

综述

小鼠滋养外胚层的分化形成及滋养层干细胞的研究进展

顾兆雷^{1#} 姜年丰^{2#} 张建^{1,2} 郭威^{1*} 高亚可^{1*}⁽¹⁾云南大学生命科学学院, 生命科学中心, 昆明 650500; ⁽²⁾云南大学实验动物中心, 昆明 650500)

摘要 在哺乳动物中, 滋养外胚层介导胚胎的植入和胎盘的形成, 而成熟的胎盘对于保障母体和胎儿之间的营养和气体交换、指导血管重塑以及保护胎儿免受母体免疫系统的排斥等生物学过程至关重要。虽然滋养外胚层细胞不直接参与胎儿的形成, 但它们对于维持胎儿的正常发育是必不可少的部分。此外, 相较于小鼠胚胎干细胞, 滋养层干细胞的研究相对较少。滋养层干细胞是一种用以研究胚胎滋养外胚层谱系分化以及重构类胚胎的重要体外模型, 同时对于揭示人类胚胎着床失败和早期流产等疾病的分子机制具有重要的指导意义。基于此, 该综述系统性地归纳了小鼠滋养外胚层谱系的分化和滋养层干细胞研究的相关进展。此外, 还提出了未来滋养层干细胞研究中值得探讨的问题, 旨在为阐明滋养层干细胞功能和实现重构类胚胎的有效植入提供新的思路。

关键词 HIPPO信号通路; 细胞极性; 滋养外胚层; 内细胞团; 滋养层干细胞

Advancement on the Differentiation and Formation of Mouse Trophectoderm Lineage and Trophoblast Stem Cells

GU Zhaolei^{1#}, JIANG Nianfeng^{2#}, ZHANG Jian^{1,2}, GUO Wei^{1*}, GAO Yake^{1*}⁽¹⁾Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China;⁽²⁾Center for Animal Research and Resources, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract In mammals, the trophoctoderm plays a crucial role in mediating embryo implantation and placenta formation, which are vital for facilitating nutrient and gas exchanges between the mother and fetus, guiding vascular remodeling, and protecting the fetus from maternal immune rejection. While trophoctoderm cells do not directly contribute to embryonic development, they are indispensable for maintaining normal fetal growth. Moreover, research on trophoblast stem cells lags significantly compared to mouse embryonic stem cells. Trophoblast stem cells are an important *in vitro* model for studying embryonic lineage differentiation and reconstructing blastoids. They also hold significant implications in unraveling the molecular mechanisms underlying human embryo implantation failure and early abortion. Based on these, this review systematically summarizes advancements in trophoctoderm differentiation and

收稿日期: 2024-11-15 接受日期: 2025-01-17

云南省科技领军人才项目(批准号: 202005AB160006)和国家自然科学基金(批准号: 22306154)资助的课题

#共同第一作者

*通信作者。Tel: 0871-65932294, E-mail: fsguowei@ynu.edu.cn; gaoyorke@sina.com

Received: November 15, 2024

Accepted: January 17, 2025

This work was supported by the Science and Technology Leading Talent Project, Yunnan Province (Grant No.202005AB160006) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.22306154)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-871-65932294, E-mail: fsguowei@ynu.edu.cn; gaoyorke@sina.com

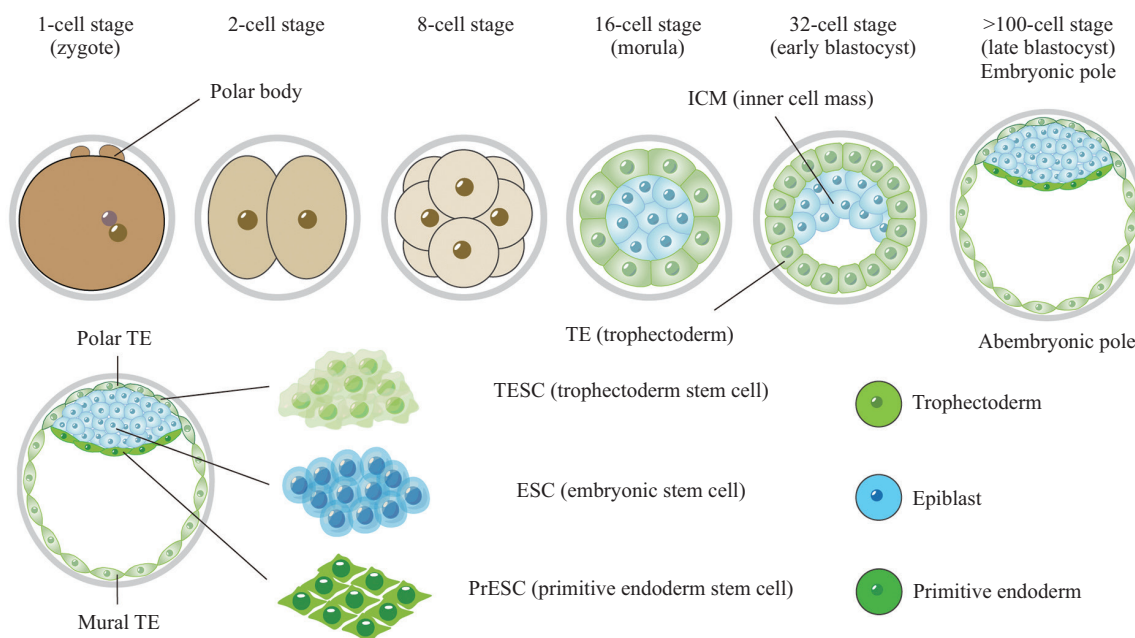
trophoblast stem cell research in mice. Moreover, this review proposes future directions of trophoblast stem cells to provide novel insights into enhancing their functionality and achieving effective implantation of reconstructed blastoids.

