



源于干细胞的囊胚样结构: 研究现状与展望

罗宇欣¹, 戚亚男¹, 于洋^{1,2,3*}

1. 北京大学第三医院生殖医学中心, 北京 100191;

2. 北京大学临床干细胞研究中心, 北京 100191;

3. 细胞生态海河实验室, 天津 300051

* 联系人, E-mail: yuyang5012@hotmail.com

2023-05-22 收稿, 2023-07-23 修回, 2023-07-25 接受, 2023-07-26 网络版发表

国家杰出青年科学基金(82225019)、国家重点研发计划(2021YFC2700303)、国家自然科学基金(82192873)和细胞生态海河实验室创新基金(HH22KYZX0004)资助

摘要 由于样本和伦理的限制, 人类早期胚胎发育中仍有许多未完全阐明的问题. 而类囊胚的出现使得构建体外模拟胚胎发育, 尤其是植入前、植入和早期植入后过程的类器官系统成为可能. 但初始方案的类囊胚构建效率较低, 且对受精囊胚的模拟还存在较大差异, 因此研究人员探索利用不同类型细胞以及不同诱导体系, 提高类囊胚的构建效率, 并获得了在形态学和转录组水平上更类似于受精囊胚的模型. 除了转录组分析, 蛋白组和翻译后修饰的组学也被用于探索类囊胚形成的分子机制和与受精囊胚的相似性. 同时, 类囊胚已经被作为研究模型探索不同基因组特征对胚胎发育的影响以及潜在作用机制. 因此, 我们总结了近期小鼠和人类的类囊胚模型的研究进展及新型全能样细胞参与构建类囊胚的未来前景.

关键词 胚胎发育, 囊胚, 类囊胚, 植入, 多能干细胞, 全能样细胞

对人类胚胎发育的理解来源于体外受精的胚胎^[1,2]以及卡内基研究所获得的福尔马林固定的胚胎标本的形态测量和定性评估^[3,4], 同时利用组学技术也获得了更细致的人类胚胎发育分子图谱^[5]. 而通过小鼠和非人灵长类的研究, 人们也获得了许多关于哺乳动物胚胎发育的信息, 并且通过对人类胚胎发育的保守性分析, 部分补充了对人类胚胎发育理解的空白. 虽然小鼠和人类的胚胎植入前发育过程相对保守, 但植入时与子宫接触的胚胎部位和植入后的胚胎形态有显著差异: 人类胚胎植入部位为外胚层(epiblast, EPI)直接相连的滋养外胚层(trophectoderm, TE)——极滋养外胚层, 而小鼠胚胎植入部位为EPI对侧的TE——壁滋养外胚层; 植入后小鼠胚胎呈卵圆柱形, 而人类胚胎呈胚盘样^[6]. 考虑到人类胚胎样本的数量稀少和伦理限制, 对人类

早期胚胎的全面深入研究需要新的模型.

近年来, 利用多能干细胞在体外可以产生类胚胎、类囊胚和类原肠胚等模拟早期发育的三维(three dimensions, 3D)结构, 这些3D结构能够以精细和高度定量的方式揭示复杂的胚胎发育事件. 类囊胚已经成为补充受精胚胎研究以及揭示特定基因和信号通路对早期胚胎发育影响的优质模型^[7], 能够模拟植入前的关键胚胎发育事件, 并在适当的培养条件下重现植入和早期植入后的特征事件. 在人类胚胎数量稀少和伦理限制的前提下, 人类的类囊胚具有代替受精胚胎和囊胚探索人类胚胎发育奥秘的潜在价值.

类囊胚需要精准地重现受精囊胚的结构, 且在诱导过程中模拟早期胚胎的发育事件. 类囊胚的内部有细胞团(inner cell mass, ICM)以及含液腔的球形结构,

引用格式: 罗宇欣, 戚亚男, 于洋. 源于干细胞的囊胚样结构: 研究现状与展望. 科学通报, 2023, 68: 3735–3745

Luo Y X, Qi Y N, Yu Y. Blastoids derived from pluripotent cells: Current research status and future prospect (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 3735–3745, doi: [10.1360/TB-2023-0485](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0485)

具有受精囊胚的3个细胞谱系,即EPI、原始内胚层(primitive endoderm, PrE)和TE,其在形成过程中能够模拟受精囊胚的2次胚胎细胞分化过程^[8]。首次报道的类囊胚是将对应于受精囊胚植入前EPI的小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)和对应于TE的小鼠滋养层干细胞(mouse trophoblast stem cells, mTSCs)在3D诱导体系中诱导形成^[7]。随后,许多研究使用不同类型多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)和不同信号通路调控分子及生长因子的诱导体系获得了多种类囊胚模型^[9-15]。在小鼠类囊胚的研究基础上,目前也已经发展了多种人类的类囊胚诱导体系^[16-21],且类囊胚的诱导效率在部分研究中可以达到近80%^[17,20]。

本文总结了构建小鼠和人类类囊胚的诱导体系,并对这些体系进行比较,同时介绍了近年来通过化学小分子等方式获得的具有全能性特征的小鼠和人类全能性细胞作为细胞来源参与类囊胚诱导的潜力,最后探讨了类囊胚研究的未来前景。

1 小鼠类囊胚的研究进展

2018年, Rivron等人^[7]首次在体外构建了形态学和转录水平类似于小鼠受精3.5 d的囊胚结构,被称为类囊胚。mESCs和mTSCs在3D悬浮条件下培养65 h后,能够形成含有液腔和ICM的典型受精囊胚结构。利用类囊胚模型发现,胚胎细胞通过STAT和MAPK信号通路调节TE的增殖和自我更新,而BMP4、Nodal和WNT信号通路调节TE的上皮形态发生^[7]。近年来,小鼠类囊胚的研究已经取得较多进展(表1),为类囊胚领域快速发展奠定了基础。

