

·学科进展·

肌形成及其基因调控的研究进展

邹仲敏 程天民 罗成基 粟永萍 高京生

(第三军医大学全军复合伤研究所,重庆 400038)

[摘要] 论述了肌形成过程中,不同的成肌相关基因在不同时序上的表达涨落构成了一个复杂的调控网络,在这个网络中 bHLH 家族成员、MEF2、MRF、pax3、p21 和粘附分子等起重要作用。

[关键词] 肌形成,肌形成调节因子,myoD,粘附分子

随着对成肌过程基因调控的研究进展,已经在骨骼肌卫星细胞、成纤维细胞和几种成肌细胞株上较成功地进行了向肌细胞的转化,这给肌萎缩和肌损伤等疾病的临床治疗带来了希望,弄清肌分化分子机制将促进这一希望早日成为现实。

1 成肌细胞和肌分化的基本过程

在胚胎发育过程中,从肌节迁移而来的增殖性成肌祖细胞发生融合,在四肢和躯干形成不同肌群的有丝分裂后肌管。一般可以把肌分化分为4个阶段(图1):首先,成肌细胞定向到分化途径,以表达 myogenin(MYG)为标志,此时细胞仍能从头合成DNA,即有增殖能力;然后,细胞不可逆地退出细胞周期,以表达 p21^(WAF/CIP)为标志,此时已不能合成DNA;进而,成肌细胞发生表型分化出现肌特异性标志,如肌球蛋白重链(MHC);最后,分化的肌细胞发生融合,形成多核肌管。在胚胎发育时期和体外培养中,伴随肌形成的一个重要现象是成肌细胞的凋亡。

研究表明,成肌细胞存在异质性。成肌调控因子 MyoD^{-/-}鼠的组织分离培养中多见 Myf5⁺,且多伴有细胞骨架 desmin⁺,这与 MyoD⁺细胞在培养时相似。Myf5⁺ MyoD⁻表型可能代表了成肌干细胞群^[1]。正常时参与骨骼肌损伤修复的成肌细胞就是卫星细胞。卫星细胞的增殖能力与年龄相关。比较3周-11月鼠的单肌丝培养细胞,发现原位卫星细胞先增殖及表达增殖细胞核抗原(PCNA)、MyoD,24h后退出 PCNA⁺/MyoD⁺状态变为 MYG⁺。成纤维细

胞生长因子2(FGF2)使可增殖的卫星细胞数增加。大量老年鼠的卫星细胞不进入 MyoD-MYG 表达程序,增殖卫星细胞数量的峰值滞后,能够增加首轮卫星细胞增殖的肝细胞生长因子(HGF)也不能改变这种滞后^[2]。去除或加入血清后部分成肌细胞进入分化程序或发生逆转,而 MyoD 的表达变化形成上述逆转的重要事件。

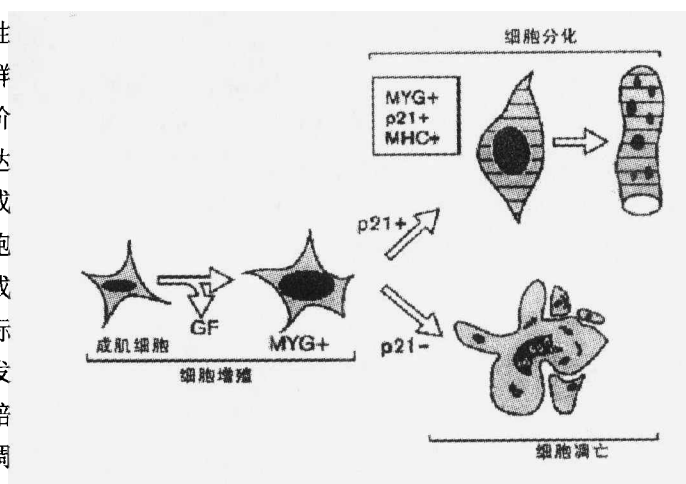


图1 成肌细胞分化过程模式图

1.1 成肌表型分化

一般认为,成肌分化终末细胞的标志物有收缩蛋白(MHC、MLC)、细胞骨架(Desmin)和肌特异酶类(MCK)等。细胞分化时,蛋白酶体和 m-calpain(钙依赖的半胱氨酸蛋白酶)表达增加,而两者的抑制剂则抑制肌管形成。微管蛋白 β -tubulin 在分化过程中无变化,随后有降低。MCK 基因含有 P53 结合位点,MyoD 氨基或羧基端与 p53 结合,促进 MCK 转录。

