

综述

小鼠上胚层多能干细胞研究进展

陈杨林 刘悦石 李喜和* 包斯琴*

(内蒙古大学, 蒙古高原动物遗传资源研究中心, 呼和浩特 010021)

摘要 小鼠上胚层干细胞(mouse epiblast stem cell, mEpiSC)是一种来自于5.5天~7.5天小鼠胚胎上胚层(epiblast)组织的多能性干细胞。EpiSC自我更新能力和多能性的维持主要依赖激活素(Activin/Nodal)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号, Activin和FGF信号对细胞多能网络进行调控, EpiSC培养体系和分离方法目前仍处于不断优化的过程。相比于处于“幼稚(naïve)”状态的小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC), mEpiSC被认为处于“待发(primed)”状态。虽然mEpiSC被注射入囊胚后, 细胞嵌合效率较低, 但是当其被移植入着床后胚胎时, 却比mESC更容易与受体胚胎发生嵌合。因此, 来源于小鼠着床后胚胎的EpiSC与来自于着床前胚胎的ESC相比, 在多能性维持、发育潜能和诱导方法等方面存在本质区别。该文对小鼠EpiSC和ESC进行比较, 并综述目前小鼠EpiSC的研究进展。

关键词 EpiSC; mESC; 多能性; 发育潜能

Advances in Mouse Epiblast Stem Cell

Chen Yanglin, Liu Yueshi, Li Xihe*, Bao Siqin*

(Research Center for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau College of Science,
Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Mouse epiblast stem cell (mEpiSC) is derived from the epiblast tissue of mouse 5.5 days-7.5 days embryos. Self-renewal and pluripotency of EpiSC is maintained by Activin/Nodal and FGF (fibroblast growth factor). Activin and FGF regulate pluripotency network. Culture system of EpiSC and separation methods still being explored. Compared with “naïve” state of mouse embryonic stem cell (mESC), mEpiSC is thought to be in a state of “primed”. When mEpiSC is injected into blastocysts, the efficiency of chimeras is low. But it was easier to fuse with the implantation embryo when compared with mESC. Therefore, the EpiSC derived from the post-implantation embryo had essential difference compared with the mESC derived from the pre-implantation embryo, such as maintenance of pluripotent, developmental potential and induction method. In this review, EpiSC and ESC of mouse were compared, and a brief summary of recent advances in the knowledge of EpiSC had been given.

Keywords EpiSC; mESC; pluripotency; development potential

收稿日期: 2016-12-14 接受日期: 2017-03-21

内蒙古大学提升综合实力项目(批准号: 11200-12110201)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992944, E-mail: lixihe@hotmail.com; baosq@life.imu.edu.cn

Received: December 14, 2016 Accepted: March 21, 2017

This work was supported by Postgraduate Scientific Research Innovation Foundation of Inner Mongolia University (Grant No.11200-12110201)

*Corresponding authors. Tel: +86-471-4992944, E-mail: lixihe@hotmail.com; baosq@life.imu.edu.cn

网络出版时间: 2017-06-05 12:15:00 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170605.1215.008.html>

1 引言

小鼠上胚层干细胞(mouse epiblast stem cell, mEpiSC)是一种来自5.5天~7.5天小鼠胚胎上胚层(epiblast)组织的多能性干细胞^[1-4]。mEpiSC克隆形态与小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)完全不同,与mESC三维椭圆克隆相比,mEpiSC细胞呈薄层紧密排列,细胞间界限明显,表现出高核质比^[2],这些均与人类胚胎干细胞(hESC)类似。与mESC的“幼稚(naïve)”状态相比, mEpiSC被认为处于一种“待发(primed)”状态^[5]。在培养过程中, EpiSC保持稳定的自我更新能力和多方面发育潜能,不仅表达八聚体结合转录因子4(organic cation/carnitine transporter 4, Oct4)、Nanog、Sox2(SRY-related HMG-box gene 2)、SSEA-1(stage-specific embryonic antigens-1)等多能性细胞因子,同时它也表达参与原肠发育和体细胞特化的基因*brachyury*(或称为T)、*Sox17*(SRY-related HMG-box gene 17)、GATA结合蛋白6(GATA binding protein 6, *Gata6*)等。但是, EpiSC不表达或者很少表达血小板内皮细胞黏附分子1(platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, *Pecam1*)、*Tbx3*(T-box 3)、*Gbx2*(gastrulation brain homeobox 2)等干细胞特异基因和生殖系相关基因*Stella*[又叫*DPPA3*(developmental pluripotency associated 3)]、*Piwil2*(piwi-like RNA-mediated gene silencing 2)、视黄酸刺激基因8(stimulated by retinoic acid gene 8, *Stra8*)、*Dazl*(deleted-in-azoospermia-like)^[4],因此,研究者们将它视为研究早期原肠发育和“待发”多能细胞的优良模型。