在小鼠类囊胚中,由于mESCs缺乏诱导形成TE的能力,因此除了将mESCs和mTSCs共培养外,寻找更高分化潜能的PSCs是高效获得小鼠类囊胚的另一种策略。扩展潜能的多能干细胞(expanded or extended pluripotent stem cells, EPSCs)是相比于PSCs具有更高分化潜能的干细胞,能够同时分化为胚内和胚外谱系细胞^[22],因此被认为可以作为诱导类囊胚的潜在细胞类型之一。以1:2比例组合mEPSCs与mTSCs诱导产生的类囊胚(EPS/TS-blastoids)在低氧条件下的形成率有15.17%^[11]。而仅用mEPSCs单一细胞类型也可以构建类囊胚(EPS-blastoids),效率约15%^[10]。EPS-blastoids和EPS/TS-blastoids都含有受精囊胚的3个细胞谱系,并与受精囊胚具有相似的形态学特征,且类囊胚的诱导过程重现了从植入前到围植入期的关键发育事件,包括

胚胎致密化、胚胎极化和TE分化等。此外,体内移植和体外延长培养实验反映了EPS-blastoids具有植入小鼠子宫并启动早期植入后发育的潜能。仅由单种细胞,即来源于同种基因型和表观遗传特征的EPS-blastoids,有助于获得更多的胚胎发育过程中的遗传和表观遗传信息^[10]。此外, Min等人^[9]对EPS-blastoids构建过程中胚胎极化(第3天)和TE分化(第5天)阶段的类囊胚进行蛋白质组学分析,发现第3天和第5天类囊胚的蛋白表达具有类似于受精胚胎的八细胞到桑椹胚的特征,而第5天类囊胚的蛋白表达与受精囊胚具有差异,这种差异可能是导致EPS-blastoids缺乏长期植入后发育潜能的原因之一。类囊胚和受精囊胚的差异表达蛋白富集在碳代谢通路,进一步分析代谢物发现在类囊胚培养过程中葡萄糖含量下降,葡萄糖类似物替代实验也提示葡萄糖代谢通路会通过YAP等通路调节类囊胚的形成,其中糖原代谢途径关键蛋白磷酸化修饰异常是导致类囊胚发育潜能受限的关键。对EPS-blastoids的蛋白质和蛋白质磷酸化修饰的动态特征分析,提供了进一步改善类囊胚体系的重要信息^[9]。

Posfai等人^[23]对两种mEPSCs诱导的类囊胚转录组学数据深入分析发现,虽然在基因调控水平上,2种mEPSCs构建的类囊胚与受精囊胚整体趋势基本一致,但是在TE谱系上存在较大差异,仅有6.7%的EPS-blastoids细胞聚集在TE谱系附近。在EPS/TS-blastoids中,同样没有观察到mEPSCs参与TE谱系的形成,提示在该体系中,mEPSCs不能在缺乏TSCs的情况下形成类囊胚^[23]。为了确证EPS-blastoids中TE谱系细胞的真实来源,将EPS-blastoids依据结构特征分出ICM和TE,并分别进行单细胞转录组测序和数据分析^[24]。结果显示,ICM中混杂包括TE样细胞等多种细胞类型,而TE则主要包含PrE谱系的细胞,但是各细胞类型总体比例与前期研究结果相似^[10]。依据单细胞转录组数据分析结果推测,EPS-blastoids的细胞来源可能为外侧PrE相关细胞包绕ICM并形成液腔出现类囊胚结构,但是缺少功能性TE来源细胞的正确定位。通过四倍体补偿实验提供功能性TE细胞,EPS-blastoids能够形成完整的胚胎结构并含有全部PrE谱系的细胞类型,甚至能够出生、发育和生育后代,但是由四倍体胚胎消化获得的单细胞与EPS-blastoids共移植则无法获得子代小鼠,提示存活子代的获得需要有功能的3D形态TE参与。这种功能性TE细胞补充的策略也提供了获得功能性类囊胚的可选方案^[24]。

