

# 上皮-间质转化在心脏发育和损伤中的作用

张建蓉 余 强

**【摘要】** 上皮-间质转化(EMT)即上皮细胞经历多重生物化学改变以获得间充质细胞表型的过程。EMT 在心脏生成及发育过程具有重要作用,心内膜 EMT 参与了心脏瓣膜形成和心脏腔室的分隔,而心外膜细胞经历 EMT 可发育成多种心系细胞。然而,这种被认为只在胚胎发育中存在的机制在成体心脏损伤过程中可以被激活,可促进心肌纤维化,使心肌收缩功能下降。该文对 EMT 在心脏发育和病理过程中的作用及其分子调控机制的研究进展予以综述。

**【关键词】** 上皮-间质转化; 心脏发育; 损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.05.015

上皮细胞具有极性,通过细胞膜侧面存在的黏附复合物彼此紧密相联形成层状,并与底部的基底膜相连接。而间充质细胞缺乏极性与细胞连接,具有迁移性并且形态易变,可以分化为许多不同的细胞类型<sup>[1,2]</sup>。在上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中,上皮细胞失去极性和细胞与细胞间的联系,发生细胞骨架的重塑。细胞表型也随之发生改变,如 E-钙黏蛋白、封闭蛋白、紧密连接蛋白 ZO-1 和角蛋白-18 等表达减少,而平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -sma)、纤维母细胞特异性蛋白 1、纤维连接蛋白和胶原蛋白、波形蛋白等间质细胞标志物增多。该过程受多种信号分子的调控。

以 EMT 发生的特定生物学环境为依据将其分为 3 种亚型。1 型 EMT:与胚胎植入、发育和器官形成相关;2 型 EMT:与损伤修复、组织再生和器官纤维化相关;3 型 EMT:是指与上皮细胞恶性肿瘤相关的表型转化。内皮细胞含有部分上皮细胞的标志物,也可转化为间质细胞,且该过程跟上皮向间质细胞转化具有相似特点,故内皮间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)被认为是特殊类型的 EMT<sup>[1]</sup>。

EMT 机制在心血管系统形成与发育中的作用

已有大量研究。对 EMT 在成体心脏病理状态下的激活及该过程的信号转导因子的研究,希望能为急性心肌梗死和心肌纤维化等疾病的临床治疗提供新思路。

## 1 EMT 在原始心管发育中的作用

在胚胎发育中,胚胎的单层结构(即上胚层)经历 EMT 迁移分化发育成了 3 个胚层。在该过程中,由单层上皮细胞组成的上胚层细胞迅速增殖,由胚盘两侧向尾端中线迁移,集中形成一条细胞索称为原条。存在于上胚层中的心脏祖细胞也随着该过程向胚盘尾端中线迁移,发生 EMT 从原条中脱离出来,向内迁移到位于中胚层两侧的侧板,形成以后发育成心脏的结构即为生心区,生心区出现围心腔及生心板,生心板内出现腔隙形成原始心管,原始心管为肌细胞包绕内皮细胞的双层管道,然后胚盘结构发生重塑,位于侧板的两条原始心管在腹侧中央融合为一条心管,分化为成体心脏左心室的原基。

该 EMT 过程受多种信号分子调控,在发生迁移形成原条的上胚层细胞中证实有 Wnt 基因信号的激活, Wnt 可使这些细胞应答于其他可启动 EMT 的细胞外信号,他们的相互作用共同调控原条的形成。Wnt 缺失的小鼠将不能发生 EMT 形成原条。Wnt 下游的 Nodal 蛋白和 Vg1 蛋白被证实可诱导 EMT 并促使细胞发生迁移<sup>[2]</sup>。锌指蛋白转

录因子 Snail 家族在诱导原肠胚形成的 EMT 过程中也有十分重要的作用,缺失或不足可导致原条细胞不能发生迁移<sup>[3]</sup>。

## 2 心内膜 EndMT 在瓣膜和心脏腔室形成中的作用

在原始心管出现后不久,心脏房室管及心室流出道处的心内膜细胞受到邻近心肌分泌的诱导信号而触发 EndMT,心内膜细胞黏着因子表达降低而失去细胞间的联系发生分离,在信号调控下这些心内膜细胞转化为间充质细胞并侵入到心胶质(原始心管由外部的心肌层与内部的心内膜层组成,其间充斥着细胞外基质即心胶质),这些移行的细胞随后增殖形成心内膜垫,在往后的发育过程中,心内膜垫经重塑发生形态改变,在心脏房室管将发育成二尖瓣和三尖瓣,在心室流出道处发育成主动脉瓣和肺动脉瓣。

