

# ERK信号通路在人胚胎干细胞造血分化中的作用研究

王洪涛<sup>#</sup> 刘鑫<sup>#</sup> 王梦鸽 苏培 张磊升 刘翠翠 王钰 吴丹 涂茜 周家喜\*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

**摘要** 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)信号通路在斑马鱼及小鼠造血发生中发挥着重要作用, 但其在人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)造血分化中的作用尚不清楚。该研究利用hESCs单层造血分化模型及ERK信号通路抑制剂PD98059探索了ERK信号通路在hESCs造血分化中的作用。采用免疫荧光技术、流式细胞术分析发现, PD98059能够显著抑制CD43<sup>+</sup>造血干/祖细胞的产生。进一步的研究发现, PD98059的作用阶段为APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层产生阶段, 在该作用阶段添加PD98059与造血分化全程添加对CD43<sup>+</sup>造血干/祖细胞产生的抑制效果一致。该研究结果表明, 抑制ERK信号通路通过抑制侧板中胚层细胞的产生而抑制hESCs造血分化。该研究为建立体外hESCs高效造血分化体系及规模化产生功能性血细胞奠定了理论基础。

**关键词** 人胚胎干细胞; 造血分化; ERK信号通路

## The Role of ERK Signaling in Hematopoietic Differentiation from hESCs

Wang Hongtao<sup>#</sup>, Liu Xin<sup>#</sup>, Wang Mengge, Su Pei, Zhang Leisheng,

Liu Cuicui, Wang Yu, Wu Dan, Tu Qian, Zhou Jiayi\*

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

**Abstract** Extracellular regulated protein kinase (ERK) pathway has been reported to play a critical role in hematopoiesis in zebrafish and mouse. However, the role of ERK pathway in hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells (hESCs) remains unclear. In this study, we investigated the role of ERK pathway in hematopoietic specification from hESCs by taking the advantage of a chemical defined hematopoietic differentiation model and PD98059, a specific inhibitor of ERK pathway. The results of immunofluorescence and flow cytometry analysis revealed that PD98059 treatment significantly inhibited the generation of CD43 positive hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). Further studies demonstrate that PD98059 suppresses hematopoietic differentiation through inhibiting the generation of APLNR positive lateral plate mesoderm cells. The addition of PD98059 in the stage of lateral plate mesoderm cell generation and the whole process of hematopoietic differentiation shows similar inhibitory effect on the generation of HSPCs. Taken together, our findings indicate that the inhibition of ERK

收稿日期: 2017-03-29 接受日期: 2017-05-04

国家自然科学基金(批准号: 31500949)和中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2016-I2M-1-018、2016-I2M-3-002)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 022-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

Received: March 29, 2017 Accepted: May 4, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31500949) and CAMS Initiative for Innovative Medicine (Grant No.2016-I2M-1-018, 2016-I2M-3-002)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2017-05-18 17:02:22 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170518.1702.010.html>

pathway suppresses hematopoietic differentiation from hESCs through repressing the generation of lateral plate mesoderm cells. This study provides a theoretical foundation for the establishment of a highly efficient hematopoietic differentiation system of hESCs and the large-scale production of functional blood cells *in vitro*.

**Keywords** human embryonic stem cells; hematopoietic differentiation; ERK pathway

人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)包括人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)以及人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs),具有无限增殖及分化为人体各种细胞类型的能力<sup>[1]</sup>。2001年, Kaufman等<sup>[2-3]</sup>证实, hESCs在体外具有造血分化潜能后, hPSCs造血分化的研究取得很大进展。目前, 对hPSCs在体外可以分化产生几乎全部的功能性血细胞, 包括红细胞、巨核细胞、B细胞、T细胞等。hPSCs造血分化研究为解决临床用血紧张的问题提供了新途径, 然而当前hPSCs诱导分化产生的红细胞和血小板数量远低于临床所需输血标准, 且不能产生具有移植能力的造血干细胞。阐明hPSCs造血分化的调控机制将有助于这些问题的解决<sup>[4]</sup>。