表 1 小鼠类囊胚的研究进展总结

Table 1 The research progress of mouse blastoids

文献	参与构建的细胞系	诱导方案	起始细胞种植数量	空腔化时间	形成空腔化效率	类囊胚评估实验	发育阶段	优势	局限
Rivron 2018 ^[7]	mESCs, mTSCs	首先在微孔板种植mESCs, 用mESC培养基培养; 24~36 h后加入mTSCs共培养(此时记为0 h), 使用类囊胚培养基, 24 h额外再加入8Br-cAMP, 48 h形成类囊胚, 65 h囊胚结构扩大并稳定	约5个mESCs和12个mTSCs	48~65 h	约12%	1. 形态学: 依据受精3.5天的囊胚, 70~110 μm, 单层mTSCs包围一个规则空腔和mESCs的细胞团。 2. 分子水平: qRT-PCR、RNA-seq, scRNA-seq类似于胚胎3.5天的囊胚, 免疫荧光。 3. 功能实验: 获取功能性mTSCs和mTSCs。 4. 植入后发育潜能: 体内移植入子宫诱导其蜕膜化	类似于3.5~4.5天的胚胎。体内移植入子宫后, 类囊胚中的滋养层细胞表达滋养层巨细胞的标志基因, 并且产生大量细胞表达植入后滋养层细胞的标记基因	首个构建的类囊胚模型, 探讨了类囊胚构建过程中信号通路的作用。分析了胚胎细胞与胚胎外细胞之间的互作, 揭示胚胎细胞维持滋养层细胞增殖和分化, 发现BMP4/Nodal-KLF6轴实现滋养层上皮细胞形态发生	类囊胚构建的效率较低, PrE部分发育不完全
Li 2019 ^[10]	mEPSCs	将细胞种在微孔板(此时记为0 h), 使用KSOM:N2B27 basal medium:TSC basal medium (2:1:1)加上Y27632培养, 24 h后, 去掉Y27632, 96 h时形成类囊胚结构	约5个细胞	72 h	约15% 单个mEPSCs的效率约2.7%	1. 形态学: 典型囊胚样形态。 2. 分子水平: 免疫荧光, RNA-seq, scRNA-seq与囊胚特征相似。 3. 功能实验: 重现植入前发育的关键过程, 获取ESCs、TSCs和XEN细胞。 4. 植入后发育潜能: 体外延迟培养获得植入后胚胎形态, 体内移植实验诱导蜕膜结构, 并呈现前后体轴	类似于3.5~4.5天的胚胎。体外延迟培养可获得卵圆柱结构, 展现EPI酸化和空腔化过程。体内移植入子宫后, 类囊胚能够继续发育, 诱导子宫内膜蜕膜化和血管通透性增加。类囊胚中的滋养层细胞表达滋养层巨细胞的标志基因, 并且产生大量分化细胞表达植入后滋养层细胞的标记基因	仅使用单一细胞类型构建类囊胚, 来源于同种基因型和表观遗传特征。获得仅由单个mEPSCs发育而来的类囊胚, 并且利用由体细胞重编程来源的干细胞获得类囊胚。获得对应于受精囊胚3种谱系的3种干细胞类型, 且3种干细胞具有对应的发育潜力。通过体外延迟培养更清晰地分析类囊胚的发育潜能, 并且进行体内移植实验明确类囊胚的体内植入发育潜能	诱导类囊胚的效率较低, 类囊胚中存在中间态细胞
Sozen 2019 ^[11]	mEPSCs, mTSCs	先将mEPSCs种在微孔系统, 使用mEPSCs培养基培养, 约20~24 h待形成细胞团块后, 再加入mTSCs(此时记为0 h), 更换为EPSC:TX培养基=1:5, 96 h, 形成类囊胚	约4个EPSCs和8个TSCs	72~96 h	约15%	1. 形态学: 形态学、尺寸、细胞数量和谱系比例类似于中晚期囊胚。 2. 分子水平: qRT-PCR、scRNA-seq、免疫荧光。 3. 功能实验: TE样细胞和PrE样细胞展现顶基极性, 建立胚胎-非胚胎轴。 4. 植入后发育潜能: 在体外延迟培养中, 类囊胚自我组织发展出植入后结构, PrE来源的壁内胚层样结构形成。体内移植实验中, 类囊胚诱导蜕膜化, TE样细胞分化为滋养层巨细胞, 未分化TSCs细胞形成胚外外胚层样结构	类似于3.5~5.0的胚胎。体外延长培养后, 类囊胚形成卵圆柱结构, 并且有PrE来源的壁内胚层。体内移植入子宫后, 滋养层样细胞表达滋养层巨细胞标记物, 并且植入位点表达极性基因, 提示侵入子宫并且分化为滋养层巨细胞。未分化的滋养层样细胞形成胚外外胚层样部分, 并且还有细胞表达壁内胚层细胞的标记基因, 提示壁内胚层样结构的形成	相比于mESCs和mTSCs的诱导方案, mEPSCs和mTSCs的共培养诱导体系提高了类囊胚的发育潜能和形成效率。对类囊胚的发育潜能进行了比较细致和深入的检测并分析了类囊胚发育障碍的潜在原因。与mESCs、mTSCs和XEN细胞共诱导获得的类囊胚的发育潜能进行比较	诱导类囊胚的效率低, TE和PrE发育不良, 结构缺乏Reichert's膜
Seong 2022 ^[3]	mESCs, TSCs	先在微孔板种植mESCs, 用mESC培养基培养; 24~36 h后加入TSCs共培养(此时记为0 h), 使用类囊胚培养基, 24 h额外再加入8Br-cAMP, 48 h形成类囊胚, 65 h囊胚结构扩大并稳定	约5个mESCs和12个mTSCs	48~65 h	约26%	1. 形态学: 类似于囊胚的结构和形态学指标。 2. 分子水平: 免疫荧光, 转录组分析。 3. 植入后发育潜能: 体内移植入子宫诱导蜕膜形成	体外移植可以诱导蜕膜化	使用对应于植入前滋养层的滋养层干细胞TESCs构建类囊胚, mESCs与TESCs的相互作用加强。产生的类囊胚发育潜能更高, 更大更圆。诱导蜕膜的比例更高和尺寸更大。作为模型探讨滋养层细胞对胚胎发育和植入的影响	类囊胚特征的探讨不全面

前期研究中与mPSCs共培养的mTSCs是来源于受精囊胚、培养在FGF4和硫酸乙酰肝素的体系中维持自我更新获得的^[25]。但是mTSCs有较大异质性^[26],含有多种分别对应于TE细胞、胚外外胚层细胞和分化的TE细胞的亚细胞群,并不能很好地对应囊胚阶段的TE细胞,尤其是植入前囊胚阶段的TE细胞^[13]。为了获得植入前囊胚阶段的TE细胞, Rivron团队通过分析EPI和TE的动态互作及EPI分泌的一系列诱导因子,确定了包含FGF4、TGF β 1、Activin、IL11、BMP7、8-Br-cAMP和LPA的最佳混合体系。将传统的mTSCs培养在这一体系中能够获得体外稳定并且高度自我更新的小鼠滋养外胚层干细胞(trophectoderm stem cells, TESC)^[13]。TESCs空腔化的效率显著提高,且发育阶段匹配的TESCs与mESCs协同性更强。更重要的是,将mESCs与TESCs重组构建的类囊胚相比于mESCs与mTSCs重组的类囊胚效果更优,主要体现在类囊胚诱导效率显著提高、形态与受精囊胚更加相似、谱系特异性基因的正确时空表达等方面。

