

杨中州, 南京大学教授, 1994年北京大学医学部获得医学硕士学位, 2004年在瑞士巴塞尔大学以最优等荣誉(Summa Cum Laude)获得博士学位, 之后从事博士后研究。2005年底加入南京大学模式动物研究所, 任职教授, 开展独立研究工作。2018年底加入南京大学医学院。2007年作为首席科学家承担科技部心血管发育研究的重大科学研究计划。2012-2014年担任南京大学模式动物研究所所长。2017年被推选为中国细胞生物学学会发育分会会长。目前还担任中国细胞生物学学会常务理事、国家心血管病专家委员会先心病专业委员会常委。主要研究方向是利用小鼠模型阐述胚胎期心脏发育与出生后心肌重塑及再生的调控机制。

<https://med.nju.edu.cn/92/63/c10880a365155/page.htm>

心脏发育过程中的细胞命运转变及命运决定

杨中州*

(南京大学医学院, 模式动物研究所, 南京 210093)

摘要 胚胎发育过程中, 心脏发生起源于生心中胚层(cardiac mesoderm)。在小鼠早期胚胎(E6.5), 上胚体(epiblast)在低浓度Nodal诱导下, Eomes出现并激活Mesp1表达。Mesp1作为主调控者(master regulator), 激活一系列生心关键转录因子及生心特异基因的表达, 促进生心祖细胞的特化及生心区(cardiac field)的形成。之后的心脏形态发生涉及细胞命运的转变, 包括流出道分隔过程中神经嵴细胞向间充质细胞转变、内皮细胞向间充质转变及房室通道发育过程中的内皮细胞向间充质转变。最新的研究表明, 流出道在分隔成为主动脉和肺动脉根部之前, 其中的细胞命运已经被预先设定。此综述文章重点探讨生心祖细胞特化、细胞命运转变与命运预先设定等方面的新进展, 调控机制及争议问题。

关键词 心脏发育; 生心祖细胞特化; 细胞命运转变; 细胞命运决定

Cell Fate Transition and Determination in Heart Development

YANG Zhongzhou*

(School of Medicine and Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Cardiogenesis originates from the cardiac mesoderm during early embryonic development. In the murine embryo, the transcription factor Eomes appears to activate the transcription of *Mesp1* in the epiblast at E6.5. *Mesp1* as a master regulator, induces a panel of cardiac specific transcription factors as well as other cardiac genes that are essential for heart development, which facilitates the specification of cardiac progenitors and formation of the cardiac field. Subsequently, cardiac morphogenesis involves cell fate transition including neural crest cell transition into mesenchymal cells during OFT (outflow tract) septation and EnMT (endothelial to mesenchymal transition) in atrio-ventricular canal development. The latest study demonstrates that the cell fate has been pre-determined

国家自然科学基金(批准号: 91519312、81741003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-83592264, E-mail: zhongzhouyang@nju.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91519312, 81741003)

*Corresponding author. Tel: +86-25-83592264, E-mail: zhongzhouyang@nju.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:26:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1036.016.html>

prior to OFT septation into the base of aorta and pulmonary artery. In this review, we discuss the new findings of cardiac specification, cell fate transition and pre-determination with underlying regulatory mechanisms. Meanwhile, some special issues of controversy will be introduced.

Keywords heart development; cardiac progenitor specification; cell fate transition; cell fate determination

