

胚胎干细胞多潜能性维持的分子机制

王庆忠 刘以训 韩春生*

(山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080.

* 联系人, E-mail: hancs@ioz.ac.cn)

摘要 分离于着床前胚胎内细胞团的胚胎干细胞是多潜能性细胞, 在胚泡注射后能产生 3 个胚层的所有细胞和组织类型. 在合适的培养条件下, 胚胎干细胞保持其多潜能性, 即维持其多向发育潜能及在不分化状态下的对称性细胞分裂能力. 胚胎干细胞的多潜能性是其得以广泛应用的基础. 胚胎干细胞可作为基因敲除或转基因动物的供体细胞、哺乳动物发育的体外模型和再生医学中进行细胞治疗的细胞库. 要实现这些目的, 必须建立化学成分明确的培养体系并在体外长期培养过程中保持胚胎干细胞的多潜能性, 同时应能够对其进行定向诱导分化. 因此, 理解和阐明胚胎干细胞多潜能性维持的分子机制是首要前提. 本文概述了该方面研究的最新进展, 包括 LIF/STAT3, BMPs/Smads, canonical Wnt, TGF β /activin/nodal, PI3K 和 FGF 等信号通路以及 *oct4*, *nanog* 等多潜能性维持相关基因, 并对小鼠和人 ES 细胞多潜能性维持系统的调控机制及其差异进行了探讨. 进一步阐明这些信号通路和基因之间的相互作用以及胚胎干细胞多潜能性维持系统的调控机制将是未来胚胎干细胞研究领域的主要目标.

关键词 胚胎干细胞 多潜能性 信号通路 多潜能性维持相关基因

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)分离于早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM), 具有体外无限增殖、保持正常的染色体核型和未分化状态的特性^[1]. ES细胞在体内外正常分化时, 能产生除滋养外胚层和原始内胚层外的内、中和外 3 个胚层的所有细胞类型. 因此, 相比较某些多能成体干细胞而言, ES细胞是全能性细胞. 胚泡注射后, ES细胞的衍生细胞分布到嵌合体动物的所有组织系统中, 包括生殖系. ES细胞衍生的生殖细胞能进行遗传物质的传递, 这一特性已被广泛应用于基因功能的研究. ES细胞进行对称性细胞分裂, 产生 2 个相同的多潜能性子代细胞, 这一特性称为ES细胞的自我复制或自我更新(self-renewal). ES细胞自我复制的同时伴随着细胞分化的抑制和多向发育潜能的维持, 这是ES细胞多潜能性的基础^[2]. ES细胞的自我更新依赖于内源和外源生长因子的刺激和多条信号通路的协同作用, 并受多潜能性维持相关基因的调控. 尽管我们在不同动物的ES细胞和成体干细胞的分离、培养及诱导分化等方面取得了重大进展, 但对ES细胞多潜能性的维持机制所知甚少, 而阐明ES细胞多潜能性保持机理以建立无饲养层和无血清培养体系是解决ES细胞研究和临床应用的关键^[3]. 因此, 本文综述了近年来在ES细胞多潜能性维持机制研究方面的最新进展, 概括了相关的细胞因子、信号通路和内源基因表达的调控机制, 以期ES细胞研究者对此能进行更深入的研究.

1 LIF/gp130/STAT3 信号通路维持小鼠 ES 细胞的多潜能性

LIF/gp130/STAT3 信号通路是发现最早的、了解最清楚的小鼠ES细胞多潜能性维持通路. LIF属于IL-6 细胞因子家族成员, 其他成员还有IL-6, IL-11, CNTF(ciliary neurotrophic factor)和CT-1 (cardiotrophin-1)等. 它们均通过膜受体蛋白gp130 转导信号^[4]. 当IL-6 和sIL-6R(soluble IL-6 receptor)同时添加到培养基中时, 能抑制小鼠ES细胞的分化^[5], 在很大程度上可替代LIF的作用.

LIF/gp130/STAT3 通路通过STAT3(signal transducer and activator of transcriptions 3)激活靶基因表达, 抑制ES细胞的分化, 从而维持小鼠ES细胞的多潜能性. LIF受体由LIFR β 和gp130 构成. LIF先与LIFR β 结合成LIF-LIFR β 复合物, 募集gp130 并与之形成三聚体复合物, 进而激活与其相连的JAKs (Janus-associated tyrosine kinases, 包括JAK-1, JAK-2, JAK-3和TYK-2). JAKs磷酸化受体复合物胞内段的酪氨酸残基, 被磷酸化的酪氨酸残基成为含SH2(Src homology 2)结构域的蛋白质的停泊和募集位点. 这类蛋白一旦与之结合, 就成为JAKs的磷酸化目标而被磷酸化. STATs是JAKs的主要磷酸化底物. 在小鼠ES细胞中, LIF主要激活STAT3^[6,7]. 磷酸化的STAT3结合成同形二聚体并转位到核内, 作为转录因子激

活靶基因表达. 最近研究表明, *myc* 是 LIF/STAT3 通路的重要靶基因^[8]. STAT3 直接激活 *Myc* 转录因子的表达, 抑制小鼠 ES 细胞的分化. 稳定表达 *Myc* 的小鼠 ES 细胞能不依赖于 LIF 而保持其自我复制能力和多潜能性.

此外, LIF 通过 gp130 还激活多种其他信号蛋白, 如 ERKs^[9,10], RSKs (ribosomal S6 kinases), CREB^[11] 和 Src 家族酪氨酸激酶 cYes^[12] 等. 因此, 在 ES 细胞中, 除 JAK/STAT3 通路外, 目前已知 LIF 至少启动另外 3 条信号通路(图 1): () Ras/Raf/MAPK/ERK1/2 通路. 该通路促进 ES 细胞分化, 可能 LIF 诱导的 JAK/STAT3 通路与 MAPK/ERK 通路之间处于一种微妙的平衡状态, 这一平衡关系的维持和倾斜决定着 ES 细胞的命运选择. () ERK5/RSK/CREB 通路. LIF 诱导的 RSKs 的磷酸化依赖于 ERK5, 而 CREB 的磷酸化受 RSKs 的调控^[11], 这可能代表了一条促进 ES 细胞自我复制的 MEK/ERK 分支通路. () cYes 信号通路. 用 Src 家族酪氨酸激酶抑制剂处理含 LIF 培养基培养的小鼠 ES 细胞, ES 细胞增殖速度和标志基因的表达水平均降低, 但并不影响 JAK/STAT3 和 p42/p44MAPK 的磷酸化, 表明 Src 酪氨酸激酶在维持小鼠 ES 细胞多潜能性方面起重要作用, 可能是通过 LIF 诱导的另外下游通路进行的^[12].