心内膜 EndMT 过程受多种信号分子的调控。T-box 转录因子家族中的 Tbx20 在心脏房室管中大量表达,它通过激活 Nmyc1 和抑制 Tbx2 表达促进心脏腔室结构的发育,缺乏 Tbx20 的小鼠心内膜向间质细胞转化过程将受到严重的干扰<sup>[4]</sup>。在鸡胚的研究中,转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)经过共同的通路参与 EndMT,它们都可通过激活 TGF- $\beta$ RⅢ诱导 EndMT 的发生和间质细胞向细胞外基质的迁移及分化<sup>[5,6]</sup>。TGF- $\beta$  缺失的小鼠会出现严重的心脏缺陷,包括心房间隔缺失、右心室双出口、左心室双入口等。Notch 信号通路的活化使细胞之间失去相互黏着,使得房室管和流出道处的心内膜细胞发生 EndMT 成为可能,Notch 信号及其配体 JAG1 的突变可导致心脏瓣膜发育的缺陷,而敲除 Notch 下游基因 Hey2 或 Hey2/Heyl 双敲除也可导致室间隔、房室瓣、肺动脉瓣发育的缺陷<sup>[7]</sup>。另外 GATA4、Wnt 基因、透明质酸(HA)、表皮生长因子(EGF)等信号也共同参与 EndMT 过程的调控。

## 3 EMT 介导心外膜细胞向多个心系细胞的发育

在心内膜发生 EMT 形成心内膜垫的同时,心脏最外层的心外膜也逐渐形成。在鸟类和哺乳动物研究中,当心外膜刚覆盖在心肌表面时即有部分心外膜细胞发生 EMT 形成心外膜源性细胞(EPDCs)。一部分的 EPDCs 留在心外膜与心肌层中间的细胞外间质区域即心外膜下空间,也有部分

的 EPDCs 向深层迁移,并广泛分布于发育中的心肌层。在这里它们分化为与冠状血管发育密切相关的细胞,即成纤维细胞、冠状平滑肌细胞、血管内皮细胞<sup>[8]</sup>。EPDCs 向血管内皮细胞的分化尚存在争议,结果存在物种的差异。在鸟类的研究,用有复制缺陷的逆转录病毒标记前体心外膜荧光染色示踪法和将鹌鹑的前体心外膜植入鸡胚的研究,都证实血管内皮细胞来自心外膜源性间质细胞的分化<sup>[9]</sup>。但是在小鼠和斑马鱼中的研究结果否认了 EPDCs 向血管内皮细胞分化的能力<sup>[10,11]</sup>。与此一致的是,近来有研究显示,血管内皮细胞来自于静脉细胞而非心外膜<sup>[12]</sup>。2008 年 Cai 和 Zhou 等<sup>[11,13]</sup>利用 Cre-LoxP 技术分别追踪维尔姆斯瘤基因 1(Wt1)和转录因子 Tbx18<sup>+</sup>的心外膜细胞结果均显示可分化为部分心肌细胞,但该结论存在争议,仍需更多的研究去证实。

多种信号分子参与调控心外膜 EMT 和 EPDCs 的迁移。血小板源性生长因子(PDGF)表达于心外膜,是调控心外膜 EMT 的重要信号分子,敲除心外膜 PDGF 受体可使心外膜 EMT 受阻。PDGF 在心外膜 EPDCs 的定向分化过程中也起到重要的作用<sup>[14]</sup>。Wt1 也是表达于心外膜的基因,它的缺失使心外膜不能发生 EMT, Wt1 通过  $\beta$ -连环蛋白和维甲酸信号通路调控心外膜 EMT。利用基因族系追踪法示踪缺失 Wt1 的前体心外膜/心外膜细胞也证实了冠脉丛的形成缺陷<sup>[15]</sup>。最新研究表明, Wt1 和 Tbx18 可通过作用于共同的下游信号靶点 Slug 实现对心外膜 EMT 过程的双向调节,下调 Wt1 使 Slug 表达增加诱发 EMT 发生,而下调 Tbx18 使 Slug 表达降低而抑制 EMT 过程<sup>[16]</sup>。在以往的研究中, Snail1 被认为在心外膜 EMT 过程中可被 Wt1 直接调控,在心外膜 EMT 中发挥着重要作用,但近来该观点被否认。最近, Casanova 等<sup>[8]</sup>利用 Wt1-和 Tbx18-Cre 敲除心外膜细胞中的 Snail1 基因,结果显示心外膜 EMT 仍然正常发生,表明心外膜 EMT 并不依赖于 Snail1 信号。另外还有胸腺素  $\beta$ 4、TGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子、维甲酸、Shh 等信号共同参与调控心外膜 EMT。

