形成态多能干细胞的研究进展

刘芳远 赵超越 吴宝江 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 010020)

摘要 胚胎在发育过程中根据其多能性调控的特征可以分为两种状态,即原始态(naïve)和激发态(primed)。为了准确掌握这两种多能性状态之间相互转换、谱系分化、表观遗传修饰等调控机制,AUSTIN提出了一种假说,认为naïve和primed状态之间存在另一种新的多能性中间状态,并将其命名为形成态(formative)。最近,AUSTIN和WU从小鼠和人类胚胎中成功分离并建立了具有formative多能性特征的干细胞系。相比于naïve和primed多能性干细胞,形成态多能干细胞(formative stem cell, FSC)不仅具有独特的基因表达特征,而且细胞的分离、诱导方法和体内发育能力与另两种多能性细胞也存在差异。该文将对FSC的特征及其多能性的研究进展进行介绍。

关键词 多能性;干细胞;发育;形成态

Progression in Formative Stem Cell

LIU Fangyuan, ZHAO Chaoyue, WU Baojiang, LI Xihe, BAO Siqin*

(Research Center for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau College of Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010020, China)

Abstract Embryonic stem cells can be divided into two states, naïve and primed, according to their pluripotency during developmental progression. In order to grasp the regulatory mechanism between two pluripotent states, such as transition, lineage differentiation, and epigenetic modification, AUSTIN proposed a hypothesis that there exists a novel intermediate state named as "formative". Moreover, AUSTIN and WU successfully isolated pluripotent stem cells with formative characteristics from mouse and human embryos in his recent study. Compared with naïve and primed pluripotent cells, FSC (formative stem cell) have unique features of gene expression, derivation and developmental pluripotency *in vivo*. Here, this review will introduce the characteristics of formative stem cells and its recent progresses.

Keywords pluripotency; stem cell; development; formative

小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)是一种来自小鼠囊胚内细胞团的多能干细胞。这种处于"原始态"(naïve)的多能干细胞,不仅具有独特的多能基因调控机制和基因组的低甲基 化水平,注射到囊胚后能贡献到嵌合小鼠体内除了

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32060176)

*Corresponding author. Tel: +86-13384716876, E-mail: baosq@imu.edu.cn

外胚层以外的其他谱系中^[1-2]。当小鼠胚胎发育着 床后,不仅胚胎形态发生明显改变,基因组的DNA 甲基化水平也出现明显升高,并且随胚胎上胚层细 胞(epiblast)受到复杂信号刺激,开始向原肠胚分化。 从早期原肠胚胎可以分离并建立小鼠上胚层干细胞

收稿日期: 2021-01-01 接受日期: 2021-01-22

国家自然科学基金(批准号: 32060176)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 13384716876, E-mail: baosq@imu.edu.cn

Received: January 1, 2021 Accepted: January 22, 2021

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5520

(mouse epiblast stem cell, mEpiSC), mEpiSC被称为 "激发态"(primed)多能干细胞^[1]。mEpiSC具有多能 性和不同谱系分化的能力, 而且一些谱系特异性的 调控基因在mEpiSC中已经开始表达^[3-4]。这说明, 多 能性细胞从退出naïve状态时就开始进入细胞分化 阶段, 并且可能是多能干细胞进行谱系分化的起始。

在体外培养条件下, naïve和primed的多能性维 持及自我更新能力具有一定的差异[5-6]。但有趣的是, 当通过改变培养条件、表观遗传或基因修饰等手段 对primed状态的细胞进行诱导时,细胞能从primed 状态向naïve状态进行重编程转化^[7]。尽管已有大量 的报道阐述了这两种多能性状态之间的相互转换机 制,但是针对哺乳动物胚胎发育过程而言,这两种 状态干细胞的发育模型还不能准确地解释早期胚胎 发育的过程,为了进一步了解两种多能性状态之间 的过渡和转化关系,研究人员陆续揭示出几种处于 naïve状态和primed状态中间的多能性状态,以解释 干细胞多能性退出和谱系分化过程的机制[8-14]。在 最近的研究中, AUSTIN的团队^[13]成功验证了他们提 出的一种处于naïve状态和primed状态之间的形成态 多能性的存在,即从小鼠和人类胚胎中分离培养出 形成态多能干细胞(formative stem cell, FSC), 并利用 嵌合体实验和多组学分析等验证了FSC的生物学特 性。FSC的发现对于人们了解干细胞多能性退出及 多谱系分化具有十分重要的意义。