与胚胎干细胞ESC对于小鼠品系的苛刻要求不同, B6×CBA、129SvEv、C57BL/6等品系小鼠包括Wistar和Sprague Dawley大鼠,都成功地分离得到了EpiSC。Brons等^[2]在对非肥胖型小鼠(NOD)进行上胚层分离建系时成功率高达93%。mEpiSC在表观遗传修饰方面与mESC很不相同,在雌性小鼠中,mESC细胞的两条X染色体均呈现活化状态,而在mEpiSC细胞中只有一条X染色体随机失活^[6]。

虽然EpiSC与诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)的发现仅仅相差一年,但是与iPSC相比,针对小鼠EpiSC的功能性研究较为缺乏,目前研究主要集中于以EpiSC为模型的细胞重编程及定向诱导。对EpiSC细胞重编程研究发现, EpiSC可以通过表观遗传重编程转变为类ESC^[1],当使用

MM-401抑制组蛋白3第4位赖氨酸(H3K4)甲基转移酶MLL1(mixed lineage leukemia 1)也可以使EpiSC发生重编程,使EpiSC进入“幼稚”状态^[7]。加入细胞因子1-a(cytokine 1-a, CK1-a)的抑制剂Epiblastin A,抑制转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)并激活WNT信号通路后,原本认为很难发生转变的一部分EpiSC(EpiSC中处于晚期状态的一类细胞)也可以成功被诱导为ESC^[8]。当白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)被添加到EpiSC细胞培养液中时,细胞表现出内胚层细胞特性,但是降低LIF浓度后, EpiSC细胞反而会进入“幼稚”状态^[9]。对EpiSC定向诱导分化研究发现,由于EpiSC细胞特性与胚胎发育过程中原条前段细胞类似,因此,当激活FGF(fibroblast growth factor)/MAPK(mitogen-activated protein kinase)、WNT、Activin/Nodal等信号通路后, EpiSC极易向原条细胞发生分化^[10]。相反,当抑制FGF信号并短暂抑制Nodal信号后, EpiSC会向外胚层祖细胞发生分化,这些外胚层祖细胞在抑制骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号后发育为神经细胞,增强BMP信号后则发育为表皮外胚层细胞^[11]。如果向EpiSC培养体系中加入BMP(激活Smad1)^[9]、Activin和Nodal^[12]可以使EpiSC向原始内胚层和滋养层分化^[2],继续提高BMP浓度, EpiSC向生殖细胞分化^[13]。Hayashi研究组^[14]将与mEpiSC类似的小鼠EpiLSC用BMP4、SCF(stem cell factor)、LIF、EGF(epidermal growth factor)刺激后,再与体细胞共培养,在体外产生了具有功能性的卵子,这让研究者们看到了EpiSC光明的应用前景。

2 多能性及自我更新能力维持机制

小鼠上胚层干细胞多能性维持和自我更新的分子机制与小鼠胚胎干细胞有很大区别。mESC在分子特性和多能性等方面更接近于着床前胚胎的上胚层细胞(之前认为接近于ICM细胞),而针对mEpiSC的转录组研究发现, mEpiSC的基因表达情况与着床后胚胎原条前段的外胚层细胞极为类似^[10]。mESC多能网络由*Oct4*、*Nanog*、*Sox2*等基因调控,主要依赖BMP/Smad信号通路和LIF/Stat3(signal transducing activator of transcription 3)信号通路^[15-16]。小鼠成纤维细胞层、血清或者化学成分明确的培养液添加GSK3- β 抑制剂、Mek/Erk抑制剂(2i^[16])以及LIF或

