



评述

Polycomb 与心脏发育

李君, 刘扬, 鲁寒, 薛丽香*

北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100191

* 联系人, E-mail: lixiangxue@hsc.pku.edu.cn

收稿日期: 2015-02-10; 接受日期: 2015-03-04

国家自然科学基金(批准号: 31071206)资助项目

doi: 10.1360/N052015-00026

摘要 心脏作为维持血液循环的“泵”, 在人体发挥重要作用. 而心脏发育的正常进行则是维持其功能的基础. 因此, 对心脏发育及其调节的研究一直为科学家们所关注. Polycomb 复合体是一组抑制基因转录的蛋白, 参与调节多种组织器官发育相关基因的表达. 越来越多的证据表明, Polycomb 在心脏发育中起重要的调节作用. 因此, 进一步了解其调节作用的机制, 将为解析先天性心脏病的发病机制提供有益线索. 本文主要从表观遗传的角度, 重点阐述了 Polycomb 蛋白复合体与心脏发育的关系.

关键词表观遗传学
心脏发育
Polycomb

1 PcG 蛋白复合体的组成和功能

Polycomb group(PcG)蛋白复合体于 1978 年在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中作为同源盒基因(homeotic genes, *Hox* 基因)的抑制因子被发现, 作为在基因沉默中发挥关键调节作用的一类复合物, 其重要性越来越引起科学界的关注^[1]. PcG 蛋白通过对染色质的修饰来实现对靶基因在转录水平的调控. 作为表观调控因子的重要成员, PcG 具有高度的保守性, 到目前为止, 果蝇中已有 18 个不同的基因被归为 PcG 成员, 并至少有 4 种蛋白质复合体被发现, 分别为 PRC1(polycomb repressive complex 1), PRC2(polycomb repressive complex 2), PhoRC(Pho-repressive complex)和 PR-DUB(polycomb repressive deubiquitinase)^[2]. 而哺乳动物体内也相继发现这 4 种复合体的类似物, 只是构成较果蝇更为复杂和多样.

PRC2 是 PcG 的核心组分, 在转录抑制起始阶段发挥作用. 其组成相对恒定, 从果蝇到哺乳动物都由

果蝇 *zeste* 基因增强子人类同源物 1/2(enhancer of *zeste* homolog 1/2, EZH1/2)、*zeste* 基因抑制子 12(suppressor of *zeste* 12, SUZ12)、胚胎外胚层发育蛋白(embryonic ectoderm development, EED)、视网膜母细胞瘤结合蛋白 7/4(retinoblastoma binding protein 7, RBBP7/4)构成^[3]. EZH1/2 具有催化 H3K27(Histone H3 lysine 27)三甲基化的作用, EED 和 SUZ12 是组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMT)所必需的. PRC1 维持处于阻抑状态染色质的稳定性, 在 PcG 蛋白复合体中用于识别 H3K27me3 (trimethylation of lysine 27 of histone H3), 并进一步沉默基因. 在哺乳动物中, PRC1 主要由 5 个核心蛋白家族结合而成, 每个蛋白家族都包含几个成员, 分别为 CBX 家族(chromobox homolog, CBXs; CBX2/4/6/7/8), 环指蛋白 1(ring finger protein 1, Ring1; Ring1A/B), 磷酸盐转运蛋白(phosphate carrier, Phc; Phc1/2/3), 表观抑制因子 Polycomb 家族成员环指蛋白的同源蛋白(polycombgroup ring finger homologs, PCGF;

引用格式: 李君, 刘扬, 鲁寒, 等. Polycomb 与心脏发育. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 643–651

Li J, Liu Y, Lu H, et al. Polycomb and heart development. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 643–651, doi: 10.1360/N052015-00026

PCGF1/6)和 Ring1, YY1 结合蛋白/YY1 相关蛋白 2(Ring1 and YY1 binding protein/YY1-associated factor 2, RYBP/YAF2)^[4]. 因此, 这些蛋白质和家族成员的不同组合可以产生多种 PRC1, 也赋予 PRC1 潜在的多样化功能. PhoRC 可用于连接 PcG 复合体与 DNA. 这些蛋白质复合体可以单独或联合来抑制目标基因的转录.

2 调控心脏发育的重要转录因子

心脏是由中胚层衍生而来, 其前外侧中胚层的区域形成新月型生心区, 随后发育成直心管, 直心管延长和向右弯曲, 最终形成具有 4 个腔室的心脏^[5]. 心脏发育是一个极其复杂的过程, 涉及众多基因在不同时间和空间的精确表达, 并受多种转录因子及信号途径的调控, 其中最为重要的几个转录因子有 GATA 家族、MEF(myocyte enhancer factor)家族、NKX2.5(NK2 homeobox 5)、Tbx(T-box DNA-binding protein)家族和 HAND(the heart and neural crest derivatives expressed transcript genes)家族等(表 1)^[6].