本文于2000年1月4日收到。

中间丝蛋白 Desmin 在培养的成肌细胞和体内的成肌祖细胞中特异表达。Desmin 基因表达受到 5' 端肌特异增强子的影响。该增强子可分为成肌细胞特异的和肌管特异的激活区段,前者含有 Sp1、Krox 和 Mb 位点,后者含有 MyoD 和 MEF2 位点,新发现的 Mt 位点 (GGTATTT) 位于 MyoD 和 MEF2 位点之间^[3]。

以往研究表明, Laminin (Laminin-1; $\alpha_1\beta_1\gamma_1$) 促进成肌细胞增殖、分化、融合和形成肌管。Merosin (Laminin-2 和 -4; $\alpha_2\beta_1/\beta_1\gamma_1$) 是存在于骨骼肌基底膜中的主要异型 Laminin。该基因缺陷可引起先天性肌营养不良。Engvall^[4] 小组发现肌分化时, Merosin 表达上调, 而 Laminin 表达则降低。在加入外源 Laminin 或 Merosin 时, 那些因 Laminin 或 Merosin 缺陷而不能融合的成肌细胞重又具有融合能力。那些可以融合, 但形成不稳定肌管的细胞只表达 Laminin; 加入外源 Merosin 后, 可使肌管稳定化。Merosin 促进肌管稳定化可能是通过抗凋亡途径实现的。人和小鼠整合素 $\alpha_7\beta_1$ 的表达和定位异常发生在 Merosin 缺陷者, dystrophin (一种细胞骨架蛋白, 连接肌动蛋白和细胞外基质) 和 sarcoglycan (一种 dystrophin 相关蛋白) 缺陷者则无。转染 Merosin α_2 链可使整合素 $\alpha_7\beta_1$ 正常化; 转染 bcl-2 能促进肌管的存活, 不能使整合素 $\alpha_7\beta_1$ 正常化; 阻断整合素 β_1 可诱导肌管凋亡。这些结果表明, 骨骼肌表达的整合素 $\alpha_7\beta_1$ 实际上是 Merosin 的受体, 其精确表达和定位依赖于 Merosin, 并可能是参与 Merosin 抑制凋亡的分子。

1.2 肌分化过程中的细胞凋亡

早期诸多实验发现胚胎肌祖细胞有“时序性解体”, 此即程序性细胞死亡或凋亡, 其生理意义在于调控增殖性成肌祖细胞的寿命来实现控制肌群规模。体外培养证实大部分细胞在肌分化时都通过凋亡而减少, 而终末分化形成的肌管是抗凋亡的。只有少数成肌细胞表达抗凋亡基因 Bcl-2, 一些 Bcl-2⁺ 细胞表达有早期肌形成的标志物, 包括 desmin、MyoD、Myf5。肌形成的晚期细胞不表达 Bcl-2。Bcl-2 裸基因鼠的成肌细胞形成肌集落的能力降低 1 倍。p21 表达和有丝分裂后状态的建立可以细胞抗凋亡, MYG 表达则无此作用。转入 p21 基因可以使成肌细胞获得抗凋亡能力, 很可能 p21 的表达与否决定了成肌细胞是继续分化还是进入程序性死亡。p21 和 p57^(KIP2) 双缺失的小鼠不能形成肌管, 成肌细胞的增殖和凋亡增加^[5]。

2 几种重要的肌决定因子 (MDFs)

