

脊椎动物骨骼肌细胞发生的分子机制

Molecular mechanism of vertebrates skeletal muscle cells

王 蕾¹, 赵玉莲², 安利国¹, 袁金铎¹, 张士瑾³

(1. 山东师范大学 生命科学学院动物抗性重点实验室, 山东 济南 250014; 2. 山东师范大学 图书馆, 山东 济南 250014; 3. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q95; Q71

文献标识码: A

文章编号: 1000- 3096(2004)12- 0054- 05

自从 1987 年 Davis 等人用差减克隆 (subtraction cloning) 法证明了肌肉发生决定基因 *MyoD* 的存在以来, 随着研究的深入, 人们发现包括 *MyoD*, *Myf- 5*, *myogenin*, *MRF4* 在内的整个 *MyoD* 家族成员在肌肉发生与分化过程中起着重要的作用, 而且其作用的分子机制也日臻清晰。

MyoD 基因家族主要在骨骼肌肌肉细胞中表达, 而且作为主控基因而存在, 它们有着相似的结构特征, 即都有一个高度同源的特异性的碱性螺旋- 环- 螺旋 (basic helix- loop- helix, bHLH) 结构域。结构上的相似性暗示出其功能上的相关性, 实验证明, *MyoD* 基因家族的四个成员在功能上有重叠 (overlapped) 但绝非冗余。*MyoD* 基因与 *Myf- 5* 基因参与骨骼肌肌肉细胞的决定过程, 但两者在时间上有不同的生肌作用插入位点 (entry point): 一个由 *Myf- 5* 基因引发, 是建立早期的生肌节所必须的, 另一个以 *MyoD* 基因为标志, 形成后期的生肌节细胞, 在生肌节发育后期, 两基因又同时表达。*Myogenin* 基因与 *MRF4* 基因参与了骨骼肌肌肉细胞的终末分化过程。骨骼肌肌肉发生 (myogenesis) 是一个复杂的连续的过程, *MyoD* 基因家族以及其它的转录调节因子通过网络式的调节方式在分子水平上来决定骨骼肌肌肉细胞的发育命运。

1 *MyoD* 基因家族的作用方式

MyoD 基因家族成员以肌肉特异性基因转录激活物的形式发挥作用^[1], 它们具有 bHLH 结构域, 与肌肉特异性基因调控区常见的顺式作用元件 E- box 结合。当然, 需要提及的是, 除了 bHLH 结构域外, 转录机制的激活还需要位于 NH₂- 和 COOH- 末端的非保守性的反式激活结构域的参与^[2]。

MyoD 基因编码核 DNA 结合蛋白 (nuclear DNA- binding protein), 能够与肌肉特异性基因结合并将其激活^[3], 例如, *MyoD* 蛋白可以与鸡肌肉乙酰胆碱受体的一个亚基因相结合从而启动这个基因^[4]; *MyoD* 基因也可以自身激活, 也就是其编码的 *MyoD* 蛋白可以结合至自身的上游 DNA 上而使其处于活化状态。*MyoD* 基因对其它基因的作用可以是直接的, 也可以是间接的。

MEF2 (myocyte enhancer- binding factor 2) 家族的 4 个成员 MEF2A- D 的表达有助于肌肉特异性基因的激活^[5], 它们与 *MyoD* 基因家族成员具有正协同作用。目前在小鼠中已经证实, *myogenin* 中含有 MEF2 转录因子的结合位点, *MyoD* 家族的其它成员中尚未见相关报道。Kaushal^[6], Molkenin^[7]曾报道, MEF2A- D 与 *MyoD* 基因家族的共表达增加了非肌肉细胞转变为肌肉细胞的效率, 而且有报道说 MEF2 蛋白也可以单独诱导非肌肉细胞形成肌肉^[8], 但是至今没有人对此观点给出充分的证据。目前有两种机制来解释 MEF2 转录因子的作用模式: MEF2 通过其转录激活结构域直接与肌肉特异性基因启动子或增强子结合; MEF2 可能作为生肌作用的一种强制性辅助因子 (cofactor) 与 *MyoD*/E12 杂和二聚体发生相互作用^[7, 9]。