BMP4均能实现维持mESC的多能性和自我更新能力。目前研究认为, LIF在2i/LIF中起关键作用, LIF的存在会激活细胞中Jak(Janus kinase)-Stat3、PI3K(phosphatidylinositol-3-OH kinase)-Akt(protein kinase B)、MAPK三条细胞信号通路^[17]。Stat3可以调控多能基因*Socs3*(suppressor of cytokine signaling)和*Klf4*(Kruppel-like factor 4)的表达, 通过Jak-Stat3-Klf4-Sox2-Oct4级联方式激活多能转录因子Oct4。LIF同时激活的另一条信号通路是PI3K-Akt-Tbx3-Nanog-Oct4, 但是通路中的Tbx3也会被LIF调节的Grb2-MAPK所抑制(MAPK抑制Tbx3出核过程, 核内Tbx积累引发LIF自我调控), 通过Tbx3实现对Nanog和Oct4的负调控^[17]。正是由于在mESC中对多能转录因子Nanog和Oct4正负调控的同时存在, 使mESC细胞内多能基因Nanog和Oct4表达处于平衡状态, 二者协同Sox2调节核受体亚家族0B组1成员(nuclear receptor subfamily 0 group B member 1, *Nr0b1*)、雌激素相关受体(estrogen related receptor, *Essrb*)、锌指蛋白(zinc finger protein, *Zfp*)、*Rif1*(replication timing regulatory factor 1)等下游多能基因的表达^[18-20], 维持mESC细胞多能状态和促进mESC细胞增殖。同时, Oct4通过分别抑制分化基因*Gata6*、*FoxD3*、*Cdx2*表达, 使mESC细胞避免向原始内胚层、外胚层、中胚层方向分化^[21-22]。

与mESC多能性的维持和细胞自我更新的分子机制完全不同, 来源于小鼠上胚层的mEpiSC状态的维持主要依赖另外两条通路: Activin/Nodal和FGF^[4]。同时, 在mEpiSC中并没有被检测到有Nr0b1和Essrb蛋白存在, 而在mESC中这两种蛋白质却高水平存在, 并处于mESC多能调控网络的核心地位, 如果mESC中基因*Nr0b1*、*Essrb*表达出现异常, mESC细胞会发生严重分化^[2]。这表明, 在mEpiSC中Activin/Nodal和FGF信号通路调控的下游多能基因也与mESC完全不同, 在mEpiSC中通过另外一种方式对细胞多能网络进行调控。mEpiSC培养体系主要添加Activin A和bFGF, 而mESC赖以生存的LIF(或BMP4), 如果被添加到mEpiSC培养体系中, mEpiSC细胞会马上发生严重分化。

EpiSC多能性及自我更新的分子机制目前研究较为集中的是Activin/Nodal信号, 而FGF对EpiSC细胞的作用目前仍没有定论。在EpiSC细胞中Activin以Nodal-ALK(activin receptor-like kinases)-TGF β R-

Smad-Nanog方式直接激活Nanog, 通过多能基因Nanog的表达促进细胞自我更新^[4,23]。培养体系中添加的Activin属于TGF β 家族, 配体Activin与细胞膜上I型ALK4、ALK5、ALK7受体结合, 激活其II型受体, 形成TGF β RI-受体-TGF β RII三聚体, 之后活化Smad2。Smad2调控包括Nodal自身在内的基因和多能基因Nanog表达, 通过Nanog及其下游调控的靶基因实现细胞自我更新^[24]。同时, Nanog还会阻止FGF诱导的神经外胚层分化过程, 并且限制Smad2/3级联反应, 抑制EpiSC形成内胚层细胞系^[24], 进而抑制EpiSC发生分化。虽然hESC和EpiSC细胞培养时都需要添加FGF, 但是FGF对hESC和EpiSC的作用机理却有区别。在hESC中, 由于FGF的存在, 导致在培养的细胞中有一部分由FGF介导的分化细胞与hESC细胞共存。此外, FGF可以刺激hESC产生胰岛素生长因子II(insulin growth factor II, IGFII), IGFII对hESC的维持与增殖具有重要作用^[25], 然而在对小鼠EpiSC的研究中却没有发现FGF的类似作用。Greber等^[23]研究发现, 在EpiSC培养体系中bFGF没有对Nanog和Smad直接作用, 但是它可以抑制神经外胚层分化(不完全阻止), 有利于EpiSC处于更稳定的状态。研究还发现, 在以MEF细胞作为饲养层细胞的EpiSC中, bFGF也可以刺激MEF细胞产生Activin A, 通过Activin-Smad2-Nanog途径调控多能基因^[26]。目前对于小鼠EpiSC中Activin A和bFGF作用的确切机理仍不十分清楚, 关于bFGF在其中扮演的角色研究者们仍存在争论, 但是随着研究的不断深入, EpiSC的“待发”多能状态维持与自我更新的确切分子机制终将被阐明。

