



胚胎干细胞向内胚层分化的分子机制及其组学研究进展

赵文娟, 杨冬*, 贺福初

军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

* 联系人, E-mail: yangdongbprc@163.com

收稿日期: 2016-06-04; 接受日期: 2016-09-22; 网络版发表日期: 2016-11-11

国家自然科学基金(批准号: 31671376)、北京市科技新星计划(批准号: Z161100004916148)、国家国际科技合作专项(批准号: 2014DFB30020, 2014DFB30010)、国家重大科学研究计划(批准号: 2015CB910700, 2014CBA02001)和蛋白质组学国家重点实验室开放课题(批准号: SKLP-O201404)资助

摘要 胚胎干细胞(ESC)在发育过程中分化为内胚层、中胚层和外胚层3个胚层. 其中内胚层进一步向终末细胞的分化, 是形成整个消化道和呼吸道, 以及肝脏、胰腺等器官的基础. ESC形成内胚层主要经历以下几个分化阶段: 外胚叶的分化、原条的形成、内胚层与中胚层的分离以及定型内胚层的形成. 本文主要从信号通路、转录因子以及表观遗传调控等几个方面综述胚胎干细胞向内胚层分化的分子机制, 并重点介绍其组学研究进展, 以期为该领域研究者提供重要参考信息.

关键词 胚胎干细胞, 内胚层, 信号通路, 表观遗传, 组学

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)作为一类具有自我更新以及多向分化潜能的细胞群体, 是研究调控细胞命运转换以及动物发育分子机制的模型. ESC在多种细胞因子相互作用下, 可分化形成内、中、外3个胚层. 内胚层的进一步分化是形成消化道、呼吸道, 以及甲状腺、肝脏、胰脏、肺等器官的基础, 此外还可以形成胆囊以及卵黄囊的胚外成分^[1,2]. ESC向内胚层的分化, 是定向分化为相应器官细胞类型的第一步, 因而深入了解ESC向内胚层分化的分子机制, 对于更有效的ESC定向分化及其在临床治疗中的应用都具有重要意义.

1 胚胎干细胞向内胚层分化过程

1.1 内胚层在体内胚胎发育中的形成过程

在哺乳动物发育中, 内胚层的分化经过两次事件: 第一次在胚胎植入前形成胚外内胚层(extraembryonic endoderm)^[3]; 第二次则是在原肠胚形成过程中分化形成定型内胚层(definitive endoderm, DE). 以小鼠(*Mus musculus*)胚胎发育^[4]为例(图1A), 在小鼠原肠胚形成过程中, E5.5天多能性的外胚叶(epiblast)细胞分化形成, 随后形成内、中、外3个胚层. 大约E6.5天前侧外胚叶细胞形成外胚层, 而后侧外胚叶细胞随着细胞的

引用格式: 赵文娟, 杨冬, 贺福初. 胚胎干细胞向内胚层分化的分子机制及其组学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1345–1353
Zhao W J, Yang D, He F C. The molecular mechanisms and their omic studies in the endoderm-lineage differentiation of embryonic stem cells. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1345–1353, doi: [10.1360/N052016-00217](https://doi.org/10.1360/N052016-00217)