与体内造血发育过程类似, 体外hPSCs造血分化也依次经历多个中间状态细胞群: 多能干细胞、中胚层细胞、侧板中胚层细胞、生血内皮细胞、造血干/祖细胞<sup>[5]</sup>。研究发现, 各个阶段细胞群体都可以用相应的标志分子标记: Brachyury标记中胚层细胞、APLNR(apelin receptor)标记侧板中胚层细胞、CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>标记生血内皮细胞、CD43<sup>+</sup>标记造血干/祖细胞<sup>[6]</sup>。每一阶段细胞群体的产生都受到精细的调控, 如BMP4(bone morphogenetic protein 4)、激活蛋白A(Activin A)信号通路调控中胚层细胞的产生<sup>[7]</sup>; VEGF(vascular endothelial growth factor)、FGF(fibroblast growth factor)细胞信号通路调控生血内皮细胞的产生<sup>[8]</sup>; TGF $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ )、Notch和RA(retinoic acid)信号通路调控造血干/祖细胞的产生<sup>[8-10]</sup>。目前, 对hPSCs造血分化中侧板中胚层产生的调控机制还知之甚少, 而其他阶段细胞群体产生的调控机制相对较清楚。

细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路调控多种重要的细胞生物学过程, 包括细胞增殖、迁移、分化和凋亡等<sup>[11]</sup>。最近研究发现, ERK信号通路在斑马鱼及小鼠造血发生中发挥着重要作用<sup>[12-14]</sup>, 但其在hESCs造血分化中作用及具体作用的阶段还不清楚。利用我

们已建立的hESCs逐级造血分化模型<sup>[15]</sup>, 本研究证实了ERK信号通路通过调控侧板中胚层的产生促进hESCs造血分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 人胚胎干细胞的培养与传代

人胚胎干细胞株H1购自WiCell, 培养于包被有基底膜基质(matrigel)(BD公司)的培养板中, 培养基为mTeSR(STEM CELL Technologies公司), 每日更换培养基。H1细胞克隆传代, 使用2 U/mL的分散酶(dispace)(STEM CELL Technologies公司)在37 °C孵箱中孵育6~8 min, 加入DMEM/F12基础培养基洗3次, 然后使用移液管尖端刮培养皿底部, 使H1细胞呈小克隆状, 收集细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min。mTeSR培养基重悬后, 平均分入培养皿中。H1单细胞传代, 使用1 mg/mL Accutase、37 °C消化细胞3 min。DMEM/F12基础培养基重悬细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min。mTeSR培养基重悬后, 平均分入培养皿中, 为了增加细胞的存活效率, 培养基中添加Y-27632(终浓度为5  $\mu$ mol/L)。

### 1.2 人胚胎干细胞的造血分化

人胚胎干细胞造血分化按照已建立的方法进行<sup>[12]</sup>。人胚胎干细胞消化成单个细胞后以 $3 \times 10^4$ /孔接种于12孔板中。12孔板培养皿预先包被Growth Factor Reduced Matrigel(BD公司), 培养24 h后, 更换造血诱导分化液, 此时记为造血诱导分化0 d, 造血分化0~2 d, 在Custom mTeSR1中添加40 ng/mL 激活蛋白A(Activin A)(Peprotech公司)和50 ng/mL BMP4(Peprotech公司); 造血分化2~4 d, 在Custom mTeSR1中添加40 ng/mL VEGF(Peprotech公司)和50 ng/mL bFGF(Peprotech公司); 造血分化4~7 d在Custom mTeSR1中添加40 ng/mL VEGF、50 ng/mL bFGF和20  $\mu$ mol/L SB-431542(Stemgent公司)。在造血分化过程的不同阶段, 使用20  $\mu$ mol/L PD98059处理细胞, 检测ERK信号通路在人胚胎干细胞造血分化的作用及作用阶段。

### 1.3 蛋白质免疫印迹

将蛋白质上样到SDS-PAGE胶中, 80 V恒压电

泳100 min。电泳结束后将蛋白质转移到硝酸纤维素薄膜上, 200 mA恒电流电泳150 min。将膜转移到1×TBST配制的5%牛奶室温封闭60 min。加入一抗pERK1/2(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling Technology公司)(1:200)和ERK1/2(Cell Signaling Technology公司)(1:1 000), 4 °C孵育过夜。1×TBST洗3次后使用二抗(1:2 000)室温孵育1 h, 1×TBST洗3次后显影。

