



王永煜, 温州医科大学基础医学院研究员, 博士生导师。2005年获得北京大学医学部病理学与病理生理学博士学位。曾在美国德州大学西南医学中心、密歇根大学等进行过博士后训练与访学, 担任依利诺伊大学(UIC)药理学系研究助理教授。以第一作者或通讯作者身份在*AJHG*、*Biomaterials*、*JBC*等杂志上发表论文23篇, 被引用次数超过800。主持国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等科研项目共9项。现为国家自然科学基金评审专家, *Gene Therapy*、中华细胞与干细胞杂志编辑, 多本SCI杂志审稿人。主要研究方向为干细胞与心血管疾病及再生。通过应用iPSC重编程及定向诱导分化技术, 探索心血管疾病的发病机制及细胞命运决定的分子调控机制。

人胚胎干细胞定向中胚层细胞分化的 miRNA-mRNA网络调控

杨继文 权颖怡 张欢 王永煜*

(温州医科大学基础医学院, 温州 325035)

摘要 胚胎来源的中胚层细胞可以分化为心血管、血液和肌肉组织等多种类型细胞, 而应用人胚胎干细胞分化为中胚层细胞的体外模型可为研究中胚层及其衍生的细胞谱系的分子调控机制提供重要手段。miRNA调控基因的表达通过多条信号通路参与中胚层细胞分化, 但其调控机制虽有相关研究却并未完全阐明, 特别是从整体水平上探索基因与非编码RNA表达变化及其相互作用的网络调控。该研究根据生物信息学分析, 构建通过调节多条信号通路参与人胚胎干细胞向中胚层分化的潜在miRNA-mRNA调控网络, 以便更全面地阐明人胚胎干细胞的分化机制。通过基因芯片和二代测序(RNaseq)技术检测筛选人胚胎干细胞诱导分化为中胚层细胞过程差异表达的miRNA和基因, 并应用生物信息学分析预测差异表达miRNA的靶基因, 将靶基因与差异表达基因取交集获得目标基因。同时, 对差异表达基因和目标基因进行GSEA富集、GO注释及KEGG富集分析。最后, 构建miRNA-mRNA的调控网络和筛选出关键基因并检测关键基因的表达。该研究共筛选出287个差异表达的miRNA和739个差异表达基因, 预测差异表达miRNA的靶基因为13 064个, 13 064个靶基因与739个差异表达基因取交集共获得目标基因401个。GSEA和KEGG富集分析发现, 多条参与中胚层分化的信号通路, 主要涉及Wnt/ β -catenin、TGF- β 和Hippo三条重要的信号通路。通过构建miRNA-mRNA调控网络, 结果显示100个miRNA靶向Wnt/ β -catenin通路中的11个基因, 59个miRNA靶向TGF- β 通路中的7个基因, 有106个miRNA靶向Hippo通路中的10个基因。通过RT-qPCR验证三条通路中关键基因的表达。因此, 该研究揭示了在中胚层分化过程中, Wnt/ β -catenin、

收稿日期: 2021-01-26 接受日期: 2021-03-25

国家自然科学基金(批准号: 82070487、81670454)和浙江省自然科学基金(批准号: LY21C120003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13676493931, E-mail: yywangut@163.com

Received: January 26, 2021 Accepted: March 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82070487, 81670454) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY21C120003)

*Corresponding author. Tel: +86-13676493931, E-mail: yywangut@163.com

TGF- β 和Hippo信号通路起了重要的调控作用,可能通过与各种miRNA-mRNA相互作用形成复杂的网络调控系统,精确调控人胚胎干细胞定向分化为中胚层细胞。

关键词 人胚胎干细胞;中胚层;分化;生物信息学;信号通路;miRNA-mRNA相互作用;靶基因

miRNA-mRNA Network Regulation of Mesodermal Differentiation from Human Embryonic Stem Cells

YANG Jiwen, QUAN Yingyi, ZHANG Huan, WANG Yongyu*

(School of Basic Medical Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract The embryonic mesoderm cells can differentiate into different types of cells, such as cardiovascular, blood and muscle cells, and the hESCs (human embryonic stem cells)-induced mesoderm differentiation provides an important *in vitro* model to study the molecular mechanisms of differentiation for mesoderm and its derived cells. The expression of miRNA-regulated genes participates in mesoderm cell differentiation through a variety of signaling pathways. Although some regulatory mechanisms of the mesoderm cell differentiation have been revealed, they have not been fully elucidated. Especially, the systemic analysis of expression changes of genes and non-coding RNA, as well as their interaction network. To better understand the mesoderm differentiation mechanisms from hESCs, this study established a potential miRNA-mRNA regulatory network that participates in the mesoderm differentiation from hESCs by regulating multiple signal pathways through bioinformatic analysis. This study first applied second-generation sequencing technology (RNAseq) and microarray to detect and screen the differently expressed miRNAs and protein coding genes during the mesoderm cells differentiation from hESCs. Furthermore, GSEA enrichment, GO annotation and KEGG enrichment analysis were performed. Finally, miRNA-mRNA regulatory network was established and key genes were screened, and further confirmed. As a result, a total of 287 and 739 differently expressed miRNAs and genes were identified, respectively. There are 13 064 target genes were predicted from 287 differentially expressed miRNAs. In total, 401 desired genes were obtained by the overlap of 13 064 target genes and 739 differentially expressed genes. GSEA and KEGG analysis showed that these changed genes were involved in many signaling pathways, including Wnt/ β -catenin, TGF- β and Hippo signaling pathways. And the miRNA-mRNA regulatory network of the three key signaling pathways were further constructed, showing that 11 genes of Wnt/ β -catenin pathway were targeted by 100 miRNAs, 7 genes of the TGF- β pathway were targeted by 59 miRNAs, and 10 genes of the Hippo pathway were targeted by 106 miRNAs. Finally, the expression of some key genes from these three pathways was verified by RT-qPCR. In summary, this study reveals that the Wnt/ β -catenin, TGF- β and Hippo signaling pathways play an important regulatory role in the process of mesodermal differentiation from hESCs, which may form a complex network with various miRNA-mRNAs and precisely regulate the mesodermal cell differentiation.

