

人类及小鼠胚胎干细胞的不同多能性状态

陈一飞 赖东梅*

(上海交通大学医学院附属中国福利会国际和平妇幼保健院, 上海 200030)

摘要 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是来源于早期胚胎的全能性细胞, 在合适条件下具有分化为任何一类成体细胞的潜力。在小鼠中, 根据细胞来源的胚胎发育时间, ESCs可以被分为原始态多能性(naïve pluripotency)和始发态多能性(primed pluripotency)两种状态。这两种状态的细胞在发育上相互联系, 具有不同的形态、信号依赖、发育性质、基因表达及表观遗传学性质, 并且在特定的条件下可以相互转化。人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)的发育潜能曾一度被认为低于小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs), 直到人类原始态胚胎干细胞的发现证明了hESCs可以表现出与mESCs相似的性质。这对于人类胚胎发育的研究及ESCs在临床治疗上的实际应用都具有重要的意义。

关键词 胚胎干细胞; 多能性状态; 相互转化

干细胞(stem cells)是一类具有自我更新能力、在一定条件下可以分化成特定组织的细胞, 在细胞发育过程中处于较原始的阶段, 其特点是具有自我更新及其分化的多能性(pluripotency)。多能性细胞具有分化为所有成体细胞的能力, 最初的多能性细胞是由畸胎瘤(teratoma)中分离得到的^[1]。干细胞领域的另一个突破是1981年从小鼠的正常胚胎中分离得到了胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)^[2]; 2006年Takahashi和Yamanaka^[3]由成体细胞重编程获得了iPSCs (induced pluripotent stem cells)。现在干细胞研究已经成为生物学研究的前沿领域, 是基础生物学研究及临床医学研究的新热点。

目前已经发现了四种主要的多能性干细胞: 畸胎瘤来源的胚胎性癌细胞(embryonal carcinoma cells, ECs)、内细胞团(inner cell mass, ICM)来源的胚胎干细胞、初级生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)来源的胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EGs)、上胚层来源的上胚层干细胞(epiblast stem cells, EpiSCs)^[5-6]。其中, 胚胎干细胞的研究对于理解胚胎发育过程及其分子机制具有特殊的理论意义, 更重要的是胚胎干细胞的应用将是临床治疗的新领域, 它将成为器官再生、基因治疗等的有效工具。

1 胚胎干细胞简述

哺乳动物ESCs一般是指分离于早期胚胎, 经体

外培养获得的具有全能性的细胞。ESCs具有胚胎细胞的特性, 在形态上表现为核质比大、核仁突出、培养时呈克隆状生长; 在功能上ESCs具有发育的全能性, 即具有分化为成年动物体内任何一类细胞的能力。

目前研究认为, 小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)可以依据其分离的发育阶段及细胞的分化特性分为两种: 来源于囊胚期内细胞团(inner cell mass of the developing blastocysts)的被称为mESCs^[2]; 来源于着床后上胚层细胞的被称为mEpiSCs^[5-6](图1)。

mESCs与mEpiSCs两种干细胞无论在克隆形态、分化能力、自我更新维持条件、基因表达还是在表观遗传学水平上均具有不同的特征(图1)。这两种胚胎干细胞分别代表了两种不同的多能性状态而被分别命名为原始态(naïve)及始发态(primed)多能性细胞^[7]。这种定义暗示了始发态多能性状态可能是一种更容易进行分化的状态。

