

上皮间质转化与干细胞自我更新和分化

翁晓菲, 何泽诏, 李涛*

(湖南师范大学医学院检验系, 长沙 410013)

摘要 上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞失去连接和极性转变为间质细胞的过程,这一现象普遍存在于胚胎发育、创伤愈合、器官纤维化以及肿瘤转移。在胚胎早期发育和晚期发育过程,例如着床、原肠运动、心血管发育等事件中有EMT和间质上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)的参与。EMT和MET参与调控干细胞表型变化、细胞迁移运动,是细胞差异分化和三维组织构建的重要机制。EMT的重要标志是细胞黏附分子表达由E-钙黏着蛋白(E-cadherin)向N-钙黏着蛋白(N-cadherin)转换。E-钙黏着蛋白通过与 β -联蛋白、p120-联蛋白、 α -联蛋白联合,影响Wnt、小GTP酶超家族等信号通路活化,调控细胞骨架运动。TGF β 、Notch、Wnt、BMP、FGF等信号通路,Snail、Twist、Zeb等转录因子,联合表观修饰酶,协同参与EMT的启动和调控。体外研究模型表明,E-钙黏着蛋白参与干细胞自我更新;而体细胞重编程可视为MET,重编程因子辅助体细胞获得E-钙黏着蛋白表达。体外研究发现,EMT及相关分子(例如E-钙黏着蛋白、Snail、Twist、Zeb等)参与了早期三胚层分化及晚期特定细胞类型的形成。对EMT机制的研究有助于理解和改善干细胞体外诱导分化效率,促进类器官的构建和诱导。

关键词 上皮间质转化; 钙黏着蛋白; 干细胞; 分化; 自我更新; 体细胞重编程

中图分类号 Q25

Epithelial Mesenchymal Transformation and Stem Cell Self-renewal and Differentiation

WENG Xiao-Fei, HE Ze-Zhao, LI Tao*

(School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

Abstract The lineage transition between epithelium and mesenchyme is a process known as epithelial-mesenchymal transition (EMT), by which polarized epithelial cells lose their adhesion property and obtain mesenchymal cell phenotypes. EMT is commonly found in embryonic development, wound healing, organ fibrosis and tumor metastasis. EMT and mesenchymal-epithelial transition (MET) are involved in the early and late development of embryo, such as implantation, gastrulation, heart development and so on. EMT and MET are involved in the regulation of stem cell phenotype changes and cell migration, which are important mechanisms of cell differentiation and three-dimensional tissue construction. The expression of cell adhesion molecules is transformed from E-cadherin to N-cadherin, which is an important sign of EMT. By interacting with β -catenin, p120-catenin and α -catenin, E-cadherin can affect the activation of Wnt, small GTPase superfamily and other signaling pathways and regulate cytoskeleton movement. TGF, Notch, Wnt, BMP, FGF, and other signaling pathways, Snail, Twist, Zeb and other transcription factors, together with epigenetic modifying enzymes, participate in the initiation and regulation of EMT in a coordinated way. *In vitro* models showed that E-cadherin was involved in self-

收稿日期: 2020-06-19; 修回日期: 2020-09-21; 接受日期: 2020-10-11

国家自然科学基金项目(No.81870201)资助

* 通讯作者 Tel: 17769312231; E-mail: 63665116@qq.com

Received: June 19, 2020; Revised: September 21, 2020; Accepted: October 11, 2020

Supported by National Natural Science Foundation of China(No.81870201)

* Corresponding author Tel: 17769312231; E-mail: 63665116@qq.com

renewal of stem cells. Somatic cell reprogramming could be regarded as MET, and the expression of E-cadherin can be obtained in somatic cells after transfection of reprogramming factors. *In vitro* studies have found that EMT and its related molecules (such as E-cadherin, Snail, Twist, Zeb, etc.) were involved in the early triploblast differentiation and the formation of specific cell types in the late stage. The study on the mechanism of EMT will help to improve the differentiation efficiency of stem cells *in vitro* and promote the induction of organoids.

Key words epithelial mesenchymal transition (EMT); cadherin; stem cell; differentiation; self-renewal; somatic reprogramming

受精卵经过卵裂形成囊胚,首次差异分化为滋养层干细胞和具有多能性的胚胎干细胞,经过原肠运动产生三胚层,继续通过分裂分化形成以上皮和间质细胞为主、具有复杂结构的组织器官。干细胞在上皮和间质表型之间可发生转化,从而在迁移和锚定状态下切换,形成不同的细胞的类型和组织结构。胚胎发育中的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和间质上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)是形态发生的重要机制,对其相关机制的研究,将为阐释细胞系谱分化和组织结构形成提供科学依据。

1 上皮与间质细胞特征和钙黏着蛋白

上皮细胞是高度极化的细胞,通过细胞膜侧面黏附复合物彼此紧密相联成层,并与基底膜相连接;而间充质细胞缺乏极性与细胞连接,具有迁移性且形态易变,可以分化为许多不同的细胞类型。上皮细胞极性主要由 Par-aPKC 等复合物参与建立和维持。上皮细胞在侧面通过紧密连接、黏附连接、缝隙连接和桥粒等方式连接邻近细胞,在基底膜处还存在半桥粒、黏着斑等方式与细胞外基质连接。紧密连接依赖于闭合蛋白(occludin)、密封蛋白(claudin)和紧密连接蛋白 ZO 等,相邻细胞质膜通过跨膜蛋白质形成嵴线,并将其锚定在微丝上。桥粒锚定连接相邻的细胞,特征是胞内锚蛋白形成独特的盘状致密斑,跨膜黏附性蛋白质包括桥粒芯蛋白(desmoglein)和桥粒芯胶黏蛋白(desmocollin)等。胞内锚蛋白质包括桥粒斑珠蛋白(plakoglobin)、桥粒斑蛋白(desmoplakin),锚蛋白与角蛋白(keratin)组成的中等纤维连接骨架。缝隙连接主要由缝隙连接蛋白(connexin)构成,介导相邻细胞的化学通讯、代谢偶联和电传导。此外,上皮细胞通过细胞表面黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)实现细胞识别和黏着。CAM 分为 4 大类:选择素、整合素、免疫球蛋白超家族及钙黏着蛋白。选择素是异亲型结合、Ca²⁺ 依赖的细胞黏附分子。整合素主要介导细

