

Tbx18 通过下调 EMT 信号分子 参与调控心脏发育 *

张 进^{1, 2)} 余 强^{1)**} 范 洁²⁾ 魏飞宇²⁾

(¹⁾ 重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 重庆 400010; ²⁾ 云南省第一人民医院心血管内科, 昆明 650032)

摘要 转录因子 Tbx18(Tbx18)在小鼠胚胎心外膜上皮细胞表达并调控心外膜上皮细胞向心系细胞分化。上皮间充质转化(EMT)过程是器官发育和形成的重要机制。为阐述 Tbx18 通过调控下游 EMT 关键信号分子参与心外膜上皮细胞分化和心脏发育, 本研究运用 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 双杂合基因敲入小鼠和免疫荧光共聚焦, 证实 Tbx18⁺ 心系细胞和 EMT 关键信号分子 Snail1、Smad、Slug、Twist 在发育后期胚鼠心外膜和心外膜下间充质发生共聚焦。同时还发现, Tbx18 在胚鼠不同发育阶段的表达模式和 Tbx18⁺ 心系细胞内上述 EMT 关键信号分子的表达模式相似。Tbx18 和 EMT 关键信号分子在发育心脏存在相似的时空表达模式, 因此, 它们之间可能存在相互调控作用。运用 Tbx18 突变技术揭示了 Tbx18 突变型胚鼠心脏 EMT 关键信号分子表达水平较野生型显著下调, 直接证实了上述 4 个 EMT 信号分子是 Tbx18 的可能靶点。理解 Tbx18 参与心脏发育的下游靶点有助于改善成年心脏损伤后的再生修复。

关键词 转录因子 Tbx18, 上皮间充质转化(EMT), 心外膜细胞, 心脏发育

学科分类号 R394.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0296

上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是指在某些特殊的生理条件下, 上皮细胞失去极性和黏附性获得迁移和运动能力并向间质细胞表型转化的现象^[1]。EMT 过程是器官发育和形成的重要机制^[2]。Tbx18 是近年来新发现的参与心脏发育的一个重要基因^[3]。既往研究表明, Tbx18 来源的心外膜祖细胞是心脏发育过程中第一、第二生心区的重要补充^[4], Tbx18 基因敲除小鼠表现为窦房结头部严重缺失^[5-6]。由此可见, Tbx18 基因在调控心脏发育中扮演重要角色。Cai 等^[7]运用 Tbx18:Cre/Rosa26R^{lacZ} 双转基因胚鼠证实, Tbx18⁺ 心外膜上皮细胞经历 EMT 过程侵入心外膜下组织并转化为间充质细胞, 这些间充质细胞最终分化为心系细胞并对心脏发育产生重要贡献。我们既往的研究也证实了 EMT 过程是 Tbx18⁺ 心外膜上皮细胞参与了心脏发育的重要机制^[8], 但具体哪些 EMT 关键信号分子参与心脏发育, 目前尚未见报道。有研究发现, 在心脏发育过程中, Tbx18^[9-10]和 EMT 关键信号分子 Snail1、Smad、Slug、Twist 在

心外膜高表达^[11]。因此, 有理由推测, Tbx18 有可能通过调控这些信号分子参与心外膜上皮细胞的分化和心脏的发育。我们利用 Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP} 双转基因胚鼠和 Tbx18 基因突变胚鼠研究 Tbx18 及 EMT 关键信号分子时空表达规律及其相互关系。探索 Tbx18 调控心外膜上皮细胞形成心系细胞的可能靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

多聚 L- 赖氨酸氢溴酸盐 (P1524) 及 MgCl₂、EGTA、NP-40、胰蛋白酶、HEPES、NaCl、葡萄糖、MgSO₄ 等试剂购自 Sigma 公司; 细胞培养瓶、

* 国家自然科学基金(81270211, 81360039, 81260038)和云南省心律失常诊治研究中心研究基金(2014NS260, 2014NS259)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 023-63693752, E-mail: qshe98@hotmail.com

收稿日期: 2015-09-29, 接受日期: 2016-01-22

24 孔细胞培养板购自 Corning 公司; II 型胶原蛋白酶购自 Worthington(LS004176); 马血清为 HyClone 产品; 高糖 DMEM 培养基、M199 细胞培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和双抗为 Invitrogen 公司产品; GoTaq® Master Mix(M7122)、Wizard® 基因组纯化试剂盒(A1120)、组织 RNA 提取试剂盒(Roche, NO12033674001); SYBR Green I (Roche); 蛋白酶 K(V3021)购自 Promega 公司; 兔 Snail1 抗体(sc-28199)、兔 Slug 抗体(sc-15391), 兔 Smad 抗体(Smad1/5/8, sc-6031-R)、兔 Twist 抗体(sc-15393)均购自 Santa Cruz 公司(1:50); TRITC 标记抗兔 IgG(ZF-0316)为北京中杉公司生产。