2 小鼠胚胎干细胞的不同多能性状态

mESCs是第一个由正常胚胎来源的多能性干

收稿日期: 2011-05-03 接受日期: 2011-06-29

国家自然科学基金(No.81070533)和中国科学院分子细胞生物学重点实验室资助项目

*通讯作者。Tel: 021-64070434-27702, E-mail: laidongmei@hotmail.com

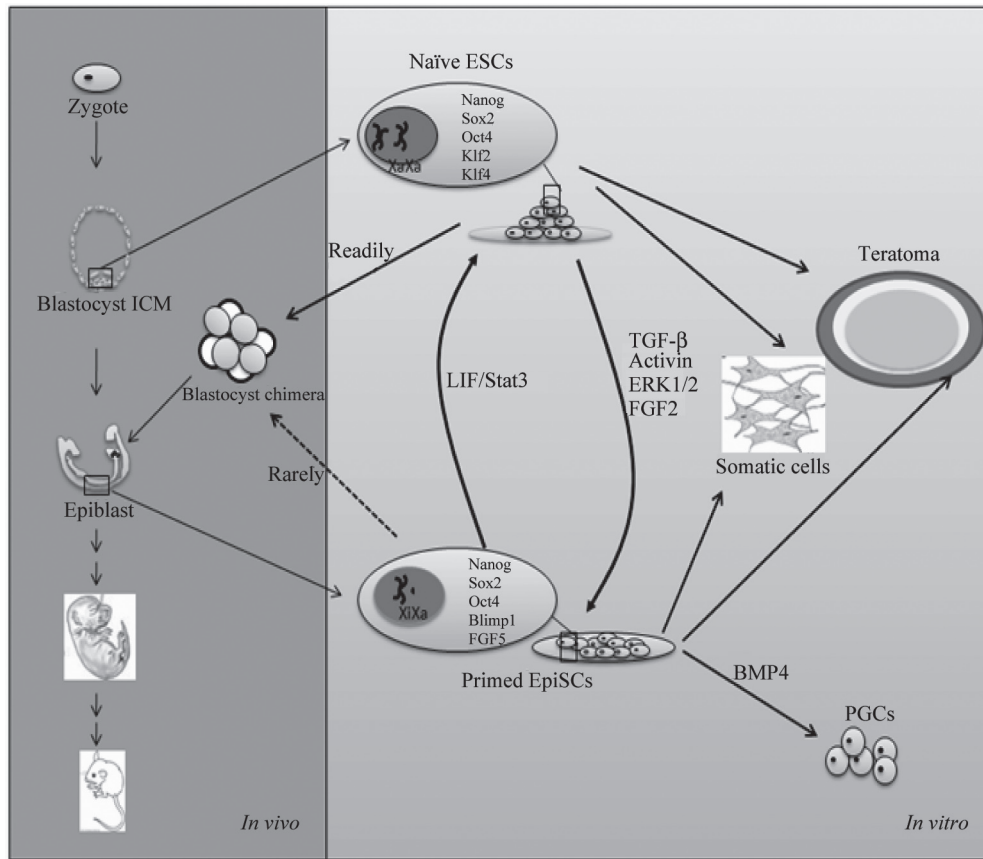


图1 mESCs和mEpiSCs分化潜能比较

Fig.1 Property comparison of mESCs and mEpiSCs

细胞^[2], 在体外可以被诱导分化为多种细胞、在体内可以形成畸胎瘤并发育形成三个胚层; 可以形成嵌合体; 在体外能向PGCs分化。mEpiSCs在体外悬浮培养中可以有效地形成类胚体(embryoid body), 在无血清培养基中类胚体主要分化为神经外胚层而胎牛血清可以促进其向内胚层及中胚层分化, 说明mEpiSCs具有广泛的发育潜力^[5]。当使用BMP4诱导分化时, mEpiSCs可以表达生殖细胞特异性基因 *Stella* 及 *Blimp1*^[5]。虽然mEpiSCs在体内可以分化形成畸胎瘤, 但是mEpiSCs重新聚集为ICM的效率却非常低^[4-6]。

mESCs形成隆起的克隆, 而mEpiSCs表现为平坦的克隆。并且mEpiSCs在胰酶处理后单细胞克隆的生长能力很差^[6]。mEpiSCs不能够有效形成嵌合体可能是因为其单细胞存活效率非常低, 所以, 当注入到囊胚中时, 不能够融合到ICM中。另外一种可能是mEpiSCs的来源比较晚, 处于胚胎发育的5.5天到7.5天, 而接受囊胚的发育时间是3.5天, 因此

两种发育状态的细胞不能融合。除了来源的组织差异, 体外培养条件也可能是造成两者ICM融合能力不同的原因: mESCs需要LIF/BMP4培养条件, 而mEpiSCs的培养条件则是bFGF/ActivinA。而Han等^[4]认为mEpiSCs可能是两种细胞的混合物: 能够形成嵌合体、具有高发育潜能的细胞占少数, 而另一种占大多数的细胞发育潜能低、不能够形成嵌合体。因为能够形成嵌合体的细胞只占少数, 所以mEpiSCs整体表现为只具有极低的嵌合体融合效率。

