

α -酮戊二酸抑制人原始态多能干细胞的长期稳态维持

丁亮¹ 徐雪婷² 秦宝明^{1,2*} 王璐璐^{3*}

(¹中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230027; ²中国科学院广州生物医药与健康研究院, 代谢与细胞命运实验室, 广州 510530; ³广州医科大学附属第五医院, 广东高校生物靶向诊治与康复重点实验室, 广州 510700)

摘要 该文探讨了4CL条件下人原始态多能干细胞(naïve human pluripotent stem cells, nPSCs)长期传代过程中自我更新能力和多能性基因表达水平的下降及其机制, 并测试了 α -酮戊二酸(alpha-ketoglutarate, α KG)对nPSCs稳态维持的影响。通过细胞生长曲线、RT-qPCR实验分别检测连续传代过程中以及 α KG处理后细胞增殖能力和多能性基因表达水平的变化; 采用转录组测序分析长期传代和 α KG处理后的差异表达基因, 并进行功能分析和motif预测。结果显示, 4CL nPSCs连续传代过程中细胞增殖能力和多能性基因表达水平均逐渐降低, 同时伴随分化相关基因表达变化; 转录组分析发现4CL nPSCs的自我更新能力下降可能与p53通路激活有关, 而多能性基因表达水平下降则可能与ETS、FOX家族转录因子有关。添加 α KG处理, 短期并未显著改变4CL nPSCs多能性基因的表达, 反而对自我更新产生一定的抑制作用; 长期虽然在一定程度上提高了4CL nPSCs的自我更新能力, 但却进一步降低了多能性基因的表达水平。总之, 4CL nPSCs长期传代后稳定性下降, 添加 α KG后, 其稳定性进一步降低。

关键词 人原始态多能干细胞; 自我更新; 多能性; α -酮戊二酸

α -Ketoglutarate Impairs the Long-Term Maintenance of Naïve Human Pluripotent Stem Cells

DING Liang¹, XU Xueting², QIN Baoming^{1,2*}, WANG Lulu^{3*}

(¹Department of Life Science and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

²Laboratory of Metabolism and Cell Fate, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China; ³Key Laboratory of Biological Targeting Diagnosis, Therapy and Rehabilitation of Guangdong Higher Education Institutes, the Fifth Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China)

Abstract This study aimed to investigate the decline in self-renewal capacity and pluripotency gene expression in nPSCs (naïve human pluripotent stem cells) during long-term passaging under 4CL conditions and to explore the underlying mechanisms. Additionally, the effect of α KG (alpha-ketoglutarate) on the steady-state maintenance of nPSCs was examined. Cell proliferation and pluripotency gene expression levels separately were assessed through cell growth curves and RT-qPCR during continuous passaging and after α KG treatment. Transcriptome sequencing was used to analyze differentially expressed genes after long-term passaging and α KG treatment, followed by functional analysis and motif prediction. Results indicated that cell proliferation and pluripotency gene expression gradually decreased during the continuous passaging of 4CL nPSCs, and were accompanied by changes in the expression of differentiation-related genes. Transcriptome analysis suggested that the decline in self-renewal

收稿日期: 2024-07-01

接受日期: 2024-10-28

国家自然科学基金(批准号: 32370849、32201214)和中国博士后科学基金(批准号: 2024T170933)资助的课题

*通信作者。Tel: 18676634613, E-mail: qin_baoming@gibh.ac.cn; Tel: 13246819881, E-mail: wang_lulu@gzhmu.edu.cn

Received: July 1, 2024

Accepted: October 28, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32370849, 32201214) and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2024T170933)

*Corresponding authors. Tel: +86-18676634613, E-mail: qin_baoming@gibh.ac.cn; Tel: +86-13246819881, E-mail: wang_lulu@gzhmu.edu.cn

might be associated with the activation of the p53 pathway, while the decrease in pluripotency gene expression could be linked to ETS and FOX family transcription factors. Short-term α KG treatment inhibited self-renewal without altering pluripotency gene expression, whereas long-term treatment improved self-renewal to some extent but further reduced pluripotency gene expression. In summary, the stability of 4CL nPSCs declines after long-term passaging, and this stability is further compromised by α KG treatment.

Keywords naïve human pluripotent stem cells; self-renewal; pluripotency; α -ketoglutarate

人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)是研究人早期胚胎发育的重要体外模型,同时对干细胞再生医学研究具有重要价值^[1-2]。根据来源途径不同, hPSCs可分为人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs);由于培养条件的差异, hPSCs呈现两种差异显著的状态:原始态(naïve)和始发态(primed),其分别对应了胚胎植入前和植入后的上胚层(epiblast)细胞^[3]。与primed状态相比, naïve状态的hPSCs具有更高的分化潜能^[4-6],为基础和再生医学应用研究提供了更多的可能性。

近十年来,国际上已有多个团队开发出不同的人原始态多能干细胞(naïve human pluripotent stem cells, nPSCs)诱导及培养体系,如NHSM、t2iLGö、PXGL、5iLAF和4CL等^[7-11]。然而,不同培养体系下的nPSCs表现出不同的特征,且存在各种问题。例如, NHSM体系下,细胞的转录组表达更接近于始发态;5iLAF体系下,尽管细胞的转录组和表观遗传状态都更接近于体内内细胞团(inner cell mass, ICM),但在传代过程中基因组稳定性较差;t2iLGö条件下的细胞则缺乏向外胚层和内胚层分化的能力^[12-13]。相比之下,4CL体系下的细胞不仅具有与体内ICM相似的转录组特征和相对稳定的基因组,还具备优秀的体内外分化潜能:在体外可以分化为三胚层的多种细胞类型及胚外细胞谱系,在体内能够成功生成嵌合体猴和人源化中期肾脏^[14-15]。尽管如此,我们在长期培养中发现,4CL nPSCs的自我更新能力和多能性基因表达水平均随着代数的增加有所降低。因此,提高其体外传代的稳定性是目前需要解决的重要问题之一。

α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α KG)作为三羧酸循环的重要中间产物,不仅参与细胞能量代谢,同时对表观遗传修饰以及干细胞命运转变都发挥重要调控作用^[16-21]。过去的研究表明,在培养基中添加 α KG能增强naïve mESCs(mouse embryonic stem cells)的自我更新能力并抑制其分化^[22-25];在人

和小鼠primed ESCs的培养体系中,提高 α KG的水平则会加速细胞的分化^[25-28];HANNA等^[29]在nPSCs的NHSM培养基中添加 α KG及其他小分子后,甚至获得了诱导效果更好的HENS(human enhanced naïve stem cell medium)培养基。然而,有关 α KG对nPSCs的影响仍有许多未知之处。

在本研究中,我们首先检测了4CL nPSCs在长期传代中的状态改变,发现自我更新能力和多能性基因表达水平均逐步降低。进一步转录组分析发现,长期传代的4CL nPSCs呈现出诸多特征,包括p53通路激活在内的多条通路变化,转录因子预测显示ETS和FOX家族因子可能是转录组变化的原因。我们进一步测试能否通过添加 α KG促进4CL nPSCs的长期稳定维持。然而,与我们的预期相反, α KG短期处理并不能提高4CL nPSCs多能性基因的表达水平,反而对自我更新有一定的抑制效应;长期处理虽然相对增强了4CL nPSCs的自我更新能力,但却导致多能性基因表达水平进一步降低;我们通过转录组分析初步证明了 α KG对4CL nPSCs的不利影响。综上,我们的研究解析了4CL nPSCs长期无法维持稳态的转录组特征,测试并发现了 α KG并不能提高nPSCs的稳定性,为后续进一步优化4CL nPSCs的长期培养提供了依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 人始发态多能干细胞(primed human pluripotent stem cells, pPSCs) H9细胞由中国科学院广州生物医药与健康研究院Miguel Angel Esteban实验室提供。

1.1.2 实验试剂

MEF培养基: DMEM高糖培养基购自Corning公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Cell Cook公司; GlutaMax和非必需氨基酸(non-essential amino acids, NEAAs)购自Gibco公司;青霉素-链霉素双抗溶液(penicillin-streptomycin)购自Hyclone公司。

mTeSR培养基: mTeSR基础培养基和mTeSR 5×添加剂购自STEMCELL Technologies公司。

4CL培养基: Neurobasal培养基、Advanced DMEM/F-12、N-2添加剂和B-27添加剂购自Gibco公司; 丙酮酸钠(sodium pyruvate)购自Corning公司; 人白血病抑制因子(human leukemia inhibitory factor, hLIF)和Activin A购自Peprotech公司; 维生素C和IWR-1购自Sigma公司; PD0325901和Y-27632购自Axon公司; DZNep购自Selleck公司; 曲古抑菌素A(Trichostatin A, TSA)购自Vetec公司; Geltrex购自ThermoFisher Scientific公司。

