

特约综述

心脏瓣膜发育早期 EMT 过程的信号调控

徐娜 李朝军*

(南京大学模式动物中心, 南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 心脏瓣膜以及膜性室间隔起源于胚胎的心内膜细胞, 由心内膜细胞发生上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)而来。EMT 过程的发生需要多种信号通路相互协调完成, 心脏房室管(atrioventricular canal, AVC)以及流出道(outflow tract, OFT)处的心内膜细胞在受到邻近的心肌细胞分泌的诱导因子(如 TGF- β 、BMP 等)的影响下, 起始 EMT 的发生。研究证实, VEGF、Notch、Wnt 以及一些转录因子 NFATc 等都参与调控了 EMT 过程。这些基因的异常表达都有可能引发 EMT 过程发生异常, 导致先天性心脏缺陷的产生。目前国内外关于 EMT 的研究较为广泛, 但是其复杂的信号调控机制还并不是十分清楚, 因而, 搞清楚调控 EMT 过程的信号通路有着极其重要的生理和病理学意义。本文就心脏瓣膜发育早期的 EMT 过程中已知的主要信号通路进行了综述。

关键词 心脏瓣膜发育; 上皮-间充质转化(EMT); 信号调控

上皮-间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是胚胎发育以及癌症发生中非常重要的过程。顾名思义, EMT 是由紧密连接的上皮或内皮细胞向可迁移的间充质细胞的转化, 产生了一种新的细胞类型。因而它是一些形态发生和器官发生过程中必经的阶段^[1]。

胚胎心脏是研究 EMT 过程的很好的模型, 心脏瓣膜发育早期即伴随着 EMT 的发生。该过程发生在特定的心脏发育阶段以及特定的心脏部位, 这样精确的发生必定受到一系列基因的精密调控。胶原凝胶侵入实验为体外 EMT 的研究提供了有力的手段^[2]。目前, 为人熟知的介导 EMT 过程的信号分子和蛋白有 TGF- β 、BMP、VEGF、Notch、Wnt 等, 这些因子组成一个复杂的调控网络, 该信号通路网络的整合开始于细胞外基质中分子间的相互作用, 这种相互作用调控细胞表面的分子事件, 通过受体、蛋白酶及其他膜分子轮流将信号转导到细胞内部, 引发细胞内信号级联, 通过转录因子和辅助因子激活或抑制基因的表达, 调节内皮细胞的增殖、分化以及迁移^[3]。尽管如此, 还有许多未知的调控路径有待进一步研究。本文对目前研究较为广泛的调控 EMT 过程的信号通路作一综述。

EMT 是心脏发育过程中瓣膜形成的必需阶段, 心脏的瓣膜形成区位于心脏房室管(atrioventricular canal, AVC)以及心室流出道(outflow tract, OFT)处, AVC 处的 EMT 产生二尖瓣和三尖瓣, 而 OFT 处的 EMT 产生主动脉瓣和肺动脉瓣^[4]。

在心脏发育早期, 原始心管由外部的心肌层和内部的心内膜层构成, 它们被细胞外基质即所谓的心胶(cardiac jelly, CJ)所隔开, 心胶包含有胶原、弹力蛋白和葡萄糖胺聚糖。EMT 过程可以分为以下几个阶段^[5-7](图 1):

(1)心内膜细胞的“活化”: 心管向右环化之后, 位于房室管和流出道处的心胶扩充隆起, 该处的心内膜细胞受到邻近的心肌层分泌的诱导信号作用下, 发生激活。

(2)“活化”的心内膜细胞粘着因子表达降低, 失去细胞与细胞之间的紧密联系, 细胞发生分离。

(3)在一些信号调控下, 这些心内膜细胞变得肥大, 丝足伸展, 向间充质细胞发生转化, 并侵入到心胶。

(4)一旦进入心胶, 间充质细胞增殖并分泌更多的胞外基质成分, 形成厚厚的心内膜垫。

1 心脏瓣膜发育的 EMT 过程概述

* 通讯作者。Tel/Fax: 025-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn

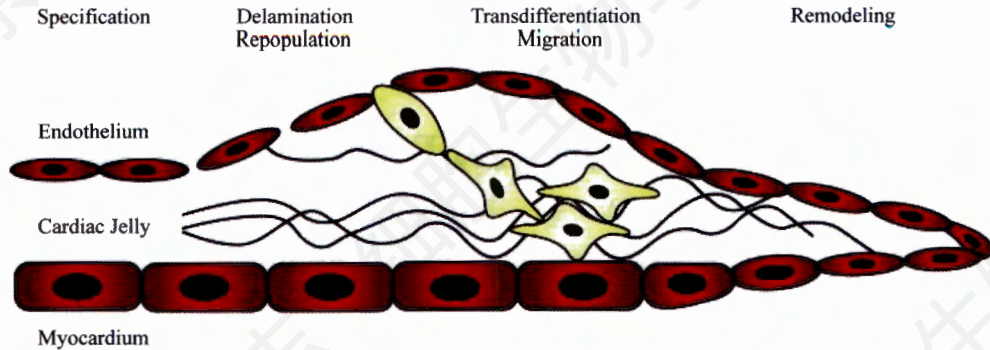


Fig.1 An overview of EMT process in heart valve development^[6]

2 调控 EMT 发生的主要信号通路及相关蛋白

EMT 过程对于心脏瓣膜的发育是极其重要的, 目前该过程的研究手段主要是进行早期房室管分离, 体外模拟 EMT 过程。该系统建立了指导 EMT 发生的关键因素, 包括胞外基质中的可溶因子, 特定区域的心肌细胞以及能够对不同信号作出应答的心内膜细胞^[8]。已有研究表明, 大量的不同信号分子参与调控了 EMT 过程, 如 VEGF、TGF- β 、Notch、Wnt、BMP、HA、EGF 等, 该过程依赖于心肌层、细胞外基质以及心内膜层之间的相互作用^[9]。以下将对介导 EMT 过程的主要信号通路及相关蛋白的最新研究近况作一阐述。