收稿日期: 2004- 03- 18; 修回日期: 2004- 07- 08

基金项目: 国家“863 计划”青年基金资助项目 (2002AA629190)

作者简介: 王蕾 (1979-), 女, 山东潍坊人, 山东师范大学硕士研究生, 电话: 0531- 6180143, Email: wanglejin@hotmail.com.cn; 袁金铎, 通讯作者; 张士瑾, 通讯作者

有旁证证明, MEF2 蛋白是很好的诱导生肌作用的候选辅助因子, 所以有些基因虽然没有 MDFs 结合位点, 但是仍然可以通过 MEF2 的协助而成为肌肉特异性基因, 因为 MEF2- MDF- E 蛋白复合体可以通过 bHLH 结构域与 E- box 结合, 也可以通过 MEF2 MADs box 结构域与肌肉特异性基因的启动子结合, 所以两者均可以激活肌肉特异性基因的转录^[6]。MEF2 的作用也受到多种因子的影响, 例如 Zo-A 等^[10]曾经报道 Smad 蛋白作为 MEF2 的共调节因子而起作用, 参与 TGF- β 的信号传导过程。

2 MyoD 家族成员之间的相互作用

在实验小鼠的胚胎发育过程中, *MyoD* 家族的 4 个成员在时空表达的模式上具有有序性, 4 个基因产物首先积累在头部的体节, 然后沿前后轴按体节自然发育的速度依次出现在所有的体节^[11]。

敲除 *MyoD* 基因后 *MRF4* 与 *myogenin* 基因正常表达, 但是 *Myf- 5* 基因的转录水平在不同的 *MyoD* 突变体中却有不同程度的增加, 1994 年 Braum 等证明在 *Myf- 5* 缺失的小鼠中, 是 *MyoD* 起始肌肉的分化^[12]。2003 年 Kablar 等证明 *Myf- 5* 和 *MyoD* 的活化分别独立地决定着胚胎发育过程中肌肉细胞的分化^[13]。在 *MyoD*, *Myf- 5* 基因双突变体小鼠中肌肉完全缺失, 而单独敲除其中的一个基因却没有出现明显的肌肉缺陷型, 上述这些实验都能证明, *MyoD* 和 *Myf- 5* 基因在功能上有很大的重叠性, 但已经有实验证明这种重叠是不完全的, 例如, 在缺少 *Myf- 5* 的情况下所导致的肋骨缺陷、呼吸困难致死等是不能被 *MyoD* 所补救的, 同时也能证明, *myogenin* 基因和 *MRF4* 基因至少有一个是 *MyoD*, *Myf- 5* 的下游靶基因(如图 1)。1996 年 Wang 等将 *myogenin* 基因敲入 *Myf- 5* 基因座位后, 小鼠转录表达 *myogenin* 基因, 这些转基因小鼠没有 *Myf- 5* 突变体的肋骨缺损现象, 也无生肌节发育迟缓现象^[14], 说明 *myogenin* 基因是在 *Myf- 5* 基因的下游。另外, 除了 1993 年 Hollenberg, 1994 年 Buchberger, 1995 年 Rawls 证明 *myogenin* 可能为 *MyoD*, *Myf- 5* 的下游靶基因外, 尚无其它报道可考^[19, 15, 16]。

myogenin 基因同源突变体中 *MRF4* 的表达显著减少, 而 *MyoD* 的表达水平正常, 说明 *MyoD* 的表达不依赖 *myogenin*, 而 *MRF4* 的激活是受 *myogenin* 的影响^[17]。在 *MRF4* 和 *myogenin* 双突变体中已经证实, 在