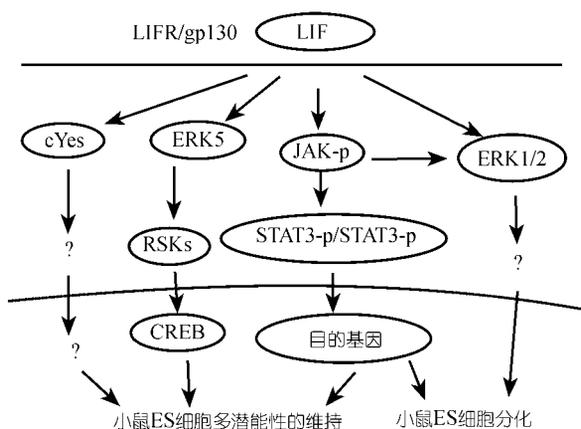


图 1 LIF/gp130 通路在小鼠 ES 细胞多潜能性维持中的作用

LIF 诱导 JAK/STAT3, Ras/Raf/MAPK/ERK1/2, ERK5/RSK/CREB 和 cYes 等多条信号通路. LIF/JAK/STAT3 通路通过抑制分化维持小鼠 ES 细胞的多潜能性. LIF/gp130 或磷酸化的 JAKs 激活的 Ras/Raf/MAPK/ERK1/2 通路促进小鼠 ES 细胞分化. ERK5/RSK/CREB 和 cYes 信号通路都促进小鼠 ES 细胞的存活和多潜能性的维持, 但详细的机制还不清楚. “?”代表通路中的未知因子

在小鼠 ES 细胞多潜能性的维持中, LIF 的作用需要其他因子和通路的协同, 而在人 ES 细胞多潜能性的维持中, LIF 不起作用. 小鼠 ES 细胞在添加有 LIF, FCS (fetal calf serum) 的高糖 DMEM 中与丝裂霉素 C 处理的 MEFs (mouse embryonic fibroblasts) 共培养时, 能保持其快速增殖能力和不分化状态. 但若撤除血清, 则不能保持小鼠 ES 细胞的自我更新能力. 显然, 除 LIF 诱导的信号通路外, 小鼠 ES 细胞多潜能性的维持还需要血清中的和 MEFs 分泌的其他因子或信号分子的参与. 值得注意的是, LIF 并不能抑制人、猴及大鼠的 ES 细胞的分化^[13], 说明人 ES 细胞多潜能性的维持是通过 LIF/gp130/STAT3 非依赖性信号通路进行的^[14].

2 BMPs/Smads 通路 与 LIF/STAT3 通路协同维持小鼠 ES 细胞的多潜能性

BMPs (bone morphogenetic proteins) 属于 TGFβ 超家族成员, 主要通过 Smads 蛋白转导信号^[15]. BMPs 的膜受体为具有 Ser/Thr 激酶活性的异二聚体跨膜复合物^[16]. BMP 先与 BMPR 结合, 引起 BMPR 构型变化并与 BMPR 形成二聚体, 从而激活 BMPR, 它反过来磷酸化 BMPR 使之活化; 活化的 BMPR 磷酸化 Smad1, Smad5 或 Smad8 (即 R-Smads; receptor-regulated smads), 后者与 Smad4 (即 Co-Smad; common Smad) 形成复合物并转位到核内, 直接或间接激活相关基因的表达. Smad6, Smad7 (即 I-Smads; inhibitory Smads) 通过抑制受体诱导的 R-Smads 的磷酸化或与 R-Smads 竞争性地结合 Smad4 而起抑制作用. BMPs 除激活 Smad 信号通路外, 还同时激活 Ras/MAPK/ERK, p38/MAPK 等通路^[17-19].

在小鼠 ES 细胞多潜能性的维持中, BMPs 与 LIF 有协同和相互补偿作用. 在含 LIF 有饲养层无血清的培养基体系中, 小鼠 ES 细胞将向神经外胚层细胞分化^[20]; 若撤除 LIF 而添加 BMP4 或 BMP2, 则诱导小鼠 ES 细胞向中胚层、内胚层和造血细胞的分化^[21]. 在 N2B7 无血清培养基中, 同时添加 BMP4 和 LIF 时, 能维持小鼠 ES 细胞的多潜能性; 以 GDF-6 代替 BMP4 亦获得同样的实验结果^[22]. 这些研究表明, LIF 抑制小鼠 ES 细胞向中胚层和内胚层等非神经细胞的分化, 但不能抑制 ES 细胞向神经外胚层的分化, 而 BMP4 或 GDF-6 具有抗神经分化效应. 因此, 在无血清培养体系中, BMPs 与 LIF 相互协同能有效地维持

小鼠 ES 细胞的多潜能性.

BMPs 通过 Smad 通路诱导 *id*(inhibitor of differentiation)基因表达, 而抑制 p38/ERK 通路活性 [22,23]. *id* 基因编码负 HLH 因子. 在中枢神经系统发育中, Id 蛋白与 bHLH 神经生成转录因子结合, 抑制神经前体细胞发生 [24]. BMPs 诱导的 Id 蛋白可能是通过这种作用方式发挥抗小鼠 ES 细胞的神经分化潜能的. 超表达 Id 的小鼠 ES 细胞, 即使在 LIF 存在时, 也会向非神经细胞分化. 显示出 LIF/STAT3 通路 与 BMP/Smad/Id 通路之间的相互协同与平衡是小鼠 ES 细胞多潜能性维持的关键因素. p38/ERK 通路促进 ES 细胞分化. 该通路的抑制, 有助于小鼠 ES 细胞多潜能性的维持.

在小鼠 ES 细胞中, LIF/STAT3 通路 与 BMPs/Smads/Id 通路间的相互作用可能发生多种水平上(图 2). I-Smads 和细胞因子信号抑制子 SOCS(suppressor of cytokine signaling)可能引导两者在受体水平上的相互作用. I-Smads 的作用如上述; gp130 诱导的经典负调控因子 SOCS 抑制 LIF 受体复合物的激活并削弱其下传信号 [25]. p38/ERK 和 p300 可能引导两通路在细胞质水平上的相互协同. 两通路对 p38/ERK 通路的相反作用以及 Smads-p300-STAT3 复合物的形成可能是两者在小鼠 ES 细胞多潜能性维持中保持平衡的关键联系. 但我们至今还不清楚两通路在基因表达水平上有何联系或协同.

在小鼠 ES 细胞中, *xiap* 基因在 BMP4 存在时有高水平的表达 [23]. XIAP(X-linker inhibitor of apoptosis)能与 ALK3(即 BMP RI_A)结合, 参与 BMP/MAPK 信号通路即 BMP/TAK1(TGFβ activated kinase 1)通路, TAK1 为一种 MAPKKK, 能抑制 β-catenin/Tcf 复合物与其 DNA 靶序列的结合 [26], 这一通路是否在 ES 细胞中起作用未见报道. 另一种可能的机制是 ALK3 激活 Smad1, Smad5 或 Smad8, 诱导 *xiap* 表达; XIAP 进入细胞质与 ALK3 结合, 并与 TAB1(TAK1 binding protein 1)相互作用共同激活 TAK1, 激活或恢复 p38/ERK 活性. 因此, XIAP 是 BMPs/Smads 信号通路的反馈抑制因子之一.