EpiSC和ESC虽然都表达多能基因Oct4、Nanog、Sox2, 但是二者除了在多能性调控机理方面完全不同之外, 对关键转录因子Oct4进行调控时, 二者也存在区别。Oct4作为多能性调控网络的核心成员之一, 它的存在与否直接决定着多能细胞能否自我更新和维持多能性^[20]。Oct4是POU(Pit-Oct-Unc)超家族中的同源域转录因子, 由基因*Pou5f1*编码。POU家族中的转录因子能够通过绑定到ATGCAAT保守序列组成的8聚体激活靶基因表达。Oct4由三个结构域组成: 富含脯氨酸残基的N-端结构域、POU结构域和富含脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基的C-端结构域。N-端和C-端对于反式激活都至关重要, 其中C-端激活时需要经过磷酸化过程, 这一点在不同细胞

(如ESC和EpiSC)中表现出了细胞种类的特异性,而N-端则没有。POU结构域中包含两个亚结构域:一个75个氨基酸组成的N-端特异性POU区域(POUs)和一个60个氨基酸组成的C-端同源域(POU_{HD})。两个亚结构域之间由17个氨基酸组成的接头相连,每个结构域可以通过螺旋-折叠-螺旋结构结合DNA,而POU外侧的区域对于结合的DNA没有严格约束,具有很小的序列保守性;POU结构域的结合位点被认为是决定细胞特异性调节的关键^[27]。*Oct4*基因转录起始位点上游的转录调节区有三个调节元件:远端增强子(distal enhancer, DE)、近端增强子(proximal enhancer, PE)和TATA缺失近端启动子(proximal promoter, PP)。根据胚胎早期的发育阶段的不同,两个增强子表现出完全不同的激活模式。在ICM(inner cell mass)、mESC和PGC(primordial germ cell)中,*Oct4*的激活由DE增强子所驱动,而在上胚层细胞和EpiSC中,*Oct4*的激活则由PE增强子所驱动。大量单核受体家族成员都可以结合于PE和PP的Sp1和激素结合位点,进而调节*Oct4*基因表达,它的刺激调节因子包括Nr5a2、SF1(steroidogenic factor 1)、RXR-β(retinoid X receptor-β, 也称Nr2b2)等,抑制调节因子包括GCNF(germ cell nuclear factor, 也称Nr6a1)和COUF-TFI/II(chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors-I/II)^[28-29]等。

近期在人和小鼠多能细胞的研究中发现,“待发”多能细胞多能性维持还依赖一种锌指蛋白281(zinc-finger protein 281, Zfp281)。这种转录因子在转录水平直接作用TET(ten-eleven translocation)家族的甲基胞嘧啶羟化酶TET1(ten-eleven translocation 1),促进*Tet1*基因表达,使细胞处于“待发”状态。同时,Zfp281通过调节miR-302/367,在转录后抑制*Tet2*基因表达,使细胞避免因TET2水平升高而进入“幼稚”状态^[18]。

3 上胚层多能干细胞发育及分化潜能

受精卵和二细胞胚胎在发育上被认为具有发育全能性,因为这两种细胞在随后的发育过程中不仅可以分化为胚胎的三个胚层和生殖细胞,而且也可以分化为胚外细胞系(如滋养层细胞)参与胚外结构的形成^[30]。近年来研究发现,mESC中一类表达端粒酶维持基因(*Zscan4*)的细胞亚群,它们在发育上同样具有全能型,也表达二细胞胚胎相关基因^[31],正是这类在mESC中只占5%的细胞,使mESC在被注