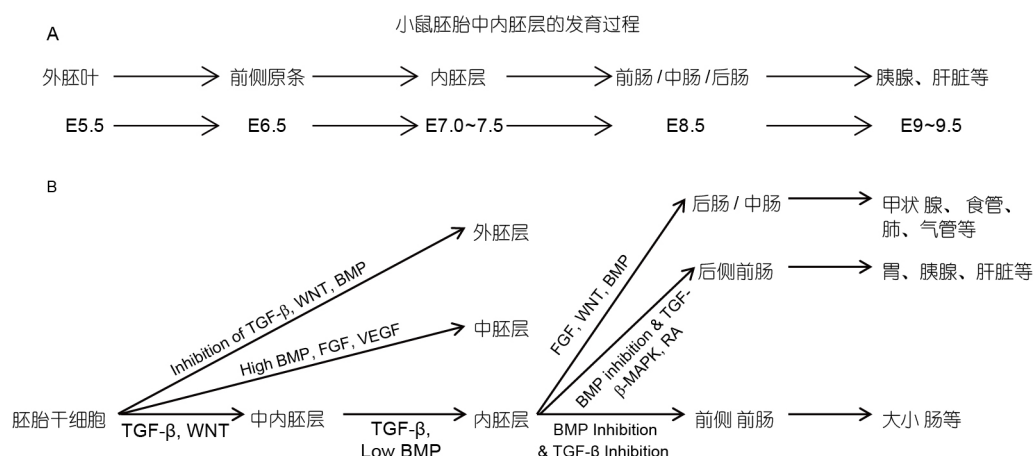


图1 内胚层发育及诱导分化模型

A: 小鼠胚胎发育过程中内胚层形成。在小鼠胚胎发育的5.5天形成外胚叶(epiblast), 6.5天形成前侧原条(primitive streak), 7.0~7.5天内胚层(endoderm)形成, 在8.5天形成前肠(foregut)、中肠(midgut)以及后肠(hindgut), 其中由前后特定的区域再形成内胚层器官原基, 如胰腺(pancreas)和肝脏(liver)等器官; B: 体外诱导ESC分化形成内胚层。该模型主要是对胚胎干细胞(ESC)分化为3个胚层, 以及内胚层向各个器官的分化。当抑制TGF-β, Wnt以及BMP能够诱导ESC向外胚层(ectoderm)分化; 中胚层(mesoderm)与内胚层的祖细胞——中内胚层则是通过激活TGF-β, Wnt信号通路; 当添加高浓度的BMP以及FGF, VEGF诱导中内胚层分化为中胚层; 而降低BMP含量同时结合TGF-β, Wnt则诱导内胚层的分化。这些信号不仅能够在此前3个胚层的分化阶段发挥作用, 其中BMP, FGF以及Wnt能够诱导内胚层分化为肺(lung)、甲状腺(thyroid)等器官, 同时还可以抑制后侧前肠的发育; 当抑制BMP、激活TGF-β能够诱导内胚层分化为胃(stomach)、胰腺和肝脏(liver)等器官; 同时抑制BMP, TGF-β则能够促进大小肠的形成。

迁移、嵌入形成原条(primitive streak, PS)。2002年Davidson等人^[5]在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的胚胎发育中发现, 中胚层与内胚层的祖细胞为“中内胚层”。同年Hardy等人^[6]在小鼠胚胎发育中同样证实“中内胚层”的存在。因此认为中胚层与内胚层来自于相同的前体细胞——原条, 也称之为中内胚层。在胚胎发育E7.0~7.5天, 原条期的细胞经过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)由前侧原条(anteriormost primitive streak, APS)产生前侧定型内胚层(anterior definitive endoderm, ADE), 随着胚胎的发育, 在E8.5天定型内胚层沿着前后轴线分化形成不同的前肠、中肠以及后肠区域, 从而形成消化道、呼吸道以及甲状腺、肝、胰、肺等器官; 而后侧原条(posterior primitive streak, PPS)则形成中胚层^[7~9], 之后中胚层可以形成心脏、血管等循环系统的组织器官以及骨骼、肌肉及其他结缔组织^[10]。

1.2 体外诱导ESC分化为内胚层

自ESC被发现以来, ESC为研究决定细胞命运的分子机制提供了一个强有力的系统。在发育过程中, 一种干/祖细胞能够向着多种谱系进行分化, 当一种

信号促进其中某一谱系的分化时伴随着对其他谱系抑制作用。体外诱导ESC分化的研究发现, 在不同的细胞因子刺激下, ESC能够向着不同的谱系进行分化(图1B)。Schuldiner等人^[11]采用8种细胞因子诱导ESC分化, 发现生长因子Activin A与TGFβ1能够诱导ESC形成中胚层细胞, Retinoic Acid, EGF, BMP4以及bFGF能够激活外胚层以及中胚层细胞表型分子的表达, 而NGF与HGF能够同时诱导3个胚层的分化, 说明这些细胞因子并不能够单独诱导ESC定向分化为某种细胞类型。

所以选择合适的细胞因子, 有助于高效诱导ESC定向分化为纯度高的内胚层细胞, 进一步诱导产生相应的组织和器官。Hinton等人^[12]发现, 高浓度的Activin A有助于直接诱导ESC向内胚层的分化。而Teo等人^[13]发现, 同单独添加Activin A相比, ESC在Activin A与BMP4结合的培养条件下, 能够提高约15%~20%的内胚层细胞的形成。Bernardo等人^[7]将Activin A与Wnt共同诱导ESC分化, 也发现能够形成表达SOX17与FOXA2等表型标志分子的内胚层。2014年Loh等人^[4]采用BMP, Wnt同时添加FGF诱导培养ESC分化形成前侧原条与后侧原条。此外, 通过应用动物血清培养或者饲养层

培养ESC也能够使其向着内胚层分化,但是这些培养条件产生的多是一些与其他谱系混合的内胚层细胞.因此,ESC向内胚层细胞分化的模型还处于不断优化中,对于其分子机制的深入了解,能够更有效地诱导ESC定向分化为内胚层及其衍生器官,为细胞治疗提供更有力的理论依据.

2 ESC向内胚层分化分子机制

ESC向各谱系细胞的分化是一个复杂的生物学过程,需要多种信号通路和转录因子来精细调控.全面认识ESC分化中经典信号通路的具体调控机制,具有十分重要的理论和应用价值.在此重点关注ESC向内胚层分化的分子机制.在ESC分化过程中,参与其向内胚层分化的信号通路主要有Activin/Nodal, BMP, TGF- β , 经典Wnt/ β -catenin, FGF/MAPK以及PI3K/Akt等信号通路(图2).