3 BMPs/Smads 通路的抑制有助于人 ES 细胞多潜能性的维持

人 ES 细胞多潜能性的维持与 BMPs/Smads 通路的抑制相关. 研究发现, BMPs/Smads 通路的激活导致人 ES 细胞的分化, 如 BMP2 诱导人 ES 细胞分化为胚外内胚层等细胞类型 [27], BMP4 则诱导人 ES 细胞向滋养外胚层分化 [28]. 因此, BMPs/Smads 通路的抑制有助于人 ES 细胞多潜能性的维持. FGF2(basic fibroblast growth factor; bFGF)是人 ES 细胞多潜能性维持的重要因子. 在非条件培养基中单独添加 bFGF 或结合添加其他因子, 都能维持人 ES 细胞的多潜能性 [29]. 在无饲养层培养体系或在非条件培养基中,

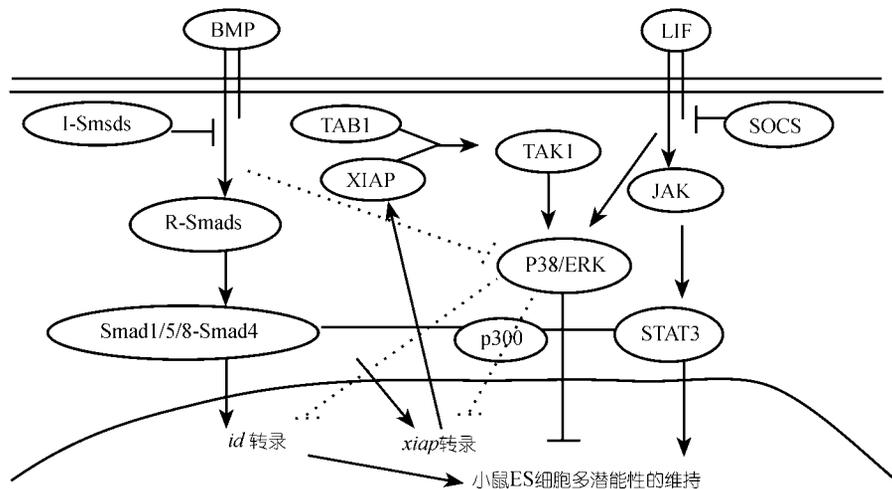


图 2 小鼠 ES 细胞中 LIF/STAT3 和 BMPs/Smads 通路间的相互作用

I-Smad 和 SOCS 分别介导 2 条通路在受体水平的抑制; LIF 激活 p38/ERK, 而 BMPs 抑制 p38/ERK, 这种正负调控作用有助于 ES 细胞多潜能性的维持; Smads-p300-STAT3 复合物可能是 2 条通路在细胞质水平的关键联系; BMPs/Smads 除通过激活 *Id* 表达以维持 ES 细胞的多潜能性外, 还同时激活负反馈抑制因子 XIAP 表达. XIAP 通过激活 p38/ERK 通路, 抑制 *Id* 和其自身的表达, 并促进 ES 细胞分化, 从而构成了较复杂的负反馈环路

BMPs抑制剂noggin和bFGF协同抑制BMPs/Smads通路的激活,能维持人ES细胞的自我更新^[30].这些研究表明,FGF通路的激活和BMPs/Smads通路的抑制是人ES细胞多潜能性维持所必需的,一种可能的机制是激活的FGF通路抑制了Smad1, Smad5 和Smad 8的磷酸化或R-Smads-Smad4 向核内的转位及R-Smads在核内的活性(图 5).

4 经典 Wnt 通路是小鼠和人 ES 细胞多潜能性维持的重要通路

Wnts为分泌性糖蛋白.在人和小鼠中已发现了19个Wnt家族成员,它们在进化上高度保守^[31].Wnts通过膜受体Frizzled家族成员(在人和小鼠有10个成员)以及辅助受体LRP5(low-density lipoprotein receptor-related protein 5)和LRP6 向细胞内转导调节信号^[32].在人类,经典Wnt通路(canonical Wnt pathway)的异常激活与肿瘤发生密切相关^[33,34].ES细胞被看作是人工癌细胞,经典Wnt通路在ES细胞中起作用是无疑问的.

经典 Wnt 通路又称 Wnt/ β -catenin 通路.在这一通路中,当 Wnts 不存在时,GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)磷酸化细胞质中的 β -catenin,磷酸化的 β -catenin被 β -TrCP(一种E3泛素连接酶复合体中的F同源盒蛋白)识别并与其结合,导致 β -catenin 被由GSK-3 β , Axin 和 APC 构成的降解复合体降解.当Wnt与Frizzled及LRP5/6结合后,Dishevelled被激活,活化的Dishevelled抑制了GSK-3 β 活性, β -catenin逃

逸磷酸化而保持游离状态,进而从细胞质转位到核内; β -catenin与Lef(lymphocyte enhancer factor)/Tcf (T-cell factor)家族转录因子结合,并将它们从抑制子转化为激活子,从而启动下游基因转录^[32,35](图 3). β -catenin也可通过GSK-3 β 非依赖方式而激活,即LRP5/6 募集Axin到质膜并使之降解,导致降解复合体不能形成^[36].用特异性抑制剂抑制GSK-3 β 活性,同样可解脱 β -catenin被降解的命运,达到激活经典Wnt通路的目的.

经典Wnt通路的激活足以维持ES细胞的多潜能性.BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime)是一种新发现的GSK-3 特异性药物抑制剂,提取于软体动物Tyrian Purple Indirubins^[37].在多种培养体系中,添加BIO以抑制GSK-3 时,能激活经典Wnt通路,小鼠ES细胞和人ES细胞均有高水平的多潜能性标志基因,如*oct-4*, *rex1*, *nanog*等的表达;即使在无饲养层、无血清和无LIF的培养体系中,添加重组Wnt-3a因子或BIO,人ES细胞或小鼠ES细胞也能维持未分化状态;当BIO撤除后,ES细胞恢复其体外的多向分化潜能和体内的嵌合体形成能力^[38].

ES细胞中有内源性的Wnt/ β -catenin通路活性,多能成体干细胞如造血干细胞^[39]、神经干细胞^[40]和皮肤干细胞^[41]等也是如此.因此,Wnt/ β -catenin通路在ES细胞的多潜能性和多能干细胞的潜能性维持中都起重要作用.

鉴于Wnt/ β -catenin通路能有效地维持ES细胞的多潜能性,LIF诱导的小鼠ES细胞的自我复制可能在

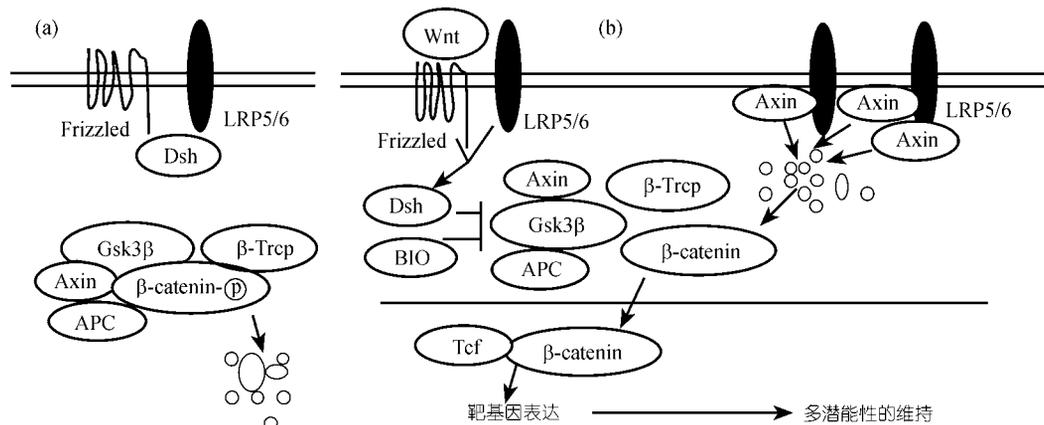


图 3 经典 Wnt 通路及其在 ES 细胞多潜能性维持中的作用

(a) Wnt 不存在时,细胞质中的 β -catenin 被 GSK-3 β 磷酸化并被 β -TrCP 识别和结合,随之被由 GSK-3 β , Axin 和 APC 构成的降解复合体降解.(b) 在培养基中添加 Wnt 后,Wnt 与受体结合,活化的 Dsh 抑制了 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化作用.当添加 BIO 时,BIO 直接抑制 GSK-3 β 的活性, β -catenin 转位到细胞核内与 Tcf 结合,启动靶基因表达;Axin 被辅助受体 LRP5/6 募集到质膜并使之降解,使降解复合体不能形成, β -catenin 发生核转位. Dsh, dishevelled; APC, adenomatous polyposis coli