1.2 Tbx18:Cre/R26R^{EYFP} 双转基因胚鼠和 Tbx18 基因突变胚鼠的建立和鉴定

Tbx18-Cre 基因敲入雄性小鼠(杂合状态)由美国加州大学 Evans 教授惠赠^[7], 在其杂合子状态下进行繁育(纯合子状态具有致死性)。条件性 Cre 报告系统小鼠 Rosa26-EYFP^[12] 可以杂合子状态或者纯合子状态与杂合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠交配(1:2), 22:00 交配, 次日 8:00 观察, 若见阴栓记胚龄 E0.5 天。杂合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠互交, 按照孟德尔遗传定理, 有 1/4 的机会得到 Tbx18 突变小鼠; 杂合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠和杂合子 Rosa26-EYFP 报告小鼠交配, 同样有 1/4 的机会得到 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 双转基因胚鼠。取少量胚胎组织提取基因组, 用 PCR 方法筛选 Tbx18-Cre 杂合子、Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 双转基因胚鼠和 Tbx18 基因突变胚鼠, 具体方法参考文献[7, 11]。

1.3 免疫荧光染色

Tbx18 基因突变和野生胚鼠、Tbx18:Cre/R26R^{EYFP} 双转基因胚鼠(E14.5、E15.5 及 E16.5)均用免疫荧光染色进行检测。胚胎或者组织在解剖后于 4%多聚甲醛 4℃ 固定 10~30 min, OCT 包埋, 冰冻切片(5~10 μm), 然后固定 5 min 减少内源性 YFP 的表达, 按常规方法进行免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜采集图像。

1.4 Western blot 蛋白质定量分析

Western-blot 蛋白质定量分析 Snail1、Slug、Smad、Twist 蛋白的表达。方法: 用组织裂解液裂解 Tbx18 突变和野生胚鼠心脏(E16.5), 提取总蛋白, 用考马斯亮蓝法进行定量, 调节蛋白质浓度后取上样蛋白经 SDS-PAGE 电泳转移至 PVDF 膜上,

脱脂奶粉封闭后加入一抗工作液(1:50), 加入二抗进行抗原抗体反应。用凝胶成像系统测定各条带积分灰度值。

1.5 流式细胞分选术

Tbx18:Cre/R26R^{EYFP} 双转基因胚鼠(分别取 E12.5、E14.5、E15.5 及出生后第一天)心脏分离后转移到 HBSS 溶液中, 洗净血液后剪成小的组织块, 组织块用 0.05% II 型胶原蛋白酶和 0.06%胰蛋白酶混合液在 37℃ 恒温振荡消化, 吸取上清, 胎牛血清终止反应, 离心搜集细胞, 重复消化 4~5 次, 直到组织全部消化完, 得到单个心肌细胞后用流式细胞分选仪 FACS (BD, 美国)分选纯化 EYFP⁺ 细胞, 具体方法参考文献[11]。

1.6 基因表达分析

用 RNA 提取试剂盒提取 Tbx18⁺ 心系细胞及野生型和突变胚鼠心脏(E11.5、E13.5、E16.5)总 RNA(按照厂家说明书进行)。对 RNA 样品进行浓度及纯度测定之后使用逆转试剂盒逆转录合成 cDNA, 接着采用 SYBR Green I 荧光染料法进行定量 PCR 反应, 用 $\Delta\Delta C_t$ 方法及管家基因 GAPDH 作为内参计算靶基因的相对表达水平。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的计量资料比较用 t 检验。 P 值小于 0.05 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 Tbx18⁺ 心系细胞和 EMT 关键信号分子在心外膜及心外膜下间充质共聚焦

将 E16.5 天 Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP} 双转基因心脏进行冰冻切片, 由于 Cre 重组酶可特异性激活报告基因 EYFP, EYFP 真实地代表了 Tbx18⁺ 心系细胞。我们观察到发绿色荧光的 Tbx18⁺ 心系细胞出现在心外膜下间充质包括: 左右心室心房壁、室间隔、心脏房室瓣和冠状动脉, 这些结果和既往研究一致^[3]。接着将 Tbx18⁺ 心系细胞和 EMT 关键信号分子 Snail1、Slug、Smad 及 Twist 蛋白进行共聚焦。结果提示, Tbx18⁺ 心系细胞和 Snail1、Slug、Smad 及 Twist 在心外膜及心外膜下间充质共定位(图 1)。EMT 关键信号分子在这些部位的限制性表达, 间接提示其作为局部信号可能参与了 Tbx18⁺ 心外膜细胞 EMT 过程和心脏的发育, 但是否是 Tbx18 的下游靶点仍需要进一步验证。

