

文章编号: 1004-0374(2009)01-0081-05

# 转录因子 Rex-1: 结构、表达谱和 干性(stemness)调控功能

蹇锐<sup>1</sup>, 刘兵<sup>2</sup>, 胡福泉<sup>1\*</sup>, 程小星<sup>3\*</sup>

(1 第三军医大学微生物学教研室, 重庆 400038; 2 解放军307医院肿瘤学研究室, 北京 100071;  
3 解放军总医院309临床部, 北京 100091)

**摘要** Rex-1(reduced expression 1)又称Zfp-42(zinc finger protein 42),是一种酸性锌指结构蛋白,在胚胎干细胞和部分成体干细胞中高表达,并随维甲酸(retinoid acid, RA)诱导干细胞分化而迅速下调。该分子的结构特点提示其具有转录调控的功能,对决定干细胞的状态和发育阶段发挥重要作用。

**关键词:** Rex-1; 干细胞; 分化; 转录调控

**中图分类号:** Q2; Q7; R394 **文献标识码:** A

## Transcription factor Rex-1: structure, expression profile and stemness regulatory function

JIAN Rui<sup>1</sup>, LIU Bing<sup>2</sup>, HU Fu-quan<sup>1\*</sup>, CHENG Xiao-xing<sup>3\*</sup>

(1 Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;  
2 Laboratory of Oncology, the 307th Hospital of PLA, Beijing 100071, China;  
3 309th Clinical Division, PLA General Hospital, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Rex-1 (reduced expression 1), also known as Zfp-42 (zinc finger protein 42), encodes a protein containing four repeats of the zinc finger motif and an acidic domain. These structural features imply a possible regulatory function for Rex-1. Expression of Rex-1 is high in embryonic and several adult stem cells, and rapidly reduced after RA-induced differentiation. The unique expression profile of Rex-1 suggests that it may play an important role in deciding the status and fate of stem cells.

**Key words:** Rex-1; stem cells; differentiation; transcriptional regulation

在维甲酸(retinoid acid, RA)诱导小鼠畸胎瘤细胞分化调控机制的研究中, Hosler等<sup>[1]</sup>利用cDNA文库筛选并分离到一个随RA刺激而表达明显下调的新分子,遂将其命名为Rex-1。后发现它在胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)等发育早期的细胞中特征性表达<sup>[2-4]</sup>。目前,该分子已作为鉴定干细胞自我更新状态和发育阶段的重要标志而被广泛应用<sup>[5-7]</sup>。本文重点就Rex-1分子的结构、功能及其相关调控机制展开综述。

### 1 Rex-1的结构

Rex-1/Zfp42属于锌指蛋白C2H2家族,是转录

因子YY1(Yin Yang 1)亚家族成员之一<sup>[2]</sup>。小鼠的Rex-1基因定位于8号染色体,其cDNA由1741个核苷酸组成,含4个外显子,开放阅读框位于第4外显子(图1)。该基因编码分子量约32.3kDa的酸性蛋白质,共编码288个氨基酸,其氨基末端从Asp56至Glu103的48个氨基酸残基组成的阴离子区域可能

收稿日期: 2008-09-10; 修回日期: 2008-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700418)

\*通讯作者: 胡福泉, Tel: 023-68752240, E-mail: hooфуquan@yahoo.com.cn; 程小星, Tel: 010-66775493, E-mail: xc36cn@yahoo.com.cn

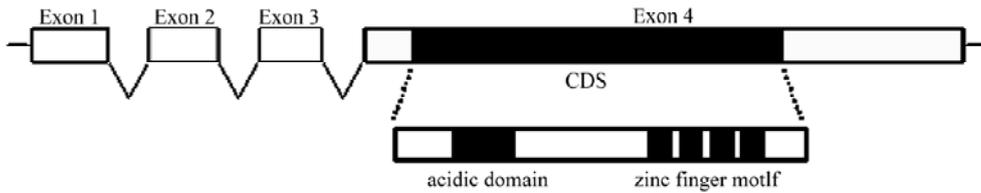


图1 Rex-1基因结构示意图

是真核细胞调节蛋白的酸性激活因子结构域；羧基末端有 4 个重复的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指基序(从 Cys172 至 His281)，每个锌指之间由 4 个氨基酸残基间隔。Rex-1 蛋白的结构特点是，具有与 DNA 相互作用并参与转录调节的功能<sup>[1-3, 8]</sup>。

