



分类号: R544.1

学号: 2019010116

重 庆 医 科 大 学

博 士 学 位 论 文

(学术学位)

论文题目 miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调节胚胎心外膜细胞
上皮间质转化过程的机制研究

作者姓名 熊天华

指导教师姓名 (职称、单位名称) 余强 教授
重庆医科大学附属第二医院

一级学科名称 临床医学

二级学科名称 内科学

论文答辩年月 2024 年 5 月

目 录

前言.....	7
参考文献.....	9
第一部分:体外培养胚胎心外膜细胞和 TGF- β 诱导其 EMT 过程..	13
前言.....	13
1 材料与方法.....	13
2 实验结果.....	23
3 讨论.....	27
小结.....	29
参考文献.....	30
第二部分:TGF- β 通过 miR-194-3p 调控心外膜细胞 EMT 过程....	35
前言.....	35
1 材料与方法.....	35
2 实验结果.....	43
3 讨论.....	53
小结.....	55
参考文献.....	56
第三部分:miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调控心外膜细胞 EMT 过程.....	61
前言.....	61
1 材料与方法.....	61
2 实验结果.....	69
3 讨论.....	76
小结.....	79
参考文献.....	80
全文总结.....	86
文献综述 心外膜在心脏发育中的研究现状	88
参考文献.....	95

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complementary deoxynucleic acid	互补脱氧核糖核酸
DE	Differentially expressed	差异表达
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
DNA	Deoxynucleic acid	脱氧核糖核酸
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
EPDCs	epicardial derived cells	心外膜源性细胞
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
min	Minute	分钟
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
mM	Mmol/L	毫摩每升
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
μM	Micromol/L	微摩每升
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
PPI	Protein-protein interaction	蛋白-蛋白交互
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	荧光定量聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
sec	Second	秒钟
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
TBS	Tris buffered saline	三羟甲基氨基甲烷缓

		冲盐溶液
TBST	Tris buffered saline with Tween	TBS-吐温缓冲液
Tbx18	T-box transcription factor 18	T-box 转录因子 18
TGF- β	Transforming growth factor- β	转化生长因子- β
UTR	Untranslated region	非翻译区

miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调节胚胎心外膜细胞 上皮间质转化过程的机制研究

摘要

背景：心外膜是心脏的重要组成部分，对于心脏的健康发育至关重要，并且能够促进心脏的内源性再生与修复。MicroRNA (miRNA) 作为一种单链 RNA，其长度介于 19-25 核苷酸之间，具有遗传保守性，能够与多个 mRNA 分子形成不完全匹配的互补关系，从而降低基因的表达。虽然 miR-194-3p 与细胞迁移和侵袭有关，但其对胚胎心外膜细胞的影响尚不清楚。

方法：本研究通过功能获得和功能丧失方法探究 miR-194-3p 在心脏发育中的作用。我们在体外培养胚胎心外膜细胞，使用转化生长因子(Transforming growth factor, TGF)- β 诱导细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并监测 miR-194-3p 的表达。通过 miR-194-3p 模拟物和抑制剂的干预，评估心外膜细胞发育过程中 EMT 的变化。在机制上，我们通过构建 miR-194-3p 突变载体及双荧光素酶报告实验以验证其与目标基因的结合位点及表型恢复。

结果：本研究发现，在 TGF- β 诱导的心外膜细胞 EMT 过程中 miR-194-3p 表达上调，提示 miR-194-3p 可能参与心外膜细胞的 EMT。使用 miR-194-3p mimics 模拟物在心外膜细胞中过表达 miRNA，发现

miR-194-3p 可促进心外膜细胞的 EMT，并表达间质细胞标志物；同样，使用 miR-194-3p inhibitor 抑制 miRNA 的表达，心外膜细胞的 EMT 过程将被抑制。为了研究 miR-194-3p 调控心外膜细胞 EMT 的下游机制，我们通过双荧光素酶报告实验证实 miR-194-3p 与 p120-catenin 为负向调控关系，且影响细胞粘附信号通路中 β -catenin 的表达。此外，我们使用小干扰 RNA (siRNA) 技术沉默 p120-catenin 的表达，发现可挽救 miR-194-3p inhibitor 诱导的 EMT 抑制现象。

结论：上述研究表明，miR-194-3p 是通过靶向调节下游基因 p120-catenin，并影响细胞粘附信号通路中 β -catenin 的表达，调控胚胎心外膜细胞的 EMT 过程。

关键词：心外膜细胞，miR-194-3p，p120-catenin，上皮间质转化，心脏发育

REGULATION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN EMBRYONIC EPICARDIAL CELLS BY MIR-194-3P VIA P120/B-CATENIN SIGNALING

ABSTRACT

Background: The epicardium is an integral part of the heart, crucial for its healthy development and capable of promoting endogenous regeneration and repair. MiRNA, a single-stranded RNA ranging from 19 to 25 nucleotides in length and conserved across species, can form imperfectly matched complementary pairs with multiple mRNA molecules, thus downregulating gene expression. While miR-194-3p is associated with cell migration and invasion, its impact on embryonic epicardial cells remains unclear.

Methods: This study investigates the role of miR-194-3p in cardiac development through gain-of-function and loss-of-function approaches. We culture embryonic epicardial cells in vitro and induce EMT with TGF- β to monitor miR-194-3p expression. Interventions with miR-194-3p mimics and inhibitors assess changes in EMT during epicardial cell development. Mechanistically, we validate the binding sites and phenotype recovery with

target genes through the construction of a miR-194-3p mutation vector and dual-luciferase reporter assays.

Results: The study found that miR-194-3p expression is upregulated in the epicardial cells undergoing EMT induced by TGF- β , suggesting miR-194-3p's involvement in the EMT of epicardial cells. Overexpression of miRNA in epicardial cells using miR-194-3p mimics promotes EMT and the expression of mesenchymal cell markers; similarly, the EMT process in epicardial cells is inhibited by using miR-194-3p inhibitors. To explore the downstream mechanism by which miR-194-3p regulates the EMT of epicardial cells, we confirmed a negative regulatory relationship between miR-194-3p and p120-catenin through dual-luciferase reporter assays, affecting the expression of β -catenin in the cell adhesion signaling pathway. Additionally, using siRNA technology to silence p120-catenin expression, we found that the EMT inhibition induced by the miR-194-3p inhibitor could be rescued.

Conclusion: These findings indicate that miR-194-3p regulates the EMT process in embryonic epicardial cells by targeting and modulating the downstream gene p120-catenin and affecting the expression of β -catenin in the cell adhesion signaling pathway.

Key words: epicardial cells, miR-194-3p, p120-catenin, epithelial-mesenchymal transition, cardiac development

miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调节胚胎心外膜细胞 上皮间质转化过程的机制研究

前言

心血管疾病仍然是全球最严重的健康问题，它对人类的生命构成了极大的威胁。心外膜是心脏的重要组成部分，在心脏的发育和内源性再生修复过程中发挥着至关重要的作用^[1]。心外膜是覆盖在心脏外层的细胞，起源于前体心外膜。前体心外膜分化为成纤维细胞和平滑肌细胞，这些细胞可生成心肌内皮细胞和间质细胞^[2,3]。在 小鼠胚胎天数(embryonic days, E)9.5 天时，前体心外膜细胞附着在心肌上，呈上皮样层状扩散，形成覆盖整个心肌的单层细胞层^[4]。到 E11.5 天时，心脏被心外膜完全包裹，呈现立方体上皮表型^[5]。心外膜细胞层的完整性和从顶到底的极性是通过细胞粘附分子的表达来维持的，如 E-cadherin 和 β -catenin^[6]。且心外膜表达多种编码转录因子的基因：Wilms tumor 1 (Wt1)^[7]，Transcription factor 21 (Tcf21)^[8]，T-box transcription factor 18 (Tbx18)^[9]等。心外膜在发育和心脏损伤修复中可分化产生多种心系细胞，如：平滑肌细胞、成纤维细胞、周细胞、脂肪细胞等。当心外膜细胞分化时，它们首先经历分层，然后经过 EMT 过程，形成心外膜源性细胞，随后填补心外膜和心肌之间的空隙，形成心外膜下间质，并侵入心肌在心肌中发育成心脏支持细胞^[10-13]。转化生长因子 TGF- β 是研究最广泛的 EMT 和细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)生成的上游调控分子之一^[14]。TGF- β 1-3 在 E12.5 时在 小鼠心外膜中表达，它们与相同的受体复合物结合，共同诱导上皮细胞 EMT^[15-18]。EMT 使原始的上皮组织发生了重大变化，形成了具有较强移动能力的间叶细胞，这是多细胞生物发育过程中的基本特征。这种转化使得上皮细胞能够在细胞外基质中迁移，并能够在特定的部位形成组织，从而促进了生物体的发育和生长^[11]。然而，目前尚不清楚心外膜源性细胞是如何产生不同类型的细胞，以及心脏发育过程中心外膜源性细胞分化命运的分子机制。此外，

有趣的是虽然成年心外膜细胞处于静止状态，但它们在损伤时被激活，并通过表达损伤的成年心脏的发育程序来促进修复过程^[19]。

MicroRNA (miRNA)，为长度 19-25 核苷酸的单链 RNA 片段，具有物种保守性。MiRNA 通过碱基互补配对结合编码 RNA 的 3'端非翻译区(3'UTR)诱导蛋白质翻译阻断或 mRNA 降解来调节基因转录后表达^[20]。目前研究发现 miR-194-3p 参与了细胞的迁移、侵袭等作用^[21-23]，然而在心脏胚胎发育过程中，miR-194-3p 在心外膜 EMT 中的精确调节作用仍未得到明确的解决。值得注意的是，虽然许多体外模型已经被用来仔细研究心外膜 EMT ^[24,25]，但对 miRNA 在这一生理转变中的调控作用的探索，尤其是 miR-194-3p 的调控作用，还尚无报道。

粘附连接在上皮细胞的生长发育中扮演着至关重要的角色，它不只是细胞增殖、迁移、细胞极化以及存活的核心调控因子，同时也充当着细胞间互相作用的桥梁^[26,27]。这些连接由钙粘蛋白超家族的同种蛋白互相作用而成立，其中 E-钙粘蛋白(E-cadherin)为所有上皮细胞中普遍存在的标志性成员。E-cadherin 与细胞内 catenin 家族的成员相结合，特别是 p120-catenin，对于保持钙粘蛋白的稳定性发挥着决定性的作用。然而，p120-catenin 在胚胎发育中的作用还尚无报道。在这项研究中，我们假设 miR-194-3p 可能通过调节 p120-catenin 及细胞粘附信号通路，介导心外膜细胞的 EMT。

我们的研究定位于这一研究空白的前沿，利用培养的胚胎心外膜细胞，旨在剖析 miR-194-3p 调节心外膜细胞 EMT 的分子基础，从而阐明其对心脏发育的潜在影响。

参考文献

- [1] J. Cao, K.D. Poss, The epicardium as a hub for heart regeneration, *Nat. Rev. Cardiol.* 15 (2018) 631–647. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0046-4>.
- [2] T. Mikawa, D.A. Fischman, Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 9504–9508. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9504>.
- [3] A.C. Gittenberger-de Groot, M.P. Vrancken Peeters, M.M. Mentink, R.G. Gourdie, R.E. Poelmann, Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions, *Circ. Res.* 82 (1998) 1043–1052. <https://doi.org/10.1161/01.res.82.10.1043>.
- [4] J. Männer, Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos, *Anat. Embryol. (Berl.)*. 187 (1993) 281–289. <https://doi.org/10.1007/BF00195766>.
- [5] V. Velecela, A. Torres-Cano, A. García-Melero, M. Ramiro-Pareta, C. Müller-Sánchez, M. Segarra-Mondejar, Y.-Y. Chau, B. Campos-Bonilla, M. Reina, F.X. Soriano, N.D. Hastie, F.O. Martínez, O.M. Martínez-Estrada, Epicardial cell shape and maturation are regulated by Wt1 via transcriptional control of Bmp4, *Dev. Camb. Engl.* 146 (2019) dev178723. <https://doi.org/10.1242/dev.178723>.
- [6] M. Wu, C.L. Smith, J.A. Hall, I. Lee, K. Luby-Phelps, M.D. Tallquist, Epicardial spindle orientation controls cell entry into the myocardium, *Dev. Cell.* 19 (2010) 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.011>.
- [7] A. Wessels, M.J.B. van den Hoff, R.F. Adamo, A.L. Phelps, M.M. Lockhart, K. Sauls, L.E. Briggs, R.A. Norris, B. van Wijk, J.M. Perez-Pomares, R.W. Dettman, J.B.E. Burch, Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart, *Dev. Biol.* 366 (2012) 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.020>.
- [8] A. Acharya, S.T. Baek, G. Huang, B. Eskiocak, S. Goetsch, C.Y. Sung, S. Banfi, M.F. Sauer, G.S. Olsen, J.S. Duffield, E.N. Olson, M.D. Tallquist, The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast

- p progenitors, Development. 139 (2012) 2139–2149.
-
- <https://doi.org/10.1242/dev.079970>
- .
-
- [9] C.-L. Cai, J.C. Martin, Y. Sun, L. Cui, L. Wang, K. Ouyang, L. Yang, L. Bu, X. Liang, X. Zhang, W.B. Stallcup, C.P. Denton, A. McCulloch, J. Chen, S.M. Evans, A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells,
- Nature*
- . 454 (2008) 104–108.
- <https://doi.org/10.1038/nature06969>
- .
-
- [10] A. von Gise, B. Zhou, L.B. Honor, Q. Ma, A. Petryk, W.T. Pu, WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through
- β
- catenin and retinoic acid signaling pathways,
- Dev. Biol.*
- 356 (2011) 421–431.
- <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.668>
- .
-
- [11] A.M. Smits, E. Dronkers, M.-J. Goumans, The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate,
- Pharmacol. Res.*
- 127 (2018) 129–140.
- <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.020>
- .
-
- [12] R.W. Dettman, W. Denetclaw, C.P. Ordahl, J. Bristow, Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart,
- Dev. Biol.*
- 193 (1998) 169–181.
- <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8801>
- .
-
- [13] H. Lie-Venema, N.M.S. van den Akker, N.A.M. Bax, E.M. Winter, S. Maas, T. Kekarainen, R.C. Hoeben, M.C. deRuiter, R.E. Poelmann, A.C. Gittenberger-de Groot, Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development,
- ScientificWorldJournal*
- . 7 (2007) 1777–1798.
- <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.294>
- .
-
- [14] J. Xu, S. Lamouille, R. Derynck, TGF-
- β
- induced epithelial to mesenchymal transition,
- Cell Res.*
- 19 (2009) 156–172.
- <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- .
-
- [15] D.G.M. Molin, U. Bartram, K. Van der Heiden, L. Van Iperen, C.P. Speer, B.P. Hierck, R.E. Poelmann, A.C. Gittenberger-de-Groot, Expression patterns of Tgf
- β
- 1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton,
- Dev. Dyn.*
- 227 (2003) 431–444.
- <https://doi.org/10.1002/dvdy.10314>
- .

- [16]P.J. Miettinen, R. Ebner, A.R. Lopez, R. Derynck, TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 2021–2036. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.2021>.
- [17]E. Piek, A. Moustakas, A. Kurisaki, C.H. Heldin, P. ten Dijke, TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells, *J. Cell Sci.* 112 (Pt 24) (1999) 4557–4568. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.24.4557>.
- [18]U. Valcourt, M. Kowanetz, H. Niimi, C.-H. Heldin, A. Moustakas, TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 1987–2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0658>.
- [19]E. Dronkers, M.M.M. Wauters, M.J. Goumans, A.M. Smits, Epicardial TGFβ and BMP Signaling in Cardiac Regeneration: What Lesson Can We Learn from the Developing Heart?, *Biomolecules.* 10 (2020) 404. <https://doi.org/10.3390/biom10030404>.
- [20]D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell.* 116 (2004) 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- [21]R. Abuduaini, X. Miao, J. Xu, L. Che, W. Zhou, Z. Guo, J. Sun, MicroRNA-194-3p inhibits the metastatic biological behaviors of spinal osteosarcoma cells by the repression of matrix metalloproteinase 9, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 11 (2018) 5257–5264.
- [22]T. Liu, Y. Fang, MiR-194-3p modulates the progression of colorectal cancer by targeting KLK10, *Histol. Histopathol.* 37 (2022) 301–309. <https://doi.org/10.14670/HH-18-413>.
- [23]Z. Tian, R. Wang, X. Zhang, B. Deng, C. Mi, T. Liang, Y. Ling, H. Li, H. Zhang, Benzo[a]Pyrene-7, 8-Diol-9, 10-Epoxy Suppresses the Migration and Invasion of Human Extravillous Trophoblast Swan 71 Cells Due to the Inhibited Filopodia Formation and Down-Regulated PI3K/AKT/CDC42/PAK1 Pathway Mediated by

- the Increased miR-194-3p, *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 166 (2018) 25–38.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy182>.
- [24] L.A. Compton, D.A. Potash, N.A. Mundell, J.V. Barnett, Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235 (2006) 82–93. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20629>.
- [25] A.F. Austin, L.A. Compton, J.D. Love, C.B. Brown, J.V. Barnett, Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGFbeta, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237 (2008) 366–376. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21421>.
- [26] NELSON W J, DICKINSON D J, WEIS W I. Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity[J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2013, 116: 3-23.
- [27] HARRIS T J C, TEPASS U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis[J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2010, 11(7): 502-514.

第一部分：体外培养胚胎心外膜细胞和 TGF- β 诱导其 EMT 过程

前言

Tbx18 属于一个大的 T-box 转录因子家族，在脊椎动物和无脊椎动物中调节各种发育过程，并富集于前体心外膜、心外膜、心外膜下间质、横膈和心肌等^[1-3]。Tbx18 对于心外膜的发育和 EMT 的过程是不可缺少的，并且 Tbx18 的缺失会导致冠状动脉血管成熟缺陷^[1,4]。体外培养 Tbx18+胚胎心外膜细胞是研究该细胞发育过程中 EMT 和相关信号通路的基础。转录因子通过抑制编码上皮粘附分子的基因(E-cadherin, ZO-1, Claudin-1)和激活间充质基因(N-cadherin, Vimentin, α -SMA, Fibronectin 1, Snail)介导上皮细胞向间质表型的转化，这也是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的产生和迁移所必需的^[5]。

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 是目前研究最充分的 EMT 和 ECM 产生的上游调控分子之一^[6]。TGF- β 1-3 均在胚胎(embryo, E) 12.5 天的小鼠心外膜表达^[7]，它们与同一受体复合物结合，具有共同诱导上皮细胞 EMT 的能力^[8-10]。通过 qRT-PCR 和免疫荧光技术，我们从 E12.5 天胚胎小鼠上取出心脏，进行体外心外膜细胞培养，以确定其中 Tbx18 基因的表达水平，并测定培养出的细胞的纯度。使用 TGF- β 重组蛋白干预心外膜细胞诱导 EMT，使用 qRT-PCR 检测上皮和间质细胞标志物的表达，为体外研究心外膜细胞 EMT 的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

重庆医科大学动物饲养中心提供了 C57BL/6J 小鼠，这些小鼠均已经获得了良好的饲养条件。所有动物育种和实验均按照重庆医科大学动物保护使用委员会批准的方案进行。所有的动物研究都是根据 ARRIVE 指南进行的^[11]。晚上 8 点将 C57 雌、雄小鼠按 1:2 或 1:3 合笼交配，并于次日早晨 8 点观察雌鼠阴栓，见阴栓

则记胚龄 E0.5 天。

1.1.2 实验材料和仪器

眼科剪	上海医疗器械股份有限公司
镊子	上海医疗器械股份有限公司
加样枪	美国 Eppendorff 公司
14mm×14mm 盖玻片	江苏世泰公司
粘附载玻片	江苏世泰公司
六孔板	无锡 NEST 公司
十二孔板	无锡 NEST 公司
200μl EP 管	无锡 NEST 公司
1.5ml EP 管	无锡 NEST 公司
15ml 离心管	无锡 NEST 公司
50ml 离心管	无锡 NEST 公司
八联管	无锡 NEST 公司
巴氏滴管	无锡 NEST 公司
细胞培养箱	美国 Thermo Fisher 公司
电热恒温水浴锅	上海一恒公司
超净工作台	美国 Thermo Fisher 公司
低温离心机	美国 Thermo Fisher 公司
纯水仪	美国 Thermo Fisher 公司
超微量分光光度计	德国 Implen 公司
制冰机	日本 Sanyo 公司
涡旋振荡器	德国 IKA 公司
低温冰箱	中国海尔公司
超低温冰箱	美国 Thermo Fisher 公司
倒置细胞显微镜	日本 Nikon 公司
正置显微镜	日本 Olympus 公司
荧光共聚焦显微镜	日本 Nikon 公司

定量 PCR 仪 美国 Bio-Rad 公司

1.1.3 实验试剂

DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清(FBS)	美国 Gibco 公司
青霉素-链霉素溶液	中国碧云天公司
明胶	德国 BioFroxx 公司
PBS	武汉博士德公司
TGF- β 1 重组蛋白	英国 Abcam 公司
兔源多克隆抗 TBX18 抗体	英国 Abcam 公司
Trizol	美国 Invitrogen 公司
三氯甲烷	重庆川东化工公司
异丙醇	重庆川东化工公司
无水乙醇	重庆川东化工公司
DEPC 水	中国碧云天公司
PrimeScrip RT reagent Kit with gDNA Eraser	日本 Takara 公司
TB Green Premix Ex Taq II	日本 Takara 公司
PCR 引物	上海生工公司
Triton X-100	北京索莱宝公司
牛血清白蛋白(BSA)	北京索莱宝公司
柠檬酸	北京索莱宝公司
胰酶	美国 Sigma 公司
II 型胶原酶	美国 Sigma 公司
4%多聚甲醛	武汉博士德公司
山羊血清	中国碧云天公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG H&L	英国 Abcam 公司
DAPI 染色液	中国碧云天公司
抗荧光淬灭剂	中国碧云天公司

1.2 方法

1.2.1 实验试剂的配制

(1) 细胞培养基的配制

配制含有 10% FBS 的 DMEM 高糖完全培养基：45ml DMEM 高糖培养基+5ml 胎牛血清+0.5ml 青霉素-链霉素溶液混匀。

(2) PBS 的配制

将 2000ml 的蒸馏水倒入 5000ml 的塑料容器内，并加入两袋 PBS 粉末，使其完全溶解，然后将其置于磁力搅拌器上，进行彻底的混合，最后将其装入 500ml 的玻璃瓶内，并置于高压蒸汽灭菌锅中进行灭菌处理。

(3) 1%明胶的配制

将 2g 明胶粉末加入 200ml PBS 中，55℃水浴至充分溶解，放入高压蒸汽灭菌锅中灭菌备用。

(4) TGF- β 1 重组蛋白溶液配制

开盖前振荡离心，在 10mM 柠檬酸(pH 3.0)中重构至 50 μ g/ml。使用含有 2mg/ml 白蛋白的 PBS 中进一步稀释为所需浓度，置于-20℃中保存备用。

(5) 细胞解离液的配制

按胰酶 0.6mg/ml，II 型胶原酶 0.4mg/ml 的浓度溶于 PBS 中。

1.2.2 体外培养胚胎 Tbx18+心外膜细胞

(1) 1%明胶铺板：

- 1) 超净台中打开 12 孔板，每孔加入高压灭菌后的 1%明胶；
- 2) 10 分钟后，吸走明胶，自然风干；
- 3) 需要做免疫荧光的细胞标本，先提前在 12 孔板中放入一片 14mm $\times$ 14mm 的盖玻片，再加入 1%明胶铺板。

(2) 获取 E12.5 天小鼠心脏

- 1) 雌雄小鼠合笼交配受孕；
- 2) 在 E12.5 天，我们处死孕鼠并放至无菌环境，以便进行胎鼠分离；
- 3) 通过观察和解剖，我们可以清除胚胎小鼠的心房和周围的血管组织。然后，我们使用无菌的巴氏滴管将心室放置在预先冷却的 DMEM 培养基中。

(3) 胚胎心脏的种植

- 1) 使用无菌巴氏滴管, 精确地将心室放置在由明胶覆盖的 12 孔板内;
- 2) 使用镊子精确地夹住一片 14mm×14mm 的无菌盖玻片, 将其覆盖在心室组织上;
- 3) 孔内加入适量细胞完全培养基;
- 4) 每孔种植 1-2 个心室。

(4) 细胞培养:

在心室种植完成之后, 应当谨慎地将 12 孔板移至 37°C、5% CO₂ 的原代细胞培养箱内, 同时应尽可能减少孔板的移动, 以确保其完整性。

(5) 心外膜细胞的爬出:

培养 1-2 天后用倒置细胞显微镜观察, 可见心室周围有大量铺路石样心外膜细胞爬出。

(6) 移除心室后继续培养:

- 1) 取出 12 孔板, 用 1ml 无菌注射器针头挑起盖玻片, 用镊子夹取并翻转 180 度后放入另一 12 孔板中, 加入适量完全培养基, 移入原代细胞培养箱中继续培养;
- 2) 同时, 用针头小心地挑离心室组织, 用负压吸引器吸走心室组织和剩余培养基;
- 3) 用适量无菌 PBS 液润洗孔板;
- 4) 重新加入适量完全培养基, 移入原代细胞培养箱中继续培养。

(7) 每两天换液一次, 并观察细胞形态。

1.2.3 TGF- β 诱导心外膜细胞

- (1) 移除心室培养后两天, 吸走培养基, 用适量无菌 PBS 液润洗孔板;
- (2) 每孔加入 500 μ l 完全培养基和 5ng TGF- β 1 重组蛋白, 浓度为 10ng/ml;
- (3) 继续培养 48 小时后, 观察细胞形态。

1.2.4 乳鼠原代心肌细胞的体外分离与培养

- (1) 1 天大的 C57 乳鼠被冰冻在冰块中, 并进行 10min 的麻醉;
- (2) 使用 75%乙醇溶液浸泡消毒乳鼠, 然后行断颈法处死;
- (3) 沿胸骨左缘从膈肌剪至锁骨, 充分暴露心脏;

- (4) 于无菌环境下, 用镊子钝性分离心脏至 4℃预冷无酶解离液中;
- (5) 用眼科剪和镊子在无菌纱布上去除心房和心脏周围大血管组织, 将心室组织放于 4℃预冷含酶解离液中;
- (6) 用镊子于心尖处固定心脏, 用另一眼科剪将心脏剪碎;
- (7) 吸取组织碎片悬液于 15ml 离心管中, 置于 37℃水浴箱中并以 80 转/分钟震荡消化 5min;
- (8) 小心弃掉上清, 重新加入含酶解离液消化 20min, 取上清至另一装有 2ml 胎牛血清的 15ml 离心管中, 离心 5min, 1000 转/分钟, 弃上清, 用 4ml 胎牛血清重悬后置于 37℃水浴箱中暂存;
- (9) 剩余组织块继续加含酶解离液消化 25min, 取上清液至另一装有 2ml 胎牛血清的 15ml 离心管中, 离心 5min, 1000 转/分钟, 弃上清, 用 4ml 胎牛血清重悬后置于 37℃水浴箱中暂存;
- (10) 重复步骤 (9);
- (11) 剩余组织块继续加含酶解离液消化 15min, 取上清液至另一装有 2ml 胎牛血清的 15ml 离心管中, 离心 5min, 1000 转/分钟, 弃上清, 用 4ml 胎牛血清重悬后置于 37℃水浴箱中暂存;
- (12) 剩余组织块继续加含酶解离液消化 10min, 取上清液至另一装有 2ml 胎牛血清的 15ml 离心管中, 离心 5min, 1000 转/分钟, 弃上清, 用 4ml 胎牛血清重悬后置于 37℃水浴箱中暂存;
- (13) 将 5 次收集的细胞悬液混合后, 经过 40 μ m 的筛网, 经过 5min、1000 转/分钟的离心, 最终用培养基进行重悬;
- (14) 贴壁 60min, 转移上清至另一 15ml 离心管, 补总体积至 10ml;
- (15) 1%明胶铺板:
 - 1) 超净台中打开六孔板, 每孔加入高压灭菌后的 1%明胶;
 - 2) 10 分钟后, 吸走明胶, 自然风干;
- (16) 将细胞接种至六孔板, 小心地移入 37℃、5% CO₂ 原代细胞培养箱中培养, 每两天换液一次, 并观察细胞形态。