类囊胚为研究早期胚胎发育和植入提供了一个独特的平台,开拓了利用干细胞构建胚胎模型的研究方向。这些类囊胚可作为研究植入前后等生物学问题的模型,并可获得与早期妊娠相关疾病的研究模型,拓展对于疾病病理机制的理解。此外,小鼠的类囊胚还可以作为基础,推动其他哺乳动物,尤其是人类的类囊胚模型的研究进展。

2 人类类囊胚的研究进展

基于小鼠类囊胚的研究基础,人类的类囊胚也已经被成功构建。多个研究团队使用不同多能性干细胞均可以获得人类的类囊胚,包括原始态(naive)、重编程的细胞混合物、人类扩展潜能的多能干细胞(human EPSCs, hEPSCs)等(表2)。

Yu等人^[18]利用5i/L/A培养基^[27](包括MEK、GSK3、BRAF、ROCK、SRC的抑制剂,白血病抑制因子(LIF)和Activin A的组合)获得人naive PSCs,并诱导获得人类的类囊胚。诱导体系中含有两种类型的分化培养基,即由N2B27培养基和FGF2、Activin A和Wnt/ β -catenin经典通路激活剂组成的PrE谱系细胞分化培养基(HDM)以及人类TSCs培养基和5i/L/A培养基以1:1比例混合获得的滋养层细胞分化培养基(TDM)。依次用HDM和TDM或TDM和HDM组合处理人naive PSCs,以促进细胞分化为PrE谱系细胞和TE谱系细胞^[18],最

终获得在形态、细胞数和谱系分化均与人类受精囊胚相似的类囊胚。在类囊胚形成过程中,蛋白激酶C的特定同工酶发挥了关键作用^[18]。但是由这种诱导方案获得的类囊胚效率不稳定,表达多个谱系特异性基因的中间态细胞比例极高。Yanagida团队^[28]则通过PXGL方案获得人naive PSCs,先进行短期TE样细胞的诱导,再构建人类的类囊胚,显示出模拟人类受精胚胎的高保真度^[20]。Polo团队^[19]将重编程成纤维细胞到诱导多能干细胞21天后获得的混合细胞群,其中包含了EPI样细胞、TE样细胞和PrE样细胞,转移到3D培养系统中,形成了人类的类囊胚(iBlastoids)。但是有研究认为,iBlastoids的TE样细胞高表达羊膜的特异性基因,提示其对应于羊膜而不是真正的TE谱系细胞^[29,30]。

hEPSCs也被用于构建人类的类囊胚(hEPSCs-blastoids),其增殖能力和单细胞存活率较好,且在嵌合实验中hEPSCs可以分化为胚胎和胚外组织^[22]。Fan等人^[16]开发了新型的2步分化体系来诱导人类的类囊胚形成,主要是预先用BMP4诱导hEPSCs为TE样细胞,再与hEPSCs共培养。结果显示,第6天,有53.5%的类囊胚含有正确时空定位的ICM样(OCT4⁺)和TE样(CK8⁺)细胞,且在形态学、谱系细胞标志分子表达和单细胞转录组特征方面与人类受精囊胚相似^[16]。更重要的是,hEPSCs-blastoids进行体外延长培养能够产生类似早期植入后胚胎的结构,提示其作为早期植入后模型探索植入病生理机制的可行性。TE样细胞在转录组水平与受精囊胚的TE细胞更加相似,且相比于人naive PSCs诱导获得的TE样细胞同质性更强,TE相关基因表达水平更高^[15,16]。为了进一步改进hEPSCs-blastoids的质量,An等人^[15]通过筛选生长因子发现表皮生长因子可以改善hEPSCs向TE谱系分化的质量,提高hEPSCs-blastoids形成效率,减少中间态细胞亚群的数量。Sozen等人^[21]直接利用hEPSCs构建类囊胚,这种类囊胚能够在形态学、谱系组成和定位及转录组水平展现人类早期胚胎发育的一些特征,延长培养也能够转变为植入后胚胎结构。但是在一些关键分子标志物的表达水平和定位、信号通路上,这些类囊胚与受精囊胚也有一定差异。利用hEPSCs构建的类囊胚的不足可能与hEPSCs有限的分化潜能有关。不同于mEPSCs与mTSCs共培养可以修正小鼠类囊胚的一些缺陷^[11],hTSCs与hEPSCs的共培养却没有获得更好的结果^[21],这可能是因为hTSCs被认为对应于植入后发育状态,更类似于绒毛细胞滋养层细胞^[31],而mTSCs则含有一部分细胞对应于