2.1 VEGF

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是个多效因子, 可以调节内皮细胞增殖、血管通透性、趋化性以及胚胎发育中的血管发生等多种过程^[10]。许多研究已经将 VEGF 与心内膜垫构成联系起来^[11,12]。脊椎动物有六种 VEGF 基因, 其中 VEGF-A 表达量最丰富, 也是目前研究较多的一种。VEGF 受体主要有两种, 即 VEGFR1 (或 Flt1) 和 VEGFR2 (或 Flk1/KDR), 它们属于酪氨酸激酶, VEGF 通过内皮细胞表面的 VEGFR 复合物, 传递其信号。

通过 LacZ 标记 VEGF 等位基因发现小鼠早期心脏发育过程中, 在胚胎 9.0 天 VEGF 表达遍布心内膜细胞, 而到胚胎期 9.5 天, VEGF 表达局限于房室管和流出道处的心内膜细胞以及该处的心肌细胞^[13]。Dor 等^[14]研究显示, VEGF 在 E10.5 天才出现瓣膜形成区域的表达升高, 特别是在此处的心肌细胞。但是不管怎样, VEGF 的表达具有明显的时空特异性, 揭示了 VEGF 在心内膜垫构成中的特殊作用。心垫处心肌细胞 VEGF 的表达表明心肌层起始心内膜细胞

的 EMT, VEGF 信号通过心肌传到心内膜。一旦激活, 这些心内膜细胞产生自己的 VEGF, 诱导相邻细胞发生 EMT。这样, 心肌层旁分泌 VEGF 信号到心内膜, 连同心内膜细胞之间自分泌 VEGF 信号, 起始并维持了 EMT 过程。

体外 AVC 培养下, 当加入额外的重组 hVEGF 或在低氧条件下, EMT 过程受到抑制, 而在低氧情况下, 再补加可溶性 VEGF 受体 sFlt-1 时, EMT 过程恢复。说明低氧造成 VEGF 表达上升, 内皮细胞表型一直被维持, 阻碍了 EMT 的发生。研究表明, 母亲患有糖尿病会大大影响胎儿的心脏以及胎盘循环, 造成胎儿心血管系统的结构和功能发生异常^[14], 而在发育的胚胎中, 高糖可通过降低 VEGF-A 的表达引起血管病变^[15]。同时, 高糖可以抑制 EMT 的发生, 当补加入重组 VEGF-A165 时, EMT 过程得到恢复^[16]。表明高糖引起 VEGF 表达下调, 心内膜细胞增殖不够, 导致没有足够的细胞来发生 EMT。种种研究结果说明了 VEGF 必须保持一个相对适度的表达量^[17] (图 2), 促使内皮细胞增殖, 以形成连续的心内膜层, 过高或过低都会引起 EMT 发生异常。这可能揭示了某些病理学意义, VEGF 信号通路应答于不同的外界刺激, 导致病理过程的产生。

2.2 TGF- β

转化生长因子 - β (transforming growth factor, TGF- β) 属于肽类生长因子超家族, 可以调控多种发育过程, 如细胞生长、增殖、分化、迁移、粘着、胞外基质构成等等。哺乳动物体内 TGF- β 家族存在三种配体形式, 即 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3, 在心内膜垫构成的 EMT 过程中发挥重要的诱导作用^[18]。

Potts 等^[19]研究表明, 当在体外培养的心脏 AVC 移植体中添加 TGF- β 1 或 TGF- β 2 时, 可以诱导 EMT

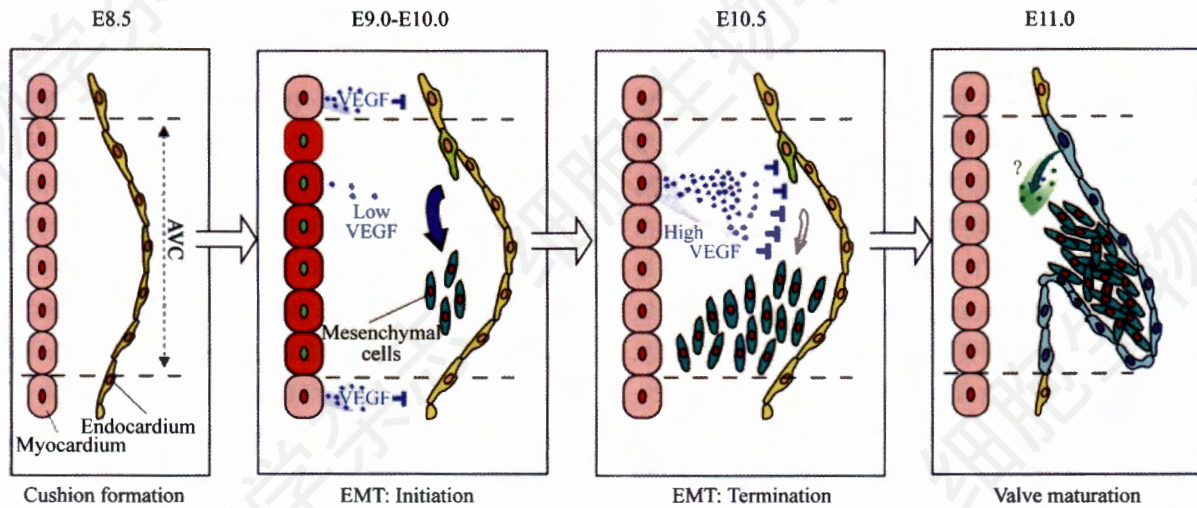


Fig.2 VEGF dose-dependently controls endocardial cushion formation^[17]

的发生, 而使用 TGF- β 功能性阻断的 TGF- β 抗体可以抑制 EMT 的发生。在对鸡的研究中发现, TGF- β 2 和 TGF- β 3 在心内膜垫发育中起重要作用^[20]。TGF- β 2 表达遍布于 EMT 发生前后的心内膜和心肌层, 体外实验中用其功能性阻断的抗体造成细胞之间的分离发生障碍, 抑制 EMT 的发生。TGF- β 3 在 EMT 发生前的心肌层中表达, 随后特别在 AVC 处激活的心内膜层中表达, 体外用其功能性阻断的抗体阻止了细胞向胶原基质中的侵入, 同样抑制了 EMT 过程的发生^[21]。运用 TGF- β 3 的反义核苷酸也能够抑制体外 EMT 的发生。表明 TGF- β 2 和 TGF- β 3 在心内膜细胞激活以及间充质细胞侵入过程中分别发挥各自的作用。