一定程度上是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路^[41]。但这2条通路之间是如何交互对话的尚需进一步研究。最近的研究表明,在人ES细胞中,经典Wnt通路与TGF β 信号通路之间相互对话,共同维持人ES细胞的多潜能性^[42]。BIO的发现和Wnt/ β -catenin通路在ES细胞多潜能性维持上的重要作用,为我们在制作化学成分明确的ES细胞无血清培养基方面开辟了一条崭新的道路。

5 TGF β /activin/nodal 通路在人ES细胞多潜能性维持中起重要作用

TGF β /activin/nodal通路与BMPs/Smads通路所不同的是,TGF β /activin/nodal首先与I型受体(ALK4, ALK5和ALK7)结合,再与II型受体结合成配体-受体复合物,随之激活Smad2, Smad3^[46]。Smad2, Smad3和Smad4形成复合体并转位到核内,与核内辅因子相互作用共同激活靶基因的转录。

TGF β /activin/nodal通路在人ES细胞多潜能性的维持中起重要作用。研究表明,Nodal和Nodal通路的两种抑制因子Lefty-A和Lefty-B在人ES细胞分化时表达下调,而在未分化的ES细胞中有高水平的表达,并且这种高水平表达是由Smad2, Smad3的激活所维持的^[43]。另一项研究显示,培养在添加了重组Nodal的培养基中的人ES细胞,有长时间的多潜能性标志基因的表达^[44]。再如,在补充有TGF β 1, LIF, bFGF, 纤连蛋白基质和代血清的无饲养层无血清培养体系中,人ES细胞能在长时间内保持其多潜能性^[45]。这些研究证明,TGF β 通路是人ES细胞多潜能性维持的必需通路。最近,James等人^[42]报道,仅仅TGF β 通路的激活并不足以维持人ES细胞的多潜能性,而需要经典Wnt通路与其协同作用。虽然经典Wnt通路的激活与Smad2, Smad3的激活之间存在密切相关性,但我们还不清楚两通路间的相互作用机制。因此,Smad2, Smad3的激活如何介导人ES细胞多潜能性的维持,以及经典Wnt通路与TGF β /activin/nodal通路在人ES细胞多潜能性维持中如何相互对话尚需进一步研究。

值得注意的是,TGF β /activin/nodal通路不参与小鼠ES细胞多潜能性的维持。这反映了两种ES细胞在多潜能性维持机制上的显著差异。很明显,BIO维持小鼠ES细胞的未分化状态不依赖于TGF β /activin/nodal通路。

6 PI3K 信号通路促进小鼠和人ES细胞的自我更新

PI3Ks(phosphoinositide 3-kinases)激酶家族分为I型(又分为I_A和I_B两亚型)、II型和III型。PI3K I_A由一个催化亚基p110(有p110 α , p110 β 和p110 δ 3种同种型)和一个调节亚基(包括p85 α , p85 β 等)构成,能磷酸化质膜中的磷酸肌醇(phosphoinositide, PI),产物PI(3,4)P₂和PI(3,4,5)P₃是细胞内第二信使,参与多条信号通路,发挥多种生物学功能^[46]。

在小鼠ES细胞中,PI3K信号通路有内源活性,促进ES细胞的自我增殖。在p85 α 无义突变的小鼠ES细胞中,PKB/Akt活性降低,细胞增殖缓慢。通过腺病毒载体感染该ES细胞系,使其重新表达p85 α ,则可逆转缺陷表型^[47]。小鼠ES细胞还特异地表达ERas,一种与已知的HRas, KRas, Nras有区别的新成员,其人ES细胞的直系同源物是Hrasp^[48]。值得注意的是,ERas不与Raf而与PI3K相互作用。Eras无义突变的小鼠ES细胞的增殖速率显著降低,这种变化可被PI3K的激活所代偿。NIH 3T3细胞被ERas转染后,细胞发生癌变。这些研究表明,PI3K通路在ES细胞自我增殖过程中起重要作用。

PI3K通路与gp130偶联,并可被LIF所激活和加强,参与小鼠ES细胞多潜能性的维持。众多研究已经证明,在多种类型的细胞中,细胞因子信号通过gp130激活PI3K I_A。在含LIF的ES细胞培养基中,添加PI3Ks的可逆性抑制剂LY294002,或通过负显性 Δ p85的调节性表达来抑制PI3K I_A的活性,小鼠ES细胞自我增殖能力明显降低,并伴随某些细胞的分化。分析表明,PI3K的抑制,对STAT3的Tyr(705)的磷酸化没有影响,但导致了PKB/Akt, GSK-3 α / β 和S6蛋白的磷酸化水平下降及ERKs磷酸化水平上升。当PI3K长时间抑制时, β -catenin的磷酸化水平下降,但细胞质中 β -catenin水平没有明显变化,暗示Wnt/ β -catenin通路在PI3Ks下游不起主要作用^[49]。这些事实证明,PI3K通路是在LIF存在时小鼠ES细胞多潜能性的维持所必需的,可能主要是通过提高PKB/Akt的磷酸化水平而降低ERKs的磷酸化水平发挥作用。但PI3Ks是细胞内众多信号的汇聚点和发散点,它与小鼠ES细胞多潜能性维持的其他通路如BMP/Smad, Wnt/ β -catenin等之间的相互关系还需要详细研究。已有实验表明,在某些细胞类型中PI3K通路与BMP/Smad通路间相互对话^[50]。

PI3K通路在人ES细胞多潜能性维持中也发挥作用。最近的研究表明,当从培养基中撤除bFGF或是抑制PI3K/Akt/PKB通路的激活时,导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分子表达水平的下降和人ES细胞的分化。因此, bFGF通过激活PI3K/Akt/ PKB通路以调节ECM分子的表达,维持人ES细胞的自我更新^[51]。以前的研究已经证明, ECM分子促进人ES细胞增殖和未分化状态的维持^[52],暗示着ECM分子与其受体间的相互作用是人ES细胞自我更新所必需的。这一假设已得到了实验的证实。用整合素 $\alpha 6/\beta 1$ 抗体阻断层黏连蛋白和整合素之间的相互作用,导致人ES细胞的分化^[51]。但细胞外基质分子信号通路的下游因子尚未知。可以肯定的是,在小鼠和人ES细胞的多潜能性维持中, PI3K通路的上游激活因子和下游因子是不同的。