## 4 EMT 在心脏损伤中的作用

EMT 事件对心脏纤维化的影响目前研究较广泛。众多研究表明, TGF- $\beta$  是影响心脏纤维化和心肌收缩功能障碍的关键因子<sup>[17,18]</sup>。心脏超后负荷

的动物实验表明, TGF- $\beta$  主要通过激活成纤维母细胞, 使成纤维细胞增生, 进而促进心肌纤维化。而在 2007 年, Zeisberg 等<sup>[17]</sup> 的研究通过 CRE-Loxp 系统转基因小鼠发现了心肌梗死后血管内皮细胞同样存在 EndMT 现象, 更加完善了 EMT 机制在心肌纤维化中的作用。研究表明, TGF- $\beta$ 1 介导血管内皮细胞发生 EndMT 现象, 而 BMP7 则维持内皮表型, 限制内皮细胞 EndMT 事件。两者共同调控心肌梗死后血管内皮细胞的 EndMT 过程。此外, EMT 事件也存在于心肌肥厚及糖尿病所致的心肌损伤中<sup>[18,19]</sup>。研究表明, 上皮标志 CD31 及间皮标志  $\alpha$ -sma 均在高血糖所致心肌损伤中激活, 提示其可能发生 EMT。体内试验进一步证实了 EMT 过程的存在, 而 TGF- $\beta$  在该过程中起着重要的介导作用<sup>[19]</sup>。另有研究显示, 厄贝沙坦减少心肌纤维化, 改善左室收缩功能与抑制心脏 EMT 有关<sup>[20]</sup>。肝细胞生长因子亦通过抑制 EMT 事件减轻超负荷小鼠的心脏纤维化及心肌重构<sup>[21]</sup>。总的来说, 不论是急性还是慢性心肌损伤及纤维化, EMT 事件均广泛存在, 并起着促进心肌纤维化, 恶化心室肌收缩功能的作用。

目前已有大量研究表明, 锌指蛋白转录因子 Snail 家族是器官纤维化(肝、肺、肾、腹膜等)中 EMT 事件的重要调控转录因子<sup>[22-24]</sup>。而对于心肌梗死后的心肌纤维化, 我们的前期研究同样证实了 EMT 信号分子的广泛激活, 其中 Snail 与心脏成纤维母细胞的激活在时相和细胞定位上关系密切, 提示 Snail 可能是干预心肌纤维化中 EMT 的重要靶点<sup>[25]</sup>。一项研究利用 EPDSs 经历 EMT 分化为心系细胞这一特点, 将成年人 EPDSs 移植至心肌梗死实验小鼠的梗死区, 进行相关研究得出结论: EPDSs 经历 EMT 事件期间可以分离培养, 移植入梗死区后可继续通过 EMT 机制分化为心系细胞, 最终改善心肌梗死后左室收缩功能及心脏重构<sup>[26]</sup>。由此提示, 研究应用 EMT 可能是心脏再生领域的重要方向。

## 5 结语

EMT 是参与胚胎心脏发生、发育非常重要的生物过程。研究发现在成体心脏中, EMT 可被激活参与心肌损伤纤维化等病理过程, 研究 EMT 在这些病理过程中的信号通路, 发现该过程的干预靶点成为近年研究热点。虽然对参与 EMT 的信号分

子已有大量研究, 但其调控机制仍未能完全揭示。

## 参 考 文 献

- [1] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [2] Acloque H, Adams MS, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease [J]. J Clin Inves, 2009, 119(6): 1438-1449.
- [3] Acloque H, Ocaña OH, Matheu A, et al. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation[J]. Dev Cell, 2011, 21(3): 546-558.
- [4] Cai X, Nomura-Kitabayashi A, Cai W, et al. Myocardial Tbx20 regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via Bmp2[J]. Dev Biol, 2011, 360(2): 381-390.
- [5] Townsend TA, Robinson JY, Deig CR, et al. BMP-2 and TGF $\beta$ 2 shared pathways regulate endocardial cell transformation[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 194(1): 1-12.
- [6] Townsend TA, Robinson JY, How T, et al. Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGF $\beta$  receptor interaction with GIPC[J]. Cell Signal, 2012, 24(1): 247-256.
- [7] Fischer A, Steidl C, Wagner TU, et al. Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition[J]. Circ Res, 2007, 100(6): 856-863.
- [8] Casanova JC, Travisano S, de la Pompa JL. Epithelial-to-mesenchymal transition in epicardium is independent of snail1 [J]. Genesis, 2013, 51(1): 32-40.
- [9] Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, et al. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos[J]. Int J Dev Biol, 2002, 46(8): 1005-1013.
- [10] Kikuchi K, Gupta V, Wang J, et al. *tcf21*<sup>+</sup> epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration[J]. Development, 2011, 138(14): 2895-2902.
- [11] Cai CL, Martin JC, Sun YC, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. Nature, 2008, 454(7200): 104-108.
- [12] Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, et al. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells[J]. Nature, 2010, 464(7288): 549-553.
- [13] Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart[J]. Nature, 2008, 454(7200): 109-113.

