

NANOG在哺乳动物早期胚胎发育与干细胞中的功能研究进展

柴壮 刘忠华*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 哺乳动物的早期胚胎发育和干细胞多能性由转录因子构成的基因网络所调控。2003年, 在胚胎干细胞中发现的重要转录因子NANOG位于基因网络调控中心, 对胚胎第二次命运决定和基态多能性的建立至关重要。该文将在NANOG生物学特征的基础上, 重点讨论其在早期胚胎发育、胚胎干细胞与诱导性多能干细胞中的功能。

关键词 NANOG; 早期胚胎发育; 多能性; 胚胎干细胞; 诱导性多能干细胞

Advances in the Functions of NANOG in Mammalian Early Embryonic Development and Stem Cells

CHAI Zhuang, LIU Zhonghua*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Early embryonic development and stem cell pluripotency in mammals are regulated by gene-regulatory networks of transcription factors. The master transcription factor NANOG, that is found in embryonic stem cells in 2003 is the central transcription factor in gene-regulatory networks and is crucial for the second lineage segregation and establishment of ground-state pluripotency. Based on the biological characteristics of NANOG, the paper summarizes the functions of NANOG in early embryonic development, embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.

Keywords NANOG; early embryonic development; pluripotency; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells

哺乳动物早期胚胎发育是发育生物学的热点研究之一, 一般指从合子到三胚层(外胚层、中胚层和内胚层)胚胎的发育过程。合子的形成标志着胚胎发生的开始, 合子经过早期卵裂阶段形成扩张囊胚, 囊胚在植入前发生两次细胞命运决定, 在第一次命运决定中, 内细胞团(inner cell mass, ICM)与滋养层(trophoblast, TE)分离。在第二次的命运决定中, ICM分化为两种不同的细胞系, 即原始内胚层(primi-

tive endoderm, PrE)与多能性的上胚层(epiblast, EPI)。EPI经过复杂的迁移和巨大的形态学转变分化形成三胚层: 外胚层、中胚层和内胚层。TE形成胎盘的滋养细胞, PrE形成腔壁内胚层(parietal endoderm, PrE)和脏壁内胚层(visceral endoderm, VE)^[1-2]。早期胚胎发育由转录因子构成的基因网络所调控, 如以CDX2为中心的基因网络调控TE的形成与分化^[3-6], GATA6参与PrE的形成^[7], 而NANOG对于EPI的形成

收稿日期: 2020-06-23

接受日期: 2020-10-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31872360)和科技部重点研发项目(批准号: 2016YFA0100200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55191729, E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn

Received: June 23, 2020

Accepted: October 19, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundations of China (Grant No.31872360), and the National Key Research and Development Program (Grant No.2016YFA0100200)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55191729, E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5422>

是必需的^[8]。

哺乳动物胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)来源于植入前胚胎的ICM, 无限增殖、自我更新的同时具有多能性, 可以在体外分化形成多种细胞系^[9-11]。植入前EPI具有naïve多能性, 将此阶段分离出的小鼠EPI细胞注射到另一个囊胚中, 可形成胚胎所有细胞系, 植入前EPI来源的小鼠ESCs代表naïve EPI在体外的无限增殖, 具有生殖系嵌合的能力, 且具有naïve EPI的表观遗传特征: 雌性细胞X染色体再激活^[12]。维持小鼠ESCs naïve状态的调控网络由12个核心转录因子组成: OCT4、SOX2、NANOG、SALL4、KLF2、KLF4、ESRRB、GBX2和TFCP2L1等, NANOG位于该多能性调控网络的中心, 其既与ESRRB、SOX2、OCT4相互调控, 又可控下游TFCP2L1的表达^[13]。

