

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0085-06

• 实验研究 •

锌指蛋白 297B协同 Myocardin调节平滑肌细胞的分化

孙璇^{1,2}, 卢光琇¹

(1. 中南大学生殖与干细胞工程研究所, 国家干细胞研究中心, 湖南省长沙市 410078

2. 密歇根大学心血管中心, 安娜堡, 48109 美国)

[关键词] 锌指蛋白 297B; Myocardin; 平滑肌细胞; 分化

[摘要] 目的 探讨锌指蛋白 297B在平滑肌细胞分化过程中的表达及相关机制。方法 用定量实时多聚酶链反应检测锌指蛋白 297B在人、大鼠和小鼠平滑肌细胞中体内/体外的表达量及在平滑肌细胞体内和体外分化或增殖过程中的表达变化;构建锌指蛋白 297B-Myc表达质粒,免疫荧光检测锌指蛋白 297B-Myc在大鼠平滑肌细胞中的表达分布;用荧光素酶活性检测及免疫共沉淀实验检测锌指蛋白 297B与 Myocardin的结合及相互作用。结果 锌指蛋白 297B在平滑肌细胞中特异性高表达,在小鼠胚胎干细胞向平滑肌细胞分化过程中表达上调,在血小板源性生长因子 BB刺激的平滑肌细胞增殖过程中下调,在大鼠颈动脉球囊损伤内膜修复过程中表达先上调后下降。锌指蛋白 297B主要分布于细胞核及核周的细胞质。锌指蛋白 297B能与 Myocardin蛋白结合,荧光素酶活性检测显示锌指蛋白 297B的表达受 Myocardin的调控。结论 锌指蛋白 297B可能在平滑肌细胞分化过程中起到重要正向调控作用,这一作用很可能是通过锌指蛋白 297B与 Myocardin的协同作用来完成。

[中图分类号] Q291

[文献标识码] A

ZNF297B Regulates Differentiation of Smooth Muscle Cells Through Interaction with Myocardin

SUN Xuan^{1,2}, and LU Guang-Xiu¹

(1. Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University and National Engineering and Research Center of Human Stem Cell, Changsha 410078, China; 2. Cardiovascular Center, Department of Internal Medicine, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI 48109 USA)

[KEY WORDS] ZNF297B; Myocardin; Smooth Muscle Cells; Differentiation

[ABSTRACT] **Aim** To discover the expression of ZNF297B in the differentiation of smooth muscle cells and investigate the related mechanism. **Methods** The mRNA expression level of ZNF297B in human, rat and mouse smooth muscle cells and the change of ZNF297B expression level in smooth muscle cell differentiation and proliferation was tested by real-time PCR. The ZNF297B-Myc/H is plasmid was constructed and transfected into rat smooth muscle cells to test the distribution of ZNF297B in cultured cells. The binding and interaction of ZNF297B and Myocardin was tested by luciferase assay and confirmed by co-immunoprecipitation. **Results** ZNF297B was specifically highly expressed in smooth muscle cells. The expression level of ZNF297B was upregulated in the process of RA induced smooth muscle cell differentiation from mouse embryonic stem cells. ZNF297B expression was downregulated in PDGFBB stimulated smooth muscle cell proliferation process. In balloon-injured rat carotid arteries, ZNF297B was upregulated after 6 hours and then downregulated. ZNF297B mainly expressed in nucleus and the cytoplasm around nucleus. ZNF297B can bind and interact with Myocardin in protein level. **Conclusion** ZNF297B may play an important role in smooth muscle cell differentiation.

This function may be related to the interaction between ZNF297B and Myocardin.