Keywords HIPPO signalling pathway; cell polarity; trophoblast; inner cell mass; trophoblast stem cell

小鼠受精卵在经历了数轮细胞分裂后形成了包含三种不同细胞谱系[包括上胚层(epiblast, EPI)、滋养外胚层(trophoblast, TE)和原始内胚层(primitive endoderm, PrE)]的植入前胚胎, 三种细胞谱系的正确分化是保障胚胎植入和正常发育的前提^[1-3]。小鼠植入前胚胎的发育过程主要包含三个阶段(图1): 谱系分化准备阶段, 是指从受精卵到8细胞早期阶段(未发生致密化), 此时的胚胎卵裂球仍具有分化为任何细胞谱系的发育潜能^[2]; 第一次谱系分化阶段, 是指从8细胞后期到桑葚胚阶段, 此时的胚胎发生了明显的致密化, 卵裂球之间无明显的界限, 并开始分化出外部的滋养外胚层和内部的内细胞团(inner cell mass, ICM)^[3-6]; 第二次谱系分化阶段,

是指从早期囊胚(E3.5)到植入期囊胚(E4.5)阶段, 此时胚胎产生了中空的充满液体的囊胚腔, 内细胞团进一步分化为上胚层和原始内胚层^[7-8]。此外, 基于植入前胚胎的三个细胞谱系, 目前已分别构建了多种胚胎来源的干细胞系, 为深入了解哺乳动物早期胚胎发育和谱系分化调控机制提供了有效的体外模型。这些干细胞系包括来源于ICM的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)^[9-11], 来源于TE的滋养外胚层干细胞(trophoblast stem cell, TESC)^[12-13]以及来源于PrE的原始内胚层干细胞(primitive endoderm stem cell, PrESC)^[14-15]。

在哺乳动物中, 成熟的胎盘不仅介导母体和胎儿之间的营养和气体交换, 还会分泌激素和细胞因



不同颜色表示胚胎细胞逐渐差异化分离, 并最终分化为植入前胚胎的三种细胞谱系。从受精卵到8细胞早期阶段, 卵裂球可以随机分化为三种细胞谱系。随后胚胎卵裂球发生极化并启动谱系分化, 形成致密的桑葚胚和中空的囊胚。在囊胚阶段, ICM所在的一端为胚胎极, 对应极性滋养外胚层; 远离ICM的一端为非胚胎极, 对应壁性滋养外胚层。图中黄绿色细胞为滋养外胚层谱系, 对应滋养外胚层干细胞; 蓝色细胞为上胚层谱系, 对应胚胎干细胞; 绿色细胞为原始内胚层谱系, 对应原始内胚层干细胞。

The different colors indicate the gradual differentiation of the embryonic cells into the three lineages of the preimplantation embryo. From the zygote to the early 8-cell stage, the blastomere initiates polarization and lineage differentiation, followed by morula and blastocyst formation. ICM is located at the embryonic pole at the blastocyst stage, corresponding to polar trophoblast. The end away from the ICM is the abembryonic pole, corresponding to the mural trophoblast. Chartreuse cells are trophoblast, corresponding to trophoblast stem cells. Blue cells are epiblast, corresponding to embryonic stem cells. Green cells are primitive endoderm, corresponding to primitive endoderm stem cells.

图1 小鼠植入前胚胎的谱系分化过程 and 对应谱系的干细胞

Fig.1 Lineage differentiation of mouse preimplantation embryos and stem cells of the corresponding lineage

子进入母体血液,指导血管的永久重塑,优化营养交换,并保护胎儿免受母体免疫系统的排斥^[16-17]。此外,滋养层干细胞(trophoblast stem cell, TSC)是一种用以研究早期胚胎谱系分化以及重构类囊胚的重要体外模型,同时对于揭示人类胚胎着床失败和早期流产等疾病的分子机制具有重要的指导意义^[18-20]。与ESC的研究相比,滋养层干细胞的研究相对较少。虽然目前已报道的TSC和TESC都具有分化为成熟滋养层细胞的发育潜能^[12-13],但两者对应的发育时期较晚(围着床期),且其是否具有早期滋养外胚层细胞的发育潜能尚需进一步验证。在本综述中,我们将主要探讨小鼠滋养外胚层谱系的分化、滋养层干细胞的自我更新和分化潜能,以及重编程来源的滋养层干细胞的分子机制。

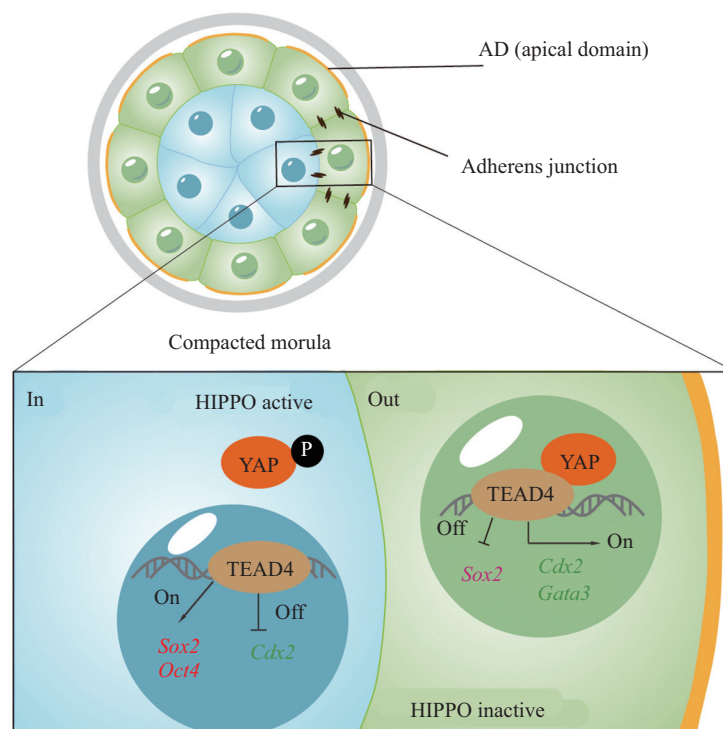
1 胚胎滋养外胚层谱系的分化

1.1 极性产生和致密化

小鼠胚胎进入8细胞阶段后出现了两个伴随发育事件:极性产生和致密化,这些发育事件可能是启动滋养外胚层谱系分化的基础。从8细胞阶段开始,胚胎的每个卵裂球会沿顶端-基底轴极化,这一过程涉及膜蛋白和细胞骨架成分在顶端和基底外侧结构域的不均匀分布,顶端域(apical domain, AD)的建立(图2),细胞骨架肌动蛋白和顶端肌动蛋白的收缩等^[21-22]。研究表明,AD主要由非典型蛋白激酶C(atypical protein kinase C, aPKC)、激活的埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白(ezrin-radixin-moesin, ERM)以及微绒毛等组成^[21,23-24]。顶端肌动蛋白的定位被证明是AD形成的先决条件,且细胞间接触可以将肌动蛋白导向至细胞顶端中心^[25]。此外,顶端肌动蛋白的极化取决于磷脂酶C(phospholipase C)介导的蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的激活^[25-26],而RhoA和CDC42也是细胞骨架蛋白和肌动蛋白极化所必需的^[25]。值得注意的是,AD的形成不仅决定了细胞的极性,可能还参与调控细胞的分裂方式。有研究显示,AD的大小与子细胞的极性之间具有相关性,即具有较大AD的细胞更有可能定向分裂,从而产生两个极性的子细胞^[27]。此外,纺锤体实时成像也观察到了类似现象:有丝分裂纺锤体通常与顶基轴对齐,垂直于AD^[21]。这表明AD影响了分裂平面,尽管尚不清楚AD如何精确地使纺锤体定向排布。同时,这也意味着AD的存在确