RNA提取所用的Trizol RNA裂解液购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 无RNA酶水(RNase free water)购自上海碧云天生物有限公司; 异丙醇和无水乙醇购自天津大茂化学试剂厂。RNA反转录所用的RNA酶抑制剂(RNase inhibitor)、Oligo dT、dNTP和反转录缓冲液(5× RT buffer)购自TaKaRa公司; 反转录酶(RTase)购自TOYOBO公司。实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)所用的Essential SYBR Green Master购自Roche公司; 引物合成于广州艾基生物技术有限公司。

其他试剂: DMEM/F12培养基和TrypLE Express酶购自Gibco公司; 0.5 mol/L EDTA和Cell Banker无血清细胞冻存液购自ThermoFisher Scientific公司; DMSO购自Sigma公司; DPBS缓冲液购自上海源培生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

H9 primed hPSCs培养。H9 pPSCs培养于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中, 每天更换新鲜的mTeSR培养基, 每4天传一代。传代时, 先用1 mL DPBS清洗细胞, 然后加入0.6 mL 0.5 mmol/L的EDTA或TrypLE-EDTA(1:1)消化液, 将细胞置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中消化2~3 min。随后, 用1 mL F12培养基终止消化, 并将消化后的细胞收集到1.5 mL离心管中, 室温下1 800 r/min离心3 min, 除上清后重悬细胞并计数。将重悬后的细胞以 1.5×10^5 个/孔的密度种在铺有Geltrex的6孔板中。每次传代的第一天, 需向培养基中添加0.1%的Y-27632。

4CL naïve PSCs的诱导。对于采用4CL培养基诱导nPSCs的具体方法, 可以参考MAZID等^[1]发表的学术论文。简要步骤概述如下: 在铺有Geltrex的6孔板

中复苏小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)作为饲养层细胞(feeder cells), 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中, 待其贴壁并完全铺展。随后, 将消化后的pPSCs以 1.5×10^5 个/孔的密度种在铺有feeder的6孔板中。诱导的第一天, 使用含0.1% Y-27632的mTeSR培养基, 并维持37 °C、5% CO₂恒温的培养条件。从第二天起, 将细胞转移至37 °C、5% O₂的低氧培养箱中继续培养, 每天更换新鲜的4CL培养基。细胞每4天传一代, 传代时, 先用1 mL DPBS清洗细胞, 然后加入0.6 mL 0.5 mmol/L的EDTA或TrypLE-EDTA(1:1)消化液, 在37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中消化7~8 min。接着, 用1 mL F12培养基终止消化, 将细胞收集至1.5 mL离心管中, 室温下1 800 r/min离心3 min, 除上清后重悬细胞并计数。重悬后的细胞以 1.5×10^5 个/孔的密度种在铺有feeder的6孔板中。每次传代的第一天, 需向培养基中添加0.05%的Y-27632。经过连续三代(即12天)4CL培养基的诱导, 细胞成功转化为nPSCs。

4CL naïve PSCs的长期维持。诱导成功的4CL nPSCs持续培养在37 °C、5% O₂的低氧培养箱中, 每天更换新鲜的4CL培养基, 每4天传一代。传代方法与4CL nPSCs诱导时一致。每次传代的第一天, 需向培养基中添加0.05%的Y-27632。

细胞冻存: 按上述步骤消化细胞, 1 800 r/min室温离心3 min, 去除上清后, 用含0.1% Y-27632的Cell Banker无血清细胞冻存液或新鲜配制的冻存液(90% FBS+10% DMSO)重悬细胞, 调整细胞密度至约 1×10^6 /mL, 分装至冻存管(1 mL/管), 置于程序冻存盒(含异丙醇)中, -80 °C冻存。

细胞复苏: 取出冻存细胞, 37 °C水浴融化后, 移入15 mL离心管, 缓慢逐滴加入F12培养基, 并用移液枪轻轻吹打混匀。室温下1 800 r/min离心3 min, 去除上清, 重悬于含0.1% Y-27632的新鲜培养基中, 重悬后的细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种至6孔板中, pPSCs置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养, nPSCs置于37 °C、5% O₂低氧培养箱中培养。

1.2.2 细胞生长曲线 将nPSCs以 6×10^4 个/孔的密度种在铺有feeder细胞的12孔板中, 置于37 °C、5% O₂的低氧培养箱中培养, 每天更换新鲜培养基并消化计数, 一代(4次计数)后, 绘制生长曲线(时间-细胞数), 并独立重复实验两次以验证结果。

1.2.3 RT-qPCR分析 首先收集细胞, 使用Trizol

裂解细胞, 通过蛋白质沉淀、异丙醇纯化、75%乙醇洗脱之后得到细胞总RNA。随后取2 μ g的RNA进行逆转录, 得到cDNA。接下来以此cDNA为模板使用SYBR Green荧光染料和相关引物进行RT-qPCR。最后根据*ACTIN*表达值对数据进行归一化, 并基于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算多能基因的相对表达值。所用引物及序列见表1。

1.2.4 数据来源和分析 本研究中采用的P2 4CL nPSCs的bulk-RNA-seq数据源自MAZID等^[11]发表的学术论文, 需注意的是, 这些数据在原文中对应的是P5 4CL nPSCs的数据, 但在此研究中我们特指P2 4CL nPSCs的相关数据, 其余数据均由我们自行送样至深圳华大国家基因库, 并利用DNBSEQ仪器进行测序获得, 产生的原始数据通过FastQC删除低质量片段和接头; 然后通过STAR软件将修剪后的数据与hg38参考基因组进行比对, 产生bam文件; 再使用RSEM软件(<https://anaconda.org/bioconda/rsem>)计算每个转录本上比对到的reads数, 生成counts表格; 最后根据表格中的count值在R中开展后续的分析: 通过DESeq2包([\[bioconductor.org/browse/DESeq2/\]\(https://bioconductor.org/browse/DESeq2/\)\)分析不同数据之间的差异表达基因\(differential expressed genes, DEGs\), 利用VennDiagram包\(<https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/index.html>\)分析不同条件下差异基因之间的重叠关系, 以及通过clusterProfiler包\(<https://bioconductor.org/packages/clusterProfiler/>\)进行基因本体\(Gene Ontology, GO\)和京都基因与基因组百科全书\(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG\)的分析。除此之外, 热图的绘制利用ComplexHeatmap包\(<https://bioconductor.org/packages/ComplexHeatmap/>\), 其余图形的绘制则利用ggplot2包\(<https://ggplot2.tidyverse.org/>\)。Motif分析使用的是Homer软件\(<http://homer.ucsd.edu/homer/>\), 根据基因ID寻找已知的或潜在的转录因子结合区域, 即motif。本文中, 我们将FC\(fold change\)>2且 \$P_{\text{adjust}} < 0.05\$ 的基因定义为差异表达基因; 绘制热图时, 需要先对基因表达量进行Z-score标准化处理。](https://</p></div><div data-bbox=)

1.2.5 统计学方法 使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式呈

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
ACTIN-F	CCA CGA AAC TAC CTT CAA CTC C
ACTIN-R	GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG T
OCT4-F	GCT CGA GAA GGA TGT GGT CC
OCT4-R	CGT TGT GCA TAG TCG CTG CT
SOX2-F	CCC AGC AGA CTT CAC ATG T
SOX2-R	CCT CCC ATT TCC CTC GTT TT
NANOG-F	GCA GAA GGC CTC AGC ACC TA
NANOG-R	AGG TTC CCA GTC GGG TTC A
DPPA3-F	CGC ATG AAA GAA GAC CAA CAA ACA A
DPPA3-R	TTA GAC ACG CAG AAA CTG CAG GGA
DPPA5-F	GCT CCT ATT TGT ACA AGC TC
DPPA5-R	CAA GTT TGA GCA TCC CTC
KLF4-F	CGC TCC ATT ACC AAG AGC TCA T
KLF4-R	CAC GAT CGT CTT CCC CTC TTT
KLF5-F	TCA GAC AGC AGC AAT GGA CAC TC
KLF5-R	GTG GCC TGT TGT GGA AGA AAC TG
KLF17-F	AAC ATT GTT GGG CCC GAC T
KLF17-R	CGG GCT GCT CTG GTA GAA AT
DNMT3L-F	TGA ACA AGG AAG ACC TGG ACG
DNMT3L-R	CAG TGC CTG CTC CTT ATG GCT
ZFP42-F	AGA AAC GGG CAA AGA CAA GAC
ZFP42-R	GCT GAC AGG TTC TAT TTC CGC