1 生心祖细胞特化及生心区形成

小鼠是研究哺乳类动物胚胎心脏发育的极佳模式动物,可以帮助理解人胚胎心脏发育过程和调控机制,并为认识人类先天性心脏病发生发展提供参考价值。在心脏结构方面,小鼠和人类心脏相似。小鼠心脏发育过程短暂,适于短期观察和研究^[1-2]。在小鼠胚胎发育的第7.0天(E7.0)左右,原肠发生(gastrulation)即将完毕,内中外三个胚层也已形成,之后开始器官发生(organogenesis)^[3-4]。心脏是首先开始发育的器官,起始于生心中胚层(cardiac mesoderm)。目前对生心中胚层形成调控机制的认识主要应该来自牛津大学Elisabeth Robertson教授实验室的工作^[5]。他们发现在E6.5天时,上胚体(epiblast)在低浓度Nodal诱导下,Eomes出现并激活Mesp1表达。Mesp1作为主调控者(master regulator),激活一系列生心关键转录因子及生心特异基因的表达,促进生心祖细胞的特化及生心区(cardiac field)的形成。Mesp1直接激活的生心关键转录因子及生心特异基因有Nkx2-5、Gata4、Hand2、Mef2c、Tbx5、Foxc1、Foxc2、Foxh1及Myocardin等^[6-8]。

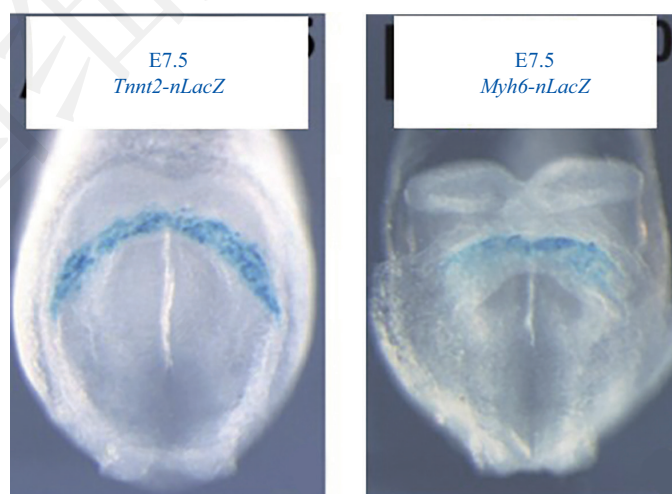
观察生心区是否形成,可以通过全胚胎原位杂交(whole mount *in situ* hybridization, WISH)的方法,检测特异标志基因,比如Nkx2-5及Myh7(编码MLC2a蛋白)的表达。最近,美国Mount Sinai医学院的Chen Leng Cai博士实验室^[9]制备了两个转基因小鼠,分别利用Tnnt2(编码心肌特异cTNT蛋白)及Myh6(编码心肌特异aMHC蛋白)两个基因的启动子驱动nLacZ基因的表达,研究发现,LacZ基因在E7.5的生心区有显著的表达(图1)。

长期以来,这些蛋白(Nkx2-5、MLC2a、cTNT及aMHC)被认为只在心肌细胞中特异表达,其中Nkx2-5调控心肌细胞分化,而MLC2a、cTNT及aMHC则调控心肌纤维收缩^[10-14]。

这些基因在生心区的表达模式带来了两个问题:

- (1)它们在生心区祖细胞中的功能是什么?
- (2)它们可以作为心肌细胞分化的标志吗?

生心区祖细胞是不会跳动的,那么这些传统上被认为调控心肌纤维收缩蛋白在生心区祖细胞中发挥怎样的功能?这个问题有待于将来深入探讨。



LacZ基因分别被Tnnt2及Myh6启动子驱动表达,其编码蛋白特异地定位于生心区。

The expression of LacZ is driven by Tnnt2 and Myh6 enhancer, respectively, and the coding protein is specifically localized in the cardiac crescent.

图1 全胚胎原位杂交(WISH)检测E7.5天小鼠胚胎中LacZ基因的表达(蓝色)(根据参考文献[9]修改)

Fig.1 Whole mount *in-situ* hybridization examination of LacZ expression (blue) in the E7.5 mouse embryos (modified from reference [9])

胚胎干细胞或iPS体外诱导分化产生心肌细胞,具有多种用途。在诱导分化过程中, *Myh6*及*Tnnt2*的表达常常被认为是心肌细胞分化的标志。成纤维细胞重编程过程(GMT方法: *GATA4/MEF2C/TBX5*; GHMT方法: *GATA4/Hand2/MEF2C/TBX5*)亦将它们的表达作为成功重编程至心肌细胞。显然,这种做法有失严谨,不足以表明所产生的就是心肌细胞^[15-16]。