2.1 GATA 家族

GATA 家族有 6 个成员, 其中 GATA-4, 5, 6 对心脏发育相关基因的表达起调控作用. GATA-4 和 GATA-6 在原始心脏和消化道发育中表达, 是心脏发育的早期标志基因^[7]. 实验表明, 抑制 GATA-4 表达会阻断 P19 畸胎瘤细胞向心肌细胞分化, 其过表达则会促进心肌分化^[8]. 本研究还表明, GATA-4 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)相互作用以调节 P19CL6 畸胎瘤细胞向心肌细胞分化^[9].

近年研究发现, GATA-4 的翻译后修饰对心脏发育也有重要的调节作用. 例如, 105 位丝氨酸磷酸化后的 GATA-4, 其与 DNA 结合能力以及转录活性增强, 从而促进体外培养的人心肌细胞的肥大生长^[10]; 利用苯肾上腺素刺激新生小鼠(*Mus musculus*)的心肌

细胞发现 GATA-4 的活性与 P300 的表达均有所增强, 同时心肌细胞有肥大倾向^[11]. 而对于 P300 基因沉默的细胞, 在苯肾上腺素的刺激下并无上述应答, 提示与 P300 结合而被乙酰化的 GATA-4 可引起心肌肥大的发生^[11]. 通过对大鼠(*Rattus norvegicus*)胚胎期 1 天时分离出的心室肌细胞体外培养发现, GATA-4 在蛋白质精氨酸甲基转移酶 5(protein arginine methyltransferase 5, PRMT5)的作用下, 部分位点发生精氨酸甲基化, 从而抑制 GATA-4 转录活性, 同时也会阻碍 P300 乙酰化 GATA-4, 从而抑制心肌肥大的发生^[12].

2.2 NKX2.5

与 GATA-4 和 GATA-6 相同, NKX2.5 也是心脏发育的早期标志基因. 它是 NK 型同源盒基因家族 NKX2 的成员, 其编码的蛋白质包含 4 个高度保守的结构域, 分别是 TN(tin)结构域、由 160 个氨基酸组成的同源结构域(homodomain, HD)、位于 HD 下游的 NK2-SD 和位于 C 端包含 GIRAW 的保守结构域. 其中 HD 结构域第 54 位氨基酸是酪氨酸, 负责特异性的识别结合 DNA. 此外, NKX2.5 还有一个富含丙氨酸和脯氨酸残基的阻遏结构域, 以及富含天冬氨酸谷氨酸残基的激活域. 这些结构域的变化会引起蛋白质-DNA 间亲和力的改变, 从而影响心脏发育相关基因的转录和蛋白的翻译, 最终造成心脏畸形. 研究表明, NKX2.5 在新生小鼠心脏发育中特异表达, 并激活 2 种心脏发育标志基因 ANF(atrial natriuretic factor)和 α -肌球蛋白^[13], 它参与心脏前体细胞的分化、心脏的环化、房室分隔、房室流出道和传导系统的形成, 并在心室的重塑中发挥作用^[12].

2.3 T-box 家族

T-box 转录因子含有一个高度保守的, 由 180 个氨基酸组成的 T-box 结构域, 其家族中的 Tbx1, Tbx2,

表 1 调控心脏发育的重要转录因子

转录因子	功能
GATA-4	调控心脏发育相关基因(主要是调节一些与心室收缩、能量产生及应激反应相关的基因)表达
NKX2.5	激活心脏发育标志基因 ANF 和 α -肌球蛋白, 参与心肌分化、心脏环化、房室分隔、房室流出道和传导系统的形成及心室重塑
Tbx5	调控房室腔初始化和房室间隔的正确形成, 促进心肌细胞增殖并维持成熟心肌收缩
MEF2C	调控心肌细胞分化、心肌成熟、心脏环化及右心室发育
HAND1/2	调控心肌细胞增殖、分化、形态构建及兴奋传导

Tbx3, Tbx5, Tbx18, Tbx20 等都在心脏发育中发挥重要作用. 研究表明, 在心脏发育过程中, Tbx5 主要在胚心的后部区域表达, 而在成熟心脏中, Tbx5 主要在左右心房及左心室中表达, 这种动态表达方式对于房室腔初始分化和房室间隔的正确形成是十分关键的^[14]. 另外, Tbx5 还能促进大多数哺乳动物胚胎期心肌细胞的增殖, 并维持成熟心肌的收缩功能. 如果 Tbx5 基因变异, 将会诱发人类 Holt-Oram 综合症^[15,16]. 研究表明, 在骨形态发生蛋白等信号分子的刺激下, Tbx5 与其他心脏发育转录因子 GATA4, GATA5 及 NKX2.5 等相互作用, 以协同激活心脏发育标志基因, 如心钠素 *ANF* 和连接蛋白 connexin 40 等, 从而维持心脏的表型和功能^[17].

