DOI:10.16016/j.1000-5404.202008213

血清反应因子经组蛋白乙酰化促进大鼠骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化

刘晶霞[1,2],梁志清[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院妇产科[1];401121 重庆,重庆市人民医院妇产科[2]

[摘要] **目的** 探讨血清反应因子(serum response factor,SRF)在大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)分化为膀胱平滑肌细胞(smooth muscle cells,SMCs)中的作用和机制。**方法** 贴壁法分离4周龄雌性SD大鼠的骨髓MSCs与膀胱SMCs,通过Transwell小室共培养诱导MSCs分化。收集MSCs,根据共培养不同时间点进行分组,通过实时荧光定量PCR和免疫荧光法检测共培养SRF MSCs中SMCs标志基因表达;通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay,ChIP)定量PCR技术检测SMCs相关基因启动子区组蛋白乙酰化修饰、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)和SRF的富集。丁酸钠(sodium butyrate,NaB)预处理MSCs后与SMCs共培养,实验分为正常共培养对照组和NaB预处理干预组,ChIP-qPCR对比两组间组蛋白修饰和SRF富集情况。**结果** 共培养MSCs中,α-SMA、Calponin和SM-MHC基因表达量增加,在这些基因启动子区H3K9^{ace},H3^{ace}和H4^{ace}富集量增加($P<0.05$),同时MSCs中HDAC1和HDAC2降低($P<0.05$)。与对照组相比,NaB干预组SRF、H3K9^{ace}和H4^{ace}富集量增加($P<0.05$)。**结论** SRF可能在HDAC1和HDAC2调节下通过结合H3K9^{ace}和H4^{ace}控制SMCs标志基因表达,从而促进MSCs向SMCs的分化。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;血清反应因子;分化;组蛋白乙酰化;丁酸钠
[中图法分类号] R322.74;R329.21;R329.26 [文献标志码] A

Serum response factor promotes differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into smooth muscle cells *via* histone acetylation

LIU Jingxia[1,2], LIANG Zhiqing[1] [1]Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, Chongqing General Hospital, Chongqing, 401121, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of serum response factor (SRF) in differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into bladder smooth muscle cells (SMCs). **Methods** Rat MSCs and SMCs were isolated respectively from the bone marrow and bladder of 4-week-old female SD rats by adherent method, and then co-cultured together in a Transwell chamber. After the MSCs were harvested at different time points, real-time PCR and immunofluorescense assay were used to detect the expression of SMCs specific marker genes in co-cultured MSCs. Furthermore, the enrichment of histone acetylation modification, histone deacetylase (HDAC) and SRF in the promoter of these genes were tested by chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) q-PCR in co-cultured MSCs. Finally, ChIP-qPCR was used to compare the histone acetylation modification and SRF enrichment in sodium butyrate (NaB) pretreatment group with control cells. **Results** The expression levels of α-SMA, Calponin and SM-MHC were increased in MSCs co-cultured with SMCs. H3K9ace, H3ace and H4ace in the promoter of these genes were enriched ($P<$

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170552)
[通信作者] 梁志清,E-mail:zhi.lzliang@gmail.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

0.05), and then, HDAC1 and HDAC2 in the induced MSCs were correspondingly decreased significantly ($P<0.05$). The enrichment of SRF in the NaB pretreatment group shared the same increasing tendency with H3K9ace and H4ace. **Conclusion** SRF may bind to H3K9ace and H4ace, through the regulation of HDAC1 and HDAC2 to control the expression of SMCs specific genes, and thus promote the differentiation from MSCs to SMCs.

[**Key words**] bone mesenchymal stem cells; serum response factor; differentiation; histone acetylation; sodium butyrate

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170552). Corresponding author: LIANG Zhiqing, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

干细胞移植是治疗膀胱功能障碍最有前途和挑战性的应用。最近,成人自体干细胞移植治疗压力性尿失禁(stress urinary incontinence,SUI),取得了一些开拓性进展[1-2]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有容易获取、免疫原性小以及不涉及伦理问题等优势,被认为是一种理想的移植种子细胞[3-4]。研究表明表观遗传调控在干细胞向平滑肌细胞(smooth muscle cells,SMCs)分化过程中发挥重要作用[5],通过对 SMCs 启动子区进行特殊的组蛋白修饰来调节 SMCs 标记基因的表达[6]。多项研究发现,胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)向 SMCs 分化过程中,SMCs 相关基因启动子区具有高水平的 H3 和 H4 残基($H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$)乙酰化[7-9]。组蛋白乙酰化是组蛋白修饰之一,受组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDACs)调控。HDACs 分为 4 个类别,其中一些与 SMCs 标记基因的表达有关[10-11]。HDAC1 和 HDAC2 是 HDAC 的Ⅰ类成员,序列存在 85%相似性,通常共同调控相关基因的表达[12-13]。此外,HDAC2 抑制 SMCs 特定基因的表达[14]。