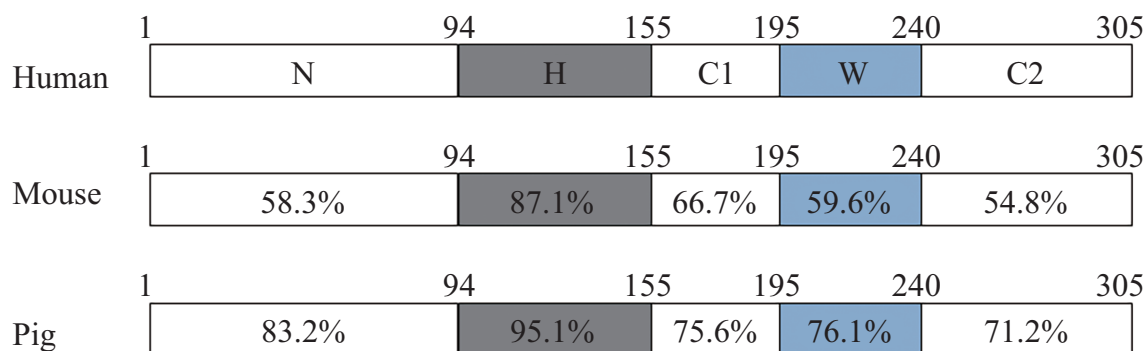
了解NANOG在哺乳动物早期胚胎发育和干细胞多能性中的功能, 对于其他哺乳动物胚胎干细胞系的建立与早期胚胎发育分子机制的解析具有重要意义, 本综述将从NANOG的生物学特征, NANOG在早期胚胎发育、胚胎干细胞与诱导性多能干细胞中的功能这几个方面简述NANOG在早期胚胎发育与干细胞多能性调控中的相关研究进展。

1 NANOG的分子生物学特征

NANOG的命名来源于凯而特(Celtic)传说中的地名“Tir Na Nog”, 为含有同源结构域的转录因子, 与NK-2同源盒家族相似^[8], 有关小鼠NANOG的相关报道较多, 小鼠的*Nanog*基因具有4个外显子, 位于6号染色体上, 长约7 Kb, 编码含305个氨基酸残基的

多肽, NANOG蛋白可被简单地分为3个结构域: N-端结构域、同源结构域、C-端结构域。N-端结构域富含丝氨酸和苏氨酸, 为反式激活结构域。C-端结构域可被分为CD1、WR和CD2, 其反式激活活性是N-端的6倍以上。WR独特且保守, 具有10个五肽重复序列, 并均起始于色氨酸, 功能分析表明, WR是一种强反式激活因子, 且色氨酸在维持WR区域活性方面起着重要作用; CD2是C-端结构域的另一个反式激活因子, WR与CD2在NANOG介导的反式激活中具有重要作用^[14-15]。与小鼠NANOG相比, 人NANOG只有C-端结构域具有反式激活活性, WR区中一个色氨酸被谷氨酸所代替(图1)^[16]。人基因组中NANOG有11个假基因, 分别为NANOGP1到NANOGP11, 其中NANOGP2到NANOGP11为加工假基因, NANOGP1为复制假基因^[17]。猪NANOG基因位于1号染色体上, 由单外显子构成。猪的基因组中NANOG也有假基因, 分别为NANOGP1和NANOGP2。猪NANOG蛋白也可被分为N-端结构域、C-端结构域、同源结构域, 人和猪NANOG同源结构域相似度高达95%, 而其他结构域相似度较低^[18]。

可变剪切是转录后修饰调控的一种, 大约一半的哺乳动物基因受可变剪切的调控, 小鼠*Nanog*可以通过其启动子选择性地转录而产生两种剪切突变体NANOGB和NANOGC。与NANOG相比, NANOGB的N-端结构域存在9个氨基酸的差异, NANOGC的N-端结构域缺失25个氨基酸。NANOGB和NANOGC可以与NANOG形成二聚体, 并且与其他的多能性相关因子如OCT4、SALL4相互作用。NANOG缺失时, NANOGB和NANOGC能



N: N-端结构域; H: 同源结构域; W: WR区; C1/C2: C-端结构域。

N: N-terminal domain; H: homeodomain; W: WR; C1/C2: C-terminal domains.