#### 1.4 流式细胞术分析

Accutase消化预备进行流式细胞术检测的细胞至单细胞状态, 1 000 r/min离心5 min, 0.2% BSA重悬细胞。室温标记目的抗体30 min后, PBS洗细胞, 并用200目筛网过滤细胞后进行流式细胞术检测, 结果使用Flowjo软件进行数据分析。本研究中所使用的流式细胞术抗体有: PE-Brachyury(R&D公司)、APC-APLNR(R&D公司)、PE-CD31(BD公司)、APC-CD34(BD公司)、PE-CD43(BD公司)。抗体浓度以1:100稀释。

#### 1.5 免疫荧光

PBS将待染色细胞清洗1次。4%多聚甲醛室温固定样品15 min, PBS清洗样品3次, 每次5 min。加入含有0.2% Triton X-100的通透液, 室温通透15 min后, PBS清洗样品3次, 每次5 min。1% BSA室温封闭样品1 h。将小鼠抗CD43的抗体, 用1% BSA以1:100稀释。将孵育抗体的样品置于4 °C冰箱中。24 h后, 回收抗体, PBS洗样品3次后, 使用488-anti-mouse荧光抗体室温标记1 h。细胞核使用DAPI标记, 室温标记15 min。PBS清洗细胞样品3次, 每次5 min。使用PerkinElmer UltraVIEW VoX转盘式荧光显微镜进行拍摄, 获取荧光图像。

#### 1.6 统计学方法

实验数据均以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。利用GraphPad Prism软件对实验数据作标准 $t$ 检验分析,  $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PD98059对人胚胎干细胞造血分化的影响

我们利用已建立的人胚胎干细胞单层造血诱导分化体系<sup>[15]</sup>, 在造血分化的过程中添加PD98059特异地抑制ERK信号通路, 以研究ERK信号通路在造血分化过程中的作用。结果显示, 在人胚胎干细胞造血分化的不同时间点, PD98059均能有效地抑制ERK1/2的磷酸化, 而对总ERK1/2蛋白质水

平没有显著的影响(图1A)。与对照组(DMSO)相比, PD98059显著地抑制“鹅卵石”样造血前体细胞的产生(图1B)。免疫荧光结果同样表明, PD98059显著地抑制CD43<sup>+</sup>造血祖细胞的产生(图1C)。流式细胞术分析结果显示, 实验组(PD98059)与对照组(DMSO)相比, CD43<sup>+</sup>造血祖细胞的产生受到显著抑制(DMSO vs PD98059: 20.50%±0.85% vs 10.53%±2.20%;  $P<0.05$ )(图1D)。以上结果说明, 抑制ERK信号通路能够显著抑制人胚胎干细胞造血分化。

