

维持胚胎干细胞自我更新状态的分子信号途径

高远 宋后燕*

(复旦大学分子医学教育部重点实验室, 复旦大学生物医学研究院干细胞与组织工程研究所, 上海 200032)

摘要 胚胎干细胞是从胚胎植入前期胚泡内细胞团分离的细胞, 可以长久维持对称性自我更新的未分化状态。多种胞内外细胞因子介导的信号途径参与这种状态的调节。现对胚胎干细胞自我更新途径分子机制进行综述, 并提出有待进一步阐明的相关问题。

关键词 胚胎干细胞; 自我更新; 分子信号途径

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞), 是从哺乳动物胚胎植入前期胚泡内细胞团(inner cell mass, ICM)分离的细胞^[1,2]。ES 细胞的多能性(pluripotency), 即可分化为全部 3 个胚层的细胞类型; 永生性(immortality), 即长久维持体外对称性分裂而不发生分化, 以及分化后几乎不表现免疫性的特点使其成为进行细胞替代、移植治疗的理想资源^[3]。在维持 ES 细胞自我更新状态的过程中, 多种细胞因子通过参与维持 ES 细胞自我更新的不同信号途径维持 ES 细胞的多能性与永生性。首先被阐明的是白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)^[4-6]。随着基因组数据的日益完备与多种 ES 细胞系的建立, 提供了研究 ES 细胞自我更新状态的重要而保守的信号途径的必要条件, 至今已确定了许多与 ES 细胞自我更新状态紧密相关的分子标记。本文对近年 ES 细胞自我更新途径分子信号途径进行简要综述, 并进一步提出可能参与 ES 细胞长期自我更新并处于未分化状态的其他分子信号途径。

1 胞外因子介导的信号途径(图 1)

1.1 LIF 途径

LIF 是 LIF、oncostatinM、IL-6 细胞因子超家族成员。通过与细胞膜上 LIFR/gp130 异二聚化受体结合, 激活 JAK/STAT-3 和 ERK/MEK/RAS/Raf 两条下游信号转导通路, 共同调节 ES 细胞的自我更新状态。

1.1.1 JAK/STAT-3 通路 JAK/STAT-3 通路是维持小鼠 ES 细胞自我更新状态非常关键的信号途径^[7]。LIF-LIFR-gp130 复合体激活 JAK (Janus associated kinase), 使 LIFR-gp130 磷酸化; 磷酸化后的 LIFR-gp130 能与含 SH2 (Src homology 2) 结构

域蛋白质如 STAT-3 结合。STAT-3 被 JAK 磷酸化后形成二聚体入核, 通过直接调控转录因子 Myc 的表达, 从而间接调节某些与小鼠 ES 细胞自我更新相关靶基因的转录来维持 ES 细胞的多能性。Cartwright 等^[8]发现, 在撤除 LIF 的培养基中, 小鼠 ES 细胞 Myc 的 mRNA 含量明显下降, 其蛋白质多肽链第 58 位苏氨酸(T58)发生磷酸化, 激活了 Wnt 信号通路下游分子 GSK3 β 依赖性 Myc 降解。STAT-3 对 Myc 稳定转录调控与 Myc T58 磷酸化的抑制是调节 Myc 活性, 维持小鼠 ES 细胞自我更新的重要条件。在 LIF 不存在的情况下激活 STAT-3 足以维持 ES 细胞长期的自我更新状态^[9]。尽管 JAK/STAT-3 通路对维持体外培养小鼠 ES 细胞处于未分化的自我更新状态起重要作用, 然而该通路在体内小鼠胚胎原肠胚形成前的作用并非不可或缺^[10], 而且在维持体外培养人 ES 细胞的自我更新状态上作用甚微^[11]。

1.1.2 MAPK/ERK 通路 LIF-LIFR-gp130 复合体在激活 JAK/STAT-3 通路的同时也激活 MAPK 通路, 经一系列磷酸化激活 RAS-Raf-MEK 活化 ERK。活化的 ERK 进入细胞核调控 Elk、Ets、Myc 和血清反应因子(serum response factor, SRF)等转录调节因子的活性, 促进 ES 细胞分化。若用药物抑制 MEK 活性或强制性表达 ERK 磷酸化酶都可以减少分化从而维持 ES 细胞的自我更新状态^[12]。许多与 LIF 通路协同维持 ES 细胞自我更新状态的信号途径都能抑制 MAPK/ERK 途径发挥作用。

