

# HOXB6启动人胚胎干细胞向中胚层分化

陈肖源 温玉琪 夏美娟 王洪涛 王梦鸽 周家喜\*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室,  
国家血液系统疾病临床医学研究中心, 天津 300020)

**摘要** *HOXB6*在胚胎发育过程中发挥重要作用,但在人胚胎干细胞中胚层分化中的作用尚不清楚。该研究利用人胚胎干细胞中胚层分化模型结合RNA-seq分析发现, *HOXB6*在中胚层分化过程中显著上调,敲降*HOXB6*的表达抑制人胚胎干细胞向中胚层分化,提示*HOXB6*在中胚层分化过程中发挥功能。通过建立*HOXB6*诱导性过表达的人胚胎干细胞株发现, *HOXB6*过表达抑制人胚胎干细胞多能性标志分子的表达,并且显著上调中胚层标志分子的表达。该研究表明, *HOXB6*单独过表达能够启动人胚胎干细胞向中胚层分化,为理解人类早期发育和建立人胚胎干细胞高效诱导分化体系提供了理论依据。

**关键词** 人胚胎干细胞; 中胚层分化; *HOXB6*

## HOXB6 Initiates Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Mesoderm

CHEN Xiaoyuan, WEN Yuqi, XIA Meijuan, WANG Hongtao, WANG Mengge, ZHOU Jiayi\*

(Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Tianjin 300020, China)

**Abstract** Although *HOXB6* plays an important role in embryonic development, its function in the mesoderm differentiation of hESCs (human embryonic stem cells) remains unclear. In this study, by taking advantage of hESC mesoderm differentiation model and RNA-seq analysis, *HOXB6* was found to be significantly up-regulated during the mesoderm differentiation of hESCs. In addition, *HOXB6* depletion inhibited the mesoderm differentiation of hESCs, implying that *HOXB6* was implicated in mesoderm differentiation. Through establishing a DOX (doxycycline) inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines, this study found that the enforced expression of *HOXB6* led to a significant downregulation of pluripotency markers, while dramatically increased the expression of mesoderm markers. This study reveals that *HOXB6* over-expression suffices to induce mesoderm differentiation in hESCs, providing a theoretical basis for understanding human early development and establishing an efficient differentiation system of hESCs.

**Keywords** human embryonic stem cells; mesoderm differentiation; *HOXB6*

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)具有自我更新能力和多向分化潜能,能够分化生成几乎人体所有细胞<sup>[1-2]</sup>。因此,人胚胎干细胞

为人类早期发育提供了重要的研究模型,同时为再生医学提供了理想的种子细胞。人胚胎干细胞在体外可以模拟原肠胚形成过程,在特定诱导分化条件

收稿日期: 2020-01-14 接受日期: 2020-04-26

国家自然科学基金(批准号: 81530008)资助的课题

\*通讯作者。E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

Received: January 14, 2020 Accepted: April 26, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.815300008)

\*Corresponding author. E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5263>

下可以被诱导,从而分化成内、中、外三个胚层的细胞,其中中胚层细胞进一步向下分化可以分化形成骨骼、心血管系统、造血系统等,且理解中胚层特化过程有利于体外再生相应的组织细胞<sup>[3-4]</sup>。然而,现阶段对人胚胎干细胞启动高效早期分化的分子机理知之甚少,极大程度限制了人胚胎干细胞高效分化产生各种组织干细胞和终末分化细胞。

人胚胎干细胞向中胚层分化受到信号通路和转录因子的精准调控。研究表明,BMP信号通路对于中胚层分化启动至关重要,Activin A信号通路能够协同BMP信号通路调控中胚层发生<sup>[5]</sup>。SHI等<sup>[6]</sup>发现,BMP信号通路的激活显著诱导*SNAIL2*(snail family transcriptional repressor 2)表达上调,敲低*SNAIL2*表达显著抑制人胚胎干细胞向中胚层分化。我们通过前期研究发现,肌节同源盒基因同系物2(*msh homeobox 2, MSX2*)在中胚层的诱导过程中发挥核心调控作用,单独过表达*MSX2*可以启动人胚胎干细胞向中胚层分化,并进一步分化产生功能完善的间充质干细胞<sup>[7-8]</sup>。因此,鉴定新的中胚层发生调控因子不仅有助于理解中胚层的分化过程,而且为体外再生中胚层来源的细胞提供了重要的工具。

同源异型盒基因(homeobox gene, *HOX*)最初是在果蝇中被发现的一类在进化过程中高度保守的基因,编码转录调控蛋白,被认为是生物体中一类专门调控生物形体的基因<sup>[9-10]</sup>。目前已经鉴定出4簇*HOX*基因:分别为*HOXA*、*HOXB*、*HOXC*、*HOXD*,它们串联排列在不同的染色体上,每簇包含9~11个基因<sup>[9-10]</sup>。研究发现,*HOX*家族基因在胚胎发育及肿瘤发生中发挥着重要的功能,如在胚胎发育过程中调控四肢、体轴等部位的发育<sup>[10-12]</sup>。*HOXB6*属于*HOXB*基因簇中的一员,在人类基因组中位于17号染色体上,编码224个氨基酸。DENG等<sup>[13]</sup>在小鼠胚胎干细胞的研究中发现,*Hoxb*位点相关的lincRNA-*HoxBlin*c RNA通过调节*Hoxb*基因的转录进而调控心源性/血源性中胚层分化,表明*Hoxb*家族基因在中胚层发育中发挥重要作用。LOWE等<sup>[14]</sup>利用*Hoxb6-cre*转基因小鼠发现,*Hoxb6*在小鼠中胚层中也有显著表达,提示*Hoxb6*可能在中胚层发生过程中发挥功能。然而,*HOXB6*在中胚层分化中的作用尚不清楚。

本研究利用前期建立的人胚胎干细胞向中胚层分化的模型作为研究基础,通过RNA-seq分析发现,*HOXB6*在人胚胎干细胞中胚层分化过程中表达显著

上调,敲降*HOXB6*的表达能够抑制人胚胎干细胞向中胚层分化,提示*HOXB6*是调控人胚胎干细胞中胚层分化的重要调控分子。随后我们建立了*HOXB6*诱导性过表达的人胚胎干细胞株,证实单独过表达*HOXB6*能够启动人胚胎干细胞向中胚层分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人胚胎干细胞系H1购自Wicell研究所;293T细胞系购自ATCC;培养基mTeSR、Custom mTeSR均购自Stem Cell Technologies公司;RPMI/B27购自Gibco公司;消化酶Dispase和Accutase均购自Stem Cell Technologies公司;Matrigel基质、Growth Factor Reduced Matrigel基质均购自BD公司;培养基DMEM/F12购自Gibco公司;生长因子ActivinA、BMP4购自Peprotech公司;Y27632购自SELLECK公司;TRIzol™ Reagent购自Invitrogen公司;DAPI购自Solarbio公司;Triton X-100购自Solarbio公司;L-glutamin、KnockOut™ serum replacement、Non-Essential Amino Acids Solution, 100X购自Gibco公司;PowerUp SYBR™ Green Master Mix购自Applied Biosystems公司。