图1 人、小鼠、猪NANOG蛋白结构域相似性对比(根据参考文献[18]修改)

Fig.1 Comparison of NANOG protein domain similarity among human, mouse and pig (modified from reference [18])

够抑制PrE基因如 *Gata6*、*Gata4*、*Dab2*、*Pdgfra* 和 *Sox17* 的表达^[19]。

2 NANOG在早期胚胎发育中的功能

哺乳动物早期胚胎发育多以小鼠为模型, 荧光原位杂交结果显示, 小鼠 *Nanog* mRNA 激活始于4-细胞和8-细胞卵裂球的部分细胞中, 此后的桑椹胚、囊胚阶段均能检测到 *Nanog* mRNA^[20]。免疫荧光结果显示, NANOG蛋白在8-细胞卵裂球、桑椹胚、囊胚阶段均能被检测到^[21]。在囊胚阶段, NANOG的表达限于ICM中, 而TE中无表达。随后ICM分化成EPI与PrE两部分时, NANOG在EPI中表达^[8,22]。在EPI早期分化中, NANOG特异性表达但随后表达量迅速下降^[23]。

NANOG在小鼠的第二次命运决定中具有重要作用, 早期囊胚阶段NANOG和GATA6在ICM中共表达, 在后期两种因子逐渐呈互斥分布, 特别是NANOG和GATA6呈“盐-胡椒状”分布。EPI与PrE分离后, EPI特异性表达NANOG, PrE特异性表达GATA6和GATA4^[24-26]。

Nanog^{-/-}胚胎在发育过程中无法形成EPI。MITSUI等^[8]利用同源重组敲除 *Nanog*, 对E5.5的胚胎进行组织学检测发现, *Nanog*^{-/-}胚胎由胚外组织组成, EPI和胚外外胚层分辨不清, 且胚胎着床后无法形成胎儿。2009年, 又有研究表明, *Nanog*^{-/-}的E4.5胚胎OCT4表达降低、GATA4缺失, 部分OCT4阳性细胞出现在胚胎表面且表达TROMA1, 这说明 *Nanog*^{-/-}的ICM不能形成EPI, PrE不形成或退化, 部分多能性细胞向TE分化或凋亡, 且EED免疫荧光结果表明, *Nanog*^{-/-}的E4.5胚胎内细胞团X染色体再激活失败, 且接种后不能获得naïve的ESCs^[27]。综上所述, NANOG对于naïve EPI的形成是必需的。

NANOG在小鼠早期囊胚PrE的形成中同样起到重要作用。MESSERSCHMIDT等^[28]在实验中通过基因诱捕法构建NANOG缺失的小鼠胚胎, 发现E3.5和E4.5 *Nanog*^{-/-}胚胎的ICM细胞GATA4表达明显降低, 这表明NANOG的缺失不会造成PrE的提前分化, 后囊胚互补实验结果表明, EPI/NANOG可通过旁分泌信号和细胞间相互作用的非细胞自主性机制影响PrE的形成, 并且研究者们推测旁分泌信号位于FGF-ERK信号通路上。2011年, FRANKENBERG等^[22]的研究证实了上述观点, FGF-ERK信号通路中的FGF4表达在EPI前体细胞中, *Nanog*^{-/-}胚

胎中检测不到FGF4的表达, 添加外源FGF4后可诱导 *Nanog*^{-/-}胚胎表达SOX17和GATA4, 这表明EPI前体中NANOG诱导FGF4表达, FGF4通过旁分泌的方式结合PrE前体中的FGF受体, 从而诱导PrE的产生。2019年, TAKUYA等^[29]在研究Erk信号通路在小鼠胚胎发育中的作用时进一步证实, NANOG可诱导FGF4和Etv5以旁分泌的方式促进相邻细胞向PrE的分化, 而通过自分泌维持EPI的细胞特性。以上研究表明, NANOG/EPI诱导FGF4表达, 通过旁分泌信号的非细胞自主性参与PrE的形成。