在小鼠体内, TGF- β 的表达形式在发育阶段显示出时空特异性, 在心内膜垫构成的 EMT 中起着重要的作用^[20]。TGF- β 1 起初在整个心内膜层中表达, 随后定位在将发生 EMT 的心内膜细胞中^[22], TGF- β 2 在发生 EMT 的 AVC 以及 OFT 处的心肌细胞中高表达, EMT 发生后便失去心垫处心肌层的特异表达^[23], TGF- β 3 在 EMT 发生之后的小鼠胚胎心脏中有表达^[24]。TGF- β 2 缺失小鼠表现多种心脏缺陷, 包括心房间隔缺失、右心室双出口、左心室双入口以及发育的流出道不能发生肌组织化等^[25], 但是 TGF- β 2 敲除小鼠在心内膜垫处依旧产生一些间充质细胞, 表明可能还有其他 TGF- β 对这个阶段有补偿作用。TGF- β 2 和 TGF- β 3 双敲除小鼠比 TGF- β 2 单个敲除小鼠表现出更严重的心垫表型^[26]。TGF- β 3 缺失小鼠中心垫 EMT 过程不受影响, 没有明显的心房、心室、流出道以及房室缺陷, 这和 TGF- β 3 在 EMT 发生时的 AVC 处不表达的现象相符合。比较得出, 在鸡和小鼠的

EMT 发生过程中, 不同的 TGF- β 在功能上分别发挥着各自的作用^[20]。

TGF- β 信号在细胞中的传递是通过跨膜 TGF- β 受体实现的。TGF- β 受体有三种, 即 TBR I、TBR II 和 TBR III。在鸡的心脏发育过程中, TBR I 受体 ALK2 和 ALK5 在发生 EMT 的 AVC 处的心内膜层有表达, 尤其是 ALK2 有着较高的表达^[27], Lai 等^[28]研究表明 ALK2 抗血清能够阻断 EMT 的发生, 组成型活化的 ALK2 足以诱导心室的内皮细胞发生 EMT, 而 ALK5 却没有这样的效应, 表明 ALK2 可以直接使心内膜细胞发生 EMT。当在 AVC 处心内膜细胞中过表达 Smad6, 心脏的 EMT 过程减弱, 可见 EMT 是依赖于 Smad 信号的^[27]。TBR II 和 TBR III 定位于 AVC 和 OFT 处的心内膜层, TBR III (betaglycan) 在迁移的间充质细胞中也有表达。通过抑制性抗体阻断 TBR II 后, 细胞入侵发生障碍, 这与 TGF- β 3 被阻断后发生的效应相一致。而 TBR III 抗体阻断了 EMT 过程中的细胞分离, 这与 TGF- β 2 被阻断后发生的效应相一致^[29,30]。这些数据表明, 不同的 TGF- β 和其特异性的受体相互作用后, 在 EMT 的两个不同的阶段即细胞分离和入侵中行使了特有的功能。Endoglin 是 TGF- β 的一种辅助受体, 在 EMT 发生过程中以及发生之后的 AVC 和 OFT 处的心内膜和间充质细胞中表达。通过反义 DNA 或 siRNA 介导的 Endoglin 缺失直接干扰到 EMT 的发生, 同时降低了 EMT 标记分子如 Slug 的表达^[31]。

在小鼠体内, TBR I 受体之一 ALK2 在 AVC 处的心内膜以及间充质细胞中被检测到有表达, 内皮特异性敲除 ALK2 的胚胎表现出更小的心内膜垫、间充

质细胞数量的减少以及心内膜层的异常增厚^[32]。Sridurongrit 等^[33]研究表明, *ALK5* 介导的信号在诱导心内膜细胞发生 EMT 的过程中起到重要的作用。*TBR II* 在 EMT 发生时的心肌、心内膜以及间充质细胞中均有表达, 其敲除的小鼠在心内膜垫形成之前便已死亡^[34], 但近来有研究表明, *TBR II* 敲除小鼠在体外可以正常发生 EMT, *TBR II* 在 EMT 过程中不是必需的^[35]。*TBR III (betaglycan)* 在 E8.5 天 AVC 处的心内膜层和邻近心垫组织的内皮细胞中短暂表达, 其敲除的小鼠显示心内膜垫组织的融合发生推迟^[36], 表型和 *TGF- β 2* 敲除小鼠类似。*Endoglin* 在 EMT 发生过程中 AVC 处的心内膜和间充质细胞中有表达, 敲除小鼠被用于做血管发生研究, *Endoglin* 的突变小鼠表现出细胞数减少的 AV 垫组织, 这与 *ALK1* 突变小鼠表型类似^[37]。

在细胞内, *TGF- β* 和其对应的受体结合后, 激活 *Smad2* 和 *Smad3*, 随后激发 EMT 介导者如 *Slug* 的表达。*Snail* 家族包括 *Snail (Snail1)* 和 *Slug (Snail2)*, 它们编码锌指转录因子, 触发胚胎发育以及肿瘤发生中的 EMT 过程^[38], 在多种间充质细胞中表达, *Snail* 能够抑制血管内皮钙粘蛋白(*VE-cadherin*)的表达, 导致内皮细胞间粘着力降低, 细胞发生分离, 从而引起迁移的产生^[39]。

2.3 BMP

骨形态发生蛋白(*bone morphogenetic protein, BMP*)家族属于结构保守性的 *TGF- β* 超家族中最大的亚家族, 在发育过程中具有多功能调节作用, 被认为在心脏瓣膜发育的 EMT 过程中担当着非常关键的角色。