现,两组间数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4CL naïve hPSCs在长期传代过程中无法稳定维持

我们根据已报道的方法将 pPSCs 诱导成 4CL nPSCs, 并通过检测其在长期传代过程中形态、增殖能力以及多能性基因表达情况来判断 nPSCs 是否能够维持稳态(图 1A)。首先, 经过 12 天 4CL 条件的诱导后, 细胞克隆的形态逐渐从扁平变得圆润(图 1B), RT-qPCR 的结果确认了 naïve 多能性基因的表达水平明显提高(图 1C), 表明 4CL nPSCs 的诱导成功。随后, 我们跟踪 4CL nPSCs 在连续传代过程中的三个阶段: 早期(P2)、中期(P4)与晚期(P8)在形态、增殖和多能性基因表达方面的情况。与 P2 代相比, P4 代细胞克隆体积变小, 但形态依旧圆润隆起, P8 代克隆体积进一步缩小, 且部分克隆形态扁平, 同时出现少量细胞死亡(图 1D); 细胞生长曲线显示, 细胞的增殖速度随传代的增加而逐渐减慢(图 1E); 多能性基因的表达水平也随传代的增加逐渐降低(图 1F)。因此, 我们初步确定, 4CL nPSCs 在连续八代的传代过程中自我更新能力和多能性基因表达水平均逐渐降低, 无法维持稳定。

2.2 转录组分析表明 4CL naïve hPSCs 长期传代后稳定性降低

为了进一步探明 4CL nPSCs 长期传代无法稳定维持的原因, 我们以 P2(引用 MAZID 等^[1]的文献中 P5)作为对照, 分析 P4 和 P8 4CL nPSCs 的转录组变化情况。主成分分析(principal component analysis, PCA)结果显示, 细胞在主成分 1(PC1)的维度上按代数从左向右连续分布, 而在主成分 2(PC2)的维度上, P4 呈现显著改变, P8 则重新回到 P2 状态(图 2A)。DEGs 的数目随传代呈现阶梯上升的趋势(图 2B)。进一步的重叠分析显示, P4 到 P8 的转录变化高度连续, P8 的 DEGs 包含了大部分 P4 的 DEGs(图 2C)。热图显示, 随着传代次数增加, 多能性和自我更新相关基因的表达水平显著下降(图 2D 和图 2E), 这些变化趋势与 RT-qPCR 验证(图 1F)及生长曲线(图 1E)结果一致。同时, 三胚层相关基因的表达模式也发生明显变化, 中胚层基因表达上调, 而外胚层和内胚层基因表达下调(图 2F)。这些发现共同指出, 在连续传代过程中, 4CL nPSCs 在转录层面经历了显著变化, 其多能性基因表达水平降低和自

我更新能力减弱, 且分化倾向逐渐向中胚层调整。

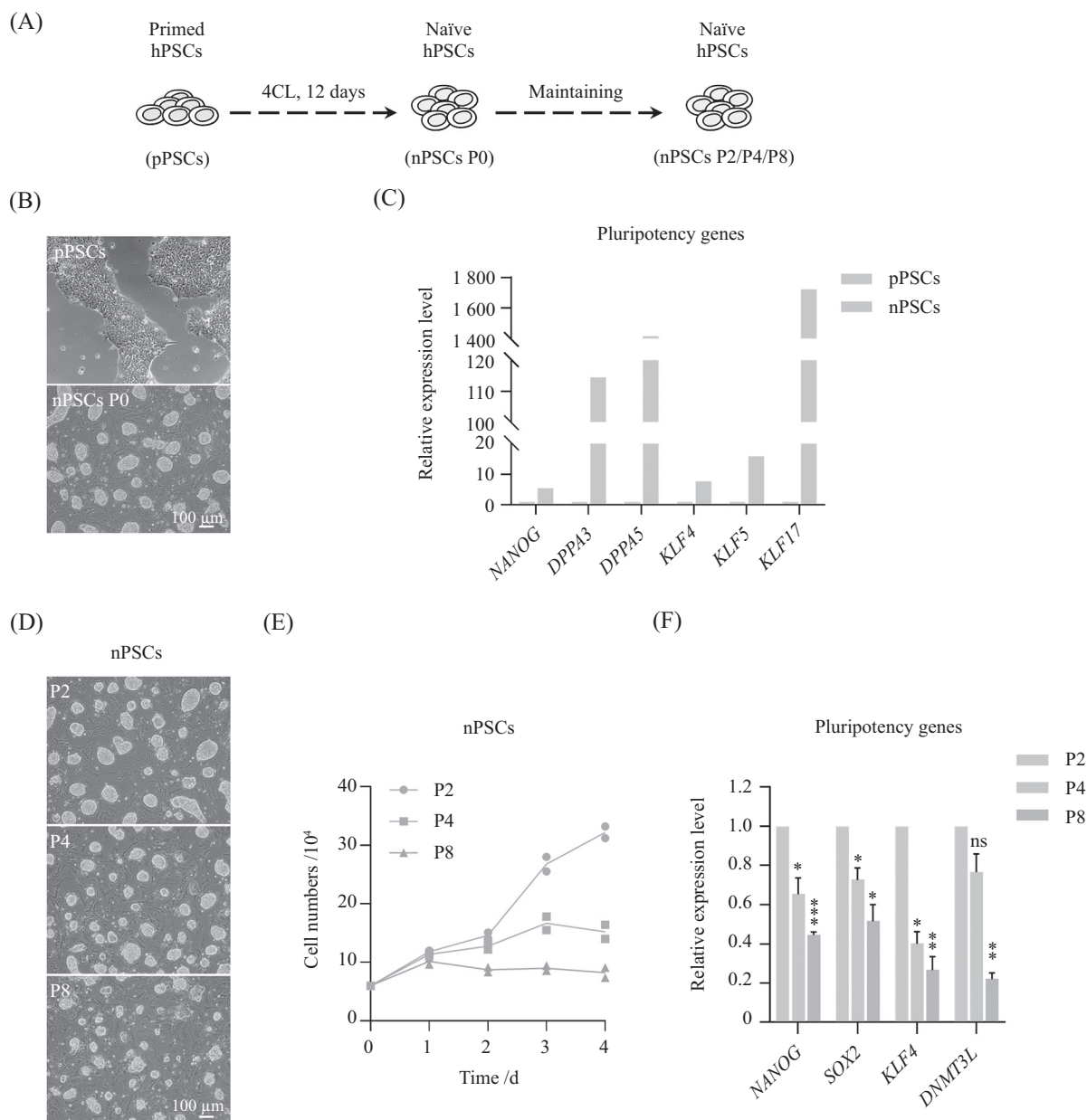
接下来的功能分析, 我们重点关注晚期 P8 相比于早期 P2 的变化特征。GO 富集分析显示, P8 4CL nPSCs 中上调的基因主要富集在 RNA 剪接、高尔基体运输以及核糖体生物合成等过程中(图 3A), 提示 P8 细胞在细胞生物学结构和功能(包括转录、翻译和转运等)水平上变得更加复杂, 与成体功能细胞相比, nPSCs 在细胞生物学结构和功能都更加简单, 提示 P8 细胞趋于分化状态; 下调的基因主要富集在膜电位调控、突触组装以及神经元发育调控等过程中(图 3B), 这与热图中显示的神经外胚层基因下调的结果一致(图 2F), 提示 4CL nPSCs 的神经分化潜能有所降低。KEGG 富集分析显示, P8 4CL nPSCs 中上调的基因主要富集在 p53 信号、自噬、Foxo 信号、细胞衰老和凋亡等通路中(图 3C), 这可能与长期传代过程中出现细胞应激(stress)增加、自我更新能力减弱、衰老和死亡增加等现象相关; 下调的基因主要富集在钙离子信号通路、MAPK 信号通路以及调控干细胞多能性的信号通路上(图 3D), 这与 GO 富集结果一致, 进一步支持长期传代过程中细胞多能性基因表达水平降低。

