

# Rex-1对 Oct4转录活性的调控\*

郭允倩<sup>1 2 3\*\*</sup> 饶艳华<sup>1\*\*</sup> 赵元<sup>1</sup> 裴端卿<sup>2\*\*\*</sup>

(1清华大学医学院 生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)

(2中国科学院广州生物医药与健康研究院 再生生物学国家重点实验室 广州 510663)

(3北京林业大学林木育种国家工程实验室 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室 北京 100083)

**摘要** Rex-1和 Oct4是在多能性细胞中特异表达的转录因子,而 Rex-1的生物学功能及其调控胚胎干细胞(ES细胞)多能性和分化能力的机制尚不清楚。实验探讨了 Rex-1和 Oct4的相互关系,利用免疫荧光实验和免疫共沉淀实验证明了 Rex-1和 Oct4两种蛋白共同定位于细胞核中,证明二者之间有直接的相互作用。进一步的活性分析表明 Rex-1能够抑制 Oct4的转录激活活性。这些数据提供了一种新的调控 Oct4活性的机制。

**关键词** ES细胞 转录因子 Rex-1 Oct4

**中图分类号** Q782

Rex-1又被称作 Zfp42(zinc finger protein 42),是 Gli3Krupple家族的一个转录因子。Rex-1在多能性细胞中特异表达,包括胚胎干细胞(ES细胞)和一些畸胎瘤细胞(EC细胞),如 F9细胞,但是在 P19细胞中却没有表达<sup>[1]</sup>。Rex-1在多能性细胞中的表达被严格地调控,以前的研究表明当 Rex-1的表达下调时, R1的 ES细胞系向原始内胚层和体壁内胚层方向分化<sup>[2]</sup>。最近的研究表明 Rex-1(-/-)的 ES细胞在分化成胚状体时并不能诱导一些内脏内胚层标记基因的产生,这些都说明 Rex-1可能调控着多能性细胞的分化<sup>[3]</sup>。

Oct4是含有 POU 结构域的 homeobox 家族的转录因子。Oct4的表达量调控着 ICM 的发育过程,也决定了 ES 细胞的命运,高剂量的 Oct4使 ES细胞向原始内胚层方向分化,低剂量的 Oct4使 ES细胞向滋养外胚层方向分化<sup>[4]</sup>。Oct4通过调控下游一系列的基因调控着 ES细胞的多能性,这些基因包括 Oct4自身、Sox2、Nanog、Rex-1、Fgf4、Utlf、Fbx15、Cdx2和 Zfp206等<sup>[5-10]</sup>。而很多转录因子也调控着 Oct4的表达,像 Foxd3、Nanog、Sox2和 Oct3/4自身。Oct4的表达和活性还通过一些转录后修饰来调

节,包括苏木化、泛素化等。

通过研究,发现 Rex-1蛋白和 Oct4蛋白共定位于细胞核中,二者有直接的相互作用,并且 Rex-1对 Oct4的活性有负调控。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和主要试剂

小鼠的 ES细胞系 E14T 和 CGR8分别来自于金颖博士(上海生命科学院)和 Austin Smith 博士(英国剑桥大学)。质粒 pPyCAG IP来自于 Ian Chambers 博士(英国爱丁堡大学)。质粒 6w-tk-luc 和 tk-luc来自于 Hitoshi Niwa 博士(日本神户大学)。293T 细胞,质粒 pCR3.1、pCR3.1-Oct4-Flag 为本实验室存留。Flag(DYKDDDDK)和 Myc(EQKLISEEDL)抗体购自 Signa 公司,Oct4 抗体购自 Abcam 公司,转染的 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 质粒构建

pPyCAG IP 载体经过改造加入 Hpa I 限制性酶切位点和 Flag 标签,不带有终止密码子的 Rex-1 的 cDNA 序列是以 CGR8 ES 细胞系的 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增的,扩增的片段从 Hpa I 酶切位点插入带有 Flag 标签的 pPyCAG IP 载体中,从而得到了 pPyCAG IP-Rex-1-Flag 表达载体。pCR3.1-Rex-1-Flag 的构建方法参见文献<sup>[11]</sup>。