2.1 成肌特异的 bHLH 转录因子

(1) Myo D

肌特异的 bHLH 转录因子是鸟和哺乳动物肌分化的关键因子, 包括有 MyoD、Myf5、MYG 和 MRF4。MyoD 相关蛋白在其 bHLH 区段的序列和总体发育表达谱均高度保守, 提示这些因子在功能水平上也保守。在早期 MyoD 和 Myf5 建立成肌细胞, 接下来 MYG 介导成肌细胞的终末分化。MYG 缺陷引起成肌细胞分化障碍, 严重的而不是全部的肌组织缺陷。MRF4 表达较晚, 可能与 MYG 作用阶段相同, 其基因缺失只引起轻微的肌表型变化。Myf5 缺失时 MYG 可以代偿, 当再有一个 bHLH 成员缺失时 MYG 则不足以代偿。bHLH 引发和促进肌形成是通过它的两个保守的氨基酸残基—碱性区段内的丙氨酸和苏氨酸, 很可能丙氨酸和苏氨酸通过改构成一个相容的构型而有利于 bHLH 吸引其它所需的协因子^[6]。

由于转染 MyoD 可以启动肌分化过程, 所以 MyoD 一直被当作最重要的成肌转录因子。MyoD 和 Myf5 具有特异的和不同的细胞周期依赖的调控方式: 在 G1 期 MyoD 表达高, 细胞进入分化, 在 G0 期 Myf5 表达高, 细胞不能分化。Zhang 等^[7] 证实来自于脊椎动物、果蝇和线虫的 MyoD 和 MyoE 功能相似。转染 PCNA 和 MyoD 促使卫星细胞进入细胞周期, 提示 MyoD 与卫星细胞成肌有关。MyoD^{-/-} 鼠成肌缺陷, 也说明 MyoD 与成年鼠的肌形成有关。MyoD^{-/-} 卫星细胞在培养时只有少数转为 MGY⁺ 细胞, 而野生型则退出增殖相进入 MGY⁺ 状态^[1]。

MyoD 可使非成肌细胞转化为肌细胞。Lattanzi 等^[8] 用 MyoD 转染小鼠皮肤, 骨髓、肌肉来源的成纤维细胞后, 细胞的 60%—90% 发生肌分化。MyoD 转化的细胞移植后, 参与再生肌肉, 且与卫星细胞来源的肌纤维形态学上完全一致。在免疫全能的 syn 基因鼠中, MyoD 转化的成纤维细胞同样参与肌再生, 在 3 周内并未见移植部位有炎性浸润。

MyoD 介导紧密染色质中的靶基因的转录与其内部此前未知有转录激活作用的两个区域有关, Myf5 中保留有这些区域, 而 MYG 中则无。这些现象也许能解释为什么 MyoD 和 Myf5 在介导肌形成的早期事件较 MYG 更有效。MyoD 碱性区段对于募集其他如 p300CBP 等共刺激因子加入并激活复合物中是必要的。P300 可以激活 MyoD 和 MEF2。肌 LIM 蛋白 (MLP) 增加 MyoD 的活性, 通过它的第一个 LIM

构型与生肌的 bHLH 转录因子相互作用^[9]。逐个突变七个脯氨酸位点,发现只有 MyoD 第 200 位丝氨酸向丙氨酸的突变取消了 MyoD 的磷酸化。该突变型 MyoD 比野生型 MyoD 激活 E 盒(CANNTG)的作用大 3 倍,明显促进生肌过程^[10]。

(2) Myf

Myf5 是在胚胎肌发育时肌祖细胞中最早被诱导表达的因子,其缺失所引起的肌形成障碍可被随后表达的 MyoD 代偿,反之,MyoD 缺失在大体上也不影响肌分化,说明两者功能重叠。当两者都缺失则成肌细胞和分化的骨骼肌细胞都不出现。位于 Myf5 基因启动子上游 50kb 以上的和 50kb 处的调控元件,分别调控 Myf5 在肢体肌肉和在体节中的表达。不同的增强子或位点控制区调节 Myf5 在不同的胚胎肌形成区的正确时空表达^[10]。比较牛、小鼠、鸡的 Myf5 基因 5' 侧翼区发现在靠近转录起始点处有 3 个进化保守区:TATA 盒、8 碱基组成的 OLS、6-bp 的富含 C 区。牛和禽的肌和非肌组织中有特异识别 OLS 的核因子。外源 Myf 5' 侧翼序列控制下的报告基因在成肌细胞中的表达比在成纤维细胞中高 12 倍,TATA 盒和 OLS 对于这两种细胞的基因表达都很重要^[10]。

