</sup>。近年的研究表明,这些同源异型蛋白对VSMC表型的调节可能通过影响表型相关转录调控因子和/或表型标志基因的表达来实现的。

正常血管壁中的VSMC处于分化表型,主要表达平滑肌 $\alpha$ 肌动蛋白(SM  $\alpha$ -actin)、平滑肌 $\gamma$ 肌动蛋白(SM  $\gamma$ -actin)、肌球蛋白重链(SM-MHC)、钙调结合蛋白(caldesmon)、h1-calponin、SM22 $\alpha$ 、smoothelin、metavinculin和 $\alpha_1$ 整合素( $\alpha_1$ -integrin)等一系列特异性标志基因来维持其收缩表型并行使特定的功能。但在一些病理条件下,如动脉粥样硬化或血管再狭窄导致的血管内皮功能受损或VSMC进行体外培养时,VSMC迅速发生表型调变,上述分化型的标志基因表达下调,而去分化型标志基因,如SMemb、I-caldesmon和OPN等基因转录增加<sup>[6,11]</sup>。研究表明,上述同源异型盒基因与这些VSMC表型调变相关基因表达具有相似的时相性,其表达产物同源异型蛋白可能以多种方式与血清应答因子(serum response factor, SRF)及其他转录因子相互作用而调节表型调变相关基因的表达<sup>[12,13]</sup>。SRF可与在几乎所有VSMC特异基因的上游调控区均含有的CArG[CC(A/T)<sub>6</sub>GG]调控元件或类CArG序列特异性的结合,从而启动基因的转录,目前认为SRF与其他特异转录因子组合并与特异基因上游调控区结合是决定VSMC特异基因表达的关键。但是,CArG调控元件并非是VSMC特异基因所独有的,而且SRF也广泛分布于多种类型的细胞,单用SRF与CArG调控元件之间的相互作用很难解释VSMC分化及表型调变过程中特异基因的表达调控机制。研究表明,SRF通常是作为一个起始转录的平台与多种蛋白质形成转录复合物共同调控基因的特异性表达,其中包括可与同源异型蛋白形成转录复合物,但是在此过程中二者的结合及其对基因表达的分子机制尚不十分清楚<sup>[14,15]</sup>。

目前认为可能的分子机制有如下几种:(1)共选择性结合(co-selective binding)模式。为保证特定基因的转录,需要多种同源异型蛋白在Pbx家族介导下相互结合成多聚体并结合到特定的顺式作用元件上,通过这种模式可以提高同源异型蛋白与结合靶位点的特异性和亲和力<sup>[3,10]</sup>;(2)同源异型蛋白通过

直接或间接与 SRF 或者其他转录因子的结合从而改变该复合物与特异基因的上游调控区结合的特异性, 或者提高或降低该复合物与特异基因的上游调控区结合的亲和力, 进而启动表型调变相关基因的表达<sup>[9, 10]</sup>; (3)同源异型蛋白参与染色质重构过程。可能通过提高表型相关基因启动子区的组蛋白乙酰化水平来提高转录复合物与相应序列结合的亲和力, 从而起到调控转录的作用<sup>[16]</sup>。

例如, 在 VSMC 表型调变过程及其在血管和心脏发育过程中, 已发现某些同源异型蛋白通过其同源异型结构域直接与 SRF 结合来调控特定基因的表达。如在 VSMC 中表型相关基因  $\alpha_1$  整合素, SM22 $\alpha$  和钙调结合蛋白等基因的表达是通过 Nkx-3.2、SRF 和 GATA-6 形成的三聚体与其上游调控区的顺式作用元件特异性的结合而激活转录的。在形成的转录因子复合物中, Nkx-3.2 的同源异型结构域直接与 SRF 的 MADS 结构域以及 GATA-6 的锌指结构域结合, 而且这种转录因子复合物的形成是多种表型调变相关基因转录所必需的。与此机制相似的是心脏细胞中心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)基因的转录同样也需要 Nkx-2.5、SRF 和 GATA-4 形成的三聚体与其上游的 CArG 样序列的结合<sup>[9, 17]</sup>。此外, 同源异型蛋白还可能通过增强 SRF 与 CArG 序列的亲和力而发挥转录调控作用, 如 Prx 1 对平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白的表达调控则是通过该方式实现的<sup>[16]</sup>。