在转录水平上, mEpiSCs与晚期上胚层相似而与ICM及mESCs有所不同^[6](表1)。虽然与mESCs一样, mEpiSCs细胞也表达 *Oct4*、*Sox2* 及 *Nanog* 等干性因子, 但是mEpiSCs中 *Nanog*、*Rex1* 及 *Klf* 的表达量下降, 而分化标志分子(如 *FGF5*、*MHC I* 家族)已经在这些细胞中有所表达^[5-6]。ChIP-on-chip实验表明, mEpiSCs具有多能性细胞特有的染色体结构域及转录因子结合情况^[6]。 *Oct4* 基因在mESCs及mEpiSCs

表1 原始态与始发态多能干细胞比较

Table 1 Comparison of naïve and primed pluripotent states

组别	原始态多能干细胞	始发态多能干细胞
Groups	Naïve	Primed
Embryonic tissue	ICM	Implantated epiblast
Representative stem cells	Rodent ESCs	Rodent EpiSCs, primate ESCs
Development		
Blastocyst chimaeras	Yes	No
Teratomas	Yes	Yes
<i>In vitro</i> differentiate to PGCs	Low	High
Gene expression		
Gene markers	<i>Oct4</i> , <i>Nanog</i> , <i>Sox2</i> , <i>Klf2</i> , <i>Klf4</i>	<i>Oct4</i> , <i>Sox2</i> , <i>Nanog</i>
Protein markers	Rex1, NrOb1, FGF4	FGF5
XX status	XaXa	XaXi
Oct4 enhancer	Distal	Proximal
Property		
Clonogenicity	High	Low
Double time <i>in vitro</i>	10~14 h	14~16 h
Clone morphology	Domed	Flattened
Signal pathway		
Positive	LIF/Stat3, BMP4, WNT, IGF	TGF- β , Activin, bFGF, ERK1/2, WNT, IGF
Negative	TGF- β , Activin, bFGF, ERK1/2	BMP4

中使用不同的增强子, 分别为远端(distal)及近端(proximal)增强子(表1), 在体内它们分别在ICM及着床后的上胚层中调控*Oct4*基因的表达^[6]。

mEpiSCs的表观遗传特性与hESC (human embryonic stem cells, hESC)相似, 但是与mESC不同。雌性mESC的两条X染色体均具有活性表现为XaXa, 而雌性mEpiSCs的一条X染色体已经失活, 即XaXi表型(图1和表1)。组蛋白H3K4me3甲基化修饰是基因活化的标记, 而H3K27me3则是抑制基因表达的标记。*Stella*在mESC中特异性表达, 而其转录起始位点也仅在mESC中存在H3K4me3修饰。在所有三种细胞类型中都存在*Otx2*诱导型标记, 但在mESC中还具有基因抑制的H3K27me3修饰, 而*Otx2*在hESC及mEpiSCs中表现出更高的表达水平^[6]。

既使是在mEpiSCs克隆中, 不同细胞的基因表达及表观遗传学修饰也会不同^[4]。根据*Oct4*-GFP报告基因的表达情况, mEpiSCs的细胞可以被分为*Oct4*-GFP阳性及*Oct4*-GFP阴性细胞, 而这两种细胞可以相互转化并且处于动态的平衡状态。虽然这两种细胞的基因表达都与mESC有明显的差异, 但是一些mESC标志性基因, 如*Klf2*、*Klf4*、*Stella*、*Rex1*等在*Oct4*-GFP阳性细胞中的表达水平高于阴

性细胞。而mEpiSCs的某些标志基因, 如*Fgf5*及*Brachyury* (T)在*Oct4*-GFP阴性细胞中的表达水平则要高于阳性细胞。*Oct4*、*Stella*、*Vasa*、*Fragilis*等基因的启动子区甲基化以及*Oct4*增强子的选择性使用在两种细胞中也各不相同, 并且都与mESC及PGCs有差异。*Oct4*-GFP阳性及阴性细胞的差异性特征分别对应了体内不同发育阶段(E5.5及E6.5)的原肠腔形成前期上胚层(pregastrulation epiblasts)^[4]。

除了基因表达及表观修饰的差异, mESC与mEpiSCs对体外培养条件的要求也不一样。LIF/BMP4对于mESC的获取及体外培养是必需的^[8-12](表1), LIF通过Stat3途径维持mESC的多能性^[10-11]; BMP4可以维持mESC处于未分化状态^[12]。而与着床后的上胚层细胞一致, BMP4信号可以诱导mEpiSCs形成PGCs前体(图1)。因此, 不能够在LIF/BMP4条件下获得建系的mEpiSCs^[5]。mEpiSCs的多能性则严格地依赖于activin/Nodal信号途径^[5](表1), 其生长依赖于Activin、bFGF、ERK1/2及TGF- β 信号, 并且会被BMP4抑制, 但对LIF/Stat3没有反应。