为了深入探究驱动这些变化的关键转录因子, 我们对上述差异表达基因进行了 motif 分析。与 P2 相比, P8 4CL nPSCs 中上调的基因主要富集出 ETS(E-twenty six)转录因子家族成员(表 2), 如 ELF4、ETV4 和 GABPA, 该家族成员在细胞分化和组织发育的调控中发挥重要作用^[30]。鉴于 ETV4 已被证实为感知细胞密度并调控 hESCs 分化的关键调控因子^[31], 我们推测, 在 4CL nPSCs 的连续传代过程中, 细胞克隆变小(图 1D), ETV4 可能作为关键调控因子, 通过抑制外胚层相关基因的表达, 影响 nPSCs 的增殖与分化平衡。下调的基因主要富集到 FOX(forkhead box)转录因子家族成员(表 3), 如 FOXA2、FOX M1 和 FOXA1, 该家族成员与干细胞多能性的维持和重建密切相关^[32-33]。这些结果提示, 4CL nPSCs 长期传代过程中无法维持稳态可能源于 ETS 和 FOX 转录因子的失调。

以上分析表明, 4CL nPSCs 在长期传代过程中无法维持稳态, 且伴随转录组显著改变。这种变化体现在细胞结构和功能、增殖和凋亡、信号通路和分化潜能等诸多层面, 可能源于信号通路以及 ETS 和 FOX 转录因子的失调。

2.3 添加 α KG 降低 4CL naïve hPSCs 的稳定性

为了促进 4CL nPSCs 的稳态维持, 我们试图从调



A: 4CL nPSCs的诱导和传代示意图; B: pPSCs和nPSCs的细胞形态; C: RT-qPCR检测pPSCs到nPSCs多能性基因表达水平的变化; D~F: 不同代数4CL nPSCs的细胞形态、生长曲线和多能性基因表达水平的变化。^{ns} $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与P2相比。

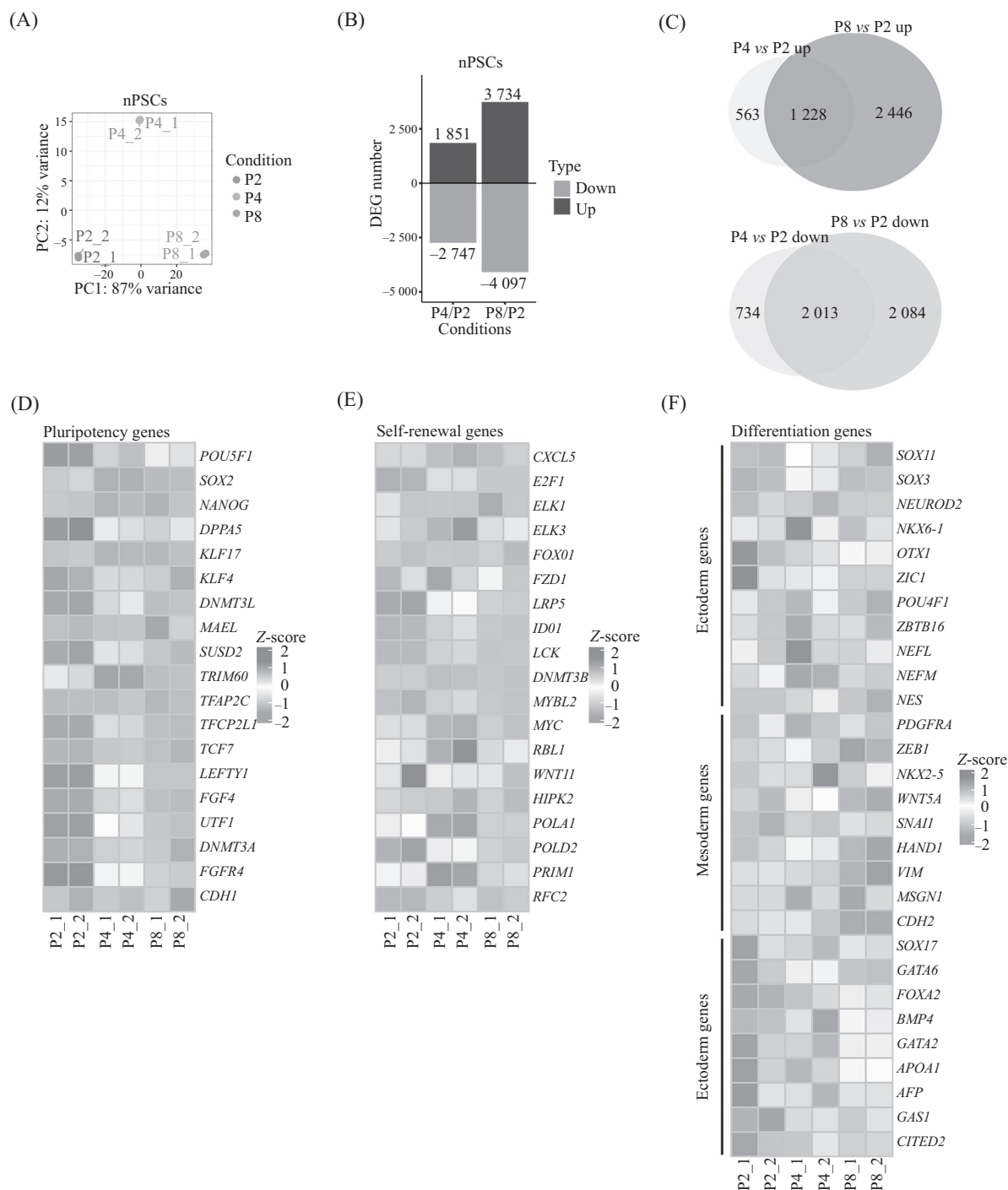
A: schematic diagram of the induction and passing of 4CL nPSCs; B: cellular morphology of pPSCs and nPSCs; C: RT-qPCR analysis of pluripotency gene expression levels changes from pPSCs to nPSCs; D-F: changes in cell morphology, growth curve and pluripotency gene expression levels of 4CL nPSCs at different passages. ^{ns} $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with P2.

图1 4CL nPSCs在长期传代过程中无法稳定维持

Fig.1 4CL nPSCs failed to maintain stability during long-term passing

控基因表达的代谢物入手^[34]。考虑到4CL培养基中的关键成分TSA和DZNep分别与组蛋白乙酰化和甲基化有关,我们推测,通过干预乙酰辅酶A和S腺苷甲硫氨酸产生的作用可能有限。基于以往在小鼠naïve ESCs中的研究结果, α KG有利于mESCs的自我更新和多能性维持^[22-25],我们推测 α KG有可能改善4CL nPSCs的自我更新、提高naïve多能性基因的表达水

平,从而有效克服4CL nPSCs在长期传代过程中稳定性降低等问题。通过添加两种剂量(低浓度2 mmol/L和高浓度4 mmol/L) α KG处理4CL nPSCs并进行连续传代(短期P4和长期P8)(图4A),我们发现:短期 α KG处理后,细胞克隆变得扁平(图4B),细胞的自我更新能力下降(图4C),但多能性基因表达水平未发生显著改变(图4D);长期 α KG处理后,细胞克隆同样变得扁



A: 不同代数4CL nPSCs的PCA结果; B、C: 不同代数4CL nPSCs差异基因数目和差异基因重叠分析; D~F: 不同代数4CL nPSCs多能性基因、自我更新相关基因以及三胚层分化基因表达水平的热图结果。

A: PCA results of 4CL nPSCs at different passages; B,C: number of differentially expressed genes and overlap analysis of differentially expressed genes in 4CL nPSCs at different passages; D-F: heatmaps of pluripotency genes, self-renewal related genes, and three-germ layer differentiation genes of 4CL nPSCs at different passages.