胞与胞外基质间的黏着。钙黏着蛋白(cadherin)是一种同亲型结合、Ca²⁺ 依赖的细胞黏着糖蛋白,具有 E、V、VE、P-钙黏着蛋白等类型。

E-钙黏着蛋白(E-cadherin)和 N-钙黏着蛋白(N-cadherin)属于经典的单跨膜钙黏着蛋白质,结构相似,胞外存在 5 个钙黏着蛋白重复结构域,对 Ca²⁺ 高度敏感,在胞内主要以钙黏着蛋白-连环蛋白复合物形式存在(Fig.1)。在胞膜下 β-联蛋白(β-catenin)与钙黏着蛋白的胞内肽段 SH1 结构域结合,β-联蛋白的氨基端与 α-联蛋白结合,将钙黏着蛋白复合体锚定在肌动蛋白骨架上,参与细胞黏附、收缩、迁移和嵌入。例如,小鼠胚胎 8 细胞期,E-钙黏着蛋白将松散联系的分裂球细胞变成紧密黏合的细胞团。p120-联蛋白与钙黏着蛋白胞内段近膜区 SH2 结构域结合,稳定钙黏着蛋白结构,抑制其内吞和降解。E-钙黏着蛋白与 N-钙黏着蛋白的结构差异主要在于 E-钙黏着蛋白与 p120-联蛋白的较短亚型结合,而 N-钙黏着蛋白与较长亚型结合。钙黏着蛋白可通过 p120-联蛋白和 β-联蛋白参与调控经典 Wnt/小 GTP 酶超家族等信号通路。钙黏着蛋白通过胞膜下募集、扣留 β-联蛋白,阻断了 Wnt/β-catenin 的促增殖作用,介导接触抑制作用。此外,p120-联蛋白在胞浆中阻止 GDP 与 RhoA 解离,使 RhoA 处于持续失活状态并激活 Cdc42 和 Rac1。而正常情况下,p120-联蛋白在胞浆中含量较低,多在胞膜下与钙黏素结合,RhoA 失活解除,从而促进肌动蛋白之间的聚合,而肌动蛋白微丝又可结合至 p120-钙黏着蛋白复合体,增强细胞结合的紧密程度。同时,p120-联蛋白也能将 β-联蛋白滞留于胞膜下,是 Wnt 信号的强负调控因子^[1];p120-联蛋白也能入核发挥转录辅因子作用^[2]。

2 上皮间质转化的生化特征和调控

在上皮间质转化时,上皮细胞失去极性和细胞间联系,细胞骨架重塑,同时获得间充质细胞的形态和基因表型,运动迁移能力和抗凋亡能力增强,细胞

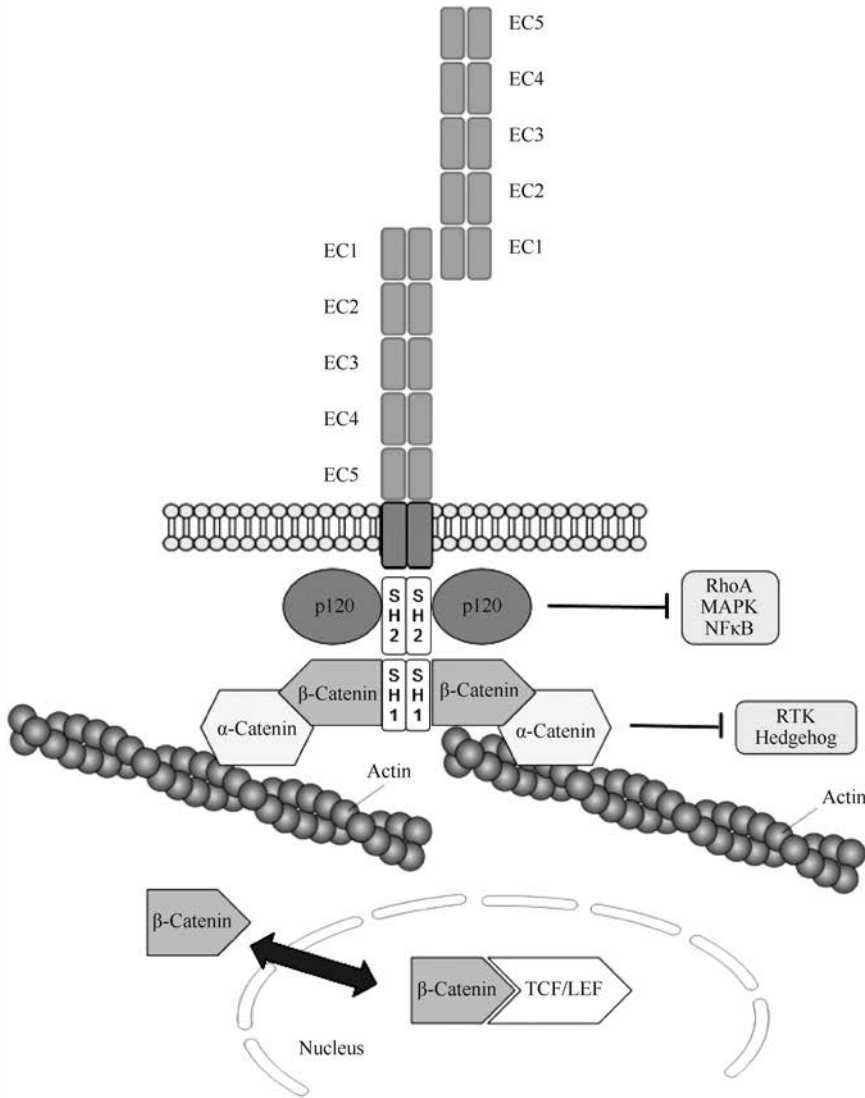


Fig.1 The Structure of cadherin and its interacting proteins The classical cadherins are single span transmembrane cadherins with five extracellular cadherin (EC) repeat domains and grouped into type-I and type-II subgroups. Cadherin intracellular tail SH2 domain interacts with p120-catenin, whereas the carboxy-terminal part SH1 domain directly binds β-catenin which connects to α-catenin, binds α-catenin mediating a dynamic linkage to the actin cytoskeleton, thus form the cadherin-catenin adhesion complex