Keywords human embryonic stem cells; mesoderm; differentiation; bioinformatics; signaling pathways; miRNA-mRNA interaction; target genes

多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC)具有在未分化状态下培养的无限增殖潜能(自我更新),并且具有分化为外、中、内三个胚层的能力(多能性)^[1]。其中,中胚层可进一步分化为多种不同组织细胞类型,包括肌肉骨骼系统的骨、软骨和肌肉,心血管系统

的心脏、血液和血管以及遍布全身的结缔组织等^[2]。应用多能干细胞定向诱导中胚层分化体系,不仅可以深入研究中胚层分化的分子调控机制,而且可以将分化的中胚层细胞及其衍生细胞应用于以细胞为基础的再生治疗,为疾病治疗和受损器官修复提

供新的治疗手段。例如, 将人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)衍生的心肌细胞应用于心梗的猴子, 可以使梗死的心脏部分功能恢复^[3]。研究表明, 参与PSCs定向分化为中胚层的调控机制很多, 包括多条重要信号通路Wnt、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、TGF- β 等参与调控^[4]。激活Wnt和BMP4通路可诱导人胚胎干细胞进入中胚层谱系, 随后的Wnt活性水平决定了心肌细胞和非心肌细胞的命运^[5]。此外, 在表观遗传水平对中胚层细胞的分化也有重要调控作用, 例如, 抑制EZH2可通过减少H3K27me3促进人胚胎干细胞分化为中胚层^[6]。也有研究表明, 非编码RNA(如miRNA, lncRNA)在多能干细胞分化为中胚层过程中也有重要的调控作用^[7]。

miRNA(microRNA)是内源性非编码RNA, 约22 nt, 在转录后水平调控基因表达^[8], 参与生长发育、增殖、凋亡以及在各种疾病的发生发展, 在细胞命运决定和分化中也起着重要的作用^[9]。例如, 在胚胎干细胞分化为中胚层过程中, 两种肌肉特异性miR-1和miR-133通过沉默非肌肉基因而促进中胚层肌肉细胞系的分化^[10]。miRNA还可以通过多种信号转导通路调节mRNA的表达, 如has-miR-335激活Wnt和TGF- β 信号通路调节BRACHYURY、GATA4和NKX2-5(心脏分化标记基因)的表达从而促进心脏中胚层和祖细胞分化^[11]。miR-302d通过抑制Hippo通路中的LATS2促进人多能干细胞衍生的心肌细胞的增殖^[12]。因此, miRNA可通过信号通路靶向多种mRNA参与胚胎干细胞分化中胚层过程中的调控。然而, 在多能干细胞定向分化为中胚层细胞的过程中, miRNA表达谱的整体变化以及与其靶向的基因之间的调控网络尚不清楚。探索这些问题, 不仅可以丰富中胚层细胞分化的表观遗传水平上的miRNA调控机制的理论, 还可为阐明miRNA与基因表达调控网络提供重要线索, 而且对多能干细胞在再生医学中的应用提供理论基础。

本研究采用诱导人胚胎干细胞定向分化为中胚层细胞方法, 并通过RNA测序(RNAseq)和基因芯片技术及生物信息学分析手段, 揭示miRNA、整体基因表达及关键信号通路的变化, 拟探索Wnt/ β -catenin、TGF- β 和Hippo信号通路与miRNA网络调控的关系, 为了解胚胎干细胞分化为中胚层的调控网络提供重要的新见解。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胚胎干细胞(hESCs)、H1细胞系培养于Matrigel (Corning)包被的含多能干细胞Nuwacell培养基(中盛溯源)的培养皿中, 放置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养。每天更换培养基, 4~5天用Versene(Gibco)溶液进行消化传代。定向诱导人胚胎干细胞向中胚层细胞(ME)分化: 细胞贴壁24 h更换中胚层诱导分化培养液, 包括: DMEM/F-12(Gibco)、Neurobasal medium(Gibco)、N-2 Supplement (100 \times) (Gibco)、Supplement B27 Minus Vitamin A (50 \times) (Gibco)、2-Mercaptoethanol(Sigma)、BMP4(R&D)、CP21R7(MCE), 持续诱导48 h后收取样本。

1.2 microRNA测序和基因芯片

收集人胚胎干细胞(day1)及分化为中胚层细胞过程中(day3)的总RNA样本, 进行高通量测序和芯片分析, 由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.3 差异表达miRNA和差异基因的筛选

从高通量数据中筛选同时满足 $|\log_2FC|>1$ 和 $P<0.05$ 的差异表达miRNA(DE-miRNA)和差异表达基因。根据 P 值和差异倍数, 构建miRNA和mRNA表达谱的火山图以便更直观地了解差异表达情况。

1.4 基因富集分析(GSEA)

使用GSEA2-2.2.3(JAVA版本)进行分析, 在GSEA结果中, ES(enrichment score)表示GSEA基因富集评分, NES(normalized enrichment score)表示归一化后的基因富集评分, FDR(false discovery rates)是多重假设检验校正后的 P 值, GSEA根据 $|NES| \geq 1.0$ 、 $P<0.05$ 及 $FDR<0.25$ 对结果进行过滤。

1.5 差异表达miRNA下游靶基因的预测

TargetScan和Miranda是miRNA靶基因预测的网站, 可以根据两个网站预测miRNA的下游靶基因, 将阈值设定为TargetScan_score ≥ 50 和Miranda_Energy <-20 , 最后取两者预测结果的交集。

1.6 差异表达miRNA的目标基因GO功能注释和KEGG途径富集分析

OmicStudio tools(<https://www.omicstudio.cn/tool>)是组学绘图通用的在线工具, 将差异表达基因和差异表达miRNA的预测靶基因进行数据处理, 绘制韦恩图, 交集即为目标基因。将目标基因进行基因富集分析, 对H1细胞向中胚层分化过程差异表达miRNA的靶向目标基因进行基因本体论数据库

(gene ontology, GO)功能注释和KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)信号通路富集分析。其中GO分析包括3类: 生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。KEGG是预测差异表达基因潜在生物学功能的有效方法, KEGG分析还可用于为差异表达的mRNA提供注释信息, 作为信号转导和疾病途径以及基因途径和功能研究的背景知识。在GO和KEGG分析中, $P < 0.05$ 作为筛选标准。

1.7 实时定量PCR

TRIzol[®]试剂(Thermo Scientific)提取细胞总RNA, 使用逆转录RT试剂盒(TaKaRa)将总RNA(1 μ g)反转录为cDNA。以上述cDNA为模板, 用SYBR[®]试剂(Bio-Rad)在ABI Step One Plus PCR仪上进行PCR反应检测。使用*GAPDH*作为内参, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理实时定量PCR数据。

1.8 统计学分析

数据分析及相关作图用GraphPad Prism 8.3软件完成。数据对比分析用Two-Tailed *t* test, 数值展现为平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)。图中* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 人胚胎干细胞定向中胚层细胞的分化