(3) 肌形成调节因子(MRF)

MRF4 促进成肌分化的能力与 MYG 相似。转染 MYG 启动子控制下的 MRF4 基因的 MYG^{-/-}小鼠,其成肌分化可部分恢复,说明外源 MRF4 表达可以部分代偿 MYG4 缺失的后果。MRF4 缺失时,MYG 表达升高。MRF4 和 MYG 基因双突变鼠的表现与 MYG 基因单独突变的表现一致,提示这两个基因都非肌分化所必需。MRF4/MyoD 双突变所致的严重肌缺陷与 MYG 突变相似,而 MRF4 或 MyoD 单一突变对肌形成没多少影响。虽然在 MRF4/MyoD 双突时有 MYG 表达,但 MYG 本身不足以支持正常的肌分化。肌特异转录因子也参与调控 MRF4 表达。MYG 和 MEF2 结合于近启动子元件以激活 MRF4 表达。在发育过程中,该元件只有限地调控 MRF4 表达,而一个 8.5 kb 启动子调控 MRF4 在胎儿的表达形式及部分调控 MRF4 在早期肌节中的表达。MRF 转入非肌细胞后,或引起非肌细胞向肌细胞转化或不能表达肌表型。NIH3T3 细胞转染 MRF 后从细胞周期退出,进行生物化学意义上的分化,但是终末分化的肌细胞完全不能融合形成多肌管,原因不明。NIH3T3 转变而来的成肌细胞不足以产生依赖肌特异的差别拼接形成整合素 B1D 和 MEF2D1b2,提示

肌管的形成至少部分依赖于差别拼接^[11]。

2.2 其他重要的成肌特异因子

(1) 成肌增强因子(MEF)

脊椎动物有 4 个 MEF2 基因,属于“MADS 盒”转录因子。它们产生的蛋白均含有高度保守的 MADS 和近 MEF2 区。MEF2 蛋白形成同源或异源二聚体,结合于肌特异基因控制区内富含 A-T 的 DNA 共同序列(CTATAAATAG)。已证实 MEF2 蛋白 N 末端的蛋氨酸决定了它与 DNA 结合时的取向。另外 MEF2 具有蛋白-蛋白相互作用,如与结合于 E 盒共同序列的 bHLH/E12 结合,并可能作为辅助因子控制转录。MyoD/MEF2 复合物不足以获得转录激活能力,可能还需要其他辅助因子。MYG 的时空表达依赖于靠近启动子区 MEF2 结合位点和 E 盒。MEF2 在平滑肌、心肌和神经系统的发育中也有重要作用。MEF2C 表达于血管内皮、平滑肌和周围间质。MEF2C 敲除导致与血管内皮生长因子(VEGF)缺失相似的血管缺陷。内皮细胞可以增殖分化,但不能组织成血管丛,而平滑肌不能分化^[12]。

(2) Pax3

对盒同源转化域(paired-box homeodomain)转录因子 pax3 表达于胚胎的背侧神经管、轴旁中胚层和体节,在体节中表达限于生皮肌节,包括那些将来游走并形成肢体肌的细胞。Slotch/myf5 双突变的小鼠肌节中无 MyoD 表达,除了头部肌肉外的所有肌肉都缺失,所以 pax3 是调节 MyoD 在除头之外的肌祖细胞中的表达的必需的上游调节物,当然,也不能排除 Myf5 也作用在 MyoD 上游。用逆转录病毒载体使 pax3 在鸡胚中表达,发现 Pax3 可以诱导 MyoD 在前体节中胚层游出细胞中的表达,并维持 Myf5 的表达,连在正常状态下从不表达 MyoD 的中胚层侧板和神经管细胞,也出现 MyoD。从体节上除去外胚层引起 Pax-3 表达下调,初始 MyoD 表达上调,终末分化阶段有短时终末分化加强,继而成肌祖细胞分化中断^[10]。Pax3 对 MyoD 有激活作用之外,它还有显著的抑制凋亡作用^[13]。用 BMP-4 模拟外胚层的作用可上调 Pax-3 的表达,导致体节中肌生长过度。同时还发现 BMP-4 拮抗物 noggin 的表达也被上调,以限制 BMP-4 的作用,促进肌分化。上述结果显示 pax 是 MyoD 上游的调节物,目前尚不知 pax3 如何精确激活 MyoD 在躯体肌中的表达,以及 Pax3 是否也调控 Myf5 基因。