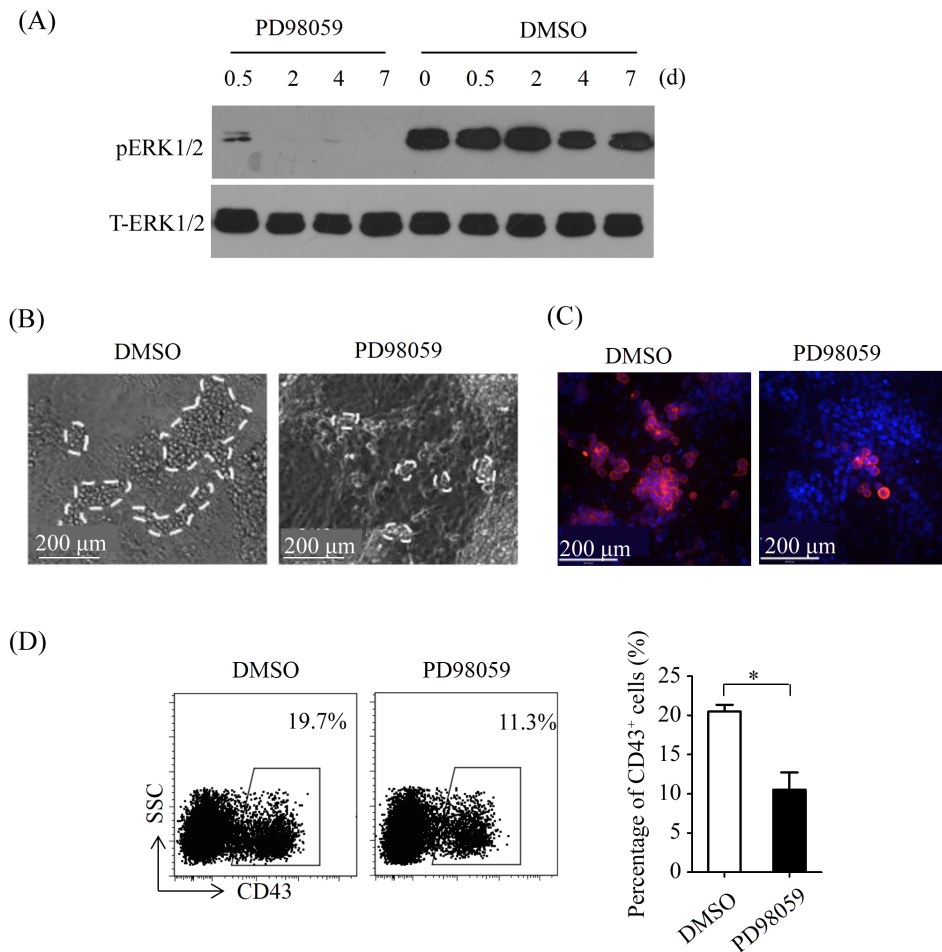
### 2.2 PD98059显著抑制人胚胎干细胞向APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层细胞和生血内皮细胞的分化

我们使用的人胚胎干细胞单层造血分化体系能够精确地模拟正常造血发育过程, 相继经历以下4个阶段: Brachyury<sup>+</sup>中胚层前体细胞、APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层细胞、CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>生血内皮细胞和CD43<sup>+</sup>造血前体细胞(图2A)。上述结果表明, PD98059能够显著抑制人胚胎干细胞造血分化(图1), 为了探索PD98059在哪个阶段发挥抑制造血分化作用的, 依次检测了PD98059前3个阶段细胞产生的影响。结果显示, PD98059对Brachyury<sup>+</sup>中胚层前体细胞的产生有微弱的抑制作用(DMSO vs PD98059: 82.30%±0.95% vs 76.87%±0.22%,  $P<0.01$ )(图2B), 而显著地抑制了APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层细胞的产生(DMSO vs PD98059: 20.83%±1.00% vs 10.83%±1.62%,  $P<0.01$ )(图2C)。以上结果说明, PD98059主要抑制了中胚层前体细胞进一步分化为侧板中胚层细胞。PD98059也相应地显著抑制了CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>生血内皮细胞的产生(DMSO vs PD98059: 16.25%±0.77% vs 5.80%±0.40%,  $P<0.001$ )(图2D)。

### 2.3 PD98059通过抑制侧板中胚层细胞的产生抑制人胚胎干细胞造血分化过程

上述结果表明, PD98059抑制了侧板中胚层细胞的产生, 进而抑制了生血内皮和造血祖细胞的产生。为了确定PD98059发挥作用的阶段, 我们首先在造血发生的不同阶段添加PD98059检测抑制ERK信号通路对生血内皮细胞产生的影响。结果如图3A显示, 在侧板中胚层发生阶段(D0~D2)添加PD98059显著抑制了CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>生血内皮细胞的产生(DMSO vs PD98059 D0~D2: 16.07%±0.72% vs 7.273%±1.26%;  $P<0.01$ ), 且与造血分化过程(D0~D4)