1.2.5 细胞免疫荧光

- (1) 移除孔板培养基, PBS 液洗 5min×3 次;
- (2) 4%多聚甲醛固定细胞 10min;
- (3) PBS 液洗 5min×3 次;
- (4) 0.25% Triton X-100 破膜 10min;
- (5) PBS 液洗 5min×3 次;
- (6) 10%山羊血清溶液封闭 30min;
- (7) 孵育一抗 (1:100 稀释), 4℃过夜;
- (8) 次日 PBS 液洗 5min×3 次;
- (9) 二抗 (1:100 稀释) 37℃孵育 45min;
- (10) PBS 液洗 5min×3 次;
- (11) DAPI 原液染细胞核 5min;
- (12) PBS 液洗 5min×3 次;
- (13) 通过使用抗荧光淬灭剂进行封片, 并在荧光共聚焦显微镜下进行拍摄。

1.2.6 细胞 RNA 提取

- (1) 移除细胞培养基, PBS 液洗 5min×3 次;
- (2) 孔板内于冰上加入 1ml Trizol 充分裂解细胞, 反复吹打细胞 15 次/每孔, 然后移入下一孔继续吹打;
- (3) 吹打完毕后, 移入 1.5ml 无酶 EP 管中, 冰上静置 5min;
- (4) 加入 200μl 氯仿, 颠倒混匀, 冰上静置 5min;
- (5) 4℃离心 15min, 12000 转/分钟;
- (6) 小心吸取上层水相 400-600μl 于另一无酶 EP 管中;
- (7) 加入与上层水相等体积的异丙醇, 颠倒混匀后冰上静置 10min;
- (8) 4℃离心 10min, 12000 转/分钟;
- (9) 小心弃掉上清液, 加冰预冷的 DEPC 水配置的 75%乙醇 1ml;
- (10) 4℃离心 5min, 12000 转/分钟;
- (11) 弃上清, 超净台内干燥 RNA 5-10min;
- (12) 加入 10-20μl DEPC 水溶解 RNA 沉淀;
- (13) 超微量分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 所得 RNA 可用于逆转录

反应或放于-80℃冰箱内短期保存。

1.2.7 RNA 逆转录为 cDNA

(1) 去除基因组 DNA 反应

根据 TAKARA PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒说明书，按如下成分于冰上配制 10 μ l 反应混合液：

试剂	使用量
5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2.0 μ l
gDNA Eraser	1.0 μ l
Total RNA	maximum 1.0 μ g
RNase Free dH ₂ O	up to 10.0 μ l

反应程序：

反应温度	时间
42℃（或者室温）	2min（5min）
4℃	

(2) 逆转录反应

按如下成分于冰上配制 10 μ l 反应混合液：

试剂	使用量
步骤（1）的反应液	10.0 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μ l
RT Primer Mix	1.0 μ l
5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0 μ l
RNase Free dH ₂ O	4.0 μ l
Total	20.0 μ l

逆转录反应程序：

反应温度	时间
37℃	15min
85℃	5sec

(3) 反应终止后, 合成的 cDNA 中加入 DEPC 水稀释至 100 μ l, 置于-20 $^{\circ}$ C 或更低温度保存。

1.2.8 qRT-PCR

(1) 引物设计与合成

实验所需引物序列由在线网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 设计。引物序列使用 BLAST 程序核对后, 由上海生工生物有限公司合成。根据使用说明书, 将引物冻干粉振荡, 然后加入无酶灭菌双蒸水, 调节至 100 μ M 浓度, 最终将其储存于-20 $^{\circ}$ C。在配制上机反应体系之前, 应当先将引物储存液稀释至 10 μ M, 以确保反应的有效性。

引物序列如下:

基因名称		引物序列 (5'-3')
Tbx18	Forward	CAGCTGACTATTCGGCCTGT
	Reverse	GAGTCCTAGGTGGGGCAAAG
E-cadherin	Forward	CAGGTCTCCTCATGGCTTTGC
	Reverse	CTCCGAAAAGAAGGCTGTCC
N-cadherin	Forward	GTGGAGGCTTCTGGTGAAATTG
	Reverse	TCCTTCGTGCACATCCTTCG
Vimentin	Forward	CTCCTACCGCAGGATGTTCC
	Reverse	CGTGTGGACGTGGTCACATA
PDGFR α	Forward	AGTGGCTACATCATCCCCCT
	Reverse	CCGAAGTCTGTGAGCTGTGT
Snail	Forward	CCATTCTCCTGCTCCCACT
	Reverse	CCTGGCACTGGTATCTCTTCA
Slug	Forward	AGAAGCCCAACTACAGCGAA
	Reverse	ATAGGGCTGTATGCTCCCGA
α -SMA	Forward	GGGAGTAATGGTTGGAATGG
	Reverse	GGTGATGATGCCGTGTTCTA
Fn1	Forward	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT
	Reverse	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG

cTnT	Forward	AGCCCACATGCCTGCTTAAA
	Reverse	TCTGAACAGGGACTGCACAC
GAPDH	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

(2) 实时荧光定量 PCR 上机反应

按如下成分于冰上配制 10 μ l 反应体系混合液:

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$)	5.0 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	2.0 μ l
cDNA	2.0 μ l
Total	10.0 μ l

上机反应程序:

反应温度	时间
Denaturation	
95 $^{\circ}$ C	30sec
qPCR $\times$ 40 Cycles	
95 $^{\circ}$ C	5sec
60 $^{\circ}$ C	30sec
Dissociation Curve	
95 $^{\circ}$ C	10sec
Melt Curve 65 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C, increment 0.5 $^{\circ}$ C	5sec

(3) 每个实验均进行至少三次重复。使用相对 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, 以 GAPDH 作为内参, 对基因表达量进行计算。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism v9.0 (La Jolla, CA, USA) 软件进行统计学分析, 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差来表示。两组样本间比较采用独立样本 t 检验, 多组样本间比较采用单因素方差分析。P 值 < 0.05 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 体外培养胚胎心外膜细胞

E12.5 天心室组织培养 24 小时后，可见有心外膜细胞从心室周围爬出（图 1-1a）；48 小时后可见多达十余层心外膜细胞从心室组织边缘爬出（图 1-1b）。挑走心室组织后继续培养 48 小时，心外膜细胞迅速增殖，呈“鹅卵石”样上皮细胞排列（图 1-1c 和 d）。

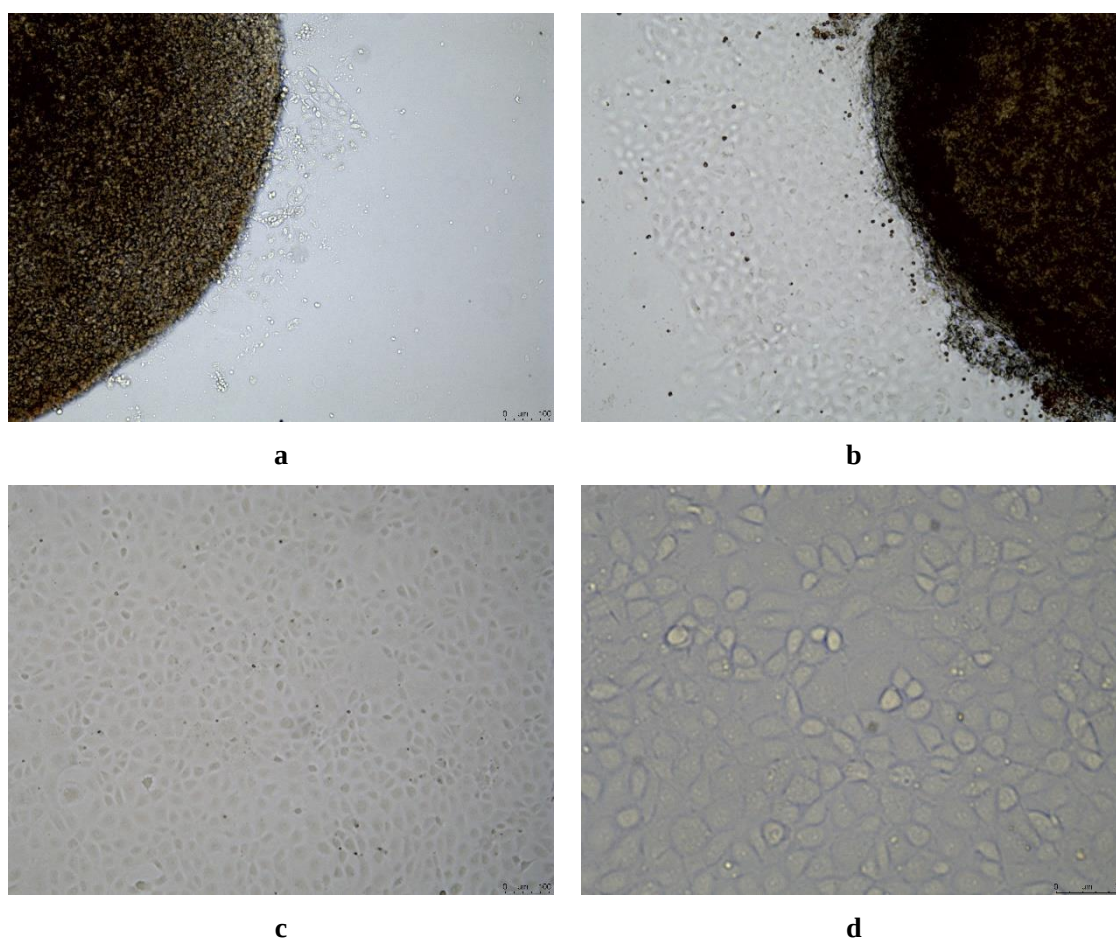
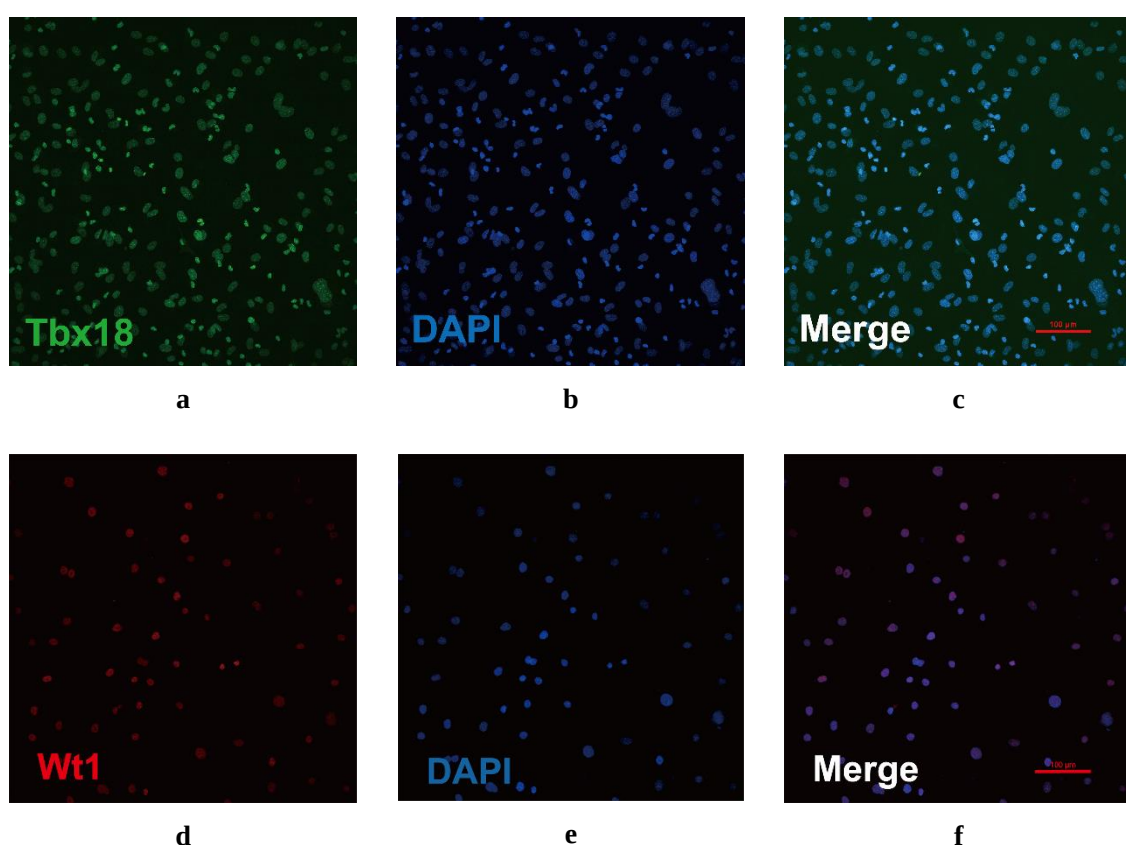


图 1-1 体外胚胎心外膜细胞的培养。(a)，种植心室组织后 24 小时。(b)，种植心室组织后 48 小时。(c 和 d)，移除心室组织后，细胞呈上皮样排列。

Figure 1-1 Culture of embryonic epicardial cells in vitro. (a), 24 hours after implantation of ventricular tissue. (b), 48 hours after implantation of ventricular tissue. (c and d), Epithelial-like arrangement of cells after removal of ventricular tissue.

2.2 Tbx18+胚胎心外膜细胞的鉴定

为了证明所培养的细胞为 Tbx18+的胚胎心外膜细胞，我们将该培养的细胞行免疫荧光和 qRT-PCR 实验进行鉴定。荧光结果显示，使用该方法培养出的细胞表达心外膜细胞标志物 Tbx18 蛋白（图 1-2a-c）和 Wt1 蛋白（图 1-2d-f）。qPCR 结果显示，与原代心肌细胞对照，该细胞高表达 Tbx18 mRNA，而基本不表达心肌细胞标志物 cTnT（图 1-2g）；而心肌细胞高表达 cTnT，几乎不表达 Tbx18（图 1-2h）。这些结果表明，我们使用该方法培养的细胞为 Tbx18+/Wt1+的胚胎心外膜细胞，为后续研究心外膜细胞 EMT 过程提供了细胞样品。



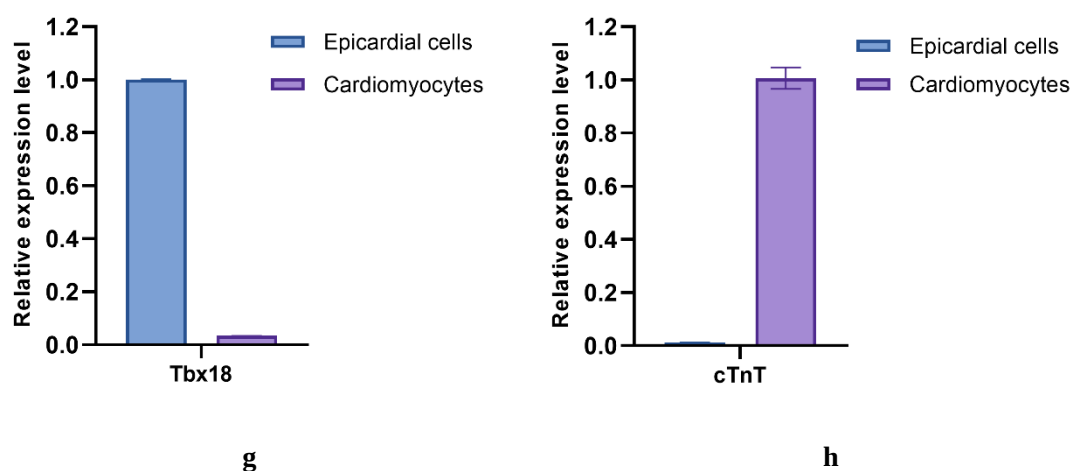


图 1-2 体外培养胚胎 Tbx18+心外膜细胞表达 Tbx18 蛋白和 mRNA。(a-c)，免疫荧光显示培养心外膜细胞表达 Tbx18 蛋白。(d-f)，免疫荧光显示培养心外膜细胞表达 Wt1 蛋白。(g)，心外膜细胞高表达而心肌细胞低表达 Tbx18 mRNA。(h)，心肌细胞高表达而心外膜细胞几乎不表达 cTnT mRNA。

Figure 1-2 In vitro cultured embryonic Tbx18+ epicardial cells with high expression of Tbx18 protein and mRNA. (a-c), Immunofluorescence shows expression of Tbx18 protein by cultured epicardial cells. (d-f), Immunofluorescence shows expression of Wt1 protein by cultured epicardial cells. (g), Epicardial cells are highly expressed while cardiomyocytes are low in Tbx18 mRNA. (h), Cardiomyocytes are highly expressed while epicardial cells barely express cTnT mRNA.

2.3 TGF- β 诱导心外膜细胞 EMT 过程

我们使用 10ng/ml TGF- β 1 重组蛋白诱导心外膜细胞 48 小时后拍照观察，发现上皮状的心外膜细胞（图 1-3a）形态发生改变，规则排列消失，变为梭状或不规则的间质细胞（图 1-3b）。提取细胞 RNA 行 qRT-PCR 检测调控 EMT 的转录因子、上皮细胞和间质细胞标志物的改变情况。我们发现，与对照组相比，TGF- β 诱导 48 小时后的细胞上皮细胞标志物 E-cadherin 表达显著减少，间质细胞标志物 Snail、Vimentin、Fn1 (fibronectin 1) 和 α -SMA 表达显著增加（图 1-3c）。这些结果提示，TGF- β 诱导后的心外膜细胞发生了上皮间质转化。

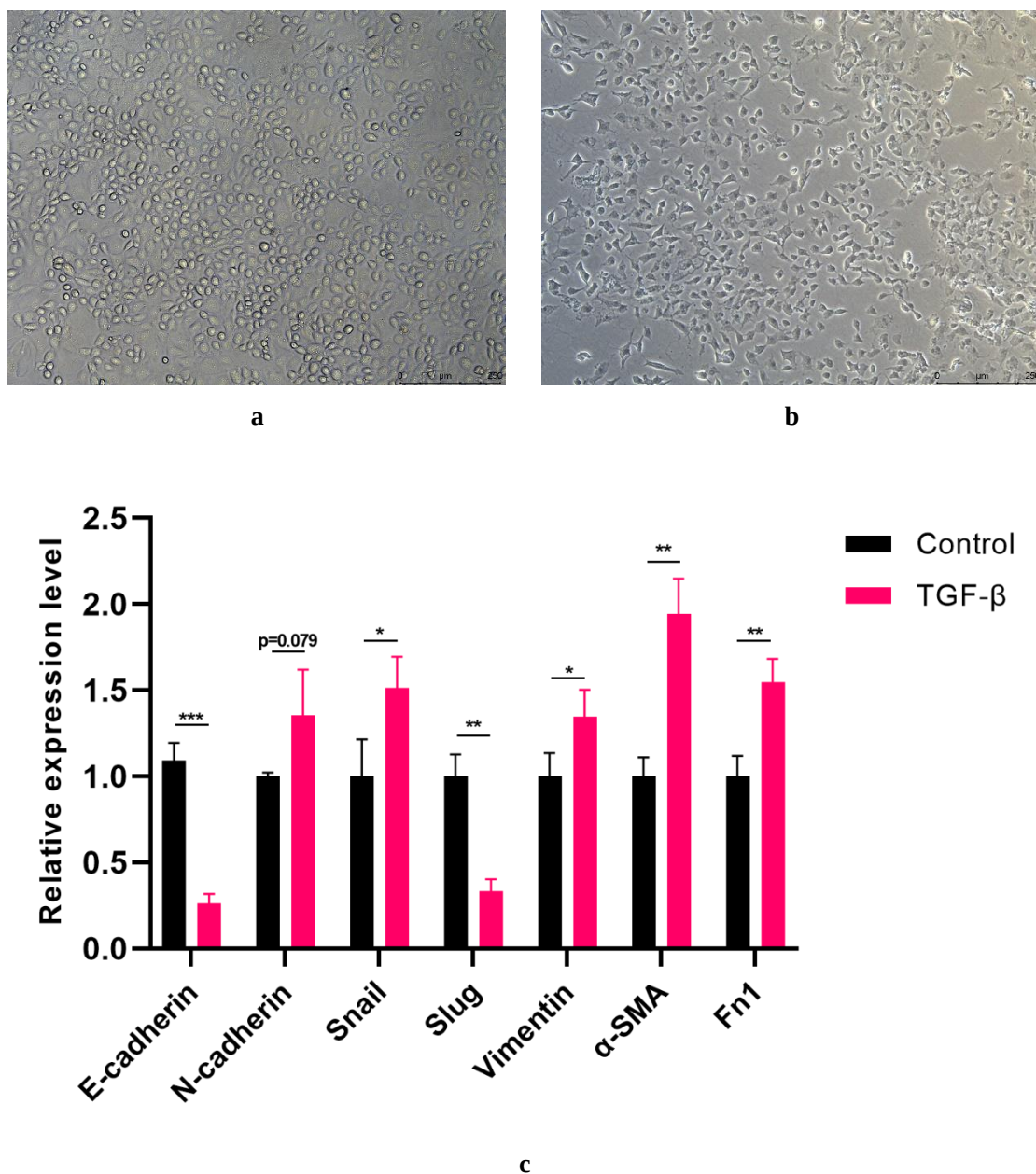


图 1-3 TGF- β 诱导心外膜细胞 EMT 过程。(a), 对照组心外膜细胞形态。(b), 10ng/ml TGF- β 1 诱导心外膜细胞 48 小时后细胞形态。(c), qRT-PCR 检测 EMT 标志物表达含量的改变。N=3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 1-3 TGF- β induced EMT process in epicardial cells. (a), Epicardial cell morphology of control group. (b), Cell morphology of 10ng/ml TGF- β 1 induced epicardial cells after 48 hours. (c), qRT-PCR to detect the alteration of EMT marker expression level. N=3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. TGF- β , transforming growth factor- β ; α -SMA, α -smooth muscle actin; Fn1, fibronectin 1.

3 讨论

心外膜是覆盖在心脏的一种间皮层, 长期以来一直被认为是一种独特的结构, 但其起源和功能仍不清楚。Manasek 在 1969 年证实了心外膜细胞来源于心脏以外, 我们今天称为前体心外膜。随后, 从鹌鹑到仓鼠等各种动物种类的多项观察性研究均描述了心外膜^[13-15]。然而, 直到 20 世纪末, 人们才发现了心外膜的功能作用: 逆转录病毒标记的前体心外膜细胞随着时间的推移被追踪, 并最终在心肌内被观察到, 这表明心外膜为发育中的心脏提供了细胞^[16,17]。从小鼠胚胎 E9.5 开始, 来自前体心外膜的细胞向心脏迁移并增殖, 覆盖在裸露的心肌上成为心外膜^[18]。到 E11.5 时, 心外膜细胞已完全包裹住心脏, 表现出立方上皮细胞的表型^[19], 其特征是细胞粘附分子的表达, 如 E-cadherin 和 β -catenin, 它们确定了心外膜细胞层的完整性, 并维持了顶端到基底的极性^[20]。然后, 一部分心外膜细胞从心外膜层剥离并经历 EMT。在 EMT 期间, 细胞通过破坏其细胞粘附特征和细胞骨架组织重排而失去其上皮表型, 使其能够从邻近细胞分离并变得可以运动。此外, 细胞还获得了功能性间充质的特征, 如分泌细胞外基质蛋白的能力。心外膜 EMT 的主要结果是使细胞迁移到心外膜下间隙, 形成 EPDCs, 并继续侵入心肌分化为血管平滑肌细胞和心脏成纤维细胞等心脏支持细胞^[21-24]。在过去的几年里, 大量的研究证实心外膜细胞参与了血管系统的稳定^[25,26]、传导系统的形成^[27]以及心肌压实的过程^[28,29]。此外, 如果心外膜的形成受到阻碍, 将导致心肌壁变薄和冠状动脉血管缺陷等严重的心脏问题, 这些结果表明了心外膜对心脏发育的重要性^[30,31]。

心外膜还是分泌生长因子的中枢, 它可以分泌成纤维细胞生长因子、视黄酸、Wnt 以及许多其他的因子, 以调节心肌和冠状动脉血管的发育^[32-34]。Tbx18 是心脏发育的关键转录因子, 它属于一个大的 T-box 转录因子家族, 在脊椎动物和无脊椎动物中调节各种发育过程, 并富集于前体心外膜、心外膜、心外膜下间质、横膈和心肌等^[1-3]。它在心外膜细胞中高度表达, 但在其他早期心脏谱系中也有表达^[35,1]。Tbx18 对于心外膜的发育和 EMT 的过程是不可缺少的, 并且 Tbx18 的缺失会导致冠状动脉血管成熟缺陷^[1,4]。Tbx18VP16 的条件性错误表达(单纯疱疹病毒编码的 VP16 蛋白与 Tbx18 的 C 端融合)可导致 Notch3 和 TGF- β 信号通路介

导的心脏发育不良和异位平滑肌分化^[36,37]。并且,成熟的平滑肌细胞是通过 Tbx18 谱系来源的周细胞的分化而产生,这些周细胞可包裹微血管并保持血管完整性^[38]。

TGF- β 是目前研究最充分的 EMT 和 ECM 产生的上游调控分子之一^[6]。TGF- β 1-3 均在胚胎 E12.5 的小鼠心外膜表达^[7],具有共同诱导上皮细胞 EMT 的能力^[8-10]。为了进一步阐明 TGF- β 信号参与了心外膜行为的不同方面,体外模型对于能够独立研究心外膜 EMT 和心外膜侵袭是很重要的。有各种体外模型被用于研究心外膜的 EMT,例如,通过将心脏移植到胶原蛋白凝胶中,使心外膜细胞呈单层生长^[39]来研究鸡的心外膜细胞。移除心脏后,TGF- β 配体刺激单层心外膜可诱导 EMT,导致细胞形态改变和 EMT 标记物增加^[39]。同样的方法也被用于证明 TGF- β 诱导 E12.5 胚胎小鼠心外膜细胞的 EMT^[40]。心外膜细胞也可来源于人类胎儿的心脏^[41]。这些人胎儿细胞不是由心脏组织标本的心外膜生长而来,而是通过消化分离的心外膜层来获得,然后在心外膜特异性培养基中培养产生单细胞悬浮液。TGF- β 刺激这些人胎儿心外膜细胞可诱导 EMT^[42]。EMT 后,心外膜细胞获得了侵入底层组织的能力。心外膜细胞的侵袭可以在体外培养的心脏中进行更详细的研究。例如,当用 TGF- β 刺激带有 YFP 标记的 WT1+细胞的 E12.5 小鼠胚胎心脏时,侵入心肌的 YFP+细胞数量增加了^[43]。通过类似的方法使用培养的禽类心脏,TGF- β 被证明以剂量依赖的方式诱导心外膜细胞的侵袭^[44]。也有研究报道 TGF- β 不诱导心外膜 EMT 和侵袭,甚至在鸡心脏模型中抑制成纤维细胞生长因子诱导的心外膜 EMT 和侵袭^[45]。他们发现在 TGF- β 的刺激下,心外膜细胞产生了收缩和形成了细胞块。然而,这一收缩过程在后来的研究报道中与上皮标志物^[39]的丢失有关。此外,间充质分化和心外膜细胞的侵袭可能依赖于细胞培养条件的变化。在此例中,观察结果的偏差可能是由于没有使用胎牛血清,这与其他关于心外膜 EMT 的研究不同。此外,细胞层融合等培养条件也会影响 EMT 反应^[41]。值得注意的是,在体内研究中,不同的 TGF- β 配体具有独特且不可互换的功能,与此相反,在体外研究中,TGF- β 的类型之间似乎没有差异;在大多数研究中,所有三种 TGF- β 配体都对 EMT 和侵袭产生了类似的影响^[39-41]。因此,尽管一些文献中有相反的发现,但有充分的证据表明,TGF- β 诱导的心外膜 EMT 和心外膜细胞的侵袭对心脏的发育至关重要。