收稿日期: 2009-04-28 修回日期: 2009-05-28

\* 国家自然科学基金(30725012 30630039 和 90813033)、中国科学院知识创新工程(KSCX2-YW-R-48)资助项目

\*\* 并列第一作者

\*\*\* 通讯作者,电子邮箱: pei\_duanqing@gbh.ac.cn

### 1.3 细胞培养

293T细胞的培养基为DMEM(Invitrogen公司)加10%的胎牛血清(Hyclone公司)。用于CGR8和E14T细胞培养的培养皿要先用0.1%的明胶包被,培养基为GMEM(Sigma公司)加20%的胎牛血清(Gibco公司),再加入100mmol/L的非必需氨基酸(Invitrogen公司),55 $\mu$ mol/L的 $\beta$ -巯基乙醇(Sigma公司),0.224 $\mu$ g/ml的L-谷氨酰胺(Invitrogen公司)和1000单位每毫升的LIF(Chemicon公司)。

### 1.4 免疫荧光实验

细胞先用4%的多聚甲醛溶液固定30min,用PBS洗3遍,再用3%的羊血清封闭2h,然后和一抗一起孵育1.5h。羊抗IgG-TRIFC(1:100, Santa Cruz公司)用作二抗。照片用LEICA共聚焦显微镜拍摄。

### 1.5 稳定转染的ES细胞系的构建

分别用两种质粒pPyCAGIP和pPyCAGIP-Rex-1-Flag转染培养在3.5cm培养皿中的E14T细胞(每种质粒转2 $\mu$ g),转染后24h细胞按照1:50的比例传代到6cm培养皿中,并且用嘌呤霉素筛选(2 $\mu$ g/ml, Invitrogen公司)。10天后,取细胞进行实验。

### 1.6 免疫共沉淀实验

稳定表达pPyCAGIP和pPyCAGIP-Rex-1-Flag的细胞(培养于10cm培养皿中)先用PBS洗两次,然后用600 $\mu$ l TNE缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100mmol/L NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.5mmol/L EDTA, 0.5%蛋白酶抑制剂)裂解10min,细胞裂解液于4 $^{\circ}$ C, 13000g离心5min,将离心后的上清液取出40 $\mu$ l作为总细胞裂解液,加入上样缓冲液于100 $^{\circ}$ C煮沸5min留存,剩余裂解液转移至新的1.5ml EP管中用于免疫沉淀。将30 $\mu$ l事先用TBS缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 137mmol/L NaCl)平衡好的偶联Flag抗体的珠子(Sigma公司)加入细胞裂解液中,将EP管固定到混匀器上在4 $^{\circ}$ C免疫沉淀4h,之后用TBS缓冲液洗涤珠子共3次,最后一次洗涤完毕,弃上清,加入30 $\mu$ l 11 $\times$  SDS上样缓冲液混合,于100 $^{\circ}$ C煮沸5min,离心后取上清液和留存的细胞总裂解液进行Western杂交实验。

### 1.7 细胞转染和荧光素酶测定

细胞转染的步骤按照Lipofectamine 2000的使用手册进行。293T细胞或者CGR8 ES细胞培养在12孔板中,每一孔细胞分别转入0.25 $\mu$ g的Oct4的报告基因6week-luc或者是对照基因tk-luc, 0.25 $\mu$ g的pCR3-1-

Oct4-Flag(CGR8细胞中不转pCR3-1-Oct4-Flag)和不同剂量的pCR3-1-Rex-1-Flag质粒(0.25 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 0.75 $\mu$ g)。每一孔细胞同时转染100ng SV40-Renilla作为内参。24~48小时后,细胞用1 $\times$ PBS洗1次,然后用1 $\times$ PLB裂解液裂解(Promega公司)。荧光素酶的活性用双荧光素酶报告系统测定(Promega公司),所用仪器是TD2020(Turner Design公司)。每一个转染实验设计2个细胞孔的重复并且实验至少重复了3次。