2.1 TGF- β 超家族信号通路及其基因表达调控网络

Activin/Nodal, BMP, TGF- β 信号通路均属于TGF- β

超家族,TGF- β 超家族分子是可溶性配体,能够结合I型受体和II型受体^[14].TGF- β 超家族调控下游靶基因的转录与表达主要依赖于Smad家族^[15,16].Smad作为转录调控因子能够诱导或者抑制其靶基因的表达,在不同的时间点以及空间上介导多种细胞命运特化.Activin/Nodal作为胞外信号分子,通过与II型膜受体——ActR II A或者ActR II B^[17,18]结合,它们能够招募且磷酸化I型受体ALK4/7(activin receptor-like kinases, ALK)形成受体复合物,该受体复合物通过受体锚定蛋白SARA(Nodal受体锚定蛋白为Cripto)招募转录因子Smad2/3并使其磷酸化,随后P-Smad2/3能够与Smad4形成转录复合物进入细胞核,与辅因子以及转录因子FoxH1, p53以及Mixer(*Xenopus mix-like endodermal regulator*)相互作用启动转录,从而诱导靶基因*Brachyury*, *Eomes*, *GSC*及*Nodal*的拮抗因子*Lefty*表达.TGF- β 信号通路^[19]诱导基因表达与Activin/Nodal信号通路相似,但其受体为TGFBR II或者TGFBR I /ALK5.

Mesnard等人^[25]研究发现,在原始内胚层阶段,Nodal与近侧内脏内胚层的表型分子*Lefty1*与*Hex*同时表达,参与了内脏内胚层的形成.Vallier等人^[29]发现,

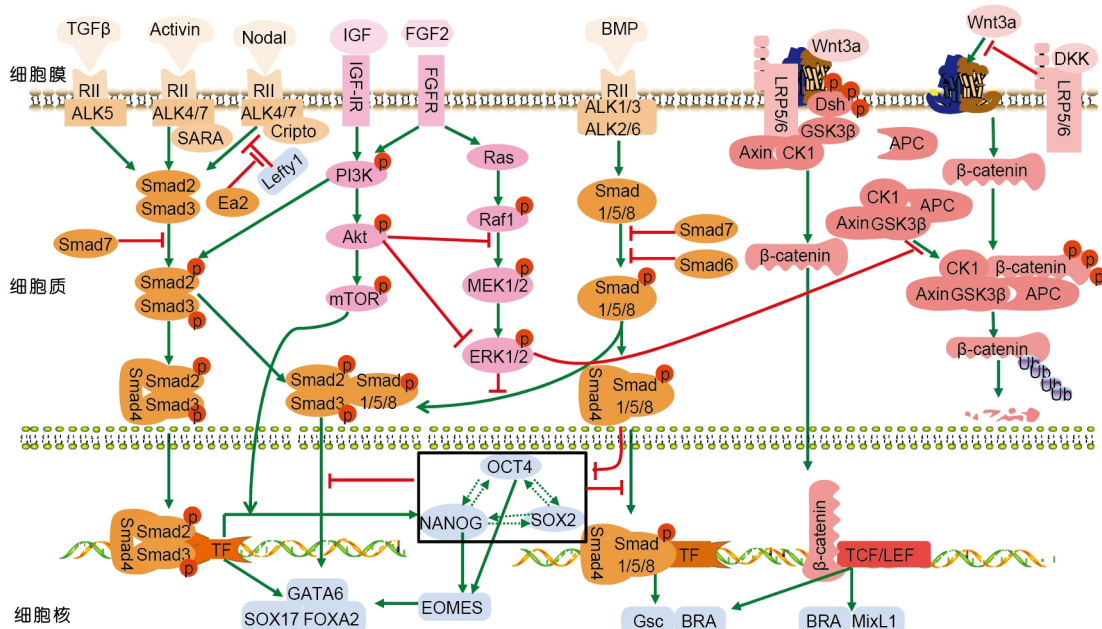


图2 ESC向内胚层分化的信号转导网络

根据已有文献报道^[1,8,20-28],绘制ESC分化过程中的信号转导网络图. Activin/Nodal, BMP, TGF- β , 经典Wnt/ β -catenin, FGF/ERK以及PI3K/Akt等信号通路参与ESC向内胚层分化. 图中展示了上述信号通路已知的主要成员及其调控关系, 以及各通路之间可能的相互作用. Ub: 泛素化修饰; p: 磷酸化修饰; TF: 转录因子; 红色箭头: 抑制作用; 绿色箭头: 诱导作用