TGF- β 的刺激对上皮细胞中细胞粘附分子的调节是一个众所周知的作用^[46]。在心外膜方面, Dokic^[44]等人证明, 在加入 TGF- β 后 30 分钟内, 连接蛋白 E-cadherin 和 β -catenin 的膜表达开始下降, 表明细胞与细胞间粘附性降低。TGF- β 可通过机械破坏单层心外膜并测定所产生的碎片数量来衡量细胞间粘附的强弱。在 TGF- β 处理的单层心外膜中, 碎片的数量要高得多, 表明细胞间的强度降低了。用可溶性的 $\alpha 4 \beta 1$ 整合素配体血管细胞粘附分子 1(sVCAM1)处理单层心外膜, 可防止 TGF- β 诱导的 E-cadherin 和 β -catenin 的变化^[44], 从而维持上皮细胞的粘附特征。事实上, 与单独地使用 TGF- β 相比, 用 sVCAM1 与 TGF- β 联合孵育可减少碎片的数量^[44]。有趣的是, 用 sVCAM1 孵育鸡的心脏可以防止 TGF- β 在体外诱导的心外膜 EMT 和心外膜细胞侵袭^[44]。这个实验表明了细胞粘附分子的变化对心外膜 EMT 的发生至关重要。鉴于 TGF- β 具有能调节细胞粘附分子的能力, 因此 TGF- β 诱导 EMT 的一个重要步骤可能是下调细胞粘附分子, 然而具体的调节机制目前还尚不清楚。

小结

在本部分研究中, 我们采取体外培养 Tbx18+胚胎心外膜细胞的方法, 成功培养出类似心脏表面的单层心外膜细胞, 并成功使用 TGF- β 诱导心外膜 EMT, 为后续研究其下游分子调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] CHRISTOFFELS V M, GRIESKAMP T, NORDEN J, et al. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors[J]. *Nature*, 2009, 458(7240): E8-E9.
- [2] CHRISTOFFELS V M, MOMMERSTEEG M T M, TROWE M O, et al. Formation of the Venous Pole of the Heart From an *Nkx2-5*-Negative Precursor Population Requires *Tbx18*[J]. *Circulation Research*, 2006, 98(12): 1555-1563.
- [3] STENNARD F A, HARVEY R P. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart[J]. *Development*, 2005, 132(22): 4897-4910.
- [4] WU S P, DONG X R, REGAN J N, et al. Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels[J]. *Developmental Biology*, 2013, 383(2): 307-320.
- [5] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(3): 178-196.
- [6] XU J, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Research*, 2009, 19(2): 156-172.
- [7] MOLIN D G M, BARTRAM U, VAN DER HEIDEN K, et al. Expression patterns of Tgf β 1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton[J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 227(3): 431-444.
- [8] MIETTINEN P J, EBNER R, LOPEZ A R, et al. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1994, 127(6 Pt 2): 2021-2036.
- [9] PIEK E, MOUSTAKAS A, KURISAKI A, et al. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells[J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112 (Pt 24): 4557-4568.
- [10] VALCOURT U, KOWANETZ M, NIIMI H, et al. TGF-beta and the Smad signaling

- pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 1987-2002.
- [11] KILKENNY C, BROWNE W, CUTHILL I C, et al. Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 160(7): 1577-1579.
- [12] MANASEK F J. Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium[J]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1969, 22(3): 333-348.
- [13] VIRÁGH S, GITTENBERGER-DE GROOT A C, POELMANN R E, et al. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures[J]. *Anatomy and Embryology*, 1993, 188(4): 381-393.
- [14] VIRÁGH S, CHALLICE C E. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse[J]. *The Anatomical Record*, 1981, 201(1): 157-168.
- [15] PÉREZ-POMARES J M, MACÍAS D, GARCÍA-GARRIDO L, et al. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 1997, 210(2): 96-105.
- [16] MIKAWA T, FISCHMAN D A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(20): 9504-9508.
- [17] GITTENBERGER-DE GROOT A C, VRANCKEN PEETERS M P, MENTINK M M, et al. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions[J]. *Circulation Research*, 1998, 82(10): 1043-1052.
- [18] MÄNNER J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos[J]. *Anatomy and Embryology*, 1993, 187(3): 281-289.
- [19] VELECELA V, TORRES-CANO A, GARCÍA-MELERO A, et al. Epicardial cell shape and maturation are regulated by Wt1 via transcriptional control of Bmp4[J].

- Development (Cambridge, England), 2019, 146(20): dev178723.
- [20]WU M, SMITH C L, HALL J A, et al. Epicardial spindle orientation controls cell entry into the myocardium[J]. Developmental Cell, 2010, 19(1): 114-125.
- [21]VON GISE A, ZHOU B, HONOR L B, et al. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways[J]. Developmental Biology, 2011, 356(2): 421-431.
- [22]SMITS A M, DRONKERS E, GOUMANS M J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate[J]. Pharmacological Research, 2018, 127: 129-140.
- [23]DETTMAN R W, DENETCLAW W, ORDAHL C P, et al. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart[J]. Developmental Biology, 1998, 193(2): 169-181.
- [24]LIE-VENEMA H, VAN DEN AKKER N M S, BAX N A M, et al. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development[J]. TheScientificWorldJournal, 2007, 7: 1777-1798.
- [25]ZAMORA M, MÄNNER J, RUIZ-LOZANO P. Epicardium-derived progenitor cells require beta-catenin for coronary artery formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(46): 18109-18114.
- [26]GITTENBERGER-DE GROOT A C, WINTER E M, POELMANN R E. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2010, 14(5): 1056-1060.
- [27]KELDER T P, DUIM S N, VICENTE-STEIJN R, et al. The epicardium as modulator of the cardiac autonomic response during early development[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015, 89(Pt B): 251-259.
- [28]CHEN T H P, CHANG T C, KANG J O, et al. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor[J]. Developmental Biology, 2002, 250(1): 198-207.

- [29]WEEKE-KLIMP A, BAX N A M, BELLU A R, et al. Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010, 49(4): 606-616.
- [30]MÄNNER J, SCHLUETER J, BRAND T. Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos[J]. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2005, 233(4): 1454-1463.
- [31]GITTENBERGER-DE GROOT A C, VRANCKEN PEETERS M P, BERGWERFF M, et al. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation[J]. Circulation Research, 2000, 87(11): 969-971.
- [32]CAO Y, DUCA S, CAO J. Epicardium in Heart Development[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2020, 12(2): a037192.
- [33]SIMÕES F C, RILEY P R. The ontogeny, activation and function of the epicardium during heart development and regeneration[J]. Development (Cambridge, England), 2018, 145(7): dev155994.
- [34]QUIJADA P, TREMBLEY M A, SMALL E M. The Role of the Epicardium During Heart Development and Repair[J]. Circulation Research, 2020, 126(3): 377-394.
- [35]CAI C L, MARTIN J C, SUN Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. Nature, 2008, 454(7200): 104-108.
- [36]GREULICH F, FARIN H F, SCHUSTER-GOSSLER K, et al. Tbx18 function in epicardial development[J]. Cardiovascular Research, 2012, 96(3): 476-483.
- [37]GRIESKAMP T, RUDAT C, LÜDTKE T H W, et al. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells[J]. Circulation Research, 2011, 108(7): 813-823.
- [38]VOLZ K S, JACOBS A H, CHEN H I, et al. Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle[J]. eLife, 2015, 4: e10036.
- [39]COMPTON L A, POTASH D A, MUNDELL N A, et al. Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell

- differentiation in epicardial cells[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2006, 235(1): 82-93.
- [40] AUSTIN A F, COMPTON L A, LOVE J D, et al. Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGFbeta[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2008, 237(2): 366-376.
- [41] DRONKERS E, MOERKAMP A T, VAN HERWAARDEN T, et al. The Isolation and Culture of Primary Epicardial Cells Derived from Human Adult and Fetal Heart Specimens[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2018(134): 57370.
- [42] MOERKAMP A T, LODDER K, VAN HERWAARDEN T, et al. Human fetal and adult epicardial-derived cells: a novel model to study their activation[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, 7(1): 174.
- [43] SMITH C L, BAEK S T, SUNG C Y, et al. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling[J]. *Circulation Research*, 2011, 108(12): e15-26.
- [44] DOKIC D, DETTMAN R W. VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells[J]. *Developmental Biology*, 2006, 299(2): 489-504.
- [45] MORABITO C J, DETTMAN R W, KATTAN J, et al. Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development[J]. *Developmental Biology*, 2001, 234(1): 204-215.
- [46] XIE L, LAW B K, AAKRE M E, et al. Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line[J]. *Breast cancer research: BCR*, 2003, 5(6): R187-198.

第二部分：TGF- β 通过 miR-194-3p 调控心外膜细胞 EMT 过程

前言

通过上述部分的研究，我们成功使用 TGF- β 激活一系列转录因子在体外诱导了心外膜细胞的 EMT。除了转录调节，非编码 RNA 调控也可作为一种新的基因调控机制。非编码 RNA 是一类具有各种不同的功能和结构特征的分子，其中包括微小 RNA (miRNA) 和长链非编码 RNA (lncRNA)，它们在生物体内发挥着重要的作用^[1-3]。这两种类型的非编码 RNA 已在胚胎发育^[4-7]、细胞稳态^[8-10]、生理病理条件^[11-13]以及更多的在致癌疾病中发现了 EMT 的参与作用。MiRNA 是 19-25 个核苷酸长度的小的非编码 RNA 的一个子集，通过碱基互补配对结合到编码 RNA 的 3'UTR，并诱导蛋白质翻译阻断和 mRNA 降解，从而在转录后调节基因的表达^[1]。但是在心外膜向间质转化的过程中，我们对 miRNA 的调控作用还所知甚少。

因此，为了进一步了解在 TGF- β 诱导心外膜细胞 EMT 过程中 miRNA 对此的调控作用，我们进行了 miRNA 的转录组测序，来分析调控 EMT 的差异 miRNA 以及下游靶基因。我们还对差异 miRNA 及其靶基因的生物过程、细胞成分和分子功能进行了基因本体论(Gene Ontology, GO)和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)通路分析，并通过 qRT-PCR 对部分差异 miRNA 和靶基因进行验证，进而筛选出目标 miRNA 进行后续研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料和仪器

加样枪

美国 Eppendorff 公司

200 μ l EP 管

无锡 NEST 公司

1.5ml EP 管	无锡 NEST 公司
八联管	无锡 NEST 公司
低温离心机	美国 Thermo Fisher 公司
纯水仪	美国 Thermo Fisher 公司
倒置细胞显微镜	日本 Nikon 公司
超微量分光光度计	德国 Implen 公司
定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
半定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
显影仪	美国 Bio-Rad 公司
酶标仪	美国 Thermo 公司
电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
电转仪	美国 Bio-Rad 公司
电泳槽	美国 Bio-Rad 公司
电子天平	上海天平仪器厂

1.1.2 实验试剂

Trizol	美国 Invitrogen 公司
PBS	武汉博士德公司
三氯甲烷	重庆川东化工公司
异丙醇	重庆川东化工公司
无水乙醇	重庆川东化工公司
DEPC 水	中国碧云天公司
PrimeScrip RT reagent Kit with gDNA Eraser	日本 Takara 公司
TB Green Premix Ex Taq II	日本 Takara 公司
Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit	日本 Takara 公司
PCR 引物	上海生工公司
Triton X-100	北京索莱宝公司
4%多聚甲醛	武汉博士德公司
山羊血清	中国碧云天公司

兔源多克隆抗 β -Actin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 E-cadherin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 Vimentin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 PDGFR α 抗体	美国 CST 公司
兔源单克隆抗 N-cadherin 抗体	英国 Abcam 公司
兔源单克隆抗 delta 1 Catenin 抗体	英国 Abcam 公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG H&L	英国 Abcam 公司
TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG H&L	英国 Abcam 公司
DAPI 染色液	中国碧云天公司
抗荧光淬灭剂	中国碧云天公司
Tris	中国索莱宝公司
SDS	中国索莱宝公司
甘氨酸	中国索莱宝公司
TBS	中国博士德公司
吐温 20	中国索莱宝公司
PVDF 膜	美国 Bio-Rad 公司
ECL 化学发光试剂盒	中国雅酶公司
PAGE 凝胶制备试剂盒	中国雅酶公司
RIPA 裂解液	中国碧云天公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	中国博士德公司
蛋白酶抑制剂 PMSF	中国博士德公司
脱脂奶粉	中国博士德公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	中国碧云天公司
预染蛋白 Marker	美国 Thermo Fisher 公司
RFect ^{PM} 原代细胞小核酸转染试剂	中国百代生物公司

1.2 方法

1.2.1 实验试剂的配制

(1) 蛋白标准品的配制

取 0.8ml 蛋白标准配制液加入到一管 20mg 蛋白标准中,充分溶解后配制成 25mg/ml 的蛋白标准溶液。取 20 μ l 25mg/ml 蛋白标准,加入到 980 μ l 稀释液配制成 0.5mg/ml 蛋白标准。

(2) TBS 缓冲液的配制

将 2 $\times$ TBS 结晶粉末倒入 2000ml 双蒸水中,充分溶解后分装至 1000ml 玻璃瓶里。

(3) TBST 缓冲液的配制

将配制好的 1 $\times$ TBS 缓冲液 1000ml 中加入 1ml 吐温 20,配制成 1 $\times$ TBST 缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存。

(4) 电泳缓冲液 (5 $\times$) 的配制

用电子天平称取甘氨酸 72.0g, Tris 15.15g, SDS 5.0g, 加至 1000ml 烧杯中,加入约 800ml 双蒸水,用磁力搅拌器充分搅拌均匀,倒入量筒中用双蒸水定容至 1000ml,装至 1000ml 玻璃瓶中,4 $^{\circ}$ C 保存。

(5) 转膜缓冲液 (1 $\times$) 的配制

用电子天平称取甘氨酸 72.0g, Tris 15.15g, 加至 1000ml 烧杯中,加入约 800ml 双蒸水,用磁力搅拌器充分搅拌均匀,倒入量筒中用双蒸水定容至 1000ml,装至 1000ml 玻璃瓶中配制成 5 $\times$ 转膜缓冲液。取 200ml 5 $\times$ 转膜缓冲液,加入 200ml 甲醇,用双蒸水定容至 1000ml,配制成 1 $\times$ 转膜缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存。

(6) 5%脱脂牛奶的配制

将一袋 10mg 脱脂奶粉加入至 200ml TBST 缓冲液中,充分搅拌溶解后配制成 5%脱脂牛奶。

1.2.2 细胞蛋白提取和蛋白质印记法

(1) 用含有 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白;

(2) BCA 法测定蛋白浓度;

(3) 稀释蛋白至相同浓度,按 4:1 体积加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 金属浴 10min;

(4) 根据说明书配制 10% SDS-PAGE 凝胶,加入蛋白样品和预染蛋白 Marker;

- (5) 150V 电泳 90min;
- (6) 用湿转法 250mA 100min 将蛋白从凝胶转至 PVDF 膜上;
- (7) 5%脱脂牛奶室温封闭 2 小时;
- (8) 孵育一抗, 4℃过夜 (15-18 小时);
- (9) 回收一抗, TBST 洗膜 10min×3 次;
- (10) 室温孵育二抗 2 小时;
- (11) TBST 洗膜 10min×3 次;
- (12) 将膜滤去多余的水后放至新鲜配制的化学发光液中, 在显影仪中进行蛋白显影和拍照。

1.2.3 细胞免疫荧光

如上部分所述。

1.2.4 细胞 RNA 提取

如上部分所述。

1.2.5 RNA 逆转录为 cDNA

如上部分所述。

1.2.6 miRNA 聚腺苷酸化与逆转录

(1) 逆转录反应

按如下成分于冰上配制 10μl 反应混合液:

试剂	使用量
mRQ Buffer (2×)	5μl
RNA sample (0.25-8μg)	3.75μl
mRQ Enzyme	1.25μl
Total	10μl

逆转录反应程序:

反应温度	时间
37℃	1hour

85°C

5min

(2) 反应终止后, 合成的 cDNA 中加入 DEPC 水稀释至 100 μ l, 置于-20°C 或更低温度保存。

1.2.7 qRT-PCR

(1) 引物设计与合成

miRNA 引物序列由上海生工生物有限公司设计与合成。根据引物合成使用说明书, 振荡并离心引物冻干粉后, 加入无酶灭菌双蒸水配成 100 μ M 浓度储存液于 -20°C 保存。配制上机反应体系时, 将引物储存液稀释为 10 μ M 浓度的工作液使用。

引物序列如下:

miRNA 名称	引物序列 (5'-3')
mmu-miR-135a-5p	CGCGGCCTATGGCTTTTTATTC
mmu-miR-34b-3p	GCGGCCTGATGACCTATGATTT
mmu-miR-142a-3p	AAGCGACCTGTAGTGTTCCTAC
mmu-miR-194-3p	TCCAGTGGAGCTGCTGTTACTTC

(2) mRNA qRT-PCR 上机反应

按如下成分于冰上配制 10 μ l 反应体系混合液:

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$)	5.0 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
灭菌水	2.0 μ l
cDNA	2.0 μ l
Total	10.0 μ l

上机反应程序:

反应温度	时间
Denaturation	
95°C	30sec

qPCR × 40 Cycles	
95°C	5sec
60°C	30sec
Dissociation Curve	
95°C	10sec
Melt Curve 65°C - 95°C, increment 0.5°C	5sec

(3) miRNA qRT-PCR 上机反应

按如下成分于冰上配制 miRNA 10μl 反应体系混合液:

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	5.0μl
miRNA-specific primer (10μM)	0.5μl
mRQ 3'Primer (10μM)	0.5μl
RNase Free dH ₂ O	2.0μl
cDNA	2.0μl
Total	10.0μl

按如下成分于冰上配制 U6 10μl 反应体系混合液:

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	5.0μl
U6 Forward Primer (10μM)	0.5μl
U6 Reverse Primer (10μM)	0.5μl
RNase Free dH ₂ O	2.0μl
cDNA	2.0μl
Total	10.0μl

上机反应程序:

反应温度	时间
Denaturation	
95°C	10sec
qPCR × 40 Cycles	
95°C	5sec

60°C	20sec
Dissociation Curve	
95°C	60sec
55°C	30sec
95°C	60sec

(4) 每个实验均进行至少三次重复。使用相对 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法, mRNA 以 GAPDH 作为内参, miRNA 以 U6 作为内参, 对表达量进行计算。

1.2.8 心外膜细胞 miRNA 转染

miRNA mimics 和 miRNA inhibitor 均由上海生工公司合成。根据合成使用说明书, 振荡并离心冻干粉后, 加入无酶灭菌双蒸水配成工作液使用。

(1) miRNA-RFect^{PM} 混合物准备 (以十二孔板为例):

- 1) 20pmol (1 μ l) miRNA 用 100 μ l 无血清培养基稀释;
- 2) 2 μ l RFect^{PM} 用 100 μ l 无血清培养基稀释, 混匀, 室温孵育 5min;
- 3) 孵育后将 miRNA 稀释液与 RFect^{PM} 稀释液混合 (总体积 200 μ l)。轻轻混匀, 室温孵育 20min;

(3) 将 200 μ l 混合物加入培养孔内, 每孔含有 1ml 无血清培养基。轻轻晃动培养板, 混匀;

(4) 37°C 培养 48 小时, qPCR 检测基因抑制效果; 或培养 72 小时后检测蛋白水平。

1.2.9 细胞划痕实验

- (1) 转染完毕后第二天, 用枪头比着细胞培养板, 垂直孔板做划痕;
- (2) PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入培养基;
- (3) 放入 37°C 培养箱, 按 0、4、8、12 小时取样, 拍照。

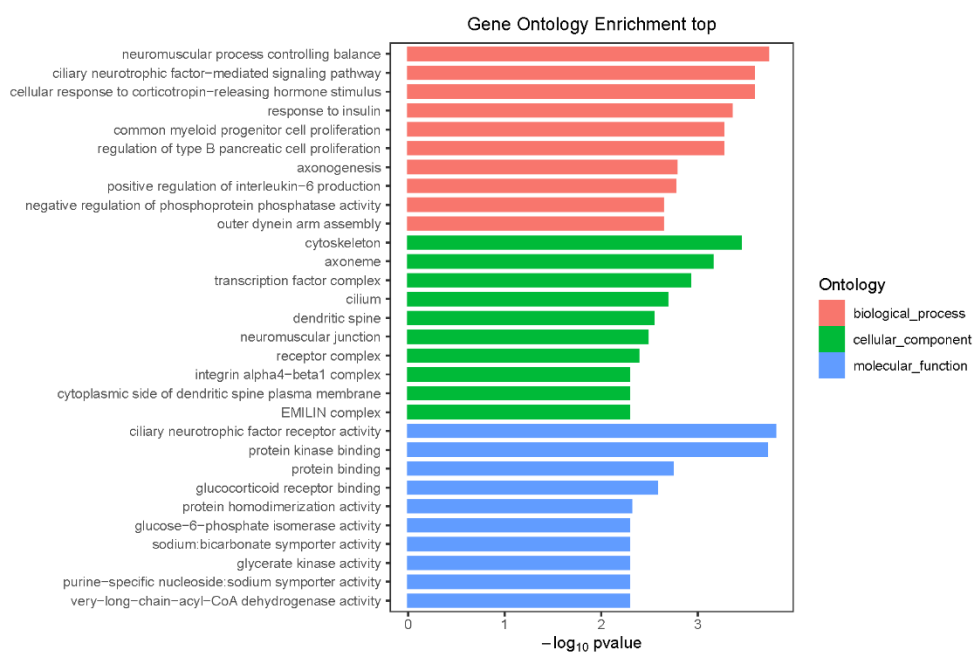
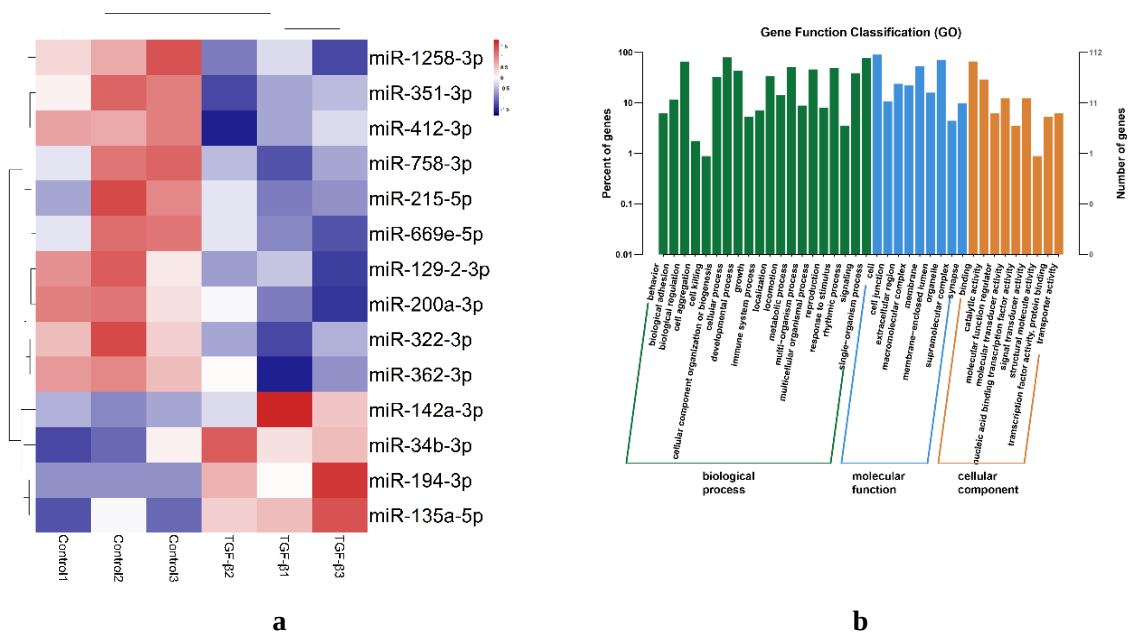
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism v9.0 (La Jolla, CA, USA) 软件进行统计学分析, 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差来表示。两组样本间比较采用独立样本 t 检验, 多组样本间比较采用单因素方差分析。P 值 < 0.05 为有统计学意义。

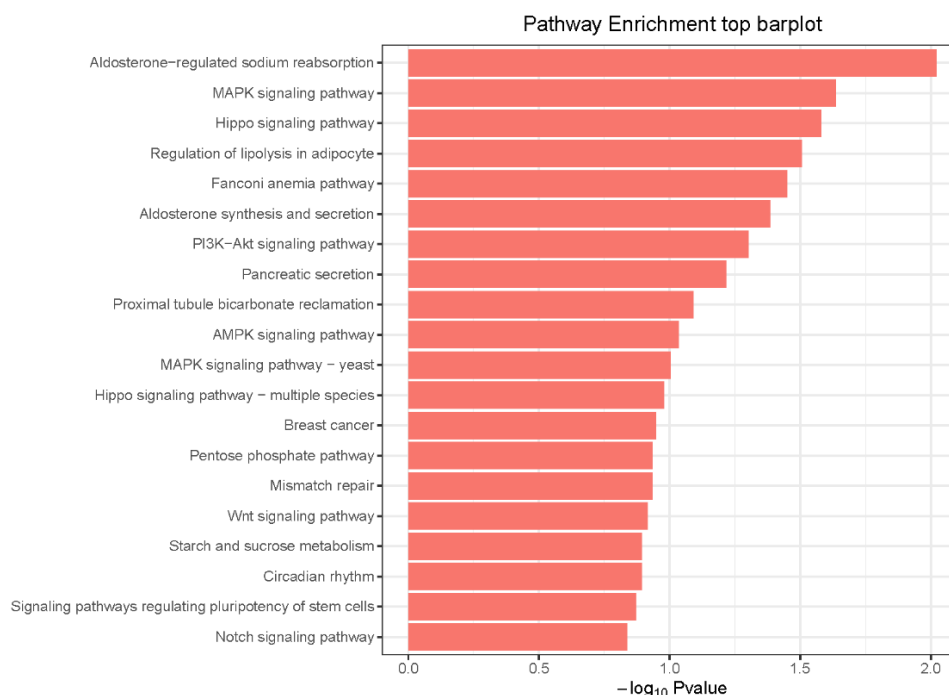
2 实验结果

2.1 TGF- β 组与对照组间的差异 miRNA 表达谱及功能富集分析

我们对 TGF- β 干预心外膜细胞组和非干预组进行了 miRNA 转录组测序，筛选出了有差异的 miRNA 14 个（倍数变化 ≥ 2 , $p < 0.05$ ），其中表达上调的有 4 个，下调的有 10 个（图 2-1a）。为了探究这些差异 miRNA 的潜在生物学功能，我们对其下游预测靶基因进行了 GO 富集和 KEGG 通路分析。在基因功能分类上，基因生物学过程富集在发育进程、生长、多细胞生物过程等；分子功能富集在细胞连接、细胞外区域、细胞膜等；细胞组分富集在结合、核酸结合转录因子活性、转录因子活性和蛋白结合等（图 2-1b）。GO 富集在细胞骨架、转录因子复合体、整合素 $\alpha 4$ - $\beta 1$ 复合物等（图 2-1c）。KEGG 通路分析富集在 MAPK 信号通路和 Hippo 信号通路等（图 2-1d）。



c



d

图 2-1 TGF- β 组与对照组间的差异 miRNA 表达谱及功能富集分析。(a)，彩色编码的热图显示 miRNA 在转录组中的差异表达谱。(b)，差异表达的 miRNA 预测靶基因的基因功能分类。(c)，差异表达的 miRNA 预测靶基因的 GO 分析结果。(d)，差异表达的 miRNA 预测靶基因的 KEGG 分析结果前 20 名。

Figure 2-1 Differential miRNA expression profiles and functional enrichment analysis between TGF- β group and control group. (a), Color-coded heatmap showing the differential miRNA expression profiles in the transcriptome. (b), Gene function classification of differentially expressed miRNAs predicting target genes. (c), GO analysis results of differentially expressed miRNAs predicting target genes. (d), Top 20 results of KEGG analysis for differentially expressed miRNA predicted target genes.