7 ES 细胞多潜能性维持的相关基因及其调控

除上述通路中的基因外,还有少数几个基因与ES细胞多潜能性的维持直接相关。这些基因包括*oct4*, *nanog*, *sox2*, *rex1*, *foxd3*等。但对这基因在ES细胞多潜能性维持中的调控机制所知甚少。

7.1 *oct4*

Oct4 属于octamer元件结合转录因子(octamer motif binding transcription factor)家族成员,由Pou5f1基因编码。表达于卵母细胞,PGCs(primordial germ cells), ICM, 和ES细胞等^[53]。Oct4 可与包括octamer元件(ATGCAAAT)和AT富集区在内的多种DNA调控序列结合^[54]。结合形式为单体,或以二聚体(同形或异形)形式与Oct4 识别的回文序列元件结合^[55],调控靶基因的表达。

*oct4*的启动子序列在进化上相当保守。在所研究的动物种类中, *oct4*的启动子均含有2个增强子:近端增强子(proximal enhancer, PE)和远端增强子(distal enhancer, DE)。两者可能都是Oct4 在ES细胞中表达所必需的,而后者决定着Oct4 在生殖细胞中的表达。早期胚胎表胚层(epiblast)分化时, GCNF(germ cell nuclear factor)结合到Pou5f1的近端增强子,导致Oct4只表达于后期胚胎及成体中的生殖细胞^[56]。

Oct4 的不同表达水平影响着ES细胞的状态。当Oct4的表达水平达到正常水平的近2倍时,ES细胞分化为内胚层和中胚层细胞;表达水平低于正常水平的50%时,ES细胞分化为滋养外胚层细胞。因此,

Oct4 的低水平表达诱导滋养外胚层分化,高水平表达诱导内胚层和中胚层分化,而中等水平的表达是ES细胞多潜能性维持所必需的^[57]。

到目前为止,我们对维持Oct4 精确表达水平的顺式作用元件和反式作用因子了解很少。在DNA序列上,没有发现保守的STAT3 和FRE(FGF response element)结合元件,但在远端增强子内有Oct4-Sox2的共结合位点^[58]。该位点称之为2B,是顺式作用元件,位于2A位点下游30 bp处。2个位点是远端增强子活性所必需的。当Oct4-Sox2 复合物特异地结合到2B位点和一个未知因子与2A位点结合后,激活远端增强子,从而启动Oct4 自身的表达。最近发现在*nanog*基因的5'端也存在保守的Oct4-Sox2 共结合位点^[59]。而且, Oct4-Sox2 复合物与此位点的结合足以维持Nanog在小鼠和人ES细胞中的适当表达水平。因此, Oct4 也是Nanog表达的调控因子之一。

目前已知, Oct4 通过2种作用方式维持ES细胞的多潜能性:() Oct4 与许多基因的octamer元件或AT富集区等序列结合,直接调控这些基因的表达;() Oct4 与不同的辅因子结合后, Oct4 或充当转录激活子或作为转录抑制子,激活或抑制靶基因表达^[60]。例如, Oct4 和Sox2 可同时结合到*oct4*, *nanog*, *sox2*, *Utf1*(undifferentiated cell transcription factor 1), *zfp42*(zinc finger protein-42), *rex1*, *fgf4*(fibroblast growth factor-4)等基因的调控区的相邻位点。尽管Oct4 是ES细胞多潜能性维持所必需的,但Oct4 单独作用并不足以维持ES细胞的多潜能性,且其超表达或表达下调时会导致ES细胞分化。

7.2 *sox2*

Sox2 蛋白含单一的HMG(high-mobility-group) DNA结合结构域,属于转录因子。许多研究表明, Sox2 是Oct4 的辅因子,促进Oct4 的靶基因的转录。FGF4 是早期胚胎发育中细胞特化所必需的旁分泌因子,可能促进小鼠ES细胞增殖。最近报道, FGF4与纤连蛋白协同促进小鼠ES细胞的分化^[61]。在*fgf4* 基因的增强子序列中,有Sox2 和Oct4 的共结合位点,当两者同时结合到这两个相邻位点后,启动*fgf4* 基因的转录^[60]。

Sox2 与Oct4 在功能上相互协同,参与ICM细胞和ES细胞多潜能性的维持。在胚胎发育早期, Sox2 与Oct4 的表达模式相似,差异在于Sox2 还表达于胚外外胚层和胚胎神经干细胞。*sox2*-/-鼠胚的ICM不能产生表胚层,只衍生出滋养外胚层和胚外内胚层细胞

[62], 体外培养的 *oct4*^{-/-} 小鼠胚胎同样不能产生表胚层, 但只产生由滋养外胚层组成的细胞团 [53]. 可见, *sox2* 的缺陷表型与 *oct4* 的缺陷表型类似. 这些事实说明, Oct4 和 Sox2 在功能上是相互协同的, 可能主要是通过 Oct4-Sox2 复合物发挥这种协同作用. 缺少 Sox2, ICM 细胞向滋养外胚层或者胚外内胚层分化; 缺少 Oct4, ICM 细胞和 ES 细胞则只衍生滋养外胚层细胞. 遗憾的是至今没有成功地建立 *sox2*^{-/-} ES 细胞系, 以充分地说明 *sox2* 在 ES 细胞多潜能性维持中作用. 通过 RNAi 技术沉默 *sox2*, 也许能达到此目的.

7.3 *rex1*

Rex1 为一种酸性锌指蛋白, 属于转录因子. 在未分化的小鼠 ES 细胞中, Rex1 有高水平的表达; 而在小鼠 ES 细胞分化时, 其表达水平显著下降.

rex1 基因是 Oct4 的靶基因之一. *rex1* 基因的启动子序列中含 octamer 元件, 该元件是启动子活性所必需的, 也是 Oct4 的结合位点, 在其邻近有 Sox2 的结合位点. 在 octamer 5' 端还有一正调控元件, 结合蛋白 Rox-1 能识别该位点并与其结合, 促进 Rex1 表达. 分析表明, 在 Rex1 蛋白的氨基酸顺序中, 1-35 是 Oct3/4 激活结构域, 61-126 是 Oct3/4 抑制结构域 [63]. 因此, Oct4 即能激活也能抑制 *rex1* 基因表达, 这可能取决于细胞所处环境. Rex1 蛋白能抑制小鼠 ES 细胞的分化, 但其作用机制还不清楚.

7.4 *foxd3*

Foxd3 (Forkhead family member D3) 属 forkhead 转录因子家族成员, 表达于 ES 细胞和表胚层, 但也表达于其后的神经嵴细胞, 是着床前和着床期小鼠胚胎发育所必需的因子. *foxd3*^{-/-} 小鼠的胚胎因表胚层缺失和近端胚外组织扩展而在着床后死亡, 体外也不能建立 *foxd3*^{-/-} 小鼠 ES 细胞系 [64]. Oct4 能与 Foxd3 的 DNA 结合结构域相互作用, 而且两者可结合到靶基因的同 DNA 调节序列. 在这一结合中, Oct4 是作为辅抑制子, 抑制谱系特异性基因的表达以保持适当的发育时机 [65]. 因此, Foxd3 与 Oct4 协同作用, 可抑制 ES 细胞或多能干细胞的分化.