小鼠与人 Rex-1 蛋白氨基酸序列同源率为 57%，其中 C 末端锌指结构域同源率高达 77%，N 末端为 44%，而同一物种的 Rex-1 又均与 YY1 蛋白有较高的同源性。YY1 是一个广泛存在的转录调节分子，但对 Rex-1 调控功能的了解却比较欠缺。通过生物信息学分析发现，Rex-1 与 YY1 的同源性较高主要是由于两者的 C 末端锌指区域具有较大的相似性(75%)，而 N 末端尚未发现与基因组中任何已知基因同源，因此推断 Rex-1 蛋白的 N 端决定了其特殊的表达方式。利用分子建模技术比较 Rex-1 与 YY1 的锌指结构，发现两者存在 7 个锌指残基差异，而这些差异在不同物种 Rex-1 蛋白间却高度保守<sup>[2]</sup>，提示 Rex-1 与 YY1 蛋白具有相似的与 DNA 结合的方式，但调节基因转录的功能却并不相同。

## 2 Rex-1 的表达谱及其功能

Rex-1 最先是从小鼠畸胎瘤细胞系 F9 中分离得到的，其转录水平随 RA 诱导 F9 细胞分化而迅速下调<sup>[1]</sup>。进一步的研究发现，Rex-1 只在少数的细胞或组织中表达，包括小鼠 ES 细胞和畸胎瘤细胞、CD34<sup>+</sup> 的造血干细胞、胎盘以及成

体的睾丸组织<sup>[2, 3]</sup>；而在人类，迄今为止只在 ES 细胞、部分组织来源的成体干细胞以及脐带血 CD133<sup>+</sup> 细胞中检测到 Rex-1 的表达<sup>[9-11]</sup>。因此，推测 Rex-1 能反映干细胞多能性(pluripotential)。

在小鼠胚胎的发育过程中，受精卵分裂产生卵裂球，此时的细胞具有同等的发育潜能。第一次分化发生在胚胎期 2.5-3.5d，分别产生内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblast)，后者发育成胎盘组织，是胚胎植入所必需的；而从前者中则可分离到 ES 细胞，最终可发育为一个完整的胚胎。胚胎期 4d，ICM 继续分化产生外胚体(epiblast)和原始内胚层(primitive endoderm)，一旦植入后，外胚体内部的细胞凋亡形成囊腔，外层存活的柱状上皮细胞即原始外胚层(primitive ectoderm)发育为胚体。原始外胚层细胞是该发育阶段惟一保持多能性的细胞，可进一步分化产生内、中、外胚层体细胞和生殖细胞，但缺乏分化为胚外组织、原始内胚层以及滋养外胚层细胞的能力<sup>[12, 13]</sup>。

Rex-1 在早期囊胚(blastocyst)的 ICM 和极滋养层(polar trophoblast)中均有表达，晚期囊胚只在滋养外胚层发育产生的绒毛膜锥(ectoplacental cone)和胚外外胚层(extraembryonic ectoderm, ExE)中可检测到 Rex-1，而在 ICM 发育的胚胎外胚层中其丰度明显降低(图 2)。到发育后期，只有在来自于滋养层的细胞(如小鼠 18d 胎盘)中可检测到 Rex-1，而成体组