Myocardin是血清反应因子的协同因子,在整个胚胎发育过程中和成体中只在平滑肌和心肌细胞系中表达^[1,2]。Myocardin属于核蛋白的 SAP(SAF-A/B, Acinus, PIAS)结构域家族,能调节染色体重构和转录的各个方面。Myocardin通过与血清反应

因子形成三聚体,激活 CaTG box依赖的平滑肌和心肌基因的启动子,是平滑肌分化过程中非常重要的调节因子^[3,4]。不表达 Myocardin的小鼠胚胎在鼠胚 10.5 天时因为完全缺乏血管平滑肌细胞而死亡;野生型 Myocardin的过表达可以造成十分严重的胚胎形态异常及胚胎死亡。Myocardin是平滑肌发育过程中调节平滑肌分化的充分必要因素^[5]。在前期的实验中,我们利用 Dr. Jiandie Lin 实验室的转录因子开放阅读框集合(transcription factor ORF collection, TFORC)荧光素酶活性报告系统来筛

[收稿日期] 2009-11-01 [修回日期] 2010-02-10

[基金项目] 863 项目(No. 2006AA02A102), 973 项目(No. 2007CB947901)

[作者简介] 孙璇,博士研究生,主要从事干细胞工程学及细胞分子生物学的研究,Email为 alhasun97184@hotmail.com。通讯作者卢光琇,教授,博士研究生导师,主要从事生殖遗传及干细胞研究,Email为 luguixia@yaho.com.cn。

选能被 Myocardin 影响的转录因子, 希望以此发现新的调节平滑肌分化的重要转录因子。转录因子开放阅读框集合系统涵盖了人类基因组中 48% 的预测的转录因子和协同因子, 包含了所有转录调节因子的各大主要种类在基因组的代表^[6]。这一荧光素酶活性筛选系统被证明在筛选另一转录因子 PGC-1 α 时很有效^[7]。我们通过筛选发现 Myocardin 对多种类型的转录因子或协同因子有调节作用, 如与基本转录相关的 TAF1B 等, 核受体 RXRA 等, 锌指蛋白 297B, 锌指蛋白 414 等, 染色体重构相关的 FOXO3A 等。本实验中, 我们首次报道 ZNF297B 可能在平滑肌分化过程中起到重要作用。

1 材料方法

1.1 细胞、动物与试剂

AD293 小鼠胚胎干 (ES) 细胞 CMT1-1 细胞株, 人平滑肌细胞, 大鼠平滑肌细胞为 Millipore 公司产品。250 g 左右成年 SD 大鼠: Charles River, 10-12 周雄性 C57BL/6J 小鼠: Jackson Lab。Q SYBR Green Supernix, β -巯基乙醇, 明胶, 二甲亚砜 (DMSO), 全反式维甲酸 (RA), 氨苄霉素, 小鼠抗 Flag M2 Affinity gel 小鼠抗 Flag 小鼠抗 c-Myc 兔抗 c-Myc Sigma PDGFBB R&D; DMEM/F12 DMEM, FBS 青链霉素, L-谷氨酰胺, 非必需氨基酸, OPTIMEM, 0.05% 胰酶/EDTA: Gibco DAPI PIERCE; DH5 α , Taq DNA 聚合酶, First-Strand cDNA 合成试剂盒, Topo-TA 克隆试剂盒, Lipofectamine 2000 invitrogen 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒: QIAgen 限制性内切酶, Quick Ligation Kit New England Biolabs RNA 提取试剂盒: ZYMO Research 化学发光检测系统: Amersham Biosciences 双向荧光素酶报告检测系统: Promega 蛋白印迹所用试剂: Bio-Rad 羊抗小鼠 IgG HRP, 羊抗兔 IgG HRP Santa Cruz 羊抗小鼠 IgG alexa fluor 594 (red): Molecular Probe

pcDNA3.1, pcDNA3.1/mycHis TK-renilla, UAS-luciferase, ZNF297B-GaDBD: Invitrogen, pcDNA3.1/mMyocardin-Flag Addgene

1.2 仪器与设备

2F Fogarty balloon catheter Baxter International Deerfield 实时定量 PCR 仪: BIO-RAD; 荧光显微镜: Olympus DNA 测序: University of Michigan DNA Sequencing Core

1.3 球囊损伤大鼠动物模型

大鼠腹腔注射 80 mg/kg ketamine 和 5 mg/kg

xylazine 麻醉后, 颈动脉用 2 F Fogarty balloon catheter 损伤, 具体方法参照文献 [8]。以正常大鼠颈动脉为对照, 取球囊损伤术后 6 h, 1 天, 3 天, 7 天和 14 天的大鼠颈动脉提取 RNA。

