

干细胞多能性信号调控机制研究进展

王 娟 孔庆然 王加强 刘忠华*

(东北农业大学胚胎工程实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 多能性干细胞是一类具有体外无限自我复制和分化为体内多种细胞类型能力的多潜能细胞, 是研究基因功能、建立疾病模型和促进再生医学领域发展的一种重要工具。自1981年小鼠胚胎干细胞建立以来, 科学家们已经先后成功地建立了灵长类、人、大鼠的胚胎干细胞和小鼠、大鼠的上胚层干细胞等。但是, 目前研究表明, 维持人、灵长类胚胎干细胞的多能性信号通路与维持小鼠、大鼠胚胎干细胞的截然不同, 而与维持小鼠、大鼠上胚层干细胞的信号通路比较类似。因此, 该文对目前研究较多的维持小鼠胚胎干细胞、人胚胎干细胞和小鼠上胚层干细胞的多能性信号通路进行了综述, 希望能够对其它物种的多能性干细胞研究提供有益的借鉴。

关键词 胚胎干细胞; 上胚层干细胞; 多能性; 信号通路

1 引言

多潜能干细胞在生物医学领域有着十分诱人的应用前景。特别是1998年人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES)被建立以来, 干细胞应用于人类疾病模型的建立、组织器官的再生等医学领域表现出了十分广阔的前景, 体现出了它得天独厚的优势。

众所周知, hES在基因操作及诱导分化方面相对于小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mES)要困难得多, 且单细胞的存活能力也十分微弱, 这些都极大地限制了hES的临床应用。虽然目前所有物种的胚胎干细胞系在一些多能性因子——比如*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*的表达上具有很大的保守性, 但是维持它们多能性的信号通路却有很大的差别。例如, 啮齿类动物小鼠、大鼠的胚胎干细胞多能性的维持都需要白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)^[1-3]和骨形态形成蛋白4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4)^[4], 而灵长类如猴、人的胚胎干细胞多能性的维持却需要基本成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和Activin/Nodal^[5-8]。2007年, Brons^[9]和Tesar^[10]两个不同的实验室分别从着床后小鼠胚胎的上胚层中分离、培养得到了小鼠上胚层干细胞(mouse epiblast stem cells, EpiSC)细胞系, 发现其多能性的信号维持和小鼠胚胎干细胞有很大差别, 却与人胚胎干细胞比较类似, 这使人们对已建立的灵长类胚胎干细胞系产生了疑问。目前,

科学家们已经通过过表达*klf4*或*Nanog*的方法成功地将EpiSC诱导成了mES^[11-12], 这为人们优化灵长类胚胎干细胞提供了启迪, 也启示我们, 要想建立起像猪、牛等物种的真正的胚胎干细胞还需要研究维持它们多能性的信号通路及这些信号通路所调控的下游基因。本文综述并比较了小鼠胚胎干细胞和上胚层干细胞以及人胚胎干细胞多能性信号通路, 阐述了它们之间的相互关系, 希望为胚胎干细胞系广泛地建立提供帮助。

2 mES多能性的维持

1981年, Evans^[13]和Martin^[14]两个实验室分别从小鼠囊胚的内细胞团中分离、培养得到了mES。为了能使其在体外无限增殖且保持未分化状态, Evans等^[13]用小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层, 而Martin等^[14]用小鼠胚胎癌细胞的条件培养基作为培养液, 此外, 两个实验室都在培养液中添加了化学成分不明确的动物产物——血清。之后, mES的建系及培养都应用了丝裂霉素或紫外线处理的小鼠胎儿成纤维细胞作为饲养层^[15-16], 因为如果去除饲养层, mES就会分化。7年后, Williams等^[2]发现LIF是饲养层分泌的维持mES多能性的必需因子。但是如果使用不

收稿日期: 2011-05-25 接受日期: 2011-07-12

“973计划”重大科学研究项目(No.2009CB941002, No.932004)和黑龙江省杰出青年基金(No.JC200905)资助项目

*通讯作者。Tel: 0451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com

添加血清的培养基,即使加入LIF, mES仍然会表现出分化状态^[17]。2003年, Ying等^[4]发现血清中和LIF一起维持mES多能性的因子是BMP4。