这两种多能性状态反映了发育过程中胚胎细胞多能性的变化过程。两者表现出各自不同的生物学特性(图1和表1), 这与它们的发育起源有关, 也

受到体外生长条件的影响。越来越多的证据说明, 不同多能性的细胞可以分为两大类: 与ICM细胞类似的多能性状态, 也就是所谓的典型ESCs状态。由PGCs来源的胚胎生殖细胞及精原干细胞来源的雄性生殖干细胞也具有这种状态; 还有一种即是与上胚层类似(epiblast-like)的状态, 即EpiSCs特性。这两种多能性状态在体外是由不同培养条件所维持的, 细胞表现出不同的基因表达特性及生长性质(图1和表1)。此外, 这两种状态依赖于不同的信号通路(表1), 而这两种信号通路是相互拮抗的。比如, BMP4信号与LIF一起可以稳定ESCs的状态, 对于EpiSCs却是诱导分化的条件; TGF- β 及bFGF支持EpiSCs的自我更新, 但是可以诱导ESCs的分化; EpiSCs需要ERK1/2信号通路, 而如果抑制这个通路则可以加强mESCs的自我更新能力^[13]。

除了上述两种多能性干细胞, Chou等^[14]在EpiSCs培养条件下由鼠的囊胚分离到一种新的细胞, 称为FAB-SCs (bFGF, activin and BIO-derived stem cells, FAB-SCs)。这些细胞具有特殊的发育功能, 其分子性质与ESCs及EpiSCs都不同。FAB-SCs表达干细胞多能性的分子标志基因(*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*), 但是这些细胞在体外不能够形成类胚体、畸胎瘤或嵌合体。然而利用LIF及BMP4诱导后, FAB-SCs又可以形成畸胎瘤, 在嵌合体小鼠中还能够产生生殖细胞^[14]。这种FAB-SCs的细胞性质及发育能力还需要进一步的研究。

3 不同多能性状态间的相互转变

胚胎干细胞的多能性并不是一成不变的。在一定的条件下mESCs与mEpiSCs是可以相互转变的(图1), 其中涉及到了表观遗传上的改变以及基因表达的调节。

在mEpiSCs细胞培养条件下mESCs能够继续传代并且会转变为mEpiSCs状细胞, 被诱导后的细胞表现出与mEpiSCs相同而与mESCs不同的标志因子表达状况。在这个过程中*Klf4*的表达明显下调^[15]。*Klf4*是Yamanaka^[3]使用的重编程因子之一, 是mESCs自我更新网络中的一个重要组份, 但是mEpiSCs不表达*Klf4*。在mESCs培养条件下(2i/Lif), 将外源*Klf4*导入到mEpiSCs中, 一部分mEpiSCs形成了mESCs似克隆, 这种被诱导后的细胞被称为Epi-iPS细胞。Epi-iPS细胞表达包括内源*Klf4*在内的mESCs特异转

录产物, 并且分化标志因子的表达量下降^[15]。雌性细胞中X染色体的失活是mEpiSCs的一个重要标志, 但是在雌性Epi-iPS细胞中两条X染色体都恢复到活化状态。Epi-iPS的多能性也与mESCs相同: 可以产生嵌合体及发生生殖系传递(germline transmission)^[15], 说明在这个诱导过程中细胞发生了重编程并且恢复了原始态多能性状态。

mEpiSCs向mESCs的重编程同时需要*Klf4*基因的表达及mESCs的培养条件^[15]。未经基因导入的mEpiSCs在2i/Lif条件下几乎全部死亡。表明EpiSC是一个稳定的细胞状态, 不能够在此特定条件下自然地原始态多能性状态转变。而基因导入后在mEpiSCs培养条件下, 细胞也不会发生任何变化。完成重编程的Epi-iPS会维持这一稳定性的状态, 即使将外源*Klf4*基因删除, 细胞的性质也不会发生改变, 证实了这种细胞重编程的完整及稳定性^[15]。