外基质产生能力增加。而 MET 则是一个逆过程,细胞由间质向上皮转变。细胞 E-钙黏着蛋白表达下调或丢失,向 N-钙黏着蛋白表达转变是上皮间质转化的主要标志^[3]。E-钙黏着蛋白减少导致上皮细胞失去细胞间黏附作用和极性,促使细胞向间质表型转化;而在间质细胞中过表达 E-钙黏着蛋白,则能使细胞转化为上皮表型,出现桥粒等细胞连接。此外,封闭蛋白、紧密连接蛋白 ZO-1 和角蛋白-18 等随着 EMT 进行表达逐渐降低。而 N-钙黏着蛋白、平滑肌 α-肌动蛋白(α-SMA)、纤维母细胞特异性蛋白 1、纤维连接蛋白、胶原蛋白和波形蛋白等间质细胞标志物增多。细胞骨架中间丝蛋白从以角蛋白为

主转变为波形蛋白为主,二者除了影响细胞运动外,还调控不同细胞器和膜蛋白质的胞浆运输^[4]。EMT 的表型转换主要与上皮和间质基因的差异表达有关,受转录因子、信号通路和表观修饰的协同调控。

调控 EMT 的分子开关包括 Snail、Twist、Zeb 等转录因子,它们协同抑制 E-钙黏着蛋白表达,也能抑制 Claudin、Occludin、Plakophilins、Mucin-1、Cytokeratin-8 等上皮基因表达。其他转录因子也参与发育过程中的 EMT,例如神经嵴分层运动,依赖于转录因子 FoxD3、SoxE 与 Snail2 的时空特异性协同调控^[5]。Snail 属于锌指蛋白质超家族,包括 Snail1 与 Snail2(又称 Slug)(Fig.2)。Snail 通过结合

E-钙黏着蛋白启动子上游 E 盒 (E-box) (-CAGGTG-)来抑制其表达。研究发现,Snail 与由组蛋白甲基化酶 (Ezh2、G9a、SUV39H1)、组蛋白去乙酰化酶 (Hdac1\2\3) 及组蛋白去甲基化酶 (Lsd1) 等组成的多梳抑制复合物 2 (PRC2) 相互作用,借助表观调控机制,抑制上皮标志性基因的表达,促进间质表型基因的表达。此外,Snail1 还可以上调 Rho-GTPase,促进细胞骨架重排和运动。在小鼠中,Snail1 敲除后胚胎在原肠胚形成期死亡。研究发现,在鸡胚原肠运动中,表达 Snail2 的细胞内移分化为中胚层和内胚层,而 Sox3 阳性的细胞形成外胚层,因此 Snail 和 Sox3 之间存在交互抑制^[6]。Snail 和 Slug 还可直接抑制上皮标记物 Cytokerain-8、Mucin-1 的表达和促进 RhoB 的形成。Twist 是编码碱性螺旋-环-螺旋 (HLH) DNA 结构域的转录因子。Twist 与 E12 或 E47 形成异源二聚体,竞争结合 E-钙黏着蛋白基因启动子中的 E-box 序列,引起表观遗传沉默,从而抑制 E-钙黏着蛋白的表达。研究显

示, Twist 可募集组蛋白甲基化酶 Set8, PRC1 转录抑制复合物组份 Bmi1。Zeb 家族是一类 E 盒结合锌指蛋白质,包括 Zeb1 和 Zeb2,具有特殊的 Smad 结构域和 CtBP 相互作用结构域。通过锌指结构结合 E-box 序列,募集辅抑制因子 CtBP,从而介导 E-钙黏着蛋白表达沉默。但如果 Zeb 结合转录共激活因子 PCAF 和 p300,则又会发挥转录激活作用,调控间质性基因表达。Zeb1 能抑制多种上皮细胞分化和细胞黏附分子,包括细胞极性基因 Crumbs3 和 Hugl2 及与 Pals1 相关的紧密连接蛋白质,从而抑制 E-钙黏着蛋白的表达,诱导 EMT。

调节 EMT 的信号通路有转化生长因子 β (TGF β)、Notch、Wnt、Hedgehog、Hippo、NF- κ B 等。TGF β 发挥核心作用,与 Notch、Wnt 相互作用可引起显著的 EMT。TGF β 可以 Smad 依赖的方式诱导 Snail、Zeb 和 Twist 的表达。此外, TGF β 可以 Smad 非依赖的方式下调顶端极性蛋白 Par3 和 Par6 的表达,改变胞膜定位和泛素化降解,并促进 RhoA 降