射入四倍体胚胎后,会产生完全来自供体细胞的胎儿。相比于可以实现稳定生殖系传递和通过四倍体补偿得到后代的“幼稚”mESC^[32]，“待发”mEpiSC在发育上处于多能状态,mEpiSC在体外分化实验中可以形成拟胚体,当被注射到裸鼠后,也可以形成畸胎瘤,其中可以检测到三个胚层来源的细胞,这些都证明了EpiSC的分化潜能。虽然,Brons等^[2]最初在进行囊胚注射和卵裂球混合培养实验时只得到了两只嵌合体小鼠(0.5%, 2/385, Tesar等^[4]没有得到嵌合体小鼠, 0/35),但是在mEpiSC培养体系中加入BMP4对mEpiSC进行诱导后,检测到了生殖系相关基因*Stella*和*Blimp1*的表达,这从另一角度证明了其分化潜力。而对于mEpiSC低效的嵌合体形成率,研究者在研究初期归因于技术障碍。有人认为,mEpiSC本身来源于着床后的胚胎,因此,本应该将其置于着床后的胚胎环境来检验其全能性;进而有学者提出了脱膜移植和超声引导移植的手段,但是都没有成功的报道^[33]。

令人欣慰的是,Huang等^[34]将mEpiSC和mESC细胞团块移植入着床后小鼠胚胎的不同部位发现,相比于mESC,mEpiSC表现出了更加高效的嵌合效率,移入的细胞成功分化为三种胚层细胞和生殖系细胞。这说明,mEpiSC更适应于着床后的胚胎发育环境,在其中更容易发挥发育潜能,进而高效地形成嵌合体,表现出了与早期着床胚胎的高度相容性^[34]。虽然采用上述方法得到了EpiSC来源的嵌合体动物,但是当采用传统标准培养液培养的EpiSC被注射入囊胚后,仍然没有形成有效的嵌合体,致使其始终被学者们公认为“primed pluripotency”^[5]。此外,由于目前培养体系中EpiSC种类的不均一性,使其细胞亚群的分化潜能也存在明显区别。针对EpiSC进一步研究发现,根据EpiSC是否表达T(brachyury),将其分为T(+)和T(-)亚群,这两类亚群在相同培养条件下可以相互发生转换。当加入BMP时,这两类细胞表现出不同的分化命运,T(-) EpiSC分化为外胚层,而T(+) EpiSC分化为中胚层。此外,在体外条件下短时间抑制Nodal,可以使EpiSC分化为外胚层祖细胞,这些细胞可以进一步分化为神经外胚层和表皮外胚层^[11]。

4 EpiSC培养体系优化进展

由于采用机械方式将胚胎上胚层部分和内脏

内胚层(visceral endoderm, VE)分割, 然后利用上胚层部分建立的细胞系, 细胞种类混杂, 状态不单一, 因此, 还需研究人员后续不断优化EpiSC的分离和维持体系。近期发现, 利用WNT抑制物IWP-2阻断WNT分泌, 可以在分离E5.5天小鼠胚胎EpiSC过程中, 无需机械去除胚胎VE部分就可以建立状态稳定的mEpiSC细胞系, 并且这些细胞具有均一的分子特征和克隆形态^[35]。此外, WNT信号抑制剂XAV939和Rho激酶抑制剂Y27632的使用, 实现了从单个epiblast细胞建立mEpiSC细胞系, 当这些细胞被注射入囊胚之后, 得到的嵌合体后代可以进行生殖系传递^[36]。2014年, Joo等^[37]用FGF4配合饲养层细胞同时替代FGF2和Activin A, 也成功建立了细胞混杂程度更少的小鼠EpiSC细胞系, 将该细胞注射入囊胚后, 嵌合体形成比例提高到了21.4%。Tsukiyama等^[38]对传统FGF2+Activin A培养体系进行了修改, 他们加入了GSK3抑制剂CHIR99021, 在这种培养条件下, mESC和miPS被诱导为一种处于mEpiSC和mESC中间状态的INTPSC(sintermediate pluripotent stem cells)新型细胞系(图1)。这种细胞系表达Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc等多能细胞因子, 在体外可以成功分化出三个胚层来源的组织, 注射入囊胚后, 也可以成功地得到嵌合体小鼠, 包括生殖系嵌合。

中国科学院周琪研究组成功将小鼠单倍体胚胎干细胞(haploid embryonic stem cells, haESCs)诱导为单倍体上胚层干细胞(haploid epiblast stem cells, haEpiSC)。haEpiSC具有完整的单倍体基因组, 表现出与二倍体上胚层干细胞类似的特征, 且也具有多

种体内外分化潜能。将孤雄单倍体上胚层干细胞(androgenetic haEpiSC, ahaEpiSC)注射入卵母细胞细胞质中, 胚胎可以发育到妊娠中期^[39]。上述这些结果不仅使EpiSC种类更加丰富, 培养体系更加完善, 而且更充分显示了EpiSC的巨大发育潜力。