HDAC 通过调节组蛋白特殊位点乙酰化,使致密染色质解聚,招募转录因子结合到 DNA 启动子区的特殊序列,从而调控相关基因的表达。血清反应因子(serum response factor,SRF)是 SMCs 的关键转录因子之一,与 SMCs 标志基因启动子区特殊 DNA 序列 CArG box[CC(A/T)6GG]结合激活 SMCs 基因转录[15-18]。然而,在 MSCs 向 SMCs 分化过程中,SRF 以及相关组蛋白乙酰化修饰调控机制尚未阐明。本研究在建立体外诱导 MSCs 向 SMCs 分化的基础上,从表观遗传调控角度探讨其分子机制,以期为组织工程和细胞种植治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用 30 只 4 周龄雌性清洁级 SD 大鼠,体质量 60 g,购自陆军军医大学实验动物中心,生产许可证号 SYXK(渝)20170002,使用许可证号 SYXK(渝),动物实验均遵循陆军军医大学动物伦理实验委员会制定的指导原则进行。DMEM/F12 培养基、H-DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶、胶原酶、PBS、青-链霉素双抗购自 Gibco 公司,细胞培养耗材购自 Hyclone 公司,Transwell 小室购自 Millipore 公司;抗大鼠 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、抗大鼠钙调蛋白(Caponin)和抗大鼠平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)抗体购自 Abcam 公司,FITC 标记山羊抗鼠 IgG 二抗购自 Abcam 公司;定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;ChIP 级抗大鼠 HDAC1 抗体,ChIP 级抗大鼠 HDAC2 抗体,ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H3K9($H3K9^{ace}$)抗体,ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H4($H4^{ace}$)抗体和 ChIP 级抗大鼠 IgG 抗体购自 Abcam 公司,ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H3($H3^{ace}$)抗体购自 Millipore 公司,ChIP 级抗大鼠 SRF 抗体购自 Santa Cruz 公司,ChIP 试剂盒购自 Millipore 公司,丁酸钠(sodium butyrate,NaB)购自 Sigma 公司。

1.2 骨髓间充质干细胞分离培养

取 1~2 只 SD 大鼠断颈法处死后,无菌分离大鼠股骨和胫骨,用 10 mL 注射器冲洗骨髓腔两次。将冲洗液离心后获得的细胞沉淀采用 DMEM/F12 培养基(含 10 %FBS)重悬。细胞悬液在 37 ℃,5 % CO_2 饱和湿度培养箱中培养。细胞密度达到 80%~90%时,进行传代。本研究中所使用的是第 3 代或第 4 代细胞。

1.3 膀胱平滑肌细胞分离培养

从上述 SD 大鼠中无菌分离膀胱,去除浆膜层和黏膜层,通过胶原酶Ⅰ和Ⅱ(1∶1)消化后,收集游离细胞。将获得的细胞在含 10%FBS 的 H-DMEM 培养基中重悬,于 37 ℃,5 % CO_2 饱和湿度培养箱中培养。细胞密度达到 80%~90 %时进行传代。本研究中第 3 代或第 4 代细胞用于与 MSCs 共培养。

1.4 骨髓间充质干细胞与膀胱平滑肌细胞共培养

将 MSCs 与 SMCs 在 Transwell 小室中共培养。胰

蛋白酶消化 SMCs 后,以 1×10^4 个/mL 密度接种于 Transwell 的外室中。胰蛋白酶消化 MSCs 后,同样也以 1×10^4 个/mL 密度接种于 Transwell 的内室中。在 0、24、48 和 72 h 收获共培养的 MSCs 细胞,用于 RT-PCR 测定 SMCs 标志基因表达;在 0、36 和 72 h 收集共培养 MSCs,用于 ChIP-qPCR 检测组蛋白乙酰化修饰、HDAC 和 SRF 在 SMCs 标志基因启动子区的富集。分离的 MSCs 用 1.0 mmol/L NaB 预处理 48 h 后,再与 SMCs 在 Transwell 小室中共培养 72 h,胰蛋白酶消化收集 MSCs 细胞,实验分为对照组和 NaB 干预组,ChIP-qPCR 方法检测组蛋白修饰和 SRF 富集量。

1.5 免疫荧光检测

MSCs、SMCs 和共培养 72 h 的 MSCs,以 5×10^3 个/mL 密度接种在培养板中,用 4% 多聚甲醛固定 10 min。采用抗大鼠 α-SMA、抗大鼠 Calponin 和抗大鼠 SM-MHC 的一抗,在 4 ℃孵育 12 h。然后采用 FITC 偶联 IgG 二抗孵育 30 min。最后采用 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 进行 5 min 的细胞核染色,进行激光共聚焦显微镜分析。

1.6 实时定量聚合酶链反应(qPCR)

在 0、24、48、72 h 收获共培养的 1×10^6 个 MSCs,预冷 PBS 洗涤。提取总 RNA 后,基于 TaKaRa 反转录试剂盒进行反转录。使用 PrimeScript 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒处理后,通过实时定量扩增系统(MxPro-MX30000P)进行实时 PCR。通过将定量的 cDNA 转录物标准化为 β-肌动蛋白(β-actin)来计算基因相对表达水平。引物序列参见表 1。退火温度为 60 ℃。每个值代表至少 3 次独立实验的平均值。