随后Bao等^[16]发现, 在LIF-Stat3信号下不用外源转录因子也可以将mEpiSCs逆转为ESC类似细胞(rESCs)。与上胚层细胞及mEpiSCs不同的是, rESCs可以在嵌合体中形成成体组织及生殖细胞, 说明rESCs是一种稳定的逆转细胞。在这种条件下培养的mEpiSCs细胞可以逐渐解除表观遗传学上的重要壁垒, 即DNA去甲基化、X染色体重新活化、转录组上发生协同改变。这些变化使得mEpiSCs丢失了上胚层细胞的表型及表观遗传学记忆, 最终形成重编程的rESCs^[16]。

Greber等^[17]的工作也证明了仅仅将mEpiSCs转移到mESCs培养条件下, 即可以实现细胞多能性状态的逆转, 并且可以通过阻碍FGF/ERK途径及GSK3 β 而显著提高mEpiSCs的逆转效率。

mEpiSCs克隆中不同细胞向mESCs的逆转效率也有差别^[4]。对应于E5.5原肠腔形成前期上胚层的*Oct4*-GFP阳性细胞向mESCs的逆转效率明显高于对应于E6.5的*Oct4*-GFP阴性细胞。

除了被重编程为原始态mESCs外, mEpiSCs还可以在维持多能性及自我更新的培养条件下产生PGCs^[18]。BMP4可以提高PGCs的产生效率, 而BMP4抑制剂则抑制这一过程, 说明BMP4至少是培养基中关键性细胞因子之一^[18]。由mEpiSCs来源的PGCs发生了合适的转录及表观重编程, 并且可以进一步被诱导分化形成多能性的EGCs, 这些细胞与ESC相似而与最初的EpiSC不同。说明在PGCs的分化中经历

了一个表观遗传的重编码过程(消除了EpiSCs的表观印记、X染色体重活化、DNA去甲基化)以及基因表达谱的改变(关键干性基因的重新表达)^[18], 达到了一个更早的类似ICM的表观状态。

mEpiSCs向mESC的这种重编程过程对于hESC的性质研究是非常重要的, 因为hESC细胞更加类似于mEpiSCs。

4 人类胚胎干细胞的多能性状态

目前, hESC一般分离于体外受精卵发育到囊胚期的ICM, 具有正常的染色体组型、表达高活性的端粒酶、表达胚胎干细胞的特异性细胞因子、可以形成三个胚层^[19]。由于hESC不可以进行囊胚融合实验, 因此, 不能确定其是否能够形成嵌合体。

虽然与mESC一样, hESC也是分离于囊胚时期的内细胞团, 但是却表现出不同的性质, 在形态、克隆产生方式、培养条件、分化行为及分子表达谱与表观遗传学上都有很大的差异。主要表现在: 克隆平坦、需要bFGF/Activin信号、在特定条件下某些雌性细胞中的一个X染色体失活, 以及对于胰酶耐受性的下降等^[20]。LIF/STAT3信号途径对于mESC维持自我更新非常重要, 而FGF/ERK信号途径在mESC的分化过程中起作用, 所以mESC在添加LIF、GSK3 β 抑制物(以模拟WNT/ β -catenin信号途径)、MEK抑制物(以抑制FGF/ERK)的环境中保持未分化状态^[17]。与此相反的是, LIF对hESC没有作用, 并且WNT/ β -catenin信号途径会引起hESC的分化^[21], 而FGF/ERK信号促进细胞的自我更新。

这些性质与mEpiSCs相似, 说明hESC至少部分对应于小鼠的始发态而不是原始态^[20]。它们可以在BMP4条件下分化为PGC类似细胞, 并且一些生殖细胞的分子标志可以被激活, 如DAZL、Blimp1及VASA。但是mESC诱导这些标志基因表达的效率非常低, 并且要求首先形成类胚体。因此在一段时间里, 人们认为人类的囊胚可能已达到了小鼠着床后上胚层细胞的分化水平, 而hESC则更加接近于哺乳动物着床后或者原肠腔形成前期的细胞^[17]。但是随后的研究表明, hESC的多能性也具有不同的状态, 而不是仅限于“始发态”。基因操作或者特殊培养条件可以将hESC诱导为原始态多能性细胞, 这种细胞与mESC的表型及基因表达更为相似。在BMP4培养条件下原始态hESC中DAZL、Blimp1及