1.4 细胞培养

AD293 细胞在高糖 DMEM, 10% FBS 和 1 \times 青霉素和链霉素中培养。转染前去掉青链霉素。mESC 的培养和向平滑肌细胞诱导的方法同文献 [9]。mES 细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度种在铺有 0.1% 明胶的 6 孔板中, 分化培养基 (DM) 为 DMEM/F12, 10% FBS, 1 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸和 1 \times 青霉素和链霉素。每天避光换液, 在换液前新鲜加入 10^{-5} mol/L (RA) 或 DMSO (为 RA 溶剂, 作为对照)。培养 4 天后收集 RNA 样本。人平滑肌细胞和大鼠平滑肌细胞也用分化培养基 DM 培养, 80% 融合时传代。大鼠平滑肌细胞长至 40% ~ 50% 融合时换 0.2% 血清的培养基使细胞停止分裂 48 h, 用 30 μ g/L 血小板源性生长因子 BB (PDGFBB) 刺激增殖, PDGFBB 的溶剂作为对照。24 h 后收集 RNA 样本。

1.5 细胞转染

AD293 细胞前一天以 $1.8 \sim 2.5 \times 10^4$ 个细胞/100 μ L 每孔的密度种在 96 孔白色不透明细胞培养板中, 第二天能达到 80% ~ 90% 融合。每孔转染体系为: 在 25 μ L OPTIMEM 中稀释 DNA, 包括 TK renilla 20 ng UAS-luciferase 10 ng ZNF297B-GaDBD 20 ng pcDNA3.1 或者 myocardin-Flag 200 ng 温和混匀。在另 25 μ L OPTIMEM 中稀释 0.8 μ L Lipofectamine 2000 混匀, 室温孵育 5 min。将稀释的 DNA 和稀释的 Lipofectamine 2000 温和混匀, 室温孵育 20 min。将 50 μ L 混合液加到细胞培养孔中, 摇晃混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 4~6 h 后换液, 继续培养 36 h 后检测荧光素酶活性。用于免疫共沉淀 (co-IP) 的 AD293 细胞种于 6 孔板中, 每孔 2.7×10^5 个细胞, 每孔加 ZNF297B-MycHis 质粒 1 μ g Myocardin-Flag 质粒或 pcDNA3.1 空载体 5 μ g Lipofectamine 2000 12 μ L/孔。4~6 h 后换液, 继续培养 48 h 后提取蛋白裂解液。

1.6 核糖核酸提取及定量实时聚合酶链式反应

用 RNA 提取试剂盒提取培养的细胞总 RNA, 具体步骤参照说明书。用 Trizol 提取大鼠组织器官中的 RNA, 其中颈动脉或主动脉的血管组织为去掉外膜的动脉, 主要成分为血管平滑肌细胞。每 2 ng RNA 用 Superscript II first-strand synthesis system 逆

转录合成 20 μL cDNA 后用 qRT-PCR 扩增,每体系 15 μL,包括 0.5 μL cDNA,7.5 μL SYBR Green Supermix,6.5 μL H₂O,上下游引物各 0.25 μL。封口膜封住管口,T_m = 59℃,40个循环。所用的引物见表 1。用 18S RNA 作为内参比较每次反应的 threshold cycle 以显示 mRNA 表达量。

1.7 构建 ZNF297B-Myc/His 的质粒

设计引物,使包含基因 CDS 的首尾约 20 个碱基并加入酶切位点(表 1)。以小鼠主动脉的 cDNA 为模板进行扩增。跑胶,胶回收纯化扩增后的 PCR 产物。用 pCR4-TOPO 试剂盒将 PCR 扩增的基因片段连接到 TOPO 质粒中去。用 One Shot TOP10 细

胞电转化,LB 琼脂板上筛选氨苄霉素抗性克隆,扩增阳性菌落并进行质粒小提。具体步骤参照质粒提取试剂盒的说明书,并测定质粒浓度。EcoRV 和 XbaI 酶切鉴定是否为目的质粒,将连接正确的质粒中的插入 ZNF297B CDS 片段进行胶回收。用 Quick T4 DNA Ligase 与同样 EcoRV 和 XbaI 酶切后的 pDNA3.1-Myc/His 载体连接。连接后的质粒经转化,LB 琼脂板上氨苄霉素筛选菌落,挑菌,质粒小提,酶切证明大小正确的载体,进行 DNA 测序。测序结果正确的质粒为 ZNF297B-Myc/His 进行质粒大提。