表 1 引物序列列表(qPCR)

序号	基因名称	引物序列
1	α-SMA	5′-GGGCATCCACGAAACCACCTAT-3′(正向)
		5′-CGCCGATCCAGACAGAATATTTG-3′(反向)
2	Calponin	5′-CCCACAATCACCACCCACACAAC-3′(正向)
		5′-CCTCGGCCTGATCTCCCCAAACT-3′(反向)
3	SM-MHC	5′-GAGGAGGCGGTGCAGGAGTGTAG-3′(正向)
		5′-GGCGCTGGTGTCCTGCTCCTT-3′(反向)
4	β-actin	5′-TGGTGGGAATGGGTCAGAAG-3′(正向)
		5′-ACGCACGATTTCCCTCTCAG-3′(反向)

1.7 染色质免疫沉淀法 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

在 0、36 和 72 h 收集 1×10^7 个共培养 MSCs 以及正常共培养对照组和 NaB 预处理干预组 MSCs,在室温下用 1% 多聚甲醛固定 10 min。通过超声处理,将交联的 DNA 剪切至 200~500 bp 的长度。将 ChIP 级抗大鼠 HDAC1 抗体 (1 μg)、ChIP 级抗大鼠 HDAC2 抗体(1 μg)、ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H3K9 抗体(5 μg)、ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H3 抗体(5 μg),ChIP 级抗大鼠乙酰基组蛋白 H4 抗体(5 μg)和 ChIP 级抗大鼠 SRF 抗体(10 μg)与每种免疫沉淀在 4 ℃磁珠中孵育过夜,并将正常大鼠 ChIP 级抗大鼠 IgG 抗体(5 μg)用作阴性对照。在反向交联之后,纯化 DNA,使用 qPCR 进行定量测定。引物序列参见表 2。退火温度为 60 ℃。每个值代表至少 3 个独立实验的平均值。

表 2 引物序列列表(ChIP-qPCR)

序号	基因名称	引物序列
1	α-SMA	5′-CCGCAGTTACAGTGATTC-3′(正向)
		5′-GCTAAGGGCTTGAGATGA-3′(反向)
2	Calponin	5′-CAGTCAGCTCCCAATACAA-3′(正向)
		5′-TTCCAAGCCTGTCCCATT-3′(反向)
3	SM-MHC	5′-CAGATCCGTACAGGGCTAA-3′(正向)
		5′-TGCCTGGGACCAATAAC-3′(反向)

1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5.0 分析数据,数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