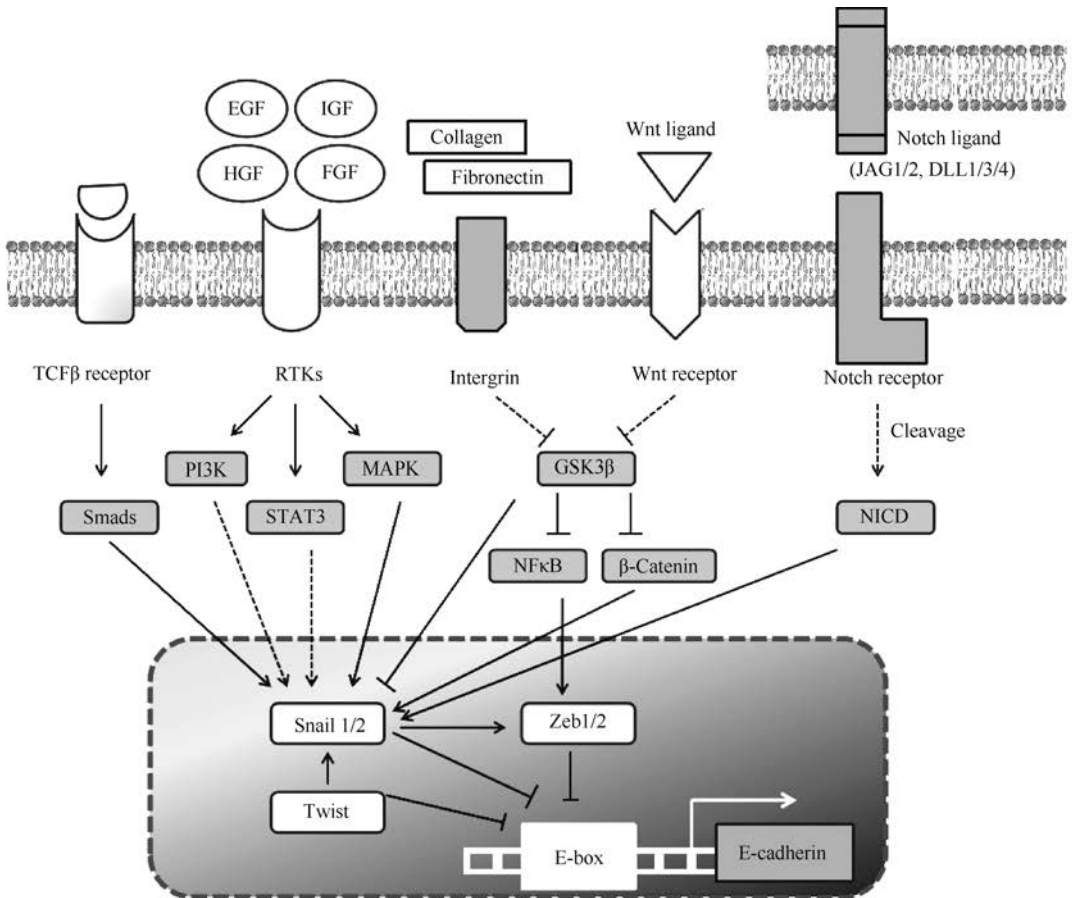


Fig.2 Signal pathways and transcription factors regulating EMT Several signaling pathways including TGF β , Wnt, Notch, integrin, Hedgehog, Hippo, NF- κ B, can regulate EMT and affect the expression of Snail, Twist and Zeb. The EMT-inducing transcription factors Snail, Twist and Zeb play a central role during EMT and repress epithelial genes by binding to E-box DNA sequences

解,影响细胞骨架排布^[7]。Wnt 信号中的 TCF/LEF 转录因子和 β -联蛋白复合物可直接调控 Snail1 表达^[8]。TGF β -Smad 通路也可上调 LEF1 表达,Smad3 能与 β -联蛋白直接结合,促进其入核^[9]。Hedgehog 通路的效应子 Gli1,也可以诱导 Snail 和 Twist 表达。

3 胚胎发育中的上皮间质转化和间质上皮转化事件

胚胎发育时,细胞需要经过多次 EMT 和间质上皮转化,时序性 EMT 过程可分为初级、次级和三级 EMT^[10, 11]。初级上皮间质转化最早出现在着床期,囊胚在子宫壁产生可植入子宫的滋养层。着床后,囊胚细胞通过剧烈而规则地运动,使细胞在原条位置上出现一类新的细胞将上下胚层分隔开,产生中胚层,形生三胚层和神经嵴,作为进一步发育的基础。次级上皮间质转化最重要的变化是三胚层细胞进一步形成具有定向分化能力的间叶细胞。例如:早期中胚层细胞会进一步迁移分化为体轴、轴旁、间介和侧板中胚层;另一部分细胞则通过间质上皮转化过程,压缩为上皮样组织,形成脊索、体节、泌尿生殖系前体和体壁/脏壁中胚层结构。

三级上皮间质转化是组织器官的精细分化。最典型的例子是心血管发育,需要经历 3 轮连续的上皮间质转化和 MET 转换。首先,生心中胚层细胞来自于原肠运动的 EMT 过程。原肠运动产生中胚层,继而形成侧板中胚层,侧板中胚层中预定发育为心血管的区域称为生心区。其次,生心区产生围心腔及生心板,生心板内出现腔隙形成原始心管,心肌前体细胞经过一个 MET 过程组装为一个两层上皮结构的心管结构,由肌细胞包绕内皮细胞,存在 β -联蛋白的基底侧表达、aPKC 的顶端表达以及 N-钙黏着蛋白的片状表达^[12],上皮化不久后便可检测到电活性。最后,原始心管的生心上皮层细胞进一步通过 EMT 分裂产生连续多层的间质样生心细胞。此外,房室隔的形成来源于内皮细胞 EMT 过程,内膜细胞转化为间充质细胞并侵入到心胶质,这些移行的细胞随后增殖形成心内膜垫,在往后的发育过程中,心内膜垫经重塑发生形态改变,在心血管房室管将发育成二尖瓣和三尖瓣,在心室流出道处发育成主动脉瓣和肺动脉瓣。而其它轴中胚层细胞则通过 MET 参与流出道和右心室的形成,阻断 MET 将引起 DiGeorge 综合征相关的先天性心血管缺陷,此外,细胞表面的丝状伪足对流出道的发育非常重要^[13]。