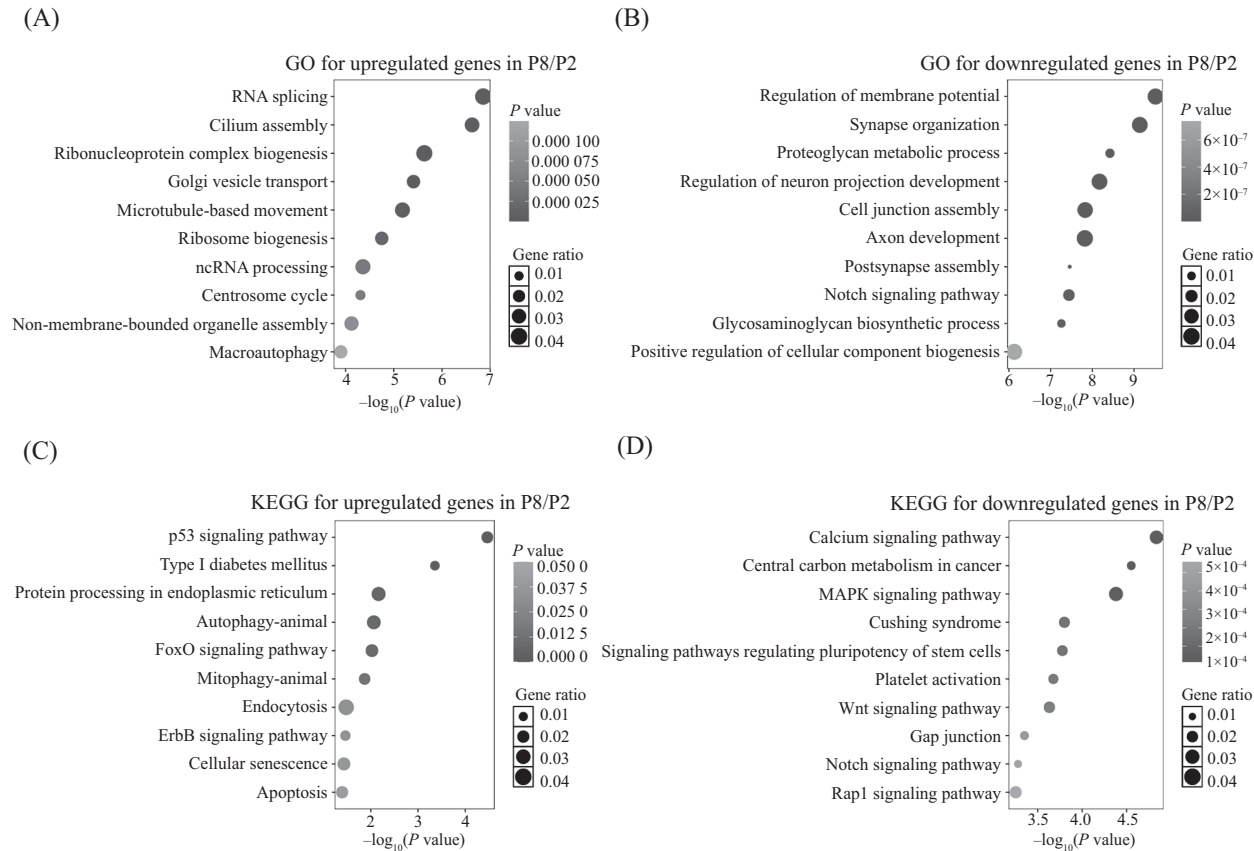
图2 转录组分析表明4CL nPSCs长期传代后稳定性降低

Fig.2 Transcriptome analysis revealed reduced stability of 4CL nPSCs after long-term passaging

平(图4E), 但细胞的自我更新能力提高(图4F), 多能性基因的表达显著下调(图4G)。以上结果初步表明, 4CL nPSCs在长期传代过程中的稳态水平降低并没

能被添加的 α KG所阻止, 在形态和多能性基因表达等层面的变化反而会被进一步加剧。

为了进一步阐明 α KG无法促进4CL nPSCs稳态



A~D: 长期传代后4CL nPSCs差异基因的GO富集分析(A、B)和KEGG富集分析(C、D)。
A-D: GO enrichment analysis (A, B) and KEGG enrichment analysis (C, D) of differentially expressed genes in 4CL nPSCs after long-term passing.

图3 4CL nPSCs长期传代后差异表达基因的功能富集分析

Fig.3 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes after long-term passing of 4CL nPSCs

表2 长期传代后nPSCs上调基因富集的motifs

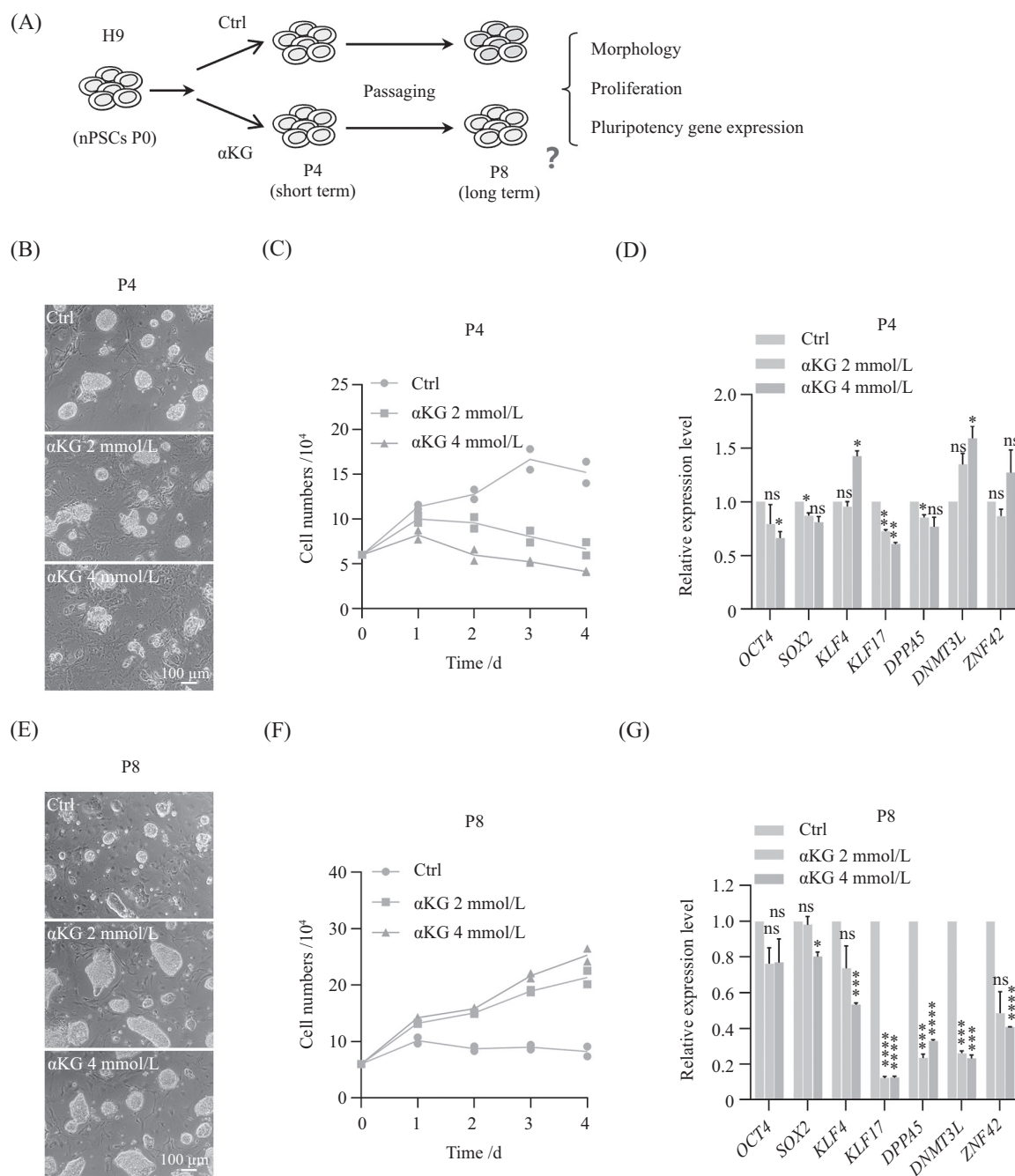
Table 2 Motifs enriched in genes upregulated in nPSCs after long-term passing

P8/P2上调 P8/P2 up	已知motifs Known motifs	P值 P value	靶标百分比 % of targets
ELF4		1×10^{-10}	36.54%
ETV4		1×10^{-10}	45.85%
GABPA		1×10^{-9}	37.12%
ELK4		1×10^{-9}	36.42%

表3 长期传代后nPSCs下调基因富集的motifs

Table 3 Motifs enriched in genes downregulated in nPSCs after long-term passing

P8/P2下调 P8/P2 down	已知motifs Known motifs	P值 P value	靶标百分比 % of targets
FOXA2		1×10^{-4}	7.72%
TATA-Box		1×10^{-2}	17.99%
HOXA9		1×10^{-2}	29.58%
FOXM1		1×10^{-2}	8.29%
FOXA1		1×10^{-2}	7.51%



A: 检测 α KG处理对4CL nPSCs稳定性影响的示意图; B-D: 短期 α KG处理后, nPSCs的细胞形态、生长曲线和多能性基因表达水平的变化; E-G: 长期 α KG处理后, nPSCs的细胞形态、生长曲线和多能性基因表达水平的变化。ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与Ctrl组相比。