5 讨论与展望

多能干细胞特征维持及自我更新的实现本质上都依赖于错综复杂的细胞信号网络。不同的多能状态对应不同的发育潜能, 无论细胞处于“幼稚”或“待发”还是最新提出的“formative pluripotency”状态, 都离不开精细的基因表达和转录调控^[40]。而在其中起关键作用的是Oct3/4、Naog、Sox2、Smad等一类因子, 它们处于信号网络的核心, 直接或者间接调控下游基因表达, 它们的水平对细胞命运产生决定性影响。在细胞中各信号之间处于平衡但又相互影响, 使细胞处于一种相对稳定的状态^[41]。小鼠EpiSC TGF β /Activin信号调节的因子Smad2/3/4和mESC中BMP信号调节的Smad1/5/8经Smad4参与将信号传递入细胞核^[42-43], 调控彼此下游相关基因表达。EpiSC中Activin/Nodal信号经ALT4/5/7活化Smad, Smad进入细胞核结合于Nanog基因ATG上游379 bp区域(这一区域同时分布了Oct4、Sox2和Nanog结合位点), 实现对多能基因Nanog表达的调控^[24], 使细胞处于多能状态并且避免向神经外胚层分化。经转录组分析发现, 小鼠EpiSC与胚胎发育早期的原肠胚后期的外胚层细胞具有相似性^[44], 都表达原条前端基因, 而大部分原条前端基因受Nodal