另外,上述这些基因(*Nkx2-5*、*Myl2*、*Myh6*及*Tnnt2*)胚胎心脏发育的起源——生心区祖细胞中即开始表达,并且一直在胚胎心脏持续表达至出生,甚至出生后一直在心肌细胞中表达。它们在生心区祖细胞、心肌祖细胞、心肌前体细胞及成熟心肌细胞中功能的差异也有待于深入地阐述。在早期心脏中, cTNT蛋白位于细胞膜及胞质中,而一旦肌纤维开始组装,它便重新定位于肌纤维中。这种细胞中分布的特征提示它在心肌细胞发育的不同时期发挥不同的功能。

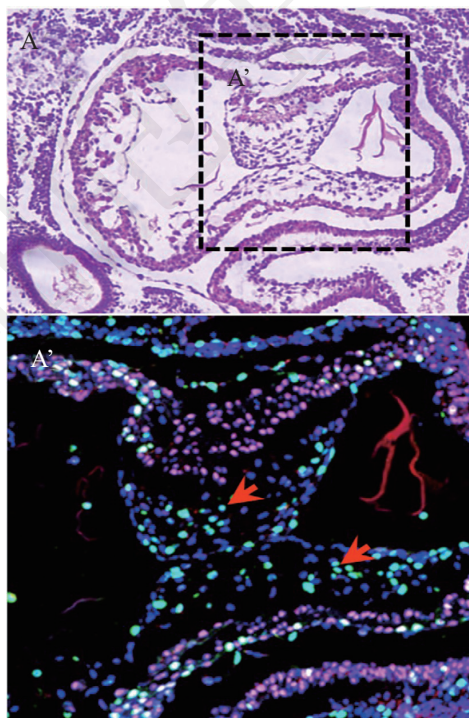
2 心脏形态发生过程中的细胞命运转变

心脏形态发生涉及细胞命运的转变,包括流出

道分隔过程中神经嵴细胞向间充质细胞转变、内皮细胞向间充质转变(endothelial to mesenchymal transition, EnMT)及房室通道发育过程中的内皮细胞向间充质转变(EnMT)^[17-19]。

目前,对房室通道发育过程中EnMT调控机制所知相对较多,因为此过程与上皮到间充质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)类似^[20]。在小鼠胚胎发育的E9.5,房室通道(atrio-ventricular canal, AVC)心内膜的内皮细胞发生命运转变,转分化成为间充质细胞并进入心内膜与心肌层之间的基质(jelly)中,逐步形成AVC的心内膜垫(endocardial cushion),并经过重塑之后最终发育成为心房和心室之间的瓣膜(valve)。AVC心内膜EnMT障碍或异常会导致房室瓣膜发育的畸形,影响心功能的正常发挥,导致严重的后果。下图显示小鼠胚胎E9.5 AVC的细胞组成和组织结构(图2)。

EnMT调控机制研究的新进展:心内膜内皮细胞中的脂肪酸氧化调控EnMT^[21]。去年,有研究报道首次发现,心内膜内皮细胞中的脂肪酸氧化(fatty



A: HE染色。A': 房室通道心内膜垫(AVC cushion)。下图为A'部分的免疫荧光染色结果。紫色为Nkx2-5,显示心肌细胞;绿色为BrdU染色,显示增殖的细胞。箭头所指为增殖的间充质细胞,来自心内膜内皮细胞,经EnMT转分化而来。

A: HE staining. A': the atrio-ventricular canal (AVC) cushion. The panel below is the immunofluorescence staining of the area in A'. Nkx2-5 is in purple for cardiomyocytes; BrdU is in green to display cell proliferation. Arrows indicate the proliferating mesenchymal cells that are derived from endocardial cells through EnMT.