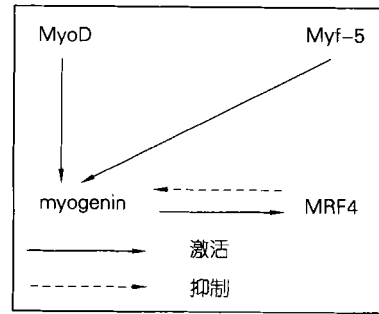


图 1 MyoD 家族成员之间的相互作用

生肌节早期阶段 *MRF4* 的表达图示与 *myogenin* 有所重叠, 但在以后的发育中 *MRF4* 的表达发生了下调, *MRF4* 的表达可以瞬时替代 *myogenin* 的缺乏, 但是这种替代并不完全。在 *MRF4* 突变体小鼠中, *myogenin* 的表达水平有所增加^[11]。综合以上的情况, 笔者认为, *MRF4* 的激活受到 *myogenin* 的影响, 一旦 *MRF4* 开始表达, 便会抑制 *myogenin* 的活性, 两者之间存在着双向的调节关系。

3 MyoD 家族成员与其它因子的相互作用

实验证明, *Id*^[18], *twist*^[19], *I- mf*^[20], FGF- 2, TGF- β , PKA, PKC, Rb(成视网膜细胞瘤)蛋白, *Cyclin/CDK* 复合物等^[21- 23]对 *MyoD* 家族成员具有负调节作用(如图 2)。

目前, 实验证明有两种机制来解释 *twist* 对肌肉发生的抑制作用: 一是 *twist* 与 E- 蛋白竞争, 与生肌决定因子形成二聚体, 从而抑制了生肌决定因子与 DNA 的高活性结合; 二是 *twist* 直接干扰 E2F/ 生肌决定因子复合体的形成, 从而抑制生肌决定因子的转录激活作用^[19]。果蝇中 *twist* 基因的作用与脊椎动物不同, 其体节肌肉的发生需要高水平的 *twist* 表达^[24]。

I- mf 可以在生肌节中高度表达, 组织生肌作用的发生, 其作用方式为: 通过修饰 *MyoD* 核定位信号使之保留在细胞质中; 干扰生肌 bHLH 的转录因子的 DNA 的结合活性。

Id 蛋白可以与生肌决定因子形成异源二聚体, 阻止它们与 DNA 结合。

目前, 虽然钙依赖的钙调磷酸酶(calcium- dependent phosphatase calcineurin) 的下游效应分子并不十分清楚, 但已经有实验证明其在肌肉发生早期起着重要的作用: 在转录水平上, 钙及其钙调磷酸酶能调节

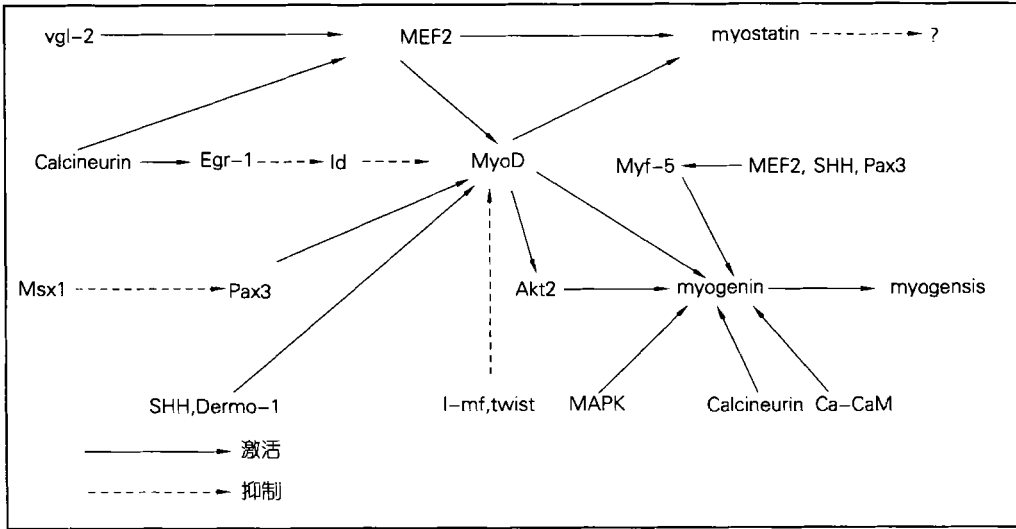


图2 *MyoD* 基因家族成员与其它因子的相互作用

myogenin 的表达, 而且能激活 *Erg-1*, 通过 *Erg-1* 对 *Id* 的抑制来解除 *Id* 对 *MyoD* 的抑制, 间接激活 *MyoD* 的表达^[25]。