A: 人胚胎干细胞造血分化的不同时间点对照组(DMSO)和实验组(PD98059)中T-ERK1/2和pERK1/2蛋白质水平; B: 人胚胎干细胞造血分化第7 d, 对照组(DMSO)和实验组(PD98059)的细胞形态图(白色虚线表示造血环境中产生的“鹅卵石”样血细胞); C: 免疫荧光检测对照组(DMSO)和实验组(PD98059)在人胚胎干细胞造血分化第7 d产生的CD43<sup>+</sup>细胞; D: 流式细胞术分析检测对照组(DMSO)和实验组(PD98059)在人胚胎干细胞造血分化第7 d产生的CD43<sup>+</sup>细胞, \* $P < 0.05$ 。

A: the levels of T-ERK1/2 and pERK1/2 protein in DMSO and PD98059 groups at different times of hematopoietic differentiation from hESCs; B: the cell morphological images in DMSO and PD98059 groups at day 7 of hematopoietic differentiation from hESCs (the white dotted line show cobblestone cells); C: immunofluorescence analysis of CD43<sup>+</sup> cells in DMSO and PD98059 groups at day 7 of hematopoietic differentiation from hESCs; D: flow cytometry analysis of the percentage of CD43<sup>+</sup> hematopoietic precursors in DMSO and PD98059 groups at day 7 of hematopoietic differentiation from hESCs, \* $P < 0.05$ .

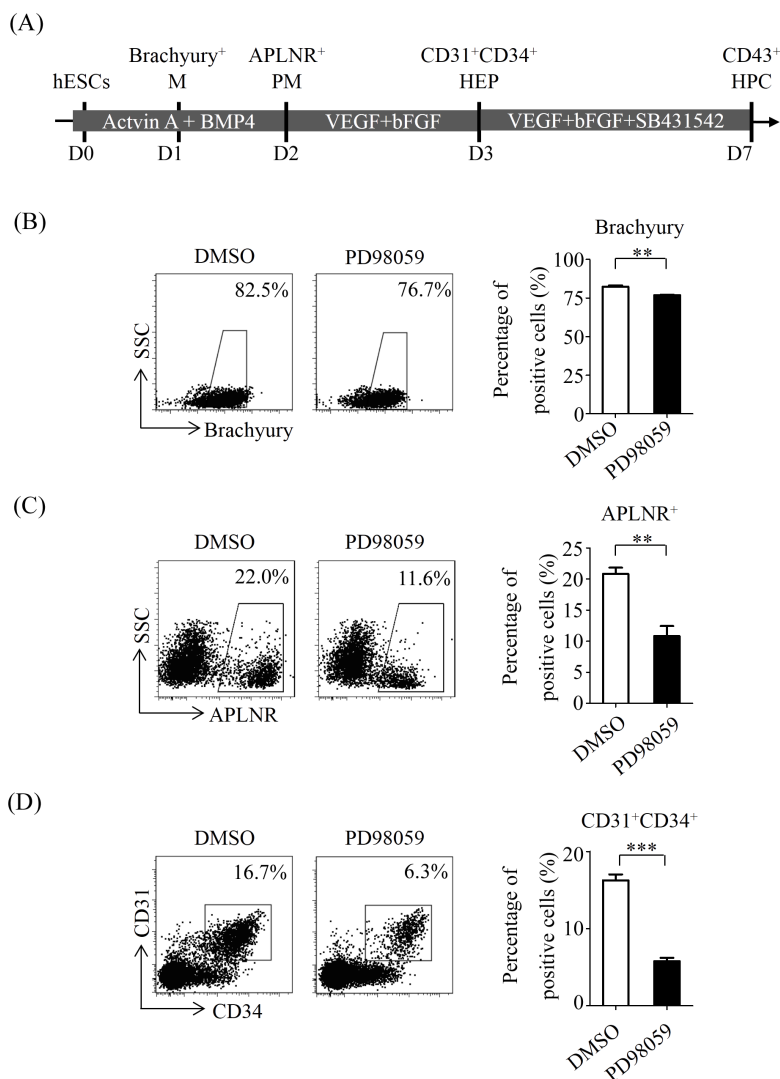
图1 PD98059对人胚胎干细胞造血分化的影响

Fig.1 The effect of PD98059 on the hematopoietic differentiation of hESCs

添加PD98059的抑制效果一致(PD98059 D0~D2 vs PD98059 D0~D4:  $7.27\% \pm 1.26\%$  vs  $6.24\% \pm 0.42\%$ ;  $P = 0.4827$ )。在生血内皮细胞发生阶段(D2~D4)添加PD98059不影响CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>生血内皮细胞的产生(DMSO vs PD98059 D2~D4:  $16.07\% \pm 0.72\%$  vs  $13.97\% \pm 0.99\%$ ;  $P = 0.1618$ )。以上结果说明, PD98059通过抑制侧板中胚层细胞的产生从而抑制生血内皮细胞的产生。