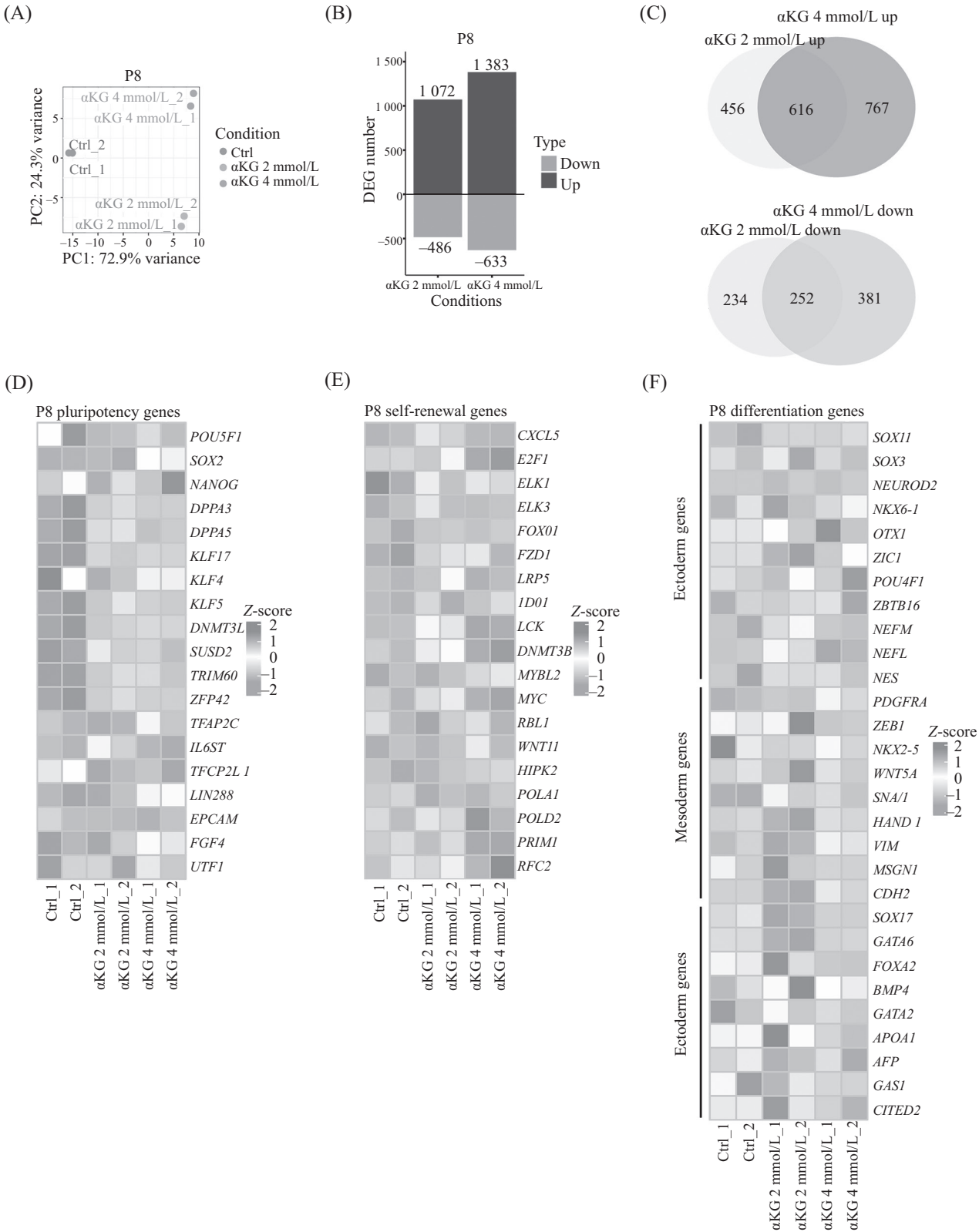
A: schematic diagram of the effects of α KG treatment on the stability of 4CL nPSCs; B-D: the effects of short-term α KG treatment on cell morphology, growth curve, and pluripotency gene expression levels in nPSCs; E-G: the effects of long-term α KG treatment on cell morphology, growth curve, and pluripotency gene expression levels in nPSCs. ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with Ctrl group.

图4 α KG降低4CL nPSCs的稳定性

Fig.4 α KG impaired the stability of 4CL nPSCs

维持的机制,我们对 α KG长期处理后的4CL nPSCs进行了转录组测序分析。首先,PCA分析显示,在 α KG低浓度条件下转录组已经明显改变,高浓度带来的进一步改变相对有限(图5A)。DEGs的数量以及在两个浓度下的DEGs重叠比较进一步体现了这一趋

势(图5B和图5C)。多能性基因表达的热图显示,两个浓度 α KG的长期处理均显著降低了这些基因的表达水平(图5D),与RT-qPCR结果一致,表明 α KG可能促进细胞分化(图4G)。自我更新相关基因的热图显示,两个浓度 α KG的长期处理均提高了细胞增殖相



A: 长期 α KG处理后nPSCs的PCA结果; B、C: 长期 α KG处理后nPSCs差异基因数目和差异基因重叠分析; D-F: 长期 α KG处理后nPSCs多能性基因、自我更新相关基因以及三胚层分化基因表达水平的热图结果。

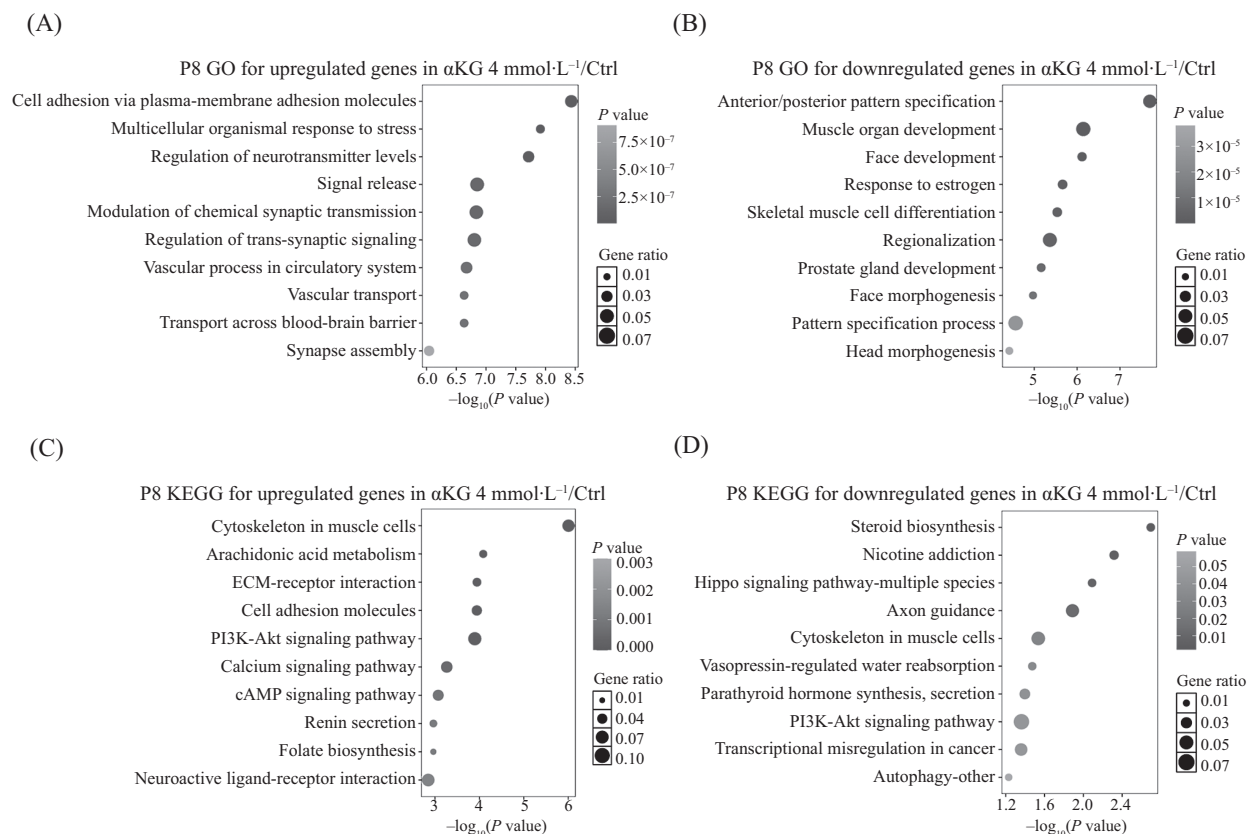
A: PCA results of nPSCs after long-term α KG treatment; B,C: number of differentially expressed genes and overlap analysis of differentially expressed genes in nPSCs after long-term α KG treatment; D-F: heatmap of pluripotency genes, self-renewal related genes, and three-germ layer differentiation genes in nPSCs after long-term α KG treatment.