大型哺乳动物胚胎中关于NANOG的研究较少, 在牛的早期胚胎中, NANOG蛋白可在卵裂阶段的8-细胞卵裂球、早期囊胚阶段的ICM和晚期囊胚阶段的EPI中被检测到^[30-31]。2019年, ORTEGA等^[30]利用CRISPR/Cas9技术敲除牛胚胎 *NANOG*发现, *NANOG*敲除的胚胎EPI标记基因 *SOX2* 和 *HA2AFZ* 表达量显著降低, TE标记基因 *CDX2* 和 *KRT8* 没有明显变化, 这表明NANOG对牛胚胎囊胚的形成是可有可无的, 但对于牛EPI的形成是必需的, 在山羊早期胚胎中, *NANOG*的表达模式与小鼠不同, 其mRNA水平在6-8细胞阶段达到最高, 随后在桑椹胚与囊胚阶段逐渐降低, *NANOG*敲低后滋养层细胞减少, 多能性转录因子OCT4与SOX2的表达上调, 这表明NANOG参与山羊胚胎TE细胞的增殖并负调控多能性转录因子^[32]。有关猪NANOG的功能研究较少, 但猪胚胎单细胞测序数据表明, NANOG的表达模式与小鼠存在差异, 桑椹胚阶段检测不到 *NANOG* mRNA 的表达, 猪胚胎中NANOG的功能可能与小鼠不同^[33]。

不同物种早期胚胎中的NANOG表达模式不同, 其功能也有所差异, 在小鼠和牛的早期胚胎中, NANOG对于EPI形成是必需的, 但在山羊的胚胎中NANOG参与滋养层细胞的增殖。这说明在不同物种中NANOG的下游基因调控网络可能不同^[8,30,32]。

3 NANOG在胚胎干细胞中的功能

NANOG在多能性的胚胎细胞、胚胎干细胞以及哺乳动物生殖细胞系中均有表达^[8,23,34]。*Nanog* 过表达的小鼠ESCs可以在白血病抑制因子(leukemia-inhibitory factor, LIF)撤去的情况下维持自我更新, 缺失会使细胞向胚外内胚层细胞系分化^[8]; HYSLOP等^[35]利用小干扰RNA敲低人ESCs中的 *NANOG* 后发现, GATA4、GATA6、CDX2、GATA2等表达上调,

细胞向胚外内胚层和TE细胞系分化。但也有研究表明, NANOG对于多能性的建立和维持严格来讲并不是必需的, CHAMBERS等^[36]发现, *Nanog*敲除的小鼠ESCs虽易分化, 但可以维持自我更新, 在小鼠ESCs中NANOG类似于一种“调节器”, 当*Nanog*被敲除后, 细胞增殖速度变慢, 自我更新效率降低。

NANOG在ESCs中调控多基因的表达, 维持干细胞的自我更新与多能性。小鼠ESCs的Chip数据表明, NANOG蛋白在小鼠ESCs基因组中共有3 006个结合位点, *Nanog*敲低后2 264个基因表达发生变化, 转录因子OCT4、SOX2、RIF1、REST等显著下调, *Nanog*过表达后OCT4、ESRRB、FOXD3、TCF2L1、NRB1与BMP4上调至正常小鼠ESCs的150%; 小鼠ESCs中ESRRB与RIF1下调后, 干细胞形态发生变化, 转变为扁平类成纤维样, 碱性磷酸酶阳性丧失; *Foxd3*编码转录抑制因子, 在内细胞团与外胚层多能性的维持和体外ES细胞系的建立中具有重要作用^[37]。在人ESCs中NANOG调控染色质重塑与修饰因子SMARCA4、MYST3、SET, 转录调控因子REST、HESX1和STAT3的表达, 在TGF β 途径中直接调控TDFG1与LEFTY2/EBAF的表达, 或通过SKIL间接调控SMAD2和SMAD4的表达^[38]。

小鼠ESCs中存在NANOG二聚体, 在CHAMBERS等^[39]和WANG等^[40]的实验中, 通过将WR区10个色氨酸替换成丙氨酸发现, 突变的NANOG不能与正常的NANOG蛋白二聚化。这说明NANOG蛋白之间通过其富含色氨酸(WR)的结构域形成二聚体, 碱性磷酸酶等实验表明, 在LIF缺失的条件下, NANOG蛋白之间形成的二聚体可维持的小鼠ESCs的多能性, 另外免疫共沉淀结果证实, SALL4、ZFP198、ZFP281、DAX1、NAC1和OCT4等多能性转录因子也优先与NANOG的二聚体相互作用, 这说明NANOG二聚体在ESCs的自我更新和多能性中具有重要作用。