图2 小鼠胚胎房室通道的结构及细胞组成(E9.5)

Fig.2 Structural and cellular components of the atrio-ventricular canal in mouse embryo at E9.5

acid oxidation, FAO)对维持内皮细胞命运至关重要,降低FAO水平会诱导EnMT,促进内皮细胞向间充质细胞转分化^[22-23]。

至于FAO的降低如何导致EnMT,尚需更加深入的机制探讨。

心脏流出道发育过程中存在两种细胞命运转变。其一,神经嵴细胞向间充质细胞转变,其中的细胞生物学行为及调控机制所知甚少。其二,流出道内膜内皮细胞向间充质转变(EnMT),该过程与AVC EnMT类似^[24-25]。

除此之外,心脏流出道发育过程中可能也存在新的细胞命运转变。流出道的形态发生依赖于第二心场祖细胞的贡献,这些祖细胞经过增殖后迁移至流出道,促进流出道变长变粗(形态发生, morphogenesis)。最近,有三个实验室报道第二心场祖细胞在向流出道迁移的过程中,其细胞命运发生改变,开始获得上皮细胞特征,包括细胞极性及黏附连接等,提示由某种细胞命运向上皮细胞的转变^[26-29]。

3 流出道分隔之前的细胞命运预先设定

流出道的形态发生为下一步的分隔发育(septation)打下基础,分隔发育将单一管道流出道分隔成为主动脉和肺动脉根部的两根管子。此过程对体循环和肺循环的建立必不可少^[25]。

对心脏流出道分隔过程的调控所知甚少,尤其在细胞生物学调控机制方面。我们不知道在流出道分隔之前,肺动脉和主动脉根部的细胞命运是否已经被决定。

法国Buckingham教授实验室^[30-31]早期利用转基因小鼠的方法,发现肺动脉和主动脉根部心肌细胞的命运可能被预示(prefigure)。我们在流出道分隔之前的细胞命运决定方面开展了一些研究,首先我们发现,主动脉和肺动脉根部的发育可能具备不同的调控模式:基因突变小鼠的主动脉根部发育正常,而肺动脉根部发育则大大受阻。进一步利用可诱导谱系示踪方法,我们发现,两波第二心场祖细胞及它们的衍生细胞对主动脉和肺动脉根部有差异和偏向性的贡献。第一波祖细胞在E7.5的时候偏向贡献于主动脉根部,而第二波祖细胞及衍生细胞在E8.5天后偏向贡献于肺动脉。PDK1可能是调控第二波祖细胞及衍生细胞发育的重要调控蛋白,剔除*Pdk1*后导致这些细胞发育受损,引起肺动脉发育不良(肺动

脉狭窄)^[32]。这些研究工作表明,肺动脉和主动脉根部的细胞命运在分隔之前(E12.5)已经被决定,该研究对理解主动脉和肺动脉疾病(主动脉夹层及肺动脉狭窄)等具有帮助作用。

4 展望

心脏发育首先发生而且心脏又是最早行使功能的器官,研究心脏发育对理解器官发生具有重要的意义。心脏发育过程涉及复杂多样的细胞命运转变和命运决定,它们是发育生物学的热点内容,随着新技术和新知识的更新,我们有望在单细胞水平、代谢水平和细胞器水平重新理解其中的调控机制,为认识和治疗心脏发育缺陷和先天性心脏病提供指导作用。

参考文献 (References)