1.2 BMP 途径

LIF 并不是单独维持 ES 细胞自我更新作用, 骨形态发生蛋白(bone morphogenic protein, BMP)与其

收稿日期: 2005-03-15 接受日期: 2005-04-27

* 通讯作者。Tel/Fax: 021-64033738, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

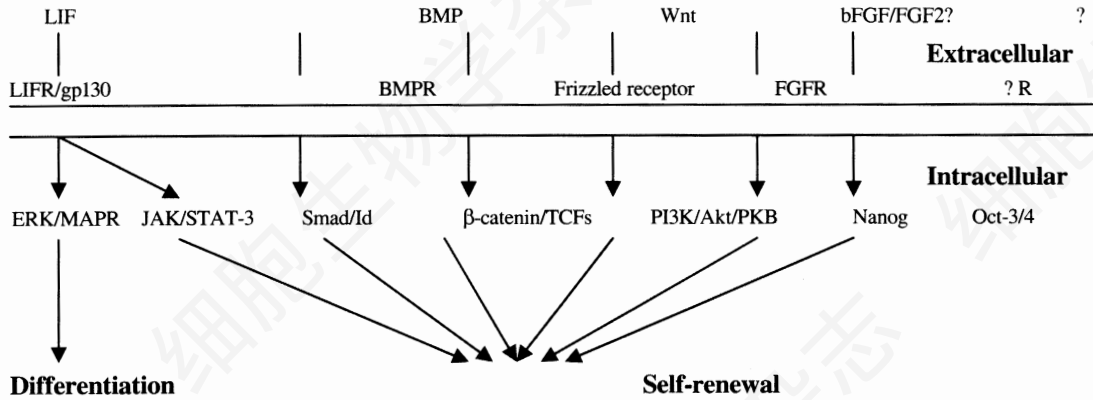


Fig.1 Molecular signaling pathways for maintaining self-renewal of ES cells

起协同作用。基因芯片检测基因表达发现 BMP 信号途径的组分在小鼠和人 ES 细胞未分化状态下的表达水平是升高的,提示 BMP 途径可能参与维持 ES 细胞自我更新状态。在 LIF 存在的情况下 BMP 主要通过细胞表面 BMP 受体(BMPR)结合,激活 Smad 信号通路,诱导 *Id* 基因的表达,从而维持 ES 细胞自我更新状态。外源性过表达 *Id* 基因可去除 ES 细胞对 BMP 或血清的依赖,并使其在仅含 LIF 的培养基中得以维持自我更新状态。BMP/Smad 途径在维持 ES 细胞自我更新状态的作用依赖于 LIF: 撤除 LIF 后, BMP/Smad 途径的作用则转变为促进 ES 细胞的多向分化(除神经细胞系外)。经 LIF+BMP 处理过的小鼠 ES 细胞可重新融入胚胎组织并发育成为各胚层组织结构,形成嵌合性小鼠。这些都说明了 BMP 途径在 LIF 存在的情况下对小鼠 ES 细胞自我更新状态的维持起着重要作用^[13]。Qi 等^[14]发现: BMP4/BMPR1a(ALK3)能抑制促进 ES 细胞分化的 p38/ERK 通路,从而与 LIF 在 ES 细胞多能性和自我更新状态的维持上起协同作用;外源性 p38 抑制剂(SB203580)和(或)ERK 抑制剂(PD98059)可模拟 BMP4 对 p38/ERK 通路的抑制作用。该结论对进一步研究 BMP 途径在维持 ES 细胞自我更新状态的作用方式有所启示。

1.3 Wnt 途径

EST (expressed sequence tags)和MPSS (massively parallel signature sequencing)对于小鼠和人 ES 细胞的分析结果显示: Wnt 途径相关成分在未分化的 ES 细胞中有明显表达,这说明 Wnt 途径可能参与维持 ES 细胞多能性与自我更新状态^[15]。Wnt 与细胞表面 Frizzled 受体结合,抑制糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase, GSK-3)活性,解除对 β 连环蛋白