rh-GH 治疗 4 周后,与心力衰竭组比较 TNF- $\alpha$  水平下降。rh-GH 可以降低心力衰竭时升高的 TNF- $\alpha$  水平,改善心功能。

心力衰竭时心肌间质的重构主要表现为间质纤维化(胶原沉积)、胶原种类的变化及胶原降解。间质纤维化在心力衰竭发生发展过程中起重要作用。心肌间质纤维化的机制尚不十分清楚。有研究显示,TNF- $\alpha$  可刺激细胞外基质蛋白和胶原酶的表达,通过影响基质金属蛋白酶、基质金属蛋白酶组织抑制物等的表达和活性间接影响细胞外基质的代谢,使胶原含量改变,从而促进心室重构<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,rh-GH 组大鼠经 rh-GH 治疗后,与心力衰竭组比较心肌间质纤维维积分减少,提示 rh-GH 可能抑制心肌间质纤维增生,其机制可能与 TNF- $\alpha$  水平降低有关。

### 参 考 文 献

[1] Kaplan RC, Strickler HD, Rohan TE, et al. Insulin-like growth factors and coronary heart disease[J]. Cardiol Rev, 2005,

13(1): 35-39.

- [2] Volterrani M, Manelli F, Ciccoira M, et al. Role of growth hormone in chronic heart failure. Therapeutic implications [J]. Drugs, 2000, 60 (4): 711-719.
- [3] 田振军,熊正美,郭进,等.大鼠游泳过度训练模型的建立及心室构型改建研究[J].陕西师范大学学报(自然科学版),1996,24(3):104-109.
- [4] Colao A, Marzullo P, Di Somma C, et al. Growth hormone and the heart[J]. Clin Endocrinol, 2001, 54 (2): 137-154.
- [5] McKie PM, Cataliotti A, Lahr BD, et al. The prognostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for death and cardiovascular events in healthy normal and stage A/B heart failure subjects [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55 (19): 2140-2147.
- [6] 郑刚,王林. N 末端脑利钠肽的心血管疾病诊疗价值现状[J]. 中国心血管杂志,2012,17(4):248-251.
- [7] Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, et al. Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure[J]. Circ Heart Fail, 2011, 4(3):246-256.

(收稿:2013-01-21 修回:2013-04-07)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 314 页)

[14] Smith CL, Baek ST, Sung CY, et al. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling [J]. Cir Res, 2011, 108(12): e15-e26.

[15] Von Gise A, Zhou B, Honor LB, et al. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin and retinoic acid signaling pathways[J]. Dev Biol, 2011, 356(1): 421-431.

[16] Takeichi M, Nimura K, Mori M, et al. The transcription factors Tbx18 and Wt1 control the epicardial epithelial-mesenchymal transition through bi-directional regulation of Slug in murine primary epicardial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e57829.

[17] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. Nat Med, 2007, 13(8):952-961.

[18] Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- $\beta$ [J]. J Clin Invest, 2010, 120(10):3520-3529.

[19] Widyanthoro B, Emoto N, Nakayama K, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition[J]. Circulation, 2010, 121(22):2407-2418.

[20] Tang RN, Lv LL, Zhang JD, et al. Effects of angiotensin II

receptor blocker on myocardial endothelial-to-mesenchymal transition in diabetic rats [J]. Int J Cardiol, 2013, 162 (2): 92-99.

- [21] Okayama K, Azuma J, Dosaka N, et al. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition [J]. Hypertension, 2012, 59 (5): 958-965.
- [22] Ohnuki K, Umezono T, Abe M, et al. Expression of transcription factor Snail and tubulointerstitial fibrosis in progressive nephropathy[J]. J Nephrol, 2012, 25(2):233-239.
- [23] Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, et al. Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(12):2392-2403.
- [24] Duan S, Yu J, Liu Q, et al. Epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation of peritoneal mesothelial cells mediated by oxidative stress in peritoneal fibrosis rats[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2011, 36(1):34-43.
- [25] Liu Y, Du J, Zhang J, et al. Snail1 is involved in de novo cardiac fibrosis after myocardial infarction in mice[J]. Acta Biochim Biophys Sin Nov, 2012, 44(11):902-910.
- [26] Winter EM, Grauss RW, Hogers B, et al. Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouseheart[J]. Circulation, 2007, 116(8):917-927.

(收稿:2013-05-22 修回:2013-07-16)

(本文编辑:金谷英)