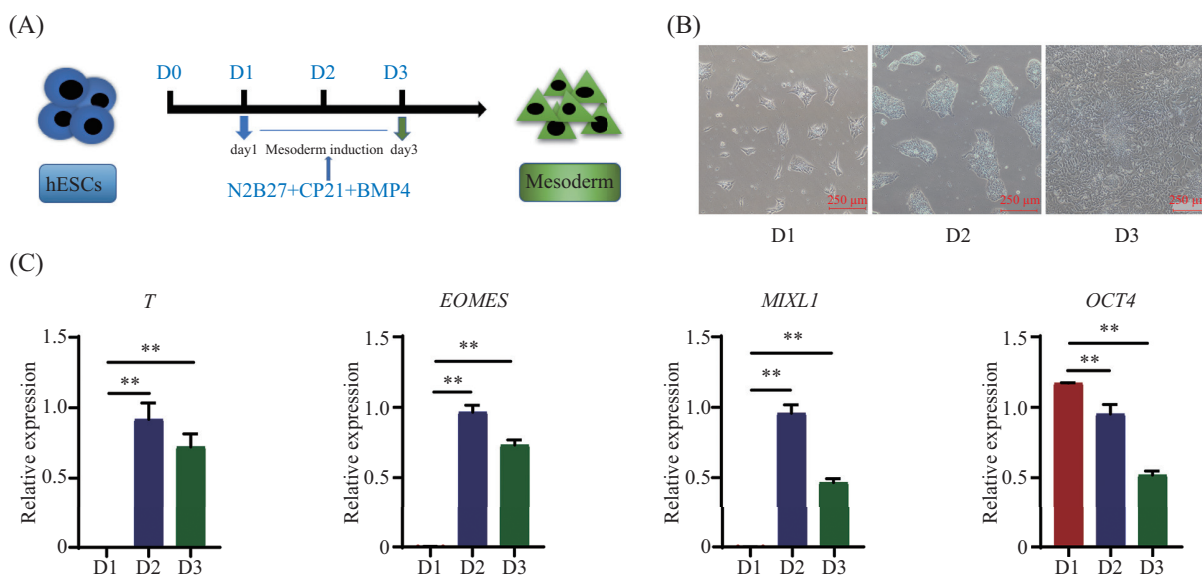
人胚胎干细胞能被诱导分化为各种细胞类型。本实验采用已经发表的分化方案来定向中胚层细胞分化^[13]。使用GSK3 β 抑制剂CP21R7(10 μ mol/L)和BMP4(25 ng/mL)持续诱导48 h, 将人胚胎干细胞分化为中胚层细胞(图1A和图1B)。分化过程中, 可以观察到中胚层标记基因*T*、*EOMES*、*MIXL1*的表达显著增加, 而多能性基因*OCT4*显著降低(图1C), 表明本实验中胚层分化体系有效。

2.2 差异表达miRNA的筛选

高通量测序技术揭示了人胚胎干细胞分化为中胚层细胞过程中miRNA表达谱差异。以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$ 作为条件进行筛选, 确定了287个miRNA有显著表达差异, 其中172个显著上调, 115个显著下调(图2A)。为了获得更多的差异miRNA, 增加后续预测靶基因的数目, 又以 $P < 0.05$ 作为条件对差异miRNA进行筛选, 共获得335个miRNA, 对其进行聚类分析, 用以显示miRNA表达量的变化情况(图2B)。

2.3 差异表达基因的筛选和GSEA富集分析

应用基因芯片检测了人胚胎干细胞分化为中



A: 人胚胎干细胞诱导分化为中胚层细胞示意图。CP21R7(10 μ mol/L)和BMP4(25 ng/mL)用于诱导hESCs分化为中胚层。B: 中胚层细胞分化形态图。C: RT-qPCR检测中胚层分化过程(第1~3天)中胚层标记物*T*、*EOMES*、*MIXL1*, 多能性标记物*OCT4* mRNA的表达变化。** $P < 0.01$ 。n \geq 3, *GAPDH*为内参。hESCs: 人胚胎干细胞。

A: schematic description of mesoderm cell differentiation from hESCs. CP21R7 (10 μ mol/L) and BMP4 (25 ng/mL) are used to induce mesoderm cell differentiation from hESCs. B: cellular morphology changed during mesoderm differentiation. C: expression of *T*, *EOMES*, *MIXL1* (mesoderm marker), *OCT4* (pluripotency marker), during the mesoderm differentiation process (day1-day3) by RT-qPCR. ** $P < 0.01$. n \geq 3, *GAPDH* was used as a reference gene. hESCs: human embryonic stem cells.

图1 hESCs诱导分化为中胚层细胞
Fig.1 Mesoderm cells differentiation from hESCs

胚层细胞过程中mRNA的表达谱差异,以 $P < 0.05$ 、 $|\log_2FC| > 1$ 作为条件进行筛选,经过分析确定了541个上调和198个下调的差异表达mRNA(图3A)。将差异表达基因显著富集的通路($P < 0.05$ 且 $FDR < 0.25$; $|NES| \geq 1$)使用热图显示(图3B),红色表示基因集在人胚胎干细胞分化为中胚层细胞过程上调,蓝色表示基因集在人胚胎干细胞分化为中胚层细胞过程下调,基于表达谱的GSEA(gene set enrichment analysis)分析显示,Wnt通路、TGF- β 通路和Hippo通路显著富集(图3C),提示差异表达基因可能通过这三条信号途径在人胚胎干细胞分化为中胚层过程起重要作用。