1 小鼠胚胎干细胞由naïve多能性到primed 多能性的转变

在小鼠胚胎发育过程中,囊胚的内细胞团被认 为具有多能性,而内细胞团从早期胚胎开始经过4~5 天的持续发育,其多能性在转录调控、信号转导、 代谢变化和表观特征等方面都发生了不同程度的变 化。这种从囊胚内细胞团中分离获得多能性细胞被 称为"naïve"多能性胚胎干细胞,而从着床后的第5.5 天至7.5天的上胚层细胞中分离获得的干细胞被称 为"primed"多能性胚胎干细胞^[1]。与prime多能性细 胞不同,naïve多能性细胞具有独自特征,即具有在嵌 合胚中发育能力,同时可实现生殖传代。体外培养 mESC时,在化学成分明确的培养基中加入GSK3-β 抑制剂(CHIR99021)、Mek/Erk抑制剂(PD0325901) 以及白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF) 三种因子组成的2i/LIF(2 inhibitors/LIF)培养体系,能 够使mESC维持naive多能性状态及其自我更新能力^[5],并且这一培养体系在不同品系小鼠及大鼠中具有高度的适用性^[15-17]。与mESC相比, primed多能性的mEpiSC在进行体外培养时需要激活素A(Activin A)和成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)发挥作用^[18],并且mEpiSC不能与囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)成功嵌合,即将mEpiSC注射到囊胚后,并不能产生嵌合后代^[6]。

造成naïve和primed多能性差异的原因很多,首 先从维持多能性的调控基因而言,尽管mEpiSC同样 表达了核心多能性调控因子基因Oct4和Sox2,但是 具体的调控机制却存在差异^[1]。比如,在mESC中, Oct4的表达主要受远端增强子驱动,而mEpiSC中的 Oct4的表达是由近端增强子调控[19];此外,一些多能 性调控的基因,如Klf2、Klf4、Tfcp2l1、Esrrb、Tbx3、 Prdm14、Nanog和Rex1(又名Zfp42),只有在naïve多 能性细胞中特异性表达[19]。当囊胚发生着床后,除 Oct4和Sox2外,其他多能基因的表达逐渐减弱甚至 沉默。与此同时,一些谱系分化基因,如T、Foxa2 和Cerl等基因逐渐开始在着床后的epiblast细胞中 表达,并起始特定谱系分化4%。有趣的是,在一些 非可逆性naïve状态退出的研究中,细胞中的谱系分 化基因(如Sox1和Foxa2)在naïve状态退出时并没有 立即表达, 而是在naive状态退出后经过一段时间才 能被检测到,这些实验表明,细胞在进行naïve状态 向primed状态转化的过程中, 谱系分化并不是随着 naïve状态退出而立即发生的, 而是存在着短暂的时 间间隔,以进行基因调控网络的重组^[20-22]。为了解释 这一现象, KALKAN等[22]利用Rex1:GFP报告基因系 统对naïve多能性细胞撤掉2i/LIF培养系后25 h内的多 能性基因表达进行追踪,分析naïve多能性退出情况。 结果发现,与谱系分化基因相比,一些早期着床后的 标记基因Otx2、Oct6和FGF5等首先出现表达上调,而 且这种变化在短时间(16 h~25 h)内是可逆的。随着 时间推移, Nanog、Esrrb和Klf4等基因的表达逐渐 减少并沉默, 而Oct4仍能保持较为稳定的表达状态, 当细胞退出naïve状态时, FGF5、Sox3、Dnmt3a和 Dnmt3b的表达也会逐渐上调,其中甲基转移酶Dnmt3a和Dnmt3b的表达上调提高了全基因组CpG甲基 化水平[22]。