SMITH小组利用“基态(ground state)”来形容从naïve状态的EPI分离获得的未分化小鼠ESC的多能性状态^[12]。传统小鼠ESCs的培养条件为血清/LIF体系, 2008年, 研究发现, 添加LIF、糖原合酶激酶3(glycogen synthase kinase 3, Gsk3)的抑制剂CHIR99021和有丝分裂激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的抑制剂PD0325901(two inhibitors, 2i), 小鼠ESCs可以在无血清和无饲养层的条件下维持自我更新, 具有基态多能性, 更类似于植入前EPI^[41-42]。血

清/LIF培养体系下NANOG在小鼠ESCs中呈现异质性, 并非所有ESCs高表达NANOG^[43-44], 2i/LIF培养体系下NANOG的表达提高, 且ESCs均高表达NANOG^[20,45]。有报道指出, NANOG异质性的表达与可变等位基因表达相关, 且与早期胚胎发育阶段的表达模式相对应, 4-细胞到早期囊胚阶段*Nanog*表达为单等位基因, 而在naïve EPI阶段*Nanog*表达转为双等位基因。2i/LIF体系下组蛋白3上的三甲基化赖氨酸4(H3K4me3)与RNA聚合酶II在*Nanog*转录起始位点富集, MEDL2与NIPBL结合到*Nanog*转录起始位点上游5 Kb处的增强子上, 通过改变*Nanog*每个等位基因处染色质的修饰从而提升*Nanog*的表达, 这也说明*Nanog*的双等位基因表达与基态多能性相联系^[20]。

综上所述, NANOG在ESCs中可直接结合多基因的调控区维持干细胞的自我更新与多能性, 也可通过二聚体的形式结合其他多能性转录因子, 且*Nanog*的双等位基因表达与基态多能性相关联。

4 NANOG在诱导性多能干细胞中的功能

除胚胎干细胞外, 多能性细胞也可以通过体细胞重编程、细胞融合^[46-49]或者转染调控转录因子获得。2006年, YAMANAKA等^[50]在ESCs的培养条件下引入四种因子*Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*成功将小鼠胚胎或成年成纤维细胞诱导为多能性干细胞, 并将其命名为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。经典的四因子并不包括*Nanog*, 但在YU等^[51]的实验中, 引入*Jdp2*、*Jhdm1b*、*Mkk6*、*Glis1*、*Nanog*、*Essrb*和*Sall4*七因子将小鼠成纤维细胞诱导为iPSCs, 与四因子的iPSCs相比, 七因子的iPSCs具有嵌合、种系传递和四倍体互补的能力, 且撤去*Nanog*后iPSCs产生效率大大降低。另外, 在早期实验中, 人iPSCs由NANOG、OCT4、SOX2和LIN28诱导, 其形态特征与小鼠EPI干细胞类似^[52]。猪间充质干细胞引入OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28和C-MYC后可被诱导为具有嵌合能力的iPSCs^[53]。

NANOG缺失会造成iPSCs基态多能性建立失败。SMITH^[54]在研究2i/LIF条件是否可以加强iPSCs的诱导效率时发现, 在体细胞最初的重编程过程中存在诱导重编程早期阶段, 是多能性阈值的评判标准, 这种状态下, 细胞不完全地表达多能性标记, 雌性细胞中X染色体失活, 对LIF无应答且不能形成嵌合体。SILVA等^[27]发现, 在2i/LIF条件下, *Oct4*、*c-Myc*和*Klf4*