保了其在子代细胞中的差异化分布,使得胚胎形成一种细胞继承AD,而另一细胞不能继承AD的分裂模式。然而,由于并不是在16细胞阶段的所有外部细胞上都能观察到AD形成,因此外部细胞的分裂并不是直接切割AD的过程,AD很可能是在分裂过程中以膜结合的形式遗传的^[28]。此外,有研究显示,AD实际上在8细胞到16细胞分裂前就已解体,并在16细胞阶段重新组装^[22]。无论卵裂面是受AD调控还是随机发生,胚胎中内/外部和极性/非极性细胞的数量都有一定程度的可变性^[28],解决这个问题可能需要对内源性标记的AD组分进行实时成像追踪。

在8细胞阶段后期,卵裂球会增加相互间的接触面积,使其表面变平,形成一个上皮样结构并压缩成一个细胞边缘难以区分的球体,这个过程也被称为致密化^[6]。伴随着致密化的过程,胚胎开始出现内、外部卵裂球的定位,以及逐步显示出细胞命运决定标记基因的差异性表达^[29]。研究表明,致密化胚胎的基底外侧细胞间接触主要依靠黏附连接,这种连接主要由跨膜的E-cadherin和细胞内的 α/β 连环蛋白(α/β -catenin)组成,前者以 Ca^{2+} 依赖的方式将相邻细胞连接在一起,后者与肌动蛋白相结合^[30]。黏附连接是胚胎致密化所必需的,因为缺乏E-cadherin或 β -catenin会使卵裂球松散接触而无法压实^[30-31]。此外,黏附连接可能是相邻卵裂球之间的锚固点,而顶端肌动蛋白产生的脉冲收缩是驱动致密化的主要动力^[32]。含有E-cadherin和肌动蛋白的可收缩丝状足可能延伸到邻近细胞的顶端表面,且这些丝状足仅在压紧过程中存在,因此被认为在将细胞拉到一起的过程中发挥作用^[32-33]。值得注意的是,有研究显示胚胎在压实过程中,细胞外表面的张力增加了两倍,而细胞之间接触界面的张力减少了1/3^[34]。利用上述力学模型,研究人员预测致密化的主要驱动因素可能是细胞表面张力的增加,而非细胞间的黏附力^[29,34]。研究发现,在致密化的过程中,肌动蛋白在细胞表面聚集,同时从相邻细胞的接触界面中消失^[24,34]。黏附分子的作用可能不是直接产生作用力,而是将肌动蛋白从细胞的接触界面中清除,以便于细胞顶端的肌动蛋白产生收缩力^[34-35]。因此,细胞肌动蛋白的收缩力可能是胚胎致密化过程中最真实的动力来源,而黏附分子可能是参与触发收缩力增强的信号^[36]。此外,在致密化的过程中,黏附分子可



在外部细胞中, HIPPO信号通路被抑制, YAP进入核内并与转录激活因子TEAD4结合, 启动TE细胞谱系基因如*Cdx2*和*Gata3*的表达; 在内部细胞中, HIPPO信号通路被激活, 磷酸化的YAP被隔离到细胞质中, 启动ICM细胞谱系基因如*Oct4*和*Sox2*的表达。

In the outer cells, HIPPO signaling is inhibited, and YAP enters the nucleus and binds to the transcriptional activator TEAD4 to initiate the expression of TE lineage genes, such as *Cdx2* and *Gata3*. In inner cells, HIPPO signaling is activated, and phosphorylated YAP sequesters into the cytoplasm, initiating the expression of ICM lineage genes such as *Oct4* and *Sox2*.

图2 小鼠桑葚胚内、外细胞中HIPPO信号的差异性激活

Fig.2 Differential activation of HIPPO signaling in inner and outer cells of the mouse morula

能还通过细胞间的接触来传递收缩力, 但目前这一作用尚不清楚^[29]。

1.2 HIPPO信号的差异性激活

极化后的卵裂球会相对于胚胎中轴不对称分裂, 因此在16细胞阶段会产生极性不同的两个细胞种群: 外部细胞是极性的(polar), 外表面缺乏细胞接触并继承了AD; 而内部细胞是非极性的(apolar), 与周围的细胞存在接触。这种细胞极性模式是可能调节HIPPO信号通路活性的主要途径^[37-38]。研究表明, 细胞极性会抑制外部细胞的LATS激酶(large tumor suppressor kinase)活性, 而LATS激酶活性降低又有助于维持外部细胞的极性状态, 因为强制上调LATS激酶活性可以逆转细胞的极性状态, 并可将外部细胞迁移到内部^[3,39]。这一作用机制可能与细胞形状、细胞黏附、细胞收缩和皮质张力的差异有关^[3,6]。因此, 在外部细胞中, LATS激酶对转录辅助激活因子YAP的磷酸化作用受到抑制, YAP进入细胞核内; 而在内部细胞中, 磷酸化的YAP被隔离到细胞质中^[5,28](图2)。进一步地, 在外部细胞中, YAP入核后与转录

激活因子TEAD4结合, 启动TE细胞谱系基因如*Cdx2*和*Gata3*的表达^[5,40]。相反, 在内部细胞中, YAP不能与TEAD4结合, 则启动ICM细胞谱系基因(如*Oct4*和*Sox2*)的表达并抑制TE细胞谱系基因的表达(图2)^[5,40]。因此, 在桑葚胚阶段, 细胞的内、外部定位可能是ICM/TE细胞谱系分化的初始驱动因素^[41]。最近的实时动态成像研究直观地展示了这一过程, 在16~32细胞阶段胚胎中, 内部细胞显示出YAP的核外定位, 而外部极化的细胞显示出YAP的核内定位^[42]。