### 1.2 人胚胎干细胞培养及传代

人胚胎干细胞培养:将人胚胎干细胞系H1接种至已经包被好Matrigel基质的培养板中,培养基为mTeSR,培养条件为37 °C、5% CO<sub>2</sub>,每24 h更换一次培养基。3~5天后,克隆长大并进行传代。

人胚胎干细胞传代过程包括单细胞传代和克隆传代。单细胞传代:将人胚胎干细胞克隆用1 mg/mL Accutase酶消化成单个细胞,用DMEM/F12培养基稀释以终止酶反应,离心后用mTeSR培养基+Y27632(5 μmol/mL)重悬细胞沉淀,计数后将细胞以一定密度接种至已经铺好Matrigel基质的细胞培养孔板中。克隆传代:将人胚胎干细胞克隆用2 U/mL蛋白水解酶(Dispase)消化至克隆卷边,用DMEM/F12稀释以终止酶反应,使用剪口1 mL的枪尖吹或刮起细胞克隆,离心后用mTeSR培养基重悬细胞沉淀,将细胞以一定密度接种至已经铺好Matrigel基质的细胞培养孔板中。

### 1.3 诱导人胚胎干细胞向中胚层分化

诱导人胚胎干细胞向中胚层分化的具体操作如下:人胚胎干细胞克隆用1 mg/mL Accutase酶消

化成单个细胞,用DMEM/F12培养基稀释终止酶反应后,1 930 r/min离心5 min,并用mTeSR培养基+Y27632(5  $\mu$ mol/mL)重悬细胞沉淀,细胞计数后以3.3万个/孔(12孔板)的密度接种至已经铺好Growth Factor Reduced Matrigel基质的12孔板中,24 h后细胞贴壁,此时更换培养基为添加有50 ng/mL Activin A和40 ng/mL BMP4生长因子的Custom mTeSR以诱导人胚胎干细胞向中胚层分化48 h即可<sup>[15]</sup>。

#### 1.4 诱导人胚胎干细胞向外胚层分化

诱导人胚胎干细胞向外胚层分化的具体操作如下:人胚胎干细胞克隆用1 mg/mL Accutase酶消化成单个细胞,用DMEM/F12培养基稀释终止酶反应后,离心并用mTeSR培养基+Y27632(5  $\mu$ mol/mL)重悬细胞沉淀,细胞计数后以 $1 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种至已经铺好Matrigel基质的细胞培养板中,24 h后细胞贴壁,撤回Y-27632并每24 h更换mTeSR培养基至人胚胎干细胞密度达到70%~80%。随后用含有20% KnockOut™ serum replacement(血清替代物)、1 mmol L-glutamin、1%非必需氨基酸和0.1 mmol  $\beta$ -巯基乙醇的DMEM/F12培养基代替mTeSR培养基来启动外胚层分化,每24 h更换培养基至分化第5天<sup>[16]</sup>。

#### 1.5 诱导人胚胎干细胞向内胚层分化

人胚胎干细胞克隆用1 mg/mL Accutase酶消化成单个细胞,用DMEM/F12培养基稀释终止酶反应后,离心并用mTeSR培养基+Y27632(5  $\mu$ mol/mL)重悬细胞沉淀,细胞计数后以3.3万个/孔(12孔板)的密度接种至已经铺好生长因子人工基质(Growth Factor Reduced Matrigel)的12孔板中,24 h后细胞贴壁,此时更换培养基为添加100 ng/mL Activin A生长因子的RPMI/B27以诱导人胚胎干细胞向内胚层分化72 h即可<sup>[17]</sup>。

#### 1.6 RNA-seq分析

收集 $2 \times 10^6$ 个人胚胎干细胞和向中胚层分化48 h后的细胞,离心后用1 mL Trizol裂解细胞沉淀并将其

冻存在-80 °C冰箱中以待提取RNA。进行RNA提取时,将细胞裂解液转移至室温,等待其融化成液体后悬滴加入200  $\mu$ L氯仿,剧烈振荡液体以充分萃取。于4 °C、12 000 r/min离心15 min后,可见液体出现明显分层,依次为:上层——无色——RNA层、中间层——白色——蛋白层、下层——红色——有机物层。小心将RNA层无色上清液转移至新的EP管中,随后加入与上清液等体积的异丙醇,温和上下颠倒几下,常温静置10 min后,于4 °C、12 000 r/min离心10 min,底部可见RNA沉淀析出。弃上清,加入1 mL 75%乙醇洗去残余有机溶剂,于4 °C、12 000 r/min离心5 min。弃上清,再次加入75%乙醇,在4 °C、12 000 r/min条件下离心5 min。弃上清,在超净台中晾干残余液体,然后加入15  $\mu$ L无酶水,弹一弹管壁,使RNA溶解。用Nanodrop测量RNA浓度。使用Bioanalyzer检测总RNA的质量,将RNA完整性系数(RNA integrity number, RIN)大于8的RNA样本送至华大基因进行转录组测序。基因热图使用Heml软件基于转录因子的相对表达量log<sub>2</sub>绘制。

#### 1.7 HOXB6敲降人胚胎干细胞株的构建及分化

将HOXB6 shRNA连接至PLKO-Tet-On质粒载体上,构建PLKO-Tet-On-shRNA质粒,并进行测序确保质粒构建成功。将质粒进行慢病毒包装后感染人胚胎干细胞,感染24 h后,用嘌呤霉素(1  $\mu$ g/mL)进行筛选,随后每24 h更换培养基并逐渐增加嘌呤霉素浓度至3  $\mu$ g/mL,待细胞不再死亡逐渐长大后进行细胞传代,用于后续实验。其中shRNA的序列如表1所示。