(β -catenin)的磷酸化。未磷酸化的 β 连环蛋白在胞质聚集并在 LEF/TCFs 协助下转位入核,与 T 细胞因子(TCFs)共同启动维持 ES 细胞自我更新相关靶基因的转录。Sato 等^[16]发现:使用外源性药物(BIO)特异性抑制 GSK-3 活性,可激活 Wnt 信号途径,使小鼠和人 ES 细胞处于未分化状态; *Rex1*、*Oct-3/4*、*Nanog* 等均为与 ES 细胞多能性状态相关的特异性转录因子,其基因表达维持在一定水平。Wnt 途径与细胞外基质(ECM)信号的相互作用在某种程度上对维持 ES 细胞自我更新状态也起重要作用。Orsulic 等^[17]发现:在上胚层表达的 E-钙黏着蛋白(E-cadherin)能抑制 β 连环蛋白的核内聚集,继而抑制 β 连环蛋白/LEF-1(淋巴细胞表达因子, T 细胞因子的一种)介导的靶基因的转录活性。在 E-钙黏着蛋白^{-/-}ES 细胞中,以上抑制作用得以缓解,靶基因在 β 连环蛋白/LEF-1 介导下进行转录。由于模拟了经典 Wnt 信号途径,ES 细胞的自我更新状态得以维持。由此可见, Wnt 信号途径在 ES 细胞自我更新过程中起重要作用。

1.4 胞外信号途径的相互协同作用

新近发现 LIF/STAT-3 通路下游转录因子 *Myc* 的活性直接受到 STAT-3 调控。*Myc* 表达水平在未分化小鼠 ES 细胞中维持较高水平,一旦撤除 LIF 破坏了 STAT-3 的激活, *Myc* 的 mRNA 含量显著下降并且其 T58 的磷酸化启动了依赖 Wnt 通路下游 GSK-3 β 的降解过程。尽管 LIF 和 Wnt 信号途径各自单独调节小鼠 ES 细胞自我更新,但 Cartwright 等^[8]提出 LIF 和 Wnt 途径很可能在转录因子 *Myc* 层面上发生交汇,协同调节小鼠 ES 细胞自我更新。在含 Wnt3a 的条件培养基中,小鼠 ES 细胞 *Myc* 的蛋白质水平

明显升高; T58 处于去磷酸化状态; GSK-3 β 处于低活性。撤除 Wnt3a 后一天, Myc T58 磷酸化水平和 GSK-3 β 活性即明显增加, 启动 Myc 降解, ES 细胞发生分化。这些都强有力地证明了 LIF 和 Wnt 信号途径可能存在的“共同交汇理论”。

在添加 LIF 的培养基中, BMP 与细胞表面 BMP 受体(通常是 I 型受体)结合, 激活 Smad1 和 Smad5, 在 Smad4 的协助下转位入核, 诱导 *Id* 基因的表达维持小鼠 ES 细胞自我更新。而在撤除 LIF 的培养条件下, BMP 信号途径则促进小鼠 ES 细胞向非神经细胞系分化^[13]。BMP 与 LIF 之间的协同作用是由于 BMP 信号途径抑制了 LIF/ERK/MAPK 分支通路, 从而与 LIF/JAK/STAT-3 分支通路形成加强性协同, 维持小鼠 ES 细胞的未分化状态^[14]。

2 胞内因子介导的信号途径(图 1)

2.1 Nanog 途径

Nanog 是在小鼠 ES 细胞中高水平表达的含有同源异形结构域的蛋白质, 在人 ES 细胞中同样处于高表达, 随着细胞的分化表达水平逐渐降低^[18]。Chambers 等^[18]和 Mitsui 等^[19]发现: Nanog 途径在维持 ES 细胞自我更新过程中不依赖于 LIF 或 BMP 途径; Nanog 途径与 LIF 途径的作用相互平行: 外源性过表达 *nanog* 基因并不影响 STAT-3 磷酸化水平; 编码 STAT-3 和 Nanog 基因功能缺失的 ES 细胞表型也不相同: 编码 STAT-3 的基因功能缺失导致 ES 向包括原始内胚层和中胚层在内的多细胞系分化, 但并不向脏层、壁层内胚层细胞系分化; *nanog* 基因缺失的 ES 细胞则向脏层, 壁层内胚层细胞系分化; 此时, LIF 仍可增强外源性过表达 *nanog* 基因的生长, 说明 Nanog 途径并非位于 STAT-3 下游, 而是与 LIF/STAT-3 途径相对独立的。许多研究结论证明 Nanog 能维持胚胎干细胞处于未分化状态, 当过表达时保持胚胎干细胞 Oct-3/4 保持正常表达量。Nanog 途径在体内维持小鼠胚胎 ICM 正常发育和维持体外培养小鼠 ES 细胞多能性上都有作用。然而有关 *nanog* 基因的表达调控及其与 Oct-3/4 信号在下游如何汇合尚不清楚。