Activin/Nodal信号通路通过Smad2/3复合体控制多能性细胞因子NANOG的表达,从而维持ESC的多能性.同时作者还发现,NANOG能够减弱Smad2/3的活性,限制Activin/Nodal信号通路诱导中内胚层向定型内胚层的分化.Wills和Baker^[30]发现,辅因子E2a作为信号分子Nodal的转录受体,能够改变Smad2/3在Nodal的抑制因子*lefty*上的结合位置,从而抑制*lefty*表达而促进中内胚层的特化.2011年,Teo等人^[31]发现,EOMES作为内胚层分化开始的早期标志分子,能够与Activin/Nodal信号通路主要胞内受体Smad2/3相互作用,从而促进内胚层的特化.当抑制Activin/Nodal信号通路时,内胚层不能够表达EOMES, MIXL1, GOOSECOID, SOX17和FOXA2等表型分子.Jiang等人^[32]发现,lncRNA DEANR1(definitive endoderm-associated lncRNA1)也能够促进FOXA2启动子招募Smad2/3,正调控内胚层转录因子FOXA2的表达而促进ESC向内胚层的分化.

与Activin/Nodal, TGF- β 信号通路不同BMP信号通路^[7,13]则需要额外的受体BMPRII, ActRII以及ALK1/3或者ALK2/6来招募Smad1/5/8, Smad1/5/8同样在被磷酸化修饰之后与Smad4形成受体复合物进入细胞核,通过抑制多能性基因*OCT4*, *SOX2*的表达而促进中内胚层转录因子Goosecoid以及BRACHYURY(BRA)的表达.此外, Smad1/5/8能够直接与Activin/Nodal信号通路胞内受体Smad2/3相互作用,诱导内胚层基因*SOX17*与*FOXA2*等表达.Vallier等人^[33]研究发现,当BMP4与Activin A共同诱导分化时则能够促进中内胚层的分化,此时细胞表达转录因子BRA以及其他中内胚层的标志基因.

2.2 Wnt信号通路及其基因表达调控网络

Wnt信号通路在细胞中发挥作用主要通过3条途径: Wnt/ β -catenin途径、PCP(平面细胞极性)途径和钙离子途径^[34,35].其中Wnt/ β -catenin也称经典Wnt信号通路,在胚胎发育中发挥着重要的作用^[28].该信号途径主要由受体蛋白Frizzled和LRP5/6,受体抑制蛋白Dickkopf, β -catenin以及Axin, GSK-3 β , CKI和APC多蛋白复合体组成.当Wnt信号不存在时,受体抑制蛋白Dickkopf能够与LRP5/6结合,从而阻止其与Frizzled发生作用.此时细胞质中的Axin, GSK-3 β , CKI和APC组成的降解复合体发生磷酸化修饰,诱导 β -catenin发生磷酸化,之后 β -catenin能够被泛素化酶修饰发生泛素化,

最终由蛋白酶体进行降解.当Wnt信号结合到细胞表面受体Frizzled上时,LRP5/6与Disheveled(Dvl)能够解除降解复合体,从而使 β -catenin能够被转运到细胞核中,结合并激活转录因子Tcf/Lef(T-cell factor/Lymphoid enhancer factor, T细胞因子/淋巴增强因子),诱导中内胚层靶基因*BRA*, *MixL1*表达^[14].Sherwood等人^[21]在小鼠发育E7.5的胚胎中发现,细胞能够表达内胚层标志基因*FOXA2*以及 β -catenin.在体外诱导小鼠以及人ESC分化时,采用Activin A诱导产生内胚层细胞;当添加低剂量的GSK-3 β 抑制剂时能够增加内胚层细胞的产生;当采用Wnt拮抗剂时则阻止内胚层细胞的分化.

2.3 FGF/ERK信号通路与PI3K/Akt信号通路及其基因表达调控网络

FGF/MAPK信号通路^[22]在胚胎发育、伤口愈合以及血管生成中扮演着重要的角色. FGF(fibroblast growth factor)能够通过受体FGFR进入细胞,激活多种信号转导通路,如Ras, MAPKs(mitogen-activated protein kinases), ERKs(extracellular signal-regulated kinases), PI3K/Akt, JNK(Jun N-terminal kinase)等.当FGF与受体FGFR结合,能够诱导FRS2(SNT)(FGFR stimulated Grb2 binding protein)中丝氨酸发生磷酸化修饰;反过来SNT能够招募GRB2(growth factor receptor bound protein-2), SOS, GAB1(GRB2 associated binding protein-1)以及SHP2(Src homology 2 phosphatase-2)与受体FGFR结合,持续激活Ras信号.激活的Ras信号能够介导Raf1-MEK-MAPK信号通路,诱导多能性基因*NANOG*的表达维持ESC多能性状态,同时能够抑制Smad2/3与Smad1/5/8结合,抑制其诱导内胚层分化的作用^[6].FGF2还能够激活PI3K/Akt信号通路^[36].磷酸化的Akt与下游mTOR相互作用,促进细胞长与增殖,参与ESC细胞的增殖与未分化状态的维持;另一方面激活的Akt反过来抑制Raf1的磷酸化,导致ERK1/2去磷酸化解除对GSK-3 β 的抑制作用. GSK-3 β 与降解复合体结合能够抑制 β -catenin入核,从而抑制内胚层的分化.Schroter等人^[22]发现,在ESC诱导分化为原始内胚层细胞(primitive endoderm, PrE)时需要抑制FGF/MAPK信号通路,从而确保转录因子GATA能够诱导PrE基因的表达.Villegas等人^[24]在小鼠ESC中发现, PI3K信号通路能够激活Akt1促进原始内胚层向前内胚层的过渡,从而证实PI3K信号通路参与内胚层的形成过程. Hardy