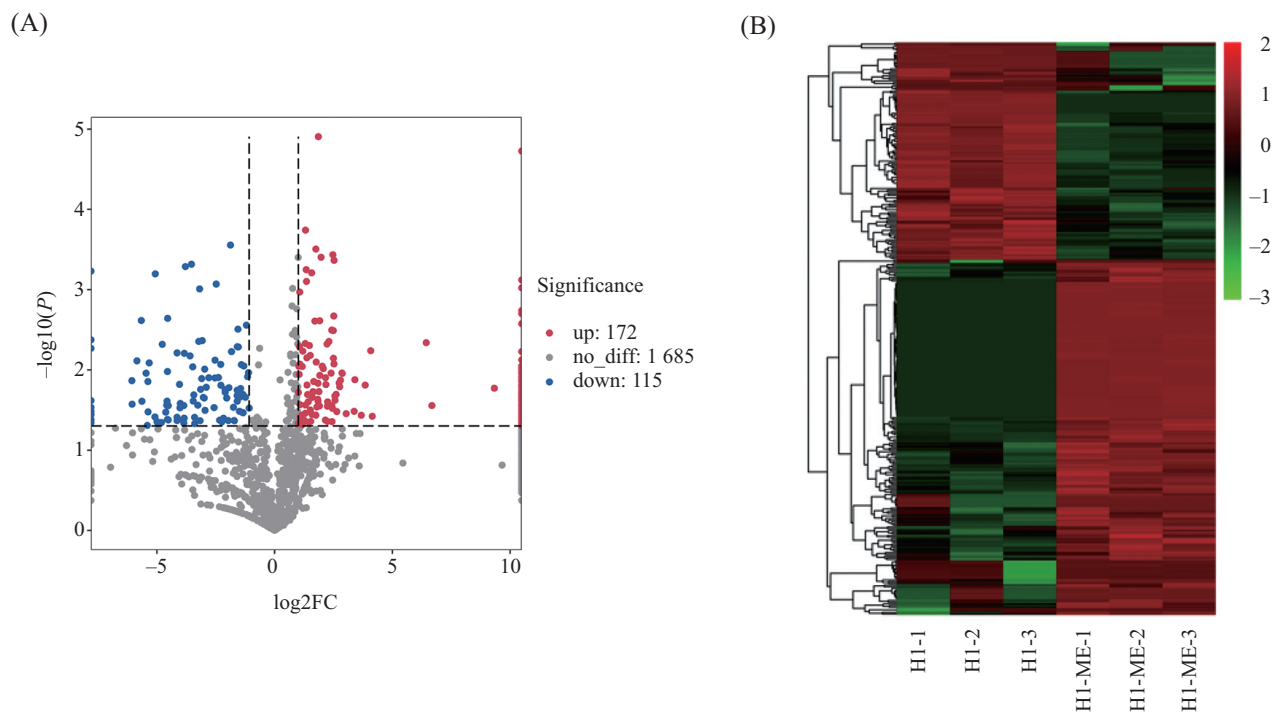
2.4 差异表达miRNA下游靶基因的预测和目标基因的筛选及分析

以 $P < 0.05$ 作为条件对差异miRNA进行筛选,共335个miRNA,对其进行靶基因预测。基于TargetScan(5.0)和Miranda(3.3a)两款软件预测差异miRNA的靶基因,阈值为TargetScan_score ≥ 50 和Miranda_Energy ≤ -20 。取两款软件预测结果的交集,

得到13 465个靶基因,共有266 559个miRNA-mRNA关系对。对差异表达基因和差异表达miRNA预测的靶基因进行综合分析后,获得差异表达miRNA的靶基因和差异表达基因的交集,即401个目标基因(图4A)。为了明确目标基因的生物学作用,对401个目标基因进行GO功能注释和KEGG途径富集分析。在GO功能注释中,生物过程分析揭示目标基因在多细胞生物发育、信号转导、DNA模板的转录调节等生物过程中显著富集;细胞成分分析表明,目标基因显著富集于细胞膜、细胞质、细胞核等;分子功能分析目标基因在蛋白质结合等方面较为丰富(图4B)。KEGG途径富集分析结果显示,目标基因在癌症通路、调节多能干细胞的信号通路、Wnt信号通路等显著富集,还有TGF- β 通路、Hippo通路也有富集(图4C)。这与差异基因GSEA的富集结果一致。

2.5 miRNA-mRNA网络的建立与分析

根据靶基因预测,Wnt通路中靶向基因有ROR1、DKK1、TP53、RNF43、WNT3A、LEF1、CSNK2A2、WNT5B、LGR5、WNT8A、WNT5A,

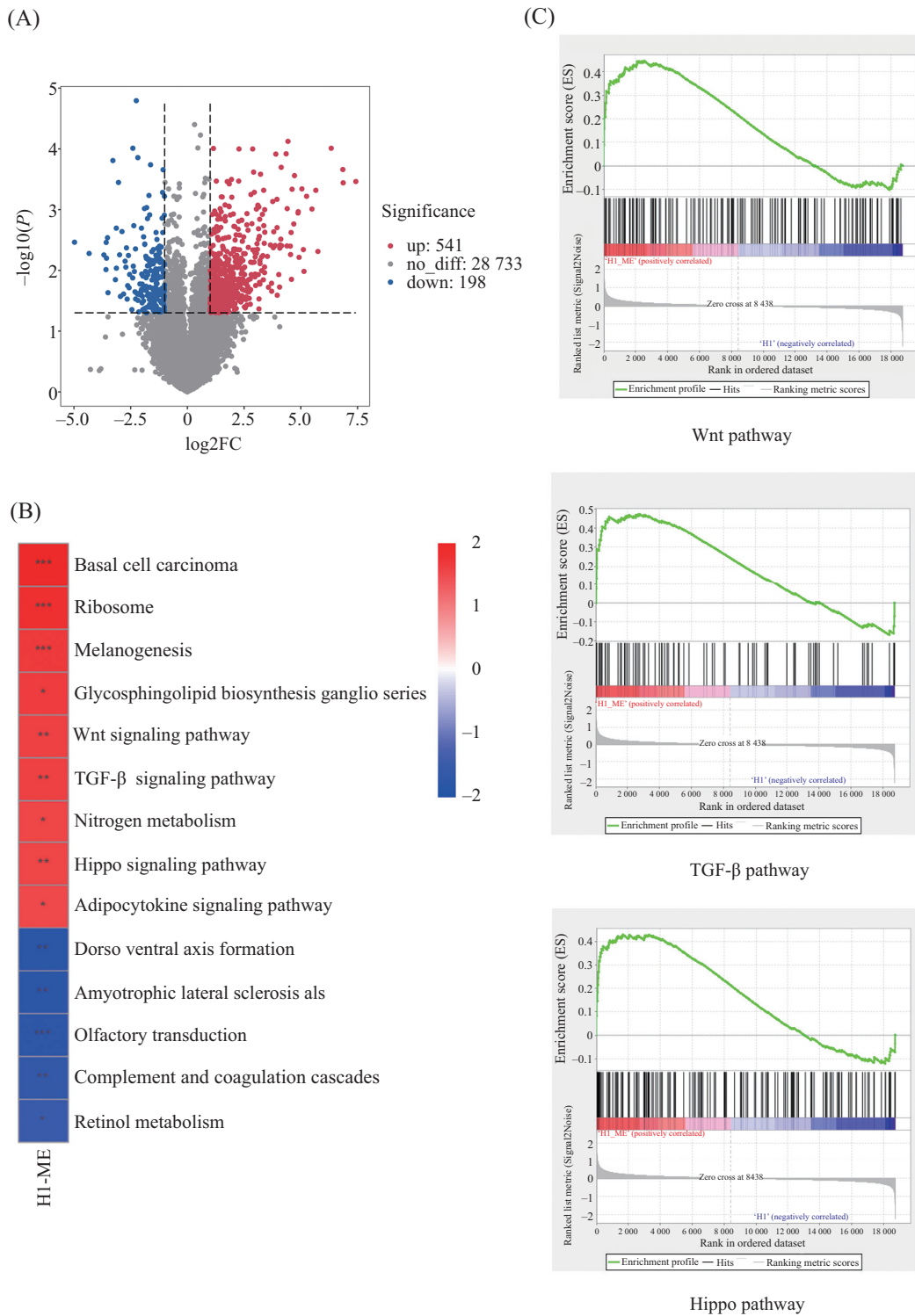


A: 火山图筛选差异表达miRNA, $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$; B: 聚类热图分析miRNA的表达量变化,表达水平高的miRNA显示为红色,表达水平低的miRNA显示为绿色。H1-1、H1-2、H1-3代表hESCs向中胚层分化day1的三个样品;H1-ME-1、H1-ME-2、H1-ME-3代表day3的三个样品。ME: 中胚层。