表 1 聚合酶链式反应引物表

	Forward primer	Reverse primer
18S	GGAAGGGCACCACCAGGAGT	TGCAGCCCCGGACATCTAAG
Human ZNF297B	CAGCAGCGCCAGCAAGGACAA	ATTTCTGGAGCGGCATTACTA
Rat ZNF297B	GATGGCGAAAACGAAGAGGAGAGC	CAGAGGCCGGGTGTAGTGGA
Mouse ZNF297B	GACGGGGAGGAGGGGACCAAT	CATCGTAGGCTGCGTGAACATC
ZNF297B-cloning	AGATATCACCATTGGAGCCTGGAACGAACCTCTT (EcoRV)	CGTCTAGAGTTAGCCTCAGTTGTATTCTGC (XbaI)
Rat Myocardin	GGGCCAGCATTTTCAACAT	TCCCCATTTTCTCCCTTTAT
Mouse Myocardin	GTGGGCCAGCATTTTCAAC	TTTCCGGTATCGTCTTTCCTC
Rat SMA	ACCCTCTCCAGCCATCTTTCA	GCGTCTGGAGGAGCAATAATC
Mouse SMA	GGCATCCACGAAACCACCTAT	AGCCACCGATCCAGACAGAGTA

1.8 细胞免疫荧光染色

大鼠平滑肌细胞转染了 ZNF297B-Myc/His 后 48 h 4% 多聚甲醛固定,进行免疫细胞化学染色,检测 Myc 的表达情况。0.1% Triton-X-100 破膜,用 4% 的山羊血清封闭 1 h 加稀释一抗(小鼠抗 c-Myc 1:200),4℃ 过夜,PBS 洗 4 遍,Alexa Fluor 594 标记的羊抗小鼠的二抗(1:200 稀释),避光室温孵育 1 h,PBS 洗 4 遍,DAPI(1:10 000)染核 10 min,荧光显微镜下观察细胞染色情况并照相记录。

1.9 荧光素酶活性测定

实验步骤按照双向荧光素酶报告检测系统的说明进行,96 孔白色不透明板中的细胞用 40 μL 的阳性裂解液裂解 15 min 后,用 Wallac 1420 workstation 测定仪测定荧光素酶活性。Renilla 的表达作为内参平衡孔间差异。加 Myocardin-Flag 和 ZNF297B-GaDBD 质粒的孔与加入 pDNA3.1 空载体和 ZNF297B-GaDBD 质粒的孔的数值相比较得到的倍数,即为 Myocardin 对 ZNF297B 的调控倍数。

1.10 蛋白质印迹

转染 48 h 后的 AD293 细胞用预冷的 PBS 洗一

次,每孔加入 100 μL 蛋白裂解液。冰上孵育 30 min 后 4℃ 离心取上清,为蛋白样板。每 30 μL 蛋白样板中加入 10 μL 4×上样缓冲液,95℃ 10 min,冰上冷却,在 Page 胶中 100V 电泳 1.5 h 100V 转膜 2 h 5% 牛奶室温封闭 1 h。一抗 4 度孵育过夜。一抗在 5% 牛奶中稀释,稀释比例为:小鼠抗 Flag 1:10 000,小鼠抗 c-Myc 1:1000,兔抗 c-Myc 1:1 000。1×TBST 洗 3 次×10 min。羊抗小鼠 IgG HRP 或羊抗兔 IgG HRP 二抗室温孵育 1 h。二抗的稀释比例均为 1:3 000。1×TBST 洗 3 次×每次 10 min,加发学发光底物,暗室中发光,压片,洗片。

1.11 免疫共沉淀

6 孔板中的 AD293 细胞转染 2 天后,吸去培养基,每孔加 1 mL PBS,用细胞刮子将细胞刮下来,转移到 eppendorf 管中,离心 3 kr/min,2 min,去掉上清,轻柔地将细胞沉淀在 300 μL IP 裂解液中重悬。IP 裂解液为 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.8),137 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1% Triton-X-100,0.2% Sarkosyl,10% 甘油,Protease Inhibitor Cocktail tablets。冰上静置 10 min。在 -80℃ 和 -42℃ 冻融