2.1 LIF介导的信号调控机制

目前研究表明, LIF和其细胞膜上的异源二聚体受体LIFR/gp130结合, 激活胞质内JAK (janus-activated kinase, JAK), JAK磷酸化信号转导和转录激活子-3 (signal transducers and activators of transcription-3, STAT3), 磷酸化的STAT3形成二聚体进入核内调节一些多能性基因的表达(图1)。许多证据表明LIF-STAT3信号通路在维持mES多能性方面有非常重要的作用^[18-20], 比如: (1) 在没有LIF的情况下, 持续性地激活STAT3, mES能保持未分化状态^[18]; (2) 过表达STAT3下游的一个重要靶基因*C-Myc*也能够使mES在LIF缺失的情况下保持未分化状态^[21]。

LIF和细胞膜上的受体LIFR/gp130结合还能够激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)信号通路, 也是维持mES多能性不可或缺的^[22](图1)。Paling等^[22]用加入PI3K抑制剂LY294002和过表达功能域缺失PI3K蛋白的方法抑制PI3K后, 发现mES会在加入LIF的情况下分化, 首次证明了PI3K信号通路在维持mES多能性中的重要作用。PI3K信号通路在维持mES多能性中的一个重要作用是激活PKB/AKT (图1)。当mES分化时, AKT的活性显著下降及过表达编码AKT活性蛋白基因能够抑制mES在没有LIF的环境下的分化的事实都证明了PI3K/ATK信号通路在mES多能性维持中的重要作用^[23]。PI3K/ATK信号通路能够抑制糖原合酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3), 并通过一系列的机制调节*Nanog*基因表达^[24-25], 而且, 过表达*Nanog*基因后, mES能够在不添加LIF的培养基中维持多能性状态^[26]。PI3K/ATK信号通路的另一个重要作用就是抑制蛋白-53 (protein-53, P53)的表达, *p53*是一个抑癌基因, 它的过表达能够导致细胞凋亡^[27](图1)。此外, PI3K/AKT还能够激活钠巴霉素的哺乳动物靶子(mammalian target of rapamycin, mTOR), 促进mES增殖^[22]。

由此看来, LIF能够调控许多与mES增殖和多能性维持相关的信号通路(图1), 在mES的体外培养中起着十分重要的作用。但是LIF还能够通过磷酸化gp130的酪氨酸残基, 为SH2 (src homology-2)提供停泊位点, 从而激活蛋白-38 (protein-38, P38)和细胞

外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)^[28](图1), 另外, mES自分泌的成纤维细胞生长因子4 (fibroblast growth factor 4, FGF4)也能够激活ERK信号通路^[29]。我们都知道, ERK的表达对mES多能性的维持起反向调控作用。在未分化的mES中, ERK的活性通常是很低的, 这应该部分归结于LIF激活的PI3K能够抑制ERK表达^[24]。另外, Kunath等^[29]认为这可能还与LIF激活的STAT3进入细胞核后与ERK启动子结合从而抑制其表达有关。虽然mES中ERK的活性很低, 但是它诱导mES的分化作用仍然不能忽视。研究表明, 用小分子物质如PD098059抑制mES中自发活化的一小部分ERK后, mES不仅对LIF的依赖性会减弱^[30], 还会在没有LIF的条件下被建系^[31]。这一系列的实验证据也促进了后来科学家在加入ERK抑制剂的条件下建立NOD小鼠品系^[32](不容易建立ES细胞系)和大鼠^[1,3]的ES细胞系, 使它们在医疗模型等方面的应用又向前跨越了一大步。

所以一般认为, LIF介导的信号网络在维持mES多能性方面具有双向性, 但其能通过正向的调控作用抑制自身引起的诱导分化作用。

Oct-4、*Sox2*、*Nanog*等基因的表达对维持mES的多能性是十分重要的, 那么LIF介导的信号通路是如何调控这些基因表达的呢? 最近, Niwa带领其研究小组^[33]解答了这一问题, 他们通过一系列的实验表明, LIF能通过STAT3激活*Klf4*, *Klf4*被激活后, 作为转录因子能提高*Sox2*的表达水平, 此外, LIF还能通过PI3K/AKT信号通路激活*Tbx3*, 进而激活*Nanog*基因的表达, 在*Sox2*和*Nanog*的共同作用下, *Oct4*基因被激活。过表达*Klf4*或者*Tbx3*虽然能在不添加LIF的情况下维持mES的多能性, 但mES的增殖能力显著下降, 这与过表达STAT3的情况不同, 可见, LIF还可能调节一些与增殖相关的基因。