3 肌决定因子(MDFs)的调控物

为防止成肌细胞早熟分化和异位成肌,机体需

要对前述的诸多肌决定因子(MDF)的正性成肌作用进行调节。肽生长因子,如 TGF、BMPs、FGFs 通过阻断成肌因子的表达和转录活性而抑制肌形成。Myostatin 是自分泌的 TGF 相关因子,近来也被证实对肌形成有抑制作用。许多核因子也有此作用。

3.1 胰岛素样生长因子及其结合蛋白(IGF/IGFBP)

IGF-1 在分化的肌管中表达,引起 MYG、MCK、 β -enolase 和 IGFBP-5 的表达,还可见激活 MEF2C、核重组、肌动蛋白聚集、整合素 β 1D 表达增加。IGF 可以促进培养的骨骼肌细胞的增殖和分化,该作用受 IGFBP-4、-5 和 -6 调节。IGFBP-4 抑制 IGF-1 和 IGF-2 刺激的增殖和分化。IGFBP-5 抑制 IGF-1 引起的早期增殖反应;刺激 IGF-1 引起的成肌反应。当 IGF-BP-5 与 IGF-1 含量为 2:1 时,这种双向作用前最明显。当 IGF-2 存在时,IGFBP-5 对细胞的增殖和分化均是抑制效应。IGFBP-4 主要是隔离过剩的 IGFs 而抑制了所有事件^[14]。IGFBP-3 通过与 IGF 结合降低其活性或直接与细胞作用而不依赖于 IGF,从而影响多种细胞的增殖和分化。外源 IGF-1 可使猪胚的成肌细胞内 IGFBP-3 mRNA 和分泌水平明显降低,MYG mRNA 提高。

3.2 Notch

跨膜受体 notch 与其配体的结合参与决定淋巴细胞、神经细胞和成肌细胞的命运。Notch 表达阻止 MEF2C 与 DNA 的结合及其与 MyoD 和 MYG 协同激活肌形成的能力。对 Notch 的反应需要 MEF2C 中一个紧靠其 DNA 结合区段的 12 个氨基酸位点。在该型的 MEF2 中其与 DNA 结合区段的序列是特异的,该部位与 Notch 的膜结合重复序列直接作用。一般认为,Notch 信号传导通过激活 DNA 结合蛋白 Su(H)/CBF1 调节下游基因的表达。Nofziger 等发现缺失 CBF1 作用序列的 Notch 仍可以抑制肌细胞的分化,而不需要激活 CBF1,也不拮抗 MyoD 的作用。Notch 所致的对 MyoD 的拮抗作用需要 CBF1,提示 CBF1 途径介导的是一种细胞类型特异的对成肌过程的阻断。可见在肌形成过程中,两个不同的 Notch 信号途径在不同的阶段阻断分化^[15]。

3.3 孤核受体

孤核受体 COUP-TF 与共抑制子 N-CoR、SMRT 和 RIPB 作用,通过主动抑制和反式抑制使转录沉寂。COUP-TFII 的表达抑制成肌细胞的形态学分化,抑制 MyoD、p21 表达。TFII DNA 结合区段/C 区和铰链/D 区直接与 MyoD N 末端激活区结合,抑制

MyoD 介导的反式转录。作为 MyoD 介导的转录的共激活子,p300 能减轻 TFII 的抑制作用。TFII 与 p300 的受体结合区段的 N 末端 149 个氨基酸相互作用,竞争 MyoD 与 p300 的结合。TFII 调节 MyoD 活性/功能、孤核受体与肌 bHLH 蛋白间的作用而影响分化^[16]。配体激活的孤核受体要与 N-CoR/SMRT 形成复合物,以抑制转录。成肌分化时,N-CoR mRNA 降低。外源 NCoR 抑制成肌分化和成肌特异的 bHLH 的表达,刺激 p21 表达;抑制 MyoD 诱导的成肌转化。外源性孤核受体负显性 ROR α 1E 的表达抑制内源 ROR α 1、MyoD、MYG、p21 表达,肌管的大小和发育受损。