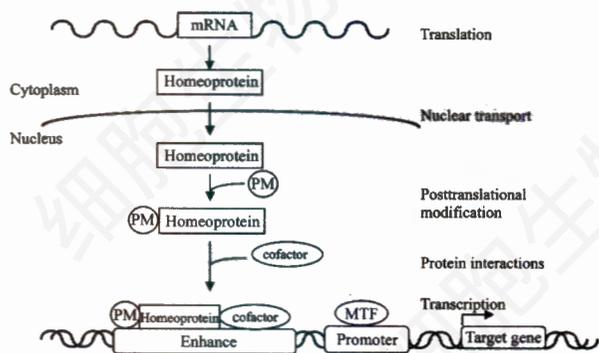
同源异型蛋白不仅可与 SRF 结合调控基因的转录, 而且同源异型蛋白还可以通过其结构中的同源异型结构域与多种转录因子相互作用以协调基因的转录。同源异型结构域不仅可与 DNA 上富含 AT 的序列结合, 而且还可与富含 GC 的序列结合, 甚至还可以与 cAMP 反应元件(cAMP-responsive element, CRE)结合<sup>[3, 7]</sup>。如同源异型蛋白 Hex 对 VSMC 的 SMemb 基因的表达调控就是通过与 CRE 相互作用来发挥起到调控活性的。Hex 是一种富含脯氨酸的同源异型蛋白, 在胚胎期一过性表达, 在成熟的血管壁以及其他组织中检测不到 Hex 的表达, 但在新生内膜中的 VSMC 或者培养的去分化型 VSMC 中该基因高表达或者诱导表达, 该基因的表达时相与 VSMC 表型标志基因 SMemb 十分相似, 转染 Hex 全长序列表达质粒的 VSMC 中 SMemb 基因转录水平明显升高, 而若用缺失了同源异型结构域的 Hex 表达质粒转染 VSMC, 则其 SMemb 基因转录水平无明显变化, 表明 Hex 中的同源异型结构域是调节转录

所必需的。进一步研究发现, Hex 结合到 SMemb 基因上游的 -461~-481 的区域, 其中包括 CRE, 并且还发现 Hex 增强 SMemb 基因转录水平并非通过其同源异型结构域直接与 CRE 结合, 与 CRE 直接结合的是 CREB, 而且也未证明 Hex 与 CREB 直接结合, 可能是通过其他的转录因子, 如 CBP/p300(CREB-binding protein)等的介导作用间接与 CREB 结合, 共同形成一个转录激活复合物调控基因的转录<sup>[7, 17]</sup>。

同源异型蛋白除了能够与多种转录因子结合调控基因的表达, 还可能通过改变染色质局部的组蛋白乙酰化程度参与染色质重构过程。染色质的基本单位是由双链 DNA 与组蛋白八聚体形成的核小体构成的, 基因转录的前提是高度螺旋化的染色质局部必须解螺旋, 与这一过程相关的酶包括组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC), 组蛋白乙酰化程度的改变可以使核小体附近的 DNA 螺旋程度相应改变, 即出现染色质重构现象, 该过程有利于转录因子与特异的顺式作用元件结合, 而且, 一部分转录因子本身就具有 HAT 活性, 如形成的转录激活复合物中的 CBP/p300 和 PCAF(CBP/p300-associated factor)等<sup>[16, 17]</sup>。研究表明, 同源异型蛋白 HoxB7 过表达可以诱导多潜能成纤维细胞 10T1/2 转变成类平滑肌细胞, 在此过程中, SM22 $\alpha$  启动子区检测到组蛋白乙酰化程度升高, 表明某些同源异型蛋白可能参与染色质重构过程。而在 VSMC 的表型调变过程中 SM22 $\alpha$  基因具有相似的表达调控过程, 在其启动子区域检测到 SRF 与 CBP 形成的转录激活复合物具有 HAT 活性<sup>[18]</sup>。从以上证据推测, 某些同源异型蛋白不仅参与了转录复合物的形成过程, 并且可能通过提高相应区域的组蛋白乙酰化水平来提高该复合物与相应序列结合的亲和力, 从而起到调控转录的作用<sup>[16]</sup>。