此外, RHO信号也参与调节细胞极化和YAP的细胞定位, 进而影响外部TE和内部ICM细胞谱系的分化^[43]。研究表明, 抑制RHO信号通路改变了LATS激酶活性并可阻断外部细胞中YAP的核内定位, 阻止TE标志物的表达^[37,44]。值得说明的是, 这种HIPPO信号的差异化效应是源于LATS激酶活性的调节, 还是由于YAP对细胞机械力(收缩/扩张)的直接反应, 仍有待确定。研究表明YAP可作为细胞机械力信号的直接转导器, 而内部细胞中LATS激酶的激活可能提供了一个额外的故障安全机制, 不仅使

YAP失活,而且可以通过磷酸化将其主动排除出细胞核^[2,37]。重要的是,在外部细胞中,核内的YAP与TEAD4结合是TE形成所必需的,是激活下游*Cdx2*和*Gata3*的关键因素^[4-5]。缺乏TEAD4的胚胎不能分化出TE,且不能维持TE特异性转录因子*Cdx2*的表达^[4]。此外,*Cdx2*表达的激活也会导致ICM特异性转录因子*Oct4*和*Nanog*的下调^[45]。相应地,过表达LATS1/2激酶会减少外部细胞中CDX2的表达,而抑制LATS1/2激酶的胚胎会在内细胞中表达CDX2,进而下调ICM特异性基因的表达^[46-47]。因此,胚胎内、外细胞差异化的HIPPO信号是TE和ICM细胞谱系分离的关键驱动因素(图2)。

1.3 壁性和极性滋养外胚层

在小鼠囊胚中后期,特化后的TE根据其ICM的接近程度明显分化为两种不同的亚型(图1),其中与ICM直接接触的部分为极性TE(polar trophectoderm, PTE);不与ICM直接接触并围绕囊胚腔的部分为壁性TE(mural trophectoderm, MTE)。小鼠胚胎植入时,E4.5晚期囊胚的MTE会附着于母体子宫内膜并诱导初级蜕膜反应^[48]。植入后,MTE细胞仅复制DNA而逐渐停止分裂,从而形成多倍体的滋养层巨细胞(trophoblast giant cell, TGC)^[49-50]。早期的TGC是具有高度侵袭性的细胞,通过分泌蛋白酶促进胚胎侵入周围的母体组织^[49]。在体外,去除Activin A/Nodal和FGF4会导致TSC特异性转录因子的下调,促使TSC最终分化为TGC,这也在一定程度上支持了体内FGF、Activin和Nodal信号的缺乏会导致MTE细胞停止增殖并分化为TGC的观点^[51-52]。不同于MTE,紧邻ICM的PTE细胞可以继续增殖,具有分化为胎盘所有终末滋养层细胞亚群的潜能^[2,53],同时PTE也是产生具有自我更新能力的滋养层干细胞的祖细胞^[12]。

虽然已经有大量的研究分析了植入后胚胎PTE和MTE的发育潜能,但对植入前这两个细胞谱系之间的差异知之甚少。有研究表明,在体内获取的晚期囊胚中,CDX2在MTE中的表达逐渐下调,而KRT18在MTE中的表达逐渐上调,这种表达变化可能受YAP/TEAD通路的调控^[13,50];而在来源于体外培养的晚期囊胚中未观察到CDX2的表达下调,表明某些内源性因子[如 β -雌二醇(β -estradiol)]会诱导MTE中CDX2的表达下调^[50]。晚期囊胚PTE和MTE细胞之间有数百个差异表达基因^[50,54],GO(Gene Ontology)分析发现,PTE细胞富集了与“有丝分裂细

胞周期”和“细胞分裂”等相关的信号通路,而MTE细胞则富集了与“脂质储存”、“膜组织”和“细胞死亡”等相关的信号通路^[50]。有研究表明,几种TS细胞富集的miRNAs(microRNAs),如miR-15b,能够诱导ES细胞转化为具有MTE表型的类滋养层细胞(trophoblast-like cell)^[55]。这些诱导来源的类MTE细胞高表达TGC的标志基因,且当它们被注射到植入前胚胎后只定位于MTE。此外,MTE包含更多的多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs),表明其吞噬作用增强^[56],这是胚胎植入过程中清除子宫内膜细胞碎片所必需的。囊胚暴露于FGF4中会导致MTE的吞噬功能下降,表明FGF信号也参与调控TE细胞的功能,而不仅仅是对TE细胞干性的维持^[56]。总之,这些研究展示了植入前胚胎TE细胞的异质性,并揭示了PTE和MTE功能的差异。

2 滋养层干细胞的自我更新和分化

TANAKA等^[12]在1998年首次从小鼠囊胚中获得了TSC,其在体外能够维持自我更新,并具有在体内、外分化为所有滋养层终末细胞的潜能(图3)。研究发现,TSC的自我更新能力是由来源于ICM的衍生因子维持的,而这种环境可以通过在培养体系中补充FGF4、Heparin以及小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)饲养层来重现,并能够维持TSC的多能性^[12,57]。从小鼠囊胚阶段开始,FGF4的表达仅限于ICM,而FGFR2却在TE细胞谱系特异性表达^[58]。此外,*Fgf4*或*Fgfr2*的纯合突变导致植入前胚胎死亡,这与ICM的发育缺陷相关^[59]。相反,用外源性FGF4处理胚外外胚层(extraembryonic ectoderm, ExE)可以维持滋养层祖细胞的增殖和未分化状态,这是衍生TSC所必需的^[12,60]。因此,FGF4-FGFR2通路参与了ICM和TE之间的相互作用,这些信号是维持体内TSC祖细胞增殖的关键,也是体外重现TSC自我更新能力的重要依据。此外,添加有FGF4、TGF- β 1和Activin A的条件培养基也可实现TSC的自我更新和多能性维持,进一步验证了FGF4、TGF- β 或Activin A是参与维持TSC自我更新的关键蛋白成分^[61-62]。当FGF4缺乏或MEF细胞撤除后,TSC会随机分化为多种滋养层细胞亚群,包括滋养层巨细胞(trophoblast giant cell, TGC)、壁层滋养层巨细胞(parietal TGC, P-TGC)、单核窦状滋养层巨细胞(sinusoidal TGC, S-TGC)、螺旋动脉关联