可诱导神经干细胞由重编程早期阶段向基态多能性转变,之后该组又指出NANOG对于iPSCs产生的早期阶段是非必需的,但对于诱导重编程早期阶段向完全重编程的基态多能性转变是必需的。2i/LIF的条件下,引入*Oct4*、*Klf4*、*c-Myc*的*Nanog*⁺神经干细胞并不能被诱导成为基态的iPSCs。相反,在相同的条件下,添加*Nanog*作为重编程因子后,*Nanog*⁺神经干细胞由诱导重编程早期阶段向到基态多能性转变。

5 总结与展望

综上所述,在小鼠胚胎的第二次命运决定中,NANOG对于EPI的形成是必需的,且通过非细胞自主作用参与PrE的形成。ESCs中NANOG能形成二聚体,与其他的多能性转录因子相互作用,又可直接结合其他基因的调控区维持干细胞的自我更新与多能性;NANOG与基态多能性相联系,2i/LIF体系下*Nanog*在ESCs中表达量上升,由单等位基因表达转变为双等位基因表达。在体细胞重编程中NANOG对于基态多能性的建立具有重要作用。

但在大型哺乳动物中,有关NANOG功能的研究较少,这与实验技术和至今仍未建立起真正的胚胎干细胞系相关。小鼠与大型哺乳动物在胚胎发育时间、转录因子表达模式和功能等方面有所不同,这也说明两者在多能性和早期胚胎发育的基因调控网络中存在差异,所以NANOG在大型哺乳动物的早期胚胎发育和多能性调控中的功能值得进一步探索。

参考文献 (References)

- [1] LU C C, BRENNAN J, ROBERTSON E J. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(4): 384-92.
- [2] SAIZ N, PLUSA B. Early cell fate decisions in the mouse embryo [J]. *Reproduction*, 2013, 145(3): R65-R80.
- [3] JOHNSON M H. From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25(1): 483-512.
- [4] GEORGIADES P. *Ets2* is necessary in trophoblast for normal embryonic anteroposterior axis development [J]. *Development*, 2006, 133(6): 1059-68.
- [5] STRUMPF D. *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst [J]. *Development*, 2005, 132(9): 2093-102.
- [6] RALSTON A, COX B J, NISHIOKA N, et al. *Gata3* regulates trophoblast development downstream of *Tead4* and in parallel to *Cdx2* [J]. *Development*, 2010, 137(3): 395-403.
- [7] SCHRODE N, SAIZ N, DI TALIA S, et al. *GATA6* levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst [J]. *Dev Cell*, 2014, 29(4): 454-67.
- [8] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, et al. The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-42.
- [9] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6.
- [10] MARTIN G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-8.
- [11] KELLER G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine [J]. *Gene Dev*, 2005, 19(10): 1129-55.
- [12] NICHOLS J, SMITH A. Naive and primed pluripotent states [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 487-92.
- [13] DUNN S J, MARTELLO G, YORDANOV B, et al. Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency [J]. *Science*, 2014, 344(6188): 1156-60.
- [14] PAN G J, PEI D Q. Identification of two distinct transactivation domains in the pluripotency sustaining factor *nanog* [J]. *Cell Res*, 2003, 13(6): 499-4.
- [15] PAN G, PEI D. The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1401-7.
- [16] OH J H, DO H J, YANG H M, et al. Identification of a putative transactivation domain in human *Nanog* [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(3): 250-4.
- [17] BOOTH H A F, HOLLAND P W H. Eleven daughters of NANOG [J]. *Genomics*, 2004, 84(2): 229-38.
- [18] YANG F, ZHANG J, LIU Y, et al. Structure and functional evaluation of porcine NANOG that is a single-exon gene and has two pseudogenes [J]. *INT J Biochem Cell B*, 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.009.
- [19] DAS S, JENA S, LEVASSEUR D N. Alternative splicing produces *Nanog* protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(49): 42690-703.
- [20] MIYANARI Y, TORRES-PADILLA M E. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of *Nanog* [J]. *Nature*, 2012, 483(7390): 470-3.
- [21] KOMATSU K, FUJIMORI T. Multiple phases in regulation of *Nanog* expression during pre-implantation development [J]. *Dev Growth Differ*, 2015, 57(9): 648-56.
- [22] FRANKENBERG S, GERBE F, BESSONNARD S, et al. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism Involving *Nanog* and RTK signaling [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(6): 1005-13.
- [23] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-55.
- [24] CHAZAUD C, YAMANAKA Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo [J]. *Development*, 2016, 143(7): 1063-74.
- [25] CHAZAUD C, YAMANAKA Y, PAWSON T, et al. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the *Grb2*-MAPK pathway [J]. *Dev Cell*,