KALKAN团队^[23]研究结果进一步证实,囊胚 ICM在体内发育分化过程中,从ICM的naïve多能性

的退出早于谱系分化基因表达的启动,并且发育到 epiblast之前存在一定的时间间隔,在这个间隔内的 细胞可能类似于干细胞从naïve状态向primed状态的 转化过程。最近的一些研究也证实, naïve和primed 状态之间确实存在着多能性中间状态。MOR-GANI等^[24]提出了两种中间状态: 胚胎着床后的 stage I(E5.0~E6.25)和上胚层细胞向原肠胚分化的 起始状态stage II(E6.25~E7.25)。在这两种中间状态 中,细胞内的多能基因表达模式分别与naïve多能性 退出和谱系分化的基因表达特征相一致。DU等[11则 发现了一种依赖于ISYI及其介导miRNA调控的平衡 多能状态,这种平衡状态类似于naïve开始退出时的 状态。BAO等^[8]对E3.5囊胚进行2次诱导后衍生出一 种新型的多能干细胞(advanced stem cell, ASC), ASC 相比于mESC具有较高的DNA甲基化水平,但是多 能性却明显高于mEpiSC。而AUSTIN等[13]经过长期 研究提出并成功获得了小鼠和人的FSC细胞系,其 特性成功解释了mESC在体外培养过程中从naïve多 能性退出和谱系分化能力获得的新状态。

2 小鼠形成态多能干细胞系的建立及其 特征

AUSTIN团队^[23]认为, formative状态是多能性 细胞进行谱系分化的起点, 相对于naïve和primed多 能性, formative多能性应该具备以下特征(表1)。从 基因表达水平来看, formative状态应是处于naïve和 primed之间的中间状态,由于谱系分化起始的影响, 细胞内染色质开放水平较mESC更为松散,无论是 naïve多能性调控基因还是谱系分化基因,都不应呈 现出高表达的趋势。在naïve和primed状态中均为 显著性高表达的多能性调控因子基因Oct4和Sox2, 在mFSC的多能基因调控网络中也发挥了重要的 作用。Otx2是小鼠发育过程中胚胎着床后调控多 能性的关键因素[25],研究表明,Oct4远/近端增强子 的变换调控过程与Otx2的表达变化密切相关^[26]。 另外,与mESC相比,mFSC中DNA甲基化水平和 H3K27me3修饰水平均有所升高,染色质重塑和表 观遗传修饰都将更加有利于细胞内谱系分化基因 的转录起始^[22,27]。因此,可以认为在formative状态 期间, 干细胞退出了naïve状态, 并正在获得谱系分 化的能力。基于这种理论, AUSTIN团队^[3,27]认为相 比于mESC, mFSC更容易进行谱系分化和定向诱导 分化。

由于formative状态的这种多能性特征, AUSTIN 团队^[28]认为, FGF和Nodal信号通路是促进naïve状态 退出并进行谱系分化的重要因素。为了排除Wnt3 对促进胚胎向原肠胚分化的影响, AUSTIN团队^[13] 在培养体系中添加了Tankyrase抑制剂XAV939培养 E5.5~E6.0的小鼠上胚层细胞, 最终成功获得了能够 稳定传代的mFSC细胞系。随后研究人员对培养体

Table 1 Properties of mouse pluripotent stem cells in different stages				
阶段	原始态	形成态	激发态	
Stages	Naïve	Formative	Primed	
Embryonic development stage	E3.5	E5.5-E6.0	E5.5-E8.0	
Expression of Oct4 and Sox2	Y	Y	Y	
Expression of naïve pluripotency genes	Y	Р	Ν	
Expression of lineage-specific genes	Ν	Ν	Υ	
Expression of early post-implantation genes	—	Υ	Р	
Chromatin accessibility	L	М	Н	
DNA methylation	L	М	Н	
X inactivation	Ν	Р	Y	
Dependence on FGF/Erk signaling	Ν	Р	Y	
Dependence on Nodal/Activin signaling	Ν	Р	Y	
Formation of blastocyst chimaeras	Н	G	_	
Homogeneous	Y	Y	Ν	

表1 小鼠多能干细胞不同阶段的特征

Y: 是; N: 否; 一: 无; H: 高; M: 中等; L: 低; P: 部分; G: 一般。

Y: yes; N: no; -: not dected; H: high; M: middle; L: low; P: partial; G: genal.