2.2 BMP4介导的信号调控机制

BMP4是维持mES多能性的又一个重要的外界刺激信号, 它与膜上的异源二聚体受体BMP4R/ALK1/2/3/6结合, 激活胞质内的SMAD1/5/8, SMAD1/5/8和SMAD4形成异源二聚体, 进入细胞核内和一些转录因子结合, 调控基因的表达。在mES中, BMP4主要通过BMP4-SMAD1/5/8信号通路激活抑制分化(inhibitor of differentiation, *Id*)基因的表达(图1), 抑制mES向神经方向的分化。过表达*Id*基因, 即使在没有添加BMP4的培养基中, mES也能处于未分化状

态^[4]。此外, BMP4-SMAD信号通路还能够激活 *Wnt1* 基因的表达, WNT1转录的产物分泌到细胞外, 和细胞膜上的多次跨膜受体结合, 抑制细胞内GSK3的表达^[34]。GSK3被抑制后, β -连环蛋白(β -Catenin)会大量表达(图1), β -Catenin的表达对维持mES的多能性和增殖能力有正调控作用。Qi等^[35]的研究还表明, BMP4能够抑制P38和ERK信号通路, 从而抑制LIF对于它们的激活作用, 维持mES的多能性。

其实在胚胎发育过程中, BMP4的作用是非常保守的, 它不是一个维持多能性的因子, 而是负责诱导预定的胚胎细胞向中胚层分化, 在没有LIF和饲养层的条件下, BMP4依然可以诱导mES向中胚层分化^[36]。最近, Hayashi等^[37]研究表明, 在无血清及血清替代物的培养基中去除LIF并加入10 ng/mL的BMP4后, mES在层粘连蛋白上会分化成滋养外胚层, 这与BMP4在诱导hES分化方面的作用一致。由此看来, BMP4在不同环境中对细胞的调控作用也是不同的, 有些学者认为, 在mES中, 有可能是LIF和血清中的一些物质抑制BMP4在诱导分化中的作用, 从而维持mES的多能性。

3 维持hES多能性的信号通路

虽然小鼠的胚胎干细胞在1981年就已经成功建系, 但是直到1995年, Thomson带领其研究小组^[8]才成功分离培养了恒河猴胚胎干细胞, 三年后, 他们又成功地建立了人胚胎干细胞系^[38]。虽然hES和mES都是从未孵化扩张囊胚的内细胞团中分离培养得到的, 但是它们维持各自多能性所需要的外界刺激信号却有很大的差别。BMP4是维持mES多能性的一个外界刺激因子, 但是它会诱导hES向滋养层分化^[39-40], 用其抑制剂GDF3阻断这个信号通路, 有利于hES的自我更新^[40]。LIF/STAT3信号通路在mES多能性的维持方面有着至关重要的作用, 但是在hES中, 即使STAT3被人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF)激活, 仍然会引起分化^[41-42]。

3.1 bFGF所介导的信号调控机制

hES的培养与mES一样, 涉及丝裂霉素或紫外线处理的小鼠胎儿成纤维细胞饲养层和动物血清的应用^[38]。在无饲养层条件下hES会变得不稳定, 而加入bFGF (又称FGF2)能改变这种状况^[43-45]。加入高浓度的bFGF (40 ng/mL)后, 即使使用基质胶(matrigel)代

替饲养层, hES也能维持多能性和增殖能力^[46]。在细胞信号转导过程中, FGF2与膜上的受体结合, 激活受体内部的酪氨酸激酶活性, 使受体胞内部分的酪氨酸被磷酸化, 从而与一系列具有SH2和PTB结构域的蛋白结合, 激活下游RAS-MAPK (包括ERK1/2、P38和JNK)、PI3K-AKT和PLC γ 等信号通路。