3次, 4℃离心取上清蛋白样本。吸出适量体积的带 Flag抗体的 Beads Gel 在 500 μ L PBS 中洗两次, 1 \times IP 裂解液中洗一次。每个反应体系用 7 μ L Beads Gel 在 100 μ L IP 裂解液中重悬。取 250 μ L 蛋白样本加入到重悬的 Beads Gel 中 (剩下的蛋白样本作为 input 检测免疫共沉淀前的蛋白表达), 在 4℃旋转过夜。400 μ L IP 洗涤液洗 3 次 \times 10 min, IP 洗涤液为 20 mmol/L Tris (pH = 8.0), 0.2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Tween 20, 10% 甘油。洗完最后一次后, 用镊子夹瘪 Tip 头, 以充分吸去残留的上清。最后加 30 μ L 1 \times SDS 做 Western。用兔抗 c-Myc 检测免疫共沉淀后的蛋白, 用小鼠抗 c-Myc 检测 input 的蛋白。

1.2 统计学分析

定量实时 PCR 实验均独立重复 3 次, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析, Bonferroni's Multiple Comparison Test 两两比较 mES 细胞诱导分化, 用 t 检验来确定大鼠球囊损伤和大鼠各组织器官中 ZNF297B 等基因表达差异的 P 值, 大鼠平滑肌细胞在 PDGFBB 刺激下增殖过程中基因表达差异的 P 值, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 锌指蛋白 297B 在血管平滑肌中高表达

以大鼠各个组织器官的 cDNA 为模板检测 ZNF297B 在大鼠的组织分布 (表 2), 发现在心、肝、脾、肺、肾、睾丸、子宫和膀胱等各种组织器官中, ZNF297B 在血管平滑肌中表达最高, 与其他各组均有显著差异。同时, 用人平滑肌细胞的 cDNA 作为模板做定量实时 PCR, 发现 ZNF297B 在人平滑肌细胞中高表达, 只需约 21.99 \pm 0.28 个循环即可到达平台期; 用小鼠主动脉平滑肌的 cDNA 作为模板发现 ZNF297B 在小鼠主动脉中也高表达, 16.05 \pm 0.12 个循环即可到达平台期。

2.2 锌指蛋白 297B 在平滑肌分化过程中表达上调, 在平滑肌增殖过程中表达下调

定量实时聚合酶链式反应检测结果表明, 在大鼠的颈动脉球囊损伤动物模型中, 发现大鼠的颈动脉内膜损伤 1 天后, ZNF297B 表达下调, 3 天后下调更为明显 (与对照组比较, $P < 0.05$), 至 14 天时 ZNF297B 的表达量回到未损伤的对照组水平。这一变化方式与 Myocardin 和 SMA 表达水平一致 (表 3)。在 mES 细胞向平滑肌细胞 RA 体外诱导分化的细胞模型中, 发现与 DMSO 溶剂对照组和未分化

mES 细胞比较, RA 诱导 4 天后的分化细胞 ZNF297B 的表达水平明显上调, 与 Myocardin 和 SMA 水平上调一致 (表 4)。用血小板源性生长因子 BB (PDGFBB) 刺激大鼠平滑肌细胞增殖 24 h 后的 SMA, MHC 等平滑肌分化标记表达下调, 同时 ZNF297B 表达也明显下调 (表 5)。

表 2 锌指蛋白 297B 在大鼠各组织器官中的表达分布

部 位	锌指蛋白 297B
肝	283.39 \pm 64.39
肾	296.09 \pm 49.86
脑	525.38 \pm 76.23
肺	402.11 \pm 36.89
血管平滑肌 ^a	2378.56 \pm 838.63
心脏	288.56 \pm 81.08
骨骼肌	186.04 \pm 23.08
小肠	517.01 \pm 60.57
肾	733.07 \pm 75.67
睾丸	406.28 \pm 20.38
子宫	250.39 \pm 102.86
膀胱	237.53 \pm 29.86