HOXB6敲降人胚胎干细胞株的中胚层分化过程如“1.3”所述,添加BMP4和Activin A诱导中胚层分化,并在分化过程中添加2  $\mu$ g/mL浓度的多西环素(doxycycline, DOX)诱导HOXB6的敲降。

#### 1.8 pLVX-tight-HOXB6-p2A-GFP-Puro质粒的构建

从长沙泽琼生物科技有限公司购买得到HOXB6-Teasy质粒,设计引物通过PCR得到HOXB6片段,并将BamH I和Xba I酶切位点通过PCR连接在片段两端,

表1 HOXB6 shRNA序列

Table 1 The sequences of HOXB6 shRNAs

| 短发夹RNA<br>shRNA | 序列(5'→3')<br>Sequences (5'→3')  |
|-----------------|---|
| HOXB6 shRNA-1 F | CCG GCG GAG AGG CAG ATC AAG ATA TCT CGA GAT ATC TTG ATC TGC CTC TCC GTT TTT G |
| HOXB6 shRNA-1 R | AAT TCA AAA ACG GAG AGG CAG ATC AAG ATA TCT CGA GAT ATC TTG ATC TGC CTC TCC G |
| HOXB6 shRNA-2 F | CCG GTT TGC CAC TTC CTC CTA TTA CCT CGA GGT AAT AGG AGG AAG TGG CAA AIT TTT G |
| HOXB6 shRNA-2 R | AAT TCA AAA ATT TGC CAC TTC CTC CTA TTA CCT CGA GGT AAT AGG AGG AAG TGG CAA A |

pLVX-Tight-p2A-GFP-Puro原始环状质粒用 *Bam*H I和 *Xba* I酶切后回收载体(其中 *Bam*H I和 *Xba* I酶切位点位于 pLVX-Tight和 p2A之间), 两个片段用 T4 DNA连接酶进行连接构建成 pLVX-tight-*HOXB6*-p2A-GFP-Puro质粒。转化后挑取单个菌落克隆进行测序鉴定, 鉴定成功的菌液进行保种, 并提取质粒进行后续实验。

### 1.9 诱导性 *HOXB6* 过表达人胚胎干细胞株的构建

将构建成功的 pLVX-tight-*HOXB6*-p2A-GFP-Puro质粒与 Tet-on反式激活因子表达质粒(sin-EF1a-rtTA)分别进行慢病毒包装, 用两种病毒共同感染人胚胎干细胞株 H1。24 h后, 用嘌呤霉素(1  $\mu$ g/mL)和 G418(300  $\mu$ g/mL)进行共同筛选, 随后每 24 h 更换培养基, 并逐渐增加嘌呤霉素浓度至 3  $\mu$ g/mL, 增加 G418浓度至 400  $\mu$ g/mL。单细胞传代后挑取单个克隆进行培养, 至克隆长大后一分为二进行单细胞传代, 一份冻存保种用于将来扩增, 一份添加 2  $\mu$ g/mL DOX进行验证, 选取添加 DOX后表达绿色荧光的克隆进行扩增以此获得稳定细胞株。

### 1.10 添加 DOX 诱导人胚胎干细胞过表达 *HOXB6*

在已经构建的 *HOXB6* 诱导性过表达人胚胎干细胞株中, 在维持细胞自我更新的 mTeSR 培养基中添加 2  $\mu$ g/mL 浓度的 DOX 以诱导 *HOXB6* 的过表达。

### 1.11 流式细胞术

将贴壁细胞用 1 mg/mL Accutase 酶消化成单个细胞, 用 PBS 稀释终止酶反应后, 将细胞吹散成单细胞重悬至 EP 管中, 于 1 930 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 100  $\mu$ L 0.2% BSA 重悬细胞沉淀以待检测上机。上机前 10 min 在细胞悬液中加入 DAPI 以标记死细胞, 随后在 FACSCanto™ II 流式细胞仪(BD Biosciences)上检测绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达。使用 FlowJo-V 10 软件进行流式数据分析。

### 1.12 qRT-PCR 分析

采用 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 试剂盒(Invitrogen, A25742)进行 qRT-PCR 反应, 反应体系如下: 5  $\mu$ L 2 $\times$  PowerUp SYBR Green Master Mix、0.5  $\mu$ L 正向引物(10  $\mu$ mol)、0.5  $\mu$ L 反向引物(10  $\mu$ mol)、1  $\mu$ g cDNA、ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu$ L。反应程序如下: 50 °C 下 UDG 酶激活 2 min; 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 1 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 变性和退火/延伸步骤循环 40 次。qRT-PCR 反应在 QuantStudio™ 6 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 以  $\beta$ -actin 为内参进行数据计算。qRT-PCR 所使用的引物序列见表 2。

### 1.13 病毒包装与感染

采用脂质体法包装慢病毒, 将 293T 细胞传代至 10 cm 细胞培养皿中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 待 293T 细胞生长密度达到 70%~80% 时进行病毒包装。以一盘 293T 细胞为例, A 管将 30  $\mu$ L fugene HD 和 450  $\mu$ L Opti-MEM 混合后静置 5 min, B 管加入 3.75  $\mu$ g 包装质粒 PSPAX2、1.25  $\mu$ g 包装质粒 PMD2G 以及 5  $\mu$ g 目的质粒与 150  $\mu$ L Opti-MEM 混合均匀。将 A、B 两管液体混合均匀后加入到密度为 70% 的 293T 细胞中, 缓慢摇匀后置于 37 °C 细胞培养箱中。12 h 后更换培养液为含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 48 h 后, 于 20 000 r/min 高速离心 2 h 收集培养基上清, 获得病毒液。

病毒感染: 将获得的病毒液加入人胚胎干细胞中, 并添加 polybrene(3  $\mu$ g/mL)以提高感染效率, 感染后约 24 h 更换新鲜培养基, 于 48 h 后进行药物筛选。

### 1.14 细胞免疫荧光染色

用 4% 组织细胞固定液室温固定细胞 20 min 后, 用 PBS 洗涤 3 次。添加 0.2% Triton X-100 于室温通透细胞 15 min 后用 PBS 洗涤 3 次。用 2% BSA 于室温封闭细胞 1 h 后, 用 0.2% BSA 以 1:200 比例稀释一抗并进行细胞标抗, 在 4 °C 冰箱中孵育过夜。次日用 PBS 洗涤 3 次后, 荧光二抗以 1:1 000 稀释比例用 0.2% BSA 稀释后进行细胞标抗(根据一抗的种属来源选择对应的荧光二抗), 于室温孵育 50 min 后以 1:1 000 比例加入 DAPI, 于室温染色 10 min 后用 PBS 洗涤 3 次即可用 UltraVIEW Vox 转盘式共聚焦显微实时成像仪拍照观察。