2.4 MEF2 家族

MEF2 家族成员在调节心脏发育中发挥重要作用, 它包括 MEF2A, MEF2B, MEF2C 和 MEF2D 4 个家族成员. MEF2 家族含有 MADS 盒结构域, 该结构域通过结合到 DNA 序列(T/C)TA(A/T)4TA(G/A)上, 从而激活基因的表达. 在这 4 个家族成员中, MEF2C 从胚龄 7.5 天起就最先在心肌细胞的前体中表达, 并对心肌细胞分化、心肌成熟、心脏环化及右心室的发育有重要作用. 研究表明, MEF2C 缺陷小鼠表现出严重的左右心室发育不全, 从而导致胚胎在发育早期死亡^[18]. 更为重要的是, MEF2 家族成员在心脏发育中功能互补. 例如, 在 *MEF2C* 基因敲除小鼠中, 另一家族成员 MEF2B 的蛋白表达增高 7 倍^[18]. 另外, *MEF2B* 基因敲除小鼠之所以心脏发育正常, 归因于 MEF2B 和 MEF2C 的功能互补, 因此 MEF2 家族成员在心脏发育中发挥重要协同作用. 另有研究表明, MEF2 家族成员可被 GATA4 招募形成蛋白复合体, 共同激活心脏发育标志基因 *ANF*, 从而在心脏发育的调节级联中发挥作用^[18,19].

2.5 HAND 家族

HAND 转录因子是 Twist 家族的成员, 含有 bHLH(basic Helix-Loop-Helix)结构域, 能够结合 DNA 序列 E-box(CANNTG)或 T-box(CGNNTG), 从而调节下游靶基因. 在小鼠胚胎发育的 7.5 天左右, *HAND1* 和 *HAND2* 基因在新月形生心区表达, 参与调节心脏一些基本结构的发育. 例如, 心室肌的发育、脑神经嵴细胞(cranial neural crest cells, cNCC)的形

成、心外膜间皮细胞群的发育等. 总之, *HAND* 基因在心肌细胞增殖、分化、形态构建及兴奋传导中发挥作用^[20,21].

心脏的发育是一个十分复杂的过程, 需要各种转录因子协同发挥作用. 例如, GATA-4 与 NKX2.5 可协同激活 *ANF* 以及心脏 α -肌动蛋白, 以共同调节心肌细胞的早期分化; MEF2 家族成员也可与 GATA4 相互作用以激活下游基因的表达. Polycomb 通过抑制上述转录因子的转录来发挥对心脏发育的调节作用. 下面对 Polycomb 的具体作用机制进行相应的阐述.

3 Polycomb 对心肌发育的调节

PcG 蛋白主要是通过 PRC2 对组蛋白 H3K27 的三甲基化从而招募 PRC1, 并进而引起 H2AK119 的单泛素化从而最终抑制靶基因转录. 下面就 PRC1 以及 PRC2 对心脏发育的调节加以阐述.

3.1 PRC1 对心脏发育的调节

目前在 PRC1 复合体中, Pc2/CBX4(chromobox homolog 4), Phc1(polyhomeotic homolog 1)(也称为 Rae28(polyhomeotic homolog 1))等先后被报道参与调控心脏的发育. PRC1 复合体结合三甲基化的 H3K27 并诱导染色质构象致密压缩, 从而保持靶基因所在的染色质区域处于沉默的状态.

SUMO(small ubiquitin-related modifier)特异蛋白酶 2(SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2, SENP2)在体外具有广泛的去 SUMO 化活性. 一般而言, 经 SUMO 化修饰的蛋白质更加稳定, 且通常发生蛋白质亚细胞定位的改变以及蛋白质-蛋白质相互作用的改变. 尽管对 SENP2 生物功能的认识在很大程度上还是一片未知区域, 但最近研究表明, 小鼠缺少 *SENP2* 基因会导致心脏发育缺陷, 并且会导致 GATA-4 和 GATA-6 表达的降低, 而 GATA-4 和 GATA-6 是心脏发育中必不可少的转录因子. 研究表明, SENP2 主要通过调节 PRC1 中 Pc2/CBX4 在 GATA-4 和 GATA-6 启动子上的结合. 从而调节 GATA-4 和 GATA-6 的转录^[22]. 在这个调节过程中, SUMO 化的 Pc2/CBX4 结合在 GATA-4 和 GATA-6 的启动子上, 抑制 GATA-4 和 GATA-6 的转录. 同时, SUMO 化的 Pc2/CBX4 能介导 PRC1 招募三甲基化的

组蛋白(H3K27me3), 导致染色质构象致密压缩, 从而保持 *GATA-4* 和 *GATA-6* 基因所在的染色质区域处于沉默的状态. 而 Pc2/CBX4 是 SENP2 的一个靶标, SENP2 可以去除 Pc2/CBX4 的 SUMO 化活性, 进而消除 SUMO 化的 Pc2/CBX4 对 *GATA-4* 和 *GATA-6* 的转录抑制作用. 在 SENP2 敲除的小鼠胚胎中, SUMO 化的 Pc2/CBX4 大量堆积, 且在 PcG 靶基因启动子上的结合明显增加, 导致心脏转录因子 *GATA-4* 和 *GATA-6* 转录下调, 从而影响心脏的正常发育(图 1)^[22].