a 为 $P < 0.05$ 与其他各组比较。

表 3 Myocardin, SMA 和 ZNF297B 在大鼠球囊损伤术后不同时间颈动脉中的表达

分 组	Myocardin	SMA	ZNF297B
对照组	1.00 \pm 0.34	1.00 \pm 0.30	1.00 \pm 0.27
1 d	0.32 \pm 0.20 ^a	0.30 \pm 0.23 ^a	0.58 \pm 0.10
3 d	0.12 \pm 0.06 ^a	0.09 \pm 0.04 ^a	0.35 \pm 0.11 ^a
14 d	1.05 \pm 0.62	0.59 \pm 0.26	0.81 \pm 0.31

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

表 4 Myocardin, SMA 和 ZNF297B 在小鼠胚胎干细胞中的表达

指 标	mESC	DMSO	RA
Myocardin	2.80 \pm 0.60	2.59 \pm 0.97	17.96 \pm 5.13 ^{ab}
SMA	68.14 \pm 22.08	366.41 \pm 88.97	2585.39 \pm 550.91 ^{ab}
ZNF297B	46.86 \pm 6.37	49.37 \pm 11.73	109.73 \pm 11.24 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与未分化 mESC 组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 DMSO 处理 4 天组比较。

表 5 Myocardin, SMA 和 ZNF297B 在血小板源性生长因子 B 链的纯合二聚体刺激下的大鼠平滑肌细胞中的表达变化

指 标	溶剂对照	PDGFBB
Myocardin	2.26 \pm 0.99	0.95 \pm 0.17
SMA	460.87 \pm 58.59	111.51 \pm 11.55 ^a
ZNF297B	316.72 \pm 96.79	109.68 \pm 27.12 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与溶剂对照组比较。

2.3 锌指蛋白 297B 在细胞中的表达主要分布与核内及核周的细胞质

从小鼠基因组 DNA 中克隆出 ZNF297B 的 CDS 片段,长 1404 bp 插入到 pcDNA3.1-Myc/His 空载体中,构建了 ZNF297B-Myc/His 表达质粒。将 ZNF297B-Myc 质粒转染到大鼠平滑肌细胞中使其过表达,用免疫荧光检测 Myc 的表达分布,发现该蛋白在细胞核及细胞质中均有表达(图 1),但主要集中在细胞核及核周围的区域。

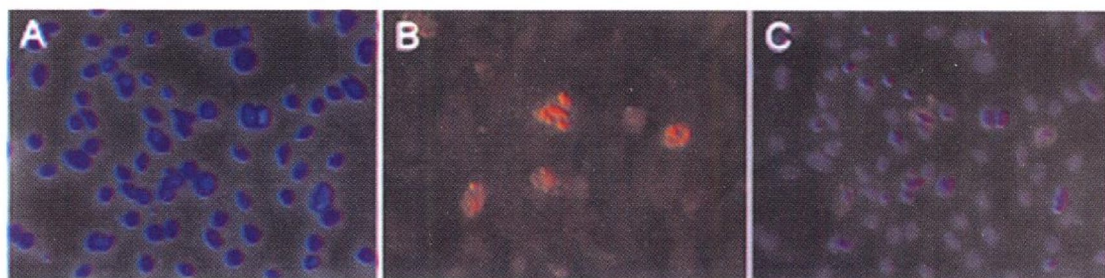


图 1. 免疫荧光检测锌指蛋白 297B 在大鼠平滑肌细胞中的分布($\times 200$)