系进行了进一步优化,发现细胞本身的内源性FGF 信号刺激便可满足mFSC的自我更新能力,而且低浓 度的Activin A(3 ng/mL)即可维持mFSC的多能性,最 终确定使用低浓度的Nodal/Activin信号刺激,以及 对Wnt信号通路的抑制来实现从小鼠E5.5的上胚层 细胞中分离并培养mFSC。与AUSTIN提出的诱导 机制不同,WU等^[12]使用小鼠E3.5的胚胎或mESC作 为诱导起点,通过对FGF、TGF-β/Smad以及Wnt信 号通路的激活成功诱导出另一种符合formative多能 性特征的干细胞系,即FTW-ESC。尽管两种方法有 所不同,但是两种诱导机制均证明了FGF信号通路 和Nodal/Activin信号通路对mFSC的重要性。

3 小鼠形成态多能干细胞的多能性维持 及体内外分化能力

在mESC中,参与多能性调控的基因主要包括 Oct4、Sox2、Nanog等,其多能性维持主要依赖于 BMP/Smad信号通路和LIF/Stat3信号通路的调控, YING等^[5,29]通过研究证明了在2i/LIF的培养体系下 调控上述信号通路能够维持mESC的自我更新能 力。mEpiSC的多能性维持被证明与Activin/Nodal 信号通路和FGF信号通路有关, AUSTIN团队的研究 结果表明, FSC在多能性调控机制^[23]、基因组甲基 化水平[26]、染色质可及性[30]等特征方面与mEpiSC 更为接近(图1)。在mFSC中, FGF和Activin/Nodal信 号通路对细胞的自我更新同样扮演了重要的角色。 AUSTIN在其培养体系中去掉了外源性FGF因子,并 使用FGF受体抑制剂PD173074(0.1 μmol/L)或下游 MEK1/2受体抑制剂PD0325901(1.0 µmol/L)进行处 理后发现,细胞无法继续维持自我更新,证明了FGF 对mFSC多能性维持和自我更新能力的重要性。与 FGF信号通路类似, 当细胞中的Nodal信号通路被抑 制后也会导致mFSC的分化加剧。由于动物胚胎发 育过程中Nodal信号通路发挥了重要的作用^[31],为了 确保细胞不会由formative状态向原条期进一步分化, 经过多次实验后确定了低浓度的Activin A(3 ng/mL) 可维持FSC的多能性。mFSC多能性维持对Wnt信号 通路的依赖性存在区别, AUSTIN等[13]研究发现, 在



随着胚胎发育的进行, 上胚层细胞的基因组甲基化水平和染色质可及性逐渐升高, 细胞内的基因表达特征也发生变化。naïve多能性调控基因 表达水平将逐渐降低, 胚胎早期着床后基因的表达将在formative时期达到最高, 进入到primed状态后, 谱系分化基因将开始表达。 With the embryonic development, genomic methylation and chromatin accessibility of the epiblast cells gradually increased, and gene expression of

cells also changed. In formative stage, the amount of naive pluripotent genes decreased progressively, and the expression of early post-implantation genes reach the peak. As the subsequent transition to primed pluripotency, lineage differentiated genes initiated.