图5 长期 α KG处理降低4CL nPSCs多能性
Fig.5 Long-term α KG treatment reduced the pluripotency of 4CL nPSCs

关基因的表达水平(图5E),这与生长曲线分析结果相符(图4F),显示了 α KG对细胞增殖的积极作用。三胚层相关基因的分析显示,两个浓度 α KG的长期处理均增强了外胚层基因的表达,且低浓度长期处理还促进了中胚层和内胚层基因的表达(图5F),提示 α KG可能具有诱导细胞向不同胚层分化的潜力,且这种潜力可能受到浓度的影响。

接下来,我们集中对高浓度 α KG条件下变化的基因进行功能分析。GO分析表明, α KG上调的基因主要富集在细胞黏着、神经递质调节、信号释放和

突触传递等过程中(图6A),下调基因主要富集在与发育和分化相关的各种过程(图6B)。KEGG富集结果显示,上调基因主要与细胞骨架、细胞黏着和细胞外基质等通路相关(图6C),下调基因主要与类固醇合成以及Hippo信号通路等有关(图6D)。基于以上功能分析, α KG主要激活细胞黏着同时改变细胞的分化潜能。在motif分析中,我们发现,上调的基因一定程度上富集出与分化相关的NKX3-2/BAPX1以及GATA家族因子(表4),这些较弱的特征在一定程度上能够解释 α KG加速4CL nPSCs分化的趋势。下调的



A~D: 长期 α KG处理后nPSCs差异基因的GO富集分析(A、B)和KEGG富集分析(C、D)。

A~D: GO enrichment analysis (A, B) and KEGG enrichment analysis (C, D) of differentially expressed genes in nPSCs after long-term α KG treatment.

图6 长期 α KG处理后差异表达基因的功能富集分析

Fig.6 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes after long-term α KG treatment

表4 长期 α KG处理后nPSCs上调基因富集的motifs

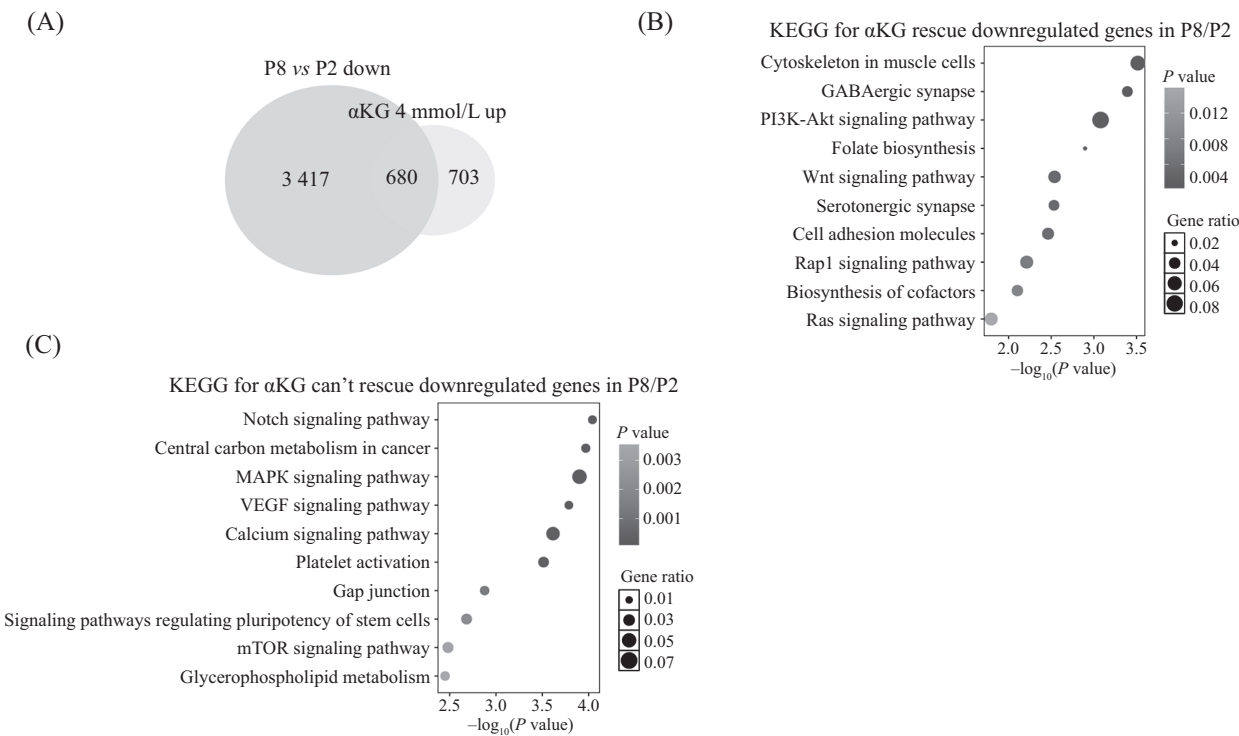
Table 4 Motifs enriched in genes upregulated in nPSCs after long-term α KG treatment

P8 α KG 4 mmol·L ⁻¹ /Ctrl上调	已知motifs	P值	靶标百分比
P8 α KG 4 mmol·L ⁻¹ /Ctrl up	Known motifs	P value	% of targets
BAPX1		1×10^{-3}	32.20%
ZNF263		1×10^{-3}	52.17%
GATA3		1×10^{-2}	17.76%
GATA6		1×10^{-2}	11.44%

表5 长期 α KG处理后nPSCs下调基因富集的motifs

Table 5 Motifs enriched in genes downregulated in nPSCs after long-term α KG treatment

P8 α KG 4 mmol·L ⁻¹ /Ctrl下调	已知motifs	P值	靶标百分比
P8 α KG 4 mmol·L ⁻¹ /Ctrl down	Known motifs	P value	% of targets
DUX4		1×10^{-6}	3.19%
TATA-Box		1×10^{-3}	25.89%
DUXBL		1×10^{-3}	2.84%
FOXA1		1×10^{-2}	16.13%
FOXM1		1×10^{-2}	14.36%



A: 长期 α KG处理上调基因与4CL nPSCs长期传代下调基因的重叠分析; B、C: α KG能够回复和无法回复基因的KEGG富集分析。

A: overlap analysis of upregulated genes from long-term α KG treatment and downregulated genes from long-term passaging of 4CL nPSCs; B,C: KEGG enrichment analysis of genes that can and cannot be rescued by α KG.

图7 α KG无法逆转4CL nPSCs长期传代后多能性基因表达的下

Fig.7 α KG couldnot rescue the decline in pluripotency gene expression in 4CL nPSCs after long-term passaging

基因主要富集出DUX和FOX家族因子(表5)。鉴于DUX是全能性细胞的关键转录因子,这一结果提示 α KG可能抑制全能性的诱导。

以上结果说明,添加 α KG并没有像在小鼠体系中那样促进多能性维持,反而加速了长期传代过程中4CL nPSCs稳态下降的趋势。

2.4 α KG无法逆转4CL naïve hPSCs长期传代多能性相关基因水平降低

为了进一步探究 α KG无法促进4CL nPSCs长期稳态维持的原因,我们对长期 α KG处理后上调的基

因与4CL nPSCs长期传代后下调的基因进行了重叠分析。结果显示,在4CL nPSCs长期传代后下调的4 097个基因中,仅有680个(约16.6%)基因在 α KG处理后得以回复,剩余3 417个(约83.4%)基因则未能回复(图7A)。KEGG富集分析表明, α KG处理后回复的基因主要与细胞增殖相关,包括PI3K-Akt、Wnt、Rap1以及Ras信号通路,这与长期 α KG处理后细胞增殖加快的现象相对应(图7B)。未回复的基因则主要富集在Notch信号通路、MAPK信号通路以及调控干细胞多能性的信号通路上(图7C),进一步支持

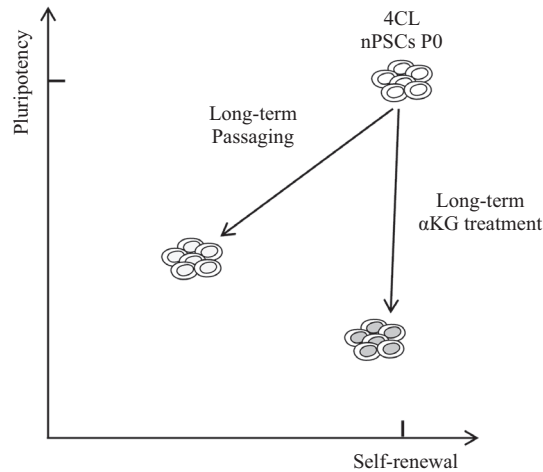


图8 长期传代和 α KG处理降低4CL nPSCs稳定性示意图

Fig.8 Schematic diagram of long-term passing and α KG treatment reduced the stability of 4CL nPSCs