A 为 DAPI 染色, B 为 ZNF297B-Myc 的表达, C 为 A 和 B 重叠的图像。

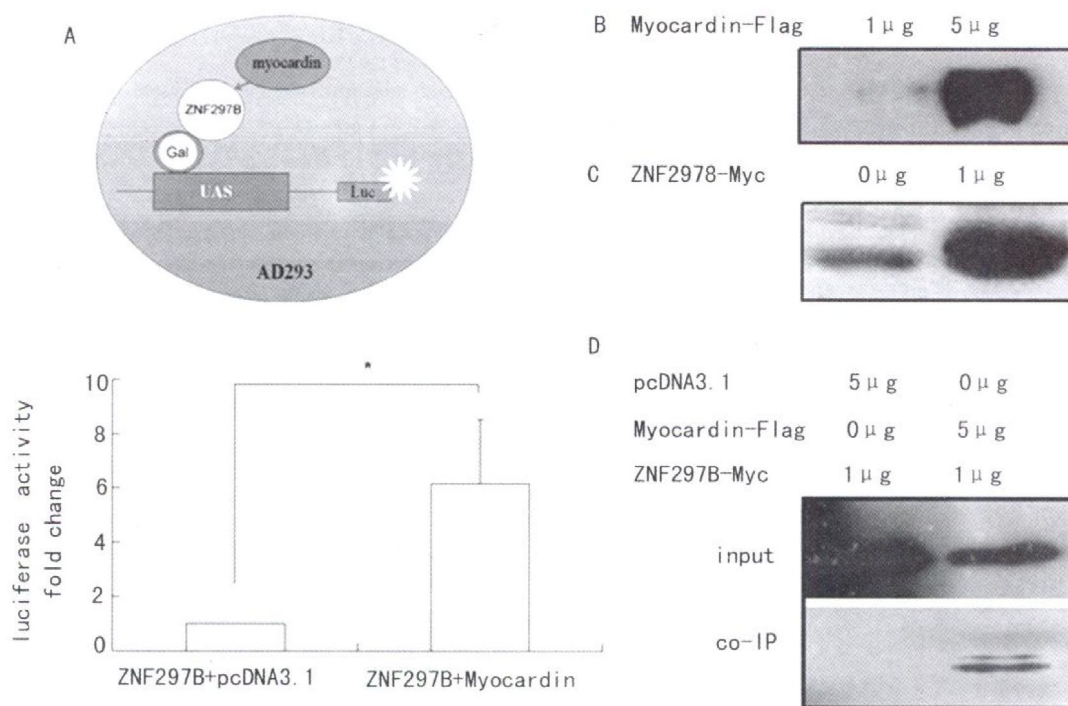


图 2. 锌指蛋白 297B 能与 Myocardin 结合并相互作用。

A 为荧光素酶检测的策略图示及 Myocardin 影响下 ZNF297B-GalDBD 介导的荧光素酶活性倍数变化。B 为 Western 检测 Myocardin-Flag 质粒在 AD293 细胞中呈剂量依赖表达。C 为 Western 检测构建的 ZNF297B-Myc/His 质粒能在 AD293 细胞表达。左侧未转染 ZNF297B 的条带为非特异性条带。D 为 co-IP 结果显示 Myocardin 能与 ZNF297B 结合。

将 Myocardin-Flag 质粒转染到 AD293 也能检测到其蛋白表达,且呈剂量依赖性,5 μ g/孔的量较 1 μ g/孔表达明显增强。片段大小约为 110 kDa(如图 2B)。同时将 ZNF297B-Myc/His 转染入 AD293

2.4 Myocardin 能与锌指蛋白 297B 蛋白结合,并影响其表达

利用 GaDBD-UAS 发光系统,用 ZNF297B 与 GaDBD 载体的融合质粒 (Gal-ZNF297B) 转染 AD293 细胞,以 pcDNA3.1 空载体的影响为对照,Myocardin-Flag 质粒的同时转染能使荧光素酶活性增强 6.17 ± 2.37 倍(图 2A),说明 Myocardin 能影响 ZNF297B 的构象,从而使荧光素酶表达增强。

细胞中,能检测到该质粒的蛋白表达。片段大小约为 57 kDa(如图 2C)。将 ZNF297B-Myc 和 Myocardin-Flag 或 pcDNA3.1 空载体在 AD293 细胞中共转染,用带 beads 的 Flag 抗体将蛋白沉淀下来,用 Myc

抗体检测附着在 beads 上的蛋白, 结果如图 2D 显示, 与转染 ZNF297B-Myc 和 pcDNA3.1 的组比较, Myocardin-Flag 能与 ZNF297B-Myc 表达蛋白结合并使之沉淀下来。这一结果说明 Myocardin 蛋白能与 ZNF297B 蛋白在 AD293 细胞内结合。ZNF297B 可能通过这种结合影响 Myocardin 的功能, 并进而影响平滑肌细胞的分化。