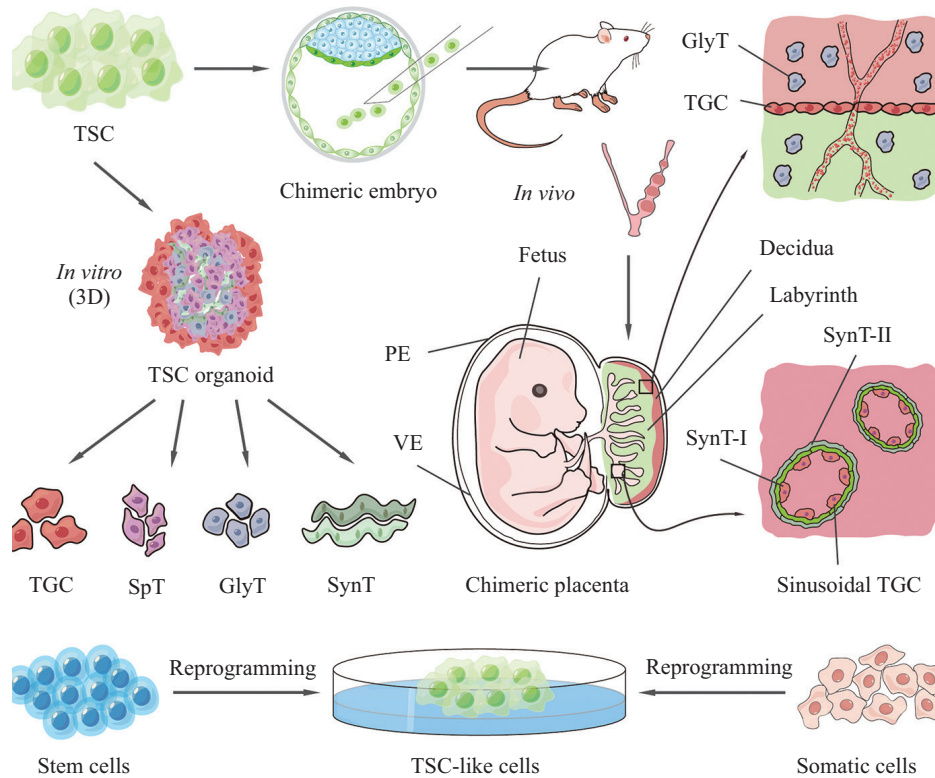


图3 滋养层干细胞的分化潜能及其重编程来源的示意图

Fig.3 Schematic diagram of the differentiation potential of TSC and their sources of reprogramming

滋养层巨细胞(spiral associated TGC, SpA-TGC)、管状滋养层巨细胞TGC(canal TGC, C-TGC)、海绵滋养层细胞(spongiotrophoblast)、I型合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast layer I, SynT-I)和II型合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast layer II, SynT-II)^[52,63]。目前,研究小鼠TSC发育潜能的主要体外模型是基于2D条件下的分化模型,该模型由于存在细胞空间性的差异而高度倾向于某些细胞谱系的分化。最近,MAO等^[64]报道了一种小鼠TSC的3D体外分化模型(图3),明确了小鼠滋养层类器官的建立、维持和分化的培养条件。在干性维持状态下的小鼠滋养层类器官含有TSC样细胞群,而分化后的类器官含有与体内E9.5~E14.5胎盘滋养层高度相似的各种滋养层细胞亚群^[64]。

虽然有多种培养条件可以支持TSC的自我更新,但由于血清成分的不明确以及不同批次血清成分的

波动等因素,给TSC相关研究的结果增加了不确定性。随后,KUBACZKA等^[65]开发了一种不需要添加血清且成分明确的培养基,支持在基质胶或合成基质上维持TSC的自我更新。研究表明,该培养体系不仅可以支持TSC的自我更新,还维持了TSC的基因表达谱和DNA甲基化谱^[65]。此外,该体系中的TSC也可以在体内和体外分化为多种胎盘终末滋养层细胞^[65]。随后,OHINATA等^[66]也开发了一种成分明确的TSC培养基,并成功从E3.5囊胚和E6.5植入后胚胎的ExE中捕获了稳定自我更新的TSC。在该研究中,研究人员发现FGF2、Activin A、XAV939和Y27632对于体外捕获稳定的TSC是必要的^[66]。该培养体系下的TSC高表达*Eomes*、*Elf5*、*Cdx2*、*Tcfap2c*、*Cdh1*和*Esrrb*等TSC标志基因,同时具有参与嵌合胎盘发育的潜能^[66]。最近,SEONG等^[13]定义了一种新的EPI诱导剂组合,可以在体外捕获稳定的、高度自我更新的小鼠TESC。该

研究发现,相较于TSC(对应围着床期TE),TESC类似更早发育阶段的滋养外胚层(囊胚期TE),具有更高的发育潜能^[13,67]。此外,TESC细胞具有更高的自我更新能力和较低的异质性。重要的是,相较于TSC,TESC与ESC聚合后可以更高效地产生类囊胚(blastoids),且可以更有效地植入子宫并引起蜕膜^[13]。

3 重编程来源的滋养层干细胞

动物胚胎细胞的分化和发育一度被认为是单向不可逆的过程。然而,YAMANAKA等^[68]通过体细胞重编程技术证实终末分化的体细胞也能够重编程为多潜能干细胞,这也为滋养外胚层干细胞的获得提供了新的途径^[69](图3)。研究发现,在ESC中过表达*Cdx2*或*Esrrb*可以诱导产生的TSC样细胞,表现出与TSC相似的分子特征和甲基化谱^[45,70]。值得注意的是,包括*Elf5*和*Tead4*在内的ESC中高甲基化的基因座在身份变化过程中似乎特别难去甲基化^[71]。因此,尽管ESC具有高度的可塑性,但少数看家基因(gatekeeper gene)的特异性高甲基化水平降低了ESC向TSC重编程的效率^[71]。类似地,TSC特异性基因的DNA甲基化状态也降低了TSC向ESC的重编程效率^[72-73]。随后,RHEE等^[72]通过引入TSC特异性的转录因子*Cdx2*、*Arid3a*和*Gata3*来研究它们在重编程ESC到TSC过程中的转录调节机制以及染色质可及性变化。该研究指出,ESC到TSC的变换是一个连续的、两步的细胞重编程机制,即首先抑制预先存在的ESC细胞相关基因表达程序之后,再通过TE相关因子激活TSC特异性基因的表达^[72]。最近,GAO等^[47]通过添加小分子LATS激酶抑制剂有效地将ESC化学重编程为稳定自我更新的类TSC细胞系,且其具有与TSC高度相似的分子特征,并可以在体内、外分化为胎盘终末滋养层细胞。