等人^[6]在鸡(*Gallus domesticus*)的胚胎研究中发现FGF信号能够通过RAS/MAPK与PI3K信号通路调控原条阶段细胞的迁移以及基因的表达。

2.4 各信号通路之间相互作用诱导ESC向内胚层分化

Activin/Nodal, BMP, TGF- β , 经典Wnt/ β -catenin, FGF/MAPK以及PI3K/Akt等信号通路均参与ESC向内胚层的分化, 然而它们如何协同作用从而诱导内胚层的形成一直是内胚层分子机制研究的核心问题。

Pauklin和Vallier^[20]发现, 一方面低浓度Activin A能够维持多能性基因*OCT4*, *NANOG*表达, 另一方面Activin A通过减少Smad1/5磷酸化(由BMP信号激活)抑制BMP介导的细胞分化过程。这一点充分证明, 单独采用Activin A并不能够有效诱导ESC向内胚层分化。Touboul等人^[37]在2010年通过将Activin A, FGF2, BMP4以及PI3K抑制剂相结合, 能够有效抑制Activin A在维持ESC多能性中的作用, 从而使ESC向着定型内胚层方向分化, 最终分化形成肝祖细胞。当采用高剂量的Activin A(100 ng/mL)能够增强内胚层细胞有效表达标志分子SOX17, GSC与Mixl1, 同时伴随着多能性细胞因子Oct4与NANOG的表达; 而抑制PI3K信号通路能够促进Activin A向内胚层诱导分化的作用, 但是并不能抑制其在维持ESC多能性中的作用; 而采用Activin A, FGF2, BMP4以及PI3K抑制剂相结合诱导的方式能够有效阻止多能性基因*NANOG*的表达。Loh等人^[4]在含有Activin A的培养体系中抑制BMP与Wnt信号之后, hESC不能够正常分化为原条。随后在分化形成的原条细胞中采用抑制剂中和内源性BMP, 结果发现中胚层标志基因*MESPI*出现3000倍下调而内胚层标记基因*SOX17*, *HHEX*, *FOXA1*和*FOXA2*则表达上调; 采用IWP2, Dkk1或者XAV939抑制内源性的Wnt信号也能够阻止hESC向中胚层的分化。因此认为BMP和Wnt信号不仅能够诱导原条的分化, 同时对于中胚层的诱导也起着一定的作用, 且持续提供BMP并不能够促进DE的形成。Gertow等人^[38]在2013年同样证实, 在缺少Activin A培养的条件下, Wnt-3a与BMP4能够协同促进中胚层的形成, 而不能够诱导ESC向内胚层的分化。Baxter等人^[39]诱导hESCs分化形成肝样细胞, 当添加Activin A后细胞在分化2~3天时高表达BRA, 随后FOXA2, GATA4与SOX17的表达量逐渐升高。同时

还发现在分化前两天添加Wnt-3a能够有效抑制低血清状态下分化细胞的死亡, 且提高FOXA2, GATA4与SOX17的表达量。Sakaki-Yumoto等人^[23]研究内质网中非折叠效应蛋白(unfolded protein response, UPR)对内胚层特化的作用时发现, UPR能够通过增强Smad2的磷酸化和 β -catenin的核转录诱导内胚层的特化。而FGF2能够激活ERK信号从而抑制GSK-3 β 与 β -catenin的结合, 促进Wnt/ β -catenin信号通路对内胚层的诱导作用。综上所述, 在ESC向内胚层的分化过程中, Activin A信号通路虽然占据着核心地位, 但仍需要与其他信号通路协同作用才能够更为有效地诱导ESC形成均质性强的内胚层细胞。

3 多组学数据整合分析应用于ESC向内胚层分化分子机制的研究

ESC具有向多谱系分化的潜能, 然而体外诱导ESC分化以期获得纯度较高的单一细胞群体, 目前来说很难实现。在诱导ESC分化体系中, 研究者往往通过添加生长因子、小分子化合物、细胞内应答效应分子等激活一些信号通路, 从而诱导ESC向部分谱系分化^[40]。Touboul等人^[37]利用多种细胞因子诱导hESC产生功能性的肝细胞, 通过检测肝细胞核因子4a(HNF4a)和甲胎蛋白(AFP)的表达来监测肝细胞产生, 而这两个细胞因子则是肝祖细胞早期阶段表达的标志基因。这种基于选择性标志物对ESC分化谱系的筛选, 或者采用PCR技术验证分化细胞的mRNA表达水平, 均不能够很好地阐明控制ESC分化过程的转录调控网络。