### 1.15 统计学分析

本研究利用 GraphPad Prism 5 软件进行图形绘制和统计学分析。实验数据均进行 3 次或 3 次以上独立重复, 以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )展示, 采用 *t* 检验进行差异比较。 $P < 0.05$  表示具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 *HOXB6* 在人胚胎干细胞向中胚层分化过程中表达显著上调

本研究组前期利用 BMP4 和 Activin A 建立了高效的人胚胎干细胞中胚层诱导分化体系(图 1A)。如图 1B, 通过形态观察可见在人胚胎干细胞向中胚层诱导分化第 2 天的细胞向四周有明显的铺展。为了探究中胚层发生潜在调控分子, 本研究收集人胚胎干细胞向中胚层诱导分化第 0 天的人胚胎干细胞

表2 qRT-PCR引物序列  
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

| 引物<br>Primer     | 序列(5'→3')<br>Sequence (5'→3')          |
|------------------|--|
| <i>NANOG</i> -F  | TTT GTG GGC CTG AAG AAA ACT            |
| <i>NANOG</i> -R  | AGG GCT GTC CTG AAT AAG CAG            |
| <i>POU5F1</i> -F | CTT GAA TCC CGA ATG GAA AGG G          |
| <i>POU5F1</i> -R | GTG TAT ATC CCA GGG TGA TCC T C        |
| <i>T gene</i> -F | CTG GGT ACT CCC AAT GGG G              |
| <i>T gene</i> -R | GGT TGG AGA ATT GTT CCG ATG A          |
| <i>MIXL1</i> -F  | TTT GGC TAG GCC GGA GAT TAT            |
| <i>MIXL1</i> -R  | GGG CTT CAG ACA TTT CGT TTC AG         |
| <i>PAX6</i> -F   | ATG TGT GAG TAA AAT TCT GGG CA         |
| <i>PAX6</i> -R   | GCT TAC AAC TTC TGG AGT CGC TA         |
| <i>GATA6</i> -F  | CTC AGT TCC TAC GCT TCG CAT            |
| <i>GATA6</i> -R  | GTC GAG GTC AGT GAA CAG CA             |
| <i>HOXB6</i> -F  | AGC AGC CCC CGT TCC A                  |
| <i>HOXB6</i> -R  | AAA GGA GGA ACT GTT GCA CGA AT         |
| <i>HOXB2</i> -F  | TCC TTG GCC GTC TAC TGG AA             |
| <i>HOXB2</i> -R  | AGT GGA TTA AAC GCT AAT TCA GTA ATA CC |
| <i>HOXB9</i> -F  | AGG CCG TGC TGT CTA ATC AAA            |
| <i>HOXB9</i> -R  | CGA GCG TGC AGC CAG TT                 |
| <i>ACTIN</i> -F  | CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT             |
| <i>ACTIN</i> -R  | AGC ACT GTG TGT TGG CGT ACA G          |

和第2天分化至中胚层阶段的细胞进行RNA-seq(图1A)。如图1C和图1D所示, RNA-seq分析表明, 与未分化细胞相比, 诱导分化第2天的细胞多能性标志基因NANOG同源框(nanog homeobox, *NANOG*)和POU第5类同源框1(POU class 5 homeobox 1, *POU5F1*)的表达显著下调, 而中胚层标志基因T-box转录因子T(T-box transcription factor T, *T*)、*MESPI*(mesoderm posterior bHLH transcription factor 1)、脱中胚蛋白(eomesodermin, *EOMES*)的表达显著上调。进一步分析发现, HOXB家族基因表达在中胚层诱导分化过程中呈整体上调趋势(图1E)。

随后, 我们通过qRT-PCR对RNA-seq数据进行实验验证, 结果显示了在中胚层诱导分化过程中多能性标志基因的下调和中胚层标志基因的上调(图1F)。如图1G所示, HOXB家族基因*HOXB6*、*HOXB2*、*HOXB9*的表达在中胚层诱导分化过程中逐渐上调, 其中*HOXB6*表达上调最为显著。为了探究*HOXB6*在中胚层分化过程中的作用, 我们利用shRNA在人胚胎干细胞中敲减*HOXB6*基因的表达后, 添加BMP4和Activin A诱导中胚层分化, 并检测敲减*HOXB6*对中胚层分化的影响。如图1H所示,

两个针对*HOXB6*的shRNA均能有效抑制*HOXB6*的表达。如图1I所示, 中胚层分化Day2 *HOXB6*敲减组中胚层标志基因T、*MIXL1*(Mix paired-like homeobox)、*EOMES*的表达低于对照组, 说明敲减*HOXB6*能够抑制人胚胎干细胞向中胚层分化, 提示我们*HOXB6*在人胚胎干细胞向中胚层分化过程中发挥重要作用。

## 2.2 成功构建*HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞株

前期的RNA-seq数据分析和*HOXB6*敲降实验结果表明, *HOXB6*在中胚层发生过程中发挥重要功能。为了进一步探究*HOXB6*的作用, 我们利用Tet-on DOX诱导系统构建了*HOXB6*诱导性过表达的人胚胎干细胞株。

如图2A所示, 我们首先构建了pLVX-tight-HOXB6-p2A-GFP-Puro质粒, 将此质粒与Tet-on反式激活因子表达质粒(Psin-EF1a-rtTA)分别进行慢病毒包装, 将两种病毒共同感染人胚胎干细胞株H1, 经过嘌呤霉素和G418进行共同筛选后进行单细胞传代, 选取添加DOX后表达绿色荧光的单克隆进行扩增获得稳定细胞株。如图2B所示, 添加DOX可显著诱导细