VASA的表达都未被激活^[20]。

在小鼠中父母本的X染色体在受精时保存遗传印记, 分裂(cleavage)时保持沉默, 在着床后的胚胎中只有来源于ICM的细胞中X染色体被重新活化表现为XaXa。XaXa是mESC全能性的标志之一, 但是hESC细胞株却一般表现为XaXi状态。Lengner等^[22]在生理氧气浓度下, 分离到了XaXa状态的hESC。通过在不同氧气浓度下分析这些细胞株性质, 证明在人类的囊胚中存在X染色体未失活的细胞, 并且这种状态在合适的体外条件下是可以维持的。这改变了人们对hESC的传统认识, 说明hESC具有比之前认为的更原始的多能性, 在合适的条件下可以维持这种原始的分化状态。只是因为受传统分离、培养条件的限制, 使得之前没能获得人类的原始态多能性胚胎干细胞。

Hanna等^[20]的工作进一步证实了这一观点。在含LIF、GSK3 β 抑制剂、ERK1/2抑制剂的条件下, 通过外源导入*Oct4*、*Klf4*或者*Klf4*、*Klf2*可以将hESC逆转更为原始的、与mESC类似的多能性状态。与传统hESC不同的是, 这些经过表观转化的细胞出现紧密、圆形、隆起的细胞克隆, 并且所依赖的信号途径都与mESC相似。相同条件还可以将人类iPSCs转化为与miPSCs类似的状态, 达到原始态^[20]。在原始态hESC中相关基因上调, 如*Klf4*、*Klf2*、*Tbx3*、*Gbx2*、*Lin28*、*SOCS3*; 而在上胚层、早期生殖层及原hESC表达的基因被下调, 如*Otx2*、*Sox17*、*Cer1*、*Foxa2*、*Zic1*、*Lhx2*、*XIST*。在原始态hESC/hiPSC中*Oct4*使用的是与mESC相同的远端增强子, 而不是hESC中的近端增强子。原始态hESC表现为XaXa状态, 说明hESC中X染色体的失活也是可逆的。胰酶处理后原始态的hESC及hiPSCs都表现出高单细胞克隆效率(85%)并且平均代时(doubling time)缩短了约20%。这些细胞在体内可以形成畸胎瘤并发育为三个胚层、在体外可以形成类胚体、原始态hiPSCs可以直接分化为神经细胞^[20]。

Buecker等^[23]也通过在LIF存在下的细胞重编程获得了在形态、分子表达、功能性质与mESC类似的人LR5 iPSCs (human LIF+ the constitutive expression of 5 reprogramming factors)。人LR5细胞可以通过胰酶消化后单细胞传代, 效率与mESC的单细胞克隆效率相当。代时由约22小时缩短为约16小时。人LR5细胞的基因操作效率明显增高, 当向细胞内电

转入相同量的质粒时, hLR5产生的克隆是hESCs的200多倍^[23]。但是hLR5细胞不具有多能性, 因为他们不能够活化内源的多能性基因、不表达关键干性因子、也不能够分化。hLR5细胞需要导入外源重编程因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*及*Nanog*)以维持原始态。去除这些重编程因子后, 他们会再变为标准的hiPSCs。所以, 这些细胞可能代表了转化后的或者部分重编程的细胞^[13]。

虽然这些工作突破性地证明了hESCs可以具有与小鼠相似的多能性状态, 但是这种原始态hESCs的获得借助了基因操作, 需要重编程基因的表达而且会影响分化能力。所以, 在无转基因操作的条件下获得原始态hESCs是另一个需要解决的重要问题。

通过仅改变培养条件, Xu等^[24]获得了原始态的hESCs。MEK抑制剂与p38抑制剂可稳定mESCs的多能性状态。利用添加这两种物质的mESCs培养基培养hESCs后, hESCs的形态发生改变, 并与mESCs相似, 即生长更为迅速、克隆变小、克隆变得隆起且紧密。该工作还发现使用不同的细胞粘附系统可能是区分干细胞不同多能性状态的机制之一。胰酶作用后mESCs与hESCs胞内的E-cadherin都会被降解, 但是mESCs新合成的E-cadherin要比hESCs中的更稳定, 而在原始态hESCs中E-cadherin的稳定性会得到提高^[24]。

mESCs类似hESCs的获得证明了人类胚胎细胞的分化发育过程可能是与小鼠类似的, 至少其ICM细胞的发育状态并不比小鼠的晚。原始态hESCs的发现与获得对于医学治疗也具有重要的意义。mESCs类似的人类细胞可以有效地进行基因操作, 比如说转基因与同源重组, 而这在典型的hESCs中是很难的^[25]。因为大多数的hESCs细胞株是通过小块的细胞块传代, 不能够利用胰酶消化后的单个细胞传代, 而转基因以后通常是要进行克隆筛选的, 因此不能有效地进行单细胞传代限制了对hESCs的基因操作。