3 讨论

ZNF297B (锌指蛋白 297B) 又叫 ZBTB43 (zinc finger and BTB domain containing 43), 在小鼠中有两种基因亚型, 其中亚型 b 比亚型 a 少一个 92 bp 的外显子。本文中所指的 ZNF297B 均为较小的亚型 b。ZNF297B 基因全长为 4998bp, 其中 CDS 编码区域有 1404bp, 编码的蛋白分子量约为 52.7 kDa。分析 ZNF297B 的氨基酸序列发现, 其 N-terminal 有 BTB/POZ domain, C-terminal 为 C2N2 锌指结构, 为典型的转录因子结构。我们将 ZNF297B-Myc/His 表达质粒转入大鼠平滑肌细胞中, 检测其在细胞中的分布, 发现 ZNF297B 主要分布在细胞核和核周的细胞质区域。说明其很可能参与核内的 DNA 转录。到目前, ZNF297B 只有一篇文献报道过其可能与调节 RNA polymerase III 的转录因子复合物 TFIIIB α / β 相关^[10]。本文首次报道 ZNF297B 在平滑肌分化中的作用。

研究中我们发现, 在大鼠的各种组织器官中, ZNF297B 在血管平滑肌中特异性高表达, 在人, 小鼠的血管平滑肌细胞中的表达量也非常高, 提示 ZNF297B 可能特异的在血管平滑肌的生理病理过程中起到重要作用。在体外实验显示, ZNF297B 在 mES 细胞向平滑肌细胞分化的过程中上调, 在 PDGF-BB 刺激下大鼠平滑肌细胞增殖过程中表达下调, 与 Myocardin, SMA 等提示平滑肌分化的基因的变化一致。体内试验显示, 在大鼠颈动脉球囊损伤术后 1 天后 ZNF297B 表达下降, 与平滑肌分化基因 SMA

和 Myocardin 的表达变化相一致, 也与静脉内膜损伤后内膜的平滑肌启动去分化, 增殖形成新内膜的病理变化机制相符。荧光素酶实验显示 Myocardin 能调节 ZNF297B 的表达, 免疫共沉淀进一步确定 ZNF297B 能与 Myocardin 蛋白相互结合。Myocardin 为平滑肌的分化中的关键调节因子, 由此提示 ZNF297B 也很可能通过与 Myocardin 协同作用, 调节平滑肌细胞的分化。ZNF297B 在平滑肌分化过程中表达明显上调, 在平滑肌增殖过程中表达明显下调, 且与 Myocardin 蛋白能特异结合, 很可能为 Myocardin 的重要调节因子, 在调节平滑肌细胞分化的过程中起到重要作用。

[参考文献]

- [1] Du KL, Ip HS, 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): 2425-437.
- [2] Wang D, Chang PS, Wang Z, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor [J]. *Cell* 2001; **105** (7): 851-862.
- [3] Yoshida T, Sinha S, Dandekar F, et al. Myocardin is a key regulator of Ca^{2+} -dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes [J]. *Circ Res* 2003; **92** (8): 856-864.
- [4] Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, et al. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; **100** (12): 7129-134.
- [5] Li S, Wang DZ, Wang Z, et al. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; **100** (16): 9366-370.
- [6] Walhout AJ, Temple GE, Brasch MA, et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFs [J]. *Methods Enzymol* 2000; **328**: 575-592.
- [7] Li S, Lin C, Li N, et al. Genome-wide coactivation analysis of PGC-1 α identifies BAF60a as a regulator of hepatic lipid metabolism [J]. *Cell Metab* 2008; **8** (2): 105-117.
- [8] Mori T, Durand J, Chen Y, et al. Effects of short-term estrogen treatment on the neointimal response to balloon injury of rat carotid artery [J]. *Am J Cardiol* 2000; **85** (10): 1276-279.
- [9] Xie CQ, Huang H, Wei S, et al. A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev* 2009; **18** (5): 741-748.
- [10] Schoenen F, Wirth B. The zinc finger protein ZNF297B interacts with BDP1, a subunit of TFIIIB [J]. *Biol Chem*, 2006; **387** (3): 277-284.

(此文编辑 李小玲)