2.2 qRT-PCR 验证差异表达的 miRNA

基于转录组测序的差异表达 miRNA 分析结果，我们挑选了 4 个经 TGF- β 干预后表达上调的 miRNA (miR-135a-5p、miR-34b-3p、miR-194-3p、miR-142a-3p) 进行了 qRT-PCR 的验证。结果显示，心外膜细胞经 TGF- β 干预后 miR-194-3p、miR-142a-3p 表达量显著增加 (图 2-2)，与测序结果一致。根据以上结果，我们选取表达上调最显著的 miR-194-3p 作为后续研究对象。

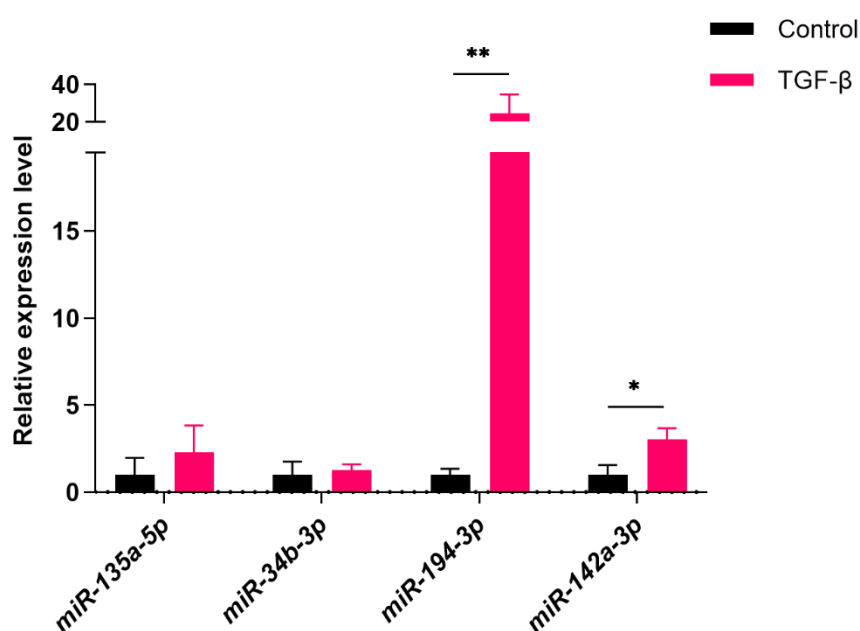


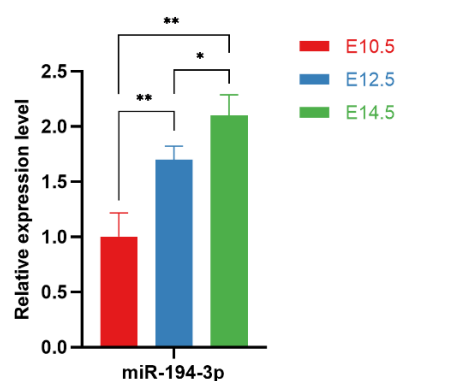
图 2-2 qRT-PCR 验证转录组测序中两组差异 miRNA 的表达。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

Figure 2-2 qRT-PCR validation of the expression of two sets of differential miRNAs in transcriptome sequencing. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

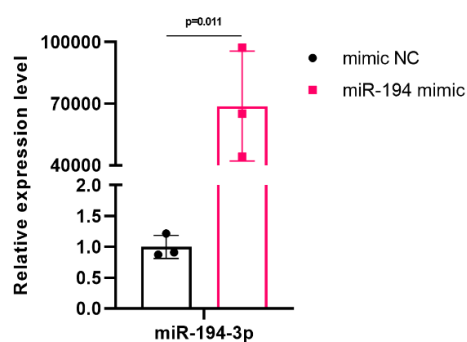
2.3 miR-194-3p 诱导心外膜细胞 EMT 过程

我们首先在不同的胚胎阶段，包括 E10.5、E12.5 和 E14.5 检测 miR-194-3p 的表达情况，发现随着胚胎心脏的发育，在心外膜细胞中 miR-194-3p 的表达量增加，提示 miR-194-3p 可能参与了心脏发育这些关键阶段的 EMT 过程（图 2-3a）。心外膜细胞培养 5 天后，转染 miR-194-3p mimics 使其过表达，qPCR 检测其表达量。转染 48 小时后，细胞显微镜下观察细胞形态，然后提取细胞 RNA 和蛋白检测 EMT 相关标志物的表达。我们可以发现，和对照组相比，转染 mimics 之后 miR-194-3p 表达量显著增加，证明转染成功（图 2-3b）。镜下观察细胞形态，过表达 miR-194 之后，细胞失去上皮样细胞排列，形态不规则且失去紧密连接，呈间质细胞形态（图 2-3c）。qPCR 结果显示，miR-194 过表达组上皮细胞标志物 E-cadherin 表达量显著减少，而间质细胞标志物 N-cadherin、Snail、Vimentin、PDGFR α 和 α -SMA 的表达显著增加（图 2-3d）。同样的，蛋白印记结果显示过表达 miR-194 之后细胞 E-cadherin 的蛋白含量显著减少，而 Vimentin、PDGFR α 的蛋白含量显著升高，提示细胞发生了 EMT（图 2-3e）。免疫荧光结果显示，过表

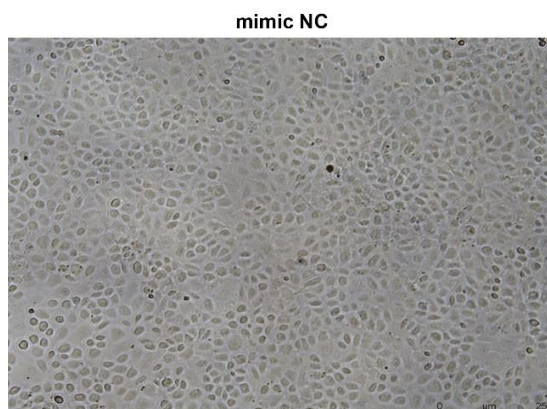
达 miR-194 组的 Vimentin、PDGFR α 荧光强度强于对照组，提示间质细胞数量增加（图 2-3f 和 g）。为了观察细胞的迁移能力，我们做了细胞划痕实验，实验结果显示过表达 miR-194 组的细胞迁移率显著高于对照组，且在划痕第 4 小时后迁移能力就显著增加（图 2-3h）。综上所述，过表达 miR-194 可以诱导心外膜细胞发生 EMT。



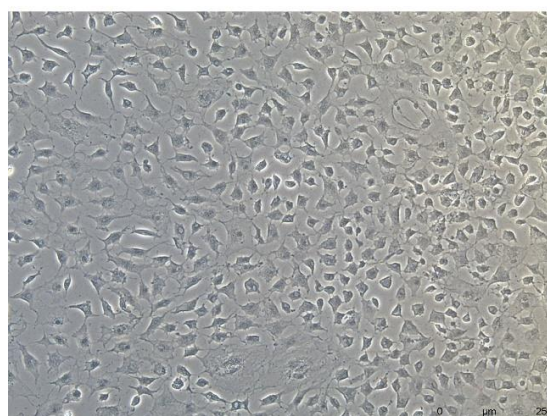
a



b

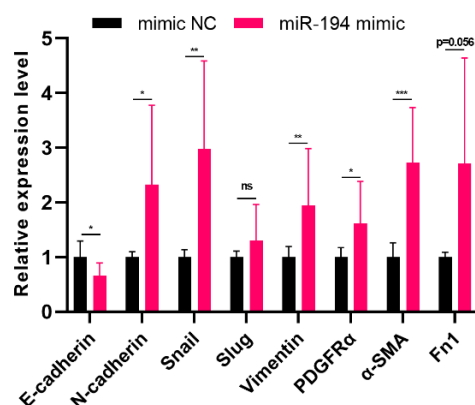


mimic NC

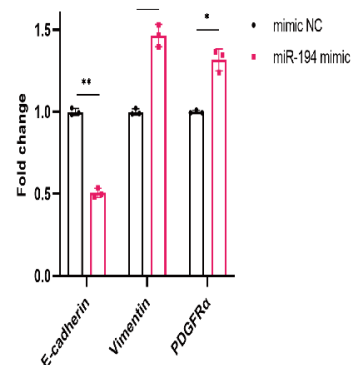
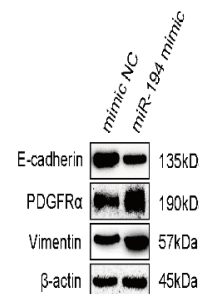


miR-194 mimic

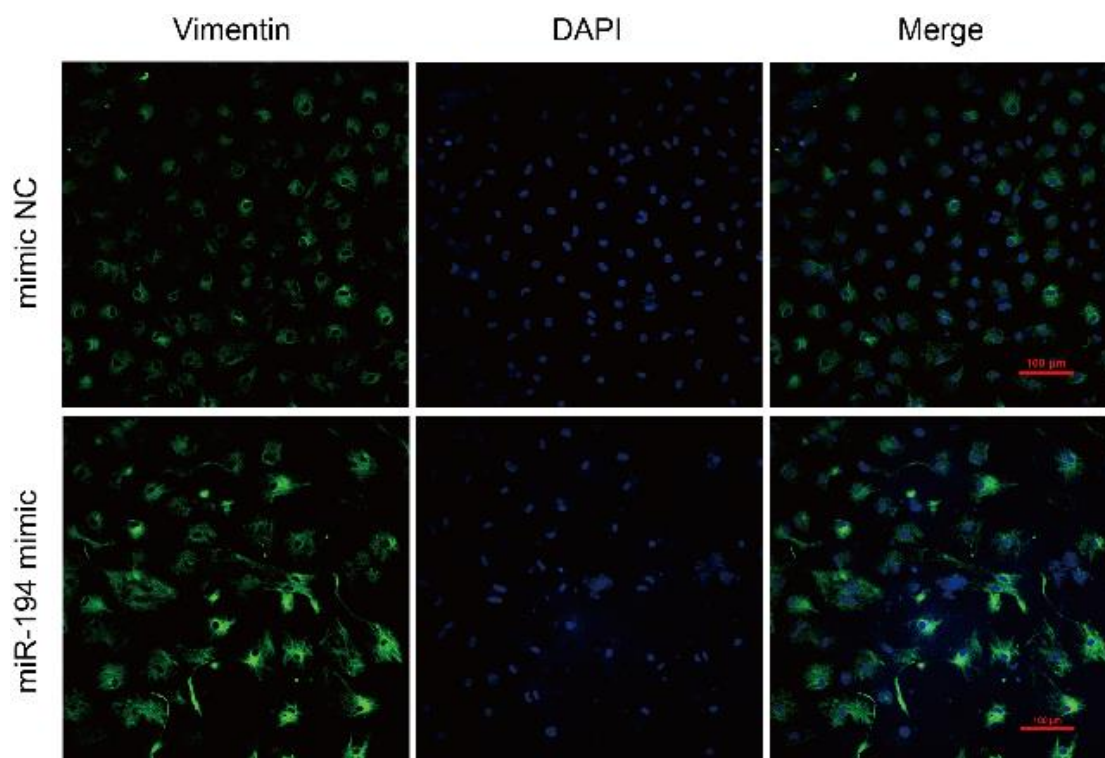
c



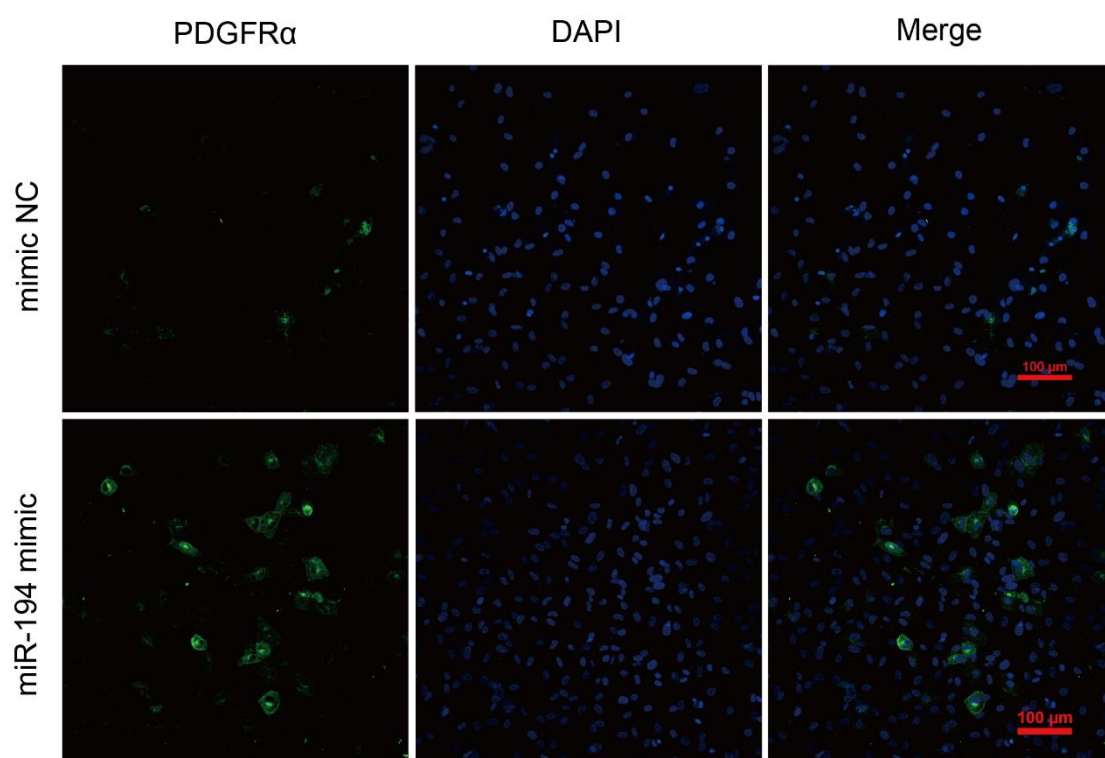
d



e



f



g

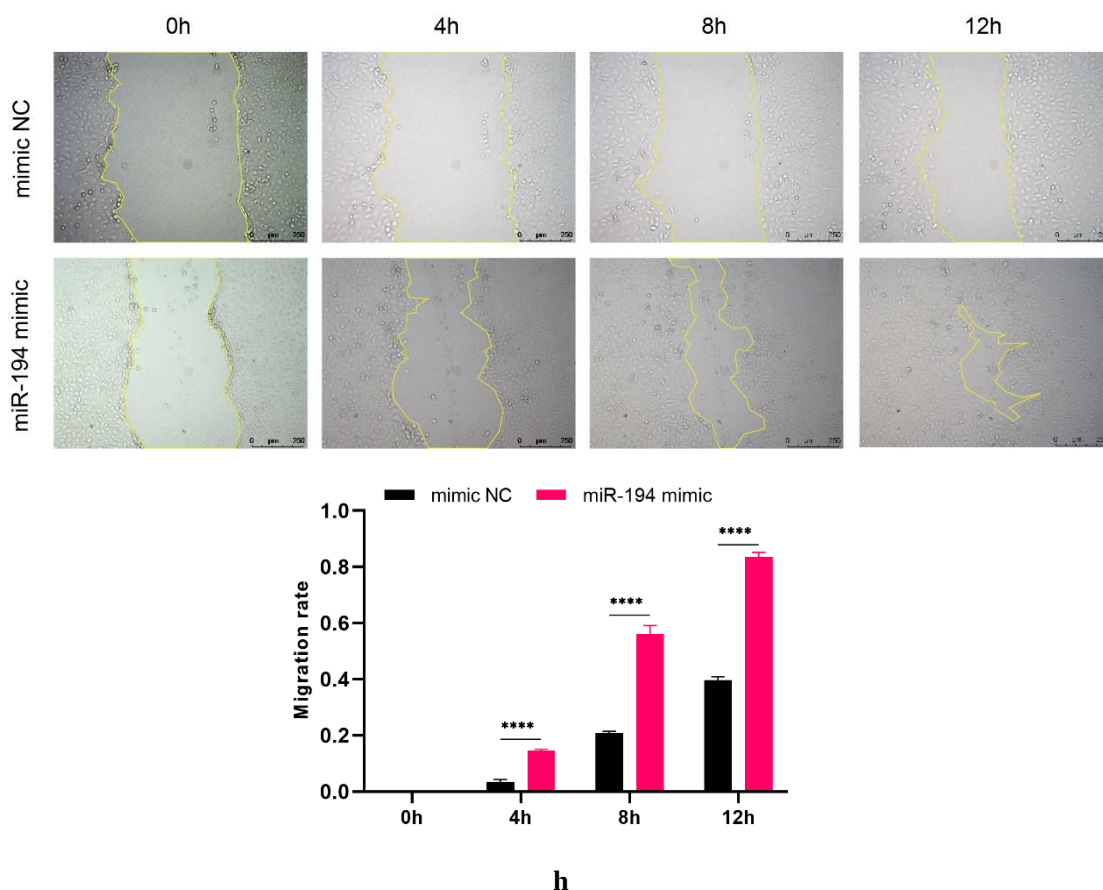


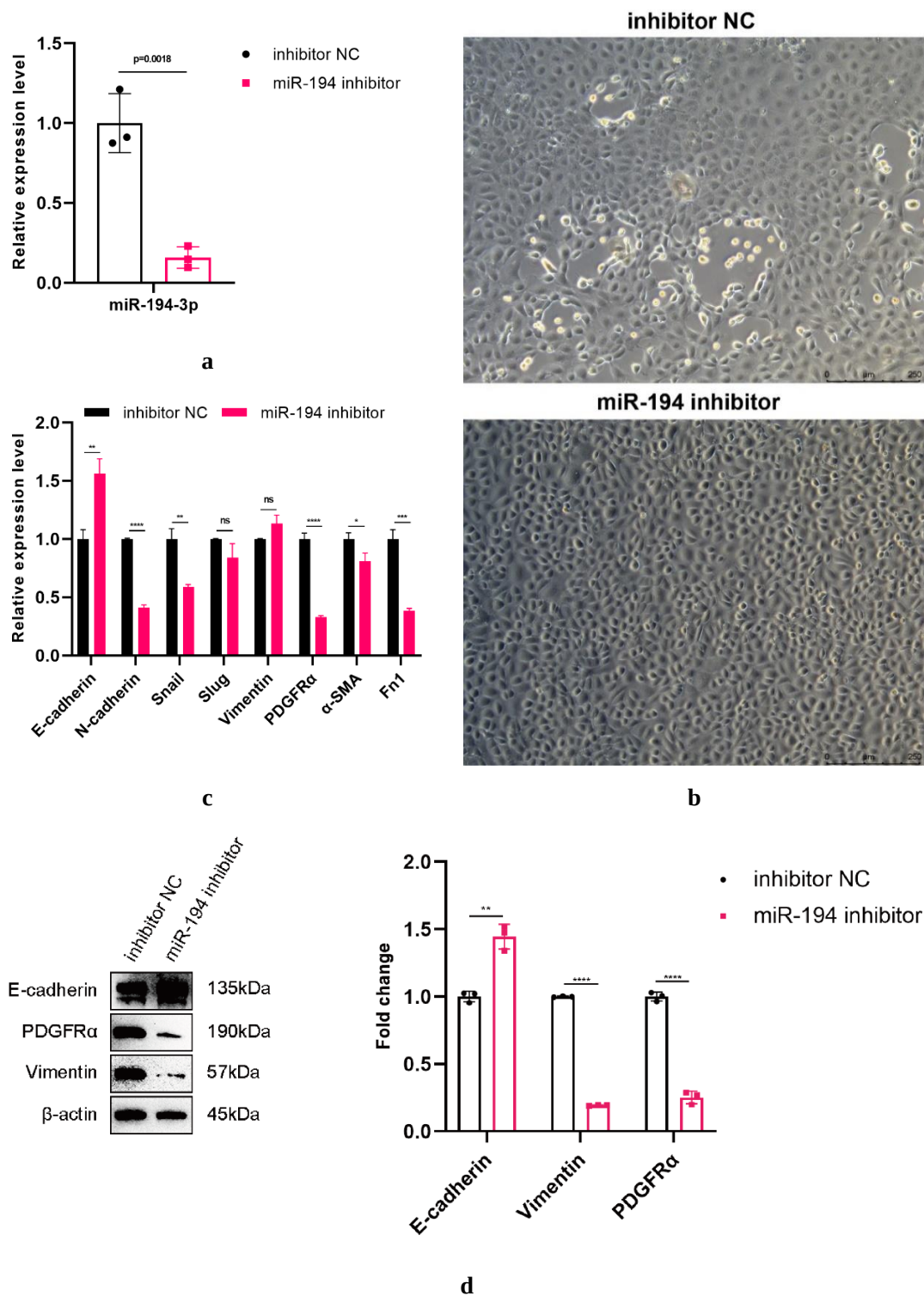
图 2-3 过表达 miR-194-3p 可诱导心外膜细胞发生上皮间质转化。(a), qPCR 分析显示 miR-194-3p 在不同胚胎天数(E10.5, E12.5 和 E14.5)的表达有显著变化。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。(b), qPCR 检测心外膜细胞转染 miR-194 mimics 后 miR-194-3p 的含量。(c), 过表达 miR-194 组和对照组的细胞形态。(d), 过表达 miR-194 后 qPCR 检测 EMT 标志物的改变情况。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; ns, 无显著差异。(e), 过表达 miR-194 后蛋白印记检测 EMT 标志物含量改变。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。过表达 miR-194 后免疫荧光检测 Vimentin (f)和 PDGFR α (g)的荧光强度改变。(h), 细胞划痕实验分别检测划痕 0h, 4, 8h, 12h 后细胞迁移情况。N=3; **** $p<0.0001$ 。

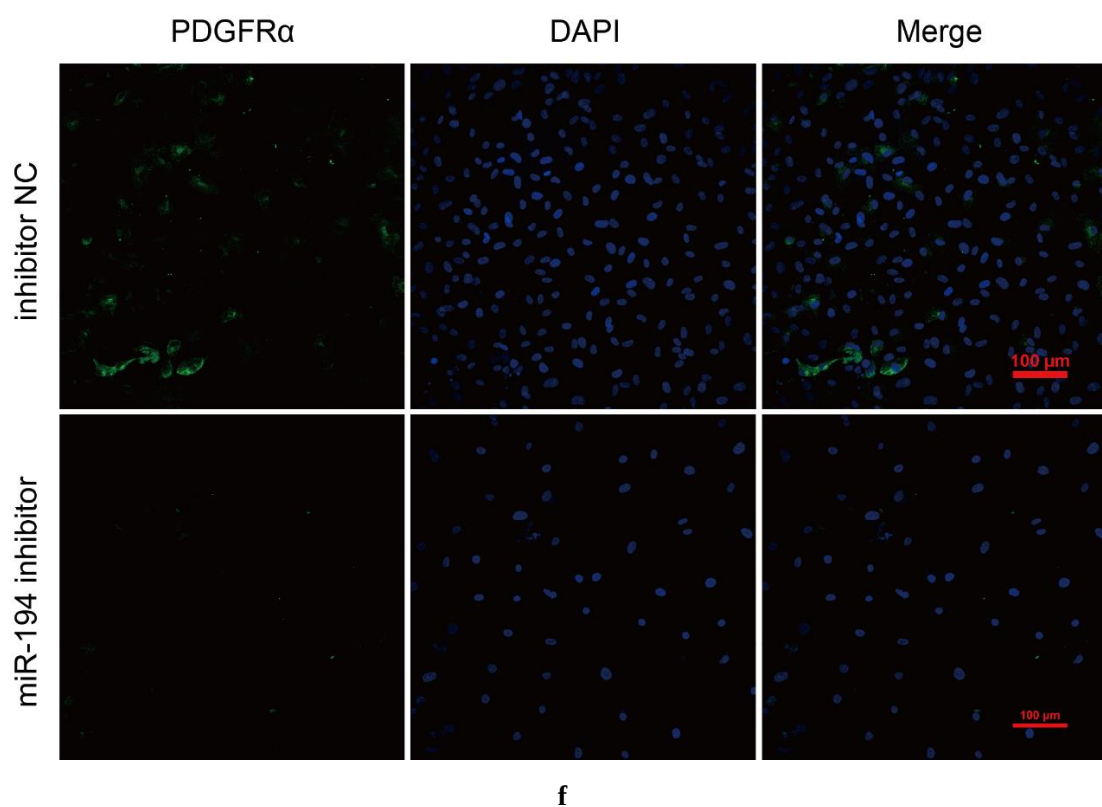
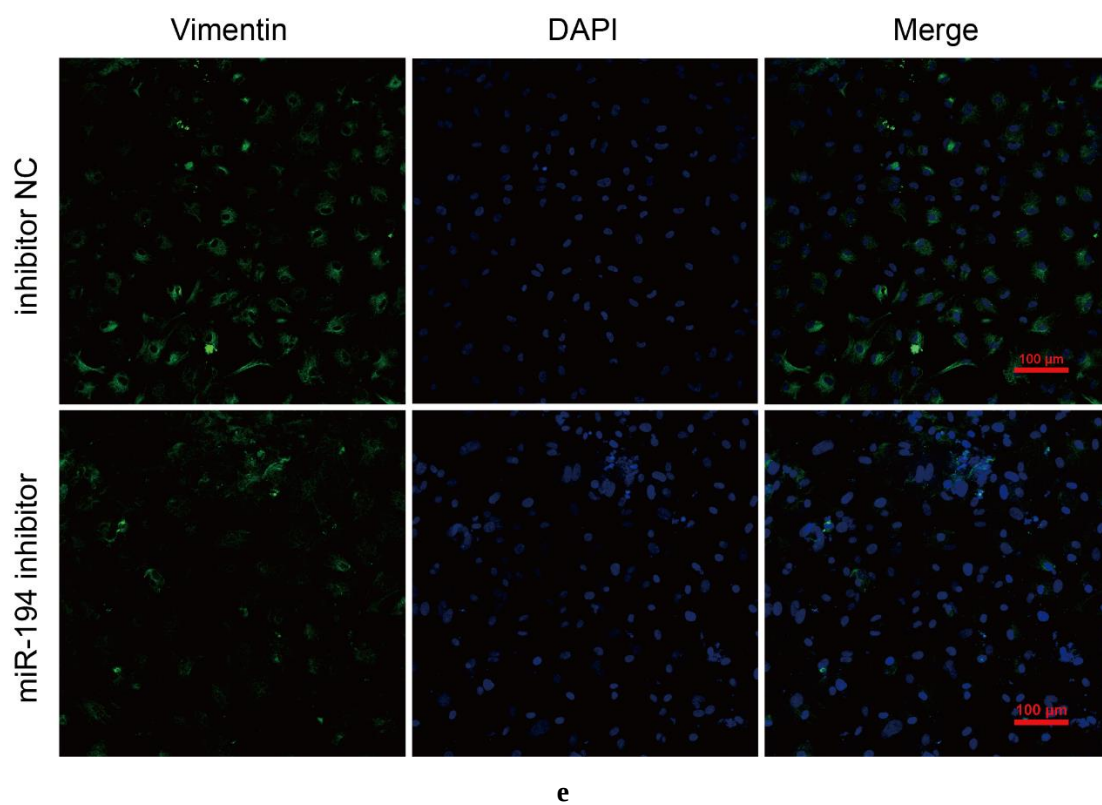
Figure 2-3 Overexpression of miR-194-3p induces epithelial mesenchymal transition in epicardial cells. (a) qPCR analysis showing significant changes in miR-194-3p expression at different embryonic days (E10.5, E12.5, and E14.5). N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$. (b), qPCR detection of miR-194-3p in epicardial cells after transfection with miR-194 mimics. (c), Cell morphology of the overexpression miR-194 group and the control group. (d), Alteration of EMT markers detected by qPCR after overexpression of miR-194. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; ns, not significant. (e), Altered EMT marker content detected by protein blotting after overexpression of miR-194. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Altered fluorescence intensity of Vimentin (f) and PDGFR α (g) detected by immunofluorescence after overexpression of miR-194. (h), Cell scratch assay to detect cell migration after scratching

for 0h, 4h, 8h, 12h, respectively. N=3; ****p<0.0001.