7.5 *nanog*

Nanog 属于一种同源盒结构域蛋白 (homeobox domain containing protein). 与 *oct4* 一样, *nanog* 仅表达于 ICM 细胞、生殖细胞和 ES 细胞等, 是 ICM 细胞及 ES 细胞多潜能性维持所不可缺少的重要基因 [66, 67].

在小鼠 ES 细胞多潜能性的维持中, Nanog 与 LIF 有协同作用, 但 Nanog 既不受 LIF/STAT3 通路的调控, 也与 BMP/Smad 通路无关, 说明 Nanog 通路是独立于此两条通路之外的 [66-68]. 尽管 Nanog 的表达受到 Oct4 的调控, 但 *nanog* 的功能丧失表型 (loss-of-function phenotypes) 及基因过表达表型与 *oct4* 的不完全相同. *nanog*^{-/-} 鼠胚的 ICM 也不能产生表胚层, 只产生体壁和脏壁内皮细胞 (parietal and visceral endoderm cells) 构成的细胞团; *nanog* 过表达时, ES 细胞不依赖于 LIF 和其他因子的刺激能有效地维持自身的多潜能性. 这说明 Nanog 是通过一条与 Oct4 通路相互联系但不同的通路参与 ES 细胞多潜能性维持的.

Nanog 如何维持 ES 细胞的多潜能性呢? 一种可能的机制是 Nanog 抑制哪些引起 ES 分化的基因的表达和促进多潜能性维持相关基因的转录. 但是, 我们目前对 Nanog 的靶基因了解很少. 过表达 Nanog 的 ES 细胞虽保持较高水平的 Oct4 表达, 但这种作用很可能是间接的. 在正常 ES 细胞中, Nanog 是否调节 Oct4 表达还没有实验证据. 另外, 除了 Oct4 和 Sox2 外, Nanog 的上游因子还有哪些我们也未知. 因此, Nanog 通路及其在 ES 细胞多潜能性维持中的作用机制还需要深入研究.

8 小鼠 ES 细胞多潜能性维持的调控系统

ES 细胞多潜能性的维持是一个涉及多因子、多通路、多基因的复杂的调控系统, 这一系统在不同种属动物来源的 ES 细胞中可能有明显的差异. 目前, 我们对 ES 细胞多潜能性维持机制的理解主要来自于对小鼠 ES 细胞和早期胚胎发育的研究. 根据现有资料, 我们假定了一个小鼠 ES 细胞多潜能性维持的调控系统模型 (图 4).

适当水平的内源性因子 Oct4 和 Nanog 可能是多潜能小鼠 ES 细胞的维持所必需的, 它们分别代表了 2 条相互联系的、未完全阐明的 ES 细胞多潜能性维持通路. 而 *rex1*, *sox2*, *foxd3* 等基因是 Oct4 或 Nanog 的靶基因, 其基因产物又作为两者的辅因子, 间接发挥作用. Oct4-Sox2 复合物既激活 Oct4 表达, 也激活 Nanog 表达. 另外, Oct4 与 Sox2 协同抑制 ES 细胞向胚外内胚层的分化, 与 Foxd3 和 Rex1 分别作用抑制 ES 细胞的多向分化, 并通过 FGF4 促进 ES 细胞增殖,

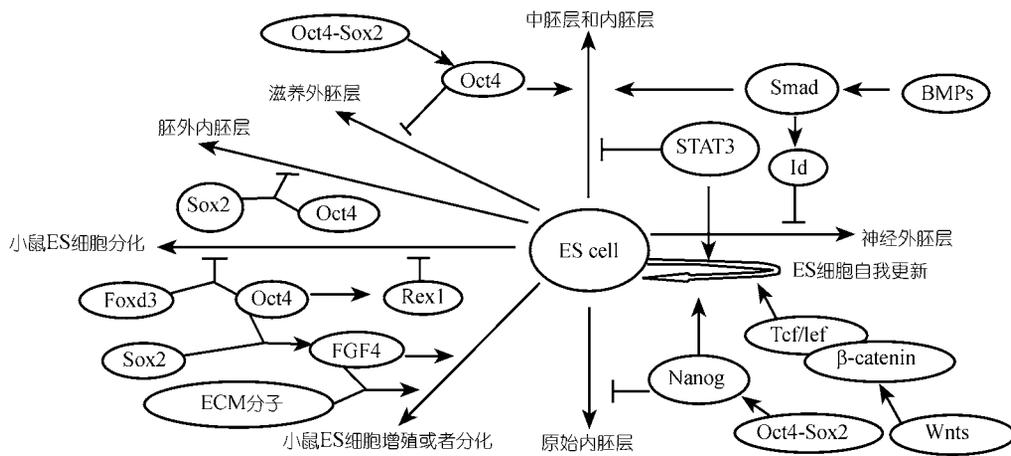


图 4 小鼠 ES 细胞多潜能性维持的调控系统模式图

Oct4 促进中胚层和内胚层分化, 而抑制滋养外胚层分化, 适当的 Oct4 表达水平是 ES 细胞多潜能性维持所必需的。Oct4-Sox2 复合物既激活 Oct4 表达, 也激活 Nanog 表达。Oct4 与 Sox2 协同作用一方面抑制胚外内胚层分化, 另一方面激活 FGF4 表达。FGF4 以及它与胞外基质分子的协同作用, 促进小鼠 ES 细胞增殖或分化。Oct4 与 Foxd3 相互作用以及通过激活 Rex1 基因表达可抑制 ES 细胞的多向分化。Nanog 以未知机制促进 ES 细胞自我增殖并抑制 ES 细胞向原始内胚层的分化。经典 Wnt 通路通过 β -catenin 与 Tcf/Lef 复合物激活靶基因表达维持 ES 细胞多潜能性。BMP/Smad 通路通过 Id 抑制神经外胚层分化。LIF 激活的 STAT3 抑制中胚层和内胚层分化, 并促进 ES 细胞自我更新

从而实现它们的 ES 细胞多潜能性维持作用。Oct4 抑制 ES 细胞向滋养外胚层的分化和 Nanog 对原始内胚层分化的抑制, 可能是小鼠 ES 细胞在体内和体外分化时不产生滋养外胚层和原始内胚层的重要原因。

外源性因子 BMPs 和 LIF 通过不同的但相互联系的通路维持小鼠 ES 细胞的多潜能性。LIF 似乎不参与早期胚胎中 ICM 细胞及表胚层细胞多潜能性的维持。因此, 小鼠多潜能 ES 细胞对 LIF 的需求可能是其对体外培养环境的一种适应现象。MEFs 或 STO 饲养层细胞分泌 BMPs 等多种细胞因子, 血清中也含有 BMPs 等。因此, 在正常的小鼠 ES 细胞培养体系中, BMPs/Smads 通路是活化的。LIF/STAT3 通路抑制小鼠 ES 细胞向非神经细胞的分化, BMPs/Smads 通路通过 Id 抑制小鼠 ES 细胞向神经外胚层分化, 并以未知机制促进 ES 细胞向非神经细胞的分化, 这种协同和补偿作用恰好维持了小鼠 ES 细胞在无血清培养体系中的多潜能性。虽然 bFGF 对小鼠 ES 细胞多潜能性的维持没有影响, 但过量的 FGF4 可能与 ECM 分子相互作用, 诱导小鼠 ES 细胞的分化。因此, 适当水平的 FGF4 表达可能也是小鼠 ES 细胞多潜能性维持所必需的。