A: screening of differentially expressed miRNA volcano plots, $P < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$; B: cluster heat map analysis the expression changes of miRNA, red denoting a higher and green denoting a lower miRNA expression level. H1-1, H1-2, H1-3 represent the three samples of day1; H1-ME-1, H1-ME-2, H1-ME-3 represent the three samples of day3 during mesoderm differentiation from hESCs. ME: mesoderm

图2 中胚层细胞分化过程差异表达miRNA(DE-miRNA)的筛选与分析

Fig.2 Screening and analysis of differentially expressed miRNA (DE-miRNA) during mesoderm differentiation

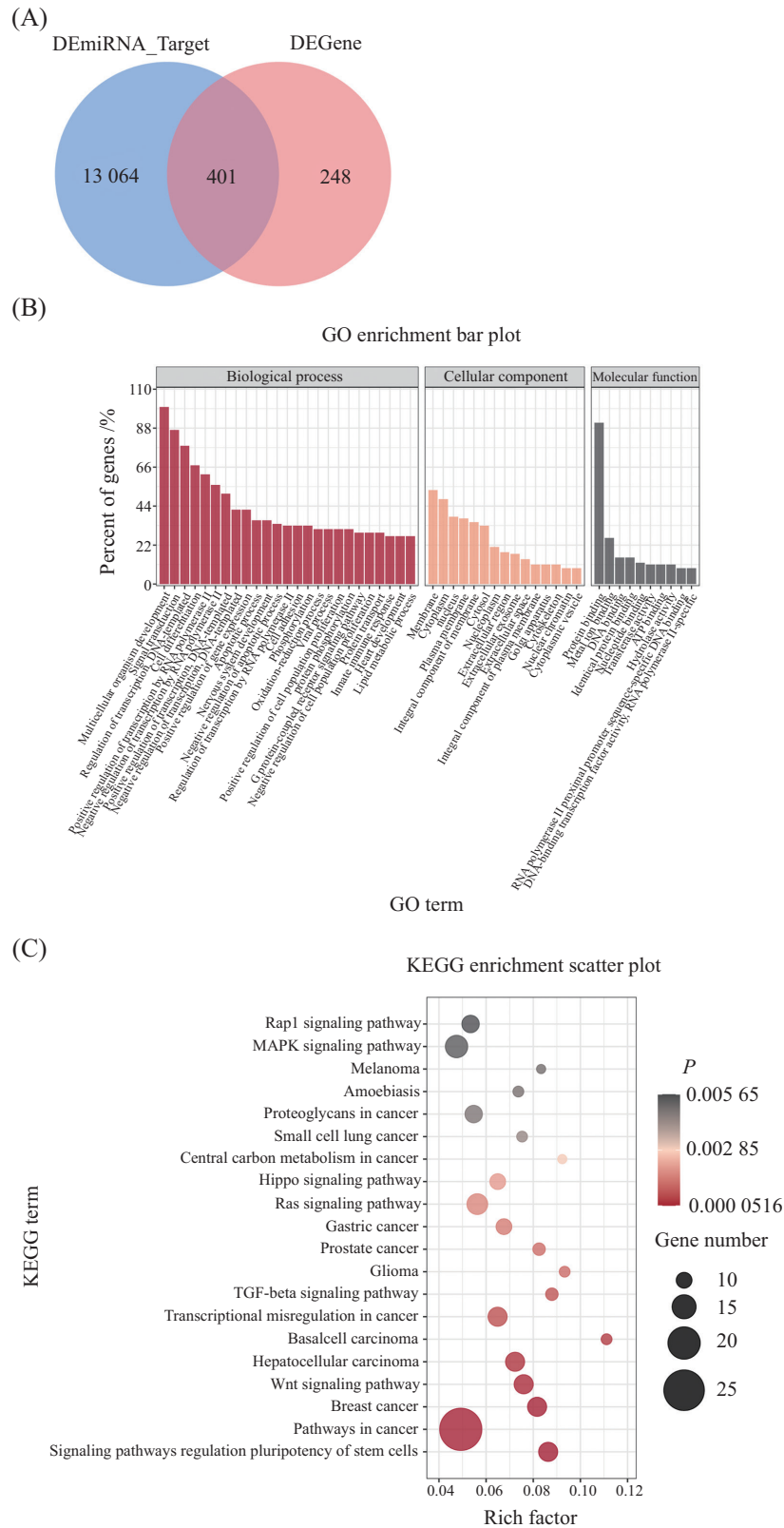


A: 火山图筛选差异表达基因, $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$; B: 热图显示差异表达基因的富集通路; C: GSEA分析显示Wnt通路、TGF-β通路和Hippo通路的富集。H1: 人胚胎干细胞; ME: 中胚层; Wnt通路: $P < 0.01$, FDR=0.25, ES=0.45, NES=1.61; TGF-β通路: $P < 0.01$, FDR=0.23, ES=0.47, NES=1.60; Hippo通路: $P < 0.01$, FDR=0.24, ES=0.43, NES=1.57。

A: screening of differentially expressed genes volcano plots, $P < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$; B: heat map shows enrichment pathways of differentially expressed genes; C: GSEA analysis shows enrichment of Wnt pathway, TGF-β pathway and Hippo pathway. H1: human embryonic stem cell; ME: mesoderm; Wnt pathway: $P < 0.01$, FDR=0.25, ES=0.45, NES=1.61; TGF-β pathway: $P < 0.01$, FDR=0.23, ES=0.47, NES=1.60; Hippo pathway: $P < 0.01$, FDR=0.24, ES=0.43, NES=1.57.