除了 Pc2/CBX4, Phc1(Rae28)也是 PRC1 的核心组件之一, 它在哺乳动物中表达, 与果蝇 PcG 蛋白质 Polyhomeotic(Ph)同源. 上文中提到, *NKX2.5* 是心脏发育的早期标志基因. Phc1(Rae28)不是 *NKX2.5* 起始表达所必需的, 但对其持续表达及促使心脏形态的发生是必需的. *Phc1(Rae28)* 胚胎突变时出现心脏发育缺陷, 虽然心室能够形成, 但出现室间隔缺损和其他心脏畸形, 且这些缺陷与心脏转录因子 *NKX2.5* 表达的缺失有关^[23]. 除此之外, *Phc1(Rae28)* 基因敲除的小鼠呈现出的心脏发育缺陷类似于人类的先天性心脏疾病. 在 *Phc1-/-*(*Rae28-/-*) 胚胎中, 心脏选择基因 *NKX2.5/CSX1*(*NKX2.5*) 正确启动但是在之后没有有效充分地表达. 在表达受损维护阶段, 表达受损的 *NKX2.5* 被证明对心脏形态有重要的作用. 遗传互补实验的结果也证明, 在 *Phc1-/-*(*Rae28-/-*) 胚胎中, 人类(*Homo sapiens*)*NKX2.5/CSX1* 的持续表达被抑制^[24].

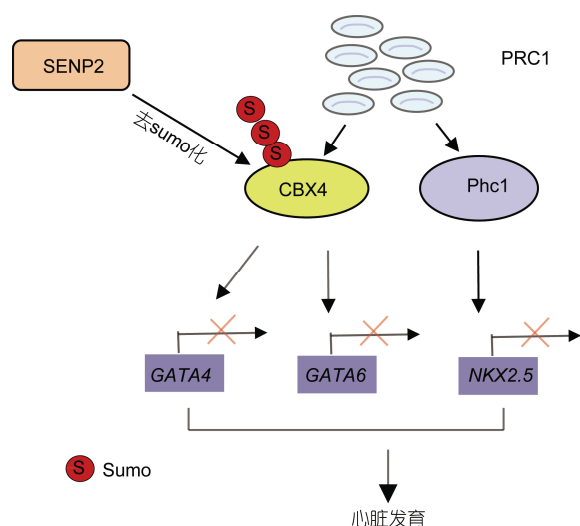


图 1 PRC1 对心脏发育的调控

而引入外源性基因 *Phc1(Rae28)* 的表达则可以修复 *Phc1-/-*(*Rae28-/-*) 胚胎中 *NKX2.5* 的表达受损, 这种现象进一步表明 *Phc1(Rae28)* 能够维持心脏发育中 *NKX2.5* 的表达^[24].

3.2 PRC2 对心脏发育的调节

PcG 介导的组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸上三甲基化(H3K27me3)在基因沉默和发育调控中起重要作用. 小鼠胚胎干细胞中超过 10% 的基因受该种修饰调控, PRC2 通过对组蛋白 H3K27 三甲基化来抑制基因表达, 且在哺乳动物中 H3K27me3 的修饰是可逆的^[25].

果蝇 *zeste* 基因增强子人类同源物 2(enhancer of *zeste* homolog2, EZH2)是调节心脏发育的核心成员, 是 PRC2 中主要的组蛋白甲基转移酶, EZH2 敲除的小鼠胚胎在原肠胚的形成还未完成之前即死亡, 这表明 EZH2 对早期胚胎发育至关重要^[23]. 研究发现, EZH2 在心脏发育中高度表达, 但在成年人的心脏中表达下调, 而其同源蛋白 EZH1 显示了相反的模式^[23]. 最近, 对心脏中特定的细胞群中 EZH2 的敲减研究也表明, EZH2 在心脏发育和成年心脏中扮演重要角色^[23]. 通过组织特异性敲除 EZH2, 发现造成致死性的先天性心脏畸形, 即致密心肌发育不全, 过度小梁化和心室中隔缺损. 候选和全基因组 RNA 表达分析以及染色质免疫沉淀分析确定了直接受 EZH2 抑制的心脏发育相关基因. 除此之外, 在心脏正常发育期间的特定时间, EZH2 充当“主调节器”的角色, 关闭不再需要或必需保持关闭的基因. 例如, 具有同源结构域的转录因子 *sine oculis* 同源盒蛋白(*sine oculis* homeobox homolog 1, Six1)能够诱导心肌细胞肥大和骨骼肌基因表达, 在心肌肥大中, Six1 被确认为 EZH2 发挥功能的主要效应因素^[26]. 在心脏正常发育期间, Six1 通常只在一个短暂时期表达, 然后 EZH2 将其永久沉默. 但是, 如果 Six1 在 EZH2 缺陷小鼠中太长时间处于转录活跃状态, Six1 的持续表达将会使心肌细胞中不该被激活的基因激活, 如形成骨骼肌的基因, 而心脏发育相关基因的表达将会受到抑制, 从而导致心脏病变(图 2)^[26].

除了甲基化 H3K27, 体内、体外实验也表明 EZH2 还可通过对心脏转录因子 *GATA4* 第 299 位赖氨酸甲基化从而抑制 *GATA4* 的转录^[27], 这使得 *GATA4* 成为第一个已知的 PRC2 的非组蛋白作用物, 也揭示了 PRC2 可能通过一个新的机制进行转录调节.