## 2 结果

### 2.1 Rex-1蛋白和Oct4蛋白共同定位于细胞核中

将质粒pPyCAGIP-Rex-1-Flag瞬时转染ES细胞系E14T,以转染空载体pPyCAGIP的E14T细胞作为对照,分别用抗Oct4蛋白的抗体和抗Flag标签的抗体进行免疫荧光染色,DAPI染细胞核。可以看到细胞核被DAPI染成蓝色(图1a,图1d),内源的Oct4的蛋白定位在细胞核中(图1b,图1e),对于转染进去质粒pPyCAGIP-Rex-1-Flag的阳性细胞,Oct4蛋白与Rex-1是共定位的(图1f)。

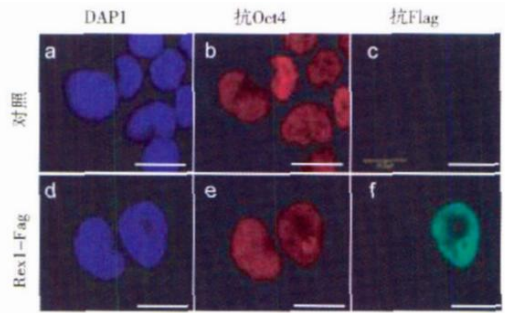


图1 ES细胞中, Rex-1蛋白和 Oct4蛋白共定位于细胞核中

Fig 1 Rex-1 and Oct4 co-localize in the nucleus in ES cells

(a) Control cells are stained with DAPI (blue fluorescence in the nucleus) (b) The nucleus localization of Oct4 is detected using an anti-Oct4 antibody in control cells (red fluorescence in the nucleus) (c) There is no signal detected using an anti-Flag antibody in control cells (d) Cells expressing Rex-1-Flag are stained with DAPI (blue fluorescence in the nucleus) (e) The nucleus localization of Oct4 is detected using an anti-Oct4 antibody in cells expressing Rex-1-Flag (red fluorescence in the nucleus) (f) The nucleus localization of Rex-1-Flag is detected using an anti-Flag antibody in cells expressing Rex-1-Flag (green fluorescence in the nucleus)

### 2.2 Rex-1蛋白和 Oct4蛋白有直接的相互作用

为了探究在蛋白水平上 Rex-1 与 Oct4 是否有直接的相互作用, 分别用质粒 pPyCAG IP 和 pPyCAG IP-Rex-1-Flag 转染 E14T 细胞系, 并且在转染后进行了 10 天的筛选分别得到了二者稳定转染的细胞系。接下来分别用两株稳定细胞系进行了免疫共沉淀实验, 用抗 Flag 的抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀, 再用抗 Oct4 的抗体检测免疫沉淀后的细胞液, 以转染 pPyCAG IP 的稳定细胞系为对照, 实验结果表明 Rex-1-Flag 与内源的 Oct4 蛋白有直接的相互作用 (图 2)。为了进一步证明这个结论, 在 293T 细胞中共转带有 Flag 标签的 Oct4GFP-Flag 和带有 Myc 标签的 Rex-1-Myc 以单独转染 Oct4GFP-Flag 的 293T 细胞为对照, 用抗 Flag 标签的抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀, 再用抗 Myc 标签的抗体检测免疫沉淀后的细胞液是否有 Rex-1-Myc 的表达, 结果也证实了 Rex-1 和 Oct4 有相互作用 (图 3)。

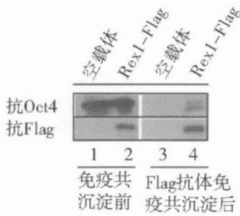


图 2 ES 细胞中 Rex-1 蛋白和 Oct4 蛋白有直接的相互作用  
Fig. 2 Rex-1 and Oct4 have direct interaction in ES cells