典型的间质上皮转化事件例如肾小管上皮的发育。出生后肾原基中的间充质细胞在输尿管芽的分支处聚集,开始表达层粘连蛋白,细胞极化,构建细胞连接,最后经过间质上皮转化组装成肾小管。输尿管芽表达 Wnt9b, Wnt9b 可以稳定 β -联蛋白,抑制转录因子 Six2 和 Cbp/p300 相互作用反式激活因子,诱导间质上皮转化^[14]。此外,PCP、Notch、Rho/ROCK 和 MAPK/ERK 等信号通路发挥重要的调控作用^[15]。

4 E-钙黏着蛋白与干细胞自我更新

E-钙黏着蛋白参与了 ES 细胞、肠道干细胞和神经干细胞的自我更新和微环境的构建^[16, 17]。E-钙黏着蛋白调控干性基因表达和 Wnt、Notch 和白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)等相关通路。研究显示,E-钙黏着蛋白通过 Stat3 和 β -联蛋白,调控 *Nanog*、*Klf4* 等干性基因转录;但是在 E-钙黏着蛋白敲除的 ES 细胞中,N-钙黏着蛋白上调,能部分弥补对干细胞自我更新造成的影响^[18]。E-钙黏着蛋白功能障碍的 ES 细胞 LIF 受体减少,pStat3 水平降低,干性基因表达下调^[19]。在果蝇中,敲除 E-钙黏着蛋白,影响 Notch 信号通路的活化^[16]。E-钙黏着蛋白- α -联蛋白融合基因的强制表达,能有效挽救 β -联蛋白基因缺陷造成的细胞粘附和自我更新障碍。这表明, β -联蛋白参与 E-钙黏着蛋白介导的细胞粘附,不依赖于经典 Wnt/ β -catenin 通路,即可参与维持干细胞自我更新状态^[19]。此外,在体外 ES 细胞培养过程中,酶消化会导致 E-钙黏着蛋白出现不可修复的损伤,从而导致细胞凋亡;E-钙黏着蛋白保护性小分子可以提高 ES 在消化后和拟胚体阶段的存活率^[20]。

另一方面,E-钙黏着蛋白在 ES 细胞中也存在动态平衡,维持自我更新和分化之间的相互拮抗。ES 细胞呈现克隆样生长,内部细胞主要表达 E-钙黏着蛋白,呈现上皮形态,克隆边缘更多的展现的是间质细胞的形态和分子特征,具有 E-钙黏着蛋白向 N-钙黏着蛋白的表达转换,伴随有 Snail、波形蛋白、金属蛋白酶的表达。同时,这些间质样细胞保持未分化状态和多向分化潜能,表达 *Oct4* 和 *Nanog* 等干性基因^[21, 22]。在 ES 细胞从囊胚内细胞团中分离并建系的过程中,抑制 EMT,有助于建立干细胞自我更新。研究显示,短时间的 Wnt/ β -catenin 通路活化有利于 E-钙黏着蛋白表达,进而通过 E-钙黏着蛋白介导的 PI3K/Akt 通路促进 ES 细胞自我更新;而长

时间的 Wnt/ β -catenin 通路活化,上调 Snail2 的表达,促进细胞分化^[23]。

5 上皮间质转化与细胞分化

5.1 EMT 与早期分化

鼠、恒河猴和人 ES 细胞自发分化或者形成拟胚体进行早期分化过程中会出现 EMT,有以下特征:(1) 细胞表达由 E-钙黏着蛋白转向 N-钙黏着蛋白,(2) 波形蛋白表达增加,(3) Snail、Slug 和 TCF3 表达上调,(4) 明胶酶表达增加,细胞运动能力增强^[21, 22, 24]。

目前已知,Wnt、TGF β 、Activin、BMP、FGF、维甲酸等信号参与原肠运动和三胚层形成阶段的 EMT。Wnt 信号是诱导原肠运动和原条前后轴建立的主要信号,也能在体外促进 ES 细胞形成的拟胚体中建立原条样结构;在体外拟胚体培养中,Wnt 活化可能来自于血清中 BMP4 和 ActivinA 的起始诱导,以及自身的正反馈强化;外源性 Wnt3a 诱导促进 EMT 和中内胚层分化,而 Wnt 通路抑制剂 Dkk1,抑制 EMT,促进神经外胚层分化^[25]。在 ES 早期分化中,经典 Wnt 信号的爆发性活化,介导了 Snail1/2 和 Twist1/2(而非 Zeb1/2)的上调^[26]。除经典 Wnt 通路外,非经典 Wnt 通路的 Wnt5a 也能促进 ES 细胞发生 EMT,以依赖 PKC 激酶活化的方式促进细胞向中胚层分化,Wnt5a 主要激活 Twist 和 Zeb1/2^[27]。Mesp1 是一个中胚层标志基因,研究发现,Mesp1 在 Wnt 通路抑制的条件下,足以激活 Snail1 和 Twist 表达^[28]。Notch 通路也参与了 ES 细胞的早期分化和 EMT 过程,通过 DAPT 抑制 Notch 通路,显著抑制了原条中间细胞和中胚层的分化,促进了神经外胚层的分化^[29]。TGF β 似乎以钙调磷酸酶和钙网蛋白依赖的方式促进 ES 细胞早期中胚层分化,说明钙离子信号通路在 EMT 调节中发挥重要作用^[30]。除以上信号途径外,维甲酸信号能通过其核受体转录因子 RAR γ 和 RXR α 结合于启动子,直接诱导 Snail1 表达^[31]。FGF2 信号能激活 PKC 激酶通路,诱导转录因子 Egr-1,Egr-1 也能直接结合于 Snail1 启动子,启动 Snail 表达以及上皮间质转化^[32]。

多项研究指出,Snail2 与中胚层和神经嵴诱导的关系更为紧密。在一项基于 Activin A、BMP4、VEGF 和 FGF2 诱导的中胚层分化模型中,Snail2 表达显著上调^[33]。有报道指出,Snail2 是 BMP4 的直接下游基因,BMP4 通路下游 Smad1/5/8 转录因子能直接结合于 Snail2 基因启动子,促进其表达,从而