PI3K 通路在小鼠 ES 细胞中有内源活性, 并可被 LIF/gp130 通路所激活和加强(图 4 中未注明)。该通路可能与其他的小鼠 ES 细胞多潜能性维持通路有广泛

的联系, 是各通路间相互作用的枢纽。经典 Wnt 通路在小鼠 ES 细胞中也有内源活性。在培养基中添加 BIO 或通过其他方式激活该通路, 可能都会有效地维持小鼠 ES 细胞的多潜能性。但该通路与其他的多潜能性维持通路之间的相互作用以及与多潜能性维持相关基因的关系我们还不清楚。

在小鼠 ES 细胞多潜能性维持的调控系统中, 上述因子和通路可能是并存和相互协同的。但不能排除其他未知的细胞因子、信号通路及相关基因在该调控系统中的重要作用。因此, 我们难以表明这一系统的精确调控网络。小鼠 ES 细胞多潜能性维持机制的阐明将最终解决 ES 细胞培养的难题, 并提供一个用于人 ES 细胞定向分化的范例。

9 人 ES 细胞多潜能性维持的可能机制

最近的研究表明, 人和小鼠 ES 细胞的自我更新机制既存在进化上的保守性, 也有明显的分歧。可以说, 人 ES 细胞是通过与小鼠 ES 细胞几乎不同的机制维持其多潜能性的。

人 ES 细胞多潜能性的维持同样需要 Oct4 和 Nanog 等内源性转录因子。在人 ES 细胞的多潜能性维持中, Oct4 的作用机制可能与小鼠 ES 细胞的相似, 反映了 Oct4 通路在进化上的保守性。Nanog 在未分化的人 ES 细胞中有高水平的表达, 但它在人 ES 细胞多潜

能性维持中的作用还缺乏充分的实验证据. Sox2 在人ES细胞中高水平的表达, 可能它与Oct4 形成的复合物同样在人ES细胞的多潜能性维持中发挥重要作用. Rex1 高水平表达于大多数入ES细胞系, 但在HES4 细胞系中不表达^[69], 说明它可能在入ES细胞的多潜能性维持中作用微弱或者不起作用. Foxd3 在不同的人ES细胞系中的表达水平有明显差异. 因此, Foxd3 不是入ES细胞多潜能性维持所必需的因子. 这些证据表明, Oct4, Nanog和Sox2 之间的相互作用是人ES细胞多潜能性维持的重要内部基础, 而Rex1, Foxd3 等其他因子也许是可有可无的, 或者只是在某些入ES细胞系中起作用(图5).

就目前所知, 与人ES细胞多潜能性维持有关的通路包括TGFβ/activin/nodal, Wnt/β-catenin, PI3K/Akt/PKB, bFGF和BMPs/Smads等通路. TGFβ/activin/nodal通路和bFGF通路是人ES细胞多潜能性维持所独有的 2 条通路, 它们对小鼠ES细胞多潜能性的维持没有促进作用. Wnt/β-catenin和PI3K/Akt/PKB通路在 2 种类型的ES细胞中都起作用, 但在通路机制上有很大的差异. BMPs/Smads通路的抑制促进入ES细胞的自我更新, 而它的激活则有助于小鼠ES细胞的多潜能性维持. 另外, 虽然LIF/gp130/STAT3 通路在未分化的人ES细胞中没有活性, 但入ES细胞中仍有STAT3 表达和磷酸化. 这可能是通过其他未知的信号通路进行的^[70], 并可能促进入ES细胞多潜能性的维持.

由 bFGF 诱导的 FGF 通路在人 ES 细胞多潜能性维持中具有重要作用. bFGF 与受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK)受体结合, 激活细胞内多条信号通路, 如 Ras/raf/mek, p38/MAPK, PKC 和 PK3K 等. 其中, PI3K/Akt/PKB 通路促进 ECM 分子表达, 抑制人 ES 细胞的分化, 而其他通路在人 ES 细胞多潜能性维持中的作用还不清楚. 另外, bFGF 通路还抑制 BMPs/Smads 通路的激活. TGFβ通路和 Wnt/β-catenin 通路之间也存在有益于入 ES 细胞多潜能性维持的相互对话. 因此, 人 ES 细胞多潜能性的维持同样需要多条通路间的协同作用. 从图 5 可以看出, 在人 ES 细胞多潜能性维持系统中, 还有许多问题需要研究.

10 结语

ES 细胞多潜能性的维持是内源性和外源性因子协同作用的结果. Oct4, Sox2 和 Nanog 是小鼠和人 ES 细胞的多潜能性维持都必需的内源性因子, 对 ES 细胞多潜能性的维持起关键作用. 外源性因子可能主要通过抑制细胞分化来维持 ES 细胞的多潜能性. 在外源性因子中, LIF, BMPs 和 Wnts 对小鼠 ES 细胞自我更新起作用, 而 TGFβ/activin/nodal, Wnts, bFGF 和/或 ECM 分子等是人 ES 细胞维持所必需的因子. 外源性因子诱导的信号通路激活内源性因子的表达. 但详细的机制以及通路间的相互作用还有待于进一步研究. 不同种属动物来源的 ES 细胞可能通过不完

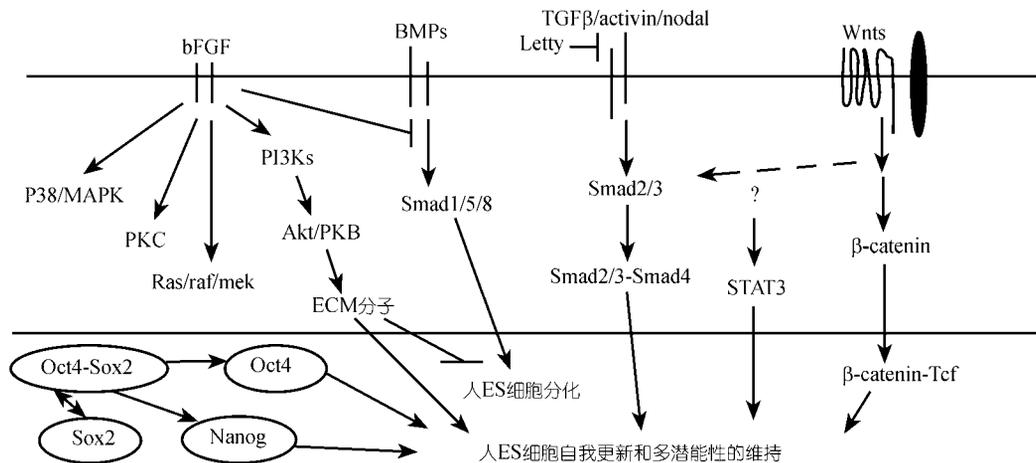


图5 人ES细胞多潜能性维持的可能机制

bFGF 通路一方面抑制 BMPs/Smads 通路的活性, 从而抑制入 ES 细胞分化; 另一方面, 通过 PI3K/Akt/PKB 途径促进 ECM 分子表达, 促进自我更新. 但 bFGF 激活的其他通路的作用还不清楚. TGFβ 通路与 Wnt/β-catenin 通路有协同作用. 这种协同可能在于 Wnt/β-catenin 途径促进或间接激活 Smad2, Smad3(虚线箭头所示). Oct4-Sox2, Oct4, Nanog, Sox2 及 STAT3 与入 ES 细胞多潜能性维持的关系也在图中表示了出来. 激活 STAT3 的上游因子还不清楚, 以“?”表示