同样, 我们也在造血发生的不同阶段添加PD98059, 再检测抑制ERK信号通路对造血祖细

胞产生的影响。结果如图3B显示, 在侧板中胚层发生阶段(D0~D2)添加PD98059显著抑制了CD43<sup>+</sup>造血祖细胞的产生(DMSO vs PD98059 D0~D2:  $22.27\% \pm 0.77\%$  vs  $10.11\% \pm 3.19\%$ ;  $P = 0.0190$ ), 与造血分化过程(D0~D7)添加PD98059的抑制效果一致(PD98059 D0~D2 vs PD98059 D0~D7:  $10.11\% \pm 3.19\%$  vs  $11.00\% \pm 2.34\%$ ;  $P = 0.8306$ )。在生血内皮细胞发生阶段(D2~D4)和造血祖细胞发生阶段添加PD98059不影响CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>生血内皮细胞的产生(DMSO vs PD98059 D2~D4:  $22.27\% \pm 0.77\%$



A: 人胚胎干细胞造血分化流程示意图; B: 流式细胞术分析检测对照组(DMSO)和实验组(PD98059)在人胚胎干细胞造血分化第1 d产生的Brachyury<sup>+</sup>细胞群; C: 流式细胞术分析检测对照组(DMSO)和实验组(PD98059)在人胚胎干细胞造血分化第2 d产生的APLNR<sup>+</sup>细胞群; D: 流式细胞术检测对照组(DMSO)和实验组(PD98059)在人胚胎干细胞造血分化第4 d产生的CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞群。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: scheme of hESCs hematopoietic differentiation in chemical defined system; B: flow cytometry analysis of the percentage of Brachyury<sup>+</sup> hematopoietic precursors in DMSO and PD98059 groups at day 1 of hematopoietic differentiation from hESCs; C: flow cytometry analysis of the percentage of APLNR<sup>+</sup> subsets in DMSO and PD98059 groups at day 2 of hematopoietic differentiation from hESCs; D: flow cytometry analysis of the percentage of CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> subsets in DMSO and PD98059 groups at day 4 of hematopoietic differentiation from hESCs. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图2 PD98059显著抑制人胚胎干细胞向APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层细胞和生血内皮细胞的分化