图3 差异表达基因的筛选和GSEA富集

Fig.3 Screening and GSEA enrichment of differentially expressed genes



A: 韦恩图显示miRNA的靶基因和差异表达基因的交集为目标基因; B: 目标基因的GO富集, 包括生物过程、细胞成分、分子功能; C: 目标基因的KEGG途径。

A: Venn diagram shows the intersection of miRNA target genes and differentially expressed genes as target genes; B: GO enrichment of target genes, including BP, CC and MF; C: KEGG pathway of target genes.

图4 目标基因的筛选、GO功能注释和KEGG富集

Fig.4 Screening, GO function annotation and KEGG enrichment of target genes

它们与100个miRNA有相互关系, 构建其miRNA-mRNA网络图(图5A)。TGF- β 通路中靶基因有 *FMOD*、*SMAD6*、*PITX2*、*LEFTY2*、*SMAD9*、*ZFYVE16*、*BAMBI*, 与59个miRNA相互作用, 构建miRNA-mRNA网络图(图5B)。Hippo通路中靶基因有 *ID2*、*DLG1*、*WNT5B*、*WNT3A*、*STK3*、*LEF1*、*WNT5A*、*DLG2*、*PARD6A*、*WNT8A*, 与106个miRNA相互作用, 构建了miRNA-mRNA的网络图(图5C)。

2.6 关键基因的鉴定

本实验通过RT-qPCR检测了三条通路的11个关键基因在分化过程中的表达水平(图6), 包括Wnt通路的 *WNT3A*、*WNT5A*、*WNT5B*、*WNT8A*、*DKK1*、*LEF1*, TGF- β 通路的 *FMOD*、*SMAD6*、*BAMBI*, Hippo通路的 *ID2*、*DLG1*, 在人胚胎干细胞分化为中胚层过程中均上调。

3 讨论

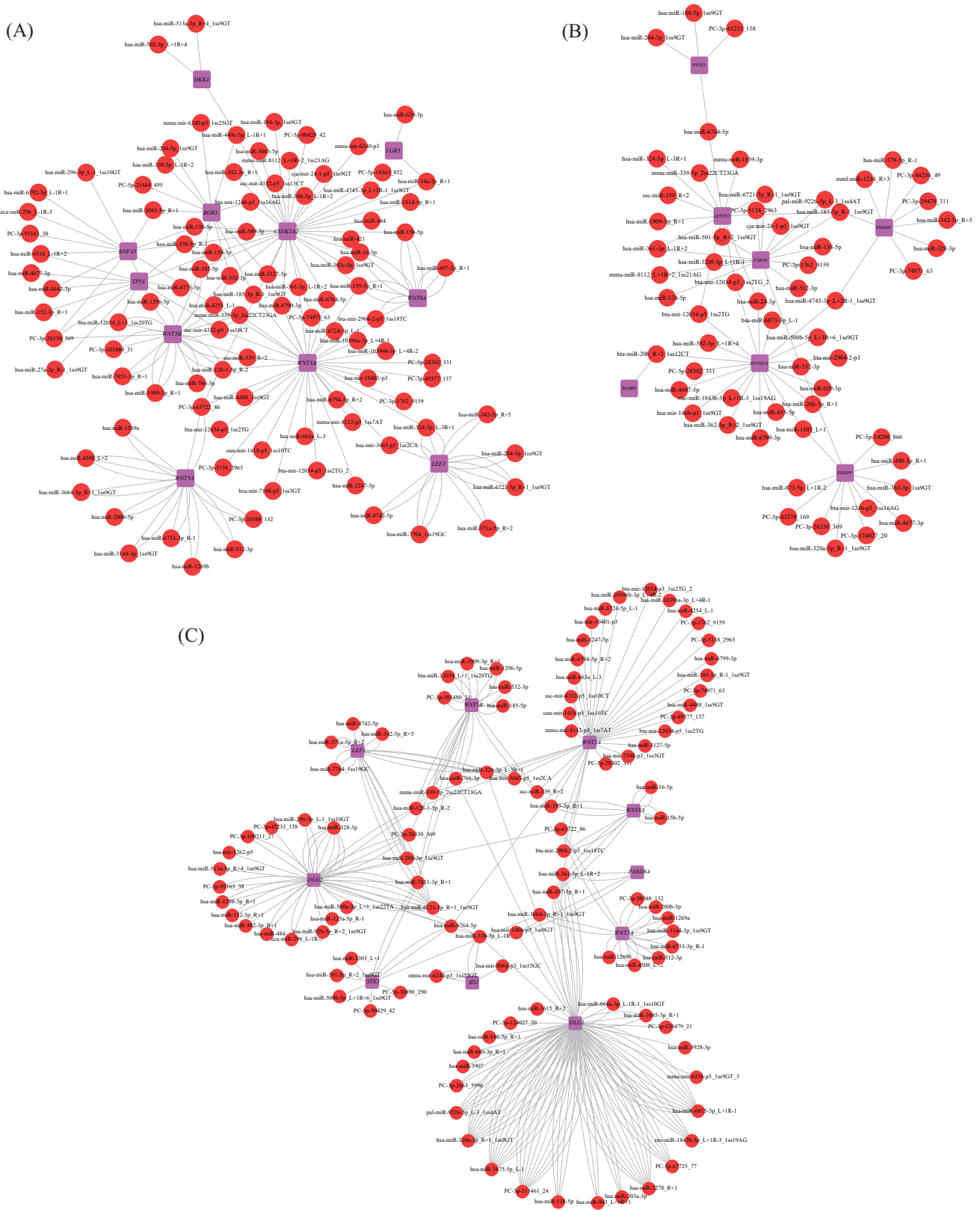
miRNA在中胚层分化过程中发挥重要调控作用。研究显示, miR-430/427/302家族对Nodal信号转导具有明显影响, 影响非洲爪蟾胚胎和人类胚胎细胞系的中胚层分化^[14]。miR-125b通过抑制hESCs多能性和促进中胚层分化来调控人心肌细胞分化^[15]。

从现有文献看, 到目前为止, miRNA-mRNA在中胚层分化中的调控网络尚未全面建立。在本研究中, 对高通量测序数据miRNA进行差异表达分析, 筛选出287个miRNA有显著表达差异, 其中172个显著上调, 115个显著下调, 有些miRNA与研究报道基本相同。ISHIKAWA等^[16]发现, 在hESCs分化为中胚层过程中, 上调的miRNA有miR-375、miR-888-5p、miR-489-3p、miR-373-3p; 下调的有miR-518e-3p、miR-520g-3p、miR-512-3p、miR-100-5p, 这些与本研究差异表达miRNA的筛选结果一致。然而miR-661、miR-200a-5p、miR-1260a等显示为上调, 这与本研究筛选的差异表达miRNA的结果相反, 可能与细胞系不同, 或miRNA测序方式不一致有关。hsa-miR-148a在差异表达分析中上调, 与miR-148a家族通过靶向Notch配体 *DLL1* 基因促进外侧中胚层和心肌细胞分化^[17]一致。本实验在差异表达分析中也发现, 有些在胚胎干细胞分化中显著上调的miRNA, 如hsa-miR-10a-5p, 变化倍数为808.8; hsa-miR-1247-5p, 变化倍数为643.0, 在肿瘤和癌症中虽有相关报