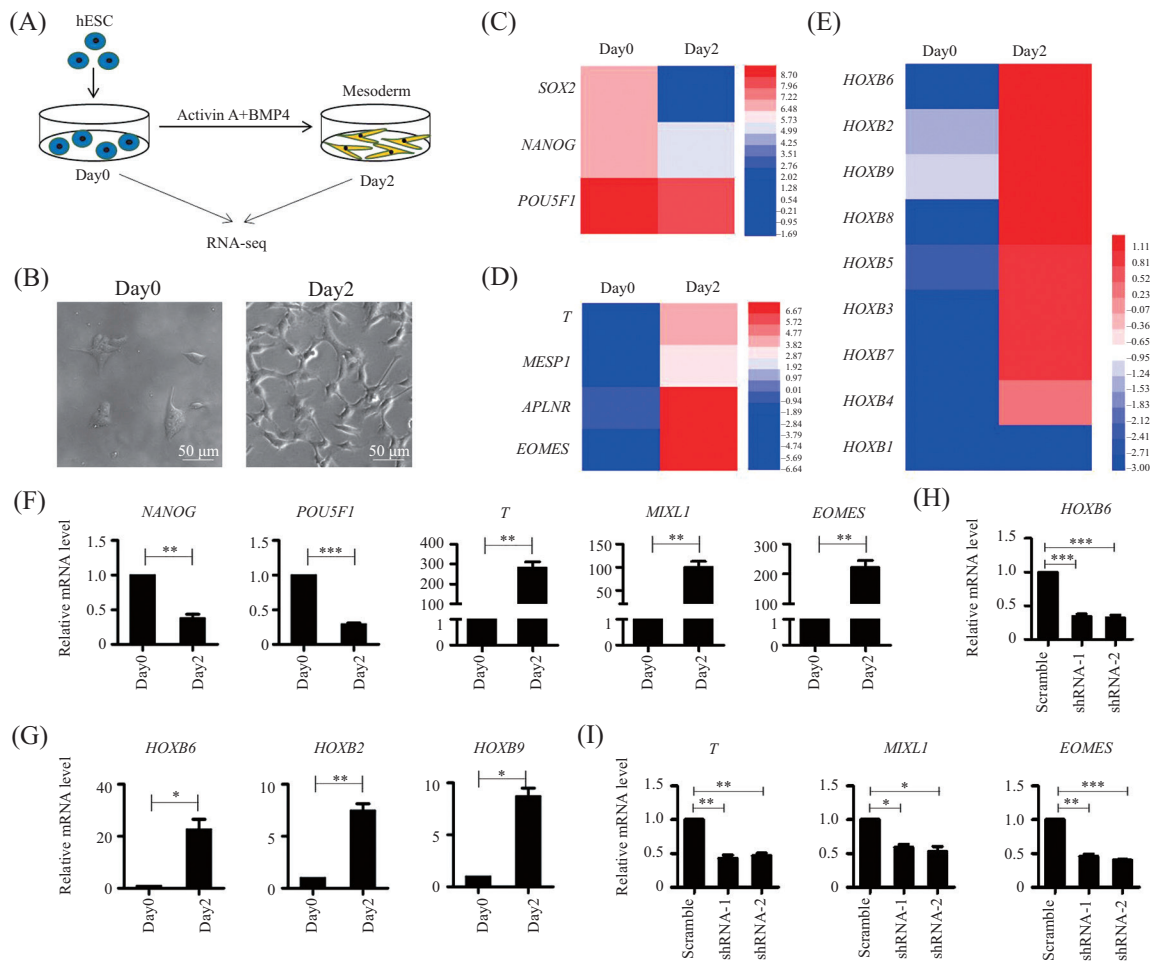


图1 *HOXB6* 在人胚胎干细胞向中胚层分化过程中表达显著上调

A: 人胚胎干细胞向中胚层分化示意图; B: 人胚胎干细胞向中胚层分化形态图; C: RNA-seq 分析人胚胎干细胞向中胚层分化过程多能性基因的动态变化; D: RNA-seq 分析人胚胎干细胞向中胚层分化过程中胚层基因的动态变化; E: RNA-seq 分析人胚胎干细胞向中胚层分化过程 *HOXB* 家族基因的动态变化; F: qRT-PCR 检测人胚胎干细胞向中胚层分化过程多能性标志基因 (*NANOG*、*POU5F1*)、中胚层标志基因 (*T*、*MIXL1*、*EOMES*) 的表达; G: qRT-PCR 检测人胚胎干细胞向中胚层分化过程 *HOXB6*、*HOXB2*、*HOXB9* 基因的表达; H: qRT-PCR 检测敲降 *HOXB6* 的人胚胎细胞株诱导中胚层分化后 *HOXB6* 的表达情况; I: qRT-PCR 检测敲降 *HOXB6* 的人胚胎细胞株诱导中胚层分化后 *T*、*MIXL1* 和 *EOMES* 的表达情况。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: schematic diagram of the mesoderm differentiation of hESCs; B: morphology of the mesoderm differentiation of hESCs; C: RNA-seq analysis of the dynamic changes of pluripotent genes during the mesoderm differentiation of hESCs; D: RNA-seq analysis of the dynamic changes of germ layer genes during the mesoderm differentiation of hESCs; E: RNA-seq analysis of the dynamic changes of *HOXB* family genes during the mesoderm differentiation of hESCs; F: qRT-PCR was used to detect the expression of pluripotency marker genes (*NANOG*, *POU5F1*) and mesoderm marker genes (*T*, *MIXL1*, *EOMES*) during the mesoderm differentiation of hESCs; G: qRT-PCR was used to detect the expression of *HOXB6*, *HOXB2* and *HOXB9* genes during the mesoderm differentiation of hESCs; H: qRT-PCR was used to detect the expression of *HOXB6* during the mesoderm differentiation of *HOXB6* knockdown human embryonic stem cell line; I: qRT-PCR was used to detect the expression of *T*, *MIXL1* and *EOMES* during the mesoderm differentiation of *HOXB6* knockdown human embryonic stem cell line. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图1 *HOXB6* 在人胚胎干细胞向中胚层分化过程中表达显著上调

Fig.1 *HOXB6* expression is significantly up-regulated during the mesoderm differentiation of hESCs

胞中 *HOXB6-GFP* 的表达, 阳性率高达 85% 以上。如图 2C 所示, qRT-PCR 进一步验证了 DOX 以剂量依赖方式诱导 *HOXB6* 的表达, 证实我们已成功构建 *HOXB6* 诱导性过表达人胚胎干细胞株。免疫荧光实验结果表明, 在不添加 DOX 条件下, *HOXB6* 诱导性过表达人胚胎干细胞能过正常表达多能性标志分子 *NANOG* 和 *OCT4* (图 2D)。随后我们将该细胞株分别向中、外、