BMP-2、*BMP-4*、*BMP-5*、*BMP-6* 和 *BMP-7* 在 EMT 起始过程中的 AVC 和 OFT 处表达。在早期小鼠心脏中, *BMP-2* 和 *BMP-4* 定位于 AVC 和 OFT 处的心肌层, 暗示它们在 EMT 中发挥一定的作用^[40]。*BMP2* 敲除小鼠在早期出现胚胎致死, 心脏发育异常^[41]。体外胶原凝胶实验证实, 纯化的 *BMP-2* 能够取代心肌层的作用, 诱导 EMT 的发生。添加有 *BMP-2* 的 AVC 外植体表达更多的 *TGF- β 2*, 表明 *TGF- β 2* 的表达受到 *BMP* 信号的调控^[42]。这也解释了为什么 *TGF- β 2* 敲除小鼠在心内膜垫处依旧能够产生一些间充质细胞, *BMP2* 也可能通过增加心内膜细胞中 *TGF- β 2* 的自分泌来起始 EMT 的发生。当使用 *BMP* 的抑制剂 *Noggin* 处理 AVC 外植体时, 间充质细胞形成受到抑制, 同时也抑制了 EMT 的发生^[42]。*Noggin* 主要在

AVC、OFT 处以及右心室的心肌细胞中表达, 其缺陷的小鼠胚胎表现出加厚的心肌层和扩大的心内膜垫, 这样的表型是由于 *BMP* 信号转导的增强而导致细胞大量增殖造成的, 促进 EMT 的发生而导致心内膜垫的扩展。该异常表型可以通过减半的 *BMP-4* 来挽救, 暗示 *BMP-4* 至少是被 *Noggin* 抑制的其中一种 *BMP* 配体^[43]。*BMP-5*、*BMP-6* 和 *BMP-7* 各自缺失的小鼠没有心脏缺陷, 但复合的 *BMP* 缺失模型显示心脏发育异常。*BMP-5* 和 *BMP-7* 双敲除小鼠不形成心内膜垫^[44], *BMP-6* 和 *BMP-7* 基因双敲除的小鼠流出道心内膜垫构成发生显著推迟, 瓣膜形态建成和腔室间隔也表现有缺陷, 胚胎由于心脏发育异常于 10.5~15.5 天之间死亡^[45], 这些数据首次揭示了 *BMP* 信号在小鼠的心内膜垫形成过程中是必不可少的。

BMP 受体的基因缺失也导致心内膜垫构成发生异常。*BMP* 受体 I A (*ALK3*) 在心肌中的特异性缺失造成心脏缺陷, 这种缺陷发生在房室接合处而非流出道处。在心内膜垫形成的初始阶段经历正常的 EMT 过程, 但是 EMT 发生后, 心内膜垫表现出发育不全的特征并且不能正常融合, 缺乏 *ALK3* 的心肌细胞死亡数目的增加可能解释了这种现象的产生。同时 *ALK3* 的缺失也导致了 AVC 处 *TGF- β 2* 表达的下调, 说明心肌层中 *BMP* 信号可以调控 *TGF- β 2* 的表达^[46]。*Inai* 等^[47]在体外胶原凝胶实验中发现, 感染 *BMP* 受体 I B (*ALK6*) 病毒能够诱导间充质细胞向胶原中迁移, 并促进了细胞外基质蛋白 *Periostin* 的表达, 而其优势负性突变病毒感染后细胞迁移量减少, *Periostin* 的表达量降低, 这些数据表明了 *BMP* 信号在 EMT 过程中发挥的关键作用。

TGF- β 信号在细胞内的传递是通过磷酸化并激活受体 *Smads* 即 *Smad2* 和 *Smad3* 来实现的, 而 *BMP* 信号是通过 *Smad1*、*Smad5* 和 *Smad8* 来传递的。*BMP* 配体和 II 型受体结合后, 受体发生磷酸化, 激活 I 型受体的丝 / 苏氨酸激酶活性, 一旦激活, I 型受体磷酸化细胞内效应蛋白 *Smads*, 活化的受体 *Smads* 和 *Smad4* 构成异二聚体复合物, 该复合物转位进入核内并激活下游基因的表达^[48]。*Smad6* 是 *BMP* 信号通路中的负调控者, 它能够和 *Smad1* 竞争性结合 *Smad4*, 从而抑制该信号通路。*Smad6* 敲除小鼠的心内膜垫处细胞数过多, 显然在 *BMP* 信号介导的间充质细胞增殖过程中 *Smad6* 起到了负反馈调节作用^[49]。在以后的研究中将聚焦于 *BMP* 信号通路如何和其他信号通路相互作用而影响到心内膜垫发育。

2.4 Notch

Notch 信号通路被证实在心脏发育过程中起着很关键的作用, Notch 突变引起许多先天性心脏病的产生, 包括 Alagille 综合征、二叶氏主动脉瓣、心脏瓣膜的钙化以及室间隔缺损等。在哺乳动物体内, Notch 信号包括 4 种跨膜受体(Notch1、Notch2、Notch3、Notch4)和 5 种跨膜配体(Jagged1、Jagged2、Delta1、Delta3、Delta4)。Notch 是一种跨膜蛋白分子, Notch 受体的胞外和胞内区均含有多个蛋白修饰以及蛋白作用位点, 其胞外区包括数个 EGF 样重复序列, Notch 配体的胞外区包含数量不等的 EGF 样重复序列以及一个富含半胱氨酸的 DSL (Delta-Serrate-Lag-2) 模体, 这一模体介导了其于 Notch 受体的相互作用^[50]。

Notch 活化的细胞共有的特性是失去细胞之间的相互粘着^[51], 正是这一特性使得房室管和流出道处的心内膜细胞发生 EMT 成为可能。在胚胎期 8.5 天小鼠的心内膜中 Notch 及其配体 Delta4 均有表达, 当 EMT 开始时, 可见 Notch 在心内膜垫间充质中表达^[52]。在小鼠 Notch 突变体中, TGF- β 2 的表达量明显下调, 推测可能 Notch 通过 TGF- β 和 BMP 信号来影响 EMT 过程^[52]。减少的 TGF- β 2 会导致 Snail 基因家族成员之一 Slug 的缺失^[53], 最近研究显示, Slug 是 Notch 的直接靶向基因, 在小鼠胚胎 9.5 天 EMT 起始时, Slug 首先在 AVC 处的一些内皮细胞和间充质细胞中表达, 在 Slug 缺失的小鼠胚胎中, E9.5 天 EMT 过程受阻, 而到了 E10.5 天, Snail 的表达促使 EMT 正常发生。相应地, Slug 和 Snail 均缺失的情况下, E10.5 天 EMT 过程发生异常。Notch 直接诱导 Slug 的表达在起始 EMT 发生的过程中起着重要的作用^[54]。