α KG不能逆转4CL nPSCs长期传代后多能性基因表达水平降低的结论。

这些结果进一步证实,虽然长期 α KG处理对4CL nPSCs的自我更新有一定的促进作用,但却无法阻止其在长期传代过程中多能性基因表达水平的降低。

3 讨论

本研究在探讨4CL nPSCs的长期传代稳定性时取得了两个发现。首先,我们发现4CL nPSCs在长期传代中稳态丧失伴随显著的转录组改变。我们的分析提示,p53等信号通路的激活以及ETS和FOX家族转录因子的失调可能介导4CL nPSCs稳态维持的抑制。我们进一步添加 α KG处理发现,与小鼠naïve ESCs不同, α KG无法阻止4CL nPSCs的稳态丧失,甚至进一步加剧了这一过程(图8)。

我们的分析显示,4CL nPSCs在长期传代中自我更新能力降低可能是由于p53信号通路的激活,多能性基因表达下调我们推测可能是由于ETS转录因子家族成员的激活促进了细胞分化,而FOX家族转录因子则可能通过影响多种信号通路辅助调节长期传代过程中的细胞代谢、细胞周期、凋亡和衰老。 α KG在4CL nPSCs长期传代中的效果与小鼠体系存在显著不同,一方面可能是因为物种间的差异,另一方面可能与培养条件的不同有关。值得注意的是,4CL培养体系下的细胞处于低氧条件,这可能影响了依赖 α KG的表观遗传双加氧酶的活性,从而显著改变了 α KG在4CL nPSCs中的作用。最近在其他人nPSCs体系中的

研究也发现,添加 α KG会引发nPSCs向滋养层干细胞方向的分化,同时对组蛋白甲基化并没有产生显著影响,而是降低H3K27的乙酰化水平^[35]。

本研究关于 α KG降低4CL nPSCs长期稳态维持的发现,为优化nPSCs体外培养条件及深入探索nPSCs代谢调控机制提供了新的视角与启示。采取抑制RNA剪接、p53信号通路以及ETS转录因子活性等策略,可能有助于增强4CL nPSCs在长期传代过程中的稳定性。此外,尝试通过减少培养基中谷氨酰胺等 α KG前体的含量,以降低 α KG水平,可能有助于恢复并提升多能性基因的表达水平。综上所述,解决nPSCs长期稳态维持的难题,仍需后续深入研究与广泛验证。

参考文献 (References)

- [1] THOMSON J A, ITSKOVITZ E J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [2] TAKAHASHI K, TANABE K, YAMANAKA S, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72.
- [3] MANOR Y S, MASSARWA R, HANNA J H. Establishing the human naïve pluripotent state [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 34: 35-45.
- [4] YANG Y, ZHANG X, YI L, et al. Naïve induced pluripotent stem cells generated from beta-thalassemia fibroblasts allow efficient gene correction with CRISPR/Cas9 [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(1): 8-19.
- [5] LEE J H, LARONDE S, COLLINS T J, et al. Lineage-specific differentiation is influenced by state of human pluripotency [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(1): 20-35.
- [6] GUO G, STIRPARO G G, STRAWBRIDGE S E, et al. Human naïve epiblast cells possess unrestricted lineage potential [J]. *Cell*

- Stem Cell, 2021, 28(6): 1040-56, e6.
- [7] GAFNI O, WEINBERGER L, MANSOUR A A, et al. Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells [J]. Nature, 2013, 504(7479): 282-6.
- [8] 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.
- [9] GUO G, MEYENN V F, SANTOS F, et al. Naïve pluripotent stem cells derived directly from isolated cells of the human inner cell mass [J]. Stem Cell Rep, 2016, 6(4): 437-46.
- [10] THEUNISSEN T W, POWELL B E, WANG H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(4): 471-87.
- [11] MAZID M A, WARD C, ESTEBAN M A, et al. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage [J]. Nature, 2022, 605(7909): 315-24.
- [12] LIU X, NEFZGER C M, ROSSELLO F J, et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naïve pluripotency generated by reprogramming [J]. Nat Methods, 2017, 14(11): 1055-62.
- [13] PASTOR W A, CHEN D, LIU W, et al. Naïve human pluripotent cells feature a methylation landscape devoid of blastocyst or germline memory [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(3): 323-9.
- [14] CAO J, LI W, LI J, et al. Live birth of chimeric monkey with high contribution from embryonic stem cells [J]. Cell, 2023, 186(23): 4996-5014.
- [15] WANG J, XIE W, LI N, et al. Generation of a humanized mesonephros in pigs from induced pluripotent stem cells via embryo complementation [J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(9): 1235-45, e6.
- [16] CHIN R M, FU X, PAI M Y, et al. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR [J]. Nature, 2014, 510(7505): 397-401.
- [17] BAKSH S C, FINLEY L W S. Metabolic coordination of cell fate by α -ketoglutarate dependent dioxygenases [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(1): 24-36.
- [18] TRAN K A, DILLINGHAM C M, SRIDHARAN R. The role of α -ketoglutarate dependent proteins in pluripotency acquisition and maintenance [J]. J Biol Chem, 2019, 294(14): 5408-19.
- [19] LIU P S, WANG H, LI X, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming [J]. Nat Immunol, 2017, 18(9): 985-94.
- [20] SEKITA Y, SUGIURA Y, MATSUMOTO A, et al. AKT signaling is associated with epigenetic reprogramming via the upregulation of TET and its cofactor, α -ketoglutarate during iPSC generation [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 510.
- [21] BETTO R M, DIAMANTE L, PERRERA V, et al. Metabolic control of DNA methylation in naïve pluripotent cells [J]. Nat Genet, 2021, 53(2): 215-29.
- [22] CAREY B W, FINLEY L W, CROSS J R, et al. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells [J]. Nature, 2015, 518(7539): 413-6.
- [23] HWANG I Y, KWAK S, LEE S, et al. Psat1-dependent fluctuations in α -ketoglutarate affect the timing of ESC differentiation [J]. Cell Metab, 2016, 24(3): 494-501.
- [24] XU Y, ZHANG Y, GUO L, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates the pluripotency of embryonic stem cells [J]. Science, 2020, 369(6502): 397-403.
- [25] TISCHLER J, GRUHN W H, REID J. Metabolic regulation of pluripotency and germ cell fate through α -ketoglutarate [J]. EMBO J, 2019, 38(1): e99518.
- [26] XING M, WANG N, ZENG H, et al. α -ketoglutarate promotes the specialization of primordial germ cell-like cells through regulating epigenetic reprogramming [J]. J Biomed Res, 2020, 35(1): 36-46.
- [27] TESLAA T, CHAIKOVSKY A C, LIPCHINA I, et al. α -ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells [J]. Cell Metab, 2016, 24(3): 485-93.
- [28] CIESLAR P A, AHRENS T D, CAGLAYAN S, et al. DNMT3B deficiency alters mitochondrial biogenesis and α -ketoglutarate levels in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2020, 38(11): 1409-22.
- [29] BAYERL J, AYYASH M, HANNA J H, et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naïve pluripotency induction [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(9): 1549-65, e12.
- [30] TAVEIRNE S, WAHLEN S, VAN L W, et al. The transcription factor ETS1 is an important regulator of human NK cell development and terminal differentiation [J]. Blood, 2020, 136(3): 288-98.
- [31] YANG S, GOLKARAM M, JANG J, et al. ETV4 is a mechanical transducer linking cell crowding dynamics to lineage specification [J]. Nat Cell Biol, 2024, 26(6): 903-16.
- [32] FU M, CHEN H, CAI Z, et al. Forkhead box family transcription factors as versatile regulators for cellular reprogramming to pluripotency [J]. Cell Regen, 2021, 10(1): 17.
- [33] ZHANG X, YALCIN S, LEE D F, et al. FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(9): 1092-9.
- [34] JACKSON B T, FINLEY L W S. Metabolic regulation of the hallmarks of stem cell biology [J]. Cell Stem Cell, 2024, 31(2): 161-80.
- [35] JAN Z, KARLIEN V N, ANNE W, et al. Metabolic rewiring underpins human trophoblast induction [J]. bioRxiv, 2024, Preprint, available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3575549/v1>.