表 2 人类的类囊胚的研究进展总结
Table 2 The research progress of human blastoids

文献	参与构建的细胞系	诱导方案	起始细胞种植数量	空腔化时间	形成空腔化效率	类囊胚评估实验	发育阶段	优势	局限
Yu 2021 ^[18]	5i/L/A naïve hPSCs	依次在第1天和第3天用HDM和TDM或TDM和HDM诱导naïve hPSCs为下胚层细胞和滋养层细胞,在第6~8天,形成人类类囊胚	约25个细胞	第4天	9.4%~12.8%	1. 形态学: 典型囊胚形态、尺寸、细胞数量; 2. 分子水平: 免疫荧光、RNA-seq, scRNA-seq; 3. 功能实验: 获得胚胎的胚胎的干细胞类型, 模拟胚胎发育关键事件; 4. 植入后发育潜能: 体外贴附实验类囊胚生长, 形成外植体, 部分模拟早期植入	类似于6~7天的囊胚, 体外培养体系的结构能够自组织形成由部分植入阶段特征的结构	发现PKC在类囊胚的囊腔形成起关键作用	类囊胚的诱导不稳定且效率低, 大量细胞不能分化为恰当细胞类型或者细胞身份不明确, 诱导体系复杂, 耗时耗力, 模拟植入后发育的效果较差, 效率低
Liu 2021 ^[19]	重编程成纤维细胞	将成纤维细胞用仙台病毒重编程, 并使用成纤维细胞培养基培养到第21天, 之后将细胞培养在微孔板, 并使用iBlastoid培养基加Y27632培养, 24 h后更换为iBlastoid培养基, 第6天形成类囊胚	约100个细胞	第3~4天	5.8%~1.8%	1. 形态学: 典型囊胚结构, 体外受精囊胚质量标准评分; 2. 分子水平: 免疫荧光, RNA-seq, scRNA-seq; 3. 功能实验: 获得PSCs和TSCs, 模拟胚胎发育关键事件; 4. 植入后发育潜能: 体外贴附实验类囊胚生长, 形成外植体, 部分模拟早期植入	类似于6~7天的囊胚, 体外贴附实验模拟植入期和早期植入后过程	利用重编程的细胞构建类囊胚, 提供利用体细胞构建类囊胚的可能和限度, 该类囊胚能够重现人类囊胚的几个部分, 可作为囊胚的体外模型	类囊胚的构建效率较低, 发育潜能有限, 没有明确的信号, TE高层没有原肠运动的信号, TE高层达羊膜的特异性基因
Fan 2021 ^[16]	hEPSCs, hEPSCs诱导的TE样细胞	hEPSCs首先用BMP4诱导为TE样细胞, 3天后, 将TE样细胞与hEPSCs共同种植在微孔板, 6天后获得类囊胚	约100个细胞, 约80个TE样细胞和20个hEPSCs细胞	第4天	1.90%	1. 形态学: 典型囊胚直径和形态; 2. 分子水平: 免疫荧光, scRNA-seq; 3. 功能实验: 获得功能性的hESCs, hTSCs; 4. 植入后发育潜能: 在体外培养体系中能够模拟囊胚植入和获得早期植入后类似的结构, 与自然囊胚的体外培养相比, 互相对应的细胞类型有较多基因重叠	类似于6天的囊胚, 体外培养实验获得中TE样细胞通过转录组分析能够形成前细胞滋养层细胞, 早期滋养层细胞和早期外胚体滋养层细胞	新发明的两步法获得的类囊胚准确的重现人类囊胚的发育, 并且有良好的植入后发育潜能	诱导效率较低, TE样细胞发育不良, 类囊胚总细胞数量较多, 且ICM样细胞较少, 在一些关键特异性基因的表达式和定位、信号通路的活性与自然囊胚存在一定差异
Sozen 2021 ^[21]	hEPSCs	第1天用iVC/hEPSC培养基: hTES培养基=2:1:1培养, 48 h后, 更换为减少FGF2浓度和去除A83-01的新培养基, 再培养48~72 h后获得类囊胚	5~6个细胞	第3~4天	60%	1. 形态学: 典型囊状结构含有外层细胞包围的扩大空腔和内部非中心的细胞团, 且细胞数量和直径类似于囊胚; 2. 分子水平: qRT-PCR, 免疫荧光, scRNA-seq; 3. 功能实验: 模拟囊胚形成的关键发育事件; 4. 植入后发育潜能: 体外培养类囊胚能够重新组织形成类似于植入后的形态, EPI样细胞辐射排列含有中心空腔	类似于6天的囊胚, 体外培养获得早期植入后的胚胎形态, 经历一些早期植入后形态学发生的细胞重排, 测试了hEPSCs与hTSCs共培养, 发现没有获得更好的效果	获得类囊胚的效率较高, 利用hEPSCs作为细胞来源可能提供不同的分子轨迹和胚胎发育信息	含有大量非定义的细胞类型, 有更多的下胚层样细胞, 只有部分hEPSCs分化为TE样细胞, 且诱导的TE样细胞更类似于植入后TE细胞的特征
Yanagida 2021 ^[20]	PXGL naïve hPSCs	将PXGL naïve hPSCs种植在超低黏附多孔板, 42~48 h后, 细胞聚集体转移到非黏附U形底孔, 撤去PD0325901和Y27632, 第3天撤去A83-01, 第3天末, 获得类囊胚结构	50~200个细胞	第2天	30%~80%	1. 形态学: 囊胚样结构; 2. 分子水平: 免疫荧光, scRNA-seq; 3. 植入后发育潜能: 类囊胚扩大生长, 表达合胞体滋养层细胞的标记基因, EPI样细胞群出现空腔, 并且表达空腔的标记基因	类似于6~7天的囊胚, 体外培养后类囊胚扩大培养, 出现空腔化和呈现空腔化的标记基因的表达	诱导方案简单明确, 诱导时间短, 多个谱系标记基因少, 且没有进行干细胞类型的获取, 类囊胚中下胚层样细胞的比例的naïve细胞均可诱导类囊胚, 并且可大规模产生	效率不稳定, 对类囊胚的测试较难, 多个谱系标记基因少, 且没有进行干细胞类型的获取, 类囊胚中下胚层样细胞的比例的naïve细胞均可诱导类囊胚, 并且可大规模产生
Kagawa 2022 ^[21]	PXGL naïve hPSCs	将PXGL naïve hPSCs种植在水凝胶微孔, 用2B27培养基加Y27632培养, 24 h后(记为0 h), 更换为含3种抑制剂的培养基, 48 h后, 更换为去除PD0325901, A83-01和LIF的新鲜培养基, 第4天可获得类囊胚	约70个细胞	第3天	73%~89%	1. 形态学: 一致的形态学标准, 类似于B6囊胚的形态; 2. 分子水平: 免疫荧光, RNA-seq, scRNA-seq; 3. 功能实验: 重现囊胚的发育时序和关键发育事件; 4. 植入后发育潜能: 将类囊胚与内囊膜器官形成的开放内膜层共培养, 类囊胚细胞新附于吞受性的开放内膜层, 模拟植入期和早期植入后特征	类似于胚胎6天的囊胚, 体外培养过程中, 滋养层样细胞表达CGβ, 呈现早期分层, 滋养层样细胞进一步分化为合胞体滋养层细胞, 和绒毛膜外滋养层细胞, EPI上皮化, 形成前羊膜样空腔, 出现胚外内胚层细胞类似物	诱导效率极大提高并且诱导体系稳定可靠, 类囊胚在形态学、细胞分配和分子水平都更类似于自然囊胚, 将类囊胚与开放内囊层共培养揭示EPI信号是TE贴附必需的, 并且是分析EPI和TE互作的良好模型, 体外延长培养的结构展现现期和前肠肠胚的特征, 实现对植入期及之后时期发育阶段的模拟	体外植入后的组织不能很好的反应植入后特征, 并且无法模拟发育阶段