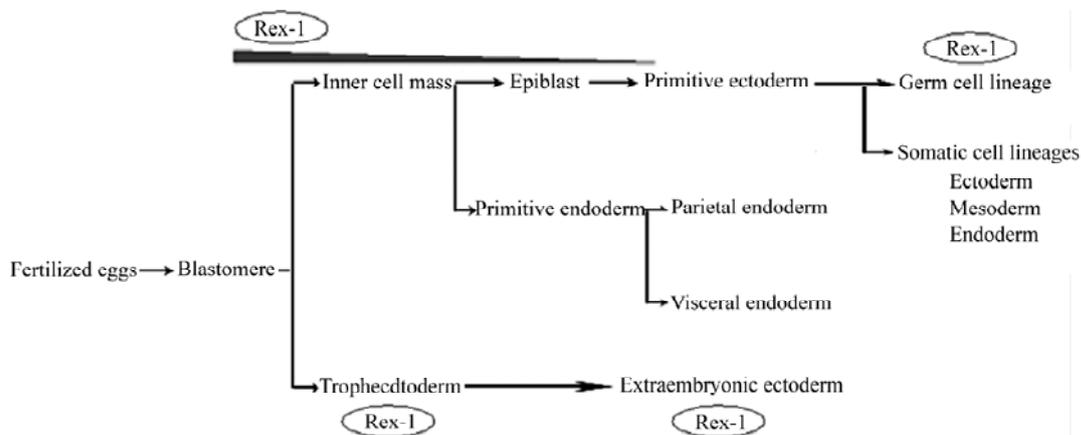


图2 胚胎发育阶段Rex-1基因表达变化

组织中只有睾丸能检测到 Rex-1, 并且其表达只局限于精母细胞(经历减数分裂的生殖细胞)<sup>[3,14]</sup>。这些结果显示: Rex-1 分子的表达主要发生在胚胎发育的早期阶段, 并且其功能很可能与滋养外胚层以及生殖细胞的发育有密切关系。

最近, 陆续有文献报道 Rex-1 分子在不同组织细胞中的表达谱。除骨髓、心脏来源的成体多能干细胞之外, Mongan 等<sup>[2]</sup>和 Beltrami 等<sup>[4]</sup>在具有较强再生能力的人表皮角质化细胞、前列腺及肺来源的上皮细胞中均检测到 Rex-1 的表达, 但随细胞传代次数增加而逐渐消失, 提示 Rex-1 的表达与细胞的自我更新能力密切相关。Kristensen 等<sup>[14]</sup>发现 Rex-1 表达于男性睾丸和女性卵巢中的减数分裂细胞, 提示 Rex-1 可能在减数分裂中发挥作用。Raman 等<sup>[15]</sup>的研究结果显示: 在高于 90% 的正常肾组织样本中检测到 Rex-1 的表达, 而在肾肿瘤样本中检出阳性率为 36%; 而另一个干细胞标志性分子 Oct-4 的表达分布却没有差别。另一个值得引起注意的是 Rex-1 的表达并不是只局限于核内, 而是在不同的发育时期或细胞类型可观察到胞浆定位, 提示 Rex-1 蛋白可能并不仅仅是一个转录因子, 而是在不同的细胞发育阶段或状态下发挥不同的功能<sup>[14,15]</sup>。

### 3 Rex-1 对 ES 细胞自我更新和分化的影响

由于 Rex-1 在 ICM 中高丰度表达, 而在外胚体和原始外胚层中迅速下调, 因此, Rex-1 通常被认为是干细胞多能性的标志性分子。然而, 该分子是否具有与 Nanog 及 Oct-3/4 同等重要的核心地位尚缺乏足够的证据, 后者的表达变化可直接决定 ES 细胞的状态及分化方向<sup>[16]</sup>。

F9 细胞具有与多能性干细胞相似的生物学特性, 是体外研究 ES 细胞分化的理想细胞模型。正常的 F9 细胞在 RA 和不同培养条件的诱导下, 可选择性地分化为原始内胚层、腔壁内胚层(parietal endoderm, PE)或内脏内胚层(visceral endoderm, VE)。与之相比, Rex-1 基因敲除(Rex-1<sup>-/-</sup>)的 F9 细胞只能分化产生 PE, 预示 Rex-1 分子在胚胎发育早期可控制分化方向<sup>[8]</sup>。然而, 该结果并未获得进一步的实验支持。近期, Niwa 实验室则提出了不同的观点。他们发现: Rex-1<sup>-/-</sup> ES 细胞系能够建立, 且可在体内或体外正常分化; 尽管一些 VE 标记分子的诱导受到影响, 但仍可通过常规的方法建立 Rex-1 基因缺失的小鼠。因此, Rex-1 分子并不是维持干细胞自我更新与胚胎发育所必需的<sup>[12,17]</sup>。