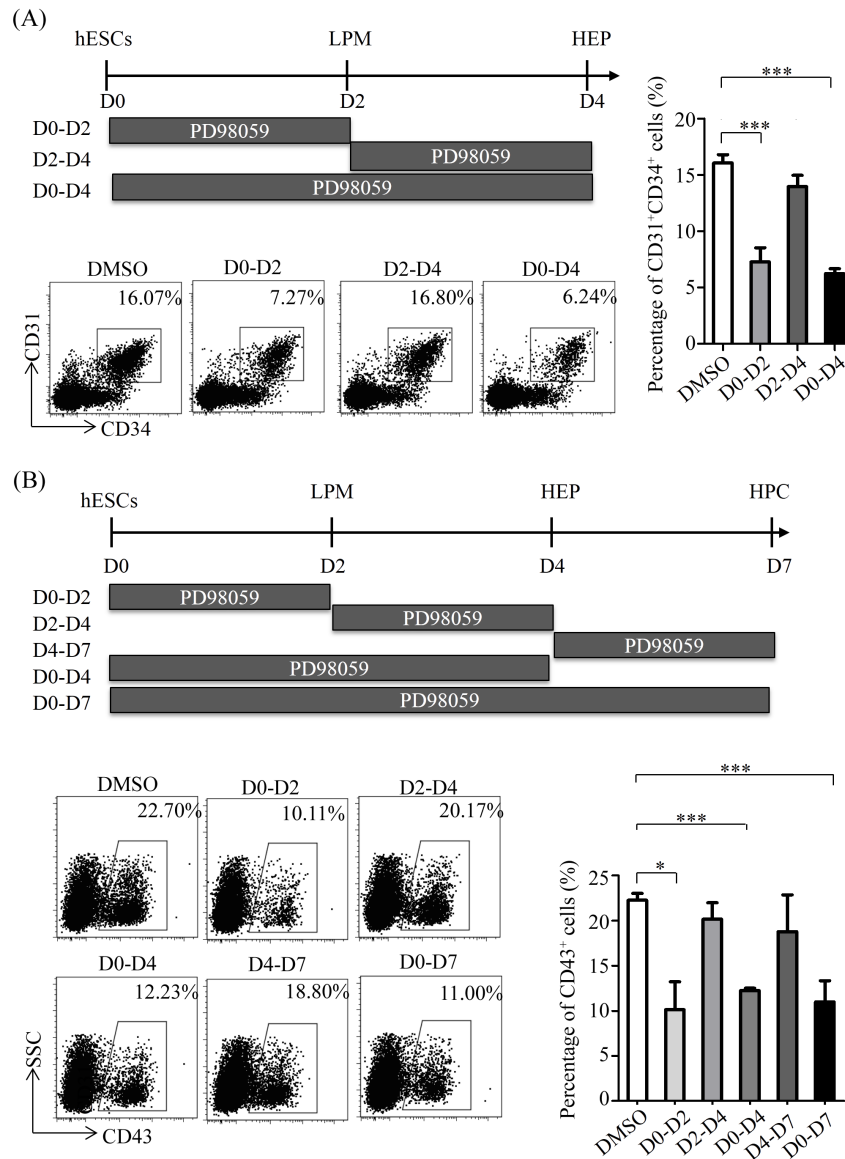
Fig.2 PD98059 significantly inhibits the generation of APLNR<sup>+</sup> lateral mesoderm cells and hemogenic endothelial progenitors

vs 20.70%±1.88%;  $P=0.3482$ )(DMSO vs PD98059 D4~D7: 22.27%±0.77% vs 18.80%±4.07%;  $P=0.4497$ )。以上结果说明, PD98059通过抑制侧板中胚层细胞的产生进而抑制造血祖细胞的产生。

### 3 讨论

人多能干细胞造血分化是个动态发育过程, 每个过程均受到不同信号通路的精密调控。我们已建立的hESCs单层造血分化体系<sup>[15]</sup>不依赖于血清, 培

养成分完全确定, 且能清晰地模拟体内造血发育过程。利用该造血分化体系, 我们发现, 抑制ERK信号通路能够显著抑制CD43<sup>+</sup>造血干/祖细胞的产生。进一步研究发现, 抑制ERK信号通路显著地抑制了APLNR<sup>+</sup>侧板中胚层细胞的产生, 而对Brachyury<sup>+</sup>中内胚层细胞的产生影响微弱。同时, 在侧板中胚层细胞产生的阶段与全程, 抑制ERK信号通路对造血分化的抑制程度一致, 而在生血内皮产生及造血干/祖细胞生成的阶段抑制ERK信号通路则不影响造血



A: 流式细胞术检测在人胚胎干细胞造血分化中不同阶段添加PD98059对CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞产生的影响; B: 流式细胞术检测在人胚胎干细胞造血分化中不同阶段添加PD98059对CD43<sup>+</sup>细胞产生的影响。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: cytometry analysis of the percentage of CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells at day 4 of hematopoietic differentiation from hESCs with the addition of PD98059 at the different stages. B: low cytometry analysis of the percentage of CD43<sup>+</sup> cells at day 7 of hematopoietic differentiation from hESCs with the addition of PD98059 at the different stages. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 PD98059通过抑制侧板中胚层细胞的产生抑制人胚胎干细胞造血分化过程

Fig.3 PD98059 inhibits hematopoietic differentiation from hESCs through suppressing the generation of APLNR<sup>+</sup> lateral mesoderm cells