植入前状态,可以改善小鼠类囊胚的质量^[13].

在多个人类的类囊胚研究基础上,Rivron团队^[17]诱导人类的类囊胚效率可以提高至80%.该方案通过抑制3条信号通路(Hippo通路、ERK通路和TGF通路)诱导PXGL的人naive PSCs^[32]构建人类的类囊胚.此外,与其他类囊胚研究中使用商品化的3D培养板不同,Rivron团队^[33]开发了热成型微孔板,这种微孔呈半球形,更有利于细胞聚集,可控制的微孔大小也可以限制聚集体的生长,模拟体内环境,从而高效率、高质量获得人类的类囊胚.

通过体系优化,已经可以较高效率地获得人类的类囊胚,因此后续研究中,将类囊胚结合体外延长发育策略,深入探索围植入期胚胎发育生理和病理机制是潜在的新方向.Tu等人^[30]将人的始发态(primed)PSCs向人naive PSCs转变过程中的中间态细胞混合物(含有EPI、PrE和TE特性以及primed hPSCs)作为构建人类的类囊胚(效率约40%)的起始细胞.将类囊胚在体外延长培养至14天,可以观察到反映人类胚胎植入期和原肠胚期的结构特征,包括原始卵黄囊样结构、原条样结构和滋养层样细胞伴随植入发生的分化结构等,实现了胚胎在围植入期发育阶段的精准模拟,对解析植入过程中的胚胎发育关键事件具有重要意义.除了结合体外延长发育策略,利用不同遗传特征的hPSCs构建类囊胚研究特定遗传学事件及其内在机制也是类囊胚应用的重要方向.Zhong等人^[34]利用孤雌来源的hESCs成功构建了孤雌类囊胚,其在形态、分子标志物和转录组特征等方面与正常干细胞诱导的类囊胚相似,但是在形成类囊胚过程中,孤雌状态的基因印记和X染色体失活的分子特征发生改变.孤雌类囊胚是理解孤雌胚胎发育和基因组印记的良好生物学模型,有助于解析亲本偏移对人类胚胎发育和病理机制的影响.

尽管类囊胚在研究人类早期胚胎发育事件中展现出巨大的应用潜力,但是在广泛推广应用之前,还需要不断进行改进和优化.例如,类囊胚的低效率和低再现性,以及体外培养可能不能反映真实的生物事件等都需要建立类囊胚,特别是人的类囊胚的鉴定标准.目前,关于人的类囊胚鉴定标准除常规的谱系分子标志物以外,与子宫内膜或者内膜类器官互作、模拟体内植入过程、检测植入过程中HCG水平,可以部分体现类囊胚对于早期植入后发育事件的模拟.此外,胚胎体外延长培养体系结合类囊胚,也可以观察原条时期之前的发育事件.总体而言,仍然亟须不断地探索更优的

诱导方案以解决这些限制类囊胚应用的难题^[35].

3 新型干细胞可作为类囊胚构建的突破方向

以上介绍的构建小鼠和人类类囊胚的细胞来源大都是PSCs.PSCs能够分化成3个胚层的所有细胞类型,也包括生殖细胞,但是不可以分化成为胚外组织细胞.近年来,全能性细胞的研究也取得重要进展.全能性严格意义是指单个细胞能够形成完整生物体的能力^[36-40],广义而言是细胞能够形成所有胚内和胚外各个组织细胞类型的能力.

3.1 小鼠全能样细胞的建立及在类囊胚研究中的应用

在2012年,Macfarlan等人^[37]发现,在mESCs中有很小群的细胞具有二细胞胚胎特征,称为二细胞样细胞(2-cell like cells, 2CLCs),并且这些细胞能够用带有亮氨酸tRNA引物的小鼠内源性逆转录病毒基因(murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer, *MERV1*)进行特异性识别.2CLCs的特征主要为多能性基因表达下调、全能性基因表达上调,以及与二细胞胚胎相似的表现遗传特征,但是2CLCs的状态极不稳定,会自发与mPSCs相互转换.虽然2CLCs作为细胞模型探究全能性调控机制已经有许多进展^[41,42],但是2CLCs体外培养不稳定性仍然制约其应用潜力.

抑制剪接体活性能将mPSCs转变为全能样细胞,即小鼠全能卵裂球样细胞(totipotent blastomere like cells, TBLCs),且这种细胞系能在体外稳定培养^[43].与EPSCs和2CLCs显著不同,TBLCs在转录组水平上更类似于二细胞和四细胞时期的胚胎.在嵌合体实验中,TBLCs可以参与ICM/EPI、TE和PrE谱系的形成,并且能够在胚胎发育后期进入胎盘组织,展现出细胞全能性^[43].但是有研究通过对TBLCs转录组数据进行分析,发现多数TBLCs亚群仍然富集多能性转录本,处于多能性状态,但有1个亚群展现明显的全能性特征^[6].