### 1.3 同源异型蛋白参与血管平滑肌细胞表型相关基因转录调控的分子机制

通过同源异型蛋白与 VSMC 表型相关基因转录调控之间关系的研究可以看出, 同源异型蛋白能够与多种转录因子直接或间接结合形成转录复合物, 该复合物与表型相关基因的上游调控区的顺式作用元件之间相互作用形成复杂的调控网络, 从多种不同的水平调控基因的转录<sup>[3]</sup>。综上所述, 同源异型蛋白对 VSMC 基因转录调控可能的分子机制如下: 同源异型盒基因在细胞质基质完成翻译过程后, 经



**Fig.1 Molecular mechanisms of transcriptional regulation of gene expression by homeoprotein**

PM, posttranslational modification; MTF, multisubunit transcription factor.

核质转运过程进入细胞核，进行翻译后加工修饰过程，之后可能与多种转录因子，如 SRF、CREB 等转录因子形成转录复合物，该复合物与表型相关基因上游调控区内的增强子或者远端启动子序列结合并通过与多亚基转录因子(multisubunit transcription factor, MTF)的相互作用共同调控特异基因的转录(图 1)<sup>[4]</sup>。

## 2 同源异型蛋白与血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡的关系

发生表型调变的 VSMC 从具有收缩功能的分化型调变为类似于胚胎期合成表型的去分化型，具有增殖和迁移活性。位于血管中膜 VSMC 过度增殖和向内膜的迁移过程在高血压、动脉粥样硬化和血管成型术后再狭窄等许多心血管疾病的发生发展过程中起十分重要的作用。研究表明，多种同源异型盒基因，如 HoxB7、HoxC9 以及 Hex 等基因的表达可能与 VSMC 增殖和迁移活性相关。在胚胎发育中以及在动脉粥样硬化斑块中的 VSMC HoxB7 基因高表达，提示该基因可能在 VSMC 表型调变和增殖过程中起作用；培养的 VSMC 中 Hex 高表达，撤血清对 VSMC 进行饥饿培养后，Hex 的表达水平迅速下降，VSMC 去分化特征逐渐减弱，代之以分化型标志的恢复，该结果提示，Hex 可能与 HoxB7 基因有类似的作用维持 VSMC 于增殖状态<sup>[8,18]</sup>。而同源异型盒基因 Gax(growth-arrest-specific homeobox, Gax)在丝裂源刺激下或者急性血管损伤时表达迅速下降，Gax 的这种表达特性提示其在维持 VSMC 于非增殖状态中起调节作用。Gax 过表达可以抑制增殖，使细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期，这一过程是通过 p53 非

依赖性方式激活 cdk2 抑制性蛋白 p21 而抑制 VSMC 增殖<sup>[19,20]</sup>。在整体动物水平，以腺病毒为载体将 Gax 导入大鼠动脉损伤模型的损伤部位，观察发现，Gax 的表达可明显抑制内皮剥脱后新生内膜的形成及血管重塑的发生，提示 Gax 可以作为抑制动脉粥样硬化斑块形成和血管成型术后再狭窄的基因治疗的候选基因<sup>[19,21]</sup>。

采用 Boyden 小室观察 Gax 对 VSMC 迁移的影响后发现，Gax 过表达可以抑制血小板源性生长因子-BB 对 VSMC 迁移的诱导作用，且其对迁移的抑制作用与其抑制整合素  $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$  的表达相平行；反之，当用促 VSMC 迁移的因素，如骨桥蛋白和纤连蛋白刺激细胞时，我们实验室观察到，骨桥蛋白和纤连蛋白在促进 VSMC 迁移时伴有 Gax 表达下降和整合素  $\beta_3$  的活性上调，这些结果表明，Gax 通过整合素的介导来协调 VSMC 迁移。另外，Gax 还可能通过整合素信号通路来介导增殖的 VSMC 凋亡。Gax 过表达可诱导丝裂原刺激增殖的 VSMC 凋亡，而对静止的 VSMC 则无影响，且 Gax 诱导凋亡不依赖于细胞周期活性，Gax 过表达导致丝裂原刺激的而非静止的 VSMC 中 Bcl-2 表达下调，Bax 表达上调，以上结果表明，Bcl-2 家族诱导的 VSMC 凋亡过程与 Gax 过表达下调整合素  $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$  的表达相关<sup>[21,22]</sup>。