在hES中, bFGF的受体和配体都是高表达的^[47], 与mES不同的是, bFGF调控的ERK信号通路对于维持hES的多能性起着至关重要的作用^[48](图2)。2007年, 我国科学家邓宏魁^[48]发现用小分子或RNA干扰的方法抑制MEK, hES会失去自我更新的能力, 首次证明了MEK/ERK信号通路在维持hES多能性中的作用。但是最近有研究表明, 在没有BMP4的情况下, 抑制ERK1/2能阻止hES向中内胚层及神经方向分化, 维持hES的多能性^[49]。由此可见, hES多能性的维持需要各个信号通路之间的相互协调, 从而使信号通路之间的作用达到动态平衡状态, 如果破坏这种平衡状态, 维持多能性的因子就有可能转化成诱导分化的因子。

另外, Eiselleova等^[50]的研究表明, bFGF还能够激活PI3K-AKT信号通路(图2), 维持hES多能性和增殖能力。但是Bendall等^[51]则认为, 在没有饲养层的条件下, 一部分hES细胞会分化为成纤维细胞样的细胞(这与Stojkovic等^[52]的研究结果一致), 这些成纤维细胞样的细胞高表达bFGF的受体, 在受到bFGF刺激后分泌胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF), 未分化的hES在IGF的刺激下激活PI3K-AKT信号通路, 维持自身的多能性。总之, 不管通过什么途径, PI3K-AKT信号通路在hES中是被激活的。PI3K-AKT信号通路的激活能够抑制GSK3的表达, 从而抑制 β -Catenin降解, 维持hES的多能性。GSK3信号通路和WNT信号通路间存在正反馈调控关系, GSK3被抑制后, 能够激活WNT信号通路, WNT信号通路被激活后又能抑制GSK3的表达。Sato等^[53]发现用BIO抑制GSK3 β 能够在没有饲养层和条件培养基的情况下短期内维持hES的未分化状态。但是, Dravid等^[54]的研究表明, 在非条件培养基中加入WNT3a并不能维持hES的多能性, 只是使其增殖速度有所加快。据此, 有些学者认为BIO除了抑制GSK3 β 外可能还调控某些与hES多能性维持相关的信号通路, 比如在mES中, BIO除了能够抑制GSK3, 还能够激活STAT3^[55]。所以, 使用BIO能短期维持

hES的多能性,而单独激活WNT信号通路不能取得相同的效果。

3.2 TGF- β 家族因子介导的信号调控机制

在成分明确的条件下,建立和培养hES系对其在医疗上的应用是十分重要的。但是采用成分明确的粘连蛋白或纤连蛋白代替饲养层或基质胶后,即使在培养液中加入高浓度的bFGF,也无法阻止hES分化,而加入一定量的Activin A则可以使hES处于未分化状态^[7]。Activin A属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)家族的一员, TGF- β 是一个很大的家族,包括TGF- β s、Activins、Inhibitions、Nodal、BMPs等因子^[56]。在细胞信号转导过程中, TGF- β 家族的因子和膜上的一型、二型受体复合物结合,磷酸化SMADS家族的蛋白,磷酸化的SMADS家族蛋白和SMAD4结合形成异源二聚体,进入细胞核内调节相关基因的表达^[56]。

在hES中, Nodal在细胞膜上的受体是高表达的^[57]。因为Activin A在体外比较容易分离纯化,性质比较稳定,且与Nodal具有相同的受体,激活相同的信号通路,所以在体外hES培养中,一般会用Activin A代替Nodal。另外, TGF- β 也能代替Activin A和Nodal;而且抑制TGF- β 的受体比去除外界TGF- β 刺激信号, hES分化的速度会更快^[58],这可能与这一家族的其它因子会代替TGF- β 行使功能有关。