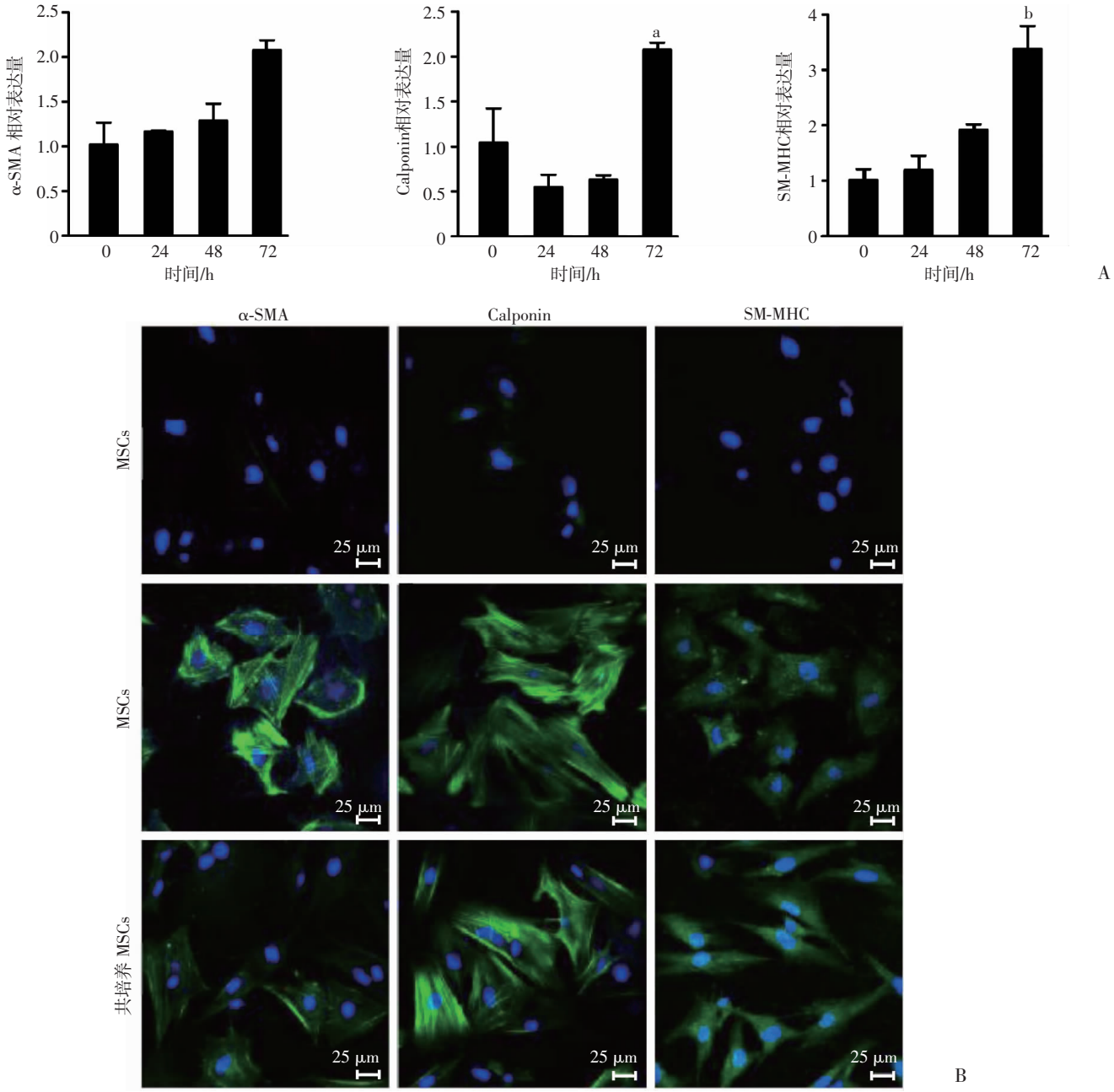
2 结果

2.1 共培养体系诱导骨髓间充质干细胞分化为膀胱平滑肌细胞

为了建立诱导 MSCs 分化为 SMCs 的可行和有效的方法,我们采用 Transwell 小室,将 MSCs 与 SMCs 共培养 72 h,并采用 RT-PCR 检测不同时间点诱导的 MSCs 中 SMCs 标志基因的表达,结果在共培养的 MSCs 中 α-SMA,Calponin($P<0.05$)和 SM-MHC($P<0.01$)表达量显著增加(图 1A);使用免疫荧光技术检测上述细胞中 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 蛋白表达,结果这些蛋白在共培养的 MSCs 中表达增强(图 1B)。

2.2 MSCs 共培养后不同时间点 SMCs 标志基因组蛋白乙酰化修饰

为了测试是否有组蛋白乙酰化修饰参与了 MSCs 向 SMCs 的分化,使用 ChIP-qPCR 检测 MSCs 中 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 启动子区的 $H3K9^{ace}$,$H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 富集情况。图 2 显示,在共培养 72 h 时,MSCs 的 SMCs 标志基因启动子区的 $H3K9^{ace}$、$H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 富集量显著增加($P<0.05$),具有统计学意义。



A:RT-PCR 测量不同时间点共培养 MSCs 的 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 基因表达量($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 0 h 比较 B:免疫荧光分析 MSCs,SMCs 和共培养 MSCs 中 α-SMA、Calponin 和 SM-MHC 蛋白表达