早已有研究报道 Notch 信号参与调控 EMT 过程, 近来有研究分析了调控 EMT 发生的 Notch 下游靶基因的作用。当 Notch 配体和跨膜受体结合后, Notch 受体经历一个复杂的断裂过程, 释放其细胞内结构域 (Notch intra-cellular domain, NICD), 然后 NICD 转位到细胞核, 激活 DNA 结合蛋白 CSL (CBF1/Su(H)/Lag1) 转录因子, 其中 CBF1 和 RBPJK、Su(H)、Lag1 分别是这一蛋白在哺乳动物、果蝇、线虫中的名称。碱性螺旋-环-螺旋转录因子 Hes 和 Hey 家族是已知的 Notch-CSL 的靶向基因^[9,55]。通过对 Notch1 和 RBPJK 突变的小鼠胚胎分析发现, 它们都有着发育不全的心内膜垫, 表明 EMT 过程受阻^[52]。当增加组成型活化的 NICD 于斑马鱼体内时, 发现心内膜细胞

有丝分裂加强并引起瓣膜超常增生。而使用 Notch 抑制剂 N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenylglycine-1, 1-dimethylethyl ester (DAPT) 时, 瓣膜则不能形成^[6]。Hey2 的缺失导致先天性心脏病的产生, 包括室间隔缺损、房室瓣膜缺陷、肺动脉瓣狭窄等。而 Hey1 敲除小鼠没有明显的病理特征, 尽管如此, Hey1 和 Hey2 双敲除的小鼠由于严重的血管问题在胚胎期死亡。说明 Hey1 和 Hey2 有着部分重叠的功能^[56]。Hey1 和 HeyL 双失活小鼠表现出严重的心脏畸形, 如膜性室间隔缺损、发育异常的房室瓣膜和肺动脉瓣。分析发现 MMP-2 的表达降低以及心内膜垫的细胞数目大大减少, EMT 过程发生障碍^[55]。

Notch 的表达升高会产生更多的 Notch 配体 Delta4, 激活心内膜细胞, 来自其中的信号诱导邻近的心肌层产生 TGF- β 2, 然后 TGF- β 2 反馈信号到活化的心内膜细胞, 使之表达 Slug/Snail 转录因子, 导致 VE-Cadherin 表达减少, 从而内皮细胞发生分层, 迁移至心腔, 在 BMP 和 VEGF 的协调控制下构成充满细胞的心内膜垫。

2.5 Wnt/ β -catenin

Wnt 是一类分泌型糖蛋白, 通过自分泌或旁分泌发挥作用, 经典的 Wnt 信号起作用的关键在于稳定转录激活子 β -连环蛋白 (β -catenin), 是通过防止其发生磷酸化依赖性的降解来实现的。Wnt/ β -catenin 信号通路参与调控了许多发育事件, 异常激活时会引起肿瘤^[57,58]。

在小鼠早期心管中, Wnt/ β -catenin 通路的组分定位于心内膜层以及房室管和流出道部位心腔中的间充质细胞中, 与心内膜垫构成有关。转基因斑马鱼和小鼠胚胎均显示在 EMT 发生时的心内膜以及间充质中存在活化的 β -catenin 信号^[59,60]。 β -catenin 的降解复合体包括 APC、Axin、GSK-3 β 、CK1 等, APC 是一种抑癌基因, 能够负调控 β -catenin 的活性。APC 功能缺失的斑马鱼胚胎由于增强的 β -catenin 活性而产生细胞数过多的心内膜垫^[60]。 β -catenin 的激活在心腔构成的 EMT 过程中发挥重要作用, 内皮特异性失活的 β -catenin 无论在体内还是体外均抑制了 EMT 的发生。Wnt 信号报告基因小鼠证实了 EMT 的发生伴随着 β -catenin/TCF/LEF 转录活性的激活。TGF- β 2 不能够诱导 β -catenin 缺失的 AVC 发生 EMT, 尽管 TGF- β 2 诱导的 Smad 磷酸化正常进行^[61]。表明 β -catenin 也是 TGF- β 2 的下游分子, TGF- β 信号可能和 Wnt 信号相互作用诱导 EMT 的发生。

Wnt 结合到细胞表面的受体卷曲蛋白(Frizzled, Fz), 启动胞内信号转导途径。经典的 Wnt 信号通路中, Wnt 与 Fz 结合后, 作用于胞内的 Dishevelled 蛋白(Dvl), Dvl 可以切断 β -catenin 的降解途径, 从而使 β -catenin 在细胞质中积累, 进入细胞核, 与 T 细胞因子(TCF/LEF)相互作用, 调节下游靶基因的转录^[57]。

2.6 EGF

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在控制心内膜垫中间充质细胞增殖方面起着重要作用。EGF 受体 ErbB1 是 ErbB 家族中的一种, ErbB 是一类受体酪氨酸激酶, 包括 ErbB1/EGFR/HER1、ErbB2/Neu/HER2、ErbB3/HER3 和 ErbB4/HER4。这四种蛋白结合不同的配体, 每个配体对其中的受体具有不同的亲和力, 如 EGF 结合 ErbB1, 而 HB-EGF 结合 ErbB1 和 ErbB4^[6]。

Shp2 是一种蛋白酪氨酸磷酸酶, 作用于 EGF 信号的下游, Shp2 和 EGF 受体(EGFR)突变的小鼠表现出肥厚的瓣膜和心肌肥大^[62]。除此之外, ErbB1、TACE 以及 HB-EGF 的变异也引起半月瓣和房室瓣增厚^[63]。这些数据表明 EGF 信号中多种组分的突变能够导致心脏瓣膜发育异常。HB-EGF 敲除的小鼠胚胎中细胞大量增殖并且伴随着 Smad-1、Smad-5 和 Smad-8 的大量激活, 这些 Smads 介导 BMP 信号通路, 因此 HB-EGF 的失活可能通过增强 BMP 信号来增加细胞增殖水平^[63]。