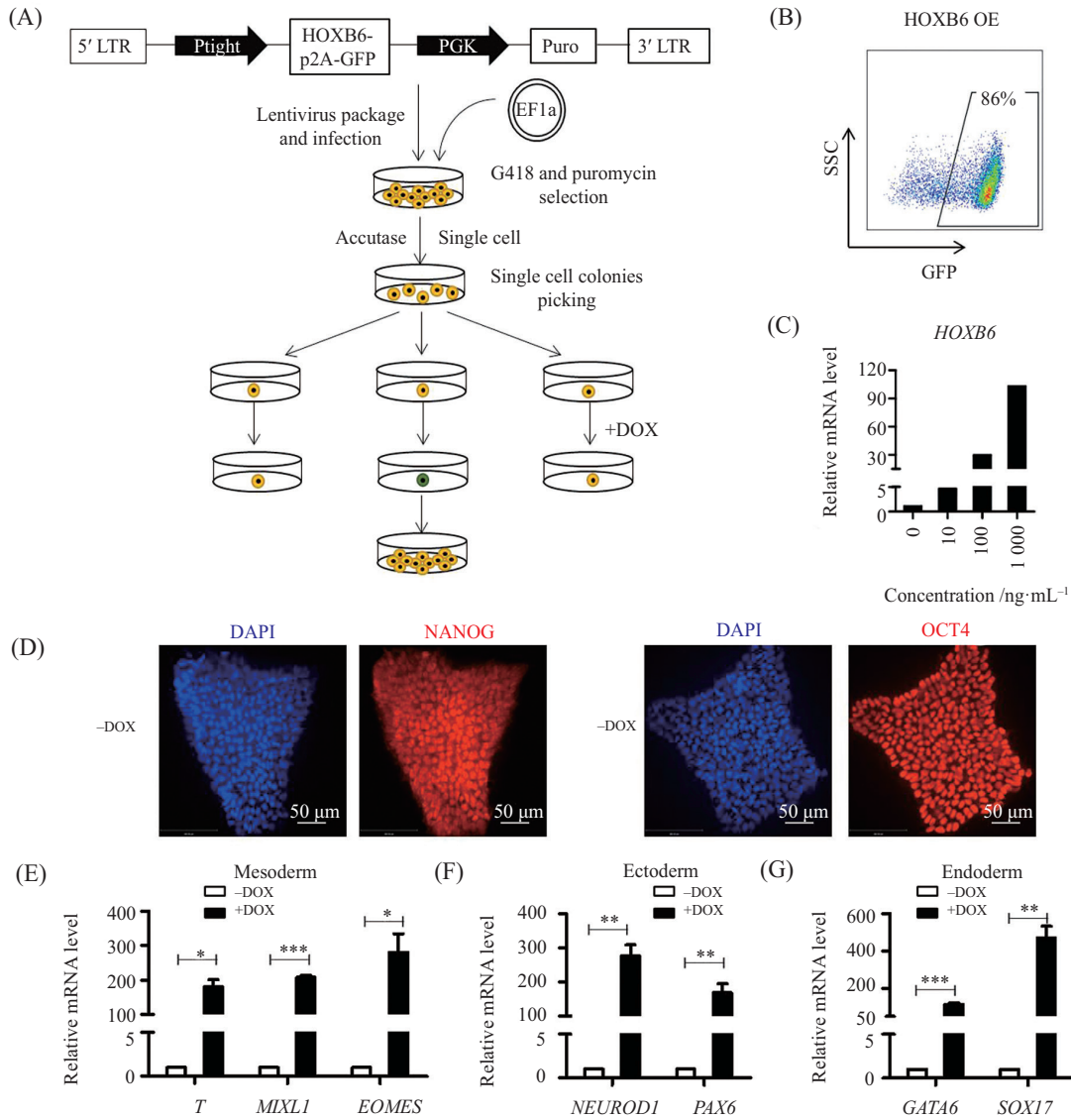
内 3 个不同胚层诱导分化, qRT-PCR 成功检测到相应胚层标志性基因的表达上调 (图 2E~图 2G), 证明该细胞株在不添加 DOX 条件下可以维持多能性且保持多向分化潜能, 可以用于后续分化实验。

### 2.3 *HOXB6* 过表达促使人胚胎干细胞退出多能性, 启动中胚层分化

为了探究 *HOXB6* 过表达对人胚胎干细胞的影

响,我们在人胚胎干细胞自我更新培养条件下,在构建好的*HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞株中添加DOX诱导*HOXB6*的过表达。如图3A所示,形态观

察发现过表达*HOXB6* 72 h后人胚胎干细胞的形态发生明显变化,从紧密规则的克隆样变成疏松扁平的间质样细胞,提示*HOXB6*过表达促使人胚胎干细



A: *HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞构建示意图; B: 流式检测*HOXB6*诱导性人胚胎干细胞株添加DOX后的GFP荧光表达; C: qRT-PCR检测*HOXB6*诱导性人胚胎干细胞株添加不同浓度DOX后*HOXB6* mRNA的表达情况; D: 免疫荧光实验检测在不添加DOX条件下诱导性*HOXB6*过表达人胚胎干细胞中NANOG、OCT4的表达情况; E: qRT-PCR检测将*HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞向中胚层诱导分化后中胚层特异性基因*T*、*MIXL1*、*EOMES*的表达情况; F: qRT-PCR检测将*HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞向外胚层诱导分化后外胚层特异性基因*NEUROD1*、*PAX6*的表达情况; G: qRT-PCR检测将诱导性*HOXB6*过表达人胚胎干细胞向内胚层诱导分化后内胚层特异性基因*GATA6*、*SOX17*的表达情况。图E~图G中白色柱子代表分化前的基因表达情况,黑色柱子代表分化后基因表达情况。\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001。

A: schematic diagram of the construction of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines; B: flow cytometry detection of GFP expression in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX; C: qRT-PCR was used to detect *HOXB6* expression in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX; D: immunofluorescence was used to detect the expression of NANOG and OCT4 in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines; E: qRT-PCR was used to detect the expression of mesoderm-specific genes *T*, *MIXL1* and *EOMES* during the mesoderm differentiation of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines; F: qRT-PCR was used to detect the expression of ectoderm-specific genes *NEUROD1* and *PAX6* during the ectoderm differentiation of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines; G: qRT-PCR was used to detect the expression of endoderm-specific genes *GATA6* and *SOX17* during the endoderm differentiation of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines. The white bars in Fig.E~Fig.G represent the gene expression before differentiation, and the black bars represent the gene expression after differentiation. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