影响 ES 细胞向中胚层分化^[34]。在 NF- κ B 和 Snail2 之间,也存在一个相互促进的调控网络^[35]。此外,miR-124a 是一个在 ES 细胞中高表达的 microRNA,靶向抑制 Snail2 表达。因此,抑制性 miR-124a 在拟胚体分化阶段表达下调,也是 Snail2 在分化启动后获得高表达的原因之一^[36]。Snail1 同样参与 ES 细胞早期分化。有研究显示,Snail1 抑制干性基因 *Nanog*、*c-Kit* 表达^[37]。但另一研究显示,敲除 *Snail1* 并不影响 ES 细胞中的干性基因表达、细胞增殖和凋亡。*Snail1* 敲除使得拟胚体诱导过程中的 E-钙黏着蛋白和干性基因不能完全清除,抑制中胚层和内胚层的分化,促进神经外胚层基因的表达;*Snail1* 在中胚层分化后的敲除,却有利于心肌分化^[26]。在 BMP4 和 B27 等诱导下,ES 细胞也能分化为神经嵴样的细胞,高表达 Snail1 和 Sox9^[38]。Snail 与 miR-200 家族有相互拮抗作用。Snail 能够促进中胚层分化,可能与其对 miR-200 的抑制相关^[39]。相对而言,Zeb2 偏向于调控向神经外胚层的分化,对抗中内胚层分化,Activin-Nodal 信号诱导其表达;其基因敲除后,细胞停留于上胚层阶段,细胞 DNA 甲基化状态有较大的改变^[40, 41]。

5.2 EMT 与晚期分化

对于心肌、内皮、脂肪、造血等中胚层来源细胞的体外分化,上皮间质转化是一个必需的分化阶段。在脂肪分化中,BMP4 可以启动 EMT^[42]。内皮和造血细胞来源于同一中胚层细胞,但造血干细胞有很强的游走迁移能力,与其高表达 *Zeb2* 等基因相关;*Zeb2* 基因敲除的造血干细胞分化受损,黏附能力增强,血管周细胞构建血管的能力受损,容易造成大出血甚至死亡^[43]。此外,造血干细胞也高表达 Twist,调节细胞自我更新,但在终末分化中表达降低^[44]。有研究发现,*Zeb1* 抑制内皮细胞特征性基因表达,而 miRNA-200c 或-150 靶向拮抗 *Zeb1*,从而发挥促进内皮分化的作用^[45]。Snail1 也有类似的作用,通过抑制 miRNA-200,促进内皮分化^[46]。ES 细胞能经血管内皮细胞向周细胞分化。在此过程中,TGF β 2 触发了内皮间质化,Snail 上调^[47]。膜蛋白 EMP2,与上皮间质转化和心肌分化有关,其基因敲除影响 Snail1/2 比例^[48]。心外膜细胞可通过 EMT 产生心血管前体细胞,具有分化为冠脉平滑肌、内皮、成纤维和心肌细胞的能力。*Wt1* 基因和 MRTF 家族转录因子在此过程中发挥重要作用。研究进一步显示,*Wt1* 抑制上皮表型,直接调控 Snail1, MRTF 负责迁移相关基因的表达^[49, 50]。

对于内胚层来源细胞的分化研究发现,体外向肝的细胞分化的过程中,ES 细胞需要经历连续的上皮间质转化和 MET。Activin A 首先诱导 ES 细胞进入定形内胚层的中间态,随后前肠形成肝芽。在此过程中,有 TGF β 和 Snail1 介导的 EMT 参与;再由间质细胞的中间态发生 MET,向肝细胞分化^[51]。

神经元来自于外胚层。但也有研究显示,当 ES 细胞发育到神经前体细胞时,Zeb1 表达显著增高;Zeb1 基因敲除干扰了神经前体细胞向神经元细胞的分化,但不影响 ES 向神经前体细胞分化^[52]。另一项研究显示,在神经细胞分化中存在一个 lncRNA-1604/miR-200c/Zeb 调控轴^[53]。

6 上皮间质转化与体细胞重编程

iPSCs 是由成纤维细胞外源导入 *c-myc*、*KLF4*、*Oct4*、*Sox2* (OSKM 因子) 等重编程因子而获得。因此,体细胞重编程是 MET 过程。在此过程中,可观察到包括细胞形态、细胞代谢、细胞基因表达谱系及表观遗传等方面的改变,细胞获得 E-钙黏着蛋白表达,同时波形蛋白表达沉默^[54]。在 B 细胞^[55]、造血干细胞^[56]、精原干细胞^[57] 等的重编程中也存在 MET。OSKM 四因子导入成纤维细胞后,会引发 1 个 EMT 相关的 microRNA-155、microRNA-10b 表达快速下调,microRNA-205 和-429 上调。研究发现,Sox2/Oct4 协同抑制 Snail 表达,c-Myc 抑制 TGF β 1 及其受体表达,而 Klf4 负责激活 E-钙黏着蛋白等多个上皮基因^[58]。有研究显示,E-钙黏着蛋白能够替代 Oct4,与其他 OSKM 因子协同诱导体细胞重编程^[59]。尽管 iPSC 的产生是一个 MET 过程,但是,Snail1 过表达似乎有利于体细胞重编程,其效应可能与对 let-7 microRNA 的抑制相关^[14]。有趣的是,TGF β 短时间处理有利于重编程,但是一个 12 d 的 TGF β 处理封闭了重编程,提示重编程介导的去分化过程可能是一个早期上皮间质转化-晚期持续 MET 的时序性事件^[60]。

重编程相关的 MET 过程涉及大量的 DNA 甲基化、组蛋白修饰、miRNA 等表观遗传改变。例如,BMP/Smad1 通路在体细胞重编程早期参与启动 MET,上调 miR-205 和 miR-200 家族^[61]。DNA 去甲基化酶 Tet1/2/3 敲除小鼠由于 DNA 甲基化被干扰,完全丧失重编程能力^[62];相反,组蛋白 H3K36 去甲基化酶 Kdm2a/2b 通过促进早期 MET 而提高重编程效率^[63]。此外,阻断 H3K79 甲基转移酶 DOT1L 可下调间充质基因表达并提高重编程效