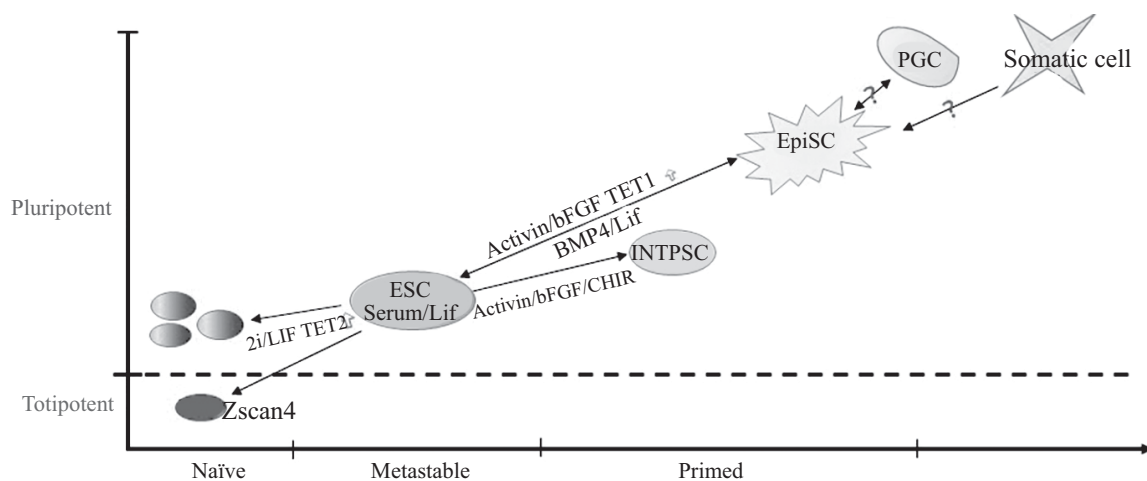


图1 小鼠ESC和EpiSC多能状态模式图

Fig.1 Pattern diagram of pluripotency of mouse ESC and EpiSC

信号调控。在胚胎发育中, Nodal信号在内胚层形成过程中有重要作用。在体外, 提高传统EpiSC培养体系中Nodal或Activin的浓度, TGF β 信号通路中配体水平升高, 增加的TGF β 信号可使EpiSC向内胚层细胞分化^[45]。Kaufman等^[12]进一步研究发现, 同属于TGF β 家族的Activin和Nodal在调控小鼠EpiSC细胞状态时也表现出了区别。在使用Activin和Nodal对EpiSC进行诱导时, 如果EpiSC中的*Mixl1*表达水平迅速上调, 细胞都会向前肠内胚层、胰腺祖细胞和肝祖细胞等分化; 而当*Mixl1*表达上调有所延迟或比较迟缓时, 细胞对于Nodal的应答效率就会发生下降。使用Nodal进行诱导时, 细胞表现出间充质细胞的表型, 而使用Activin A进行诱导时, 细胞的表型和基因表达情况都类似于上皮细胞, 这使得人们认为二者调节的基因并不与之前认为的完全相同, Activin A在体外可能不能有效地替代Nodal在胚胎发育中所扮演的角色。相比之下, 针对mESCs分子机制的研究则较为透彻, 通过LIF/Stat3信号调节核心因子Oct3/4和Naog, 同属于TGF β 家族的BMP信号经ALK2/3/6活化Smad1/5, 调节抑制分化基因(inhibitors of differentiation, *Id*)表达, 维持mESC的稳定状态^[15,42,44]。TGF β 家族的信号分子还参与调控多种细胞, 如hES、iPS和成体干细胞等^[46-48], 但是由于Smads与DNA的结合能力较弱^[49], 使得TGF β 家族成员在调控基因表达时表现出对环境的依赖性。Smad级联的作用方式, 使其更容易与其他信号通路如WNT、FGF、Notch等发生相互作用, 更多地参与了胚胎发育和细胞命运决定。鉴于此, 探寻TGF β 家族成员在多能细胞中的精确细胞信号网络以及这些网络与细胞多能性和细胞分化之间的关系等类似问题, 对于哺乳动物干细胞的研究极具价值。

着床胚胎的上胚层细胞是在啮齿类胚胎发育时空顺序中最接近体细胞和原始生殖细胞的一类细胞。从上胚层分离得到的EpiSC被认为是体外建立的唯一能够帮助人类研究和理解原肠胚的多能干细胞模型。不断探索和完善的培养体系, 使EpiSC细胞状态更加稳定, 这为探寻哺乳动物原肠发生过程中的分子机制奠定了坚实的基础, 也为其他类型干细胞的分离提供了极具意义的参考。除此之外, 由于其拥有类似于hESC的细胞特性, 并且取材和分离方法相对容易, 因此针对啮齿类EpiSC的研究体现出了巨大的价值和优势。对啮齿类EpiSC

多能性机制、发育分化潜力、表观遗传特性等方面的深入研究每前进一步, 都将会为人类胚胎干细胞的研究提供宝贵的经验和借鉴。同时, 对于EpiSC细胞状态维持的分子机制和精确的定向诱导方法的研究, 也将为分离人类全能干细胞、人类干细胞定向诱导以及干细胞治疗等方面提供有力的帮助。但是, 针对EpiSC也还有很多有趣的问题需要我们去探讨。成体细胞、原始生殖细胞或者其他分化的细胞能否重编程为EpiSC? 如何针对EpiSC进行定向诱导(图1), 诱导方式是否与mESC完全相同? 这些都将是需要深入研究和解决的问题, 而随着这些问题的不断解决, EpiSC也将让我们看到它巨大的价值。

参考文献 (References)

- 1 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.
- 2 Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuvp de Sousa Lopes SM, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448(7150): 191-5.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 487-92.
- 6 Hayashi K, de Sousa Lopes SMC, 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.
- 7 Zhang H, Gayen S, Xiong J, Zhou B, Shanmugam Avinash K, Sun Y, *et al.* MLL1 inhibition reprograms epiblast stem cells to naive pluripotency. *Cell Stem Cell* 2016; 18(4): 481-94.
- 8 Illich DJ, Zhang M, Ursu A, Osorno R, Kim KP, Yoon J, *et al.* Distinct signaling requirements for the establishment of ESC pluripotency in late-stage EpiSCs. *Cell Rep* 2016; doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.073.
- 9 Onishi K, Tonge PD, Nagy A, Zandstra PW. Local BMP-SMAD1 signaling increases LIF receptor-dependent STAT3 responsiveness and primed-to-naive mouse pluripotent stem cell conversion frequency. *Stem Cell Rep* 2014; 3(1): 156-68.
- 10 Kojima Y, Kaufman-Francis K, Studdert JB, Steiner KA, Power MD, Loebel DA, *et al.* The transcriptional and functional properties of mouse epiblast stem cells resemble the anterior primitive streak. *Cell Stem Cell* 2014; 14(1): 107-20.
- 11 Li L, Song L, Liu C, Chen J, Peng G, Wang R, *et al.* Ectodermal progenitors derived from epiblast stem cells by inhibition of