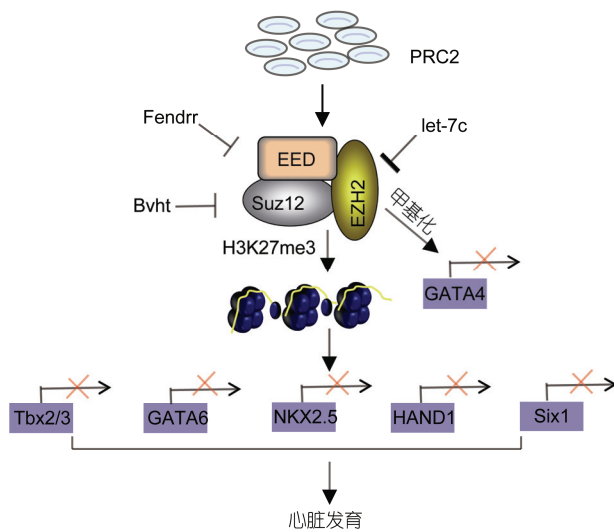


图2 PRC2对心脏发育的调控

未来需要进一步阐明通过 PRC2 介导 H3K27 甲基化与 GATA4 甲基化所致的目标基因沉默的机制。值得关注的是, GATA4 可能不是一个孤立的例子, PRC2 可能还有其他有待确定的非组蛋白作用物^[23]。

目前, PcG 蛋白能否维持胚胎干细胞多能性尚有争议。研究表明, 如果敲除胚胎干细胞中 PRC2 亚基 EZH2, EED 和 SUZ12, 这些胚胎干细胞在细胞重编程以及定向分化中发生异常^[28]。上文已经提及, 在心脏发育中, EZH2 失活导致围产期死亡和心脏畸形, 如心肌致密化不全, 小梁过度形成, 室间隔缺损和右心房扩张。在心肌细胞分化中, 当 EED 敲除, 也同样发生围产期死亡并伴有心肌变薄, 但与 EZH2 不同, 胚胎并没有出现室间隔缺损或心房扩张^[23]。上述结果表明, PRC2 对于心脏形态发生是非常必要的。另外, He 等科学家已经确定了 50 多个基因在心脏发育中受 PRC2 调控, 如胰岛素基因增强结合蛋白 (ISL LIM homeobox 1, Isl1), Tbx2, Tbx3, HAND1, Irx5 (iroquois homeobox 5) 和 Six1 等, 进一步表明 PRC2 在心脏发育中发挥重要作用^[23]。

PRC2 对心脏发育的调控是通过 H3K27me3 来实现的, 与之对应, 拮抗 H3K27 的甲基化也将参与对心脏发育的调控。在胚胎干细胞分化为心肌细胞的过程中, 具有组蛋白去甲基化酶作用的 Jmj(Jumonj) 及其家族蛋白也发挥重要调控作用。Jmj, 也称作 Jumonj 富含 AT 相互作用结构域蛋白 2 (Jumonj AT rich interactive domain 2, Jarid2), 富含于多种多能干细胞

中, Jmj 与 PRC2 功能有关。然而, Jmj 是否促进或抑制 PRC2 的甲基转移酶 (histone methyltransferase, HMTase) 活性还不确定, 这主要取决于 Jmj 和 PRC2 的相对蛋白质含量。通过对 Jarid2, EZH2, 以及 SUZ12 的 ChIP-seq 分析发现, Jmj 和 PRC2 占据相同的基因组区域, 进一步研究发现, Jmj 促进 PRC2 的招募, 并抑制其组蛋白甲基转移酶活性。说明 Jarid2 作为一个“分子变阻器”, 在 PRC2 对发育相关基因的调控中, 起到精确调节的作用。在心脏发育中, Jmj 的分子功能机制远未明了, 目前, 有如下发现被相继报道: (1) Jmj 与 2 个重要的心脏转录因子 NKX2.5 和 GATA4 相互作用, 并抑制 NKX2.5 的激活和 GATA4 的表达; (2) Jmj 通过以下 2 方面调节心肌细胞的细胞周期: (i) Jmj 能够结合到转染细胞中周期蛋白 D1 (CyclinD1) 的启动子上并引起其 H3K9 三甲基化, 从而直接 CyclinD1 的表达, 并进而抑制 Rb 磷酸化; (ii) 与 Rb 相互作用, 并发挥 Rb 辅阻遏物的功能, 最终导致抑制 E2F 靶基因, 而 E2F 靶基因是细胞周期得以完成所需要的。 (3) 在心内膜中, Jmj 是 Notch 信号的负调节蛋白, Notch 信号通路可以促进心肌进行有丝分裂和调节小梁形成过程。Jmj 与 Notch1 基因座的保守区域相关联, 在 Jmj^{-/-}小鼠心脏中, Notch1 蛋白质水平显著升高。值得注意的是, 内皮细胞特异性 (心内膜和其他内皮细胞谱系细胞) 敲除 Jmj 小鼠的表型与 Jmj^{-/-}小鼠中所出现的表型几乎相同。这表明, Notch 和其他可能的信号源自心内膜的调节, 这是 Jmj 的一个重要功能。最后, Jmj 对分化标记基因的表达是必需的, 如在胎儿心肌细胞中的肌球蛋白重链 6 (myosin, heavy chain 6, Myh6) 基因 (编码 α -MHC), α -心肌动蛋白基因, 辅肌动蛋白基因等。这可能是 Jmj 在发挥调节增殖与分化功能时的间接影响。研究表明, 在 Jmj^{-/-}心脏中, CyclinD 表达增加, 导致心肌的过度增殖和对 GATA4 的表达抑制, 而 GATA4 正是上述分化标记基因的转录激活因子^[23]。