2.7 NFATc

激活 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFATc)是一种转录因子, 在心内膜层表达。它的激活依赖于钙调蛋白、神经钙蛋白。NFATc 缺失小鼠表现出发育不全的心脏瓣膜以及室间隔缺损。在心内膜垫处仍有间充质细胞的存在表明 NFATc 对于 EMT 的发生不是必要的。当心内膜细胞向间充质细胞转化时, NFATc 表达消失。表明 NFATc 对于 EMT 发生后瓣膜形态发生阶段起着关键的作用^[64,65]。

2.8 NF-1

神经纤维瘤蛋白(neurofibromin, NF-1)是一个具有 GTP 酶活性的蛋白, 它特异性地作用于 Ras, 将 Ras-GTP 形式转化为 Ras-GDP 形式^[66]。NF-1 敲除的小鼠胚胎表现出扩展的心内膜垫^[67], 是由于 Ras 活性水平的异常升高导致的。可见 NF-1 可通过下调 Ras 信号来控制 EMT 过程。研究认为, NFATc 是 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的最可能靶标, 在 NF-1^{-/-} 细

胞中, 升高的 Ras 水平导致 NFATc 转录活性的增加^[68,69]。因而, NF-1 在正常心垫发育过程中可能限制了 NFAT 的活性, 与 Smad6 和 EGF 作用类似, NF-1 负调控心内膜细胞的转化和增殖以维持一种平衡来形成合适大小的功能性的瓣膜小叶。

2.9 HA

心胶的成分也可以调节 EMT 过程中的细胞衍生信号, 透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种葡萄糖胺聚糖, 它不仅仅是细胞外基质的结构成分, 也具有通过 ErbB 受体传递信号的功能^[3]。哺乳动物中有三种 HA 合成酶基因, 即 has1、has2 和 has3。Has2 在 EMT 发生时心垫处的心内膜和间充质细胞中表达。当小鼠体内主要的 HA 合成酶 Has2 缺失时, 心内膜垫完全不能形成。该过程可以通过激活 ErbB 信号来挽救, 也可以添加外源的 HA 或组成型活化的 Ras。通过添加 HA 来挽救 Has2^{-/-} 的 AVC 中 ErbB3 磷酸化水平上升^[70]。目前还不清楚是否是 HA 和 ErbB3 受体直接相互作用。优势负性突变的 Ras 抑制了 HA 挽救的 Has2^{-/-} 移出物发生间充质转化。表明 HA 足以诱导 EMT 发生, 这种诱导可能通过 Ras 信号通路^[71]。这些数据均表明了 HA 在诱导 EMT 发生中的重要作用。

3 心脏瓣膜发育中 EMT 过程的基因网络调控

调控 EMT 发生的各个信号通路不是单独发挥作用的, 它们之间相互协调、相互补偿, 共同形成一个信号网络。像上述所列的那样, EGF 信号负调控细胞增殖和心垫中的 EMT 过程, HB-EGF 的缺失导致 BMP 信号中 Smads 的磷酸化, 说明 EGF 信号可以通过调节 BMP 信号影响 EMT 过程。BMP 信号也可以调控心垫中 TGF- β 的表达, BMP 受体 ALK3 的缺失引起 TGF- β 2 的表达下调。Notch 信号能够通过影响 BMP 和 TGF- β 信号来调控 EMT, 心内膜中 Notch 的抑制也下调心肌中 TGF- β 2 的表达。Notch、BMP、TGF- β 均可以通过诱导转录因子 Snail/Slug 的表达, 下调粘着因子 VE-cadherin 的表达来促进 EMT 的发生。Notch 和 BMP 可能通过 TGF- β 信号, 通过 Smads 介导作用于 Snail/Slug, 也有研究表明 Slug 可以直接应答于 Notch 信号。TGF- β 2 不能诱导 β -catenin 缺失的心脏发生 EMT, 尽管 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平正常。经典的 Wnt 信号中 β -catenin 是 Wnt 的下游蛋白, 但也可以是 TGF- β 2 的下游分子, TGF- β 信号和 Wnt 信号相互作用诱导 EMT 的发生。HA 和 EGF

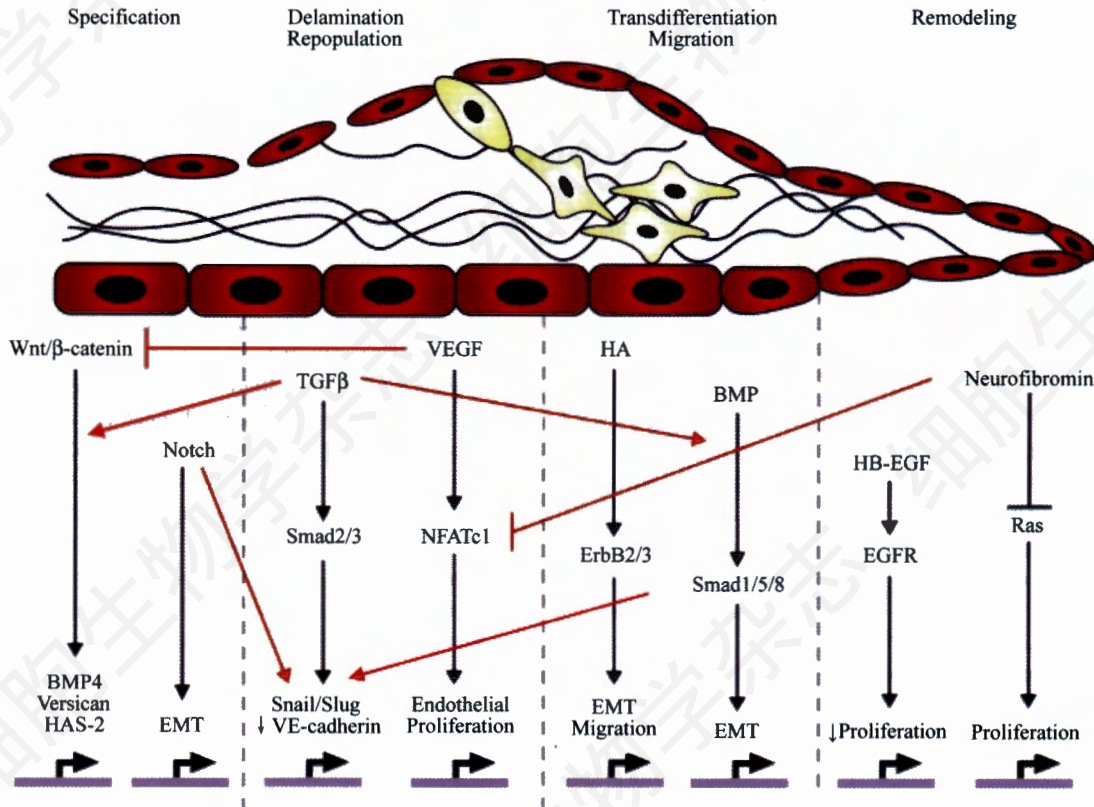


Fig.3 Signaling networks in regulation of EMT process during heart valve development