随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来, 越来越多平行且高准确性的组学数据被产出, 而不同的组学数据在不同水平对生命科学进行了诠释。如基于新一代测序技术(next generation sequencing, NGS)、转录组测序技术(RNA-seq)、全基因组甲基化测序(whole-genome bisulfite sequencing, WGBS)以及质谱技术等, 基因组、转录组、蛋白质组以及表观遗传组等组学数据呈指数形式飞速增长, 这些“组学”, 其独特的认识论和方法论, 迅速成为生命科学的推动力, 推动学科再创新高^[41]。运用多组学数据整合分析成为在全基因组范围内寻找细胞分化相关的关键分子及调控网络的重要手段^[42~44]。

在ESC诱导分化中, 核心的转录因子, 如SOX2,

OCT4与NANOG和信号通路的转录效应蛋白,如SMAD2/3和TCF1发挥着重要的作用,了解这些转录因子在基因组中的结合位点及谱系特异性表达模式有助于更好地阐明其在ESC诱导分化过程中扮演的角色. 2013年Gifford等人^[45]对ESC分化为3个胚层的转录组数据进行分析,发现在分化的前24 h内检测筛选到541个有表达值的基因,其中与谱系特化相关的268个基因发生了动态变化. 其中OCT4, NANOG等多能性基因在内胚层细胞群体中维持表达状态,证实多能性基因OCT4与NANOG在早期内胚层的特化中发挥着重要的作用. 2015年Tsankov等人^[43]对筛选到的38个高质量的转录因子进行分析,证实转录因子具有谱系特异性选择的现象,如FOXA2与HNF4A在内胚层中表达上调, HAND1与SNAI2则在中胚层表达量最高,而OTX2与PAX6在外胚层中表达上调. 对转录因子的RNA-seq数据分析发现,中内胚层标志基因EOMES, BRA其表达量在ESC向内胚层分化过程中呈动态变化,分化12 h表达量达最高,随后表达下降,证明ESC向内胚层分化需经历中间状态——中内胚层.

当然,在调控基因转录过程中表观遗传修饰也发挥着一定的作用. 表观遗传修饰能够通过DNA甲基化以及组蛋白修饰等方式调控基因转录. 例如, Xie等人^[44]发现在ESC多谱系分化的早期阶段,被激活的启动子更倾向于CG富集,而在未分化阶段启动子的沉默则由H3K27me3所调控. 结合转录组数据以及表观遗传数据研究, Gifford等人^[45]发现,在未分化ESC中, DNA甲基化和H3K4me1的谱系特异性动态变化经常出现在绑定有多能性细胞因子的远端调控元件上,并不位于启动子附近. 而在内胚层细胞群体中H3K4甲基化的丢失(me1与me3)常常伴随着DNA甲基化的高度富集. 2011年Teo等人^[31]通过结合全基因组数据和染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)数据发现多能性转录因子SOX2, OCT4与NANOG能够调控内胚层特化. 在未分化状态, SOX2, OCT4与NANOG能够结合内胚层的基因EOMES的增强子区域,抑制其表达,从而维持未分化状态. 随着分化过程的进行,在后侧原条形成中SOX2快速向神经外胚层迁移,不再抑制EOMES. 但OCT4与NANOG仍能够与EOMES相互作用,促进ESC向内胚层分化. Tsankov等人^[43]整合RNA-seq与ChIP-seq数据,分析发现在ESC向3个胚层分化过程

中, H3K4me1区域高度富集内胚层转录因子FOXA1/2, GATA4, GATA6和SOX17; 与谱系特化相关的转录因子(如GATA4, GATA6, OTX2, SOX17)的结合位点与DNA甲基化动态变化区域重叠,其靶基因的表达与DNA甲基化的丢失有着密切的联系.