2.2 Oct-3/4 途径

转录因子 Oct-3/4 的精确表达是维持 ES 细胞多能性的重要指标, 过表达或低表达都会改变 ES 细胞自我更新状态^[20]。Oct-3/4 与其他转录因子如 Sox、FoxD3 结合, 共同作用于许多下游靶基因的

启动子或增强子, 正/负调控下游靶基因的表达, 从而维持 ES 细胞的自我更新状态^[21]。在许多转录因子(如 Sox2, Utf1, Rex-zfp42, FGF4 等)的调节区域都可以发现相互邻近的 Oct 和 Sox 的结合位点。许多受 Oct-Sox 信号调控的基因同时含有 STAT 结合位点, 说明 LIF 和 Oct 通路都可在转录水平调节 ES 细胞特异性基因的表达。但是 LIF 途径并不调节 Oct-3/4 途径; Oct-3/4 途径也并不作用于 Jak/STAT 信号途径都说明了 Oct 途径与 LIF 途径一样在维持 ES 细胞自我更新状态上起平行的作用^[21]。目前已经发现很多 Oct 信号途径下游的相互作用因子, 但是其上游调控成分尚不清楚。

2.3 PI3K 信号途径

磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)是脂激酶家族成员, 在细胞增殖调控、存活、迁移等方面有重要作用^[21]。其分解产物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PI(3,4)P₂)和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PI(3,4,5)P₃)是胞内信号转导的第二信使。Paling 等^[22]发现, PI3K 在维持小鼠 ES 细胞自我更新方面有重要的作用: 使用 PI3K 可逆性抑制剂 LY294002 或调节性表达 dominant-negative p85, Δ p85 由于缺失 p110 结合位点, 对 PI3K I_A 家族有竞争性抑制作用, 并减弱 LIF 维持 ES 自我更新的作用, 使 ES 细胞朝分化的方向发展。他们的实验结果认为: LY294002 和 Δ p85 能显著升高 LIF 诱导的 ERK 的磷酸化程度, 但对 LIF 诱导的 STAT-3 磷酸化却无影响, 可见 PI3K 主要通过抑制 MAPK/ERK 通路维持 ES 细胞的自我更新状态。Kim 等^[23]发现, PI3K 信号途径在维持人 ES 细胞自我更新中也起重要作用: 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是体外培养人 ES 细胞, 并使其保持未分化状态的重要因子。bFGF2 激活 PI3K/Akt/PKB 途径, 使细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分子正常表达。ECM 分子则能诱导促进人 ES 细胞增殖, 并保持未分化状态的信号^[24]。

3 人与小鼠 ES 细胞自我更新信号分子的差异

人和小鼠 ES 细胞最初都被分离并培养于含血清的成纤维细胞饲养层上。尽管两者初始培养条件相似, 但调节人和小鼠 ES 细胞自我更新的因子却不尽相同。LIF 被用于维持小鼠 ES 细胞未分化状态, 它与 LIF 受体异二聚体 LIR/gp130 结合, 并活化 JAK/STAT3 信号。然而添加 LIF 或激活 STAT3 都不能

维持人 ES 细胞处于未分化状态^[25]。尽管 BMP 能在无血清培养条件与 LIF 协同维持小鼠 ES 细胞自我更新, 然而在人 ES 细胞中 BMP 却能诱导滋养层细胞的分化^[26]; Pera 等^[27]发现应用 BMP 拮抗剂 noggin 封闭 BMP 信号途径却并不能维持人 ES 细胞的未分化状态, 反而能通过抑制非神经分化来诱导人 ES 细胞向神经细胞方向分化。Xu 等^[28]研究表明, noggin 能与 bFGF 协同抑制 BMP 促分化信号途径, 在无滋养层或条件培养基状态下维持人 ES 细胞自我更新状态。