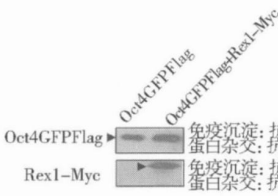


图 3 293T 细胞中 Rex-1 蛋白和 Oct4 蛋白有直接的相互作用  
Fig. 3 Rex-1 and Oct4 have direct interaction in 293T cells

### 2.3 Rex-1抑制内源 Oct4的转录激活活性

以前的研究表明, 一些蛋白像 EWS, Sox2 和 FoxD3 可以结合 Oct4<sup>[12, 13]</sup>, 增强或者抑制 Oct4 的转录激活活性。已经证明 Rex-1 可以结合 Oct4 所以 Rex-1 也有可能影响 Oct4 的转录激活活性。为了验证这一假说, 在 ES 细胞系 CCR8 中共转 Oct4 的报告基因 6w-tk-luc 和

pCR3 1-Rex-1-Flag 来看 6w-tk-luc 的活性变化。在 ES 细胞中, 6w-tk-luc 可以被激活约几百倍。随着 Rex-1-Flag 转染剂量的不断增多, 报告基因 6w-tk-luc 的活性不断降低 (分别为 550 倍, 400 倍和 300 倍), 而对照报告基因 tk-luc 却没有被激活而且也没有被抑制的趋势 (图 4)。由此得出结论, Rex-1 抑制了内源 Oct4 的转录激活活性。

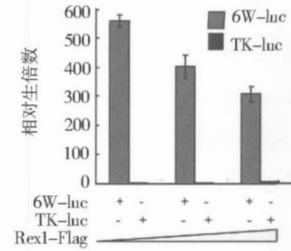


图 4 ES 细胞中 Rex-1 抑制内源 Oct4 的转录激活活性

Fig 4 Rex-1 inhibits the transcriptional activity of endogenous Oct4 in ES cells

### 2.4 Rex-1抑制外转 Oct4的转录激活活性

为了进一步验证 Rex-1 抑制 Oct4 的转录激活活性的结论, 在 293T 细胞里共转 pCR3 1-Rex-1-Flag pCR3 1-Oct4-Flag 和 6w-tk-luc。在 293T 细胞中, 6w-tk-luc 可以被 Oct4 激活约 40 倍。随着 Rex-1-Flag 转染剂量的不断增多, 报告基因 6w-tk-luc 的活性不断降低 (分别为 35 倍, 27 倍和 22 倍)。而对照报告基因 tk-luc 却没有被激活而且也没有被抑制的趋势, 同样只转染 Rex-1-Flag 和 6w-tk-luc 而不转染 Oct4 也没有抑制趋势 (图 5)。

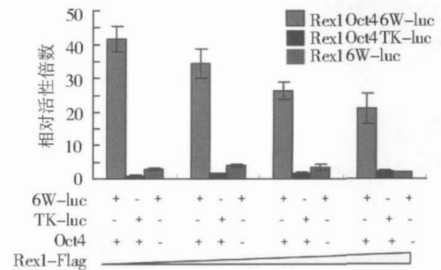


图 5 293T 细胞中 Rex-1 抑制外转 Oct4 的转录激活活性

Fig 5 Rex-1 inhibits the transcriptional activity of exogenous Oct4 in 293T cells

### 3 讨论

REX-1和Oct4都是在多能细胞中特异表达的转录因子<sup>[1, 14]</sup>。将ES细胞培养基中的LIF撤去或是在培养基中加入RA, ES细胞会发生分化, 在分化过程中REX-1的表达迅速降低<sup>[1]</sup>。Oct4是在胚胎发育过程和ES细胞命运决定过程中都起着重要作用的基因<sup>[14]</sup>。而REX-1和Oct4等重要的转录因子调控ES细胞的机制尚不清楚。本文的研究则是针对ES细胞中REX-1和Oct4的相互作用机制进行的。