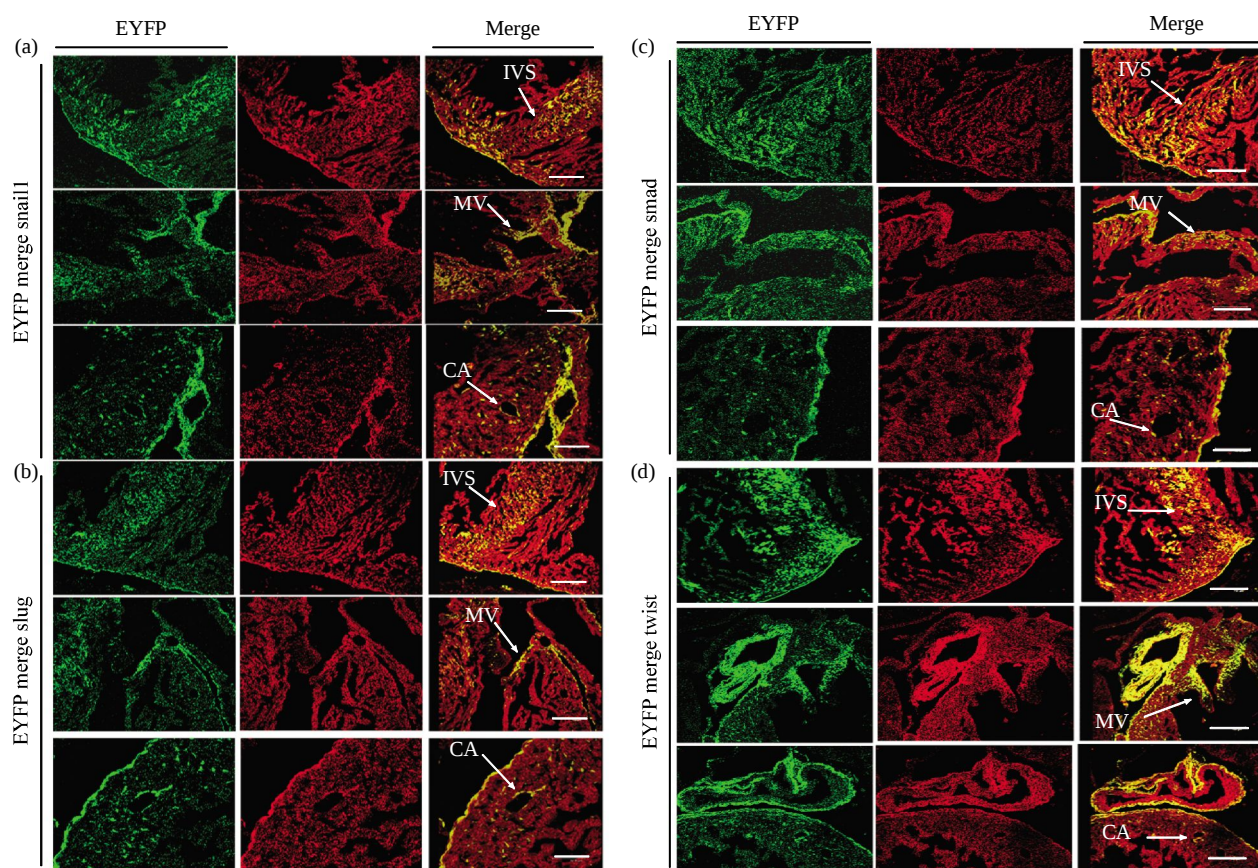


Fig. 1 Tbx18-expressing epicardial cells and their descendants (EYFP) co-localized with Snail1, Slug Smad and Twist (a~d) E16.5 Tbx18:Cre/ R26R^{EYFP} heart cryosections, EYFP efficiently labeled Tbx18-expressing epicardial cells and their descendants. An overlay of EYFP with Snail1(a), Slug(b), Smad(c) and Twist(d) in the interventricular septum (IVS), atrioventricular valves (MV, mitral valve) and coronary artery (CA) revealed that local signals (Snail1, Slug Smad and Twist) in these areas likely involved in the formation of myocardial lineage. The scale bars in all figures represent 150 μ m.

2.2 Tbx18⁺心系细胞内 (E12.5 天至出生后第 1 天) EMT 关键信号分子时间表达模式

用胶原酶分离不同发育时期(E12.5、E14.5、E15.5、E16.5 及出生后第 1 天)Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP} 双转基因心脏的单个心肌细胞,接着用 EYFP 激活的流式细胞分选术获得了发绿色荧光的 Tbx18⁺ 心系细胞(图 2a)。由于在 Tbx18:Cre/R26R^{EYFP} 双转基因小鼠中 Cre 重组酶可以特异性地激活 EYFP,所以 EYFP 可以真实地反映 Tbx18⁺ 心系细胞(心外膜祖细胞及其后代细胞)的时空表达情况。我们称这些 Tbx18⁺ 心系细胞为 EPI 细胞。用实时荧光定量 PCR 比较了这些 EMT 关键信号分子在不同发育时期心脏 EPI 细胞内的动态表达模式(图 2b~e)。结果发现: Snail1、Slug、Smad1、Twist 在 E12.5 尚处于较低水平,随着 Tbx18⁺ 心外膜细胞向心脏迁