2.4 抑制 miR-194-3p 可能抑制心外膜细胞 EMT

心外膜细胞培养 5 天后，转染 miR-194-3p inhibitor 使其表达被抑制，qPCR 检测其表达量。转染 48 小时后，细胞显微镜下观察细胞形态，然后提取细胞 RNA 和蛋白检测 EMT 相关标志物的表达。我们可以发现，和对照组相比，转染 inhibitor 之后 miR-194-3p 表达量显著减少，证明转染成功（图 2-4a）。镜下观察细胞形态，抑制 miR-194 之后，和对照组相比细胞排列更为紧密（图 2-4b）。qPCR 结果显示，miR-194 抑制组上皮细胞标志物 E-cadherin 表达量显著增加，而间质细胞标志物 N-cadherin、Snail、PDGFR α 、 α -SMA 和 Fn1 的表达显著降低（图 2-4c）。同样的，蛋白印记结果显示抑制 miR-194 之后细胞 E-cadherin 的蛋白含量明显增多，而 Vimentin、PDGFR α 的蛋白含量显著降低，提示细胞 EMT 的过程被抑制了（图 2-4d）。免疫荧光结果显示，抑制 miR-194 组的 Vimentin、PDGFR α 荧光强度弱于对照组，提示间质细胞数量和对照组相比更少（图 2-4e 和 f）。为了观察细胞的迁移能力，我们做了细胞划痕实验，实验结果显示抑制 miR-194 组的细胞迁移率在 4 小时时无改变，而 8 小时后开始迁移能力显著低于对照组（图 2-4g）。综上所述，抑制 miR-194 可以抑制心外膜细胞发生 EMT。





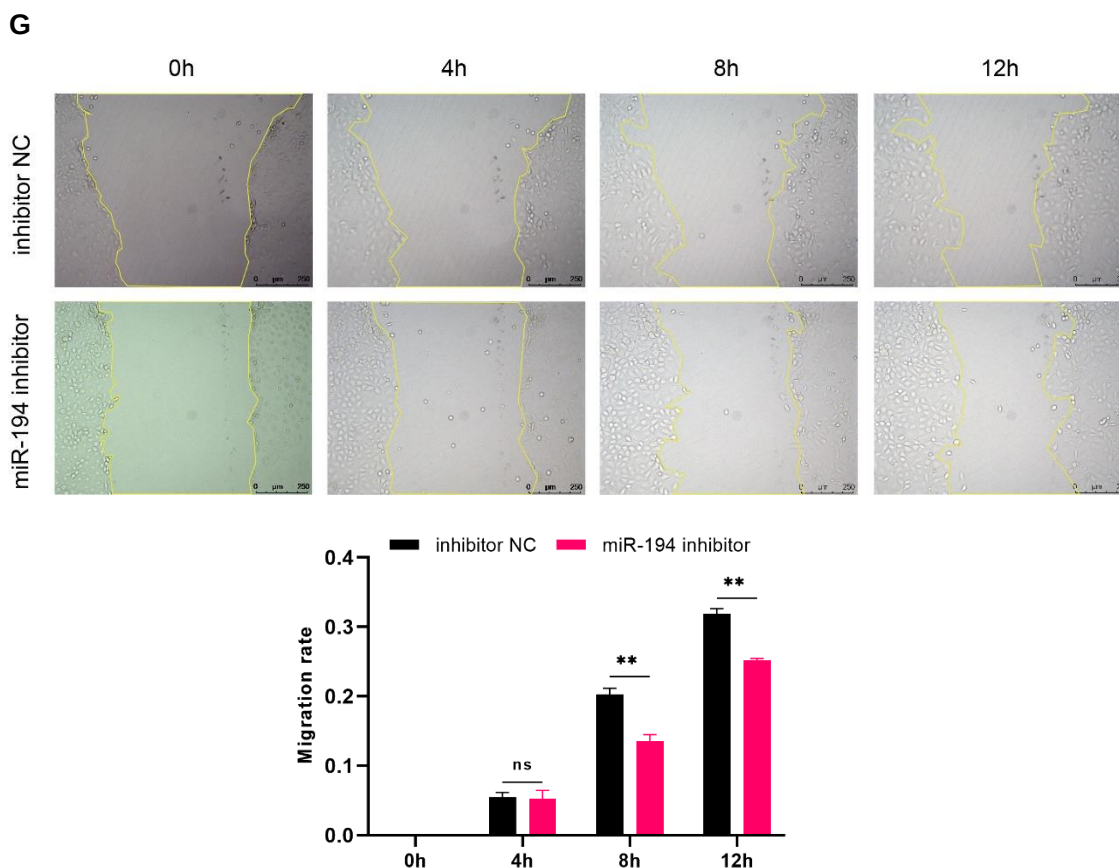


图 2-4 抑制 miR-194-3p 可抑制心外膜细胞的上皮间质转化。(a), qPCR 检测心外膜细胞转染 miR-194 inhibitor 后 miR-194-3p 的含量。(b), miR-194 抑制组和对照组的细胞形态。(c), 抑制 miR-194 后 qPCR 检测 EMT 标志物的改变情况。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; ns, 无显著差异。(d), 抑制 miR-194 后蛋白印记检测 EMT 标志物含量改变。N=3; **** $p<0.0001$ 。抑制 miR-194 后免疫荧光检测 Vimentin (e)和 PDFGR α (f)的荧光强度改变。(g), 细胞划痕实验分别检测划痕 0h, 4, 8h, 12h 后细胞迁移情况。N=3; ** $p<0.01$; ns, 无显著差异。

Figure 2-4 Inhibition of miR-194-3p inhibits epithelial mesenchymal transition in epicardial cells. (a), qPCR assay of miR-194-3p in epicardial cells after transfection with miR-194 inhibitor. (b), Cell morphology of miR-194 inhibitor and control groups. (c), Alteration of EMT markers detected by qPCR after inhibition of miR-194. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$; ns, not significant. (d), Altered EMT marker content detected by protein blotting after miR-194 inhibition. N=3; **** $p<0.0001$. Altered fluorescence intensity of Vimentin (e) and PDFGR α (f) detected by immunofluorescence after miR-194 inhibition. (g), Cell scratch assay to detect cell migration after scratching for 0h, 4h, 8h, and 12h, respectively. N=3; ** $p<0.01$; ns, not significant.

3 讨论

MicroRNA 是 19-25 个核苷酸长度的小的非编码 RNA 的一个子集, 通过碱基互补配对结合到编码 RNA 的 3'非翻译区, 并诱导蛋白质翻译阻断和/或 mRNA 降解, 从而在转录后调节基因表达。这种能力是由种子序列提供的, 即从成熟 microRNA 分子的第 2 位延伸到第 8 位的 6 个核苷酸。MicroRNA 在细胞核中编码, 由 RNA 聚合酶 II 转录, 并以 pre-microRNA 和/或 pri-microRNA 前体分子的形式聚腺苷化, 这取决于它们是来自于单顺反子还是多顺反子的 microRNA 分子^[1]。目前, 人类已经鉴定出超过 1500 个 microRNA。具有相同功能种子序列的 microRNA, 例如 miR-195a 和 miR-195b, 即使它们位于不同的染色体位置, 也具有相似的功能能力。目前至少有五种不同的转录因子在正常和病理条件下指导 EMT; 即 Snail, Slug, Twist, Zeb1 和 Zeb2。我们目前对这些转录因子在胚胎发育和/或组织稳态期间由 microRNA 调控的了解还很少。几组证据表明, 有限数量的 microRNA 可以在发育和/或组织稳态期间调节 Twist^[14]和/或 Zeb1/Zeb2^[15]。在心血管系统中, 我们对 EMT 过程中 microRNA 的调节作用的理解也处于起步阶段。在心内膜垫形成过程中, 有三种 microRNA 参与了 EMT^[16-18], 即 miR-23、miR-126 和 miR-199, 它们都抑制了 EMT 的进展。它们的功能特性在小鼠、鸡和斑马鱼中是保守的, 这也支持了广泛的进化守恒理论。在心外膜向间质转化过程中, 我们对 microRNA 的调控作用也了解得相当匮乏^[5-7]。有研究报道, 加工 microRNA 的 Dicer 酶的缺失可导致心外膜形成受损, 但 EMT 并未受到严重影响^[7]。在这种情况下, 操纵 miR-21 可导致 EMT 进展受损和心外膜来源细胞向纤维细胞分化。另一方面, 在病理条件下, 所有这些转录因子都明显受到 microRNA 的调控。

除了 microRNA 在 EMT 相关信号通路和关键转录因子水平上发挥的调节机制外, 一些研究还指出了 microRNA 直接调节细胞与细胞接触和细胞骨架蛋白的作用。miR-122, miR-24 和 miR-1291 可以直接靶向 RhoA 的表达^[19-21], 而 miR-22 同样可以影响波形蛋白的表达^[22], 因此在从上皮细胞向间质细胞的转变过程中提供信号来修饰细胞骨架组织。据报道, 许多 microRNA 可调控钙粘蛋白和 claudin 的表达。特别是 miR-10b 和 miR-214 已被报道通过靶向 E-cadherin 的 3' UTR 直接调控 E-cadherin^[23,24], 而间接调控 E-cadherin 是由多个 microRNA 介导的, 例如, miR-200 的家族成员^[25-28]。此外, miR-27a 直接调控血管内皮(VE)-cadherin^[29],

而 miR-199a 可调控 N-cadherin 的表达^[30]。Claudin 1 和 Claudin 5 也分别被 miR-155 和 miR-30a 等 microRNA 直接靶向^[31,32]。

目前关于 miR-194-3p 的研究还很少, 在一些癌症疾病中, miR-194-3p 主要抑制了 TGF- β 促进 EMT 的作用^[33]以及抑制了细胞的迁移和侵袭^[34-39]。这与我们研究发现的 miR-194-3p 促进心外膜细胞 EMT 和细胞迁移作用相反, 可能因为他们的研究结果与致癌过程相关而并非胚胎发育过程, 胚胎发育过程中的 EMT 可能激活的是不同信号通路程序, 但目前尚无人报道 miR-194-3p 在胚胎发育过程中的作用。我们课题组前期研究报道了心外膜细胞的发育分化可能与自噬相关^[40], 而有最新研究发现 miR-194-3p 可能通过自噬发挥调控作用^[41], 然而具体的调控作用与机制还需要更进一步的研究。

关于细胞骨架和细胞-细胞接触蛋白的证据仅在致癌过程中报道过, 而目前还没有关于正常胚胎学和/或稳态过程的报道。综上所述, 我们的研究首次报道了在心外膜发育过程中的 microRNA 的表达情况, 且对 microRNA 的预测靶基因进行了 GO 和 KEGG 分析。我们首次报道与 microRNA 相关的细胞连接、细胞骨架、转录因子活性和一系列发育相关的信号通路参与了心外膜的发育, 这为后续研究心脏发育在非编码 RNA 领域提供了新的思路与视野。

小结

我们研究发现过表达 miR-194-3p 可以促进心外膜细胞的 EMT, 而抑制 miR-194-3p 则抑制了心外膜细胞的 EMT, 从而发现 TGF- β 可通过 miR-194-3p 调控心外膜细胞 EMT 的过程, 为后续研究 miR-194-3p 下游分子调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] BÄR C, CHATTERJEE S, THUM T. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy[J]. Circulation, 2016, 134(19): 1484-1499.
- [3] CHEN L L. Linking Long Noncoding RNA Localization and Function[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(9): 761-772.
- [4] KLATTENHOFF C A, SCHEUERMANN J C, SURFACE L E, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment[J]. Cell, 2013, 152(3): 570-583.
- [5] BRØNNUM H, ANDERSEN D C, SCHNEIDER M, et al. miR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1[J]. PloS One, 2013, 8(2): e56280.
- [6] BRØNNUM H, ANDERSEN D C, SCHNEIDER M, et al. Islet-1 is a dual regulator of fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition in epicardial mesothelial cells[J]. Experimental Cell Research, 2013, 319(4): 424-435.
- [7] SINGH M K, LU M M, MASSERA D, et al. MicroRNA-processing enzyme Dicer is required in epicardium for coronary vasculature development[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(47): 41036-41045.
- [8] ANTONELLO Z A, REIFF T, BALLESTA-ILLAN E, et al. Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch[J]. The EMBO journal, 2015, 34(15): 2025-2041.
- [9] KE J, ZHAO Z, HONG S H, et al. Role of microRNA221 in regulating normal mammary epithelial hierarchy and breast cancer stem-like cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(6): 3709-3721.
- [10] SALVIANO-SILVA A, LOBO-ALVES S C, ALMEIDA R C de, et al. Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis[J]. Non-coding

- RNA, 2018, 4(1): 3.
- [11] DENG X G, QIU R L, WU Y H, et al. Overexpression of miR-122 promotes the hepatic differentiation and maturation of mouse ESCs through a miR-122/FoxA1/HNF4a-positive feedback loop[J]. Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 2014, 34(2): 281-295.
- [12] KOLESNIKOFF N, ATTEMA J L, ROSLAN S, et al. Specificity protein 1 (Sp1) maintains basal epithelial expression of the miR-200 family: implications for epithelial-mesenchymal transition[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(16): 11194-11205.
- [13] LIU C Y, ZHANG Y H, LI R B, et al. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardin transcription[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 29.
- [14] KHANBABAEI H, TEIMOORI A, MOHAMMADI M. The interplay between microRNAs and Twist1 transcription factor: a systematic review[J]. Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2016, 37(6): 7007-7019.
- [15] KIM T, VERONESE A, PICHIORRI F, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2011, 208(5): 875-883.
- [16] LAGENDIJK A K, GOUMANS M J, BURKHARD S B, et al. MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production[J]. Circulation Research, 2011, 109(6): 649-657.
- [17] BONET F, DUEÑAS Á, LÓPEZ-SÁNCHEZ C, et al. MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation[J]. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2015, 244(10): 1259-1275.
- [18] STANKUNAS K, MA G K, KUHNERT F J, et al. VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development[J]. Developmental Biology, 2010, 347(2): 325-336.

- [19]PAPADIMITRIOU E, VASILAKI E, VORVIS C, et al. Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Oncogene*, 2012, 31(23): 2862-2875.
- [20]WANG S C, LIN X L, LI J, et al. MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA[J]. *PloS One*, 2014, 9(7): e101330.
- [21]XU Q, DUAN H, GAN L, et al. MicroRNA-1291 promotes endometrial fibrosis by regulating the ArhGAP29-RhoA/ROCK1 signaling pathway in a murine model[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(4): 4501-4510.
- [22]LI W, JIANG G, ZHOU J, et al. Down-regulation of miR-140 induces EMT and promotes invasion by targeting Slug in esophageal cancer[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2014, 34(5): 1466-1476.
- [23]LIU M, LIU L, BAI M, et al. Hypoxia-induced activation of Twist/miR-214/E-cadherin axis promotes renal tubular epithelial cell mesenchymal transition and renal fibrosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(3): 2324-2330.
- [24]ZHANG L, SUN J, WANG B, et al. MicroRNA-10b Triggers the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells by Directly Targeting the E-cadherin[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(1): 33-44.
- [25]KORPAL M, LEE E S, HU G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(22): 14910-14914.
- [26]PARK S M, GAUR A B, LENGYEL E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(7): 894-907.
- [27]CONG N, DU P, ZHANG A, et al. Downregulated microRNA-200a promotes EMT

- and tumor growth through the wnt/ β -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma[J]. *Oncology Reports*, 2013, 29(4): 1579-1587.
- [28] ASAKURA T, YAMAGUCHI N, OHKAWA K, et al. Proteasome inhibitor-resistant cells cause EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1[J]. *International Journal of Oncology*, 2015, 46(5): 2251-2260.
- [29] LIU S, CUI J, LIAO G, et al. MiR-137 regulates epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal stromal tumor[J]. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2014, 35(9): 9131-9138.
- [30] SUZUKI T, MIZUTANI K, MINAMI A, et al. Suppression of the TGF- β 1-induced protein expression of SNAI1 and N-cadherin by miR-199a[J]. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2014, 19(9): 667-675.
- [31] CHUNG Y H, LI S C, KAO Y H, et al. MiR-30a-5p Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulates Expression of Tight Junction Protein Claudin-5 in Human Upper Tract Urothelial Carcinoma Cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(8): 1826.
- [32] ZHANG G J, XIAO H X, TIAN H P, et al. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(6): 1375-1380.
- [33] ZHANG Q, LIU F, QIN L, et al. Characterization of TGF β -associated molecular features and drug responses in gastrointestinal adenocarcinoma[J]. *BMC gastroenterology*, 2021, 21(1): 284.
- [34] ABUDUAINI R, MIAO X, XU J, et al. MicroRNA-194-3p inhibits the metastatic biological behaviors of spinal osteosarcoma cells by the repression of matrix metalloproteinase 9[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2018, 11(11): 5257-5264.
- [35] LIU B, TIAN Y, CHEN M, et al. CircUBAP2 Promotes MMP9-Mediated

- Oncogenic Effect via Sponging miR-194-3p in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 675043.
- [36]LIU T, FANG Y. MiR-194-3p modulates the progression of colorectal cancer by targeting KLK10[J]. *Histology and Histopathology*, 2022, 37(3): 301-309.
- [37]XIA W, MAO Q, CHEN B, et al. The TWIST1-centered competing endogenous RNA network promotes proliferation, invasion, and migration of lung adenocarcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(11): 62.
- [38]YI L, OUYANG L, WANG S, et al. Long noncoding RNA PTPRG-AS1 acts as a microRNA-194-3p sponge to regulate radiosensitivity and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via PRC1[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 19088-19102.
- [39]ZHOU Q, GUO J, HUANG W, et al. Linc-ROR promotes the progression of breast cancer and decreases the sensitivity to rapamycin through miR-194-3p targeting MECP2[J]. *Molecular Oncology*, 2020, 14(9): 2231-2250.
- [40]LIU Y, LIU B, LI Y, et al. Autophagy is involved in the differentiation of epicardial progenitor cells into vascular smooth muscle cells in mice[J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 375(2): 60-71.
- [41]FAN L, LI B, LI Z, et al. Identification of Autophagy Related circRNA-miRNA-mRNA-Subtypes Network With Radiotherapy Responses and Tumor Immune Microenvironment in Non-small Cell Lung Cancer[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 730003.

第三部分：miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调控心外膜细胞 EMT 过程

前言

通过上部分的研究，我们发现过表达 miR-194-3p 可以促进心外膜细胞的 EMT，而抑制 miR-194-3p 则抑制了心外膜细胞的 EMT，从而发现 TGF- β 可通过 miR-194-3p 调控心外膜细胞 EMT 的过程，但 miR-194-3p 是通过影响下游哪个靶基因来调控表型的还尚未可知。MicroRNA 通过碱基互补配对结合到编码 RNA 的 3'非翻译区，并诱导蛋白质翻译阻断和/或 mRNA 降解，从而在转录后调节基因表达。这种能力是由种子序列提供的，即从成熟 microRNA 分子的第 2 位延伸到第 8 位的 6 个核苷酸。因此，在这个部分我们将通过在线网站预测 miR-194-3p 的靶基因并进行生物信息学分析，然后通过 qRT-PCR 验证来确定研究的目标分子。我们也将使用双荧光素酶报告实验和小干扰 RNA 来探究 miR-194-3p 与靶基因和 EMT 表型之间的调控关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料和仪器

加样枪	美国 Eppendorff 公司
200 μ l EP 管	无锡 NEST 公司
1.5ml EP 管	无锡 NEST 公司
八联管	无锡 NEST 公司
低温离心机	美国 Thermo Fisher 公司
纯水仪	美国 Thermo Fisher 公司
倒置细胞显微镜	日本 Nikon 公司
超微量分光光度计	德国 Implen 公司
定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司

半定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
显影仪	美国 Bio-Rad 公司
酶标仪	美国 Thermo Fisher 公司
电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
电转仪	美国 Bio-Rad 公司
电泳槽	美国 Bio-Rad 公司
电子天平	上海天平仪器厂

1.1.2 实验试剂

Trizol	美国 Invitrogen 公司
PBS	武汉博士德公司
三氯甲烷	重庆川东化工公司
异丙醇	重庆川东化工公司
无水乙醇	重庆川东化工公司
DEPC 水	中国碧云天公司
PrimeScrip RT reagent Kit with gDNA Eraser	日本 Takara 公司
TB Green Premix Ex Taq II	日本 Takara 公司
PCR 引物	上海生工公司
兔源多克隆抗 β -Actin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 E-cadherin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 Vimentin 抗体	美国 CST 公司
兔源多克隆抗 PDGFR α 抗体	美国 CST 公司
兔源单克隆抗 delta 1 Catenin 抗体	英国 Abcam 公司
Tris	中国索莱宝公司
SDS	中国索莱宝公司
甘氨酸	中国索莱宝公司
TBS	中国博士德公司
吐温 20	中国索莱宝公司
PVDF 膜	美国 Bio-Rad 公司

ECL 化学发光试剂盒	中国雅酶公司
PAGE 凝胶制备试剂盒	中国雅酶公司
RIPA 裂解液	中国碧云天公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	中国博士德公司
蛋白酶抑制剂 PMSF	中国博士德公司
脱脂奶粉	中国博士德公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	中国碧云天公司
预染蛋白 Marker	美国 Thermo Fisher 公司
RFect ^{PM} 原代细胞小核酸转染试剂	中国百代生物公司
Lipofectamine 3000	美国 Thermo Fisher 公司
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	美国 Promega 公司
Stop & Glo® Reagent	美国 Promega 公司

1.2 方法

1.2.1 细胞蛋白提取和蛋白质印记法

如上部分所述。

1.2.2 细胞 RNA 提取

如上部分所述。

1.2.3 RNA 逆转录为 cDNA

如上部分所述。

1.2.4 qRT-PCR

(1) 引物设计与合成

实验所需引物序列由在线网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 设计。引物序列使用 BLAST 程序核对后, 由上海生工生物有限公司合成。根据使用说明书, 将引物冻干粉振荡, 然后加入无酶灭菌双蒸水, 调节至 100 μ M 浓度, 最终将其储存于-20 $^{\circ}$ C。在配制上机反应体系之前, 应当先将引物储存液稀释至 10 μ M, 以确保反应的有效

性。

引物序列如下：

基因名称		引物序列 (5'-3')
Kras	Forward	CAAGAGCGCCTTGACGATACA
	Reverse	CCAAGAGACAGGTTTCTCCATC
Camk2b	Forward	TGATGTCCTGAGCTTGGTGAG
	Reverse	GGGGGCTAATGGGAAGTGG
Ctnnd1 (p120)	Forward	GTGGAAACCTACACCGAGGAG
	Reverse	CGTCTAGTGGTCCCATCATCTG

(2) 实时荧光定量 PCR 上机反应

按如下成分于冰上配制 10 μ l 反应体系混合液：

试剂	使用量
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$)	5.0 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	2.0 μ l
cDNA	2.0 μ l
Total	10.0 μ l

上机反应程序：

反应温度	时间
Denaturation	
95 $^{\circ}$ C	30sec
qPCR $\times$ 40 Cycles	
95 $^{\circ}$ C	5sec
60 $^{\circ}$ C	30sec
Dissociation Curve	
95 $^{\circ}$ C	10sec
Melt Curve 65 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C, increment 0.5 $^{\circ}$ C	5sec

(3) 每个实验均进行至少三次重复。使用相对 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法，以 GAPDH 作为内

参，对基因表达量进行计算。

1.2.5 载体构建

(1) 本实验采用 psiCHECK-2 载体，T7 启动子后为多克隆位点区，使用 XhoI 和 NotI 两个酶切位点插入目的片段。

(2) 目的基因 DNA 序列信息如下：

Psicheck2-Ctnnd1 WT (野生型) NM_007615.4

cgccactctacgtgctccatatgggcttataatattacttttatttttgggtgggaaatggactgatgattttttcctttcttc
gctggactattgtgccaactgccaggctgactcctaccctttagcccaaattggctgccgtcatccgtgaattacctacatct**tc**
cactgaagtttaattgtcctatcctccagaccctacttccagttttccccaagaacactgactctgtatttgcatacttgagaaa
ctgctgcagattagctcttttgcagccttcctggaactctggccttgcatagagggagggagagtggaaactctctactgga
agcaatgggaagaactgaaaattacacactgtctgttcagcagtcagcattc

Psicheck2-Ctnnd1 MUT (突变型) NM_007615.4

cgccactctacgtgctccatatgggcttataatattacttttatttttgggtgggaaatggactgatgattttttcctttcttc
gctggactattgtgccaactgccaggctgactcctaccctttagcccaaattggctgccgtcatccgtgaattacctacatct**ag**
gtgacaagtttaattgtcctatcctccagaccctacttccagttttccccaagaacactgactctgtatttgcatacttgagaaa
ctgctgcagattagctcttttgcagccttcctggaactctggccttgcatagagggagggagagtggaaactctctactgga
agcaatgggaagaactgaaaattacacactgtctgttcagcagtcagcattc

1.2.6 分子克隆实验

(1) 引物由上海生工生物有限公司合成，分别稀释至 10uM 浓度备用。

(2) psiCHECK-2 用 XhoI, NotI 双酶切，酶切体系如下：

试剂	使用量
psiCHECK-2 载体(1000ng/μl)	2.0μl
XhoI	1.0μl
NotI	1.0μl
10×buffer	2.0μl
H ₂ O	14.0μl
Total	20.0μl

将以上所有组分加入 EP 管中，轻轻混匀，于 37 度水浴锅中孵育 2 小时。

(3) 酶切完成后进行 DNA 凝胶电泳，切胶回收线性化的 psiCHECK-2 载体。

(4) 目的片断 Ctnnd1-3'UTR (WT)/(MUT)的获取。

(5) Ctnnd1-3'UTR (WT)/(MUT)由通用生物合成到 pUC57 载体。

(6) 目的片段 PCR，体系如下：

试剂	使用量
质粒模板	0.5 μ l
Pfu mix	10.0 μ l
Forward (ATTCTAGGCGATCGCTCGAGCGCCACTCTACCTGCTCCAT)	0.5 μ l
Reverse (TTATTGCGGCCAGCGGCCGCGAATGCTGACTGCTGAACAG)	0.5 μ l
H ₂ O	8.5 μ l
Total	20.0 μ l