ES细胞中的转录因子相互作用形成网络共同调控着ES细胞的命运, 已有的研究表明REX-1结合一个大的蛋白复合体, 这一复合体中就包括Oct4<sup>[15]</sup>。通过免疫荧光实验和免疫共沉淀实验证明了REX-1和Oct4两种蛋白共同定位于细胞核中, 并且二者之间有直接的相互作用。又通过进一步的活性分析得到REX-1能够抑制Oct4的转录激活活性。这说明REX-1对于Oct4有较为精细的调控。

2006年, Takahashi等<sup>[16]</sup>报道了将四个转录因子(Oct4, Sox2, c-myc和Klf4)转染进小鼠的胚胎成纤维细胞(MEFs)产生了诱导型多能性干细胞(iPS细胞), 很快在人也实现了iPS细胞的成功<sup>[17-19]</sup>。重编程技术的这一突破使得人们看到再生医学的光明前景, 而要解决重编程费时费力的问题, 就必须对重编程的机制有所了解。Oct4作为一个重要的重编程因子在这一过程的调控和功能值得探索, 研究从ES细胞出发, 探索了一种可能的Oct4和REX-1相互作用和被REX-1调控的机制, 为理解ES细胞多能性的分子机制和重编程的机制奠定了理论基础。

### 参考文献

- [1] Hosler B A, LaRosa G J, Grippo J F, 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: 5623~5629.
- [2] Zhang J Z, Gao W, Yang H B, et al. Screening for genes essential for mouse embryonic stem cell self-renewal using a subtractive RNA interference library. *Stem Cells*, 2006, 24: 2661~2668.
- [3] Masui S, Ohtsuka S, Yagi R, et al. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 45.
- [4] Niva H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 2000, 24: 372~376.
- [5] Chew J L, Loh Y H, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 6031~6046.
- [6] Okumura-Nakanishi S, Saito M, Nawa H, et al. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 5307~5317.
- [7] Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis-regulation of Nanog gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25: 2475~2485.
- [8] Rodda D J, Chew J L, Lin L H, et al. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 24731~24737.
- [9] Ambrosetti D C, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17: 6321~6329.
- [10] Tokuzawa Y, Kaiho E, Maniyama M, et al. Flx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 2699~2708.
- [11] Pan G J, Pei D Q. The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C-terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 1401~1407.
- [12] Lee J R, Hee B K, Bae G Y, et al. Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. *Stem Cells*, 2005, 23: 738~751.
- [13] Guo Y, Costa R, Ramsey H, et al. The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endoderm-specific promoter expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 3663~3667.
- [14] Palmieri S L, Peter W, Hess H, et al. Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First 2 Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation Development. *Developmental Biology*, 1994, 166: 259~267.
- [15] Wang J L, Rao S, Chu J L, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 2006, 444: 364~368.
- [16] Takahashi K, Yananaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663~676.
- [17] Yu J Y, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917~1920.

[18] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors Cell 2007, 131: 861~ 872

[19] Park IH, Zhao R, West JA, et al Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors Nature 2008, 451: 141~ 146

## **Rex-1 Regulates the Transcriptional Activity of Oct4 through Direct Protein Interaction**

GUO Yun-qian<sup>1, 2, 3</sup> RAO Yan-hua<sup>1</sup> ZHAO Yuan<sup>1</sup> PEI Duan-qing<sup>2</sup>

(1 State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institutes of Biomedicine, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(2 Key Laboratory of Regenerative Biology, Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China)

(3 National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract** The transcription factor Rex-1 has long been used as an ES cell maker but its biological function and potential to regulate ES cell pluripotency and self-renewal remains elusive. The results showed that Rex-1 is colocalized with Oct4 in the nucleus by immunofluorescent staining and the physical interaction between Rex-1 and Oct4 was proved by immunoprecipitation. Furthermore, the results were also indicated by interacting with Oct4. Rex-1 can inhibit Oct4 transcriptional activity. In all, the data suggested a new mechanism to modulate Oct4 activity by Rex-1 in ES cells.

**Key words** ES cells, Transcription factor, Rex-1, Oct4