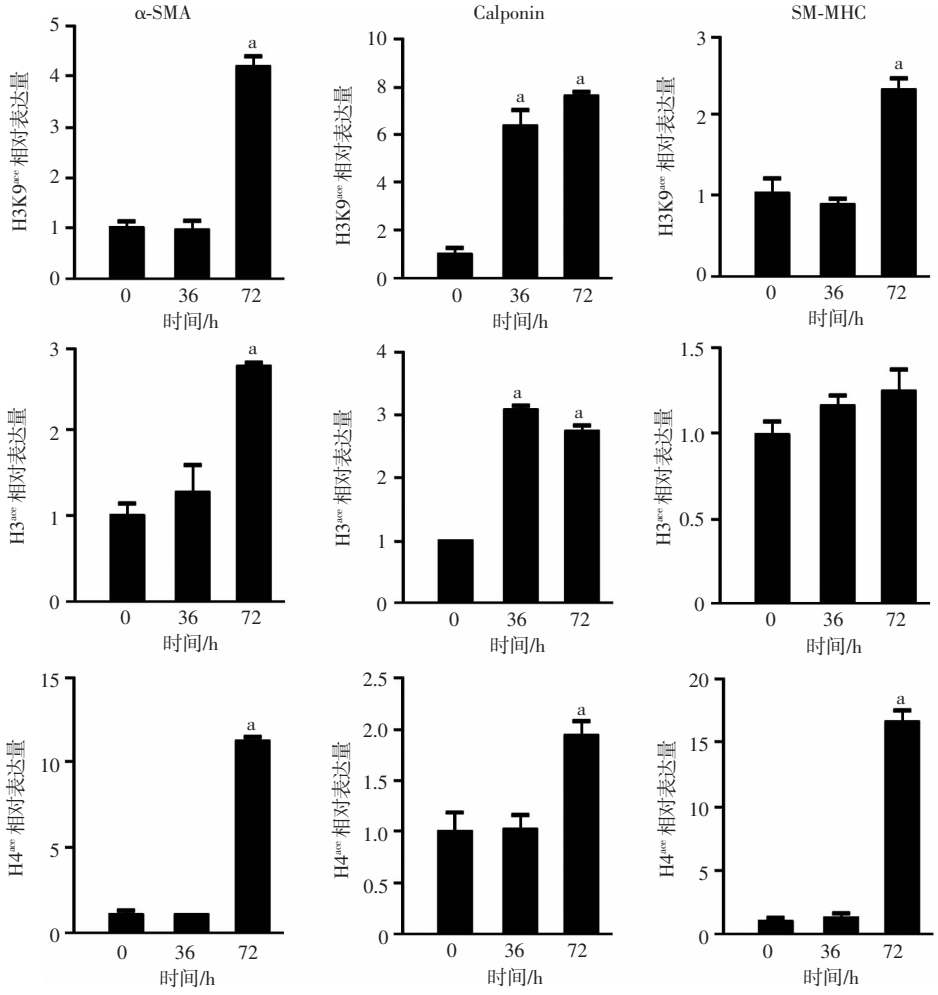
图 1 共培养 MSCs 中 α-SMA 标志基因的表达

2.3 HDAC1 和 HDAC2 参与 MSCs 向 SMCs 分化的过程

为了进一步证明组蛋白乙酰化对 SMCs 基因表达的影响,我们采用 ChIP-qPCR 检测不同时间点诱导的 MSCs 中 HDAC1 和 HDAC2 的富集。结果表明,诱导的 MSCs 中 HDAC1 和 HDAC2 在 SMCs 标志基因启动子区的富集量显著降低,有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$,图 3)。

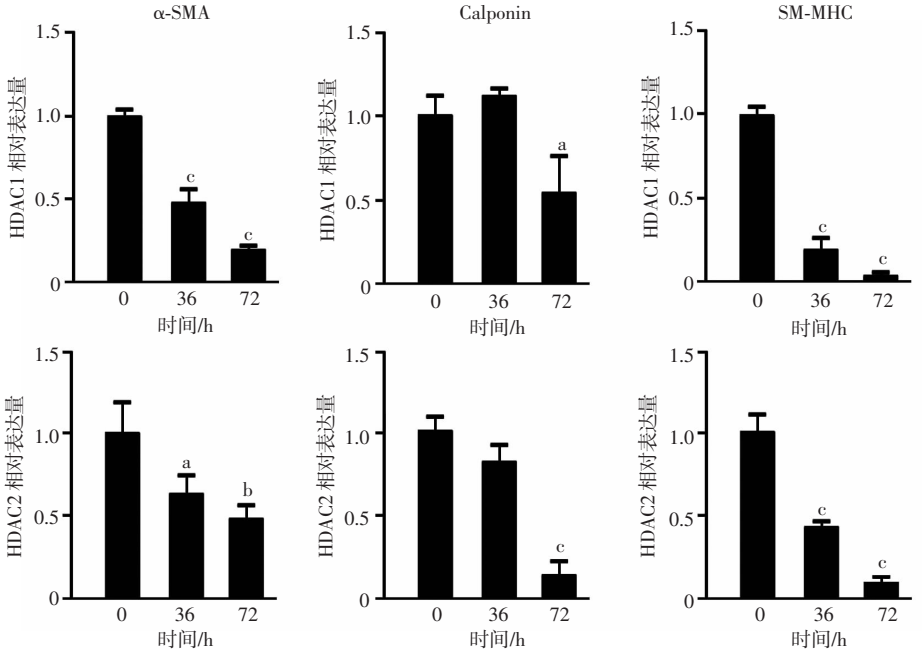
2.4 SRF 促进 MSCs 向 SMCs 分化

为了测定 MSCs 向 SMCs 分化是否受 SRF 调控,我们测定共培养后 MSCs 的 SMCs 标志基因启动子区 SRF 的富集情况,图 4 显示随着共培养时间的延长,SRF 在 α-SMA 和 SMC-MHC 基因中富集量显著增加($P<0.05$)。



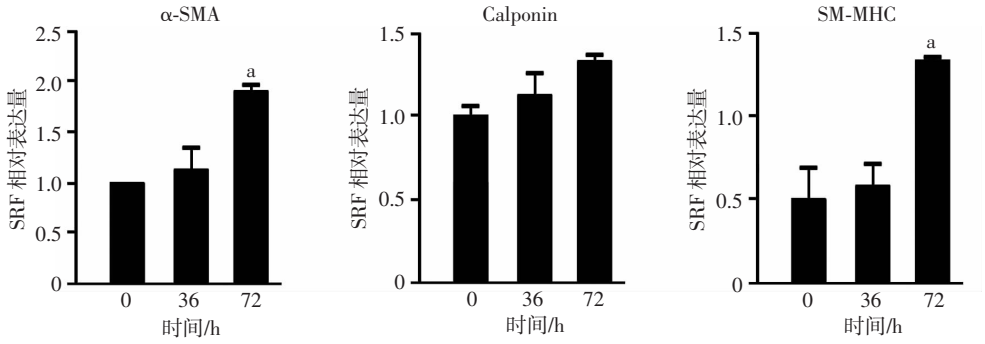
a:$P<0.05$,与 0 h 比较

图 2 ChIP-qPCR 分析共培养 MSCs 中组蛋白乙酰化修饰 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