道, 如miR-10a-5p可以通过调节BDNF/SEMA4C途径促进胰腺癌的发生和发展^[18]; miR-1247-5p通过miR-1247-5p/CDC14B/p53信号轴在人类星形胶质瘤U251细胞中起着抑癌作用^[19], 但并未报道其与中胚层细胞分化有关, 提示可能是调控中胚层分化的新型miRNA。这些筛选到的新型miRNA, 可能对hESCs向中胚层的分化过程有重要调控作用, 但深入的分子机制有待进一步研究。

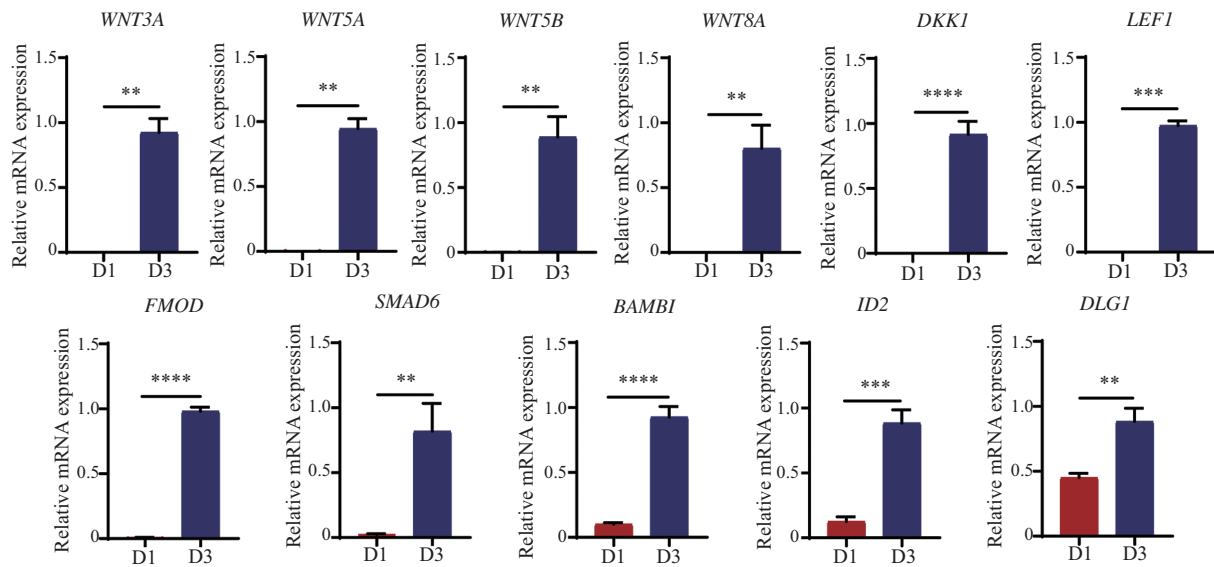
miRNA在调控基因表达中起关键作用。对芯片数据mRNA进行差异表达分析, 并预测差异表达miRNA的靶基因, 将其靶基因与差异表达基因交集后获得401个目标基因。对差异表达基因进行GSEA分析和对目标基因进行KEGG富集分析显示Wnt通路、TGF- β 通路、Hippo通路参与中胚层分化, 其分析结果与以下研究报道基本相同。研究表明, Wnt通路和TGF- β 通路在中胚层细胞谱系分化和心肌细胞分化过程至关重要^[20]; 敲除小鼠胚胎干细胞中Hippo信号的两个关键因子 *Mst1* 和 *Mst2*, 导致中胚层分化的中断^[21]。而miRNA在转录后水平上调调控基因表达通过靶向信号通路调节中胚层分化。miR-184是ESCs分化过程中 *WNT3* 的直接调控因子, 进一步丰富了ESCs分化为中胚层和心肌细胞的表观遗传调控网络^[22]; miR-127通过靶向 *Lefty2* 的 *Nodal* 信号转导来加速小鼠胚胎干细胞的中胚层分化^[23]。

本研究在富集的重要信号调控通路中, 对其中三条通路的miRNA-mRNA的调控网络进行构建。Wnt/ β -catenin通路涉及100个miRNA靶向11个基因。TGF- β 通路中59个miRNA靶向7个基因。Hippo通路中有106个miRNA靶向10个基因。进一步, 挑选了11个关键基因进行表达验证, 结果显示 *WNT3A*、*WNT5A*、*WNT5B*、*WNT8A*等在胚胎干细胞分化中起关键作用。 *WNT3A* 是典型的Wnt/ β -catenin信号通路的激活因子, 用于中内胚层的早期诱导, *WNT3A* 诱导可增强hESCs向中胚层分化和心肌细胞形成^[24]。 *WNT3* 和 *WNT8A* 通过 *FZD7* 和经典Wnt通路调控 *BRACHYURY* 的表达和中胚层诱导; *WNT5A/5B* 通过 *ROR2* 和非经典Wnt通路调控 *MESPI* 表达和心血管发育^[25]。 *Dickkopf-1(DKK1)* 是Wnt/ β -catenin信号抑制剂, 抑制 *DKK1* 导致经典Wnt通路的激活延长和中胚层分化, 有利于心肌细胞谱系发育^[26]。 *LEF1* 是经典Wnt通路中DNA结合的转录因子, 其活性受 β -catenin的调节, *LEF1* 参与小鼠胚胎干细胞分化的启动^[27]。 *SMAD6* 是



A: Wnt通路miRNA-mRNA网络图; B: TGF-β通路miRNA-mRNA网络图; C: Hippo通路miRNA-mRNA网络图。
 A: the miRNA-mRNA network of Wnt pathways; B: the miRNA-mRNA network of TGF-β pathways; C: the miRNA-mRNA network of Hippo pathways.

图5 Wnt、TGF-β、Hippo三条信号通路的miRNA-mRNA网络
 Fig.5 The miRNA-mRNA network of Wnt, TGF-β and Hippo pathways



在中胚层分化过程(第1天、第3天) 11个关键基因的表达, RT-qPCR数据统计分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, $n \geq 3$, *GAPDH*为内参。 The expression levels of 11 hub genes during the mesoderm differentiation process (day1,day3). RT-qPCR data. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, $n \geq 3$, *GAPDH* was used as a reference gene.