- 1 Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008; 451(7181): 943-8.
- 2 Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 2002; 3(7): 544-56.
- 3 Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 2007; 8(5): 368-81.
- 4 Lu CC, Brennan J, Robertson EJ. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(4): 384-92.
- 5 Costello I, Pimeisl IM, Drager S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ. The T-box transcription factor eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol* 2011; 13(9): 1084-91.
- 6 Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 1999; 126(15): 3437-47.
- 7 Bondué A, Blanpain C. *Mesp1*: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res* 2010; 107(12): 1414-27.
- 8 Bondué A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, *et al.* *Mesp1* acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* 2008; 3(1): 69-84.
- 9 Yan J, Zhang L, Sultana N, Oh JG, Wu B, Hajjar RJ, *et al.* A series of robust genetic indicators for definitive identification of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 97: 278-85.
- 10 Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, *et al.* Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 1995; 9(13): 1654-66.
- 11 Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor *Csx/Nkx2-5*: its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther* 2005; 107(2): 252-68.
- 12 Bartman T, Hove J. Mechanics and function in heart morphogenesis. *Dev Dyn* 2005; 233(2): 373-81.
- 13 Nishii K, Morimoto S, Minakami R, Miyano Y, Hashizume K,

- Ohta M, *et al.* Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. *Dev Biol* 2008; 322(1): 65-73.
- 14 Jiang J, Wakimoto H, Seidman JG, Seidman CE. Allele-specific silencing of mutant Myh6 transcripts in mice suppresses hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 2013; 342(6154): 111-4.
- 15 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 16 Nam YJ, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth K, West K, *et al.* Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(14): 5588-93.
- 17 Kirby ML, Waldo KL. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 1995; 77(2): 211-5.
- 18 Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99(9): 1375-9.
- 19 Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004; 18(1): 99-115.
- 20 de la Pompa JL, Epstein JA. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Dev Cell* 2012; 22(2): 244-54.
- 21 Lovisa S, Kalluri R. Fatty acid oxidation regulates the activation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Trends Mol Med* 2018; 24(5): 432-4.
- 22 Xiong J, Kawagishi H, Yan Y, Liu J, Wells QS, Edmunds LR, *et al.* A metabolic basis for endothelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell* 2018; 69(4): 689-98, e7.
- 23 Xiong J. Fatty acid oxidation in cell fate determination. *Trends Biochem Sci* 2018; 43(11): 854-7.
- 24 Kovacic JC, Dimmeler S, Harvey RP, Finkel T, Aikawa E, Krenning G, *et al.* Endothelial to mesenchymal transition in cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(2): 190-209.
- 25 Neeb Z, Lajiness JD, Bolanis E, Conway SJ. Cardiac outflow tract anomalies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013; 2(4): 499-530.
- 26 Li D, Sinha T, Ajima R, Seo HS, Yamaguchi TP, Wang J. Spatial regulation of cell cohesion by Wnt5a during second heart field progenitor deployment. *Dev Biol* 2016; 412(1): 18-31.
- 27 Sinha T, Wang B, Evans S, Wynshaw-Boris A, Wang J. Disheveled mediated planar cell polarity signaling is required in the second heart field lineage for outflow tract morphogenesis. *Dev Biol* 2012; 370(1): 135-44.
- 28 Ramsbottom SA, Sharma V, Rhee HJ, Eley L, Phillips HM, Rigby HF, *et al.* Vangl2-regulated polarisation of second heart field-derived cells is required for outflow tract lengthening during cardiac development. *PLoS Genet* 2014; 10(12): e1004871.
- 29 Francou A, Saint-Michel E, Mesbah K, Kelly RG. TBX1 regulates epithelial polarity and dynamic basal filopodia in the second heart field. *Development* 2014; 141(22): 4320-31.
- 30 Bajolle F, Zaffran S, Kelly RG, Hadchouel J, Bonnet D, Brown NA, *et al.* Rotation of the myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries. *Circ Res* 2006; 98(3): 421-8.
- 31 Bajolle F, Zaffran S, Meilhac SM, Dandonneau M, Chang T, Kelly RG, *et al.* Myocardium at the base of the aorta and pulmonary trunk is prefigured in the outflow tract of the heart and in subdomains of the second heart field. *Dev Biol* 2008; 313(1): 25-34.
- 32 Jin H, Wang H, Li J, Yu S, Xu M, Qiu Z, *et al.* Differential contribution of the two waves of cardiac progenitors and their derivatives to aorta and pulmonary artery. *Dev Biol* 2019; 450(2): 82-9.