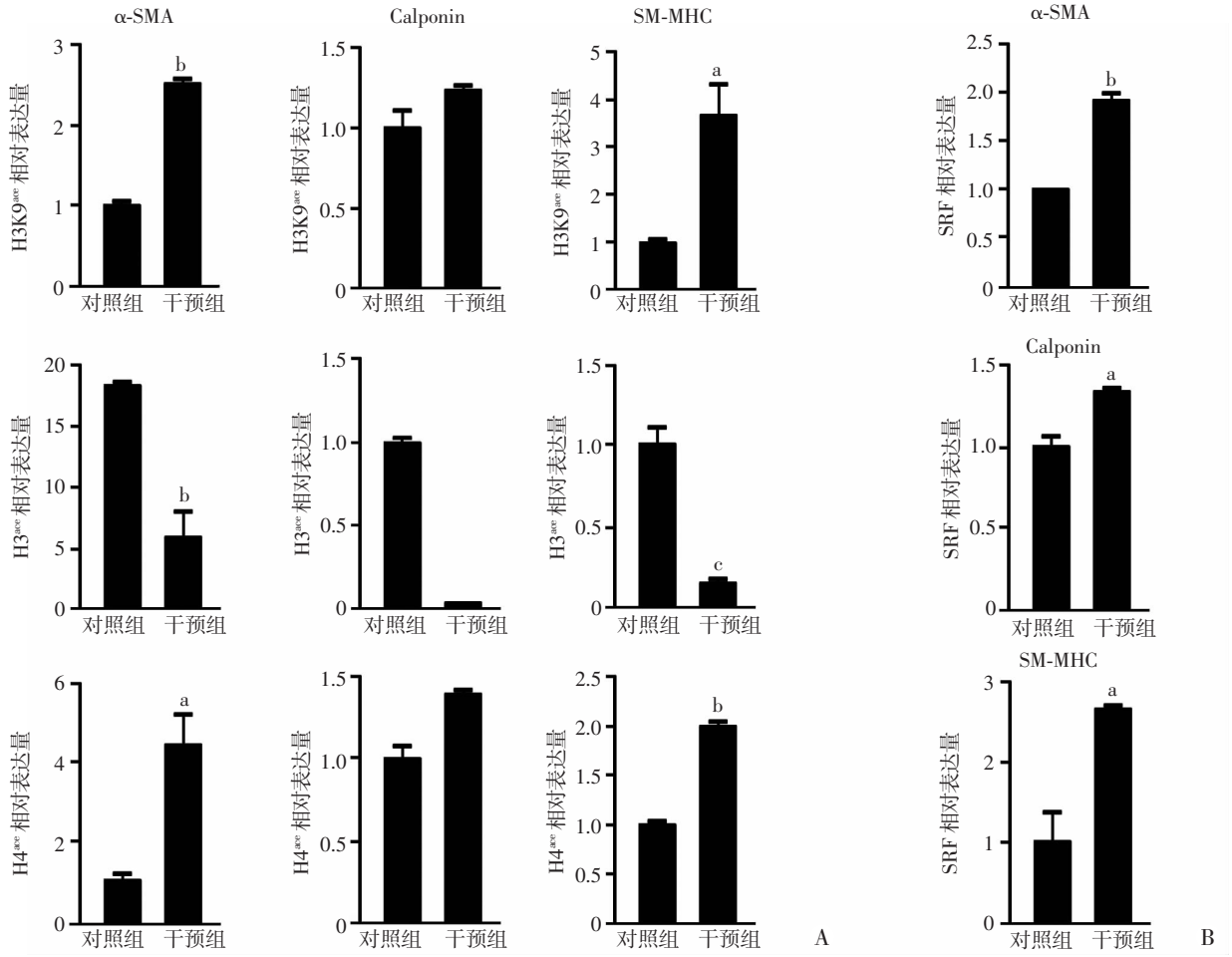
a: $P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 0 h 比较

图 3 共培养的 MSCs 中 SMCs 标志基因 HDAC1 和 HDAC2 富集量 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



a：$P<0.05$，与 0 h 比较

图 4　共培养的 MSCs 的 SMCs 标志基因中 SRF 富集　（$n=3,\bar{x}\pm s$）



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，c：$P<0.001$，与干预组比较

A：两组 SMCs 标志基因中 H3K9^{ace}、H3^{ace} 和 H4^{ace} 的富集量；B：两组 SMCs 标志基因中 SRF 富集量

图 5　NaB 预处理对共培养间充质干细胞中组蛋白乙酰化修饰和 SRF 结合富集的影响　（$n=3,\bar{x}\pm s$）

2.5　组蛋白乙酰化可能通过 SRF 促进 MSCs 分化成 SMCs

研究采用 1.0 mmol/L NaB 提高其乙酰化水平，并比较 NaB 处理干预组与对照组间组蛋白乙酰化修饰和 SRF 富集情况。结果显示：NaB 干预组 α-SMA 和 SM-MHC 基因中 H3K9^{ace} 和 H4^{ace} 的富集量明显高于对照组（$P<0.05$，图 5A）；SRF 在干预组中呈现相同增高趋势，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 5B）。相反，经 NaB 干预组的 H3^{ace} 显著低于对照组（$P<0.05$，图 5A）。