3.3 PcG 通过其他表观遗传机制来发挥对心脏发育的调节

除了上文提到的 PRC1, PRC2 对心脏发育的调控, PcG 还可以通过影响长链非编码 RNA (lncRNA) 以及 microRNA 等其他表观遗传机制来发挥对心脏发育的调节。

lncRNAs 对哺乳动物心脏发育有重要意义。

Klattenhoff 等人^[29]通过研究鉴定出了与小鼠心脏发育有关的 lncRNA-Braveheart(Bvht). 通过多个胚胎干细胞株 ESC 差异化策略实验发现: (i) Bvht 对于初期中胚层向心肌分化是必需的; (ii) Bvht 对于激活心血管核心基因的调控网络也是必要的. 中胚层前体碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1(mesoderm posterior basic helix-loop-helix transcription factor 1, *Mesp1*)被认为是心血管增殖分化的主监管因子, 它可以级联启动心脏转录因子并直接生成心脏中胚层^[30]. 而 Bvht 可作用于 *Mesp1* 的上游片段. 通过体外心肌细胞(cardiomyocyte, CM)差异化分析, 观察到相对于对照组, Bvht 敲除的拟胚体(EBs)较小, 培养第 4 天时 MES(pre-cardiac mesoderm)的形状不规则, 第 5.3 天时心脏祖细胞(cardiac progenitors, CP)已不能形成一个附着单层. 在第 4 和第 5.3 天敲除 Bvht 的心肌细胞不能成功诱导 *Mesp1* 表达, 而 Bvht 过表达则会使心脏基因包括 *Mesp1* 基因的表达水平升高. 另外, 在心脏原肠胚形成时期, *Mesp1* 也调节上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)基因 *Snail* (snail family zinc finger 1/2), *Twist1*, *Twist2* 的表达, 而 EMT 基因的表达通过心前体母细胞的迁移发挥关键作用. 综上, Bvht 在从新生中胚层分化至心肌的过程中不可缺少. 另一方面, 多个 ESC 差异化策略实验显示 Bvht 可影响心脏的关键转录因子(如 *Mesp1*, *GATA4*, *HAND1*, *HAND2*, *NKX2* 以及 *Tbx5*)的表达, 进一步数据分析得出, Bvht 主要通过增强活化调控网络中核心基因的翻译过程进而直接影响心肌细胞的命运. 此外, 运用核糖核酸免疫沉淀实验(RNA immunoprecipitation, RIP), 发现在心肌分化中, Bvht 还可以与 PRC2 的核心成分 SUZ12 相互作用. 在敲除 Bvht 的胚胎干细胞中, SUZ12 仍在心脏发育关键基因的启动子中保持高水平结合, 这些关键基因包括 *Mesp1*, *GATA6*, *HAND1*, *HAND2* 和 *NKX2.5*. 虽然现有数据尚不能说明 Bvht 是直接还是间接作用于 SUZ12, 但至少在一定程度上说明 Bvht 和 SUZ12 对心脏发育有共同调节作用^[31]. Bvht 被认为是决定心肌细胞命运和谱系特异性的第一个 lncRNA, 并且将 lncRNAs 与心脏发育和疾病连接起来^[32].

而另一种与心脏发育有关的 lncRNA 是 Fendrr, 在小鼠胚胎中, 它可以同时与 PRC2 和 TrxG/MLL 结合, 并发挥调节作用. 当胚胎缺乏 Fendrr 时, PRC2 在目标基因启动子上的结合减少, 同时伴有 H3K27me3

的表达水平下调或 H3K4me3 表达水平升高, 调节侧板和心肌分化的转录因子, 如 *MEF2C*, *GATA-6*, *NKX2.5*, *Foxf1*(forkhead box protein F1)的表达也出现上调^[33]. 所以 Fendrr 可以通过影响 PcG 来影响心脏的发育.

近年来, microRNAs 对脊椎动物心脏发育的研究越来越多, 已有数种 microRNAs 被证明在心脏发育中通过影响 PcG 进而调控心脏发育. 如 miR-99a/let-7c 家族^[34], 通过干扰小鼠胚胎干细胞 microRNA 的表达, 发现 let-7c 的直接靶标是 PcG 蛋白 EZH2, 并进而调控心脏发育. 而 miR-99a 则通过抑制核小体重塑因子 *Smarca5*, 衰减 *Nodal/Smad2* 信号从而抑制心脏发育. 值得一提的是, miR-99a 和 let-7c 位于人类 21 号染色体(human chromosome 21, Hsa21)上, 而 1/3 Hsa21 副本的存在可引起唐氏综合征(Down's syndrome, DS), DS 病人中约有 40%伴有先天性心脏病. 同时, 也在人类唐氏综合征胎儿心脏标本中发现了 miR-99a/let-7c 的表达. 另外, 运用 qRT-PCR 方法, 还发现 miR-200c 可以调节 *GATA-4* 的表达并诱导人类胚胎干细胞凋亡, 进而影响心脏的正常发育^[35]. 而本研究也发现 miR-200 另一家族成员 miR-200b 也调节 *GATA-4* 的表达并抑制 P19CL6 细胞向心肌细胞分化^[36].