尽管通过转录组数据同时结合表观遗传修饰数据全面分析ESC向内胚层分化过程的转录调控模式,有助于阐明ESC分化的分子机制,但研究发现转录本证据并不能够直接反应基因在蛋白水平的变化. 许多蛋白的合成是通过翻译后修饰调控的,蛋白质翻译后修饰影响着细胞内的主要生物学过程,如细胞增殖、分化、凋亡、信号转导等,其中磷酸化蛋白质组学主要应用于细胞信号转导相关科学问题的研究,尤其在干细胞多能性维持及分化机制研究中已取得丰硕成果^[40]. Brill等人^[46]利用蛋白质组学技术对人胚胎干细胞及其衍生细胞的磷酸化蛋白质组进行了全面分析,共鉴定到1602种磷酸化蛋白质及数种新的调控胚胎干细胞分化的激酶. Van Hoof等人^[47]对人胚胎干细胞经BMP4诱导的早期分化中全蛋白质组及磷酸化蛋白质组的动态变化进行了检测,共鉴定到5222种蛋白,其中1399种是发生了磷酸化修饰的. 对应于3067个磷酸化位点. 大约1/2的磷酸化修饰水平在分化的1 h内上调,表明在ESC早期分化中存在复杂的磷酸化修饰的网络动态变化. Rigbolt等人^[48]采用不同诱导条件培养ESCs,对其分化24 h内的磷酸化修饰动态变化进行研究,共检测到6521种蛋白,其中4335种磷酸化蛋白含有23522个磷酸化修饰位点,其中50%以上的蛋白发生了磷酸化动态变化. 同时在ESC早期分化中,一些DNA甲基转移酶(DNMTs)存在磷酸化动态变化. 其中DNMT3A与DNMT3B与转录延伸复合体——聚合酶因子1(PAF1)有着特异性的相互作用. 这一发现提示在分化早期DNA甲基化与多能性细胞因子(OCT4, NANOG)的基因沉默相关. 然而目前,对于已经产出的ESC磷酸化蛋白质组学数据,其中一些已检测到的磷酸化位点的特征及其对应的磷酸化蛋白所发挥的功能仍然不清楚,因此对于这些数据集的进一步研究是对ESC磷酸化蛋白质组研究的第一步. 此外,以往研究考虑到磷酸化修饰动态变化的瞬时效应,忽略了ESC向某种特定终末期细胞分化过程中磷酸化修饰的动态变化特征^[40].

4 总结与展望

综上所述, Activin/Nodal, BMP, TGF- β , 经典Wnt/ β -catenin, FGF/MAPK以及PI3K/Akt等信号通路之间多路径多位点的相互作用, 影响细胞核内众多转录因子的表达, 从而调控ESC的自我更新以及向内胚层分化的潜能. 在ESCs向内胚层分化过程中Activin信号通路发挥着核心的作用, 而其他信号分子诱导ESCs向内胚层分化是一个剂量依赖性的过程, 例如, 低浓度BMP在内胚层分化早期能够促进ESCs分化形成前侧原条, 而在后期则抑制向内胚层的分化, 反而对中胚层的分化有着诱导的作用.

同时随着高质量、高准确性组学数据的大量产出, 利用多组学数据研究ESC分化分子机制已成为此领域研究的一大热点. 但是目前这一方向的研究还存在一些问题, 如不同来源的数据整合等. 由于来源于不同实验室和不同实验批次的材料、环境、方案以及仪器设备不同等原因, 造成数据来源的不均一, 因此, 针对此问题, 选择合适的科学问题及科学合理的统计学方法是非常必要的. 今后, 随着生命组学从数据产出、数据质控及数据挖掘的标准化的实现, 组数据挖掘在ESC分化机制研究中必将得到更充分的应用.

参考文献

- 1 D'Amour K A, Agulnick A D, Eliazar S, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1534–1541
- 2 Zorn A M, Wells J M. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 221–251
- 3 Boroviak T, Loos R, Lombard P, et al. Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Dev Cell*, 2015, 35: 366–382
- 4 Loh K M, Ang L T, Zhang J, et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 237–252
- 5 Davidson L A, Hoffstrom B G, Keller R, et al. Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin $\alpha 5 \beta 1$, fibronectin, and tissue geometry. *Dev Biol*, 2002, 242: 109–129
- 6 Hardy K M, Yatskievych T A, Konieczka J, et al. FGF signalling through RAS/MAPK and PI3K pathways regulates cell movement and gene expression in the chicken primitive streak without affecting E-cadherin expression. *BMC Dev Biol*, 2011, 11: 20
- 7 Bernardo A S, Faial T, Gardner L, et al. BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 144–155
- 8 Blauwkamp T A, Nigam S, Ardehali R, et al. Endogenous Wnt signalling in human embryonic stem cells generates an equilibrium of distinct lineage-specified progenitors. *Nat Commun*, 2012, 3: 1070
- 9 Gadue P, Huber T L, Paddison P J, et al. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an *in vitro* model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16806–16811
- 10 Murry C E, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008, 132: 661–680
- 11 Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11307–11312
- 12 Hinton A, Afrikanova I, Wilson M, et al. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2010, 19: 797–807
- 13 Teo A K K, Ali Y, Wong K Y, et al. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2012, 30: 631–642
- 14 Payne C, King J, Hay D. The role of activin/nodal and Wnt signaling in endoderm formation. *Vitam Horm*, 2011, 85: 207–216
- 15 Heldin C H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, 390: 465–471
- 16 Mullen A C, Orlando D A, Newman J J, et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell*, 2011, 147: 565–576
- 17 Wrana J L, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 1994, 370: 341–347
- 18 Tsuchida K, Nakatani M, Yamakawa N, et al. Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 220: 59–65
- 19 Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113: 685–700