## 3 小结

目前虽然对一些同源异型盒基因与 VSMC 的表型调变、增殖、迁移和凋亡有了一些认识，但仍然有许多问题尚未研究清楚，如参与 VSMC 表型调变的多种同源异型蛋白之间的关系、同源异型蛋白与各种转录因子的关系等仍需要进一步的研究。

## 参考文献 (References)

- [1] Reese DE et al. *Circ Res*, 2002, **91**: 761
- [2] Gorski DH et al. *Circ Res*, 2000, **87**: 865
- [3] Gorski DH et al. *Circ Res*, 2001, **88**: 7
- [4] Shen CA. *Nature Rev Cancer*, 2002, **2**: 777
- [5] Oettgen P. *Circ Res*, 2001, **89**: 380
- [6] Halayko AJ et al. *J Appl Physiol*, 2001, **90**(1): 358
- [7] Sekiguchi K et al. *Circ Res*, 2001, **88**: 52
- [8] Galant R et al. *Development*, 2002, **129**: 3115
- [9] Nishida W et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**(9): 7308
- [10] Su B et al. *Circ Res*, 2001, **89**: 39
- [11] Wen JK et al. *Life Sci*, 2002, **70**: 799
- [12] Kemp PR et al. *Biochem J*, 2000, **345**: 445
- [13] Strobeck M et al. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19): 16418

- [14] 韩梅等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**: 626  
 [15] Mckean DM *et al. J Cell Biol*, 2003, **161**: 393  
 [16] Qiu P *et al. Circ Res*, 2002, **90**: 858  
 [17] Puri PL *et al. Mol Cell*, 1997, **1**: 35  
 [18] Bostrom K *et al. J Cell Biochem*, 2000, **78**: 210  
 [19] 韩梅等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 250  
 [20] Maillard L *et al. Gene Ther*, 2000, **7**: 1353  
 [21] Witzensbichler B *et al. J Clin Invest*, 1999, **104**: 1469  
 [22] 刘智敏等. *中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 163

## Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell by Homeobox Gene

Lei Nie, Mei Han\*, Jin-Kun Wen

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

**Abstract** Homeobox genes are critical in the regulation of cell proliferation, differentiation and migration. Vascular smooth muscle cells occur phenotypic modulation during the pathological processes such as atherosclerosis and arterial restenosis after balloon angioplasty. Recently, homeobox genes have been detected in vascular smooth muscle cells, and may play an important role in regulating these processes. This paper will review the homeobox genes involve in the phenotypic modulation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.

**Key words** homeobox gene; vascular smooth muscle cell; phenotypic modulation

Received: November 10, 2003 Accepted: February 18, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270499) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303454)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, E-mail: wjk@hebm.edu.cn

### 《细胞生物学杂志》编辑委员会

### The Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology

#### 主 编 Editor-in-Chief

郭礼和 Li-He Guo

#### 副主编 Associate Editors-in-Chief

白永延 Yong-Yan Bai 施渭康 Wei-Kang Shi 朱学良 Xue-Liang Zhu

#### 编 委 Members of the Editorial Board

白永延 Yong-Yan Bai	陈瑞阳 Rui-Yang Chen	陈受宜 Shou-Yi Chen
陈尊器 Zun-Qi Chen	丁明孝 Ming-Xiao Ding	丁小燕 Xiao-Yan Ding
费 俭 Jian Fei	郭礼和 Li-He Guo	黄百渠 Bai-Qu Huang
李逸平 Yi-Ping Li	林圣彩 Sheng-Cai Lin	陆长德 Chang-De Lu
马奎蒙 Kui-Meng Ma	施渭康 Wei-Kang Shi	孙 兵 Bing Sun
吴 乔 Qiao Wu	许政暄 Zheng-Kai Xu	杨弘远 Hong-Yuan Yang
严缘昌 Yuan-Chang Yan	章静波 Jing-Bo Zhang	赵寿元 Shou-Yuan Zhao
郑仲承 Zhong-Cheng Zheng	周光炎 Guang-Yan Zhou	朱德煦 De-Xu Zhu
朱学良 Xue-Liang Zhu		

#### 编辑部 Editorial Office

侯向宇 Xiang-Yu Hou 卢建平 Jian-Ping Lu

(姓名先后按汉语拼音字母为序, alphabetically)