将以上所有组分加入 EP 管中，轻轻混匀，置于 PCR 仪中进行扩增

上机反应程序：

反应温度	时间
Denaturation	
95°C	3min
qPCR × 29 Cycles	
95°C	30sec
56°C	30sec
72°C	1min
Extension	
72°C	10min

PCR 完成后进行 DNA 凝胶电泳，切胶回收目的片段。

(7) 重组：

试剂	使用量
胶回收所得目的片段	1.0 μ l
酶切好载体	1.0 μ l
2 $\times$ Super Fusion Mix	5.0 μ l
H ₂ O	3.0 μ l
Total	10.0 μ l

以上连接液在 50℃水浴锅反应 1h。

(8) 转化 (感受态细胞: DH5 α):

1) DH5 感受态细胞从-80℃冰箱拿出来之后, 立刻放到冰上融化, 感受态分装过程操作轻柔, 减轻对其机械破坏;

2) 待感受态融化后, 以每管 20 μ L 的体积分装, 分装之后以不超过感受态体积 1/10 的量加入连接产物, 冰上放置 20-30min;

3) 42℃热激 45s, 热激完之后立刻插入冰上冰育 2-3 min;

4) 在超净台中, 加入 500 μ L LB 培养基 (无抗生素), 轻柔上下颠倒 3-5 次;

5) 37℃、230rpm 震荡培养 45-60 min;

6) 将菌液涂到相应抗性的固体平板上, 涂布均匀, 然后将板子倒放 37℃恒温箱培养 12-16h;

7) 第二天挑取单菌落于 1ml 含抗性的 LB 培养基中, 37℃ 250rpm/min 摇菌 16 小时, 酶切验证, 将阳性菌液送公司测序;

8) 比对测序结果。

1.2.7 细胞转染

(1) 根据需要转染的分组和复孔数量, 转染前一天进行 293T 细胞铺板 (96 孔板, 每孔细胞数约为 3×10^4 个), 待细胞密度达到 50%-70%进行细胞转染实验;

(2) 将 10 μ l DMEM 与 0.1 μ g 的 WT/MUT 目的质粒以及 5pmol 的 mmu-miR-194-1-3p/Negative.Control (N.C) 充分混匀后室温放置 (溶液 a), 之后将 10 μ l

DMEM 与 0.2ul 的 lipo3000 转染试剂充分混匀（溶液 b），无需室温放置即可进行下一步；

- （3）将溶液 a 与溶液 b 充分混匀，室温静置 15min；
- （4）将转染混合物加入 96 孔板中，轻轻摇晃混匀，放培养箱中培养；
- （5）转染 6h 后换新鲜培养基；
- （6）转染 48h 后进行荧光素酶检测。

1.2.8 荧光素酶检测

- （1）将 5×PLB (Passive Lysis Buffer)用蒸馏水稀释至 1×PLB，以 96 孔板每孔 100ul 的量加入；
- （2）加样枪吹打打散细胞，置于室温摇床上缓慢摇 15 分钟；
- （3）将细胞裂解液吸至 1.5ml EP 管，4℃ 12000rpm 离心 10 分钟，取上清移入新的 EP 管；
- （4）96 孔板中加入 Luciferase Assay Reagent II (LAR II) (Luciferase Assay Reagent, Progenia)工作液 100ul；
- （5）加入 20ul 细胞裂解液，加样枪吹打混匀 2-3 次，测定记录 Firefly luciferase 值，此值为内参值；
- （6）加入 100ul Stop & Glo[®] Reagent (Luciferase Assay Reagent, Progenia)，加样枪吹打混匀 2-3 次，测定记录 Renilla luciferase 值，此值为报告基因发光值。

1.2.9 心外膜细胞 siRNA 转染

siRNA 由上海生工公司合成。根据合成使用说明书，振荡并离心冻干粉后，加入无酶灭菌双蒸水配成工作液使用。

- （1）siRNA-RFect^{PM} 混合物准备（以十二孔板为例）：
 - 1) 20pmol (1μl) miRNA 用 100μl 无血清培养基稀释；
 - 2) 2μl RFect^{PM}用 100μl 无血清培养基稀释，混匀，室温孵育 5min；
 - 3) 孵育后将 miRNA 稀释液与 RFect^{PM} 稀释液混合（总体积 200μl）。轻轻混

匀，室温孵育 20min；

(3) 将 200 μ l 混合物加入培养孔内，每孔含有 1ml 无血清培养基。轻轻晃动培养板，混匀；

(4) 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时，qPCR 检测基因抑制效果；或培养 72 小时后检测蛋白水平。

1.2.10 蛋白-蛋白交互 (PPI) 网络分析

在网络结构中，蛋白质被视为一个节点，它们之间的相互作用构成了一个复杂的网络。蛋白质是基因表达的产物，它们之间的相互作用可以影响到整个生物体的功能，从而深入了解基因的功能，并发现其中的核心调控机制。PPI 网络由 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 和 Cytoscape 软件(<https://www.cytoscape.org/>)进行分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism v9.0 (La Jolla, CA, USA) 软件进行统计学分析，所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差来表示。两组样本间比较采用独立样本 t 检验，多组样本间比较采用单因素方差分析。P 值 < 0.05 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 miR-194-3p 靶基因预测及其生物信息学分析

为了更准确地预测 miR-194-3p 的下游靶基因，我们结合了三个在线数据库：TargetScan (https://www.targetscan.org/mmu_72/), miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 和 miRDB (<https://mirdb.org/mirdb/index.html>) 进行联合预测并绘制韦恩图取其交集，得到了 91 个三个数据库共同预测的靶基因 (图 3-1a)。利用 Metascope 对预测靶基因进行 GO 分析^[1]。GO 分析显示，预测靶基因在发育生长的调节、蛋白质在膜上定位的调控和分泌等上富集 (图 3-1c)，靶基因生物学过程在发育过程、信号传导、生长和多细胞生物过程上富集 (图 3-1d)。然后，利用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba app 基于 PPI 网络分析在预测靶基因中选择关键基因 (图 3-1b)。

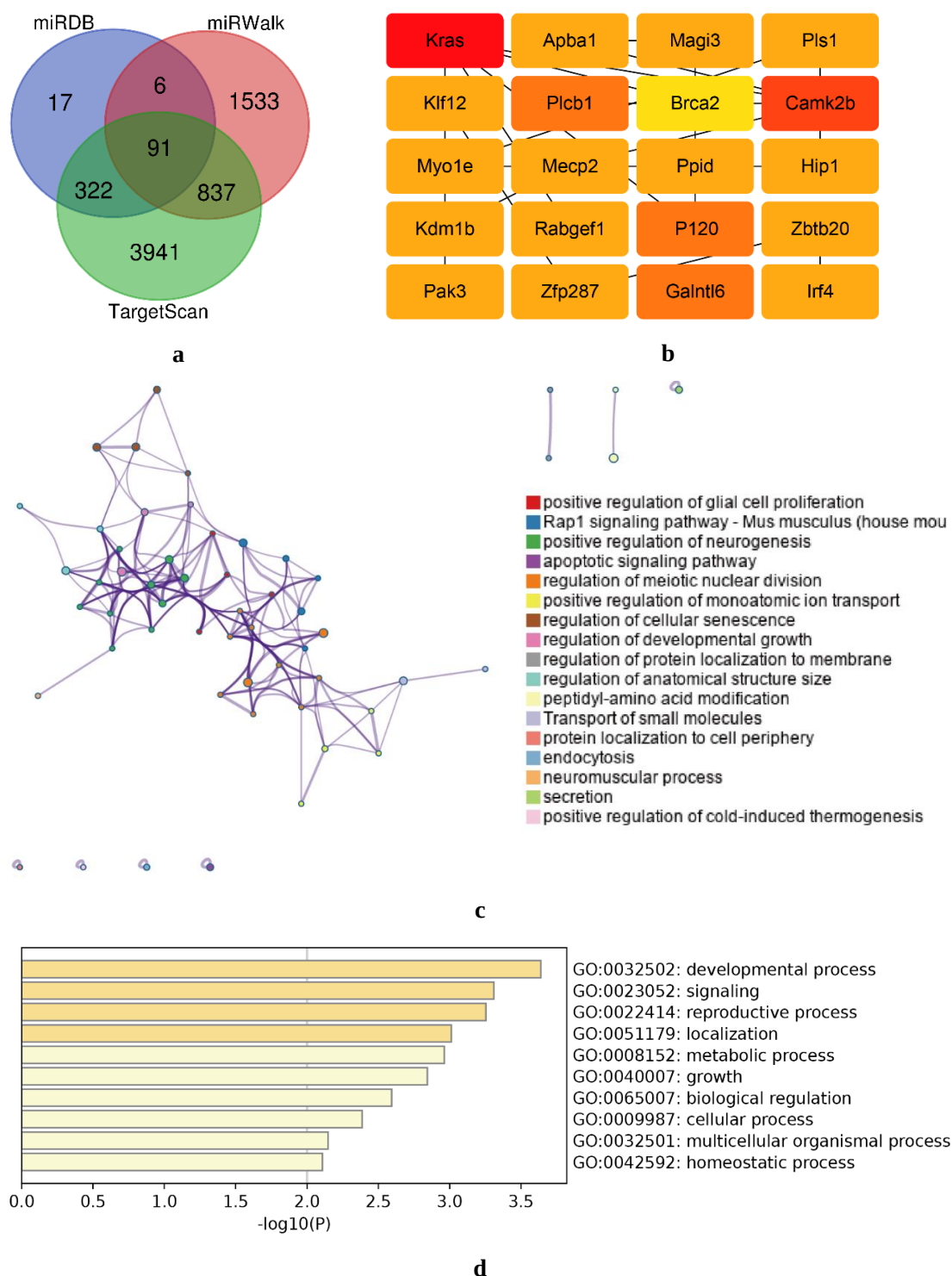


图 3-1 预测 miR-194-3p 下游靶基因及其生物信息学分析。(a)，韦恩图显示三个数据预测靶基因的交集。(b)，预测靶基因的关键基因由 Cytoscape 软件中的 CytoHubba app 选择，节点的颜色根据关键基因的得分由黄到红逐渐变化。(c)，预测靶基因的 GO 富集网络，节点表示在注释的本体术语中富集的功能，节点大小指的是属于该术语的基因数量。(d)，预测靶基因的生物学过程富集。

Figure 3-1 Predicted miR-194-3p downstream target genes and their bioinformatics analysis.

(a), Venn diagram showing the intersection of three data predicted target genes. (b), Hub genes of predicted target genes were selected by CytoHubba app in Cytoscape software, and the color of nodes gradually changed from yellow to red according to the score of hub genes. (c), GO enrichment network for predicted target genes, nodes indicate the function enriched in the annotated ontology term, and node size refers to the number of genes belonging to the term. (d), Predicted biological process enrichment of target genes.

2.2 qRT-PCR 验证 miR-194-3p 靶基因

基于前面的预测靶基因的生物学分析，我们筛选了 3 个关键基因：Kras、Camk2b 和 p120-catenin，使用 miR-194 mimics 过表达 miR-194-3p 后检测关键基因的 mRNA 的表达量（图 3-2）。和对照组相比，miR-194 mimic 组 p120-catenin 表达量显著降低，而 Kras 和 Camk2b 的表达量改变无明显差异，提示 p120-catenin 可能是 miR-194-3p 的下游靶基因。

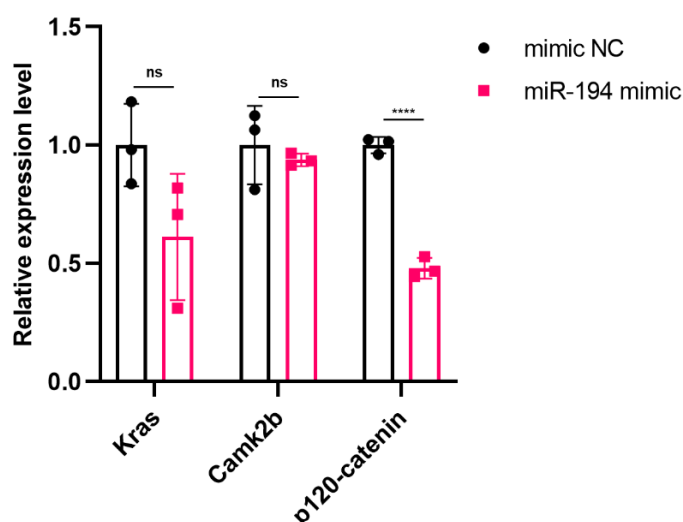


图 3-2 过表达 miR-194-3p 后 qPCR 检测下游预测靶基因的表达量改变。N=3;

**** $p < 0.0001$; ns, 无显著差异。

Figure 3-2 Altered expression of downstream predicted target genes detected by qPCR after overexpression of miR-194-3p. N=3; **** $p < 0.0001$; ns, not significant.

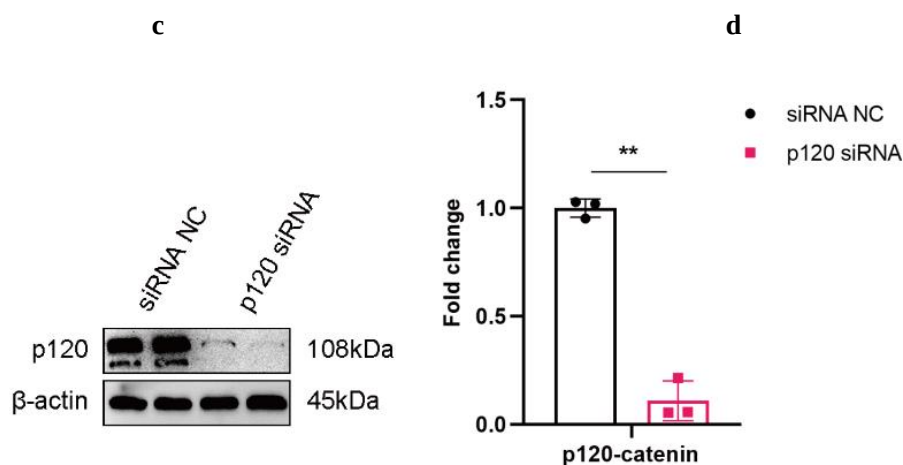
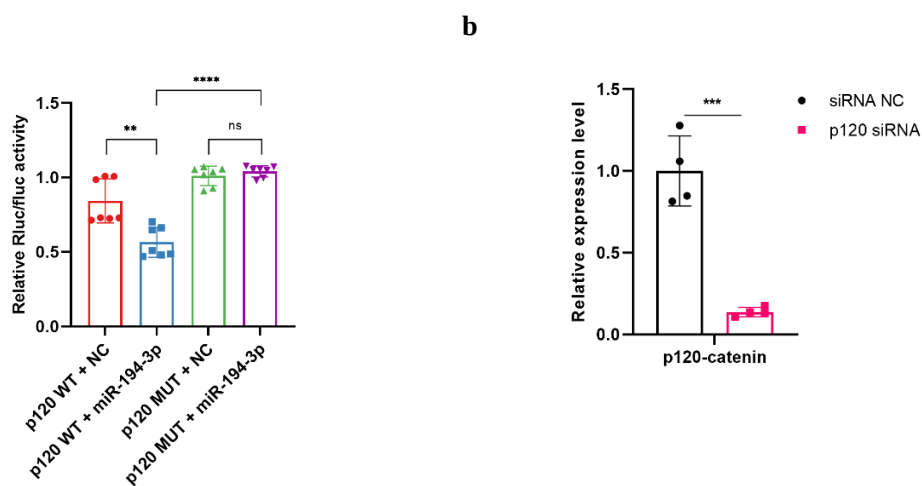
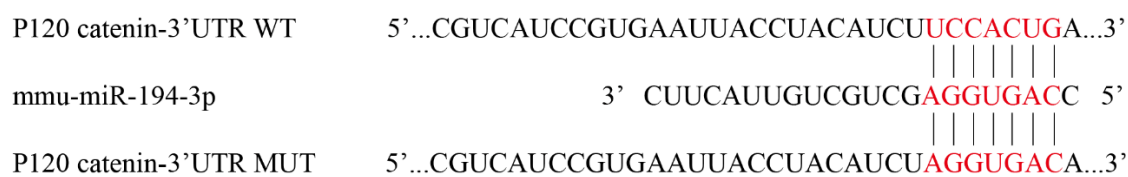
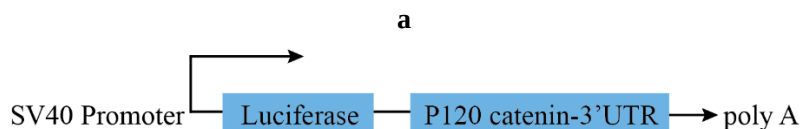
2.3 miR-194-3p 通过靶向 p120-catenin 调控心外膜细胞 EMT

我们首先通过在线网站 TargetScan 预测得到 miR-194-3p 与 p120-catenin 的可

能结合位点（图 3-3a）。随后我们通过构建的野生型（WT）和突变型（MUT）p120-catenin 3'UTR 进行双荧光素酶报告实验，证实了 miR-194-3p 和 p120-catenin 的结合位点（图 3-3b 和 c），提示它们具有直接相互作用。然后向培养 5 天的心外膜细胞转染构建好的 p120-catenin 小干扰 RNA（siRNA），qPCR 和蛋白印记检测 p120-catenin 表达抑制情况。结果显示，p120-catenin 在 mRNA 水平（图 3-3d）和蛋白水平（图 3-3e）均被抑制，说明 siRNA 转染成功。为了研究 miR-194-3p 通过 p120-catenin 来调控心外膜细胞 EMT，我们设计了 rescue 实验。由于 microRNA 调控靶基因为负调控关系，因此我们在转染了 miR-194 inhibitor 抑制心外膜细胞 EMT 的同时，转染 p120-catenin siRNA 抑制靶基因的表达，观察心外膜细胞 EMT 抑制的表型是否恢复。qPCR 结果显示，抑制 miR-194-3p 并转染 siRNA 阴性对照时，心外膜细胞 EMT 被抑制的表型没有明显变化。当抑制 miR-194-3p 的同时使用 siRNA 沉默靶基因 p120-catenin，E-cadherin 表达量显著减少且 N-cadherin、Vimentin 和 PDGFR α 表达量显著增加，提示 p120-catenin 挽救了心外膜细胞被 miR-194-3p inhibitor 抑制的 EMT 过程（图 3-3f）。同样的，在蛋白水平也验证了此现象（图 3-3g）。

以上结果表明，p120-catenin 作为 miR-194-3p 的靶基因，也同样参与了调控心外膜细胞 EMT 的过程。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}
Position 173-180 of CTNND1 3' UTR	5' ... GAUAUACUACAUUU...UCCACUGA... mmu-miR-194-1-3p 3' ... CUUCAUGUGUGUGAGGUGACC	8mer	-0.27	96	-0.26	0	< 0.1
Position 8857-8863 of CTNND1 3' UTR	5' ... GCAGUGUGAGCGGCUCCACUGAG... mmu-miR-194-1-3p 3' ... CUUCAUGUGUGUGAGGUGACC	7mer-A1	-0.03	18	0.00	0	< 0.1
Position 12875-12881 of CTNND1 3' UTR	5' ... AGUCAGGGGUGUUAUCCACUGAG... mmu-miR-194-1-3p 3' ... CUUCAUGUGUGUGAGGUGACC	7mer-A1	-0.03	36	0.00	0	< 0.1



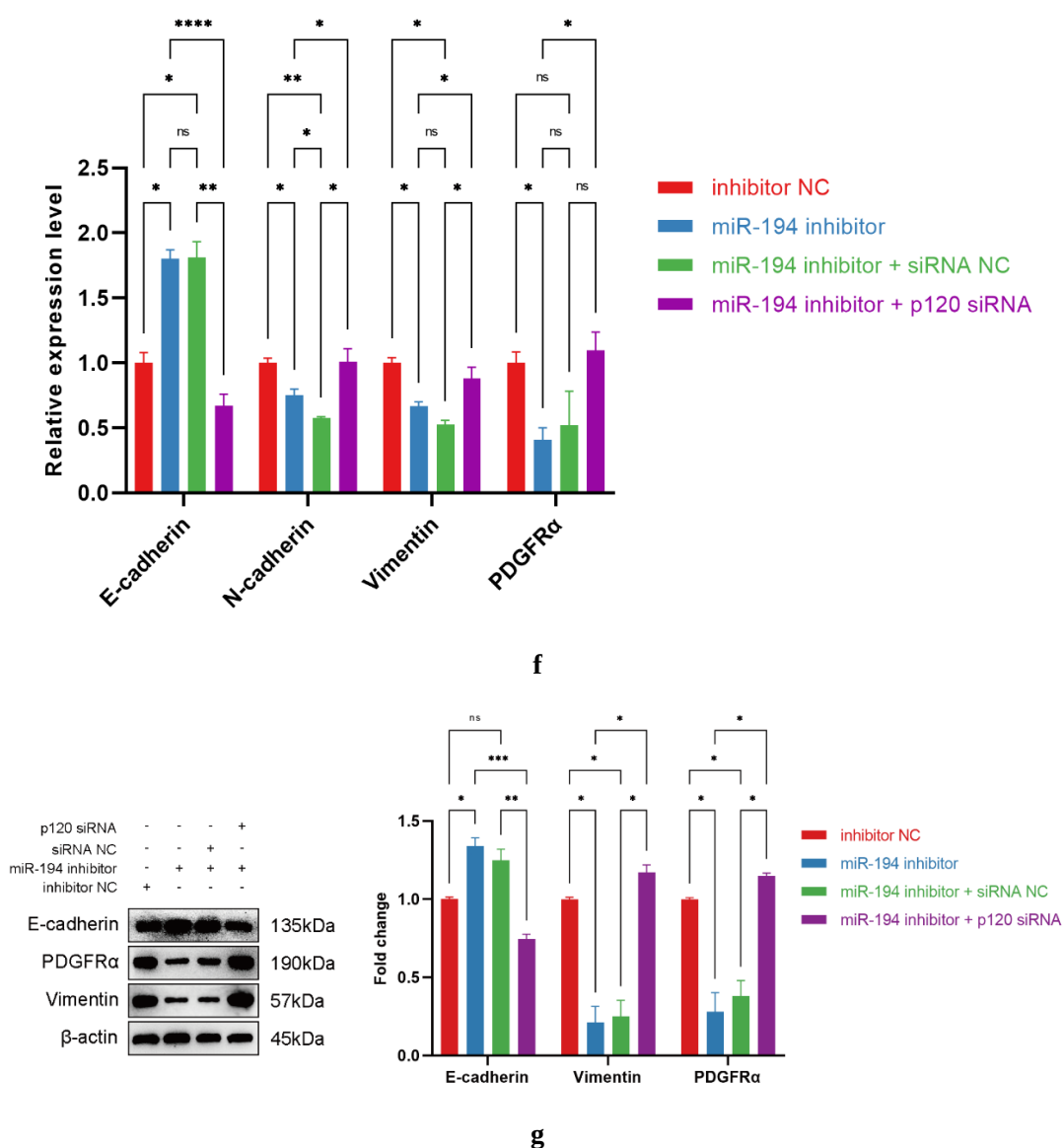


图 3-3 miR-194-3p 通过靶向 p120-catenin 调控心外膜细胞上皮间质转化。(a), TargetScan 网站预测 miR-194-3p 与靶基因 p120-catenin 在 3'UTR 的结合位点, 由上至下预测评分递减。(b), 构建野生型和突变型的 p120-catenin 3'UTR。(c), miR-194-3p mimic 和 p120-catenin 野生型的 3'UTR 共转染后, 荧光素酶活性降低, 提示了它们的直接相互作用。N=7; ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; ns, 无显著差异。(d), qPCR 检测 p120-catenin siRNA 的基因沉默效果。N=4; *** $p < 0.001$ 。(e), 蛋白印迹检测 p120-catenin siRNA 的蛋白抑制效果。N=3; ** $p < 0.01$ 。(f), qPCR 检测抑制 miR-194-3p 后和抑制 miR-194-3p 的同时沉默 p120-catenin 后 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 PDGFRα 的表达含量。N=3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; ns, 无显著差异。(g), 蛋白检测抑制 miR-194-3p 后和抑制 miR-194-3p 的同时沉默 p120-catenin 后 E-cadherin、Vimentin 和 PDGFRα 的表达含量。N=3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ns, 无显著差异。

Figure 3-3 miR-194-3p regulates epithelial mesenchymal transition in epicardial cells by targeting p120-catenin. (A), TargetScan website predicts the binding site of miR-194-3p to the target gene p120-catenin at 3'UTR with decreasing prediction score from top to bottom. (b), Construction of wild-type and mutated 3'UTR variants of p120-catenin. (c), Decreased luciferase activity after co-transfection with miR-194-3p mimic and the wild-type 3'UTR of p120-catenin, highlighting a direct interaction. N=7; **p<0.01, ****p<0.0001; ns, not significant. (d), qPCR assays for gene silencing effect of p120-catenin siRNA. N=4; ***p<0.001. (e), Protein blotting assays for protein inhibition effect of p120-catenin siRNA. N=3; **p<0.01. (f), qPCR assays for inhibition of miR-194-3p after and inhibition of miR-194-3p after simultaneous silencing of p120-catenin. expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and PDGFR α . N=3; * p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001; ns, not significant. (g), Western blot for expression levels of E-cadherin, Vimentin and PDGFR α after inhibition of miR-194-3p and after inhibition of miR-194-3p with concomitant silencing of p120-catenin. N=3; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; ns, not significant.

2.4 p120-catenin 激活细胞粘附信号通路调控心外膜细胞 EMT

由于 p120-catenin 被认为是细胞粘附信号通路的一部分，它可以与 E-cadherin 相互结合，参与下游的调节，但目前尚不清楚它是否能够通过激活这种信号通路，从而参与胚胎心脏的发育。因此，我们在这部分探究 p120-catenin 与细胞粘附信号通路的分子 β -catenin 的调控关系。结合之前的研究，在培养 5 天的心外膜细胞中分别转染 miR-194 mimics 和 miR-194 inhibitor 使其过表达或抑制，检测 p120-catenin 和 β -catenin 的表达量改变情况。结果显示过表达 miR-194-3p 后 p120-catenin 表达量减少，与之前研究结果相同，而 β -catenin 的表达量显著增加；抑制 miR-194-3p 后 p120-catenin 表达量增加，而 β -catenin 的表达量减少，提示 p120-catenin 和 β -catenin 可能为负调控关系（图 3-4a）。为了确定它们的上下游关系，我们使用 miR-194 inhibitor 干预心外膜细胞使 p120-catenin 表达增加的同时使用 p120-catenin siRNA 将其沉默，观察到 β -catenin 的表达减少的表型被 p120-catenin siRNA 所挽救（图 3-4b），证明 p120-catenin 可作为 β -catenin 的上游，参与调控下游表型。

综上所述，miR-194-3p 可通过抑制 p120-catenin 从而激活细胞粘附信号通路， β -catenin 的表达量增加，促进心外膜细胞的 EMT 过程。

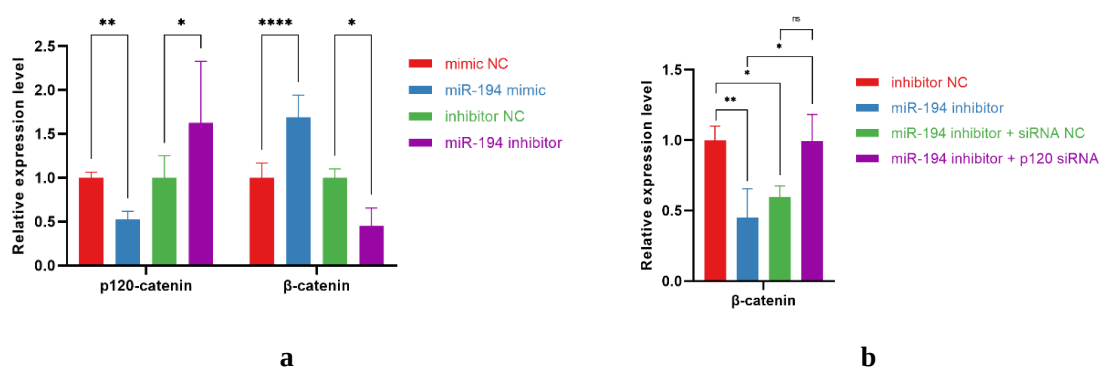


图 3-4 p120-catenin 与 β -catenin 的调控关系。(a), 分别在过表达和抑制 miR-194-3p 的心外膜细胞中使用 qPCR 检测 p120catenin 与 β -catenin 的表达量。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ 。(b), qPCR 检测抑制 miR-194-3p 后和抑制 miR-194-3p 的同时沉默 p120-catenin 后 β -catenin 的表达量。N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$; ns, 无显著差异。

Figure 3-4 Regulatory relationship between p120-catenin and β -catenin. (a), Expression of p120catenin versus β -catenin was detected using qPCR in epicardial cells overexpressing and repressing miR-194-3p, respectively. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$. (B), qPCR assay of β -catenin expression after inhibition of miR-194-3p and after inhibition of miR-194-3p with concomitant silencing of p120-catenin. N=3; * $p<0.05$, ** $p<0.01$; ns, not significant.