移分化,其表达水平逐渐升高,在 E14.5 达到最高水平, E15.5 开始表达下降,在出生后第 1 天又降至较低水平,即表现为开口向下的抛物线表达模式。和这些转录因子相反, E-cadherin 在 E12.5 处于较高水平,之后开始下降,在 E15.5 降至最低水平。之后又开始升高,在出生后第 1 天达到较高水平,即表现为开口向上的抛物线表达模式(图 2f)。

有趣的是转录因子 Tbx18 的表达模式和上述 EMT 关键信号分子的表达模式十分相似(图 2g),即: 开口向下的抛物线表达模式。荧光定量 PCR 结果提示,上述 EMT 关键信号分子上调及 E-cadherin 下调的时间点和 Tbx18⁺ 心外膜细胞经历 EMT 并形成间充质细胞的时间点十分吻合^[7]。因此,间接证据提示上述 EMT 关键信号分子可能和 Tbx18 存在相互作用。

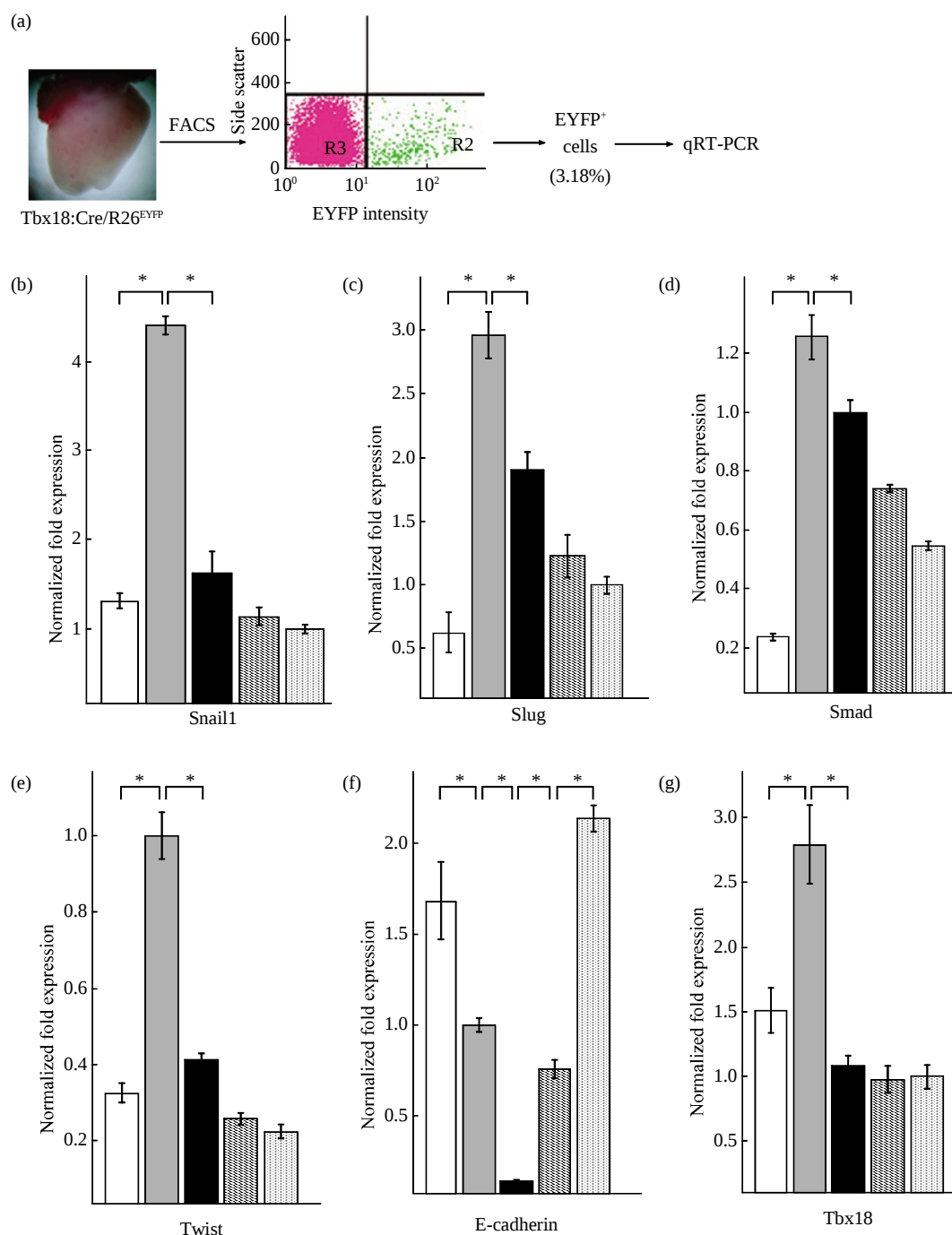


Fig. 2 Parabolic expression patterns of the major EMT biomarkers and Tbx18 from E12.5 to postnatal 1 day within FACS-sorted Tbx18 lineage cells by qRT-PCR