5 小结与展望

哺乳动物的胚胎干细胞可以表现出不同的多能性状态, 分别被称为原始态及始发态。小鼠及人类不同多能性状态干细胞性质的研究无论是对哺乳动物发育规律还是对细胞分化机制等基础理论研

究, 都具有重要的意义。特别是人类胚胎干细胞原始态的确定, 证明了人类胚胎干细胞具有与小鼠胚胎干细胞相同的发育潜能。

将两种多能性状态细胞进行对照分析是重要的。由于两种细胞分别对应于体内不同的胚胎发育时期, 利用这两种细胞可以构建不同的模型以分阶段细化分析胚胎发育过程中的信号途径及分子机制。而区分发育阶段的疾病模型则会成为研究药物作用机理、进行基因治疗及新药研发的有力工具。

在特异性的内在及外在因子作用下两种细胞状态可以相互转换, 说明任一种多能性状态的胚胎干细胞具有成为另一种多能性状态细胞的潜力。所以人工体外诱导的iPSCs理论上具有形成原始态及始发态两种细胞的潜力, 只是因为人为筛选条件的不同造成所得细胞的不同。这是一个值得探讨的问题, 特别是对于hESCs来说, 因为能够有效进行单细胞传代的原始态hESCs才能真正地应用于基因治疗、器官再生等临床领域。

参考文献 (References)

- Hogan BL. Changes in the behaviour of teratocarcinoma cells cultivated *in vitro*. *Nature* 1976; 263(5573): 136-7.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- Han DW, Tapia N, Joo JY, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Bernemann C, *et al*. Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. *Cell* 2010; 143(4): 617-27.
- 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.
- 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.
- Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 487-92.
- 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.
- 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.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, *et al*. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferenti-

- ated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 1999; 18(15): 4261-9.
- 11 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.
 - 12 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.
 - 13 Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 2010; 143(4): 508-25.
 - 14 Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, *et al.* The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 2008; 135(3): 449-61.
 - 15 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.
 - 16 Bao S, Tang F, Li X, Hayashi K, Gillich A, Lao K, *et al.* Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 2009; 461(7268): 1292-5.
 - 17 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.
 - 18 Hayashi K, Surani MA. Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delineation of germ cells with epigenetic reprogramming *in vitro*. *Development* 2009; 136(21): 3549-56.
 - 19 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.
 - 20 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.
 - 21 Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* 2008; 135(17): 2969-79.
 - 22 Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, *et al.* Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 2010; 141(5): 872-83.
 - 23 Buecker C, Chen HH, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, *et al.* A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(6): 535-46.
 - 24 Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, *et al.* Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(18): 8129-34.
 - 25 Kerr CL, Cheng L. Multiple, interconvertible states of human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(6): 497-9.

Multiple Pluripotent States of Human and Mouse Embryonic Stem Cells

Chen Yifei, Lai Dongmei*

(The International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells obtained from embryos during early development. Mouse embryonic stem cells (mESCs) can be defined into naïve and primed pluripotent cells depending on the distinct phases of embryonic development from which they were derived. Those cells show different colony morphology, pluripotency, culture conditions for self-renewal, gene expression and epigenetic features. And the two cell types can be interconverted into each other under specific conditions. As human embryonic stem cells (hESCs) are more akin to primed mESCs than to the naïve mESCs, they are thought to be derived from later stage of development compared to mESCs. However, this view is being challenged since naïve pluripotent hESCs identification. The establishing and characterizing of naïve hESCs is essential for both developmental mechanism research and clinical application studying. Here we review recent advances in generation and identification of multiple pluripotent ESCs.

Key words embryonic stem cells; pluripotent state; interconvert

Received: May 3, 2011 Accepted: June 29, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81070533) and Laboratory of Molecular Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences

*Corresponding author. Tel: 86-21-64070434-27702, E-mail: laidongmei@hotmail.com