除ESC外,其他类型细胞也被证实可以被重编程为类滋养层干细胞。STEPHANIE等^[70]比较了小鼠ESC、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)、胚胎癌性细胞(embryonal carcinoma cell, ECC)和上胚层干细胞(epiblast stem cell, EpiSC)被重编程为TSC的能力。研究发现,在ESC、iPSC和ECC中过表达*Cdx2*可有效诱导产生TSC样细胞,这表明这些细胞系在发育潜能上是接近的。然而,在*Cdx2*过表达后,EpiSC不能产生TSC样细胞,这表明EpiSC不再有能力通过响应TE标记物CDX2来实

现这一过程^[70]。此外,BENCHETRIT等^[73]报道了*Gata3*、*Eomes*和*Tfap2c*在小鼠成纤维细胞中的瞬时表达可诱导产生稳定的类滋养层干细胞。这种类滋养层干细胞具有与囊胚来源的TSC高度相似的转录谱,具有相似的甲基化和表观遗传模式^[73]。重要的是,这种类滋养层干细胞可以产生TE细胞谱系,形成出血性病变,并在嵌合体实验中促进胎盘发育^[73]。随后,BENCHETRIT等^[74]报道了一组转录因子,包括*Gata3*、*Eomes*、*Tfap2c*、*Myc*和*Esrrb*,它们可以同时成纤维细胞重编程为iPSC、诱导滋养层干细胞(induced trophoblast stem cell, iTSC)和诱导胚外内胚层干细胞(induced extraembryonic endoderm stem cells, iXENs),且iTSC特异性地参与了体内嵌合胎盘的发育。在机制上,该研究发现*Esrrb*和*Eomes*之间的相互作用决定了细胞命运,其中高水平的*Esrrb*驱动细胞的多能性,而高水平的*Eomes*驱动TE的命运决定^[74]。

4 讨论和展望

胚胎植入是哺乳动物胚胎发生的重要生物学事件之一,其中滋养外胚层起着决定性的作用,其侵袭和内分泌功能是早期妊娠建立和维持的关键^[2,51]。由于开展体内细胞谱系分化研究会受到诸多限制性因素的影响,因此TSC可以作为一种研究滋养外胚层谱系分化的重要体外模型。然而,随着TSC的传代增加,自发性的TGC分化减少,而细胞增殖率增加,这表明TSC在体外衍生或长期培养的过程中发生了一些未知变化^[75]。因此,开发包含TSC和ESC的混合培养系统可能是一种模拟体内胚胎发育环境的方法,并可能提供一种替代模型来识别两个细胞谱系之间交流的新的参与者。同时,完善培养条件的标准化可以限制TSC培养过程中的变异性,并可能为解析参与TSC自我更新的旁分泌信号提供新的见解。此外,目前对于TSC分化潜能的研究普遍采用随机分化的方式,缺乏对TE细胞谱系定向分化调控的分子机制^[63],因此开展TSC的定向分化研究对于进一步完善TE细胞谱系调控网络十分必要。

虽然目前已经实现了多种条件下捕获稳定自我更新的小鼠滋养层干细胞,包括无饲养层细胞和无血清体系,但这些滋养层干细胞仍与胚胎TE细胞存在功能差异^[12-13,65-66]。值得注意的是,无论是传统的TSC还是近期被报道的TESC,虽然都具有在体内和体外分

化为胎盘终末滋养层细胞的发育潜能^[12-13],但它们是否具有完全替代胚胎TE并支持EPI发育的功能尚不可知。近年来,随着体外重构胚胎模型研究的深入,越来越多的胚胎模型均显示出胚外谱系发育潜能的不足,尤其是滋养外胚层^[18-19,76-80]。同时,源于ICM的ESC或EPSC(extended pluripotent stem cell)、源于PrE的PrESC以及重编程来源的诱导多能干细胞iPSC已经被证实具有完全的胚胎谱系替代功能^[15,81-83],但具有完全替代TE细胞谱系的干细胞系尚未获得。此外,TSC对应发育时序上的围着床期TE(E5.5),TESC对应发育时序上的囊胚期TE(E4.5)^[13],但功能性TE细胞谱系的特化早在32细胞阶段就已完成^[84],因此获得更早期的具有更高发育潜能的滋养外胚层干细胞对于揭示早期TE细胞谱系的分化和实现类囊胚模型的有效植入具有重要的意义。目前临床上约有60%的胚胎会在围着床期发生着床失败或早期流产,但基于人类医学伦理的限制,目前此类疾病的研究尚缺乏有效的体外研究模型^[85]。因此,完善小鼠滋养外胚层干细胞的功能和分化调控网络也可以为人类胚胎的着床失败和早期流产等相关疾病的干预提供理论参考。

综上所述,滋养层干细胞是一种用以研究胚胎滋养外胚层谱系分化以及重构类胚胎的重要体外模型,进一步完善滋养层干细胞的培养体系并揭示其分化调控网络十分必要。同时,获取更早发育时期的具有更高分化潜能的滋养层干细胞对于实现小鼠类囊胚模型的有效植入和揭示人类早期流产等疾病的分子机制具有重要的指导意义。

作者贡献

顾兆雷、姜年丰负责文章初稿的起草和修改;张建参与文章的修改;郭威设计并绘制文章中的图片,参与文章的修改和校对;高亚可提出综述的主题和框架,设计并绘制文章中的图片,且参与文章的修改和校对。

参考文献 (References)