3.4 其他参与调控成肌因子的蛋白

DNA 结合抑制物(Id)HLH 蛋白缺乏与 DNA 结合区段,它可以对其他 bHLH 因子进行隔离,4 种 Id 与 bHLH 转因子的不同作用可能代表各异的生物功能。小鼠的 bHLH 蛋白 twist 通过阻断 DNA 结合,中和 E 蛋白(又称泛在的 bHLH 蛋白),干预 MyoD 和 MEF2 的转录而抑制 MDF 的作用。Id1 和 Id3 对培养肌细胞的肌形成有负调控作用,Id2 抑制成肌细胞分化。Id4 不影响肌分化时特异基因的表达,以及 MCK 增强子 E 盒的 DNA 结合能力和 MCK 增强子的转录^[17]。bHLH 家族成员 Mist1 在成肌细胞中表达,当肌细胞分化成肌管时,mist1 表达降低。Mist1 表达于成肌干细胞,当成肌细胞分化为肌细胞时其表达降低。Mist1 引起的分化抑制与下列因素有关:形成无活性的 MyoD-Mist1 复合物;Mist1 同源二聚体占据了 E 盒位点;Mist 拥有一个能够抑制异聚体激活物的抑制区段^[18]。MyoR(myogenic repressor)表达于未分化成肌细胞,在分化时则表达下调。MyoR 与 E 蛋白结合,但在与 E 盒结合后其作用却与 MyoD 相反。

I-mfa 表达于生骨节(sclerotome),在体外可抑制 MyoD 家族成员的反式激活作用。I-mfa 与 MyoD 结合,使其滞留在胞浆中。I-mfa 还能干预 MDF 与 DNA 的结合。锌指/E 盒结合蛋白(IEB)结合于肌特异基因的 E 盒的一个亚类,抑制转录,直到高浓度的成肌 bHLH 因子取而代之,这种调控肌特异基因时序表达的机制是依赖于 ZEB 和成肌 bHLH 蛋白的相对浓度,以及它们对各种 E 盒的结合能力^[19]。

分化诱导剂维甲酸(RA)只引起表达 MyoD 肌细胞的生长停止和分化,瞬时转染研究发现 MyoD 和 RA 受体(RAR)间有相互作用。在肌细胞内特异的 MyoD DNA 结合位点处聚集的复合中含有 RXR-My-

oD。在体外 RAR 与肌 bHLH 存在物理性结合,肌 bHLH 的碱性区与 RAR 的 DNA 结合区段相结合^[20]。外源负显性突变(dn)RAR 或 RXR 使 RA 诱导的生长停滞和分化推迟,dnRXR 的作用更强。dnRXR 表达抑制 MyoD 的表达,而 dnRAR 则无此作用。

病毒蛋白 E2F 家族成员有促细胞增殖作用。以下证据说明 E2F 转录因子作用在调控肌细胞分化和增殖的结点处:(1)MyoD 依赖的 MCK 增强子的转录与 E2F 转录活性负相关;(2)高反应性的突变 pRb 对 E2F 活性有抑制,可以逆转 cyclin 和 cdk 引起的成肌转录抑制;(3)过表达的 E2F1 抑制 MyoD 依赖的转录;(4)pRb 缺失或减少可使肌细胞分化不完全^[9]。

4 细胞周期调控

处于细胞周期内的成肌细胞不可逆地从细胞周期中退出是肌分化程序得以继续进行的先决条件,几种主要细胞周期调节物在成肌分化中的变化归纳如表 1^[21]。

表 1 几种主要细胞周期调节物在成肌分化中的变化

细胞周期调节基因	
上调	Cyclin D3, P130, P18, P21
无变化	Cyclin E, Cdk 4, Cdk 6, E2F, Rb, P16
下调	Cyclin A, Cyclin D1, Cyclin D2, Cdc, Cdk 2, P19, P107