Activin/Nodal/TGF- β 与细胞膜上的受体结合,激活胞质内的SMAD2/3, SMAD2/3激活后与SMAD4形成异源二聚体进入细胞核,调控相关基因的表达(图2),维持hES的多能性^[6-7,59-60]。许多研究表明, Activin/Nodal/TGF- β 信号通路是通过抑制hES向神经外胚层分化来维持hES多能性的^[5,61],以下简单列举几点: (1) 在化学成分明确的培养基中,如果不加入Nodal, hES会向神经外胚层分化;加入Nodal后,这种分化能够被抑制^[5]; (2) Vallier等^[5]在hES中转入了持续性表达的Nodal基因,发现当此细胞系形成EB时,神经外胚层的标记基因检测不到,进一步证明了Nodal在抑制hES向神经外胚层分化中的作用; (3) Smith等^[61]在hES中转入持续性表达的Lefty和Cerb-S (Lefty和Cerb-S能够抑制Nodal的表达),发现该细胞系在形成EB时,神经外胚层标志性基因的表达量相对于没有转入Lefty和Cerb-S的hES形成的EB高很多,反向证明了Nodal在抑制hES向神经外胚层分化中的作用。

但是,在胚胎发育过程中Activin/Nodal信号通路负责诱导中内胚层的形成^[62],这似乎与其能维持hES的多能性有所矛盾。关于这个问题, Vallier等^[63]认为, Activin/Nodal信号通路下游的SMAD2/3和SMAD4形成的异源二聚体蛋白能够直接激活Nanog, Nanog表达量升高后会通过负反馈调控抑制SMAD2/3的表达,使Activin/Nodal信号通路在hES中的激活程度控制在一定的范围内,不能诱导hES向中内胚层分化。

与mES中的作用不同, BMP4激活SMAD1/5/8后,会诱导hES向中内胚层分化^[39-40],但是在未分化的hES中,依然会表达BMP4,磷酸化一小部分的SMAD1^[5](图1)。有人认为这可能是由于SMAD1下游所调控的转录因子被bFGF所抑制,所以即使内源性的BMP4表达, hES也能保持未分化状态^[64]。

bFGF和Activin/Nodal/TGF- β 单独长期作用都会诱导hES的分化,而它们共同作用时却能够维持hES的多能性,暗示了它们之间存在着相互调控的机制。我国科学家肖磊等^[65]发现在培养液中加入5 ng/mL的Activin A后, hES可以在无饲养层和不加入bFGF的条件下维持多能性,进一步的研究表明在hES中, Activin A可以调控bFGF的表达。Vallier等^[63]的研究表明, Activin/Nodal信号通路能通过激活Nanog的表达抑制由bFGF诱导的hES向神经外胚层的分化。但是它们之间更多的相互作用机制,还有待进一步研究。

4 EpiSC和hES多能性维持的异同

2007年,两个不同的实验室几乎同时从着床后小鼠胚胎的上胚层中分离得到了与mES具有类似分化潜能的EpiSC细胞系,其多能性不如ES,但是人们发现mES和EpiSC两个细胞系间可以相互转化,在mES中抑制Stella, mES会转变为EpiSC^[66],在EpiSC中过表达klf4或Nanog, EpiSC会被诱导回mES状态^[11-12]。EpiSC集落形态是大的、单层的、扁平状,单细胞培养时生存能力十分微弱,有一条X染色体是失活的,其多能性的维持需要外界刺激因子Activin/Nodal和bFGF, BMP4能诱导它向滋养外胚层分化,这些都与hES相同,与mES有很大差别^[9-10]。另外,基因芯片分析结果也表明, EpiSC中Oct-4调节基因的表达状态与hES中的非常相似,与mES中的差异较大^[10]。

但是EpiSC和hES也有许多不同之处。如: EpiSC

是碱性磷酸酶阴性的, hES是碱性磷酸酶阳性的; EpiSC表达SSEA-1, 不表达SSEA-3/4, hES不表达SSEA-1, 表达SSEA-3/4; EpiSC表达着床后胚胎上胚层的标志基因*Fgf5* (mES中不表达), hES表达着床前胚胎内细胞团的标志基因*Rex1* (mES中表达)^[9]; 另外, hES表达*Stella*^[67]和*Klf4*^[68]基因, EpiSC中不表达这两个基因。除了细胞表面标志和基因表达方面有所不同, EpiSC和hES在信号通路调控方面也有所不同。例如, bFGF在hES中能激活*Nanog*基因的表达, 促进hES增殖, 但在EpiSC中却没有这些功能^[69](图3)。然而Activin/Nodal信号通路在EpiSC和hES中是比较保守的, 它在这两类干细胞中都能够促进*Nanog*表达, 阻断细胞向神经外胚层分化^[69](图3)。