Dermo-1 是一个多功能的 bHLH 转录因子, 它对基因转录和细胞凋亡具有负调节作用^[26]。 *Dermo-1* 能抑制 *MyoD* 和 *MEF2* 的活性但是机制并不相同, *Dermo-1* 的 C- 末端和 HLH 结构域对于抑制 *MyoD* 的反式激活活性是必须的, 而 *Dermo-1* 对 *MEF2* 的抑制作用要通过 C- 末端和 N- 末端来进行, 它可对 *MEF2* 直接作用但抑制其反式激活区域却是有选择性的。丝氨酸脱乙酰化作用能抑制 *Dermo-1* 介导的转录抑制作用。

Pax3 是 Paired- box 转录因子, 由 479 个氨基酸组成, 包括两个保守的 DNA 结合单元, 它以直接的方式激活 *MyoD* 基因^[27]。在鸡胚实验中, *Msx1* 在鸡胚前肢和体节当中的异位表达阻止了 *MyoD* 的表达及肌肉细胞的分化, *Pax3* 的表达则激活 *MyoD* 基因, 而 *Msx1* 和 *Pax3* 的共表达对 *MyoD* 的表达无太大影响, 由此可以得知, *Msx1* 通过与 *Pax3* 的相互作用而抑制了 *Pax3* 的活性。2003 年 Buchberger 等证明, 在某些特殊的情况下, *Pax3* 与其直向同源物 *Pax7* 同等重要^[28]。

由骨髓和底板产生的 SHH (Sonic hedgehog) 在控制体节和神经管模式及分化中起着诱导和营养信号的作用^[29]。现在已有实验证明, SHH 在肌肉发生决定基因 *MyoD* 和 *Myf-5* 的早期活化中起着重要的作用。

myostatin (肌肉生长抑制素) 基因是 *MyoD* 蛋白的一个靶基因, 也是肌肉发生过程中的一个潜在的抑制位点^[30,31]。上游序列分析表明, *myostatin* 启动子在进化过程中是保守的, 1.6 kb 的牛 *myostatin* 基因上游序列包含 10 个 E- box 模体符 (分成三簇排列) 和一个 *MEF2* 位点。E- box 在受体基因调节中起重要作用, 而且它与 *MyoD* 相结合, 由 *MyoD* 上调 *myostatin* 启动子的活性。Langley B 等^[32]实验发现, *MyoD* 与 *myostatin* 有极大的相关性: 当 *MyoD* 表达水平最高时, *myostatin* 启动子的活性较高, 在 *MyoD* 不表达的细胞中, *myostatin* 启动子的活性大大降低。

Akt2 是 Akt/ PkB 家族的成员之一, 在骨骼肌细胞的分化过程中, *Akt2* 的表达量增加, anti- *Akt2* 与 *Akt2* 的相互作用可以明显抑制肌肉的形成, 由此而证明 *Akt2* 在肌肉分化过程中起到一定的作用^[33]。 *MyoD* 在转录水平上调节 *Akt2* 的活性, 但 *Akt2* 可以反式激活 *MyoD*- *MEF2* 的活性。*Akt2* 的启动子包括 9 个 E- boxes, *MyoD* 可以与其中的 8 个位点结合。*MyoD* 的表达能明显提高 *Akt2* 激活 *MyoD*- *MEF2* 转录活性后诱导 *myogenin* 的表达。因此我们可以推测在肌肉分化过程中, *Akt2* 与 *MyoD*- *MEF2* 中可能存在 1 个正反馈的调节环, 这对 *MyoD* 诱导的肌肉生成具有重要的作用。