- [1] PAPUCHOVA H, LATOS P A. Transcription factor networks in trophoblast development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(6): 337-54.
- [2] ROSSANT J. Genetic control of early cell lineages in the mammalian embryo [J]. *Annu Rev Genet*, 2018, 52: 185-201.
- [3] ZHU M, ZERNICKA-GOETZ M. Principles of self-organization of the mammalian embryo [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1467-78.
- [4] YAGI R, KOHN M J, KARAVANOVA I, et al. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoblast lineage at the beginning of mammalian development [J]. *Development*, 2007, 134(21): 3827-36.
- [5] NISHIOKA N, INOUE K, ADACHI K, et al. The Hippo signaling pathway components *lats* and *yap* pattern TEAD4 activity to distinguish mouse trophoblast from inner cell mass [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(3): 398-410.
- [6] YILDIRIM E, BORA G, ONEL T, et al. Cell fate determination and Hippo signaling pathway in preimplantation mouse embryo [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 386(3): 423-44.
- [7] 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.
- [8] FRUM T, RALSTON A. Cell signaling and transcription factors regulating cell fate during formation of the mouse blastocyst [J]. *Trends Genet*, 2015, 31(7): 402-10.
- [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] BISWAS A, HUTCHINS R. Embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(2): 213-22.
- [12] TANAKA S, KUNATH T, HADJANTONAKIS A K, et al. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4 [J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2072-5.
- [13] SEONG J, FRIAS-ALDEGUER J, HOLZMANN V, et al. Epiblast inducers capture mouse trophoblast stem cells *in vitro* and pattern blastoids for implantation in utero [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(7): 1102-18.
- [14] KUNATH T, ARNAUD D, UY G D, et al. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts [J]. *Development*, 2005, 132(7): 1649-61.
- [15] OHINATA Y, ENDO T A, SUGISHITA H, et al. Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm [J]. *Science*, 2022, 375(6580): 574-8.
- [16] CROSS J C, HEMBERGER M, LU Y, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1/2): 207-12.
- [17] GEORGIADIS P, FERGUSON-SMITH A C, BURTON G J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae [J]. *Placenta*, 2002, 23(1): 3-19.
- [18] XU Y, ZHAO J, REN Y, et al. Derivation of totipotent-like stem cells with blastocyst-like structure forming potential [J]. *Cell Res*, 2022, 32(6): 513-29.
- [19] DUPONT C, SCHÄFFERS O J M, TAN B F, et al. Efficient generation of ETX embryoids that recapitulate the entire window of murine egg cylinder development [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(3): e2913.
- [20] AZAGURY M, BUGANIM Y. Unlocking trophoblast mysteries: *in vivo* and *in vitro* perspectives on human and mouse trophoblast fate induction [J]. *Dev Cell*, 2024, 59(8): 941-60.
- [21] KOROTKEVICH E, NIWAYAMA R, COURTOIS A, et al. The apical domain is required and sufficient for the first lineage segregation in the mouse embryo [J]. *Dev Cell*, 2017, 40(3): 235-47.
- [22] ZENKER J, WHITE M D, GASNIER M, et al. Expanding actin

- rings zipper the mouse embryo for blastocyst formation [J]. *Cell*, 2018, 173(3): 776-91.
- [23] YAMAGUCHI H, KASA M, AMANO M, et al. Molecular mechanism for the regulation of Rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil [J]. *Structure*, 2006, 14(3): 589-600.
- [24] STEPHENSON R O, YAMANAKA Y, ROSSANT J. Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin [J]. *Development*, 2010, 137(20): 3383-91.
- [25] ZHU M, LEUNG C Y, SHAHBAZI M N, et al. Actomyosin polarisation through PLC-PKC triggers symmetry breaking of the mouse embryo [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): e921.
- [26] WINKEL G K, FERGUSON J E, TAKEICHI M, et al. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo [J]. *Dev Biol*, 1990, 138(1): 1-15.
- [27] ARKOWITZ R A, DARD N, LOUVET-VALLÉE S, et al. Orientation of mitotic spindles during the 8- to 16-cell stage transition in mouse embryos [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8171.
- [28] ANANI S, BHAT S, HONMA-YAMANAKA N, et al. Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo [J]. *Development*, 2014, 141(14): 2813-24.
- [29] TURLIER H, MAÎTRE J L. Mechanics of tissue compaction [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 47-48: 110-7.
- [30] DE VRIES W N, EVSIKOV A V, HAAC B E, et al. Maternal β -catenin and E-cadherin in mouse development [J]. *Development*, 2004, 131(18): 4435-45.
- [31] YAMANAKA Y, LANNER F, ROSSANT J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst [J]. *Development*, 2010, 137(5): 715-24.
- [32] MAÎTRE J L, BERTHOUMIEUX H, KRENS S F G, et al. Adhesion functions in cell sorting by mechanically coupling the cortices of adhering cells [J]. *Science*, 2012, 338(6104): 253-6.
- [33] FIERRO-GONZÁLEZ J C, WHITE M D, SILVA J C, et al. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1424-33.
- [34] MAÎTRE J-L, NIWAYAMA R, TURLIER H, et al. Pulsatile cell-autonomous contractility drives compaction in the mouse embryo [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 849-55.
- [35] KLOMPSTRA D, ANDERSON D C, YE H J Y, et al. An instructive role for *C. elegans* E-cadherin in translating cell contact cues into cortical polarity [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 726-35.
- [36] REIK W, BEDZHOV I, LISZEWSKA E, et al. Igf1r signaling is indispensable for preimplantation development and is activated via a novel function of E-cadherin [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002609.
- [37] GERRI C, MCCARTHY A, MEI SCOTT G, et al. A conserved role of the Hippo signalling pathway in initiation of the first lineage specification event across mammals [J]. *Development*, 2023, 150(8): dev201112.
- [38] KARASEK C, ASHRY M, DRISCOLL C S, et al. A tale of two cell-fates: role of the Hippo signaling pathway and transcription factors in early lineage formation in mouse preimplantation embryos [J]. *Mol Hum Reprod*, 2020, 26(9): 653-64.
- [39] FRUM T, MURPHY T M, RALSTON A. HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency *in vivo* [J]. *eLife*, 2018, 7: e42298.
- [40] HOME P, SAHA B, RAY S, et al. Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19): 7362-7.
- [41] MORRIS S A, TEO R T Y, LI H L, et al. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6364-9.
- [42] GU B, BRADSHAW B, ZHU M, et al. Live imaging YAP signaling in mouse embryo development [J]. *Open Biol*, 2022, 12(1): e210335.
- [43] ALARCON V B, MARIKAWA Y. Trophectoderm formation: regulation of morphogenesis and gene expressions by RHO, ROCK, cell polarity, and HIPPO signaling [J]. *Reproduction*, 2022, 164(4): 75-86.
- [44] YU F X, ZHAO B, PANUPINTHU N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling [J]. *Cell*, 2012, 150(4): 780-91.
- [45] NIWA H, TOYOOKA T, SHIMOSATO D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation [J]. *Cell*, 2005, 123(5): 917-29.
- [46] LORTHONGPANICH C, MESSERSCHMIDT D M, CHAN S W, et al. Temporal reduction of LATS kinases in the early pre-implantation embryo prevents ICM lineage differentiation [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(13): 1441-6.
- [47] GAO Y, HAN W, DONG R, et al. Efficient reprogramming of mouse embryonic stem cells into trophoblast stem-like cells via lats kinase inhibition [J]. *Biology*, 2024, 13(2): e71.
- [48] VARMUZA S, PRIDEAUX V, KOTHARY R, et al. Polytene chromosomes in mouse trophoblast giant cells [J]. *Development*, 1988, 102(1): 127-34.
- [49] SCREEN M, DEAN W, CROSS J C, et al. Cathepsin proteases have distinct roles in trophoblast function and vascular remodeling [J]. *Development*, 2008, 135(19): 3311-20.
- [50] SUZUKI D, OKURA K, NAGAKURA S, et al. CDX2 downregulation in mouse mural trophectoderm during peri-implantation is heteronomous, dependent on the YAP-TEAD pathway and controlled by estrogen-induced factors [J]. *Rep Med Biol*, 2022, 21(1): e12446.
- [51] POSFAI E, ROVIC I, JURISICOVA A. The mammalian embryo's first agenda: making trophectoderm [J]. *Int J Dev Biol*, 2019, 63(3/4/5): 157-70.
- [52] SUZUKI D, MORIMOTO H, YOSHIMURA K, et al. The differentiation potency of trophoblast stem cells from mouse androgenetic embryos [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(4): 290-302.
- [53] CHÁVEZ D J, ENDERS A C, SCHLAFKE S. Trophectoderm cell subpopulations in the periimplantation mouse blastocyst [J]. *J Exp Zool*, 1984, 231(2): 267-71.
- [54] NAKAMURA T, YABUTA Y, OKAMOTO I, et al. SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(9): e60.
- [55] NOSI U, LANNER F, HUANG T, et al. Overexpression of trophoblast stem cell-enriched microRNAs promotes trophoblast fate in embryonic stem cells [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(6): 1101-9.
- [56] RASSOULZADEGAN M. Phagocytosis reveals a reversible differentiated state early in the development of the mouse embryo [J]. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3295-303.
- [57] DOUGLAS G C, VANDEVOORT C A, KUMAR P, et al. Tro-