5 结语与展望

mES、hES和EpiSC多能性的维持涉及到复杂的信号通路调控网。在mES中, LIF和BMP4调控的信号通路起主要作用; 在hES和EpiSC中, bFGF和Activin/Nodal调控的信号通路起主要作用。近些年来, 这些信号通路在维持干细胞多能性中所扮演的角色和它们之间的相互调控关系已经得到了充分的研究, 这使干细胞能够在化学成分明确的培养基中生长成为可能, 为干细胞的临床应用提供了安全保障。

最近, Hanna等^[70]在培养液中加入LIF、ERK和GSK3的抑制剂与蛋白激酶-A (诱导*Klf4*和*Klf2*表达), 通过短暂性地过表达*Klf2*和*Klf4*或*Oct4*和*klf4*, 使hES变成了具有mES特性的细胞, 这极大地促进了hES在临床方面的应用。我国科学家金颖等^[71]发现抑制NFAT信号通路可以使mES在不依赖LIF的情况下维持其多能性状态, 这又补充了我们对mES多能性维持的认识。尽管如此, 对调控干细胞多能性的信号通路的研究还有待于进一步深化和探索。例如, 在mES中LIF和BMP4的相互作用机制仍然不是十分明确, 在hES中WNT信号通路在维持其多能性方面的作用仍然有争议。而且, 目前除了小鼠、大鼠、恒河猴、人等少数几个物种外, 像猪、牛等物种仍然没有建立真正的胚胎干细胞系。阐明调控各个物种胚胎干细胞多能性信号通路的区别与联系以及这些信号通路在胚胎发育中的作用将为广泛地建立多个物种的胚胎干细胞系提供可靠依据。

参考文献 (References)

- 1 Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1287-98.
- 2 Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336(6200): 684-7.
- 3 Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al.* Germ-line competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1299-310.
- 4 Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003; 115(3): 281-92.
- 5 Vallier L, Reynolds D, Pedersen RA. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol* 2004; 275(2): 403-21.
- 6 James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 2005; 132(6): 1273-82.
- 7 Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt19): 4495-509.
- 8 Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 7844-8.
- 9 Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448(7150): 191-5.
- 10 Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; 448(7150): 196-9.
- 11 Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, *et al.* *Klf4* reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 2009; 136(7): 1063-9.
- 12 Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, *et al.* *Nanog* is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138(4): 722-37.
- 13 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 14 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 15 Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(11): 5709-12.

- 16 Batlle-Morera L, Smith AJ. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis* 2008; 46(12): 758-67.
- 17 Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336(6200): 688-90.
- 18 Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 1999; 18(15): 4261-9.
- 19 Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2048-60.
- 20 Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 2846-51.
- 21 Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132(5): 885-96.
- 22 Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem* 2004; 279(46): 48063-70.
- 23 Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* 2006; 25(19): 2697-707.
- 24 Takahashi K, Murakami M, Yamanaka S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt6): 1522-5.
- 25 Storm MP, Bone HK, Beck CG, Bourillot PY, Schreiber V, Damiano T, *et al.* Regulation of Nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2007; 282(9): 6265-73.
- 26 Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5): 643-55.
- 27 Vousden KH, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 594-604.
- 28 Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15(5): 729-40.
- 29 Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaileakh M, Wray J, Meloche S, Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 2007; 134(16): 2895-902.
- 30 Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 1999; 210(1): 30-43.
- 31 Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- 32 Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, *et al.* Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 513-24.
- 33 Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009; 460(7251): 118-22.
- 34 Lee MY, Lim HW, Lee SH, Han HJ. Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1858-68.
- 35 Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, *et al.* BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16): 6027-32.
- 36 Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 1995; 15(1): 141-51.
- 37 Hayashi Y, Furue MK, Tanaka S, Hirose M, Wakisaka N, Danno H, *et al.* BMP4 induction of trophoblast from mouse embryonic stem cells in defined culture conditions on laminin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(5): 416-30.
- 38 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 39 Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, *et al.* BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002; 20(12): 1261-4.
- 40 Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 2006; 133(2): 209-16.
- 41 Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, *et al.* LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22(5): 770-8.
- 42 Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, *et al.* Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* 2004; 22(4): 522-30.
- 43 Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227(2): 271-8.
- 44 Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, van den Heuvel-Kramer K, Manning D, *et al.* Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24(3): 568-74.
- 45 Chiao E, Kmet M, Behr B, Baker J. Derivation of human embryonic stem cells in standard and chemically defined conditions.