图1 小鼠胚胎的多能性进展过程

Fig.1 Developmental progression of pluripotency in mouse embryos

mFSC中只有完全抑制Wnt信号通路才能阻止其分 化。有趣的是,在WU等^[12]得到的FTW-ESC中,虽然 与formative多能性特征极为接近,但Wnt信号通路却 处于激活状态,这可能由于两种诱导方法使用了不 同阶段的胚胎所致。因此,Wnt信号通路对formative 多能性维持的具体作用仍需要进一步的验证。此外, 根据KALKAN等^[32]在2019年的研究发现,PEA3家 族的*e26*转录因子(E26 transformation-specific,*ETS*) *Etv5*与naïve状态的退出有密切联系。当敲除mFSC 中*Etv5*和*Etv4*之后,细胞虽然可以进行自我更新,但 却无法向primed状态方向分化,即被认为是失去了 谱系分化的能力。当mFSC中敲除胚胎着床时期具 有关键作用的基因*Otx2*后,无论是FSC的自我更新 能力,还是谱系分化能力均受到严重的影响,表明 *Otx2*对FSC多能性维持发挥了重要的作用。

胚胎干细胞嵌合体形成能力是区分naïve和 primed多能性的重要标志之一。研究表明,mEpiSC 很难通过囊胚注射获得嵌合体小鼠^[2,6]。研究发现, mFSC可以通过囊胚注射方法获得嵌合体小鼠,但是 效率低于naïve状态的mESC。为了验证囊胚注射后 的mFSC是否恢复了naïve状态的部分特征,研究人 员检测囊胚注射24 h后的胚胎中Oct6和Klf4的表达 情况,结果发现,mFSC在囊胚中保留了formative多 能性特征。WU等^[12]也成功使用FTW-ESC细胞进行 了嵌合体实验,再次证实了formative状态的细胞能 够有效地贡献到嵌合体发育过程中。有趣的是,WU 等^[12]还发现FTW-ESC与外胚层样细胞(epiblast like cell, EpiLC)类似,能够响应BMP信号的刺激诱导 成为原始生殖样细胞(primordial germ cell-like cell, PGCLC)。

4 人类形成态多能性研究

1998年, THOMSON团队^[33]首次从人类胚胎中 分离获得了人多能性干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC),由于其来源于囊胚,人们起初认为这便 是naïve状态的人多能性干细胞。2012年,OLEARY 等^[34]通过研究证实这种来源于人ICM的细胞在多能 性方面其实更接近于小鼠的primed状态。此外,通 过分子诱导而获得的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)也被证实与mEpiSC更为接 近^[35]。直到近几年,研究人员通过对2i/LIF培养体系 进行优化,陆续实现了人naïve状态细胞多能性的诱 导和维持^[36-37]。根据BOROVIAK等^[38]提出的哺乳动物体内多能性维持的保守特性,在人胚胎发育过程应当存在formative状态。基于这种假设,AUSTIN等^[13]将三种人的naïve状态细胞系,即cR-H9EOS、cR-Shef6和胚胎来源的HNES1置于小鼠formative培养体系下进行诱导,最终同样获得了具有formative多能性基因表达特征的hFSC(human formative stem cell)。在WU等^[12]的诱导体系中,则使用iPSC而非naïve hPSC作为诱导起点,尽管FTW-iPSC的转录组分析结果表明,细胞的发育状态处于naïve hPSC和primed hPSC之间,但并不能因此将其准确定义为formative状态的hPSC。此外,AUSTIN还成功从人的囊胚中分离并培养出hFSC。

有关hFSC的特性还需要进一步研究。根据 TAKASHIMA等^[9]提出的观点, naïve多能性细胞的 基因组和表型在灵长类动物中的稳定性要低于啮齿 动物,因此hFSC在体外培养应更具有优势。一方面, 由于染色质可及性及转录调控发生变化, 与naïve细 胞相比hFSC对诱导信号的反应会更加灵敏;另一方 面,因为formative状态细胞尚未发生谱系分化,与 primed细胞相比, hFSC在受到特定诱导信号的刺激 后,对诱导信号的响应更为敏感,诱导分化的方向 也更为一致。研究表明在naïve hPSC中, 脱甲基化 的作用会对细胞印记基因造成一定的损害[39]。由于 hFSC具有较高的甲基转移酶活性,故细胞因脱甲基 化而受到的印记损伤应当有所降低。利用这一特 性,将hPSC重编程为naïve状态后,迅速诱导为hFSC 能够有效减少脱甲基化造成的印记损害,也为保留 完整的印记提供了良好的基础。在接下来的研究中, 无论是从人胚胎ICM中直接诱导获得hFSC, 还是利 用体细胞进行重编程而获得hFSC,都将是研究人员 关注的干细胞研究重点之一。