3 讨论

上皮细胞的粘附连接是其生长发育过程中不可或缺的重要环节，它不仅是细胞增殖、迁移、细胞极化和存活的关键调节因素，也是细胞-细胞间的桥梁^[2,3]。它们是由钙粘蛋白超家族中的同型蛋白相互作用形成的，其中 E-钙粘蛋白（E-cadherin）是在所有上皮细胞中表达的典型成员。E-cadherin 在细胞内与 catenin 家族成员相互作用，其中 p120-catenin(简称 p120)对钙粘蛋白的稳定性至关重要。与其在正常发育和稳态中的重要作用相一致，细胞培养和动物模型研究表明 E-cadherin 是一种侵袭和肿瘤抑制因子，人体内 E-cadherin 的缺失与头颈部鳞状细胞癌^[4]、膀胱癌^[5]和卵巢癌^[6]等多种癌症的不良预后相关。类似地，p120 在许多类型的癌症中被下调。这些对癌症的影响可能是由上皮粘附性和极性丧失、细胞生存和增殖失调、获得侵袭性特征和单个细胞扩散引起的。尽管有许多报道表明 E-cadherin 在许多癌症中保留^[7]，甚至在转移中增加^[8-10]，但是，实际上，癌症的局部扩散更多地发生在含 E-cadherin 的连接完整的情况下^[11]。类似地，也报道了 p120 的促肿瘤作用^[12]。然而，p120 在胚胎发育中的作用还尚无报道。本部分研

究中我们发现了 p120 的缺失可促进心外膜细胞的 EMT, 也与细胞失去粘附性相关。

E-cadherin 是一种跨膜蛋白, 其胞外区域包含五个细胞外钙粘蛋白(EC) 重复结构域, 其中 EC-1 通过与相邻细胞的 E-cadherin EC-1 反式同源二聚体结构域介导细胞-细胞粘附。此外, 同一细胞上的 E-cadherin 分子顺式横向结合形成簇, 有助于粘附强度^[13]。细胞内, E-cadherin 通过近膜结构域(JMD)与 p120 结合, 并通过连环蛋白结合结构域(CBD)^[14]与 β -catenin 结合。 β -catenin 通过与 α -catenin 相互作用将 E-cadherin 连接到肌动蛋白骨架上。JMD 包含内吞机制和泛素连接酶 Hakai 的对接位点, 它们以 E-cadherin 分子为目标进行内吞和蛋白酶体降解^[3]。通过掩盖这些位点, p120 充当 E-cadherin 稳定性的主要调节因子^[15-17]。P120 通过其位于蛋白质中心部分的 ARM 结构域与 E-cadherin 结合。由于存在四个不同的替代翻译起始位点, 其调节 n 端区域(NTR)可以具有不同的长度, 从而形成不同的 n 端异构体^[18,19], 在使用各自的转录起始位点后, 我们将其称为 p120-1、p120-2、p120-3 和 p120-4。最长的 p120 异构体, p120-1, 含有 n 端线圈结构, 这是其他 p120 异构体所缺乏的。额外的异构体变异是由于四个替代外显子的存在, 其中两个发现在 c 端结构域(CTR)。我们研究同样发现在心外膜细胞 EMT 过程中 p120 与 E-cadherin 的表达具有协同作用, 然而具体的相互调控机制还需更进一步的研究。

P120 最初被鉴定为癌基因 vSrc 的底物, 其磷酸化与细胞转化^[20]相关。其主要作用是通过抑制 E-cadherin 的内吞作用及随后的蛋白体破坏, 稳定质膜上的 E-cadherin^[15,16,21]。因此, p120 损耗会下调大多数经典钙粘蛋白^[15-17]。在上皮细胞极化过程中, p120 依赖的 E-cadherin 在基底膜上的稳定性通过招募 Scribble 而得到加强, Scribble 稳定了 p120 与 E-cadherin 的相互作用^[22]。由于其 E-cadherin 的稳定功能, p120 可以通过抑制肿瘤生长和侵袭发挥抑癌作用^[23]。除了这种抑制作用, p120 还可以通过依赖 E-cadherin 和不依赖 E-cadherin 的机制促进侵袭。P120 促进或抑制肿瘤的功能包括调节 RhoGTPases 和参与细胞侵袭和迁移的下游细胞骨架动力学。P120 可以通过直接与 Rho 结合并作为 RhoGDI 发挥作用^[24], 或通过 E-cadherin 依赖性招募 Rho 抑制剂 p190RhoGAP 来抑制 Rho^[25]。通过这种方式, p120 调节 Rho 沿外侧膜的活性^[26], 抑制外膜收缩性, 促进上皮结构稳定^[27]。相

反, p120 通过激活 Rac 和 cdc42 的活性, 通过与 Rac GEFs (如 Vav2) 相互作用^[28,29], 或通过抑制 Rho 间接地促进细胞侵袭和迁移。然而, p120 对 GTPase 功能的调节非常复杂, 依赖于 p120 异构体和钙粘蛋白家族成员的表达, 以及细胞环境等^[30,31]。P120 可进一步转位到细胞核, 与 Kaiso^[32]、MUC1^[33]、Glis2^[34]、REST/CoREST^[35]相互作用, 发挥转录调节作用, 参与 Wnt 信号通路^[19]的转录调控。最后, 条件性 p120 敲除研究已经证明了 p120 可能作为 Rho 的下游分子^[36], 通过抑制核因子 kappaB(NF-kB)的激活发挥抗炎作用^[37]。

与 E-cadherin 一样, p120 在癌症中也经常失调, 这是其下调或转位到细胞质的结果^[38]。下调发生在转录水平, 例如通过 FOXC2^[39]和 miRNAs^[40,41]或转录后, 例如通过 Calpain^[42]或 β -catenin 破坏复合物^[43]。转位到细胞质与粘附连接分离和 E-cadherin 的内吞有关, 并受磷酸化的调控^[44]。取决于所涉及的激酶和残基, p120 的磷酸化可能对粘附、RhoA 结合和核信号传导等下游过程产生相反的影响。p120 调控的另一个重要层面是由于使用不同的翻译起始位点和替代剪接而产生不同的异构体, 这可能导致 p120 异构体在 n 端起始位点不同, 并包含替代的外显子^[18,19]。n 端变异体 p120-1 和 p120-3 最常在间充质细胞、内皮细胞和上皮细胞中差异表达。大多数细胞表达多种 p120 亚型, p120-3 通常在上皮细胞中高表达^[18,45-47]。p120 的选择性剪接模式与乳腺癌亚型相关^[48,49], 在人类癌症中观察到差异异构体表达并与预后相关^[50]。选择性剪接由上皮剪接因子 ESRP1 和 ESRP2 调控, 诱导向 p120-3 的转换^[51], 而 EMT 转录因子可诱导向 p120-1 的转换^[52,53]。由于 p120 亚型通过其共享的保守 ARM 结构域稳定 E-cadherin^[54], 其亚型特异性功能可能依赖于与其他下游效应子差异的相互作用, 这些效应子可能包括 Rac 和 Rho 调控子、Kaiso 和 MUC1^[44]。此外, p120 n 端包含许多磷酸化位点, 因此亚型特异性磷酸化是 p120 的额外调控作用, 例如 p120-1 特异性磷酸化调控 Wnt 信号^[43,55]。P120 亚型的表达也能在 EMT 过程中被调节。例如, 已有研究报道在人类上皮癌细胞的 EMT 诱导反应中, p120-1 上调和 p120-3 变异体下调^[52,53]。相反, p120(或异构体)可能通过稳定 E-cadherin 来调节 EMT。这些结果表明 p120-3 抑制 EMT, 而 p120-1 促进 EMT, 这将对 p120 亚型的预后作用产生影响。另一方面, 在含有膜性 E-cadherin 的肺癌细胞系中, 过表达 p120-1 和 p120-3 均可抑制 EMT, 而在含有胞质性 E-cadherin 的细胞中, p120-1 促进 EMT, 而 p120-3 抑制 EMT^[56]。本

研究的局限性在于我们并没有研究 p120 的亚型对心外膜 EMT 的作用影响，但我们也首次报道了 p120 可作为 miR-194-3p 的靶基因参与心脏发育过程中的 EMT，并激活细胞粘附信号通路发挥作用，这对今后研究心脏发育过程中心外膜细胞的 EMT 提供了新的思路。

小结

本研究发现 miR-194-3p 可直接与 p120-catenin 结合从而降低 p120 的表达，且 p120 可调控细胞粘附信号通路的 β -catenin 分子的表达，进而调控心外膜细胞的 EMT 过程。

参考文献

- [1] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1523.
- [2] NELSON W J, DICKINSON D J, WEIS W I. Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2013, 116: 3-23.
- [3] HARRIS T J C, TEPASS U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis[J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2010, 11(7): 502-514.
- [4] YAZDANI J, GHAVIMI M A, JABBARI HAGH E, et al. The Role of E-Cadherin as a Prognostic Biomarker in Head and Neck Squamous Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2018, 22(5): 523-535.
- [5] XIE Y, LI P, GAO Y, et al. Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(37): 62489-62499.
- [6] DAI C, CAO J, ZENG Y, et al. E-cadherin expression as a prognostic factor in patients with ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 81052-81061.
- [7] GLOUSHANKOVA N A, RUBTSOVA S N, ZHITNYAK I Y. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells[J]. Tissue Barriers, 2017, 5(3): e1356900.
- [8] KOWALSKI P J, RUBIN M A, KLEER C G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases[J]. Breast cancer research: BCR, 2003, 5(6): R217-222.
- [9] JESCHKE U, MYLONAS I, KUHN C, et al. Expression of E-cadherin in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive carcinomas, their lymph node metastases, their distant metastases, carcinomas with recurrence and in

- p>recurrence[J].
- Anticancer Research*
- , 2007, 27(4A): 1969-1974.
- [10] CHAO Y L, SHEPARD C R, WELLS A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition[J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9: 179.
- [11] BRONSERT P, ENDERLE-AMMOUR K, BADER M, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface[J]. *The Journal of Pathology*, 2014, 234(3): 410-422.
- [12] TENHAGEN M, KLARENBECK S, BRAUMULLER T M, et al. p120-Catenin Is Critical for the Development of Invasive Lobular Carcinoma in Mice[J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2016, 21(3-4): 81-88.
- [13] YAP A S, GOMEZ G A, PARTON R G. Adherens Junctions Revisualized: Organizing Cadherins as Nanoassemblies[J]. *Developmental Cell*, 2015, 35(1): 12-20.
- [14] SHAPIRO L, WEIS W I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009, 1(3): a003053.
- [15] IRETTON R C, DAVIS M A, VAN HENGEL J, et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 159(3): 465-476.
- [16] DAVIS M A, IRETTON R C, REYNOLDS A B. A core function for p120-catenin in cadherin turnover[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 163(3): 525-534.
- [17] NANES B A, CHIASSEON-MACKENZIE C, LOWERY A M, et al. p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 199(2): 365-380.
- [18] KEIRSEBILCK A, BONNÉ S, STAES K, et al. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms[J]. *Genomics*, 1998, 50(2): 129-146.
- [19] PIETERS T, VAN ROY F, VAN HENGEL J. Functions of p120ctn isoforms in cell-cell adhesion and intracellular signaling[J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2012, 17(5): 1669-1694.
- [20] REYNOLDS A B, ROESEL D J, KANNER S B, et al. Transformation-specific

- tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1989, 9(2): 629-638.
- [21]MIYASHITA Y, OZAWA M. Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(15): 11540-11548.
- [22]LOHIA M, QIN Y, MACARA I G. The Scribble polarity protein stabilizes E-cadherin/p120-catenin binding and blocks retrieval of E-cadherin to the Golgi[J]. *PloS One*, 2012, 7(11): e51130.
- [23]STAIRS D B, BAYNE L J, RHOADES B, et al. Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 470-483.
- [24]ANASTASIADIS P Z, MOON S Y, THORESON M A, et al. Inhibition of RhoA by p120 catenin[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(9): 637-644.
- [25]WILDENBERG G A, DOHN M R, CARNAHAN R H, et al. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho[J]. *Cell*, 2006, 127(5): 1027-1039.
- [26]PRIYA R, GOMEZ G A, BUDNAR S, et al. Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(10): 1282-1293.
- [27]YU H H, DOHN M R, MARKHAM N O, et al. p120-catenin controls contractility along the vertical axis of epithelial lateral membranes[J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(1): 80-94.
- [28]NOREN N K, LIU B P, BURRIDGE K, et al. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 150(3): 567-580.
- [29]JOHNSON E, SEACHRIST D D, DELEON-RODRIGUEZ C M, et al. HER2/ErbB2-induced breast cancer cell migration and invasion require p120

- catenin activation of Rac1 and Cdc42[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(38): 29491-29501.
- [30]MENKE A, GIEHL K. Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012, 524(1): 48-55.
- [31]SCHACKMANN R C J, TENHAGEN M, VAN DE VEN R A H, et al. p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention[J]. Journal of Cell Science, 2013, 126(Pt 16): 3515-3525.
- [32]DANIEL J M, REYNOLDS A B. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor[J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(5): 3614-3623.
- [33]LIU X, YI C, WEN Y, et al. Interactions between MUC1 and p120 catenin regulate dynamic features of cell adhesion, motility, and metastasis[J]. Cancer Research, 2014, 74(5): 1609-1620.
- [34]HOSKING C R, ULLOA F, HOGAN C, et al. The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin[J]. Molecular Biology of the Cell, 2007, 18(5): 1918-1927.
- [35]LEE M, JI H, FURUTA Y, et al. p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation[J]. Journal of Cell Science, 2014, 127(Pt 18): 4037-4051.
- [36]QIN S, QIN L, ZHANG C, et al. p120-Catenin modulating nuclear factor- κ B activation is partially RhoA/ROCKdependent in scratch injury[J]. Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 2015, 23(2): 231-240.
- [37]PEREZ-MORENO M, DAVIS M A, WONG E, et al. p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin[J]. Cell, 2006, 124(3): 631-644.
- [38]THORESON M A, REYNOLDS A B. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression[J]. Differentiation; Research in Biological Diversity, 2002, 70(9-10): 583-589.
- [39]MORTAZAVI F, AN J, DUBINETT S, et al. p120-catenin is transcriptionally

- downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells[J]. Molecular cancer research: MCR, 2010, 8(5): 762-774.
- [40]HAMADA S, SATOH K, MIURA S, et al. miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin[J]. Journal of Cellular Physiology, 2013, 228(6): 1255-1263.
- [41]LIU L, ZHANG C, LI X, et al. miR-223 promotes colon cancer by directly targeting p120 catenin[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 63764-63779.
- [42]WANG Y, MINSHALL R D, SCHWARTZ D E, et al. Cyclic stretch induces alveolar epithelial barrier dysfunction via calpain-mediated degradation of p120-catenin[J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2011, 301(2): L197-206.
- [43]HONG J Y, PARK J I, CHO K, et al. Shared molecular mechanisms regulate multiple catenin proteins: canonical Wnt signals and components modulate p120-catenin isoform-1 and additional p120 subfamily members[J]. Journal of Cell Science, 2010, 123(Pt 24): 4351-4365.
- [44]HONG J Y, OH I H, MCCREA P D. Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1863(1): 102-114.
- [45]MONTONEN O, AHO M, UITTO J, et al. Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms[J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society, 2001, 49(12): 1487-1496.
- [46]MO Y Y, REYNOLDS A B. Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines[J]. Cancer Research, 1996, 56(11): 2633-2640.
- [47]VENHUIZEN J H, SOMMER S, SPAN P N, et al. Differential expression of p120-catenin 1 and 3 isoforms in epithelial tissues[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 90.
- [48]SEBESTYÉN E, ZAWISZA M, EYRAS E. Detection of recurrent alternative splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer[J]. Nucleic

- Acids Research, 2015, 43(3): 1345-1356.
- [49]ZHAO W, HOADLEY K A, PARKER J S, et al. Identification of mRNA isoform switching in breast cancer[J]. BMC genomics, 2016, 17: 181.
- [50]TALVINEN K, TUIKKALA J, NYKÄNEN M, et al. Altered expression of p120catenin predicts poor outcome in invasive breast cancer[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2010, 136(9): 1377-1387.
- [51]WARZECHA C C, SATO T K, NABET B, et al. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing[J]. Molecular Cell, 2009, 33(5): 591-601.
- [52]SARRIÓ D, PÉREZ-MIES B, HARDISSON D, et al. Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions[J]. Oncogene, 2004, 23(19): 3272-3283.
- [53]OHKUBO T, OZAWA M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation[J]. Journal of Cell Science, 2004, 117(Pt 9): 1675-1685.
- [54]ISHIYAMA N, LEE S H, LIU S, et al. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion[J]. Cell, 2010, 141(1): 117-128.
- [55]HONG J Y, PARK J I, LEE M, et al. Down's-syndrome-related kinase Dyrk1A modulates the p120-catenin-Kaiso trajectory of the Wnt signaling pathway[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125(Pt 3): 561-569.
- [56]ZHANG Y, ZHAO Y, JIANG G, et al. Impact of p120-catenin isoforms 1A and 3A on epithelial mesenchymal transition of lung cancer cells expressing E-cadherin in different subcellular locations[J]. PloS One, 2014, 9(2): e88064.

全文总结

目前, 心血管疾病已经成为全球最为普遍的致命疾病, 对人类的健康构成了极大的威胁。心外膜是心脏的基本结构, 它不仅能够促进心脏的正常发育, 还能够促进心肌的内源性再生。胚胎发育过程中一部分心外膜细胞分化时先分层, 经历上皮间质转化(EMT)成为心外膜源性细胞, 并侵入心肌分化为心脏的支持细胞。非编码 RNA 参与多种生物学过程, 但 miRNA 在胚胎心外膜细胞发育中的作用还不清楚。因此, 本研究探讨了 miRNA 调控心外膜 EMT 过程的可能机制。进一步研究后总结如下:

1. 我们成功分离并体外培养胚胎心外膜细胞, 并鉴定其为 Tbx18⁺的胚胎心外膜细胞。TGF- β 1 重组蛋白可诱导心外膜细胞的 EMT 过程。

2. 我们对 TGF- β 诱导的心外膜细胞做了 miRNA 转录组测序, 对差异表达的 miRNA 做了功能富集分析, 并实验验证了差异表达的 miRNA, 选取诱导后表达量显著增加的 miR-194-3p 作为目标分子。转染 miR-194-3p mimic 使其过表达, 可促进心外膜细胞的 EMT; 而转染 miR-194-3p inhibitor 抑制 miR-194-3p 则可能抑制心外膜细胞的 EMT。提示 TGF- β 可能通过调控 miR-194-3p 来促进心外膜细胞 EMT。

3. 我们通过在线网站预测 miR-194-3p 的靶基因并进行生物信息学分析, 然后使用双荧光素酶报告实验验证了 p120-catenin 是 miR-194-3p 直接结合的下游靶基因。我们使用小干扰 RNA (siRNA)来沉默 p120-catenin, 发现当使用 miR-194-3p inhibitor 抑制心外膜 EMT 时, p120 siRNA 可挽救表型, 提示 miR-194-3p 是通过 p120-catenin 来调控心外膜 EMT。过表达 miR-194-3p 后 p120-catenin 表达量减少, 而 β -catenin 的表达量显著增加; 抑制 miR-194-3p 后 p120-catenin 表达量增加, 而 β -catenin 的表达量减少, 提示 p120-catenin 和 β -catenin 可能为负调控关系。我们使用 miR-194 inhibitor 干预心外膜细胞使 p120-catenin 表达增加的同时使用 p120-catenin siRNA 将其沉默, 观察到 β -catenin 的表达减少的表型被 p120-catenin siRNA 所挽救, 证明 p120-catenin 可作为 β -catenin 的上游, 参与调控下游表型。

综上所述，本研究分别通过体外培养心外膜细胞以及转录组测序在一定程度上揭示了 miR-194-3p 通过 p120/ β -catenin 调控胚胎心外膜细胞 EMT 的机制（图 4）。

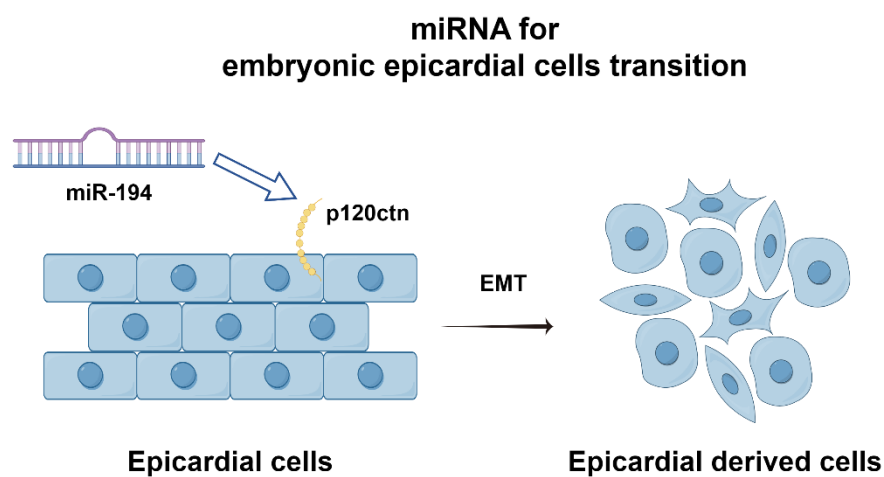


图 4 miR-194-3p 调控胚胎心外膜细胞转化。

Figure 4 miR-194-3p for embryonic epicardial cells transition.

文献综述

心外膜在心脏发育中的研究现状

摘要

心脏由一层称为心外膜的间质细胞组成，它为胚胎心脏的形成提供了重要的细胞贡献。心外膜中有一群祖细胞，它们经历了上皮到间质的转化，在分化为非心肌细胞心脏谱系(如血管平滑肌细胞、周细胞和成纤维细胞)之前，表现出平面上皮细胞向多极和侵袭性间质细胞的特征性转变。心外膜也是旁分泌信号的来源，对胎儿心脏生长、冠状血管的形成和心脏的再生修复至关重要。虽然心外膜在出生后处于休眠状态，但心脏损伤会重新激活发育基因程序，刺激上皮细胞向间质细胞转变；然而，目前尚不清楚心外膜在成人中如何促进疾病进展或修复。在这篇综述中，我们将总结控制心外膜来源的祖细胞迁移的分子机制，以及心外膜对心脏形成的贡献。

关键词：心外膜，心脏发育，上皮间质转化

前言

由于缺血性损伤，心血管疾病依旧是世界上最严重的疾病之一^[1]。其中，心肌梗塞(MI)会造成数以百万计的心肌细胞损伤，这会加剧先天性的免疫反应，从而消灭那些已经衰老的细胞，并且刺激肌成纤维细胞分泌胶原蛋白，从而改变细胞的内部结构^[2]。由于心肌细胞无法完全适应缺血的环境，所以它们的损伤是无法挽回的，尤其是对于成年哺乳动物^[3]。在过去的十年中，有多种策略被用来促进心脏修复，包括刺激心肌细胞重新进入细胞周期、输送干细胞或干细胞衍生的心肌细胞、使用无细胞疗法调节组织修复，以及应用病毒载体和生物工程贴片来输送再生因子^[3-5]。然而，越来越明显的是，心脏修复需要众多不同类型的心脏细胞的积极贡献。心外膜是一个进化上保守的间皮层，是覆盖在脊椎动物心脏最外层的单层细胞。在胎儿发育过程中，心外膜作为一个祖细胞池，提供了多能细

胞,产生了心脏间质。然而,心外膜的作用并不限于非心肌细胞系的重新形成。这个心外膜层也促进了对心肌生长和冠状血管形成至关重要的旁分泌环境。随着心脏的成熟,心外膜经历了一个休眠期,作为心肌和心包腔之间的一个简单屏障发挥作用。然而,最近对斑马鱼和小鼠的研究表明,心脏损伤可以使心外膜及其衍生物恢复活力,从而调节组织修复^[6]。这篇综述将总结心外膜谱系在心脏发育过程中的不同作用,重点是可能用于促进心脏修复的发育程序。

1 心外膜的起源

功能心脏的形成需要多个起源于胚胎结构的祖细胞群的组装和整合,如心源性中胚层、心脏神经嵴和前体心外膜^[7]。心外膜原是一个进化上保守的、位于胎儿心脏静脉极的短暂的祖细胞簇,在从七鳃鳗到人类的许多脊椎动物物种中都有描述^[8-13]。前体心外膜源性细胞在小鼠胚胎期(E)9.5天和鸡的 Hamburger-Hamilton 17-18 时期出现迁移,从初生心脏的心外膜转移到房室管(鸡)。前体心外膜源性细胞形成单细胞层的间皮,称为心外膜,排列在心脏的最外层^[11,12,14]。最初,心外膜表现出上皮样特性;然而,一部分心外膜细胞从心外膜层剥离并侵入心肌,在心脏内产生大部分血管平滑肌细胞(SMCs)和心脏成纤维细胞^[15]。因此,心外膜对于提供有助于心肌完整性的支持细胞至关重要。

2 心外膜的上皮间质转化

心外膜源性细胞(EPDCs)由心外膜层通过上皮间质转化(EMT)事件产生,该事件在鸡的 Hamburger-Hamilton 18 期和小鼠的 E12.5 期后开始^[16,17]。在人类中,EMT 标记物已在胎儿第 3 期心室周围扩张的心外膜中观察到表达(相当于小鼠的 E17.5-18.5)^[8]。EMT 是一种进化保守的过程,上皮细胞失去其顶端-基底极性和细胞-细胞粘附,并获得类似于多能间充质干细胞的迁移和侵袭特性^[18]。从 EMT 中出现的祖细胞经常在器官发生过程中产生新的细胞谱系。早期对鸡胚的研究中使用染料或逆转录病毒载体来标记心外膜细胞,结果表明 EPDCs 结合在心脏间质和冠状动脉血管中^[19-21]。心外膜 EMT 和心外膜来源的细胞命运随后在小鼠中使用基因谱系示踪方法进行描述,该方法可使用 β -半乳糖苷酶(LacZ)或荧光谱系报告器标记所有表达 Cre 重组酶细胞的子代。该技术利用特定的调控序列驱动 Cre 在