- phoblast stem cells: models for investigating trophoblast differentiation and placental development [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(3): 228-40.
- [58] KRAWCZYK K, WILCZAK K, SZCZEPANSKA K, et al. Paracrine interactions through FGFR1 and FGFR2 receptors regulate the development of preimplantation mouse chimaeric embryo [J]. *Open Biol*, 2022, 12(11): e220193.
- [59] ARMAN E, HAFFNER-KRAUSZ R, CHEN Y, et al. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 5082-7.
- [60] FELDMAN B, POUHEYMIROU W, PAPAIOANNOU V E, et al. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development [J]. *Science*, 1995, 267(5195): 246-9.
- [61] CHANG H, BROWN C W, MATZUK M M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(6): 787-823.
- [62] ERLEBACHER A, PRICE K A, GLIMCHER L H. Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF- β /activin [J]. *Dev Biol*, 2004, 275(1): 158-69.
- [63] ZHU D M, GONG X, MIAO L Y, et al. Efficient induction of syncytiotrophoblast layer II cells from trophoblast stem cells by canonical wnt signaling activation [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(6): 2034-49.
- [64] MAO Q, YE Q, XU Y, et al. Murine trophoblast organoids as a model for trophoblast development and CRISPR-Cas9 screening [J]. *Dev Cell*, 2023, 58(24): 2992-3008.
- [65] KUBACZKA C, SENNER C, ARAÚZO-BRAVO M J, et al. Derivation and maintenance of murine trophoblast stem cells under defined conditions [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 2(2): 232-42.
- [66] OHINATA Y, TSUKIYAMA T. Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107308.
- [67] SINGH V P, GERTON J L. Protocol for mouse trophoblast stem cell isolation, differentiation, and cytokine detection [J]. *STAR Protocol*, 2021, 2(1): e100242.
- [68] 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.
- [69] HUANG B, PENG X, ZHAI X, et al. Inhibition of HDAC activity directly reprograms murine embryonic stem cells to trophoblast stem cells [J]. *Dev Cell*, 2024, 59(16): 2101-17.
- [70] BLIJ S, PARENTI A, TABATABAI-YAZDI N, et al. Cdx2 efficiently induces trophoblast stem-like cells in naïve, but not primed, pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(11): 1352-65.
- [71] CAMBULI F, MURRAY A, DEAN W, et al. Epigenetic memory of the first cell fate decision prevents complete ES cell reprogramming into trophoblast [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: e5538.
- [72] RHEE C, LEE B K, BECK S, et al. Mechanisms of transcription factor-mediated direct reprogramming of mouse embryonic stem cells to trophoblast stem-like cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(17): 10103-14.
- [73] BENCHETRIT H, HERMAN S, VAN WIETMARSCHEN N, et al. Extensive nuclear reprogramming underlies lineage conversion into functional trophoblast stem-like cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(5): 543-56.
- [74] BENCHETRIT H, JABER M, ZAYAT V, et al. Direct induction of the three pre-implantation blastocyst cell types from fibroblasts [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 983-94.
- [75] HAYAKAWA K, HIMENO E, TANAKA S, et al. Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells [J]. *Curr Protoc Stem Cell Bio*, 2015, 32(1): 1E.4.1-1E.4.32.
- [76] LI H, CHANG L, WU J, et al. *In vitro* generation of mouse morula-like cells [J]. *Dev Cell*, 2023, 58(22): 2510-27.
- [77] POSFAI E, SCHELL J P, JANISZEWSKI A, et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(1): 49-60.
- [78] MIN Z, ZHONG K, LUO Y, et al. Protein expression landscape defines the formation potential of mouse blastoids from EPSCs [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: e840492.
- [79] LAU K Y C, RUBINSTEIN H, GANTNER C W, et al. Mouse embryo model derived exclusively from embryonic stem cells undergoes neurulation and heart development [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(10): 1445-58.
- [80] ZHANG P, ZHAI X, HUANG B, et al. Highly efficient generation of blastocyst-like structures from spliceosomes-repressed mouse totipotent blastomere-like cells [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(3): 423-35.
- [81] NAGY A, GOCZA E, DIAZ E M, et al. Embryonic stem-cells alone are able to support fetal development in the mouse [J]. *Development*, 1990, 110(3): 815-21.
- [82] ZHAO X Y, LI W, LV Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90.
- [83] LI H, ZHAO C, XU J, et al. Rapid generation of gene-targeted EPS-derived mouse models through tetraploid complementation [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(1): 20-30.
- [84] SUWINSKA A, CZOŁOWSKA R, OZDZENSKI W, et al. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos [J]. *Dev Biol*, 2008, 322(1): 133-44.
- [85] AI Z, NIU B, YIN Y, et al. Dissecting peri-implantation development using cultured human embryos and embryo-like assembloids [J]. *Cell Res*, 2023, 33(9): 661-78.