- 2006, 10(5): 615-24.
- [26] PLUSA B, PILISZEK A, FRANKENBERG S, et al. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst [J]. *Development*, 2008, 135(18): 3081-91.
- [27] SILVA J, NICHOLS J, THEUNISSEN T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 722-37.
- [28] MESSERSCHMIDT D M, KEMLER R. Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism [J]. *Dev Biol*, 2010, 344(1): 129-37.
- [29] AZAMI T, BASSALERT C, ALLEGRE N, et al. Regulation of the ERK signalling pathway in the developing mouse blastocyst [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.177139.
- [30] ORTEGA M S, KELLEHER A M, O'NEIL E, et al. NANOG is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo [J]. *Mol Reprod Dev*, 2020, 87(1): 152-60.
- [31] KUIJK E W, VAN TOL L T, VAN DE VELDE H, et al. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos [J]. *Development*, 2012, 139(5): 871-82.
- [32] HABIBI R, HOSSEINI S M, ZADEGAN F G, et al. Functional characterization of NANOG in goat pre-implantation embryonic development [J]. *Theriogenology*, 2018, doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.023.
- [33] RAMOS-IBEAS P, SANG F, ZHU Q, et al. Pluripotency and X chromosome dynamics revealed in pig pre-gastrulating embryos by single cell analysis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 500.
- [34] YAMAGUCHI S, KIMURA H, TADA M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development [J]. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5(5): 639-46.
- [35] HYSLOP L, STOJKOVIC M, ARMSTRONG L, et al. Down-regulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8): 1035-43.
- [36] CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development [J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1230-4.
- [37] LOH Y H, WU Q, CHEW J L, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(4): 431-40.
- [38] BOYER L A, LEE T I, COLE M F, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 947-56.
- [39] MULLIN NICHOLAS P, YATES A, ROWE ARTHUR J, et al. The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer [J]. *Biochem J*, 2008, 411(2): 227-31.
- [40] WANG J, LEVASSEUR D N, ORKIN S H. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6326-31.
- [41] NIWA H. How is pluripotency determined and maintained [J]? *Development*, 2007, 134(4): 635-46.
- [42] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23.
- [43] MACARTHUR B D, SEVILLA A, LENZ M, et al. Nanog-dependent feedback loops regulate murine embryonic stem cell heterogeneity [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(11): 1139-47.
- [44] SINGH A M, HAMAZAKI T, HANKOWSKI K E, et al. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2534-42.
- [45] FILIPCZYK A, GKATZIS K, FU J, et al. Biallelic expression of nanog protein in mouse embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(1): 12-3.
- [46] MILLER R A, RUDDLE F H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids [J]. *Cell*, 1976, 9(1): 45-55.
- [47] TADA M, TADA T, LEFEBVRE L, et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells [J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6510-20.
- [48] TADA M, TAKAHAMA Y, ABE K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1553-8.
- [49] TAKAGI N, YOSHIDA M A, SUGAWARA O, et al. Reversal of X-inactivation in female mouse somatic cells hybridized with murine teratocarcinoma stem cells *in vitro* [J]. *Cell*, 1983, 34(3): 1053-62.
- [50] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [51] WANG B, WU L, LI D, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Jdp2-Jhdm1b-Mkk6-Glis1-Nanog-Essrb-Sall4 [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(12): 3473-85.
- [52] YU J, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20.
- [53] WEST F D, TERLOUW S L, KWON D J, et al. Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(8): 1211-20.
- [54] SILVA J, BARRANDON O, NICHOLS J, et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition [J]. *PLoS Biol*, 2008, doi: 10.1371/journal.pbio.0060253.