信号也相互协调影响心垫的间充质细胞转化, 添加 HA 来挽救 Has2 缺失的 AVC 发生 EMT 的过程中呈现 ErbB3 受体的磷酸化水平上升, 表明 ErbB3 的激活也可以是 HA 诱导 EMT 发生路径的下游信号。NF-1 通过抑制 Ras 信号来限制 EMT 的扩展。由此可见, EMT 调控信号网络是个非常复杂而精密的过程, 各个信号分子之间都可能相互影响, 协调完成正常的 EMT 过程(图 3)。

4 展望

发育中的 EMT 过程与肿瘤发生中细胞自发转化相类似, TGF- β 、BMP、Notch、Wnt 等信号在大多数发育过程以及癌变过程中均起着重要作用。研究方法涉及广泛, 通过 Cre/LoxP 系统诱导基因沉默, siRNA 或者基因过表达等方法来对该基因如何进一步影响其他基因的表达进行研究, 模式动物遗传学和体外胶原凝胶实验系统为研究各种因子参与 EMT 过程和心脏形态发生提供了有力的工具。目前对 EMT 发生过程中的细胞和分子机制研究已取得了较大的进步, 但仍有较多工作亟待解决, 今后的研究应该更深入地完善各个信号通路之间的相互关系, 以便对

EMT 发生的整个过程有更全面的认识。

参考文献(References)

- [1] Boyer B, Valle's AM, Edme N. Induction and Regulation of Epithelial-Mesenchymal transitions, *Biol Pharm*, 2000, 60(8): 1091-1099
- [2] Runyan, RB, Markwald RR. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue, *Dev Biol*, 1983, 95 (1): 108-114
- [3] Schroeder JA, Jackson LF, Lee DC, *et al.* Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling, *J Mol Med*, 2003, 81(7): 392-403
- [4] Runyan RB, Heimark RL, Camenisch TD, *et al.* Epithelial-mesenchymal transformation in the embryonic heart. In: Savagner P ed. *Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concept of Epithelial-Mesenchymal Transition*, Austin, TX: Landes Bioscience, 2005, 40-55
- [5] Runyan RB, Mercado-Pimentel ME. Multiple TGF- β isoforms and receptors function during EMT in the embryonic heart, *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3): 146-156
- [6] Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development endothelial cell signaling and differentiation, *Circ Res*, 2004, 95(5): 459-470
- [7] McFadden DG, Olson EN. Heart development: learning from mistakes, *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(3): 328-335
- [8] Bernanke DH, Markwald RR. Migratory behavior of cardiac

- cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system, *Dev Biol*, 1982, 91(2): 235-245
- [9] Wagner M, Siddiqui MAQ. Signal transduction in early heart development (II), *Exp Biol Med*, 2007, 232(7): 866-880
- [10] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-776
- [11] Dor Y, Camenisch TD, Itin A, et al. A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects, *Development*, 2001, 128(9): 1531-1538
- [12] Dor Y, Kiewer SE, McDonald JA, et al. VEGF modulates early heart valve formation, *Anat Rec*, 2003, 271(1): 202-208
- [13] Miquerol L, Gertsenstein M, Harpal K, et al. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele, *Dev Biol*, 1999, 212(2): 307-322
- [14] Hornberger LK. Maternal diabetes and the fetal heart, *Heart*, 2006, 92(8): 1019-1021
- [15] Pinter E, Haigh J, Nagy A, et al. Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation, *Am J Pathol*, 2001, 158(4): 1199-1206
- [16] Enciso JM, Gratzinger D, Camenisch TD, et al. Elevated glucose inhibits VEGF-A-mediated endocardial cushion formation: modulation by PECAM-1 and MMP-2, *J Cell Biol*, 2003, 160(4): 605-615
- [17] Lambrechts D, Carmeliet P. Sculpting heart valves with NFATc and VEGF, *Cell*, 2004, 118(5): 532-534
- [18] Azhar MJ, Schultz Jel, Grupp I, et al. Transforming growth factor β in cardiovascular development and function, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5): 391-407
- [19] Potts JD, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor β , *Dev Biol*, 1989, 134(2): 392-401
- [20] Camenisch TD, Molin DG, Person A, et al. Temporal and distinct TGF β ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis, *Dev Biol*, 2002, 248(1): 170-181
- [21] Boyer AS, Ayerinkas II, Vincent EB, et al. TGF β 2 and TGF β 3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart, *Dev Biol*, 1999, 208(2): 530-545
- [22] Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, et al. TGF β in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis, *Development*, 1990, 108(4): 645-656
- [23] Dickson MC, Slager HG, Duffie E, et al. RNA and protein localisations of TGF- β 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development, *Development*, 1993, 117(2): 625-639
- [24] Potts JD, Vincent EB, Runyan RB, et al. Sense and antisense TGF β 3 mRNA levels correlate with cardiac valve induction, *Dev Dyn*, 1992, 193(4): 340-345
- [25] Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, et al. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes, *Development*, 1997, 124(13): 2659-2670
- [26] Dunker N, Krieglstein K. Tgf β 2^{-/-} Tgf β 3^{-/-} double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality, *Anat Embryol (Berl)*, 2002, 206(1-2): 73-83
- [27] Desgrosellier JS, Mundell NA, McDonnell MA, et al. Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation, *Dev Biol*, 2005, 280(1): 201-210
- [28] Lai YT, Beason KB, Brames GP, et al. Activin receptor-like kinase 2 can mediate atrioventricular cushion transformation, *Dev Biol*, 2000, 222(1): 1-11
- [29] Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, et al. Antibodies to the type II TGF- β receptor block cell activation and migration during atrioventricular cushion transformation in the heart, *Dev Biol*, 1996, 174(2): 248-257
- [30] Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, et al. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart, *Science*, 1999, 283(5410): 2080-2082
- [31] Mercado-Pimentel ME, Hubbard AD, Runyan RB. Endoglin and ALK5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation, *Dev Biol*, 2007, 304(1): 420-432
- [32] Wang J, Sridurongrit S, Dudas M, et al. Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart, *Dev Biol*, 2005, 286(1): 299-310
- [33] Sridurongrit S, Larsson J, Schwartz R, et al. Signaling via the TGF- β type I receptor Alk5 in heart development, *Dev Biol*, 2008, 322(1): 208-218
- [34] Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF- β receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis, *Dev Biol*, 1996, 179(1): 297-302
- [35] Jiao K, Langworthy M, Batts L, et al. TGF- β signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during *in vivo* cardiac development, *Development*, 2006, 133(22): 4585-4593
- [36] Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, et al. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor β 2 sensitivity in transforming growth factor β type III receptor-deficient embryos, *Mol Cell Biol*, 2003, 23(12): 4371-4385
- [37] Sorensen LK, Brooke BS, Li DY, et al. Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGF- β coreceptor, *Dev Biol*, 2003, 261(1): 235-250
- [38] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 155-166
- [39] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 76-83
- [40] Keyes WM, Logan C, Parker E, et al. Expression and function of bone morphogenetic proteins in the development of the embryonic endocardial cushions, *Anat Embryol (Berl)*, 2003, 207(2): 135-147
- [41] Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development, *Development*, 1996, 122(10): 2977-2986
- [42] Sugi Y, Yamamura H, Okagawa H, et al. Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice, *Dev Biol*, 2004, 269(2): 505-518
- [43] Choi M, Stottmann RW, Yang YP, et al. The bone morphogenetic protein antagonist noggin regulates mammalian cardiac