图6 11个关键基因的表达水平
The expression levels of 11 hub genes

TGF- β 通路的重要基因, *Zdhhc13*是BMP信号的关键调节因子, 通过调节*SMAD6*的活性来调控外胚层和中胚层细胞谱系分化^[28]。 *Mst1*和*Mst2*是Hippo通路的核心组成部分, 在胚胎干细胞分化中是正常的的心脏谱系细胞发育所必需的^[29]。通过抑制小鼠胚胎干细胞多能性转录因子*OCT4*和BMP信号因子*SMAD5*和*ID2*, 证明了miR-421是一种分化相关的调节因子, 揭示了miR-191、miR-16-1、miR-23a、miR-421与TGF- β /BMP信号通路的两个分支之间的调控网络^[30]。

尽管本研究存在一定的局限性, 缺乏对miRNA-mRNA调控网络的深入分子水平的实验性验证, 但该研究通过转录组测序、基因芯片等手段获得精准、特异的高通量数据, 又基于生物信息学分析, 综合各数据库的相关研究, 更加系统、全面地从宏观层面构建人胚胎干细胞分化为中胚层的miRNA-mRNA调控网络。从而避免了传统研究单一或片面的阐述, 为干细胞治疗和实验性机制研究提供整体性的数据和见解。

基于生物信息学的优势, 通过对miRNA和mRNA进行筛选、分析, 发现更多的miRNA-mRNA通过调节Wnt/ β -catenin、TGF- β 、Hippo这三条信号通路调控中胚层分化, 这些不同的miRNA-mRNA网络均可能是中胚层分化的潜在作用机制, 对于细胞

分化的临床应用也具有重要的指导意义。

参考文献 (References)

- [1] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-7.
- [2] FERRETTI E, HADJANTONAKIS A K. Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues [J]. *Current Opin Cell Biol*, 2019, 61: 110-6.
- [3] CHONG J J, YANG X, DON C W, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts [J]. *Nature*, 2014, 510(7504): 273-7.
- [4] BURRIDGE P W, KELLER G, GOLD J D, et al. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(1): 16-28.
- [5] YANG Y, REN Z, XU F, et al. Endogenous IGF signaling directs heterogeneous mesoderm differentiation in human embryonic stem cells [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(11): 3374-84, e5.
- [6] YU Y, DENG P, YU B, et al. Inhibition of EZH2 promotes human embryonic stem cell differentiation into mesoderm by reducing H3K27me3 [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(3): 752-61.
- [7] LUO S, LU J Y, LIU L, et al. Divergent lncRNAs regulate gene expression and lineage differentiation in pluripotent cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(5): 637-52.
- [8] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97.
- [9] IVEY K N, SRIVASTAVA D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 36-41.
- [10] IVEY K N, MUTH A, ARNOLD J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells [J].

- Cell Stem Cell, 2008, 2(3): 219-29.
- [11] KAY M, SOLTANI B M, AGHDAAEI F H, et al. Hsa-miR-335 regulates cardiac mesoderm and progenitor cell differentiation [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 191.
- [12] XU F, YANG J, SHANG J, et al. MicroRNA-302d promotes the proliferation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by inhibiting LATS2 in the Hippo pathway [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(13): 1387-99.
- [13] PATSCH C, CHALLET-MEYLAN L, THOMAS E C, et al. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(8): 994-1003.
- [14] ROSA A, SPAGNOLI F M, BRIVANLOU A H. The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection [J]. Dev Cell, 2009, 16(4): 517-27.
- [15] WONG S S, RITNER C, RAMACHANDRAN S, et al. miR-125b promotes early germ layer specification through Lin28/let-7d and preferential differentiation of mesoderm in human embryonic stem cells [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36121.
- [16] ISHIKAWA D, DIEKMANN U, FIEDLER J, et al. miRNome profiling of purified endoderm and mesoderm differentiated from hESCs reveals functions of miR-483-3p and miR-1263 for cell-fate decisions [J]. Stem Cell Rep, 2017, 9(5): 1588-603.
- [17] FANG X, MIAO S, YU Y, et al. MIR148A family regulates cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells by inhibiting the DLL1-mediated NOTCH signaling pathway [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 134: 1-12.
- [18] FEI X, JIN H Y, GAO Y, et al. Hsa-miR-10a-5p promotes pancreatic cancer growth by BDNF/SEMA4C pathway [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3): 927-34.
- [19] LIU Q, DONG Z, CHEN T. MiR-1247-5p Functions as a tumor suppressor in human astrogloma cells by targeting CDC14B [J]. Ann Clin Lab Sci, 2020, 50(2): 182-9.
- [20] PAIGE S L, PLONOWSKA K, XU A, et al. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation [J]. Circ Res, 2015, 116(2): 341-53.
- [21] SUN X, REN Z, CUN Y, et al. Hippo-YAP signaling controls lineage differentiation of mouse embryonic stem cells through modulating the formation of super-enhancers [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(13): 7182-96.
- [22] LIU X, YANG Y, WANG X, et al. MiR-184 directly targets Wnt3 in cardiac mesoderm differentiation of embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2020, doi: 10.1002/stem.3282.
- [23] MA H, LIN Y, ZHAO Z A, et al. MicroRNA-127 promotes mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells by targeting left-right determination factor 2 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(23): 12126-35.
- [24] TRAN T H, WANG X, BROWNE C, et al. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2009, 27(8): 1869-78.
- [25] MAZZOTTA S, NEVES C, BONNER R J, et al. Distinctive roles of canonical and noncanonical wnt signaling in human embryonic cardiomyocyte development [J]. Stem Cell Rep, 2016, 7(4): 764-76.
- [26] RAI M, WALTHALL J M, HU J, et al. Continuous antagonism by Dkk1 counter activates canonical Wnt signaling and promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(1): 54-66.
- [27] KIM S, KIM H, TAN A, et al. The distinct role of tcfs and lef1 in the self-renewal or differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Int J Stem Cells, 2020, 13(2): 192-201.
- [28] CHEN X, SHI W, WANG F, et al. Zinc finger DHHC-type containing 13 regulates fate specification of ectoderm and mesoderm cell lineages by modulating Smad6 activity [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(16): 1899-909.
- [29] LI P, CHEN Y, MAK K K, et al. Functional role of Mst1/Mst2 in embryonic stem cell differentiation [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79867.
- [30] HADJIMICHAEL C, NIKOLAOU C, PAPAMATHEAKIS J, et al. Micronas for fine-tuning of mouse embryonic stem cell fate decision through regulation of TGF- β signaling [J]. Stem Cell Rep, 2016, 6(3): 292-301.