4 小结和展望

ES 细胞维持自我更新状态为多途径共同作用结果, 各通路既可独立发挥作用, 又可相互协同互相关联。LIF、BMP、Wnt 等胞外分子通过跨膜信号转导激活相应信号途径, 各信号通路间存在网络交叉协同; 许多尚未明了的胞外分子通过已经阐明的下游胞内分子介导的信号途径如 Nanog、Oct-3/4、PI3K 等调节维持 ES 细胞自我更新。但总而言之, 胞内外信号分子介导信号途径之共同作用是促进 ES 细胞的对称性自我更新或抑制其多向分化, 从而维持 ES 细胞的多能性与永生性。值得指出的是, 人 ES 细胞相对于小鼠 ES 细胞, 其自我更新分子机制存在很大差异。

ES 细胞自我更新状态通过复杂的信号通路得以维持, 除了上述途径外, 还有许多调节途径包括异

染色质基因, 微小 RNA, 参与端粒调节的基因等, 有待进一步研究。ES 细胞自我更新信号途径的研究, 从分子水平揭示了这种神奇细胞的本质, 为干细胞生物学的迅速崛起与应用提供了强有力的支持。

参考文献 (References)

- [1] Evans MJ *et al.* *Nature*, 1981, **292**: 154
- [2] Martin GR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 7634
- [3] Thomson JA *et al.* *Science*, 1998, **282**: 1145
- [4] Simth AG *et al.* *Nature*, 1988, **336**: 688
- [5] Williams RL *et al.* *Nature*, 1988, **336**: 684
- [6] Yoshida K *et al.* *Mech Dev*, 1994, **45**: 163
- [7] Niwa H *et al.* *Genes Dev*, 1998, **12**: 2048
- [8] Cartwright P *et al.* *Development*, 2005, **132**: 885
- [9] Matsuda T *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 4261
- [10] Simth AG. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, **17**: 435
- [11] Daheron L *et al.* *Stem Cells*, 2004, **22**: 770
- [12] Burdon T *et al.* *Dev Biol*, 1999, **210**: 30
- [13] Ying QL *et al.* *Cell*, 2003, **115**: 281
- [14] Qi X *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 6027
- [15] Brandenberger R *et al.* *BMC Dev Biol*, 2004, **4**: 10
- [16] Sato N *et al.* *Nat Med*, 2004, **10**: 55
- [17] Orsulic S *et al.* *J Cell Sci*, 1999, **112**: 1237
- [18] Chambers I *et al.* *Cell*, 2003, **113**: 643
- [19] Mitsui K *et al.* *Cell*, 2003, **113**: 631
- [20] Niwa H. *Cell Struct Funct*, 2001, **26**: 137
- [21] Rao M. *Dev Biol*, 2004, **275**: 269
- [22] Paling NRD *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 48063
- [23] Kim SJ *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 534
- [24] Xu C *et al.* *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 971
- [25] Daheron L *et al.* *Stem Cells*, 2004, **22**: 770
- [26] Xu RH *et al.* *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 1261
- [27] Pera MF *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 1269
- [28] Xu RH *et al.* *Nat Methods*, 2005, **2**: 185

Molecular Signaling Pathway for Maintaining Self-renewal of Embryonic Stem Cells

Yuan Gao, Hou-Yan Song*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, China; Institute of Stem Cell and Tissue Engineering, Institute of Biomedical Sciences (IBS), Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Embryonic stem cells (ES cells) are derived from the inner cell mass (ICM) of mammalian preimplantation blastocyte. They can undergo symmetrically self-renew to consistently maintain the undifferentiated state. Multiple cytokine-mediated signaling pathways participate in regulating such status of ES cells. We reviewed the molecular signaling pathways being critical to the maintenance of self-renewal of ES cells based on the current research results. And furthermore, we addressed some pending results which seem to be essential for the undifferentiated proliferation of ES cells.

Key words embryonic stem cell; self-renewal; molecular signaling pathway

Received: March 15, 2005 Accepted: April 27, 2005

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-64033738, E-mail: hysong@shmu.edu.cn