- Nodal signaling. *J Mol Cell Biol* 2015; 7(5): 455-65.
- 12 Kaufman-Francis K, Goh HN, Kojima Y, Studdert JB, Jones V, Power MD, *et al.* Differential response of epiblast stem cells to Nodal and Activin signalling: A paradigm of early endoderm development in the embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1657): 20130550.
- 13 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.
- 14 Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, *et al.* Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 2016; 539(7628): 299-303.
- 15 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.
- 16 Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- 17 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.
- 18 Fidalgo M, Huang X, Guallar D, Sanchez-Priego C, Valdes VJ, Saunders A, *et al.* Zfp281 coordinates opposing functions of Tet1 and Tet2 in pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2016; 19(3): 355-69.
- 19 Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen* 2014; 3(1): 7.
- 20 Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38(4): 431-40.
- 21 Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Bio* 2008; 313(2): 614-29.
- 22 Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123(5): 917-29.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor β signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cell* 2007; 25(2): 455-64.
- 27 Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Rudnicki MA. Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One* 2007; 2(6): e553.
- 28 Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 1997; 89(4): 619-28.
- 29 Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, *et al.* Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 1996; 122(3): 881-94.
- 30 Lykke-Andersen K, Gilchrist MJ, Grabarek JB, Das P, Miska E, Zernicka-Goetz M. Maternal argonaute 2 is essential for early mouse development at the maternal-zygotic transition. *Mol Bio Cell* 2008; 19(10): 4383-92.
- 31 Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, Bonanomi D, *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 2012; 487(7405): 57-63.
- 32 Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8424-8.
- 33 Chenoweth JG, McKay RD, Tesar PJ. Epiblast stem cells contribute new insight into pluripotency and gastrulation. *Dev Growth Differ* 2010; 52 (3): 293-301.
- 34 Huang Y, Osorno R, Tsakiridis A, Wilson V. *In vivo* differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep* 2012; 2(6): 1571-8.
- 35 Sugimoto M, Kondo M, Koga Y, Shiura H, Ikeda R, Hirose M, *et al.* A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by wnt inhibition. *Stem Cell Rep* 2015; 4(4): 744-57.
- 36 Sumi T, Oki S, Kitajima K, Meno C. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/beta-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *PLoS One* 2013; 8(5): e63378.
- 37 Joo JY, Choi HW, Kim MJ, Zaehres H, Tapia N, Stehling M, *et al.* Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions. *Sci Rep* 2014; 4: 7477.
- 38 Tsukiyama T, Ohinata Y. A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. *PLoS One* 2014; 9(4): e95329.
- 39 Shuai L, Wang Y, Dong M, Wang X, Sang L, Wang M, *et al.* Durable pluripotency and haploidy in epiblast stem cells derived from haploid embryonic stem cells *in vitro*. *J Mol Cell Biol* 2015; 7(4): 326-37.
- 40 Smith A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development* 2017; 144(3): 365-73.
- 41 Weidgang CE, Seufferlein T, Kleger A, Mueller M. Pluripotency factors on their lineage move. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 6838253.
- 42 Sakaki-Yumoto M, Liu J, Ramalho-Santos M, Yoshida N, Derynck R. Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *J Biol Chem* 2013; 288(25): 18546-60.
- 43 Papanayotou C, Benhaddou A, Camus A, Perea-Gomez A,

- Jouneau A, Mezger V, *et al.* A novel nodal enhancer dependent on pluripotency factors and smad2/3 signaling conditions a regulatory switch during epiblast maturation. *PLoS Biol* 2014; 12(6): e1001890.
- 44 Sun LT, Yamaguchi S, Hirano K, Ichisaka T, Kuroda T, Tada T. Nanog co-regulated by Nodal/Smad2 and Oct4 is required for pluripotency in developing mouse epiblast. *Dev Biol* 2014; 392(2): 182-92.
- 45 Gaarenstroom T, Hill CS. TGF-beta signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 32: 107-18.
- 46 Itoh F, Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 32: 98-106.
- 47 Wu J, Yamauchi T, Izpisua Belmonte JC. An overview of mammalian pluripotency. *Development* 2016; 143(10): 1644-8.
- 48 Ashida Y, Nakajima-Koyama M, Hirota A, Yamamoto T, Nishida E. Activin A in combination with ERK1/2 MAPK pathway inhibition sustains propagation of mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 2017; 22(2): 189-202.
- 49 Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J. Structural determinants of SMAD function in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 2015; 40(6): 296-308.