3 讨论

临床上细胞移植治疗受到干细胞来源的限制[2]。由于 MSCs 能够分化成多种细胞,因此被认为是一种极具应用潜能的种子细胞。体外培养中,MSCs 可通过直接接触或者细胞因子诱导分化为 SMCs[19-20]。在体内,骨髓间充质干细胞经尿道和膀胱颈黏膜下注射可分化为膀胱平滑肌细胞[1]。我们的研究发现共培养后 MSCs 的 SMCs 标志基因表达增加,说明体外 Transwell 小室共培养能够诱导 MSCs 向 SMCs 分化,这为干细胞定向分化寻找到一个较为可靠的途径。

MSCs 向 SMCs 分化的机制尚不清楚。先前的研究表明,组蛋白乙酰化修饰参与了 SMCs 的分化[21-23]。干细胞系的乙酰化水平较低,而在分化后的 SMCs 中,SMCs 标志基因的 $H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 升高[8]。与此相一致,我们还发现,SMCs 标志基因中 $H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 的富集在 MSCs 向 SMC 分化中升高,这意味着 $H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 在 MSCs 分化过程中启动了相关基因表达。MCDONALD[6]报道 α-SMA 和 SM-MHC 的 $H3K9^{ace}$ 升高。我们还发现分化的 MSCs 中 α-SMA,Calponin 和 SM-MHC 的 $H3K9^{ace}$ 显著高于未分化的 MSCs。这些数据表明在 MSCs 分化为 SMCs 中,$H3K9^{ace}$ 激活平滑肌标记基因表达。所有结果表明,组蛋白乙酰化修饰在 MSCs 分化为 SMCs 中起促进作用。

组蛋白乙酰化状态由 HAT 和 HDAC 调节。在 HDAC 家族中,HDAC1 和 HDAC2 保持相同的 85%序列,通常共同存在并抑制基因转录。研究证明,HDAC2 通过结合某些 SMCs 特异性转录因子来抑制 SMCs 标志基因的表达[14,24]。我们的研究结果表明,随着共培养时间的延长,HDAC1 和 HDAC2 在 SMCs 标记基因上的富集程度显著降低,说明 HDAC1 和 HDAC2 抑制了 MSC 向 SMC 分化中 SMCs 标记基因的表达。

组蛋白修饰通过转录因子调控基因表达[25-26]。SRF 是 SMCs 特异性基因表达的关键转录因子之一。MCDONALD[6]报道 SRF 与 H4 乙酰化结合可以控制 SMCs 的分化。在本研究中,我们发现在 MSCs 分化中,SRF 在 SMCs 标志基因启动子区富集量增加,促进 MSCs 中 SMCs 标志基因的表达。进一步,我们通过 1.0 mmol/L NaB 提高组蛋白乙酰化修饰水平,并观察了 SRF 的富集和组蛋白修饰的变化。结果发现,与对照组相比,NaB 干预组 SMCs 基因启动子区 $H3^{ace}$ 富集量显著降低,原因可能是 H4 高乙酰化状态抑制了 H3 乙酰化[6];同时,SRF、$H3K9^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 明显升高,提示 $H3K9^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 可能联合 SRF 促进 MSCs 的 SMCs 标志基因表达。

本研究通过建立体外共培养体系,揭示了组蛋白乙酰化修饰在 MSCs 向 SMCs 分化中的作用。虽然组蛋白特异位点乙酰化修饰促进 MSCs 的 SMCs 标志基因的表达,并且 NaB 提高乙酰化修饰后 SRF 与其有相同的增高趋势,然而 SRF 与相关乙酰化组蛋白间的结合是直接还是间接,尚未明确,并且上述组蛋白特异位点乙酰化与 HDAC1 和/或 HDAC2 之间结合关系也需在后续研究中进一步阐明。

总之,体外 Transwell 小室共培养体系能够诱导 MSCs 分化成 SMCs。在分化过程中,$H3K9^{ace}$、$H3^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 可能经 HDAC1 和 HDAC2 调整,促进 SMCs 标志基因的表达,$H3K9^{ace}$ 和 $H4^{ace}$ 可能结合 SRF 参与 SMCs 标志基因的初始转录。

参考文献:

[1] KUISMANENK, SARTONEVA R, HAIMI S, *et al*. Autologous adipose stem cells in treatment of female stress urinary incontinence: results of a pilot study[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(8): 936-941. DOI: 10.5966/sctm.2013-0197.

[2] ROMANS, MANGERA A, OSMAN N I, *et al*. Developing a tissue engineered repair material for treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse-which cell source?[J]. Neurourol Urodynam, 2014, 33(5): 531-537. DOI: 10.1002/nau.22443.