率^[64]。在一个成纤维细胞重编程研究中,在细胞聚集成球的条件下,细胞间的黏接信号诱导 MET,Zeb1 表达下调和缺氧协同诱导 DNA 去甲基化酶 Aid/Aicda 表达,导致 *Oct4* 基因启动子去甲基化而活化,Oct4 进而启动 DNA 甲基化酶 Dnmt1 表达,实现细胞分化状态的改变。

7 问题与展望

上皮间质转化和间质上皮转化在胚胎发育和干细胞自我更新及分化中有着重要的作用,通过细胞类型转换,调控细胞分化和组织结构的形成。EMT 和 MET 在胚胎发育早期影响细胞自我更新和三胚层分化;在晚期发育中,EMT 和 MET 精细调控细胞定向分化、雕琢组织和器官的空间构型。通过对发育相关 EMT 和 MET 的研究,有助于改善体外诱导干细胞的定向分化,并探究功能性组织、类器官的诱导。同时,对胚胎发育期 EMT 和 MET 的扰动,可能会造成胚胎发育停滞或组织器官发育畸形。例如肾的发育中 MET 极为重要,对其上皮化的干扰将引起多囊肾等发育缺陷。因此,对发育相关 EMT 和 MET 的研究,也有助于探究某些胚胎发育障碍及先天性出生缺陷的致病原因。

参考文献 (References)

- [1] Hernandez-Martinez R, Ramkumar N, Anderson KV. p120-catenin regulates WNT signaling and EMT in the mouse embryo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, **116**(34): 16872-16881
- [2] Lee M, Ji H, Furuta Y, et al. p120-catenin regulates REST and CoREST, and modulates mouse embryonic stem cell differentiation [J]. J Cell Sci, 2014, **127**(Pt 18): 4037-4051
- [3] Pannekoek WJ, de Rooij J, Gloerich M. Force transduction by cadherin adhesions in morphogenesis [J]. F1000Res, 2019, **8**: F1000 Faculty Rev-1044
- [4] Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, et al. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments [J]. Trends Cell Biol, 2005, **15**(11): 608-617
- [5] Gouignard N, Andrieu C, Theveneau E. Neural crest delamination and migration: Looking forward to the next 150 years [J]. Genesis, 2018, **56**(6-7): e23107
- [6] Aclouque H, Ocana OH, Matheu A, et al. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation [J]. Dev Cell, 2011, **21**(3): 546-558
- [7] Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, et al. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity [J]. Science, 2005, **307**(5715): 1603-1609
- [8] Zhang J, Tian XJ, Xing J. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF-beta, SHH, and WNT and Their Crosstalks [J]. J Clin Med, 2016, **5**(4): 41
- [9] Nawshad A, Hay ED. TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development [J]. J Cell Biol, 2003, **163**(6): 1291-1301
- [10] Chen T, You Y, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis [J]. J Cell Physiol, 2017,