(a) Schematic showing the dissociation and FACS isolation of Tbx18 lineage cells from Tbx18:Cre/R26^{EYFP} hearts from E12.5 to postnatal day 1 for qRT-PCR analysis. (b~e, g) qRT-PCR analysis demonstrated enrichment for four transcriptional factors (Snail1, Slug, Smad, Twist1) and Tbx18 within Tbx18 lineage cells. The expressions of these factors and Tbx18 were significantly upregulated from E12.5~E14.5, while downregulated from E14.5~postnatal day1. (f) qRT-PCR analysis indicated downregulated expressions of E-cadherin from E12.5~E15.5, while continued upregulated from E15.5~postnatal day 1 and high levels being maintained on postnatal day 1. $n=3$. * $P < 0.05$. □: E12.5; ▤: E14.5; ■: E15.5; ▨: E16.5; ▩: Neol.

2.3 EMT 关键信号分子在 Tbx18 突变和野生胚鼠心脏的表达模式差异

利用荧光定量 PCR 我们比较了肌肉源性标志

物和非肌肉源性标志物在突变型胚鼠心脏和野生型胚鼠心脏的表达差异。这些标志物包括: cTnT (心肌)、Myh11 (冠状动脉血管平滑肌)、Postn、

Col1a、Ddr2、Mmp2、Vimentin(非肌肉源性标志物)和 Hcn4(窦房结). 结果显示, 和野生型胚鼠心脏相比, 上述标志物(cTnT 除外)在突变胚鼠心脏

表达显著减少(图 3). 提示 Tbx18 突变型胚鼠心外膜 EMT 过程和心脏发育受损.

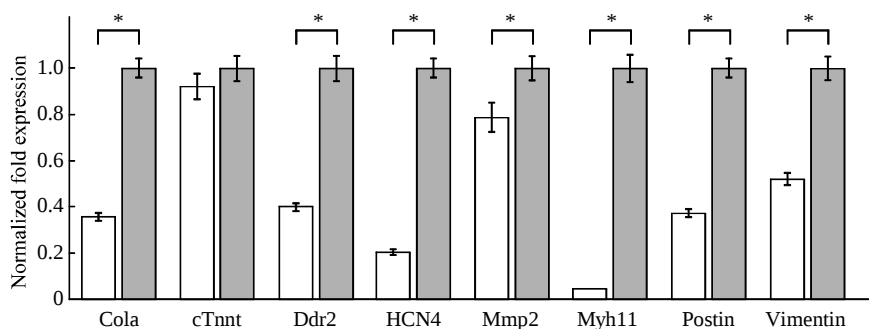


Fig. 3 Comparison of the mRNA levels of muscle derived markers and non-muscle derived markers between Tbx18 KO hearts and the wild-type hearts by qRT-PCR

□: KO; ■: WT. * $P < 0.05$.

为直接证实 Tbx18 通过哪些 EMT 关键信号分子参与了心脏的发育, 我们比较 EMT 关键信号分

子 Snail1、Slug、Smad1、Twist 及 E-cadherin 在 Tbx18 突变胚鼠心脏和野生型心脏的表达差异(图 4).