PcG 蛋白的靶基因有许多, 除了上述提及的各种心脏发育特异性的转录因子之外, 作为 PcG 的经典下游靶标, *Hox* 基因家族在心脏的发育中也发挥重要调节作用. *Hox* 基因家族最早被发现参与了生物体节、体轴和神经系统的发育^[37]. 但随着研究的不断深入, 其在全身各系统的发育乃至各类肿瘤发生中的作用也相继被揭示. 在小鼠胚胎发育的早期, *HoxA* 和 *HoxB* 在第二心场前体细胞中表达, 并参与心脏的环化^[38]. 在 *HoxA1* 敲除小鼠胚胎中表现出主动脉弓以及锁骨下动脉形成受阻, 同时伴有法乐氏四联症的表型. 这表明 *HoxA1* 对于大动脉以及心脏流出道的形成是必不可少的. 同时, *HoxA1* 在心脏神经嵴前体细胞中表达, 作为上游转录因子, 通过上调心脏神经嵴特化所必需的 *Hnf1b*(Hnf1b homeobox B), *Foxd3*(forkhead box D3)以及 *Zic1*(Zic family member 1), 来发挥对心脏发育的调节作用^[39]. 此外, 科学家还发现 *HoxA10* 可以与 *NKX2.5* 协同作用, 以调节心脏中胚层的分化时间^[40]. 总之, 胚胎的正常发育是在

时间、空间上经过精确的表观遗传调控而顺序发生的结果. *Hox* 基因家族中不同成员的时空顺序性表达受控于 PcG, 无论是 PcG 的表达异常还是 *Hox* 家族成员的表达异常, 都将对心脏的发育产生重要影响.

4 总结与展望

正如大多数的科学问题, 心脏发育的影响因素十分复杂, 受到多种转录因子的调节. 同时相关转录因子又受到基因水平和表观遗传学水平的调控. 本文介绍的 PcG 蛋白一方面可以通过抑制相关转录因子的表达来调节心脏发育, 另一方面也可以通过影响长链非编码 RNA(lncRNA)以及 microRNA 等其他

表观遗传机制来发挥对心脏发育的调节. 但许多具体机制还不甚了解, 新的发现也不断地更新着人们的观念. 如传统认为, 成体心肌细胞是高度成熟的细胞, 失去了分裂和分化的能力, 不再进入细胞周期. 然而, 越来越多的研究发现, 心肌组织内应该存在干细胞, 无论是成体心肌细胞还是其他干细胞都存在有分化为心肌细胞的潜能, 即在心肌损伤后有再生的潜能, 而非只能通过纤维组织增生来取代. 有研究发现, 心肌细胞细胞周期的激活可以改善心脏的功能, 这就为细胞损伤后的细胞治疗和基因治疗指出了新的方向. Polycomb 蛋白复合体作为心肌分化和心脏发育过程中重要的调控因子, 在分子水平为先天性心脏病的发病机理提供了可能的解决答案.

参考文献

- 1 Molitor A, Shen W H. The polycomb complex PRC1: composition and function in plants. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 231–238
- 2 Su S, Zhang M, Li L, et al. Polycomb group genes as the key regulators in gene silencing. *Wuhan Uni J Nat Sci*, 2014, 19: 1–7
- 3 Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 2011, 469: 343–349
- 4 Luis N M, Morey L, Di Croce L, et al. Polycomb in stem cells: PRC1 branches out. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 16–21
- 5 van Wijk B, Moorman A F, van den Hoff M J. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res*, 2007, 74: 244–255
- 6 Clowes C, Boylan M G, Ridge L A, et al. The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development. *Genesis*, 2014, 52: 713–737
- 7 Liang Q, De Windt L J, Witt S A, et al. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30245–30253
- 8 Zhang H, Toyofuku T, Kamei J, et al. GATA-4 regulates cardiac morphogenesis through transactivation of the N-cadherin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312: 1033–1038
- 9 Ma C X, Song Y L, Xiao L, et al. EGF is required for cardiac differentiation of P19CL6 cells through interaction with GATA-4 in a time- and dose-dependent manner. *Cell Mol Life Sci*, 2014, in press
- 10 Liang Q, Wiese R J, Bueno O F, et al. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 7460–7469
- 11 Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, et al. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 3593–3606
- 12 Carter D R, Buckle A D, Tanaka K, et al. *Art27* interacts with *GATA4*, *FOG2* and *NKX2.5* and is a novel co-repressor of cardiac genes. *PLoS One*, 2014, 9: e95253
- 13 Liang Q, Molkentin J D. Divergent signaling pathways converge on GATA4 to regulate cardiac hypertrophic gene expression. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34: 611–616
- 14 杨雪芳, 田杰, 陈国珍, 等. 小鼠胚胎心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶亚型 p300 调控心脏特异转录因子的动态表达. *重庆医科大学学报*, 2010, 35: 961–965
- 15 Hoffmann A D, Yang X H, Burnicka-Turek O, et al. *Foxf* genes integrate Tbx5 and hedgehog pathways in the second heart field for cardiac septation. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004604
- 16 Baban A, Postma A V, Marini M, et al. Identification of Tbx5 mutations in a series of 94 patients with Tetralogy of Fallot. *Am J Med Genet A*, 2014, 164: 3100–3107
- 17 Singh R, Horsthuis T, Farin H F, et al. Tbx20 interacts with smads to confine Tbx2 expression to the atrioventricular canal. *Circ Res*, 2009, 105: 442–452
- 18 Voronova A, Al M A, Fischer A, et al. Gli2 and MEF2C activate each other's expression and function synergistically during cardiomyogenesis *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 3329–3347