[3] LIAOW, YANG S, SONG C, *et al*. Construction of ureteral grafts by seeding bone marrow mesenchymal stem cells and smooth muscle cells into bladder acellular matrix[J]. Transplant Proc, 2013, 45(2): 730-734. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.08.023.

[4] HAN J, LIU J Y, SWARTZ D D, *et al*. Molecular and functional effects of organismal ageing on smooth muscle cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(1): 147-155. DOI: 10.1093/cvr/cvq024.

[5] GAN Q, YOSHIDA T, MCDONALD O G, *et al*. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(1): 2-9. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0383.

[6] MCDONALD O G, WAMHOFF B R, HOOFNAGLE M H, *et al*. Control of SRF binding to CArG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo[J]. J Clin Invest, 2006, 116(1): 36-48. DOI: 10.1172/jci26505.

[7] QIU P, LI L. Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression[J]. Circ Res, 2002, 90(8): 858-865. DOI: 10.1161/01.res.0000016504.

08608.b9.

[8] MANABE I, OWENS G K. Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system [J]. Circ Res, 2001, 88(11): 1127-1134. DOI: 10.1161/hh1101.091339.

[9] CAO D, WANG Z, ZHANG C L, *et al*. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(1): 364-376. DOI: 10.1128/mcb.25.1.364-376.2005.

[10] ZHOU B, MARGARITI A, ZENG L, *et al*. Splicing of histone deacetylase 7 modulates smooth muscle cell proliferation and neointima formation through nuclear β-catenin translocation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2676-2684. DOI: 10.1161/atvbaha.111.230888.

[11] SINGH N, TRIVEDI C M, LU M M, *et al*. Histone deacetylase 3 regulates smooth muscle differentiation in neural crest cells and development of the cardiac outflow tract [J]. Circ Res, 2011, 109(11): 1240-1249. DOI: 10.1161/circresaha.111.255067.

[12] TURGEON N, BLAIS M, GAGNÉ J M, *et al*. HDAC1 and HDAC2 restrain the intestinal inflammatory response by regulating intestinal epithelial cell differentiation [J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e73785. DOI: 10.1371/journal.pone.0073785.

[13] HE S H, KHAN D H, WINTER S, *et al*. Dynamic distribution of HDAC1 and HDAC2 during mitosis: Association with F-actin[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(7): 1525-1535. DOI: 10.1002/jcp.24311.

[14] KONG X, FANG M, LI P, *et al*. HDAC2 deacetylates class II transactivator and suppresses its activity in macrophages and smooth muscle cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(3): 292-299. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.10.023.

[15] WANG Z, WANG D Z, HOCKEMEYER D, *et al*. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression [J]. Nature, 2004, 428(6979): 185-189. DOI: 10.1038/nature02382.

[16] PENKE L R, HUANG S K, WHITE E S, *et al*. Prostaglandin E2 inhibits α-smooth muscle actin transcription during myofibroblast differentiation via distinct mechanisms of modulation of serum response factor and myocardin-related transcription factor-A [J]. J Biol Chem, 2014, 289(24): 17151-17162. DOI: 10.1074/jbc.m114.558130.

[17] MORITA T, HAYASHI K. Arp5 is a key regulator of myocardin in smooth muscle cells[J]. J Cell Biol, 2014, 204(5): 683-696. DOI: 10.1083/jcb.201307158.

[18] DAVIS F J, GUPTA M, CAMORETTI-MERCADO B, *et al*. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy [J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 20047-20058. DOI: 10.1074/jbc.m209998200.

[19] PARK W S, HEO S C, JEON E S, *et al*. Functional expression of smooth muscle-specific Ion channels in TGF-β(1)-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 305(4): C377-C391. DOI: 10.1152/ajpcell.00404.2012.

[20] WANG T, XU Z, JIANG W, *et al*. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell[J]. Int J Cardiol, 2006, 109(1): 74-81. DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.05.072.

[21] LIU R, LESLIE K L, MARTIN K A. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(4): 448-453. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2014.06.004.

[22] VILLENEUVE L M, REDDY M A, LANTING L L, *et al*. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(26): 9047-9052. DOI: 10.1073/pnas.0803623105.

[23] ALEXANDER M R, OWENS G K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease[J]. Annu Rev Physiol, 2012, 74(1): 13-40. DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142315.

[24] MENG F, HAN M, ZHENG B, *et al*. All-trans retinoic acid increases KLF_4 acetylation by inducing HDAC2 phosphorylation and its dissociation from KLF_4 in vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(1): 13-18. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.112.

[25] KATAN-KHAYKOVICH Y, STRUHL K. Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(4): 1296-1301. DOI: 10.1073/pnas.1018308108.

[26] XU M, LONG C, CHEN X, *et al*. Partitioning of histone H3-H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly [J]. Science, 2010, 328(5974): 94-98. DOI: 10.1126/science.1178994.

(收稿:2020-08-27;修回:2020-09-16)

(编辑 栾 嘉)