5 讨论与展望

自AUSTIN和KALKAN首次提出formative状态 以来^[3],越来越多的研究证明,naïve和primed状态中 间存在formative状态^[12-13,40]。虽然在FSC中,Oct4和 Sox2基因对于多能性维持和自我更新发挥了关键的 作用,但是在转录因子的精准调控下,细胞在染色质 开放程度^[30]、甲基化水平^[26]和谱系分化^[22]方面体现 出了不同的特征。FSC为更好地理解胚胎发育过程 中谱系分化的起始提供了良好的研究模型,而在此 之前,无论是naïve和primed状态,还是诱导分化形成 PGC前的EpiLC,都无法像FSC一样对分化信号产生 敏感的反应。利用formative状态的这一特点,通过对 中胚层或内胚层转录因子的调控,为实现向中/内胚 层进行定向诱导提供了更有效的思路和方案。

随着FSC细胞系的获得,关于formative多能性 的研究将进入了一个新的阶段。与naïve和primed 状态的细胞相比, FSC在多能性维持机制和诱导方 案等方面的研究仅仅是刚刚开始,今后仍然需要更 多、更深入的研究精准地阐明其调控机制。比如, 在FSC的自我更新维持方面,虽然已有的研究证明, Etv4、Etv5以及Otx2是不可或缺的因素[25,32],但这3 个基因在多能性调控网络中,与Oct4、Sox2的相互 作用应当进一步阐明;另外,AUSTIN和WU提出的 两种不同的诱导方案,最终都得到了具有formative 多能性特征的细胞,而对两种诱导方案中的不同之 处进行更深入的探讨将有助于我们理解胚胎发育的 具体机制。此外,已有的研究表明,可以通过诱导手 段实现由primed状态向naïve状态的重编程转换,而 这种转换能否也存在于formative状态, 值得我们去 深入研究。总之, formative已为我们打开了理解胚 胎发育过程中谱系分化起始的大门,在体外培养条 件下有助于人们将多能干细胞定向分化为具有特定 功能的细胞。

参考文献 (References)

- NICHOLS J, SMITH A. Naive and primed pluripotent states [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 487-92.
- [2] BRADLEY A, EVANS M, KAUFMAN M H, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines [J]. Nature, 1984, 309(5965): 255-6.
- [3] KALKAN T, SMITH A. Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1657): 20130540.
- [4] BOROVIAK T, LOOS R, BERTONE P, et al. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(6): 516-28.
- [5] 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.
- [6] TESAR P J, CHENOWETH J G, BROOK F A, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells [J]. Nature, 2007, 448(7150): 196-9.
- [7] BAO S, TANG F, LI X, et al. Epigenetic reversion of postimplantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells [J]. Nature, 2009, 461(7268): 1292-5.