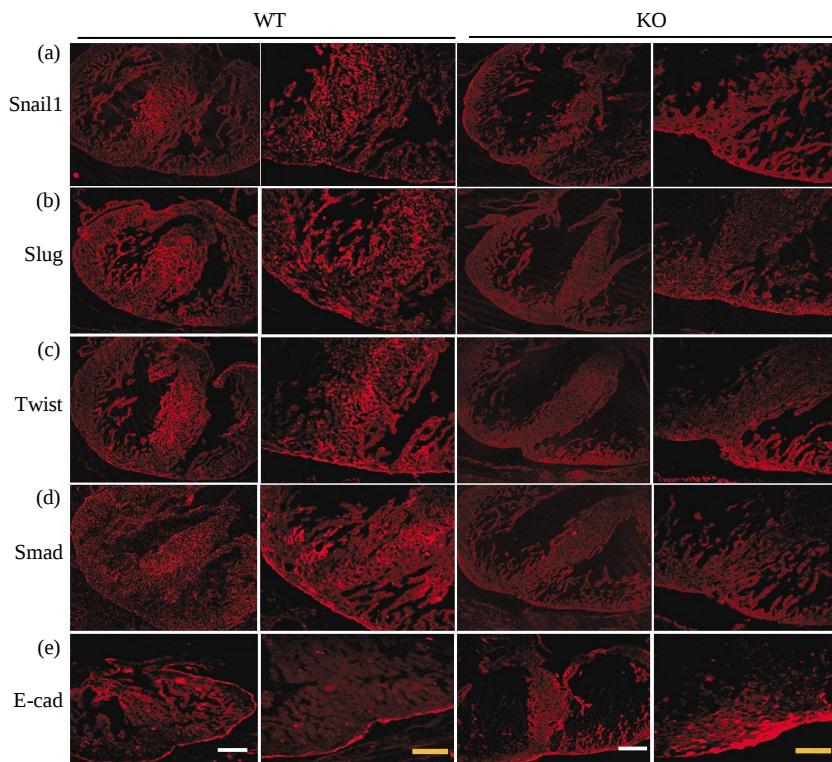


Fig. 4 Comparison of the protein levels of transcriptional factors Snail1, Slug, Smad and Twist at E16.5 between Tbx18 KO hearts and the wild-type hearts by immunohistochemistry

(a~e) Snail1 (a), Slug (b), Twist(c) and Smad (d) were markedly reduced and E-cadherin (e) was upregulated in the epicardium and subepicardial mesenchyme within the Tbx18 KO hearts compared with the wild-type hearts, revealing that Snail1, Slug, Smad, Twist and E-cadherin are direct or indirect downstream targets of Tbx18. The scale bars in low-magnification figures represent 300 μm (white scale bars) and those in high-magnification figures represent 150 μm (orange scale bars).

免疫荧光结果提示, 上述信号分子在 E16.5 天野生型心脏心外膜及心外膜下室间隔部位表达十分丰富. 和野生型心脏相比, Snail1、Slug、Smad1 和 Twist 在突变心脏心外膜及心外膜下室间隔表达均显著减少. E-cadherin 在 E16.5 天野生型心脏心外膜局限性表达, 而在突变心脏表达广泛, 包括心外膜及部分心外膜下. 荧光定量 PCR 分析提示(图 5a~c), 和野生型心脏相比, E11.5 天突变心脏 Snail1、Slug、Smad 和 Twist mRNA 表达显著减少, 但 E-cadherin mRNA 表达没有显著性差异. 为减少由于取材和发育阶段不同造成的试验误差, 我们研究

了更多发育阶段的突变心脏. 结果提示, 和野生型心脏相比, E13.5 和 E16.5 突变心脏 Snail1、Slug、Smad 和 Twist mRNA 表达显著减少, E-cadherin mRNA 表达明显增加, 且有显著性差异. Western blot 定量分析提示(图 5d), E16.5 天突变心脏 Snail1、Slug、Smad 和 Twist 蛋白表达较野生型心脏显著减少, E-cadherin 蛋白表达显著增加. 总之, Tbx18 突变导致 EMT 关键信号分子表达下调提供了 EMT 关键信号分子是 Tbx18 可能靶点的直接证据.

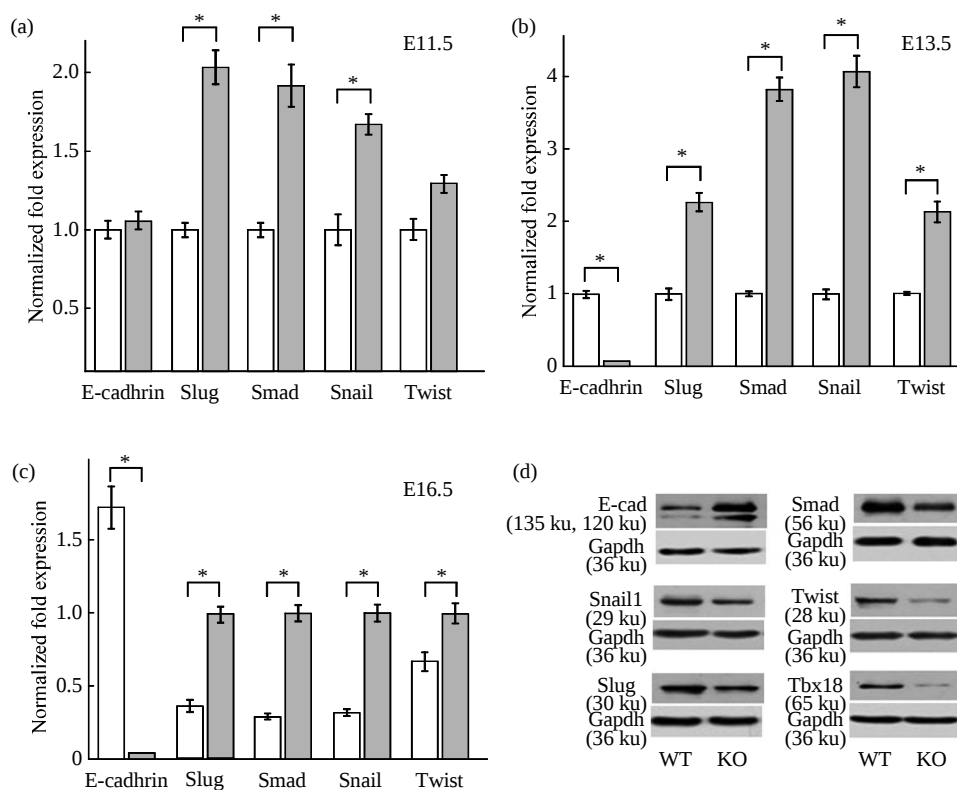


Fig. 5 Comparison of the mRNA and protein levels of the transcriptional factors Snail1, Slug, Smad, Twist and E-cadherin between Tbx18 KO hearts and the wild-type hearts by qRT-PCR and Western blot analysis