全能样干细胞(totipotent like stem cells, TLSCs)可以通过化学小分子组合(SGC0946、AS8351、A366等)诱导mESCs获得.TLSCs全能性的转变机制被认为与染色质重塑密切相关.在TLSCs形成过程中,化学小分子分别抑制染色质中心形成,并重塑全能特异性非经典H3K4me3表观遗传修饰,最终诱导mESCs转变为二细胞胚胎样状态^[44].TLSCs被注射到小鼠胚胎后,能够高效分化形成胚内和胚外谱系细胞.而利用TLSCs构建类

囊胚的效率高达35%,且形成过程重现了植入前的关键发育事件。另外1种全能样细胞,即全能潜能干细胞(totipotent potential stem cells, TPSCs)也被用于诱导类囊胚(TPS-blastoids)^[45]。TPS-blastoids在形态和转录组水平类似于受精后4.5天的囊胚,转录组数据分析的3种细胞亚群与受精囊胚对应的3个谱系可以较好地聚类。与mPSCs/mTSCs或mEPSCs获得的类囊胚^[7,46]的转录组数据相比较,TPS-blastoids的TE细胞与受精囊胚的TE细胞转录水平的相似度更高。

化学诱导的全能干细胞(chemically induced totipotent stem cells, ciTotiSCs)也是利用化学小分子组合(TTNPB、1-Azakenpaullone和WS6)将多能干细胞重编程为全能干细胞^[47]。相比于TBLCs和TLSCs等类似二细胞或四细胞胚胎的小鼠全能样细胞,ciTotiSCs特异性表达几乎所有的全能性基因,而全部多能性基因表达沉默。另外,不仅在转录和表观遗传水平,ciTotiSCs的代谢水平也与二细胞阶段的胚胎细胞相似。在体外ciTotiSCs能够同时分化为胚内和胚外谱系,嵌合体实验也反映了ciTotiSCs可以在体内分化为全部胚层细胞类型的潜能。

3.2 人类全能样细胞的建立及在类囊胚研究中的应用

小鼠的全能样细胞类似于发育到二细胞阶段的胚胎细胞,这个发育阶段也是小鼠合子基因组激活发生的时期^[48]。人类的主要合子基因组激活发生在八细胞胚胎阶段^[49],此时胚胎细胞之间的分子表达水平开始出现差异,因此推测类似于人类八细胞阶段的细胞——八细胞样细胞(8 cell-like cells, 8CLCs)可能类似于小鼠2CLCs,即具有全能性特征。

在不同人的naive PSCs诱导过程中,PXGL^[50]和5iLA^[27]的体系获得8CLCs的比例相对较高,而t2iLGo和RSeT体系中8CLCs的比例^[46]相对较低,且由该体系诱导获得的8CLCs的全能性基因表达异质性更强^[51]。为了改善诱导和维持8CLCs的培养体系,通过对信号通路和表观遗传通路调控因子的筛选,得到4种小分子加1种细胞因子的组合,其能够将hPSCs转变为8CLCs,并且在这种条件下,8CLCs能够长期培养并维持全能性^[51]。通过与发育各阶段的胚胎细胞、多能性细胞和全能性细胞的转录组、表观遗传组和分化发育潜能的比较分析,可以鉴定8CLCs的全能性特征,发现8CLCs更类似于人类八细胞阶段胚胎细胞的分子特征。8CLCs

能够被诱导为TSCs,并进一步分化为合体滋养层细胞和绒毛膜外滋养层细胞。8CLCs也被用于构建人类的类囊胚(效率28%~58%),获得的类囊胚含有液腔和明显分界的内部及外部细胞,转录组数据分析也显示其含有的3个细胞亚群与受精囊胚的3个谱系具有相似的表达模式,提示构建的类囊胚能够作为模拟早期人类胚胎发育的体外模型。

同时,两个研究团队也发现在人naive PSCs中存在极少数量的8CLCs,分析发现这些8CLCs不仅上调合子基因组激活的标志基因,如ZSCAN4和LEUTX以及一些在合子基因组激活时高度开放的模体结合基因——DUX4、DUXA和KLF17,而且八细胞阶段胚胎细胞特有表达的转座元件HERV(MLT2A1和HERVL-int)也高度表达^[52,53]。通过基因编辑技术过表达DUX4,或者使用广谱剪接体抑制剂处理人naive PSCs,可以提高合子基因组激活基因的表达水平,提示基因编辑和化学小分子处理都可以用于提高8CLCs的比例,并揭示合子基因组激活的分子机制^[53]。而另外一个研究通过分析早期人类胚胎的单细胞转录组数据,确认LEUTX可以作为8CLCs的标志基因,并且通过对信号通路和表观遗传发挥调控作用的化学小分子筛选,建立了高比例分化8CLCs且能稳定培养的体系,获得了化学诱导的8CLCs(chemical-induced 8CLCs, ci8CLCs)^[52]。利用ci8CLCs构建的类囊胚能够重现植入前的关键过程,为人类的类囊胚研究提供了新的细胞类型的选择。

上述研究结果表明,小鼠和人类的全能样细胞具有获得更高效率、更高质量、更精准模拟囊胚发育事件的类囊胚的潜力,同时类囊胚诱导的实验结果也可以作为评估全能样细胞全能性状态和分子特征的研究模型。但是这些全能样细胞构建的类囊胚与受精囊胚仍然在基因表达、植入后发育、谱系分化等事件中存在差距,仍然需要优化诱导体系。