- 232**(12): 3261-3272
- [11] Kim DH, Xing T, Yang Z, *et al.* Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview [J]. *J Clin Med*, 2017, **7** (1): 1
- [12] Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field; from mesoderm to heart tube [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, **23**: 45-68
- [13] Francou A, Saint-Michel E, Mesbah K, *et al.* TBX1 regulates epithelial polarity and dynamic basal filopodia in the second heart field [J]. *Development*, 2014, **141**(22): 4320-4331
- [14] Unternaehrer JJ, Zhao R, Kim K, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition factor SNAIL paradoxically enhances reprogramming [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, **3**(5): 691-698
- [15] Kim HY, Jackson TR, Davidson LA. On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, **67**: 113-122
- [16] Maeda K, Takemura M, Umemori M, *et al.* E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut [J]. *Genes Cells*, 2008, **13**(12): 1219-1227
- [17] Karpowicz P, Willaime-Morawek S, Balenci L, *et al.* E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal [J]. *J Neurosci*, 2009, **29** (12): 3885-3896
- [18] Hawkins K, Mohamet L, Ritson S, *et al.* E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation [J]. *Stem Cells*, 2012, **30**(9): 1842-1851
- [19] del Valle I, Rudloff S, Carles A, *et al.* E-cadherin is required for the proper activation of the Lifr/Gp130 signaling pathway in mouse embryonic stem cells [J]. *Development*, 2013, **140**(8): 1684-1692
- [20] Xu Y, Zhu X, Hahm HS, *et al.* Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(18): 8129-8134
- [21] Ullmann U, In 't Veld P, Gilles C, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions [J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, **13**(1): 21-32
- [22] Eastham AM, Spencer H, Soncin F, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation [J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(23): 11254-11262
- [23] Huang TS, Li L, Moalim-Nour L, *et al.* A Regulatory Network Involving beta-Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling [J]. *Stem Cells*, 2015, **33**(5): 1419-1433
- [24] Behr R, Heneweck C, Viebahn C, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in colonies of rhesus monkey embryonic stem cells; a model for processes involved in gastrulation [J]. *Stem Cells*, 2005, **23**(6): 805-816
- [25] ten Berge D, Koole W, Fuerer C, *et al.* Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 508-518
- [26] Lin Y, Li XY, Willis AL, *et al.* Snail1-dependent control of embryonic stem cell pluripotency and lineage commitment [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3070
- [27] Yu CY, Kuo HC. The Trans-Spliced Long Noncoding RNA tsRMST Impedes Human Embryonic Stem Cell Differentiation Through WNT5A-Mediated Inhibition of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition [J]. *Stem Cells*, 2016, **34**(8): 2052-2062
- [28] Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, *et al.* Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(1): 55-68
- [29] Hughes JN, Dodge N, Rathjen PD, *et al.* A novel role for gamma-secretase in the formation of primitive streak-like intermediates from ES cells in culture [J]. *Stem Cells*, 2009, **27** (12): 2941-2951
- [30] Karimzadeh F, Opas M. Calreticulin Is Required for TGF-beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Cardiogenesis in Mouse Embryonic Stem Cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, **8**(5): 1299-1311
- [31] Galvagni F, Lentucci C, Neri F, *et al.* Snail promotes ESC exit from the pluripotency by direct repression of self-renewal genes [J]. *Stem Cells*, 2015, **33**(3): 742-750
- [32] Kinehara M, Kawamura S, Mimura S, *et al.* Protein kinase C-induced early growth response protein-1 binding to SNAIL promoter in epithelial-mesenchymal transition of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, **23**(18): 2180-2189
- [33] Evseenko D, Zhu Y, Schenke-Layland K, *et al.* Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(31): 13742-13747
- [34] Richter A, Valdimarsdottir L, Hrafkelsdottir HE, *et al.* BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells via SLUG and MSX2 [J]. *Stem Cells*, 2014, **32**(3): 636-648
- [35] Zhang C, Carl TF, Trudeau ED, *et al.* An NF-kappaB and slug regulatory loop active in early vertebrate mesoderm [J]. *PLoS One*, 2006, **1**(1): e106
- [36] Lee MR, Kim JS, Kim KS. miR-124a is important for migratory cell fate transition during gastrulation of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2010, **28**(9): 1550-1559
- [37] Galvagni F, Neri F. Snail1 represses Nanog to promote embryonic stem cell differentiation [J]. *Genom Data*, 2015, **4**: 82-83
- [38] Carr-Wilkinson J, Prathalingam N, Pal D, *et al.* Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Sympathetic Neurons: A Potential Model for Understanding Neuroblastoma Pathogenesis [J]. *Stem Cells Int*, 2018, **2018**: 4391641
- [39] Gill JG, Langer EM, Lindsley RC, *et al.* Snail and the microRNA-200 family act in opposition to regulate epithelial-to-mesenchymal transition and germ layer fate restriction in differentiating ESCs [J]. *Stem Cells*, 2011, **29**(5): 764-776
- [40] Stryjewska A, Dries R, Pieters T, *et al.* Zeb2 Regulates Cell Fate at the Exit from Epiblast State in Mouse Embryonic Stem Cells [J]. *Stem Cells*, 2017, **35**(3): 611-625
- [41] Chng Z, Teo A, Pedersen RA, *et al.* SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, **6**(1): 59-70
- [42] Huang HY, Chen SZ, Zhang WT, *et al.* Induction of EMT-like response by BMP4 via up-regulation of lysyl oxidase is required for adipocyte lineage commitment [J]. *Stem Cell Res*, 2013, **10** (3): 278-287
- [43] Goossens S, Janzen V, Bartunkova S, *et al.* The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization [J]. *Blood*, 2011, **117**(21): 5620-5630
- [44] Dong CY, Liu XY, Wang N, *et al.* Twist-1, a novel regulator of hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid lineage development [J]. *Stem Cells*, 2014, **32**(12): 3173-3182
- [45] Luo Z, Wen G, Wang G, *et al.* MicroRNA-200c and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1 [J]. *Stem Cells*, 2013, **31**(9): 1749-1762
- [46] Gill JG, Langer EM, Lindsley RC, *et al.* Snail promotes the cell-autonomous generation of Flk1(+) endothelial cells through the repression of the microRNA-200 family [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, **21**(2): 167-176
- [47] Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, *et al.* Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2008, **121**(Pt 20): 3317-3324
- [48] Liu Y, Dakou E, Meng Y, *et al.* Loss of Emp2 compromises cardiogenic differentiation in mouse embryonic stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, **511**(1): 173-178

- [49] Trembley MA, Velasquez LS, de Mesy Bentley KL, *et al.* Myocardium-related transcription factors control the motility of epicardium-derived cells and the maturation of coronary vessels [J]. *Development*, 2015, **142**(1): 21-30
- [50] Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, *et al.* Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin [J]. *Nat Genet*, 2010, **42**(1): 89-93
- [51] Li Q, Hutchins AP, Chen Y, *et al.* A sequential EMT-MET mechanism drives the differentiation of human embryonic stem cells towards hepatocytes [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15166
- [52] Jiang Y, Yan L, Xia L, *et al.* Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) is required for neural differentiation of human embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2018, **293**(50): 19317-19329
- [53] Weng R, Lu C, Liu X, *et al.* Long Noncoding RNA-1604 Orchestrates Neural Differentiation through the miR-200c/ZEB Axis [J]. *Stem Cells*, 2018, **36**(3): 325-336
- [54] Hoffding MK, Hyttel P. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res*, 2015, **14**(1): 39-53
- [55] Di Stefano B, Sardina JL, van Oevelen C, *et al.* C/EBPalpha poises B cells for rapid reprogramming into induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2014, **506**(7487): 235-239
- [56] Gao S, Tao L, Hou X, *et al.* Genome-wide gene expression analyses reveal unique cellular characteristics related to the amenability of HPC/HSCs into high-quality induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, **7**: 40
- [57] An J, Zheng Y, Dann CT. Mesenchymal to Epithelial Transition Mediated by CDH1 Promotes Spontaneous Reprogramming of Male Germline Stem Cells to Pluripotency [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, **8**(2): 446-459
- [58] Li R, Liang J, Ni S, *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 51-63
- [59] Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, *et al.* E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming [J]. *EMBO Rep*, 2011, **12**(7): 720-726
- [60] Liu X, Sun H, Qi J, *et al.* Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT-MET mechanism for optimal reprogramming [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, **15**(7): 829-838
- [61] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 64-77
- [62] Hu X, Zhang L, Mao SQ, *et al.* Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, **14**(4): 512-522
- [63] Wang T, Chen K, Zeng X, *et al.* The histone demethylases Jhdmla/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, **9**(6): 575-587
- [64] Onder TT, Kara N, Cherry A, *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming [J]. *Nature*, 2012, **483**(7391): 598-602