转基因小鼠的心外膜中表达。重要的是,虽然似乎没有单一的基因专门标记心外膜,但一些基因调节序列已被用于追踪在其他组织中发现的心外膜细胞和其他组织中发现的间质细胞,包括 Scx, Sema3d, Gata5, Tbx18, Tcf21 和 Wt1。使用他莫西芬诱导的 Cre 等位基因(Cre 重组酶融合到突变的雌激素配体结合域或 CreERT2)也提供了时间调控,来研究心外膜 EMT 的时间和心外膜细胞后代的命运图谱^[22]。

2.1 心外膜 EMT 的分子调控

转录因子(TFs)通过抑制编码上皮粘附分子的基因(E-cadherin, claudins 和 occludens)和激活间质基因[N-cadherin, 胶原蛋白和纤连蛋白(FN)]介导上皮细胞向间质表型的分化,这是细胞外基质(ECM)产生和迁移所必需的^[18]。在此,我们将强调已知的转录调控因子,以及上游生长因子的反应途径,其中包括心外膜的 EMT。

Wt1 是一种锌指 TF,心脏发育期间在心外膜高表达,并随着心外膜 EMT 而下调^[23,24]。在小鼠中全部或条件性缺失 Wt1 会导致胚胎在妊娠中后期死亡,心脏显示心外膜 EMT 和 EPDC 侵袭有缺陷,导致心肌发育不良和冠状动脉血管丛覆盖异常^[25,26]。这些缺陷可能归因于转录的改变,因为 Wt1 在 EMT 期间调节了许多靶点^[26-29],包括 Snail 的激活,它抑制了上皮标志物 Cdh1 (E-cadherin)的表达。Wt1 也被证明作用于经典 Wnt/ β -catenin 通路和视黄酸(RA)信号的上游,两者都对心外膜生物学和 EMT 至关重要^[17]。因此,心外膜中 β -catenin 的缺失将破坏粘附连接和细胞极性,最终损害 EPDC 迁移和冠状动脉的形成^[17,30]。

Tcf21 (Pod1/epicardin/capsulin)是一种在前体心外膜和心外膜中高度表达的 II 类基本螺旋-环-螺旋的 TF^[31]。缺失 Tcf21 的爪蟾胚胎不能形成一层内聚的心脏间质细胞,这表明 Tcf21 对前体心外膜细胞迁移和心外膜的正常形成至关重要^[13]。在小鼠中,Tcf21 调节心外膜 EMT,这可以通过在 Tcf21 缺失的心外膜外植体中 Snai1、Sox9 和 Zeb1 的下调来证明^[32]。Tcf21 依赖的转录对心外膜稳态的影响和 EMT 之间的确切机制尚不清楚,尽管与转录共抑制因子的相互作用以及与 E-box 共识序列(CAnnTG)的直接结合可能有助于这些过程^[13,33]。

通过 Hippo 信号通路和心肌相关转录因子(MRTFs)/血清反应因子(SRF)对 EMT 和运动基因程序的调控是 EPDCs 侵入心肌所必需的。Yap (Yap1)和 Taz

(Wwtr1)是进化保守的协同因子,被 Hippo 通路负向靶向抑制器官大小^[34]。除了调节接触抑制、细胞增殖和干细胞自我更新外,Yap 和 Taz 还在各种情况下介导 EMT^[34]。使用 Wt1^{CreERT2} 等位基因对 Yap 和 Taz 进行条件行敲除可以减少多个 EMT 相关 TF 的表达,包括 Snai1、Snai2、Twist1、Wt1 和 Tbx18^[35]。有趣的是,Hippo 通路必须在心外膜中被严格调控,因为 Yap/Taz 缺陷(Hippo 激活)或 lats1/2 缺陷(Hippo 失活)小鼠 EPDCs 在细胞迁移和成纤维细胞分化方面表现出缺陷^[35,36]。

SRF 是一种对前体心外膜的形成和心外膜 EMT 至关重要的 TF^[37,38]。SRF 与一种称为 CArG 盒的 DNA 基序[CC(A/T)₆GG]结合,激活与肌动蛋白细胞骨架重排、细胞粘附和迁移以及血管平滑肌细胞结合相关的基因程序^[37-41]。心外膜细胞的核 SRF 与平滑肌基因水平的增加相对应,而显性抑制 SRF 的表达可抑制平滑肌的形成^[38]。SRF 的转录活性通过与信号反应辅助因子 MRTF 家族的相互作用而大大增强^[41]。MRTFs 通过与单体肌动蛋白的相互作用被栓在细胞质中,而这隐藏了核定位信号^[42]。机械拉伸或激活 Rho 激酶和肌动蛋白聚合的途径导致 MRTFs 的核积累和激活 SRF 依赖的基因程序^[42]。使用 Wt1^{CreERT2} 等位基因的 MRTF 缺失导致在发育性 EMT 期间 EPDCs 的迁移减少,并伴有冠状动脉丛的延迟成熟^[43]。这些发现强调了信号反应性转录调节在心外膜 EMT 和 EPDCs 分化中的重要性。一般来说,EPDCs 在小鼠和鸡的心外膜中均表现出不同的心外膜 TF 表达^[44];因此,不同心外膜来源谱系可能部分是由于 EPDCs 的内在差异调节了对旁分泌信号的反应。

2.2 心外膜 EMT 的生长因子依赖性调控

转化生长因子(TGF)- β 是研究最充分的 EMT 和产生细胞外基质的上游调控因子之一^[45]。TGF- β 1-3 均在 E12.5 小鼠心外膜表达^[46],使用鸡的 Gata5 增强子(cGata5)-Cre 靶向删除 III 型 TGF- β 受体 Alk5 可影响心外膜 EMT,导致心肌发育不良、平滑肌细胞(SMC)和微血管结构损伤^[47]。同样的,III 型 TGF- β 受体的整体缺失(Tgfb3^{-/-}小鼠模型)可使冠状动脉丛消失,这是由心外膜炎症信号失调和骨形态发生蛋白 2 介导的 EPDCs 运动缺陷所导致的^[48,49]。由 TGF- β 1 和 TGF- β 2 刺激的小鼠和人心外膜外植体失去上皮标记物(紧密连接蛋白 ZO-1 和细胞角蛋白),并上调 SMC 标记物(α -SMA、转凝蛋白或 SM22、钙调节蛋白和钙调素结合蛋白)表

明发生了 EMT^[50,51]。TGF- β 2 还通过间接刺激透明质酸合成酶 2 (Has2)的表达和产生 ECM 成分透明质酸来放大心外膜的运动能力^[52]。

血小板衍生生长因子 (PDGF)信号在小鼠心脏发育过程中普遍存在,并调节其中的关键过程,如心脏神经嵴细胞募集到流出道,冠状动脉血管成熟和心肌发育^[53-55]。PDGF 受体(PDGFR)- α 和 PDGFR- β 是受体酪氨酸激酶,在调节心外膜 EMT 和 EPDCs 中发挥关键作用^[56]。缺乏 *Pdgfra/b* 的心外膜细胞对促 EMT 刺激 [TGF- β 、成纤维细胞生长因子(FGF)-2 和 PDGFBB]无反应,并表达低水平的 EMT 转录因子(Snai1 和 Sox9)和间质基因^[56]。在 PDGFR 突变细胞中强制过表达 Sox9 可以挽救 EMT 中的缺陷,这表明 Sox9 是 PDGFR- α/β 信号的下游。使用 cGata5Cre 或 WT1^{CreERT2} 等位基因条件性删除或全部敲除每个受体,可通过破坏磷酸肌醇 3 激酶介导的肌动蛋白聚合调控来限制 EPDCs 的运动性^[56-58]。

3 心外膜来源的间质细胞谱系

各种心脏间质细胞系,包括成纤维细胞,血管壁细胞,和一定程度上的内皮细胞(ECs)均于心外膜上产生。

3.1 成纤维细胞

谱系示踪和报告小鼠品系,如 Tcf21^{MerCreMer/+}; Rosa26^{EGFP}^[59], Collagen1a1 (Col1a1)GFP^[60,61]和 PDGFR α ^{GFP/+}^[62]有助于鉴定起源于 EPDCs 的^[63]特别是在窦房结、房室垫和瓣膜附近区域以及纤维环的心脏驻留成纤维细胞^[64-67]。值得注意的是, Tcf21 控制着 EPDCs 向 SMC 或成纤维细胞系的转化^[68]。Tcf21 缺失的心脏含有更少的 Col1a1 (collagen1a1)-GFP⁺成纤维细胞,而 SMCs 的数量保持不变^[32]。相反,通过外源性 RA 激活 Tcf21 将会减少鸡胚胎心脏 SMCs 的数量^[44]。除了 Tcf21 外,上游信号如 PDGF 信号也可以影响心脏成纤维细胞的命运。在小鼠模型中, PDGFR 异构体在心外膜形成的早期阶段显示出重叠的表达模式,但到了 E13.5 就变得不同了^[56]。*Pdgfra* 功能缺失将损害 EPDCs 向心脏成纤维细胞分化,而 *Pdgfrb* 的条件缺失影响血管 SMC 谱系^[56]。这些发现表明 PDGFR α 和 PDGFR β 调节的是不同的心外膜来源的发育轨迹。

3.2 血管壁细胞

冠状动脉内的血管 SMCs 首次在禽类模型中被证明起源于前体心外膜来源的细胞^[19]。这些发现后来在小鼠中使用 Cre 依赖的追踪来自表达 Tcf21^[56], Wt1^[15]和 Tbx18^[69]祖细胞的细胞得到证实。Tbx (T-box 蛋白)-18 属于一个大的 T-box 转录因子家族, 在脊椎动物和无脊椎动物中调节各种发育过程, 并富集于前体心外膜、心外膜、心外膜下间质、横隔和心肌的一个子集^[70-72]。Tbx18 对于心外膜发育和 EMT 是不可缺少的; 然而, Tbx18 的缺失会导致冠状动脉血管成熟的缺陷^[70,73]。Tbx18 的强制性表达可阻止 SRF 依赖的平滑肌报告细胞的激活。相反, Tbx18VP16(单纯疱疹病毒编码蛋白 VP16 与 Tbx18 的 c 端融合)的条件性错误表达将导致 Notch3 和 TGF- β 信号通路介导的心脏发育不良和异位平滑肌分化^[74,75]。据报道, 成熟的 SMCs(平滑肌肌球蛋白重链, 也称为 MYH11⁺)通过 Tbx18 谱系来源的周细胞的分化而产生, 这些周细胞是包裹微血管并保持血管完整性的星状细胞^[76]。心外膜来源的心脏周细胞, 由 PDGFR- β 和硫酸软骨素蛋白聚糖 4(也称为神经胶质抗原 2)的表达来定义, 是胚胎冠状神经丛的稳定和生长所必需的^[43,77]。的确, 与心外膜中 MRTFs 基因缺失相关的 EMT 缺陷会使心脏的周细胞减少, 导致血管完整性降低和心外膜下出血^[43]。

3.3 血管内皮细胞

冠状动脉内皮细胞主要来源于非心外膜源性的^[78]。小鼠的谱系示踪研究已经将心外膜来源的内皮细胞从 Tbx18、c-Gata5 或 Tcf21 谱系来源的 EPDCs 排除了^[79,69,32]。然而, Wt1 来源的心外膜细胞已被证明在发育中的鸡胚胎中产生了心电图^[21]; 并且在小鼠模型中, 在 E10.5 或出生后早期时间点给予他莫西芬后, Wt1 来源的心外膜细胞从 Wt1^{CreERT2} 谱系中映射出 EPDCs 的命运^[15,80]。然而, 心外膜对 ECs 命运的贡献受到了挑战, 有报道称成熟内皮细胞中内源性 Wt1 表达从 E12.5 开始, 并在小鼠出生后发育过程中持续存在^[81]。通过体内命运定位和体外培养证实, Scx 和 Sema3D 阳性心外膜细胞能形成罕见的 ECs 群体。虽然 Sema3D^{GFP^{Cre}}、Scx^{Cre}、Wt1^{CreERT2} 和 G2-Gata4^{Cre} 心外膜 Cre 谱系^[82,24]可以零星地标记一些内皮细胞, 但大多数心脏内皮细胞还是来自静脉窦和心内膜^[77]。

4 总结

损伤心脏的治疗性再生一直是一个巨大的挑战，而心外膜在这一领域还是一个相对较新的参与者。有趣的是，成年人的心脏损伤后可以激活胚胎发育期的基因来参与修复，这提示了我们研究胚胎心脏的发育过程及其机制将有可能治疗损伤心脏。成年人心肌细胞损伤后由纤维组织替代损伤心肌，造成不可逆的心功能下降，而胚胎心外膜细胞在心脏发育过程中经由 EMT 形成心脏支持细胞，乃至心肌细胞。这给我们研究心外膜细胞的发育机制，使心外膜细胞重编程为心肌细胞，来治疗心肌梗死病人损伤的心肌提供了一种新的思路和重要见解。

参考文献

- [1] BENJAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association[J]. Circulation, 2019, 139(10).
- [2] BURCHFIELD J S, XIE M, HILL J A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2[J]. Circulation, 2013, 128(4): 388-400.
- [3] HEALLEN T R, KADOW Z A, KIM J H, et al. Stimulating Cardiogenesis as a Treatment for Heart Failure[J]. Circulation Research, 2019, 124(11): 1647-1657.
- [4] VAGNOZZI R J, MOLKENTIN J D, HOUSER S R. New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications[J]. Circulation Research, 2018, 123(2): 159-176.
- [5] FORTE E, FURTADO M B, ROSENTHAL N. The interstitium in cardiac repair: role of the immune–stromal cell interplay[J]. Nature Reviews Cardiology, 2018, 15(10): 601-616.
- [6] CAO J, POSS K D. The epicardium as a hub for heart regeneration[J]. Nature Reviews Cardiology, 2018, 15(10): 631-647.
- [7] MEILHAC S M, LESCROART F, BLANPAIN C, et al. Cardiac Cell Lineages that Form the Heart[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2015, 5(2): a026344-a026344.
- [8] RISEBRO C A, VIEIRA J M, RILEY P R. Characterisation of the human embryonic and foetal epicardium during heart development[J]. Development, 2015: dev.127621.
- [9] POMBAL M A, CARMONA R, MEGÍAS M, et al. Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus[J]. Evolution & Development, 2008, 10(2): 210-216.
- [10] SERLUCA F C. Development of the proepicardial organ in the zebrafish[J]. Developmental Biology, 2008, 315(1): 18-27.

- [11]NAHIRNEY P C, MIKAWA T, FISCHMAN D A. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos[J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 227(4): 511-523.
- [12]ZHOU B, GISE A von, MA Q, et al. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 375(3): 450-453.
- [13]TANDON P, MITEVA Y V, KUCHENBROD L M, et al. Tcf21 regulates the specification and maturation of proepicardial cells[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2409-2421.
- [14]RODGERS L S, LALANI S, RUNYAN R B, et al. Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart[J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(1): 145-152.
- [15]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.
- [16]CARMONA R, GUADIX J A, CANO E, et al. The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development[J]. *JouRNAl of Cellular and Molecular Medicine*, 2010, 14(8): 2066-2072.
- [17]ZAMORA M, MÄNNER J, RUIZ-LOZANO P. Epicardium-derived progenitor cells require β -catenin for coronary artery formation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(46): 18109-18114.
- [18]LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(3): 178-196.
- [19]MIKAWA T, GOURDIE R G. Pericardial Mesoderm Generates a Population of Coronary Smooth Muscle Cells Migrating into the Heart along with Ingrowth of the Epicardial Organ[J]. *Developmental Biology*, 1996, 174(2): 221-232.
- [20]DETTMAN R W, DENETCLAW W, ORDAHL C P, et al. Common Epicardial Origin of Coronary Vascular Smooth Muscle, Perivascular Fibroblasts, and Intermycardial Fibroblasts in the Avian Heart[J]. *Developmental Biology*, 1998,

- 193(2): 169-181.
- [21]PÉREZ-POMARES J M, PHELPS A, SEDMEROVA M, et al. Experimental Studies on the Spatiotemporal Expression of WT1 and RALDH2 in the Embryonic Avian Heart: A Model for the Regulation of Myocardial and Valvuloseptal Development by Epicardially Derived Cells (EPDCs)[J]. *Developmental Biology*, 2002, 247(2): 307-326.
- [22]BRAITSCH C M, YUTZEY K E. Transcriptional Control of Cell Lineage Development in Epicardium-Derived Cells[J]. *JouRNAI of Developmental Biology*, 2013, 1(2): 92-111.
- [23]CARMONA R, GONZÁLEZ-IRIARTE M, PÉREZ-POMARES J M, et al. Localization of the Wilms' tumour protein WT1 in avian embryos[J]. *Cell and Tissue Research*, 2001, 303(2): 173-186.
- [24]KATZ T C, SINGH M K, DEGENHARDT K, et al. Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells[J]. *Developmental Cell*, 2012, 22(3): 639-650.
- [25]MARTÍNEZ-ESTRADA O M, LETTICE L A, ESSAFI A, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(1): 89-93.
- [26]VON GISE A, ZHOU B, HONOR L B, et al. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways[J]. *Developmental Biology*, 2011, 356(2): 421-431.
- [27]GUADIX J A, RUIZ-VILLALBA A, LETTICE L, et al. Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2[J]. *Development*, 2011, 138(6): 1093-1097.
- [28]VELECELA V, LETTICE L A, CHAU Y Y, et al. WT1 regulates the expression of inhibitory chemokines during heart development[J]. *Human Molecular Genetics*, 2013, 22(25): 5083-5095.
- [29]NORDEN J, GRIESKAMP T, LAUSCH E, et al. Wt1 and Retinoic Acid Signaling in the Subcoelomic Mesenchyme Control the Development of the Pleuropericardial

- Membranes and the Sinus Horns[J]. Circulation Research, 2010, 106(7): 1212-1220.
- [30]WU M, SMITH C L, HALL J A, et al. Epicardial Spindle Orientation Controls Cell Entry into the Myocardium[J]. Developmental Cell, 2010, 19(1): 114-125.
- [31]LU J, RICHARDSON J A, OLSON E N. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs[J]. Mechanisms of Development, 1998, 73(1): 23-32.
- [32]ACHARYA A, BAEK S T, HUANG G, et al. The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors[J]. Development, 2012, 139(12): 2139-2149.
- [33]FUNATO N, OHYAMA K, KURODA T, et al. Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Epicardin/Capsulin/Pod-1 Suppresses Differentiation by Negative Regulation of Transcription[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(9): 7486-7493.
- [34]PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond[J]. Physiological Reviews, 2014, 94(4): 1287-1312.
- [35]SINGH A, RAMESH S, CIBI D M, et al. Hippo Signaling Mediators Yap and Taz Are Required in the Epicardium for Coronary Vasculature Development[J]. Cell Reports, 2016, 15(7): 1384-1393.
- [36]XIAO Y, HILL M C, ZHANG M, et al. Hippo Signaling Plays an Essential Role in Cell State Transitions during Cardiac Fibroblast Development[J]. Developmental Cell, 2018, 45(2): 153-169.e6.
- [37]LANDERHOLM T E, DONG X R, LU J, et al. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells[J]. Development (Cambridge, England), 1999, 126(10): 2053-2062.
- [38]LU J, LANDERHOLM T E, WEI J S, et al. Coronary Smooth Muscle Differentiation from Proepicardial Cells Requires RhoA-Mediated Actin Reorganization and p160 Rho-Kinase Activity[J]. Developmental Biology, 2001, 240(2): 404-418.
- [39]SMALL E M. The Actin-MRTF-SRF Gene Regulatory Axis and Myofibroblast

- Differentiation[J]. *JouRNAI of Cardiovascular Translational Research*, 2012, 5(6): 794-804.
- [40]NELSON T J, DUNCAN S A, MISRA R P. Conserved Enhancer in the Serum Response Factor Promoter Controls Expression During Early Coronary Vasculogenesis[J]. *Circulation Research*, 2004, 94(8): 1059-1066.
- [41]PIPES G C T, CREEMERS E E, OLSON E N. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(12): 1545-1556.
- [42]OLSON E N, NORDHEIM A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(5): 353-365.
- [43]TREMBLEY M A, VELASQUEZ L S, DE MESY BENTLEY K L, et al. Myocardin-related transcription factors control the motility of epicardium-derived cells and the maturation of coronary vessels[J]. *Development*, 2015, 142(1): 21-30.
- [44]BRAITSCH C M, COMBS M D, QUAGGIN S E, et al. Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart[J]. *Developmental Biology*, 2012, 368(2): 345-357.
- [45]XU J, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Research*, 2009, 19(2): 156-172.
- [46]MOLIN D G M, BARTRAM U, VAN DER HEIDEN K, et al. Expression patterns ofTgf β 1-3 associate with myocardialisation of the outflow tract and the development of the epicardium and the fibrous heart skeleton[J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 227(3): 431-444.
- [47]SRIDURONGRIT S, LARSSON J, SCHWARTZ R, et al. Signaling via the Tgf- β type I receptor Alk5 in heart development[J]. *Developmental Biology*, 2008, 322(1): 208-218.
- [48]HILL C R, SANCHEZ N S, LOVE J D, et al. BMP2 signals loss of epithelial character in epicardial cells but requires the Type III TGF β receptor to promote

- p invasion[J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 1012-1022.
- [49]CLARK C R, ROBINSON J Y, SANCHEZ N S, et al. Common pathways regulate Type III TGF β receptor-dependent cell invasion in epicardial and endocardial cells[J]. Cellular Signalling, 2016, 28(6): 688-698.
- [50]COMPTON L A, POTASH D A, MUNDELL N A, et al. Transforming growth factor- β induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235(1): 82-93.
- [51]TREMBLEY M A, VELASQUEZ L S, SMALL E M. Epicardial Outgrowth Culture Assay and Ex Vivo Assessment of Epicardial-derived Cell Migration[J]. JouRNAl of Visualized Experiments, 2016(109): 53750.
- [52]CRAIG E A, AUSTIN A F, VAILLANCOURT R R, et al. TGF β 2-mediated production of hyaluronan is important for the induction of epicardial cell differentiation and invasion[J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(20): 3397-3405.
- [53]BLOOMEKATZ J, SINGH R, PRALL O W, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) signaling directs cardiomyocyte movement toward the midline during heart tube assembly[J]. eLife, 2017, 6: e21172.
- [54]TALLQUIST M D, SORIANO P. Cell autonomous requirement for PDGFR α in populations of cranial and cardiac neural crest cells[J]. Development, 2003, 130(3): 507-518.
- [55]VAN DEN AKKER N M S, LIE-VENEMA H, MAAS S, et al. Platelet-derived growth factors in the developing avian heart and maturing coronary vasculature[J]. Developmental Dynamics, 2005, 233(4): 1579-1588.
- [56]SMITH C L, BAEK S T, SUNG C Y, et al. Epicardial-Derived Cell Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fate Specification Require PDGF Receptor Signaling[J]. Circulation Research, 2011, 108(12).
- [57]MELLGREN A M, SMITH C L, OLSEN G S, et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor β Signaling Is Required for Efficient Epicardial Cell Migration and Development of Two Distinct Coronary Vascular Smooth Muscle Cell

- Populations[J]. Circulation Research, 2008, 103(12): 1393-1401.
- [58]BAX N A M, BLEYL S B, GALLINI R, et al. Cardiac malformations in *Pdgfra* mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and *Nkx2.5* in the second heart field[J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(8): 2307-2317.
- [59]ACHARYA A, BAEK S T, BANFI S, et al. Efficient inducible Cre-mediated recombination in *Tcf21* cell lineages in the heart and kidney[J]. genesis, 2011, 49(11): 870-877.
- [60]MOORE-MORRIS T, GUIMARÃES-CAMBOA N, BANERJEE I, et al. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis[J]. Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(7): 2921-2934.
- [61]LIN S L, KISSELEVA T, BRENNER D A, et al. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney[J]. The American Journal of Pathology, 2008, 173(6): 1617-1627.
- [62]HAMILTON T G, KLINGHOFFER R A, CORRIN P D, et al. Evolutionary Divergence of Platelet-Derived Growth Factor Alpha Receptor Signaling Mechanisms[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(11): 4013-4025.
- [63]LIGHTHOUSE J K, SMALL E M. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016, 91: 52-60.
- [64]ZHOU B, VON GISE A, MA Q, et al. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart[J]. Developmental Biology, 2010, 338(2): 251-261.
- [65]WESSELS A, VAN DEN HOFF M J B, ADAMO R F, et al. Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart[J]. Developmental Biology, 2012, 366(2): 111-124.
- [66]ERALP I, LIE-VENEMA H, BAX N A M, et al. Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart[J]. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006, 288A(12): 1272-1280.

- [67]GITTENBERGER-DE GROOT A C, VRANCKEN PEETERS M P F M, MENTINK M M T, et al. Epicardium-Derived Cells Contribute a Novel Population to the Myocardial Wall and the Atrioventricular Cushions[J]. Circulation Research, 1998, 82(10): 1043-1052.
- [68]MIYAGISHI M, HATTA M, OHSHIMA T, et al. Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000, 205(1-2): 141-147.
- [69]CAI C L, MARTIN J C, SUN Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. Nature, 2008, 454(7200): 104-108.
- [70]CHRISTOFFELS V M, GRIESKAMP T, NORDEN J, et al. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors[J]. Nature, 2009, 458(7240): E8-E9.
- [71]CHRISTOFFELS V M, MOMMERSTEEG M T M, TROWE M O, et al. Formation of the Venous Pole of the Heart From an *Nkx2-5* -Negative Precursor Population Requires *Tbx18*[J]. Circulation Research, 2006, 98(12): 1555-1563.
- [72]STENNARD F A, HARVEY R P. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart[J]. Development, 2005, 132(22): 4897-4910.
- [73]WU S P, DONG X R, REGAN J N, et al. Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels[J]. Developmental Biology, 2013, 383(2): 307-320.
- [74]GREULICH F, FARIN H F, SCHUSTER-GOSSLER K, et al. Tbx18 function in epicardial development[J]. Cardiovascular Research, 2012, 96(3): 476-483.
- [75]GRIESKAMP T, RUDAT C, LÜDTKE T H W, et al. Notch Signaling Regulates Smooth Muscle Differentiation of Epicardium-Derived Cells[J]. Circulation Research, 2011, 108(7): 813-823.
- [76]VOLZ K S, JACOBS A H, CHEN H I, et al. Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle[J]. eLife, 2015, 4: e10036.
- [77]RED-HORSE K, UENO H, WEISSMAN I L, et al. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells[J]. Nature, 2010, 464(7288): 549-553.

- [78]TIAN X, PU W T, ZHOU B. Cellular Origin and Developmental Program of Coronary Angiogenesis[J]. Circulation Research, 2015, 116(3): 515-530.
- [79]MERKI E, ZAMORA M, RAYA A, et al. Epicardial retinoid X receptor α is required for myocardial growth and coronary artery formation[J/OL]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(51): 18455-18460. DOI:10.1073/pnas.0504343102.
- [80]ZHOU B, PU W T. Genetic Cre-loxP Assessment of Epicardial Cell Fate Using Wt1-Driven Cre Alleles[J]. Circulation Research, 2012, 111(11).
- [81]RUDAT C, KISPERT A. Wt1 and Epicardial Fate Mapping[J]. Circulation Research, 2012, 111(2): 165-169.
- [82]CANO E, CARMONA R, RUIZ-VILLALBA A, et al. Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio-venous connections[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(3): 656-661.