上述看似矛盾的研究中有两个现象尤其值得关注: 首先, Rex-1<sup>-/-</sup> F9 细胞的增殖能力明显高于 Rex-1<sup>+/-</sup> 和野生型 F9 细胞, 特别是当加入 RA 后, 后者表现为完全生长停滞, 而前者几乎不受影响<sup>[8]</sup>, 提示 Rex-1 有可能通过控制细胞周期和凋亡来影响干细胞的命运; 其次, Niwa 等的研究发现, 体外培养的 ES 细胞并不是均质性的, 至少包括 Rex-1<sup>-</sup>/Oct-3/4<sup>+</sup> 和 Rex-1<sup>+</sup>/Oct-3/4<sup>+</sup> 两种类型, 两类细胞可相互转变, 但 Rex-1<sup>-</sup>/Oct-3/4<sup>+</sup> 更易于分化为体细胞系, 而 Rex-1<sup>+</sup>/Oct-3/4<sup>+</sup> 主要分化为原始外胚层, 并且形成嵌合体小鼠的能力也更强。该结果已得到 Carter 等研究的支持, 表明体外培养的 ES 细胞实际上是由小范围内不同发育阶段的多能性细胞构成(主要包括 ICM、外胚体和原始外胚层)<sup>[12,18]</sup>。这些现象提示, Rex-1 可能是胚胎发育早期(从受精卵到 ICM)特定阶段的功能分子, 它的缺失可能对 ES 细胞的分化方向不产生直接影响, 但它的存在必定赋予 ES 细胞某种特殊的生理学特性, 对决定干细胞的状态和发育阶段至关重要。

### 4 Rex-1 的调控机制

Rex-1 分子的结构特点提示其具有结合 DNA 并调节基因转录的功能, 而特殊的表达谱变化又表明该分子的转录表达受其他信号的严密调控。对 Rex-1 基因启动子的分析结果显示, 该启动子缺乏“TATA”盒并有多转录起始位点<sup>[19]</sup>。虽然已发现多个转录因子的结合位点, 但目前得到充分证据支持的主要是 Oct-3/4。Oct-3/4 属于 POU 转录因子家族, 与 Nanog、Sox-2 共同调控 ES 细胞自我更新与分化, 位于细胞全能性调控网络的顶端<sup>[20-22]</sup>。在 Rex-1 启动子的 -234 - -204 区域存在 Oct-3/4 的结合位点(ATTGTCAT), 突变该位点导致启动子活性下降, 表明该八聚体元件(octamer element)是 Rex-1 基因转录激活所必需的。如前所述, F9 细胞接受 RA 刺激后 Rex-1 的表达迅速下调, 但 RA 并不直接调控 Rex-1 转录水平的变化, 而是通过下调 Oct-3/4 对 Rex-1 的表达产生影响, 即使无 RA 刺激, Rex-1 的表达也会随细胞发生分化而下降<sup>[19]</sup>。该结论得到 Rosfjord 和 Rizzino<sup>[23]</sup> 及 Ben-Shushan 等<sup>[24]</sup> 研究的支持, 并认为低水平的 Oct-3/4 蛋白表达激活 Rex-1 启动子的活性, 高水平的 Oct-3/4 反而抑制其活性。另外, Nanog 和 Sox-2 可能也参与对 Rex-1 分子的直接调控, Shi 等<sup>[25]</sup> 的研究发现, Nanog 蛋白 C 末端 CD2 (C-terminal domain 1) 和 WP (W-repeat

domain)是激活 Rex-1 的功能域,并且与 Sox-2 有协同效应,其反应元件位于 Rex-1 启动子-286 - -187 区域。

相比而言,对于 Rex-1 下游的分子调控机制尚缺乏足够的了解。有证据显示, Rex-1 与 Oct-3/4 之间可能存在负反馈调控关系,干扰 Rex-1 会导致 Oct-3/4 表达上调,从而进一步抑制 Rex-1 的表达并诱导 ES 细胞分化<sup>[26]</sup>。Xu 等<sup>[27]</sup>的研究则表明, Rex-1 能通过抑制 JAK/STAT (Janus kinase /signal transducer and activator of transcription)信号传导通路调节 F9 细胞分化,该信号通路对控制 ES 细胞的自我更新也同样发挥重要作用。