- [8] BAO S, TANG W W, WU B, et al. Derivation of hypermethylated pluripotent embryonic stem cells with high potency [J]. Cell Res, 2018, 28(1): 22-34.
- [9] TAKASHIMA Y, GUO G, LOOS R, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human [J]. Cell, 2014, 158(6): 1254-69.
- [10] CORNACCHIA D, ZHANG C, ZIMMER B, et al. Lipid deprivation induces a stable, naive-to-primed intermediate state of pluripotency in human PSCs [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(1): 120-36.
- [11] DU P, PIROUZ M, CHOI J, et al. An intermediate pluripotent state controlled by microRNAs is required for the naive-toprimed stem cell transition [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(6): 851-64.
- [12] YU L, WEI Y, SUN H X, et al. Derivation of intermediate pluripotent stem cells amenable to primordial germ cell specification [J]. Cell Stem Cell, 2020, 28(3): 550-67.
- [13] KINOSHITA M, BARBER M, MANSFIELD W, et al. Capture of mouse and human stem cells with features of formative pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2020, 28(3): 453-71.
- [14] HAYASHI K, OHTA H, KURIMOTO K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells [J]. Cell, 2011, 146(4): 519-32.
- [15] HIRABAYASHI M, KATO M, KOBAYASHI T, et al. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency [J]. Mol Reprod Dev, 2010, 77(2): 94.
- [16] BUEHR M, MEEK S, BLAIR K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts [J]. Cell, 2008, 135(7): 1287-98.
- [17] LI P, TONG C, MEHRIAN-SHAI R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts [J]. Cell, 2008, 135(7): 1299-310.
- [18] 陈杨林, 刘悦石, 李喜和, 等. 小鼠上胚层多能干细胞研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报(CHEN Y L, LIU Y S, LI X H, et al. Advances in mouse epiblast stem cell [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2017, 38(7): 931-8.
- [19] HACKETT J A, SURANI M A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(4): 416-30.
- [20] TURNER D A, TROTT J, HAYWARD P, et al. An interplay between extracellular signalling and the dynamics of the exit from pluripotency drives cell fate decisions in mouse ES cells [J]. Biol Open, 2014, 3(7): 614-26.
- [21] MULAS C, KALKAN T, SMITH A. NODAL secures pluripotency upon embryonic stem cell progression from the ground state [J]. Stem Cell Rep, 2017, 9(1): 77-91.
- [22] KALKAN T, OLOVA N, ROODE M, et al. Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency [J]. Development, 2017, 144(7): 1221-34.
- [23] SMITH A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum [J]. Development, 2017, 144(3): 365-73.
- [24] MORGANI S, NICHOLS J, HADJANTONAKIS A K. The many faces of pluripotency: *in vitro* adaptations of a continuum of *in vivo* states [J]. BMC Dev Biol, 2017, 17(1): 7.
- [25] ACAMPORA D, DI GIOVANNANTONIO L G, SIMEONE A. Otx2 is an intrinsic determinant of the embryonic stem cell

state and is required for transition to a stable epiblast stem cell condition [J]. Development, 2013, 140(1): 43-55.

- [26] BUECKER C, SRINIVASAN R, WU Z, et al. Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(6): 838-53.
- [27] AUCLAIR G, GUIBERT S, BENDER A, et al. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 545.
- [28] LIU P, WAKAMIYA M, SHEA M J, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation [J]. Nat Genet, 1999, 22(4): 361-5.
- [29] YING Q L, NICHOLS J, CHAMBERS I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 [J]. Cell, 2003, 115(3): 281-92.
- [30] ZYLICZ J J, DIETMANN S, GUNESDOGAN U, et al. Chromatin dynamics and the role of G9a in gene regulation and enhancer silencing during early mouse development [J]. eLife, 2015, 4: e09571.
- [31] ROBERTSON E J. Dose-dependent Nodal/Smad signals pattern the early mouse embryo [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 32: 73-9.
- [32] KALKAN T, BORNELOV S, MULAS C, et al. Complementary activity of ETV5, RBPJ, and TCF3 drives formative transition from naive pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(5): 785-801.

- [33] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [34] O'LEARY T, HEINDRYCKX B, LIERMAN S, et al. Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(3): 278-82.
- [35] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861-72.
- [36] THEUNISSEN T W, POWELL B E, WANG H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(4): 471-87.
- [37] GUO G, VON MEYENN F, SANTOS F, et al. Naive pluripotent stem cells derived directly from isolated cells of the human inner cell mass [J]. Stem Cell Rep, 2016, 6(4): 437-46.
- [38] BOROVIAK T, NICHOLS J. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naive pluripotency [J]. Development, 2017, 144(2): 175-86.
- [39] PASTOR W A, CHEN D, LIU W, et al. Naive human pluripotent cells feature a methylation landscape devoid of blastocyst or germline memory [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(3): 323-9.
- [40] BREDENKAMP N, YANG J, CLARKE J, et al. Wnt inhibition facilitates rna-mediated reprogramming of human somatic cells to naive pluripotency [J]. Stem Cell Rep, 2019, 13(6): 1083-98.