- 20 Pauklin S, Vallier L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development*, 2015, 142: 607–619
- 21 Sherwood R I, Maehr R, Mazzoni E O, et al. Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. *Mech Dev*, 2011, 128: 387–400
- 22 Schroter C, Rue P, Mackenzie J P, et al. FGF/MAPK signaling sets the switching threshold of a bistable circuit controlling cell fate decisions in embryonic stem cells. *Development*, 2015, 142: 4205–4216
- 23 Sakaki-Yumoto M, Liu J, Ramalho-Santos M, et al. Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *J Biol Chem*, 2013, 288: 18546–18560
- 24 Villegas S N, Rothová M, Barrios-Llerena M E, et al. PI3K/Akt1 signalling specifies foregut precursors by generating regionalized extra-cellular matrix. *eLife*, 2013, 2: e00806
- 25 Mesnard D, Guzman-Ayala M, Constam D B. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development*, 2006, 133: 2497
- 26 艾宗勇, 赵淑梅, 李天晴. 灵长类原始态多能干细胞的研究与挑战. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 1203–1213
- 27 雷晓华, 邓智利, 段恩奎, 等. 机械力及力学信号转导影响干细胞命运的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 639–648
- 28 苏尚, 吴畏. Wnt/ β -catenin 信号通路对靶基因转录的调控. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 1029–1042
- 29 Vallier L, Mendjan S, Brown S, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development*, 2009, 136: 1339–1349
- 30 Wills A E, Baker J C. E2a is necessary for Smad2/3-dependent transcription and the direct repression of lefty during gastrulation. *Dev Cell*, 2015, 32: 345–357
- 31 Teo A K K, Arnold S J, Trotter M W B, et al. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through coesodermin. *Genes Dev*, 2011, 25: 238–250
- 32 Jiang W, Liu Y, Liu R, et al. The lncRNA *DEANR1* facilitates human endoderm differentiation by activating *FOXA2* expression. *Cell Rep*, 2015, 11: 137–148
- 33 Vallier L, Touboul T, Brown S, et al. Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 2655–2666
- 34 Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med*, 2006, 38: 1–10
- 35 Clevers H, Loh K M, Nusse R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 2014, 346: 1248012–1248012
- 36 Vallier L, Alexander M, Pedersen R A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 2005, 118: 4495–4509
- 37 Touboul T, Hannan N R F, Corbinau S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*, 2010, 51: 1754–1765
- 38 Gertow K, Hirst C E, Yu Q C, et al. WNT3A promotes hematopoietic or mesenchymal differentiation from hESCs depending on the time of exposure. *Stem Cell Rep*, 2013, 1: 53–65
- 39 Baxter M, Withey S, Harrison S, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*, 2015, 62: 581–589
- 40 Hutchins A P, Robson P. Unraveling the human embryonic stem cell phosphoproteome. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 126–128
- 41 He F C. Lifeomics leads the age of grand discoveries. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 201–212
- 42 Yang D, Ma Z, Lin W, et al. Identification of KAP-1-associated complexes negatively regulating the Ey and β -major globin genes in the β -globin locus. *J Proteomics*, 2013, 80: 132–144
- 43 Tsankov A M, Gu H, Akopian V, et al. Transcription factor binding dynamics during human ES cell differentiation. *Nature*, 2015, 518: 344–349
- 44 Xie W, Schultz M D, Lister R, et al. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, 2013, 153: 1134–1148
- 45 Gifford C A, Ziller M J, Gu H, et al. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell*, 2013, 153: 1149–1163
- 46 Brill L M, Xiong W, Lee K B, et al. Phosphoproteomic analysis of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 204–213
- 47 Van Hoof D, Muñoz J, Braam S R, et al. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 214–226
- 48 Rigbolt K T G, Prokhorova T A, Akimov V, et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal*, 2011, 4: rs3–rs3

The molecular mechanisms and their omic studies in the endoderm-lineage differentiation of embryonic stem cells

ZHAO WenJuan, YANG Dong & HE FuChu

*State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing),
Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China*

The embryonic stem cells (ESC) can be differentiated into three germ layers, known as endoderm, mesoderm and ectoderm. Endoderm, which generates terminally differentiated cells, lays the foundation for generating the respiratory and digestive systems as well as the functional organs such as liver and pancreas. The differentiation of ESC into endoderm includes four main stages: the differentiation into epiblast, the formation of primitive streak, the separation of endoderm and mesoderm, the eventual formation of definitive endoderm (DE). The molecular mechanisms of endoderm-lineage differentiation of ESC are summarized in this review. We mainly focus on the key signaling pathways, transcription factors, epigenetic regulation mechanisms in the four processes. The progress of the multi-omic studies of these mechanisms are highlighted. This review may provide important referenced information for the researchers in this field.

embryonic stem cell, endoderm, signaling pathway, epigenetic, omics

doi: [10.1360/N052016-00217](https://doi.org/10.1360/N052016-00217)