- Methods Cell Biol 2008; 86: 1-14.
- 46 Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, *et al.* Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 2005; 23(3): 315-23.
 - 47 Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, Vodinska M, Najvirtova M, Krekac D, *et al.* Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(8): 1200-11.
 - 48 Li J, Wang G, Wang C, Zhao Y, Zhang H, Tan Z, *et al.* MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 2007; 75(4): 299-307.
 - 49 Na J, Furue MK, Andrews PW. Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesendodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cell Res* 2010; 5(2): 157-69.
 - 50 Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Nérail J, *et al.* A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1847-57.
 - 51 Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, *et al.* IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells *in vitro*. *Nature* 2007; 448(7157): 1015-21.
 - 52 Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, *et al.* An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(3): 306-14.
 - 53 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10(1): 55-63.
 - 54 Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, *et al.* Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(10): 1489-501.
 - 55 Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y, Shimosato D, Niwa H. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(1): 159-66.
 - 56 Miyazawa K, Shinzaki M, Hara T, Furuya TM, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002; 7(12): 1191-204.
 - 57 Assou S, Le Carrouer T, Tondeur S, Strom S, Gabelle A, Marty S, *et al.* A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* 2007; 25(4): 961-73.
 - 58 Xu RH, Sampsel-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, *et al.* NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(2): 196-206.
 - 59 Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, *et al.* Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(3): 934-42.
 - 60 Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, *et al.* Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 2005; 23(4): 489-95.
 - 61 Smith JR, Vallier L, Lupo G, Alexander M, Harris WA, Pedersen RA. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol* 2008; 313(1): 107-17.
 - 62 Dunn NR, Vincent SD, Oxburgh L, Robertson EJ, Bikoff EK. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo. *Development* 2004; 131(8): 1717-28.
 - 63 Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, *et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 2009; 136(8): 1339-49.
 - 64 Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005; 2(3): 185-90.
 - 65 Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1476-86.
 - 66 Hayashi K, Lopes SM, Tang F, Surani MA. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 2008; 3(4): 391-401.
 - 67 Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, *et al.* Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* 2004; 22(2): 169-79.
 - 68 Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, Tan KS, *et al.* KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(9): 2114-25.
 - 69 Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, *et al.* Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(3): 215-26.
 - 70 Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(20): 9222-7.
 - 71 Li X, Zhu L, Yang A, Lin J, Tang F, Jin S, *et al.* Calcineurin-NFAT signaling critically regulates early lineage specification in mouse embryonic stem cells and embryos. *Cell Stem Cell* 2011; 8(1): 46-58.

Signaling Pathways Regulating the Pluripotency of Pluripotent Stem Cells

Wang Juan, Kong Qingran, Wang Jiaqiang, Liu Zhonghua*

(Department of Laboratory of Embryo Biotechnology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Embryonic stem cells can go indefinite self-renewal and give rise to many kinds of cells of the adult body. The derivation of pluripotent stem cells is seminal technological breakthroughs as it provides powerful tools for gene function research, disease models establishment and regenerative medicine. Now primate, human, rat embryonic stem cells and mouse, rat epiblast stem cells have been derived since the first establishment of mouse embryonic stem cells in 1981. However, the signaling pathways regulating the pluripotency in primate and human embryonic stem cells are different from that in mouse and rat embryonic stem cells, but they are similar with that in mouse and rat epiblast stem cells. Understanding the signaling pathways will guide us to use pluripotent stem cells in therapy, and pave the way to establish naïve embryonic stem cells widely. This review focuses on the signaling pathways regulating mouse embryonic stem cells (mES), human embryonic stem cells (hES) and mouse epiblast stem cells (EpiSC).

Key words embryonic stem cells; epiblast stem cells; pluripotency; signaling pathways

Received: May 25, 2011 Accepted: July 12, 2011

This work was supported by Grant from the National Basic Research Program of China (973 Program, No.2009CB941002, No.932004) and Fund for Outstanding Young Scholars in Heilongjiang Province (No.JC200905)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55191729, E-mail: liu086@yahoo.com