系统进化分析的结果显示, Rex-1 分子是 YY1 通过逆转座产生的复制本基因,两者具有亲缘关系。YY1 是 Gli-Kruppel 型锌指蛋白,其 C 末端为 DNA 结合功能域,而位于 N 末端的调节结构域显示其具有抑制、激活以及蛋白 / 蛋白相互作用的功能。Rex-1 与 YY1 蛋白分子的 C 末端高度同源,然而由于在进化过程中承受不同的选择压力,其 DNA 结合基序已发生改变,但核心区(5' -CCAT-3')域仍具有相似性。体外实验表明,YY1 的 DNA 结合位点(CGCCATNTT)非常保守,而与 Rex-1 结合的序列包括两种类型:5' -GGCAGCCATTA-3' 和 5' -GGCCATTA-3',亲和力和相对较低,分析认为 5' 端的 -GGC- 以及 3' 端的 A 均有助于提高与 Rex-1 蛋白结合的亲和力<sup>[2, 28]</sup>。

## 5 结语

Rex-1 分子在胚胎发育过程中可能扮演了非常特殊的角色,对 ES 细胞自我更新与多向分化的调节可能也发挥重要的作用,但迄今为止对其功能的认识还比较局限,深入了解其分子调控机制必将有助于最终揭示干细胞多能性的复杂调控网络。

## 【参 考 文 献】

- [1] Hosler BA, Larosa GJ, Grippo JF, et al. Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1989, 9(12): 5623-9
- [2] Mongan NP, Martin KM, Gudas LJ. The putative human stem cell marker, Rex-1 (Zfp42) structural classification and expression in normal human epithelial and carcinoma cell cultures. *Mol Carcinog*, 2006, 45(12): 887-900
- [3] Rogers MB, Hosler BA, Gudas LJ. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, 1991, 113(3): 815-24
- [4] Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, et al. Multipotent cells can be generated *in vitro* from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 2007, 110(9): 3438-46
- [5] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-9
- [6] Eiges R, Schuldiner M, Drukker M, et al. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol*, 2001, 11(7): 514-8
- [7] Karlmark KR, Freilinger A, Marton E, et al. Activation of ectopic Oct-4 and Rex-1 promoters in human amniotic fluid cells. *Int J Mol Med*, 2005, 16(6): 987-92
- [8] Thompson JR, Gudas LJ. Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 195(1-2): 119-33
- [9] Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, et al. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*, 2002, 298(5593): 597-600
- [10] Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 2002, 20(4): 329-37
- [11] Baal N, Reisinger K, Jahr H, et al. Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. *Thromb Haemost*, 2004, 92(4): 767-75
- [12] Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, et al. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development*, 2008, 135(5): 909-18
- [13] Niwa H. How is pluripotency determined and maintained. *Development*, 2007, 134(4): 635-46
- [14] Kristensen DM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, et al. Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. *Hum Reprod*, 2008, 23(4): 775-82
- [15] Raman JD, Mongan NP, Liu L, et al. Decreased expression of the human stem cell marker, Rex-1 (zfp-42), in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2006, 27(3): 499-507
- [16] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 372-6
- [17] Masui S, Ohtsuka S, Yagi R, et al. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC Dev Biol*, 2008, 8(1): 45
- [18] Carter MG, Stagg CA, Falco G, et al. An in situ hybridization-based screen for heterogeneously expressed genes in mouse ES cells. *Gene Expr Patterns*, 2008, 8(3): 181-98
- [19] Hosler BA, Rogers MB, Kozak CA, et al. An octamer motif contributes to the expression of the retinoic acid-regulated zinc finger gene Rex-1 (Zfp-42) in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(5): 2919-28
- [20] Chambers I. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells*, 2004, 6(4): 386-91
- [21] Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and

- embryonic stem cells. *Oncogene*, 2004, 23(43):7150-60
- [22] Wang JL, Rao S, Chu JL, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 2006, 444(7117):364-8
- [23] Rosfjord E, Rizzino A. The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203(3):1795-802
- [24] Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, et al. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(4):1866-78
- [25] Shi WJ, Wang H, Pan GJ, et al. Regulation of the pluripotency marker *Rex-1* by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 2006, 281(33):23319-25
- [26] Zhang JZ, Gao W, Yang HB, et al. Screening for genes essential for mouse embryonic stem cell self-renewal using a subtractive RNA interference library. *Stem Cells*, 2006, 24(12):2661-8
- [27] Xu J, Sylvester R, Tighe AP, et al. Transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) gene via STAT3 is increased in F9 REX1 (ZFP-42) knockout teratocarcinoma stem cells relative to wild-type cells. *J Mol Biol*, 2008, 377(1):28-46
- [28] Kim JD, Faulk C, Kim J. Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(10):3442-52