4.1 P21

在成肌分化过程中,细胞周期抑制物 P21 的特征性变化是表达增强,即使在血清刺激条件下,仍然维持其高表达,而其他的细胞周期调节物则发生逆转。MHC⁺的细胞均表达 p21 提示不可逆地退出周期与 p21 不可逆地表达有关。p21 表达可能在 MYG 之后,因为没有观察到 MYG-p21⁺的细胞表型。p21 与肌特异转录因子之间存在着正反馈,MyoD 以非 p53 依赖方式激活 p21 表达。在肌管而不是成肌细胞中可以共沉淀得到 p21 与 cdk2 和 cdk4 复合物,故在分化中 p21 的诱导与 cdk2、cdk 4、cdk 6 活性下降明显相关。成人骨骼肌中高表达的 p57KIP2、体外肌形成时被中度上调的 p27 和被明显诱导表达的 p18 均可能是类似 p21 的细胞周期调节因子。p57 和 p21 都缺失的小鼠不能形成肌管^[22]。G1 期 cdk 抑制物 p27^{KIP1}的表达可加强 MyoD 引起的肌分化。P27 是成肌细胞退出周期并开始分化的始动因素。p27 降低后,p18、p21、p57 维持分化的肌细胞处于有丝分裂后状态^[23]。

4.2 pRb

在周期内的细胞,其 pRb 上称作“口袋”的特殊区段被 cdk 磷酸化,阻断 pRb 与多种有促细胞增殖作用的细胞蛋白或病毒蛋白(如 E2F 家族成员)的相互作用,从而阻断 pRb 抑制生长的作用。细胞在 G0 期停滞和高表达晚期肌分化标志都需要 pRb。pRb 可能作用在 cdk 复合物下游,调节肌形成中的增殖、分化、凋亡等。Rb^{-/-}者的成肌缺陷与转录因子 MEF2 活性无效有关,因为此时 MyoD 可以诱导 MEF2 在核内聚积,MEF2 有结合 DNA 的能力,但不能激活转录。当有 pRb 时,MyoD 使 MEF2 发挥作用,可见,pRb 与 MyoD 协同促进 MEF2 的转录激活作用^[24]。

4.3 Cyclin-cdk

在分化开始时,MyoD 激活 Rb、P21 和 cyclin D3 基因。在分化后的肌细胞中,cyclinD3 稳定化,并且几乎全部与未磷酸化的 pRb 形成复合物,cdk4 与 PCNA 被隔离在由 pRb 和 cyclin D3 组成的复合物中。腺病毒 E1A 可抑制 cyclin D3 上调和稳定化,这与 E1A 促进 pRb 磷酸化的作用有关;相反,cyclin D3 在分化肌管中的高表达抵消 E1A 介导的 DNA 合成的激活。可见 cyclin D3 的表达与分化中的成肌细胞不可逆地退出细胞周期有关^[25]。从增殖的成肌细胞中沉淀的 cdk1-cyclinB,或 cdk1 和 cdk2 可以有效地在体外使 MyoD 磷酸化。丝裂原作用后引起的 MyoD 和 cdk4 相互作用干扰了 MyoD 与 DNA 结合、肌特异基因的表达和向成肌转化,这一作用受 CyclinD1 调节。cyclinD1 在肌管中表达引起 cdk4 由胞浆向核的转运,从而调节 MyoD 和 cdk4 的相互作用^[26]。cyclin D1 的过表达可以抑制 MyoD 依赖的 MHC 增强子的激活,而共转染 p21 和 p16 可以逆转这种转录抑制。每一 cyclin D 均可能抑制 MyoD 依赖的转录,以 cyclin D1 为最强。

5 结 语

综上所述,涉及成肌细胞分化的调节因子及其信号传导分子极多。可以相信,随着成肌分化调控机制的面纱被揭开,开发可用于临床治疗肌病的药物将更具特异性。另一方面,非成肌细胞转化而来的肌细胞也将成为一种新的生物材料。

参 考 文 献

- [1] Yablonka Reuveni Z, Rudnicki M A et al. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking My-