全相同的机制维持各自的多潜能性, 因此, 维持 ES 细胞多潜能性的保守机制和分歧通路分析可能最终揭示不同种属动物来源的 ES 细胞多潜能性维持的详细机制。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 30300182)和中国科学院动物研究所客座研究基金(批准号: A5204094)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Donovan P J, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 92~97[DOI]
- 2 Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(9): 432~438 [DOI]
- 3 Nakashima K, Colamarino S, Gage F H. Embryonic stem cells: staying plastic on plastic. *Nat Med*, 2004, 10(1): 23~24 [DOI]
- 4 Taga T. The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med*, 1997, 29(1): 63~72
- 5 Nichols J, Chambers I, Smith A. Derivation of germline competent embryonic stem cells with a combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *Exp Cell Res*, 1994, 215(1): 237~239[DOI]
- 6 Niwa H, Burdon T, Chambers I, et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 1998, 12(13): 2048~2060
- 7 Raz R, Lee C K, Cannizzaro L A, et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 2846~2851[DOI]
- 8 Cartwright P, Mclean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 2005, 132(5): 885~896[DOI]
- 9 Burdon T, Stracey C, Chambers I, et al. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 1999, 210(1): 30~43[DOI]
- 10 Ernst M, Oates A, Dunn A R. Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 1996, 271(47): 30136~30143[DOI]
- 11 Boeuf H, Merienne K, Jacquot S, et al. The ribosomal S6 kinases, cAMP-responsive element-binding, and STAT3 proteins are regulated by different leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 46204~46211[DOI]
- 12 Anneren C, Cowan C A, Melton D A. The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J Biol Chem*. 2004, 279(30): 31590~31598[DOI]
- 13 Daheron L, Opitz S L, Zaehres H, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 770~778[DOI]
- 14 Humphrey R K, Beattie G M, Lopez A D, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 522~530[DOI]
- 15 Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*, 1999, 25(1): 91~93[DOI]
- 16 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113(6): 685~700[DOI]
- 17 Lai C F, Cheng S L. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 15514~15522[DOI]
- 18 Gallea S, Lallemand F, Atfi A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*, 2001, 28(5): 491~498[DOI]
- 19 Lee K S, Hong S H, Bae S C. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*, 2002, 21(47): 7156~7163[DOI]
- 20 Wiles M V, Johansson B M. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1): 241~248[DOI]
- 21 Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 183~186[DOI]
- 22 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. *Cell*, 2003, 115(3): 281~292[DOI]
- 23 Qi X, Li T G, Hao J, et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6027~6032[DOI]
- 24 Lyden D, Young A Z, Zagzag D, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 1999, 401(6754): 670~677[DOI]
- 25 Duval D, Reinhardt B, Keding C, et al. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J*, 2000, 14(11): 1577~1584[DOI]
- 26 von Bubnoff A, Cho K W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, 2001, 239(1): 1~14[DOI]
- 27 Pera M F, Andrade J, Houssami S, et al. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 7): 1269~1280[DOI]
- 28 Xu R H, Chen X, Li D S, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(12): 1261~1264[DOI]
- 29 Xu C, Rosler E, Jiang J, et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 315~323[DOI]
- 30 Xu R H, Peck R M, Li D S, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 185~190[DOI]
- 31 Topol L, Jiang X Y, Choi H, et al. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol*, 2003, 162(5): 899~908[DOI]
- 32 Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(5): 547~553[DOI]
- 33 Taipale J, Beachy P A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 2001, 411(6835): 349~354[DOI]
- 34 Moon R T, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*, 2002, 296(5573):

- 1644~1646[DOI]
- 35 Bienz M, Clevers H. Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus — proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol*, 2003, 5(3): 179~182[DOI]
- 36 Tolwinski N S, Wehrli M, Rives A, et al. Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5, 6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell*, 2003, 4(3): 407~418[DOI]
- 37 Meijer L, Skaltsounis A L, Magiatis P, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol*, 2003, 10(12): 1255~1266[DOI]
- 38 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004, 10(1): 55~63[DOI]
- 39 Reya T, Duncan A W, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, 423(6938): 409~414[DOI]
- 40 Chenn A, Walsh C A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, 2002, 297(5580): 365~369[DOI]
- 41 Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*, 2003, 17(10): 1189~1200[DOI]
- 42 James D, Levine A J, Besser D, et al. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 2005, 132(6): 1273~1282[DOI]
- 43 Besser D. Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2, -3. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 45076~45084[DOI]
- 44 Vallier L, Reynolds D, Pedersen R A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol*, 2004, 275(2): 403~421[DOI]
- 45 Amit M, Shariki C, Margulets V, et al. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 70(3): 837~845[DOI]
- 46 Vanhaesebroeck B, Waterfield M D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1): 239~254[DOI]
- 47 Hallmann D, Trumper K, Trusheim H, et al. Altered signaling and cell cycle regulation in embryonic stem cells with a disruption of the gene for phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 5099~5108[DOI]
- 48 Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2003, 423(6939): 541~545[DOI]
- 49 Paling N R, Wheadon H, Bone H K, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48063~48070[DOI]
- 50 Runyan C E, Schnaper H W, Poncelet A C. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2632~2639[DOI]
- 51 Kim S J, Cheon S H, Yoo S J, et al. Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 2005, 579(2): 534~540[DOI]
- 52 Xu C, Inokuma M S, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971~974[DOI]
- 53 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, 95(3): 379~391[DOI]
- 54 Saijoh Y, Fujii H, Meno C, et al. Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells*, 1996, 1(2): 239~252
- 55 Tomilin A, Remenyi A, Lins K, et al. Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*, 2000, 103(6): 853~864[DOI]
- 56 Fuhrmann G, Chung A C, Jackson K J, et al. Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell*, 2001, 1(3): 377~387[DOI]
- 57 Niwa H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 372~376[DOI]
- 58 Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, et al. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5307~5317[DOI]
- 59 Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(6): 2475~2485[DOI]
- 60 Ambrosetti D C, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(11): 6321~6329
- 61 Prudhomme W, Daley G Q, Zandstra P, et al. Multivariate proteomic analysis of murine embryonic stem cell self-renewal versus differentiation signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2900~2905[DOI]
- 62 Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 126~140[DOI]
- 63 Ben-Shushan E, Thompson J R, Gudas L J, et al. Rex1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(4): 1866~1878
- 64 Hanna L A, Foreman R K, Tarasenko I A, et al. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev*, 2002, 16(20): 2650~2661[DOI]
- 65 Guo Y, Costa R, Ramsey H, et al. The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endoderm-specific promoter expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 3663~3667[DOI]
- 66 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, 113(5): 631~642[DOI]
- 67 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113(5): 643~655[DOI]
- 68 Hart A H, Hartley L, Ibrahim M, et al. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn*, 2004, 230(1): 187~198[DOI]
- 69 Richards M, Tan SP, Tan J H, et al. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*, 2004, 22(1): 51~64[DOI]
- 70 Brandenberger R, Wei H, Zhang S, et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 707~716[DOI]

(2005-04-14 收稿, 2005-06-28 收修改稿)