myogenin 基因的表达在转录水平上受到 MAPK (丝裂原激活的蛋白激酶) 信号通路、 Ca^{2+} - CaM 依赖

的蛋白激酶信号通路、钙调磷酸酶信号通路的调节, *myogenin* 启动子附近的 3 个顺式作用元件 (E-box, MEF2, MEF3) 与此 3 条途径相关, 此 3 条途径的作用是平行但并非冗余的, 任何一种信号的抑制都会降低或消除 *myogenin* 的表达及随后分化事件的发生^[34]。

很多骨骼肌特异性基因的活化都要依赖于 TEF-1 (transcription enhancer factor-1) 和 MEF2 这两种转录因子。在果蝇中已经发现 TEF-1 与辅因子 *Vestigial* 直接作用驱动翅膀的分化, 间接作用驱动翅膀肌肉的分化。在哺乳动物中, 2002 年 Maeda T 等分离了 3 个类似 *Vestigial* 的基因 *Vgl-1* (*Vestigial-like genes*), *Vgl-2* 和 *Vgl-3*, 虽然这三个基因的 TEF-1 结合结构域具有同源性, 但是 *Vgl-1* 和 *Vgl-3* 在胎盘中表达, 只有 *Vgl-2* 在胚胎发育过程中表达在分化的体节中, 而在成体中表达在骨骼肌肌肉细胞中, 而且有证据表明, 在肌肉细胞分化的过程中, *Vgl-2* mRNA 的表达水平以及 *Vgl-2* 蛋白从细胞质到细胞核的转移都有所增加, 另外, 哺乳动物的体内和体外实验都证明 *Vgl-2* 能够与 MEF2 结合。这些充分证明 *Vgl-2* 是哺乳动物肌肉分化过程中的一个重要的新元素^[35]。

4 小结

MyoD 基因家族以及其它转录因子之间的复杂的网络式的调控作用决定了骨骼肌肌肉的发生与分化, 目前这一领域已经成为发育生物学中研究细胞分化的极好的例子, 同时也为医学、动物育种学等学科领域的发展提供了理论基础。虽然肌肉发生分化过程中的很多机制正在分子水平上逐渐揭开, 但是由于此过程的复杂性和科学研究方法上的局限性, 使得整个研究仍然有众多的疑问需要解决, 目前, *MyoD* 基因家族各个成员之间的关系已经相对比较清晰, 但是本家族成员与其它转录调节因子之间的关系还有很多的空白, 这就使得我们离将骨骼肌在整个生命过程中发生、发育、分化的过程清晰地描述并且应用到实际生活中这一目标还有很长的一段距离。

参考文献:

[1] Olson E. MyoD family: a paradigm for development? [J]. *Genes Dev*, 1990, 4(9): 1454-1461.
[2] Braun T, Winter B, Bober E, et al. Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5 [J]. *Nature*, 1990, 346(6285): 663-666.

[3] Piette J, Bessereau J, Huchet M, et al. Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene [J]. *Nature*, 1990, 345(6273): 353-355.
[4] Lassar A, Buskin J, Lockshon D, et al. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer [J]. *Cell*, 1989, 58(5): 823-831.
[5] Ludolph D, Konieczny S. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program [J]. *FASEB J*, 1995, 9(15): 1595-1604.
[6] Kaushal S, Schneider J, Nadal-Ginard B, et al. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD [J]. *Science*, 1994, 266(5188): 1236-1240.
[7] Molkentin J, Black B, Martin J, et al. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins [J]. *Cell*, 1995, 83(7): 1125-1136.
[8] Kaushal S, Schneider J, Nadal-Ginard B, et al. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD [J]. *Science*, 1994, 266(5188): 1236-1240.
[9] Buchberger A, Ragge K, Arnold H. The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2 [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(25): 17289-17296.
[10] Zo-A Q, Yang C, Jeffrey L W, et al. Smad proteins function as co-modulators for MEF2 transcriptional regulatory proteins [J]. *Nucleic acids Research*, 2001, 29(3): 732-742.
[11] Ott M, Bober E, Lyons G, et al. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5 in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo [J]. *Development*, 1991, 111(4): 1097.
[12] Braun T, Bober E, Rudnicki M, et al. MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice [J]. *Development*, 1994, 120(11): 3083-3092.
[13] Kablar B, Krastel K, Tajbakhsh S, et al. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development [J]. *Dev Biol*, 2003, 258(2): 307-318.
[14] Wang Y, Jaenisch R. Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently [J]. *Development*, 1997, 124(13): 2507-2513.
[15] Hollenberg S, Cheng P, Weintraub H. Use of a conditional

- MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1993, **90**(17): 8 028- 8 032.
- [16] Rawls A, Morris J, Rudnicki M, *et al.* Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis[J]. **Dev Biol**, 1995, **172**(1): 37- 50.
- [17] Hastly P, Bradley A, Morris J, *et al.* Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene[J]. **Nature**, 1993, **364**(6437): 501- 506.
- [18] Jen Y, Weintraub H, Benezra R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins[J]. **Genes Dev**, 1992, **6**(8): 1 466- 1 479.
- [19] Hebrok M, Wertz K, Fuchtbauer E. M-twist is an inhibitor of muscle differentiation[J]. **Dev Biol**, 1994, **165**(2): 537- 544.
- [20] Chen C, Kraut N, Groudine M, *et al.* I- myf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family[J]. **Cell**, 1996, **86**(5): 731- 741.
- [21] Ludolph D, Konieczny S. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program[J]. **FASEB J**, 1995, **9**(15): 1 595- 1 604.
- [22] Olson E, Brennan T, Chakraborty T, *et al.* Molecular control of myogenesis: antagonism between growth and differentiation[J]. **Mol Cell Biochem**, 1991, **104**(1-2): 7- 13.
- [23] Olson E. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage[J]. **Dev Biol**, 1992, **154**(2): 261- 272.
- [24] Cripps R, Olson E. Twist is required for muscle template splitting during adult drosophila myogenesis[J]. **Dev Biol**, 1998, **203**(1): 106- 115.
- [25] Friday B, Mitchell P, Kegley K, *et al.* Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD[J]. **Differentiation**, 2003, **71**(3): 217- 227.
- [26] Gong X, Li L. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation[J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(14): 12 310- 12 317.
- [27] Bendall A, Ding J, Hu G, *et al.* Mx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors[J]. **Development**, 1999, **126**(22): 4 965- 4 976.
- [28] Buckingham M, Bajard L, Chang T, *et al.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb[J]. **J Anat**, 2003, **202**(1): 59- 68.
- [29] Borycki A, Brunk B, Tajbakhsh S, *et al.* Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation[J]. **Development**, 1999, **126**(18): 4053- 4063.
- [30] Spiller M, Kambadur R, Jeanplong F, *et al.* The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD[J]. **Mol Cell Biol**, 2002, **22**(20): 7 066- 7 082.
- [31] Amthor H, Huang R, McKinnell I, *et al.* The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis[J]. **Dev Biol**, 2002, **251**(2): 241- 57.
- [32] Langley B, Thomas M, Bishop A, *et al.* Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression[J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(51): 49 831- 49 840.
- [33] Kaneko S, Feldman R, Yu L, *et al.* Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter[J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(26): 23 230- 23 235.
- [34] Xu Q, Yu L, Liu L, *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase-, calcium-calmodulin-dependent protein kinase-, and calcineurin-mediated signaling pathways transcriptionally regulate myogenin expression[J]. **Mol Biol Cell**, 2002, **13**(6): 1 940- 1 952.
- [35] Maeda T, Chapman D, Stewart A. Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation[J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(50): 48 889- 48 898.

(本文编辑: 刘珊珊)