分化的进程,说明ERK信号通路通过调控侧板中胚层的产生促进hESCs造血分化进程。

近年的研究相继发现,ERK信号通路在斑马鱼及小鼠造血发生中发挥着重要作用。Wang等<sup>[12]</sup>发现,ETS(E-twenty six)转录因子Fev通过增强ERK基因的表达促进斑马鱼体内内皮-造血转换过程(endothelial-hematopoietic transition, EHT),进而正调控造血发生。Lan等<sup>[13]</sup>报道,Smad4通过抑制ERK

信号通路负调控小鼠体内EHT过程,从而抑制造血干细胞的产生。这些研究均说明,ERK信号通路通过调控EHT过程促进造血,然而,ERK信号通路发挥作用是剂量依赖的。Zhang等<sup>[14]</sup>发现,过度激活ERK信号通路会促使生血内皮细胞持续维持动脉内皮细胞特性,反而抑制造血干细胞的产生,而Smad1/5信号通路通过负向调节ERK基因的表达使体内ERK信号通路维持在适度水平,从而有利于正常造血发生。

与模式生物体内ERK信号通路在EHT过程中发挥重要作用不同, 本研究发现, 在EHT阶段添加ERK信号通路抑制剂并不影响CD43<sup>+</sup>造血干/祖细胞的产生, 提示, ERK信号通路在人与模式生物造血发生中可能发挥着不同的作用。

综上所述, 本研究结果表明, ERK信号通路通过作用于侧板中胚层细胞的产生进而影响hESCs造血分化。该结果不仅有助于理解人造血发育调控机制, 也为建立体外hESCs高效造血分化体系及规模化产生功能性血细胞奠定了理论基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Yoshida Y, Yamanaka S. Ips cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(2): 327-32.
- 2 Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10716-21.
- 3 Kaufman DS. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2009; 114(17): 3513-23.
- 4 Ditadi A, Sturgeon CM, Keller G. A view of human haematopoietic development from the petri dish. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18(1): 56-67.
- 5 Slukvin II. Generating human hematopoietic stem cells *in vitro* -exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition. *FEBS Lett* 2016; 590(22): 4126-43.
- 6 Slukvin II. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: Current advances and challenges toward *de novo* generation of hematopoietic stem cells. *Blood* 2013; 122(25): 4035-46.
- 7 Wu Q, Zhang L, Su P, Lei X, Liu X, Wang H, *et al.* Msx2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesendoderm by simultaneously suppressing sox2 and activating nodal signaling. *Cell Res* 2015; 25(12): 1314-32.
- 8 Wang C, Tang X, Sun X, Miao Z, Lv Y, Yang Y, *et al.* Tgfbeta inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res* 2012; 22(1): 194-207.
- 9 Lee JB, Werbowetski-Ogilvie TE, Lee JH, McIntyre BA, Schnerch A, Hong SH, *et al.* Notch-hes1 signaling axis controls hemato-endothelial fate decisions of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Blood* 2013; 122(7): 1162-73.
- 10 Yu C, Liu Y, Miao Z, Yin M, Lu W, Lv Y, *et al.* Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood* 2010; 116(23): 4786-94.
- 11 Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the erk signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 2006; 38(3): 200-11.
- 12 Wang L, Liu T, Xu L, Gao Y, Wei Y, Duan C, *et al.* Fev regulates hematopoietic stem cell development via erk signaling. *Blood* 2013; 122(3): 367-75.
- 13 Lan Y, He W, Li Z, Wang Y, Wang J, Gao J, *et al.* Endothelial smad4 restrains the transition to hematopoietic progenitors via suppression of erk activation. *Blood* 2014; 123(14): 2161-71.
- 14 Zhang C, Lv J, He Q, Wang S, Gao Y, Meng A, *et al.* Inhibition of endothelial erk signalling by smad1/5 is essential for haematopoietic stem cell emergence. *Nat Commun* 2014; 5: 3431.
- 15 Pang S, Wu Q, Tian S, Su P, Bai Y, Gao J, *et al.* Establishment of a highly efficient hematopoietic differentiation model from human embryonic stem cells for functional screening. *Sci China Life Sci* 2013; 56(12): 1147-9.