(a~c) qRT-PCR analysis indicated the mRNA levels of the transcriptional factors Snail1, Smad, Slug and Twist were significantly reduced in the Tbx18^{KO} hearts at E11.5, E13.5 and E16.5 compared with the wild-type hearts. However, E-cadherin expression was upregulated subsequent to the transcription factors (except E11.5). $n=3$. * $P < 0.05$. (d) Western blot analysis revealed the protein levels of the transcriptional factors were significantly reduced in the Tbx18^{KO} hearts at E16.5 compared with the wild-type hearts. However, E-cadherin expression was upregulated. Gapdh was used as a loading control. □: KO; ■: WT.

3 讨 论

本研究主要有三个重要发现: 首先, 我们阐述了 Tbx18⁺ 心系细胞内 EMT 关键信号分子的时空表

达模式, 间接提示 EMT 关键信号分子 Snail1、Slug、Smad、Twist 和 E-cadherin 可能参与了 Tbx18⁺ 心外膜细胞的 EMT 过程和心脏的发育. 其次发现 Tbx18 突变导致了胚鼠心脏 EMT 过程受

损. 再次, 揭示了上述信号分子表达水平在 Tbx18 突变心脏较野生心脏显著减少, 而 E-cadherin 显著升高, 直接证实了上述 EMT 关键信号分子可能是 Tbx18 的靶点并参与了心脏的发育.

利用 Tbx18:Cre/Rosa26^{EYFP} 双转基因模型标记和跟踪 Tbx18⁺ 心系细胞, 我们发现, Tbx18⁺ 心系细胞和这些 EMT 关键信号分子 Snail1、Slug、Smad 和 Twist 在心外膜间充质发生共聚焦(即空间表达模式相似). 同时还发现: 从 E12.5~E15.5 天, Tbx18⁺ 心系细胞内上述 EMT 关键信号分子和 Tbx18 逐渐升高, 之后逐渐下降, 都呈现出相似的抛物线表达模式(即时间表达模式相似). 有趣的是, Cai 等^[7]发现 Tbx18⁺ 心外膜祖细胞经历 EMT 开始迁移的时间点刚好在上述转录因子开始升高的 E12.5 天. Tbx18 基因及上述转录因子表达水平升降的时间点与 Tbx18 心外膜祖细胞开始迁移时间点十分一致. Tbx18 和这些 EMT 关键信号分子相似的时空表达模式提供了它们之间可能存在相互作用的间接证据.

既往研究发现, Snail1、Slug 和 Twist 及其对 E-cadherin 的抑制效应参与了其他上皮细胞的间充质转化^[2, 13]. 有研究发现, 在 Wt1 突变体小鼠心外膜, 减少的 Snail1、Slug 及升高的 E-cadherin 导致了损害的心外膜 EMT 和心脏发育缺陷^[14]. 由于 Tbx18^[7, 15-16]和 Wt1^[14]这两个转录因子在心脏发育中的作用十分相似, 都在心外膜表达且促进上皮细胞的分化、迁移及心脏发育. Wt1 调控下游 EMT 关键信号分子的研究结果启示: Snail1、Slug、Smad、Twist 及 E-cadherin 也有可能是 Tbx18 的候选下游靶分子. 我们用 Tbx18 基因突变模型来寻找其可能靶点, 结果提示, 上述 EMT 关键信号分子及肌肉源性、非肌肉源性标志物表达水平在 Tbx18 基因突变胚鼠均显著减少, 这些结果作为直接证据提示上述 EMT 关键信号分子作为 Tbx18 可能靶点并参与了心外膜 EMT 过程和心脏发育. 既往动物整体水平研究发现, 很多基因, 包括 Cx40、Cx43、Gata4、Gata6、Raldh2、Bmp4 和 Tbx5 均不是 Tbx18 的下游靶点^[17]. 我们的研究首次阐述了小鼠心脏发育过程中 Tbx18 基因的直接分子靶点.