- morphogenesis, *Circ Res*, 2007, 100(2): 220-228
- [44] Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in Bmp5; Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup, *Development*, 1999, 126(8): 1753-1768
- [45] Kim RY, Robertson EJ, Solloway MJ. Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart, *Dev Biol*, 2001, 235(2): 449-466
- [46] Gaussin V, Van de Putte T, Mishina Y, et al. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 2878-2883
- [47] Inai K, Norris RA, Hoffman S, et al. BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis, *Dev Biol*, 2008, 315(2): 383-396
- [48] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell*, 2003, 113(6): 685-700
- [49] Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, et al. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system, *Nat Genet*, 2000, 24(2): 171-174
- [50] Niessen K, Karsan A. Notch signaling in cardiac development, *Circ Res*, 2008, 102(10): 1169-1181
- [51] Grego-Bessa J, Diez J, Timmerman L, et al. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw, *Cell Cycle*, 2004, 3(6):718-721
- [52] Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation, *Genes Dev*, 2004, 18(1): 99-115
- [53] Romano LA, Runyan RB. Slug is an essential target of TGF- β 2 signaling in the developing chicken heart, *Dev Biol*, 2000, 223(1): 91-102
- [54] Niessen K, Fu YX, Chang L, et al. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization, *J Cell Biol*, 2008, 182(2): 315-325
- [55] 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, *Circ Res*, 2007, 100(6): 856-863
- [56] Fischer A, Schumacher N, Maier M, et al. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development, *Genes Dev*, 2004, 18(8): 901-911
- [57] Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease, *Cell*, 2006, 127(3): 469-480
- [58] Huang H, He X. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights, *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(2): 119-125
- [59] Gitler AD, Lu MM, Jiang YQ, et al. Molecular markers of cardiac endocardial cushion development, *Dev Dynam*, 2003, 228(4): 643-650
- [60] Hurlstone AF, Haramis AP, Wienholds E, et al. The Wnt/ β -catenin pathway regulates cardiac valve formation, *Nature*, 2003, 425(6958): 633-637
- [61] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, et al. β -Catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse, *J Cell Biol*, 2004, 166(3): 359-367
- [62] Chen B, Bronson RT, Klamann LD, et al. Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis, *Nat Genet*, 2000, 24(3): 296-299
- [63] Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, et al. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling, *EMBO J*, 2003, 22(11): 2704-2716
- [64] de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum, *Nature*, 1998, 392(6672): 182-186
- [65] Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation, *Nature*, 1998, 392(6672): 186-190
- [66] Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP, *Cell*, 1990, 62(3): 599-608
- [67] Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues, *Genes Dev*, 1994, 8(9): 1019-1029
- [68] Gitler AD, Zhu Y, Ismat FA, et al. Nf1 has an essential role in endothelial cells, *Nat Genet*, 2003, 33(1): 75-79
- [69] Ichida M, Finkel T. Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes, *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3524-3530
- [70] Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, et al. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors, *Nat Med*, 2002, 8(8): 850-855
- [71] Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme, *J Clin Invest*, 2000, 106(3): 349-360

Signaling Regulation of EMT Process in Early Heart Valve Development

Na Xu, Chao-Jun Li*

(*Model Animal Research Center of Nanjing University, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

Abstract Heart valves and the membranous interventricular septum arise from embryonic endocardial cells by epithelial-mesenchymal transformation (EMT), which requires the corporation of many signaling pathways. EMT is triggered by inductive stimulus like TGF- β and BMP that are produced by the adjacent myocardium lying at heart atrioventricular canal (AVC) and outflow tract (OFT) regions. Studies have confirmed that VEGF, Notch, Wnt and some transcriptional factors like NFATc participate in the regulation of EMT. The abnormal expression of these genes may cause the abnormal EMT events and lead to congenital cardiac defects. At present, the research about EMT has been broadly conducted, but the complicated signaling mechanisms involved in EMT are still unclear. To clarify the physiological and pathological significance of the signaling pathways involved in EMT, we reviews the main signaling pathways and the molecular and cellular mechanisms in the EMT process during early heart valve development.

Key words heart valve development; EMT; signaling regulation

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-83596289, E-mail: licj@nju.edu.cn