- 19 Morin S, Charron F, Robitaille L, et al. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J*, 2000, 19: 2046–2055
- 20 Vincentz J W, Barnes R M, Firulli A B. HAND factors as regulators of cardiac morphogenesis and implications for congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011, 91: 485–494
- 21 Barnes R M, Firulli B A, Conway S J, et al. Analysis of the HAND1 cell lineage reveals novel contributions to cardiovascular, neural crest, extra-embryonic, and lateral mesoderm derivatives. *Dev Dyn*, 2010, 239: 3086–3097
- 22 Kang X, Qi Y, Zuo Y, et al. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol Cell*, 2010, 38: 191–201
- 23 Wang Q T. Epigenetic regulation of cardiac development and function by polycomb group and trithorax group proteins. *Dev Dyn*, 2012, 241: 1021–1033
- 24 Shirai M, Osugi T, Koga H, et al. The Polycomb-group gene *Rae28* sustains *NKX2.5/CSX* expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J Clin Invest*, 2002, 110: 177–184
- 25 He A, Ma Q, Cao J, et al. Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circ Res*, 2012, 110: 406–415
- 26 Delgado-Olguin P, Huang Y, Li X, et al. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by EZH2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat Genet*, 2012, 44: 343–347
- 27 He A, Shen X, Ma Q, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev*, 2012, 26: 37–42
- 28 Zhang Z, Jones A, Sun C W, et al. PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Stem Cells*, 2011, 29: 229–240
- 29 Klattenhoff C A, Scheuermann J C, Surface L E, et al. Braveheart, a long non-coding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 2013, 152: 570–583
- 30 Chan S S, Shi X, Toyama A, et al. *Mesp1* patterns mesoderm into cardiac, hematopoietic, or skeletal myogenic progenitors in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 587–601
- 31 Quenet D, Dalal Y. A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere. *Elife*, 2014, 3: e3254
- 32 Kataoka M, Huang Z P, Wang D Z. Build a braveheart: the missing linc (RNA). *Circ Res*, 2013, 112: 1532–1534
- 33 Grote P, Wittler L, Hendrix D, et al. The tissue-specific lncRNA *Fendrr* is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*, 2013, 24: 206–214
- 34 Coppola A, Romito A, Borel C, et al. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res*, 2014, 12: 323–337
- 35 Huang H N, Chen S Y, Hwang S M, et al. miR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Res*, 2014, 12: 338–353
- 36 Yao C X, Wei Q X, Zhang Y Y, et al. miR-200b targets GATA-4 during cell growth and differentiation. *RNA Biol*, 2013, 10: 465–480
- 37 Foronda D, De Navas L, Garaulet D, et al. Function and specificity of *Hox* genes. *Int J Dev Biol*, 2009, 53: 1404–1419
- 38 Nolte C, Jinks T, Wang X, et al. Shadow enhancers flanking the *HoxB* cluster direct dynamic *Hox* expression in early heart and endoderm development. *Dev Biol*, 2013, 383: 158–173
- 39 Makki N, Capecchi M R. Cardiovascular defects in a mouse model of *HoxA1* syndrome. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 26–31
- 40 Behrens A N, Iacovino M, Lohr J L, et al. *NKX2-5* mediates differential cardiac differentiation through interaction with *HoxA10*. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 2211–2220

Polycomb and Heart Development

LI Jun, LIU Yang, LU Han & XUE LiXiang

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, China

Heart plays an important role in blood circulation, and normal heart development is necessary for maintaining cardiac function. Therefore, the regulatory mechanisms underlying cardiac development are widely explored by scientists. Polycomb protein complexes are a group of protein which inhibits the transcription of related genes and regulates the expression of genes involved in the development of various tissues and organs. A better understanding of the molecular mechanism that controls heart development, coupled with an identification of novel roles of Polycomb, could provide the new insight for congenital heart diseases. Here, we mainly expound the relationship between the Polycomb protein complexes and heart development from the perspective of epigenetics.

epigenetics, heart development, Polycomb

doi: 10.1360/N052015-00026