我们的研究阐述了 Tbx18 通过调控 EMT 关键信号分子 Snail1、Slug、Smad、Twist 和 E-cadherin 参与了心脏的发育. Lepilina 等^[18]发现, 斑马鱼心脏发生损伤时, 心外膜胚胎基因 Tbx18 可再次激活并迁移到损伤部位, Tbx18 基因通过调节血管的

生成完全修复了损伤的心脏而不遗留疤痕, 这种神奇的修复能力与胚胎基因 Tbx18 向心脏损伤部位的迁移分化密切相关. 有研究发现, 在小鼠心脏损伤部位有心外膜胚胎基因 Tbx18 和 Wt1 的再激活. 激活的心外膜胚胎基因 Tbx18 和 Wt1 诱导心外膜细胞经历上皮间充质转化生成新生血管而参与了损伤修复反应^[19]. 研究胚胎时期 Tbx18 参与心脏发育的可能靶点对成年心脏损伤修复具有重要启发意义.

参 考 文 献

- [1] Acloque H, Adams M S, Fishwick K, *et al.* Eithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, **119** (6): 1438-1449
- [2] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, **139** (5): 871-890
- [3] Hoogaars W M H, Barnett P, Moorman A F M, *et al.* T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64** (6): 646-660
- [4] Chien K R, Domian I J, Parker K K. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*, 2008, **322** (5): 1494-1497
- [5] 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. *Circ Res*, 2006, **98** (12): 1555-1563
- [6] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res*, 2009, **104** (3): 388-397
- [7] Cai C L, Martin J C, Sun Y, *et al.* A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*, 2008, **454** (7200): 104-108
- [8] 张 进, 蒲 荻, 高二志, 等. 基因谱系示踪技术揭示小鼠 Tbx18⁺ 心脏祖细胞向心系细胞分化的潜能. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38** (2): 127-133
Zhang J, Pu D, Gao E Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38** (2): 127-133
- [9] Haenig B, Kispert A. Analysis of TBX18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol*, 2004, **214** (8): 407-411
- [10] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev*, 2001, **100** (1): 83-86
- [11] 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. *Developmental Biology*, 2010, **338** (2): 251-261
- [12] Srinivas S, Watanabe T, Lin C S, *et al.* Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*, 2001, **1**: 4
- [13] Mani S A, Guo W J, Liao M J, *et al.* The epithelial-mesenchymal

- transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, **133**(4): 704–715
- [14] Martínez-Estrada¹ O M, Lettice¹ L A, Essafi¹ A, *et al.* Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nature Genetics*, 2010, **42**(1): 489–493
- [15] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev*, 2001, **100**(1): 83–86
- [16] Haenig B, Kispert A. Analysis of TBX18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol*, 2004, **214**(8): 407–411
- [17] 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. *Circ Res*, 2006, **98** (12): 1555–1563
- [18] Lepilina A, Coon A N, Kikuchi K, *et al.* A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 2006, **127**(3): 607–619
- [19] Zhou B, Honor L B, He H, *et al.* Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest*, 2011, **121**(5): 1894–1904

The Transcription Factor Tbx18 Control Major Epithelial-to-mesenchymal Transition-associated Signaling Molecules in Mouse Heart Development*

ZHANG Jin^{1,2)}, SHE Qiang^{1)**}, FAN Jie²⁾, WEI Fei-Yu²⁾

⁽¹⁾ Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

⁽²⁾ Department of Cardiology, the First People's Hospital of Yun Nan Province, Kunming 650032, China)

Abstract T-box transcription factor Tbx18 (Tbx18) was expressed in epicardial cells and controls the differentiation of epicardial epithelial cells into myocardial lineage in the developing mouse embryo. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) plays a crucial role in embryonic development. For the purpose of determine whether Tbx18 regulates downstream EMT-associated signaling molecules, such as the transcriptional factors Snail1, Slug, Smad, Twist and cell adhesion molecule E-cadherin in mouse heart development. In this study, we used the Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP double-heterozygous mice and Tbx18 mutants to investigate the spatiotemporal expressions patterns of the major EMT-associated signaling molecules within Tbx18 lineage cells. We observed that the major EMT-associated transcriptional factors co-localized with Tbx18 lineage cells in the epicardium and subepicardial mesenchyme. The expression patterns of the major EMT-associated signaling molecules within Tbx18 lineage cells were consistent with Tbx18. Most important, we further demonstrate that the four EMT-associated transcriptional factors are reduced and E-cadherin is significantly increased in the Tbx18 mutant hearts compared with the wild type hearts. Our data together indicated that Tbx18 regulated the major EMT-associated major signaling molecules in mouse heart development. Understanding the signaling pathways by which Tbx18 regulates mouse heart development may help to improve regeneration in adult heart disease.

Key words transcriptional regulator T-box18 (Tbx18), epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), epicardial cells, heart development

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0296

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81270211, 81360039, 81260038), and the Project of Diagnosis and Treatment Center for Arrhythmia of Yunnan Province (2014NS260, 2014NS259).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-63693752, E-mail: qshe98@hotmail.com

Received: September 29, 2015 Accepted: January 22, 2016