- oD. *Dev Biol.*, 1999, **210**(2):440.
- [2] Yablonka Reuveni Z, Seger R et al. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem.*, 1999, **47**(1):23.
- [3] Gao J, Li Z, Paulin D. A novel site, Mt, in the human desmin enhancer is necessary for maximal expression in skeletal muscle. *J Biol Chem.*, 1998, **273**(11):6402.
- [4] Kuang W, Xu H, Vachon P H et al. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models. *J Clin Invest.*, 1998, **102**(4):844.
- [5] Zhang P, Wong C, Liu D et al. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.*, 1999, **13**(2):213.
- [6] Arnold HH, Winter B. Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev.*, 1998, **8**(5):539.
- [7] Zhang J M, Chen L, Krause M et al. Evolutionary conservation of MyoD function and differential utilization of E proteins. *Dev Biol.*, 1999, **208**(2):465.
- [8] Lattanzi L, Salvatori G, Coletta M, et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J Clin Invest.*, 1998, **101**(10):2119.
- [9] Barth J L, Morris J, Ivarie R. An Oct like binding factor regulates Myf-5 expression in primary avian cells. *Exp Cell Res.*, 1998, **238**(2):430.
- [10] Kitzmann M, Vandromme M, Schaeffer V et al. cdk1 and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity. *Mol Cell Biol.*, 1999, **19**(4):3167.
- [11] Russo S, Tomatis D, Collo G et al. Myogenic conversion of NIH3T3 cells by exogenous MyoD family members: dissociation of terminal differentiation from myotube formation. *J Cell Sci.*, 1998, **111**(6):691.
- [12] Lin Q, Lu J, Yanagisawa H et al. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development*, 1998, **125**(22):4565.
- [13] Borycki A G, Li J, Jin F et al. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development*, 1999, **126**(8):1665.
- [14] Ewton D Z, Coolican S A, Mohan S et al. Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5. *J Cell Physiol.*, 1998, **177**(1):47.
- [15] Nofziger D, Miyamoto A, Lyons K M et al. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development*, 1999, **126**(8):1689.
- [16] Bailey P, Sartorelli V, Hamamori Y et al. The orphan nuclear receptor, COUP-TF II, inhibits myogenesis by post-transcriptional regulation of MyoD function: COUP-TF II directly interacts with p300 and myoD. *Nucleic-Acids Res.*, 1998, **26**(23):5501.
- [17] Melnikova I N, Bounpheng M, Schatteman G C et al. Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp Cell Res.*, 1999, **247**(1):94.
- [18] Lemerger C, To R Q, Carrasco R A, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J.*, 1998, **17**(5):1412.
- [19] Kraut N, Snider L, Chen C M et al. Requirement of the mouse I-mfa gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO J.*, 1998, **17**(21):6276.
- [20] Froeschle A, Alric S, Kitzmann M et al. Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene*, 1998, **16**(26):3369.
- [21] Walsh K, Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev.*, 1997, **7**(5):597.
- [22] Zhang P, Wong C, Liu D et al. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.*, 1999, **13**(2):213.
- [23] Zabudoff S D, Csete M, Wagner R et al. p27Kip1 is expressed transiently in developing myotomes and enhances myogenesis. *Cell Growth Differ.*, 1998, **9**(1):1.
- [24] Novitsch B G, Spicer D B, Kim P S et al. pRb is required for MEF2 dependent gene expression as well as cell cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr Biol.*, 1999, **9**(9):449.
- [25] Cenciarelli C, De Santa F, Puri P L et al. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol.*, 1999, **19**(7):5203.
- [26] Zhang J M, Wei Q, Zhao X et al. Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.*, 1999, **18**(4):926

ADVANCE IN MYOGENESIS AND ITS GENETIC REGULATION

Zou Zhongmin Cheng Tianmin Luo Chengji Su Yongping Gao Jingsheng

(*Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038*)

Abstract During the course of myogenesis, many myogenesis-associated genes differentially expressed in a time- and spacial - dependent manner, and form a complicated regulatory net. The member of bHLH family, MEF2, MRF, pax3, p21 and adhesion molecules play important roles.

Key words myogenesis, myogenic regulatory factors, myo D, adhesion molecule