图2 成功构建*HOXB6*诱导性过表达人胚胎干细胞株

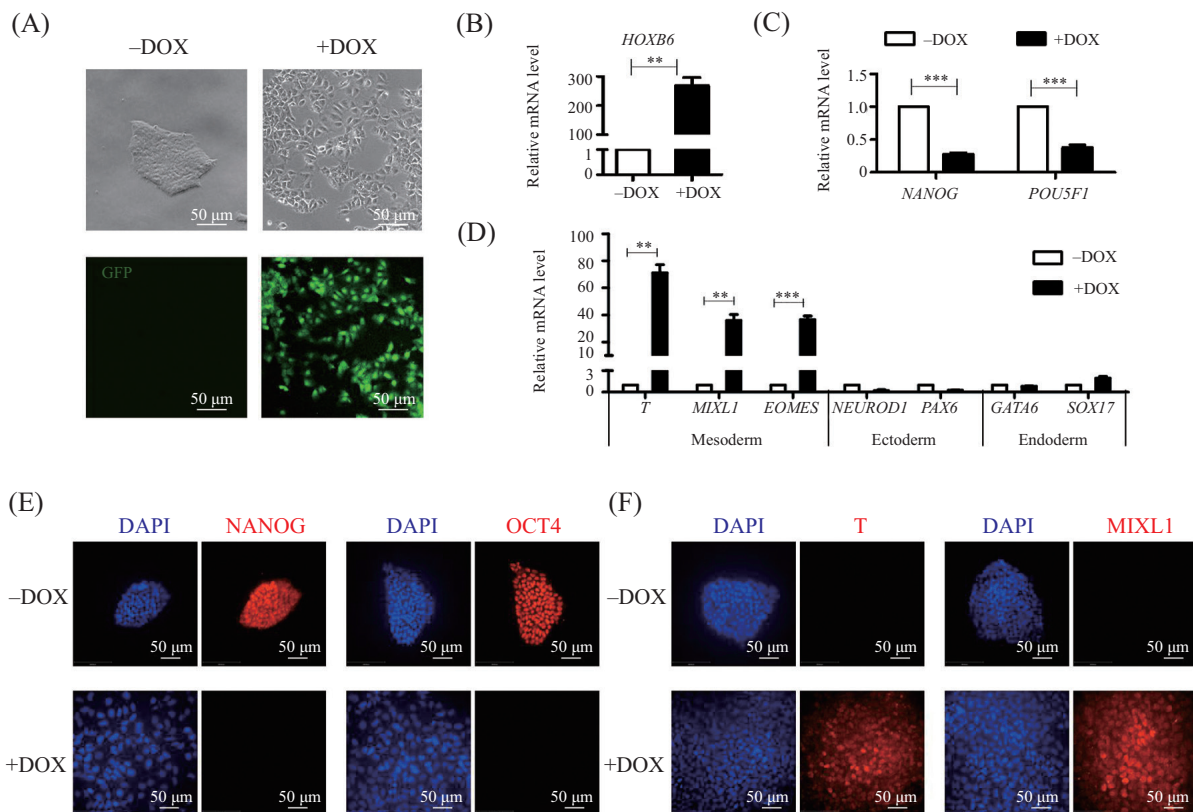
Fig.2 Construction of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines

胞多能性丢失。因此, 我们利用qRT-PCR检测细胞添加DOX诱导*HOXB6*过表达72 h后多能性标志基因和中、外、内三个不同胚层各自标志基因的表达变化。结果显示, 添加DOX可以诱导*HOXB6*的表达(图3B), 且*HOXB6*过表达使多能性标志基因*NANOG*、*POU5F1*的表达显著降低(图3C), 证实*HOXB6*过表达促使人胚胎干细胞丧失多能性。为了验证过表达*HOXB6*后人胚胎干细胞具体向哪一胚层分化, 我们进行qRT-PCR检测人胚胎干细胞过表达*HOXB6* 72 h后中、外、内三个不同胚层各自标志基因的表达情况。如图3D所示, *HOXB6*过表达显著诱导中胚层标

志基因*T*、*MIXL1*、*EOMES*的表达, 而对内胚层和外胚层的标志基因的表达并无显著影响, 说明*HOXB6*过表达可以启动中胚层分化。免疫荧光实验同样表明, 在人胚胎干细胞中添加DOX诱导*HOXB6*过表达导致多能性基因*NANOG*和*OCT4*的蛋白表达下降, 中胚层标志分子*T*和*MIXL1*的蛋白表达增高(图3E和图3F)。以上结果表明, *HOXB6*单独过表达促使人胚胎干细胞丧失多能性, 启动中胚层分化。

### 3 讨论

本研究利用人胚胎干细胞中胚层分化模型结



A: 人胚胎干细胞中添加DOX诱导*HOXB6*过表达后细胞形态发生改变; B: qRT-PCR检测添加DOX诱导*HOXB6*过表达72 h后*HOXB6*的表达情况; C: qRT-PCR检测添加DOX诱导*HOXB6*过表达72 h后多能性标志分子表达情况; D: qRT-PCR检测添加DOX诱导*HOXB6*过表达72 h后中胚层特异性基因*T*、*MIXL1*、*EOMES*, 外胚层特异性基因*NEUROD1*、*PAX6*和内胚层特异性基因*GATA6*、*SOX17*的表达情况; E: 添加DOX诱导*HOXB6*过表达后, 多能性基因*NANOG*、*OCT4*蛋白的表达下降; F: 添加DOX诱导*HOXB6*过表达后, 中胚层特异性基因*T*和*MIXL1*的蛋白表达上调。\*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: cell morphology changes of inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX to induce *HOXB6* overexpression; B: qRT-PCR was used to detect *HOXB6* expression in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX for 72 h; C: qRT-PCR was used to detect the expression of pluripotency marker genes in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX for 72 h; D: qRT-PCR was used to detect the expression of mesoderm-specific genes *T*, *MIXL1*, *EOMES*, ectoderm-specific genes *NEUROD1*, *PAX6* and endoderm-specific genes *GATA6*, *SOX17* in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX for 72 h; E: the expression of pluripotency genes *NANOG* and *OCT4* protein decreased in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX to induce *HOXB6* overexpression; F: the protein expression of mesoderm-specific genes *T* and *MIXL1* was up-regulated in inducible *HOXB6*-overexpressed hESC lines after adding DOX to induce *HOXB6* overexpression. \*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ .

图3 *HOXB6*过表达促使人胚胎干细胞退出多能性, 启动中胚层分化

Fig.3 *HOXB6* overexpression promotes hESCs to withdraw from pluripotency and initiate mesoderm differentiation



合RNA-seq分析发现, *HOXB6*在中胚层诱导分化过程中显著上调。为了探究*HOXB6*在中胚层分化过程中的作用, 我们利用shRNA在人胚胎干细胞中敲降*HOXB6*, 发现敲降*HOXB6*抑制人胚胎干细胞向中胚层分化, 提示*HOXB6*在人胚胎干细胞中胚层分化过程中发挥重要作用。为了进一步探究*HOXB6*的功能, 本研究利用Tet-on DOX诱导系统建立了*HOXB6*诱导性过表达的人胚胎干细胞株。通过形态观察发现, *HOXB6*过表达使人胚胎干细胞由紧密规则的克隆样变成疏松扁平的间质样细胞, qRT-PCR和免疫荧光实验证实, *HOXB6*过表达使人胚胎干细胞多能性标志基因的表达下降, 而中胚层特异性标志基因的表达上升。这些结果表明, *HOXB6*过表达促使人胚胎干细胞退出多能性, 启动中胚层分化。

中胚层是胚胎发育早期介于外胚层和内胚层之间的结构, 是形成各种组织的细胞来源, 包括心脏、血管系统和血液系统等, 解析人胚胎干细胞向中胚层分化的调控机制对于人体发育研究及组织器官再生均具有重要意义<sup>[18-19]</sup>。利用人胚胎干细胞中胚层分化体系, 我们之前鉴定到中胚层发生的核心调控因子MSX2<sup>[7]</sup>。为了进一步鉴定中胚层发生的调控因子, 本研究利用人胚胎干细胞中胚层分化模型结合RNA-seq分析, 发现了HOXB家族基因在中胚层诱导分化过程中显著上调。2006年, IIMURA等<sup>[20]</sup>发现, 在鸡胚发育早期*Hoxb*基因的共线激活导致外胚层前体迁移到原条中进行中胚层特化, 并且在青蛙和小鼠胚胎中也观察到类似的*Hoxb*基因的共线激活, 表明该研究在脊椎动物中是保守的。2016年, DENG等<sup>[13]</sup>在小鼠胚胎干细胞的研究中发现了*Hoxb*位点相关的lincRNA-*HoxBlinc* RNA通过调节局部染色质的改变来调节*Hoxb*基因的转录, 并且通过Wnt/NOTCH信号通路和Hox通路调控心源性/血源性中胚层分化, 当*HoxBlinc* RNA受到抑制时, 中胚层衍生受到干扰, 导致早期细胞谱系的阻滞。这些研究表明, HOXB家族基因在中胚层发育中发挥作用。2000年, LOWE等<sup>[14]</sup>利用*Hoxb6-cre*转基因小鼠发现*Hoxb6*在小鼠中胚层中也有显著表达。然而, *HOXB6*在中胚层分化中的作用尚不清楚。本研究揭示了在人胚胎干细胞中敲降*HOXB6*会抑制中胚层分化, 并且*HOXB6*过表达促使人胚胎干细胞退出多能性, 启动人胚胎干细胞向中胚层分化。该研究证实, *HOXB6*是人胚胎干细胞向中胚层分化的重要调控分子, 但是就*HOXB6*是通过何种机

理调控中胚层发生而言还需要进一步的研究。

综上所述, 本研究结果表明, *HOXB6*在人胚胎干细胞中胚层分化过程中发挥重要功能, 敲降*HOXB6*会抑制中胚层分化, 在人胚胎干细胞中过表达*HOXB6*能够促使其退出多能性状态向中胚层分化。本研究不仅增强了我们对人类早期发育调控机制的理解, 也为建立人胚胎干细胞的高效分化体系奠定了理论基础。

### 参考文献 (References)

- [1] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [2] YOUNG R A. Control of the embryonic stem cell state [J]. *Cell*, 2011, 144(6): 940-54.
- [3] DVASH T, BEN-YOSEF D, EIGES R. Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis [J]. *Pediatr Res*, 2006, 60(2): 111-7.
- [4] LEROU P H, DALEY G Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells [J]. *Blood Rev*, 2005, 19(6): 321-31.
- [5] ZHANG P, LI J, TAN Z, et al. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells [J]. *Blood*, 2008, 111(4): 1933-41.
- [6] SHI J, SEVERSON C, YANG J, et al. Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest [J]. *Development*, 2011, 138(15): 3135-45.
- [7] WU Q, ZHANG L, SU P, et al. MSX2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesoderm by simultaneously suppressing SOX2 and activating NODAL signaling [J]. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1314-32.
- [8] ZHANG L, WANG H, LIU C, et al. MSX2 initiates and accelerates mesenchymal stem/stromal cell specification of hPSCs by regulating TWIST1 and PRAME [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(2): 497-513.
- [9] KRUMLAUF R. Hox genes in vertebrate development [J]. *Cell*, 1994, 78(2): 191-201.
- [10] MALLO M. Reassessing the role of Hox genes during vertebrate development and evolution [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(3): 209-17.
- [11] SOSHNIKOVA N. Hox genes regulation in vertebrates [J]. *Dev Dyn*, 2014, 243(1): 49-58.
- [12] SHAH N, SUKUMAR S. The Hox genes and their roles in oncogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 361-71.
- [13] DENG C, LI Y, ZHOU L, et al. HoxBlinc RNA recruits Set1/MLL complexes to activate Hox gene expression patterns and mesoderm lineage development [J]. *Cell Rep*, 2016, 14(1): 103-14.
- [14] LOWE L A, YAMADA S, KUEHN M R. HoxB6-Cre transgenic mice express Cre recombinase in extra-embryonic mesoderm, in lateral plate and limb mesoderm and at the midbrain/hindbrain junction [J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 118-20.
- [15] WANG M, WANG H, WEN Y, et al. MEIS2 regulates endothelial to hematopoietic transition of human embryonic stem cells by

- targeting TAL1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 340.
- [16] ZHOU J, SU P, LI D, et al. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors [J]. *Stem cells*, 2010, 28(10): 1741-50.
- [17] LI Q, HUTCHINS A. P, 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.
- [18] SMITH J C. Mesoderm-inducing factors in early vertebrate development [J]. *EMBO J*, 1993, 12(12): 4463-70.
- [19] WILLIAMS M L, BHATIA S K. Engineering the extracellular matrix for clinical applications: endoderm, mesoderm, and ectoderm [J]. *Biotechnol J*, 2014, 9(3): 337-47.
- [20] IIMURA T, POURQUIE O. Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression [J]. *Nature*, 2006, 442(7102): 568-71.