4 总结与展望

近几年类囊胚的研究已经取得了重要的突破,国内外研究团队利用不同类型细胞和诱导体系均可以获得小鼠和人类的类囊胚。因其与受精囊胚发育和分子特征高度相似,同时具有可以大规模获取、来源广泛、伦理争议较小等优势,已经成为研究早期胚胎发育的优质模型。但是与小鼠不同,人类的类囊胚无法开展体内研究,评估其体内发育潜能,因此需要开发人类

类囊胚功能研究的新策略。Rivron团队^[17]利用子宫内
膜类器官形成的开放内膜层模拟体内子宫内膜组织，
与人类类囊胚共培养，成功模拟了子宫内膜和受精囊
胚的互作过程。类囊胚只能贴附在容受性开放的子宫
内膜，且贴附后的形态学改变和3种谱系细胞的扩增分
化反映了人类类囊胚在围植入期的发育潜能。多个类
器官模型的共培养以及在共培养过程中分子互作的精
确检测为确证人类类囊胚发育潜能提供了研究策略。
同时通过体外延长培养体系也能提供人类类囊胚在围
植入期发育的重要线索。多种研究体系的交叉使用，可
以更大程度地扩展人类类囊胚的应用范围，更系统地
解析人类胚胎发育的奥秘。

除了小鼠和人类的类囊胚已经成功获得，非人灵
长类的类囊胚^[54]和牛的类囊胚^[55]也已经成功构建，并
且体外延长培养的非人灵长类的类囊胚可以发育到原
肠胚阶段，并可以检测出3个胚层和原始生殖细胞的标
志分子表达。体内移植实验显示非人灵长类的类囊胚
能够诱发母体的妊娠反应，包括孕激素水平的动态变
化以及早期孕囊的出现^[54]。利用非人灵长类动物进行
类囊胚的研究可以进一步降低人类胚胎研究中伦理和

数量限制的问题，同时相比于小鼠，非人灵长类与人类
在进化上更加相似，可以为人类胚胎发育机制的解析
提供更重要的参考价值。

类囊胚作为研究模型探讨小鼠和人类胚胎早期发
育的研究价值已经得到研究人员的认同，其中类囊胚
诱导过程中筛选的信号通路及其相应的调控小分子可
以帮助研究人员发现更多的胚胎发育过程中的新关键
基因和信号通路。利用基因编辑的干细胞诱导类囊胚，
可研究特定基因在胚胎发育过程中的作用机制。类囊
胚模型对于生殖障碍性疾病的病理机制研究也具有重
要意义，比如改进体外受精胚胎培养体系、胚胎非整
倍体发育机理、遗传突变对胚胎植入的影响机制等，
同时与子宫内膜及其类器官的共培养可以作为研究人
类围植入期胚胎着床生理和病理机制的重要工具。此
外，在药物发现和筛选、药物生殖毒性评价等药学研
究中，类囊胚同样展现出重要的应用价值。

综上所述，鉴于类囊胚的研究价值和存在的问题，
该领域仍然需要进一步加强对细胞谱系的机制探索，
从而更好地优化诱导和培养体系，获得可以高精度模
拟受精囊胚细胞和分子特征的类囊胚。

参考文献

- 1 Rock J, Menkin M F. *In vitro* fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Science*, 1944, 100: 105–107
- 2 Edwards R G, Bavister B D, Steptoe P C. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature*, 1969, 221: 632–635
- 3 Hertig A T. On the development of the amnion and exocoelomic membrane in the previllous human ovum. *Yale J Biol Med*, 1945, 18: 107–115
- 4 Hertig A T, Rock J, Adams E C. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat*, 1956, 98: 435–493
- 5 Haniffa M, Taylor D, Linnarsson S, et al. A roadmap for the human developmental cell atlas. *Nature*, 2021, 597: 196–205
- 6 Mole M A, Weberling A, Zernicka-Goetz M. Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Curr Top Dev Biol*, 2020, 136: 113–138
- 7 Rivron N C, Frias-Aldeguer J, Vrij E J, et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature*, 2018, 557: 106–111
- 8 Luijckx D, Shankar V, van Blitterswijk C, et al. From mice to men: Generation of human blastocyst-like structures *in vitro*. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 838356
- 9 Min Z, Zhong K, Luo Y, et al. Protein expression landscape defines the formation potential of mouse blastoids from EPSCs. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 840492
- 10 Li R, Zhong C, Yu Y, et al. Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures. *Cell*, 2019, 179: 687–702.e18
- 11 Sozen B, Cox A L, De Jonghe J, et al. Self-organization of mouse stem cells into an extended potential blastoid. *Dev Cell*, 2019, 51: 698–712.e8
- 12 Kime C, Kiyonari H, Ohtsuka S, et al. Induced 2C expression and implantation-competent blastocyst-like cysts from primed pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*, 2019, 13: 485–498
- 13 Seong J, Frias-Aldeguer J, Holzmann V, et al. Epiblast inducers capture mouse trophectoderm stem cells *in vitro* and pattern blastoids for implantation in utero. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 1102–1118.e8
- 14 Vrij E J, Scholte op Reimer Y S, Aldeguer J F, et al. Chemically-defined induction of a primitive endoderm and epiblast-like niche supports post-implantation progression from blastoids. *BioRxiv*, 2019, 510396
- 15 Zhang Y, An C, Yu Y, et al. Epidermal growth factor induces a trophectoderm lineage transcriptome resembling that of human embryos during reconstruction of blastoids from extended pluripotent stem cells. *Cell Prolif*, 2022, 55: e13317

- 16 Fan Y, Min Z, Alsolami S, et al. Generation of human blastocyst-like structures from pluripotent stem cells. *Cell Discov*, 2021, 7: 81
- 17 Kagawa H, Javali A, Khoei H H, et al. Human blastoids model blastocyst development and implantation. *Nature*, 2022, 601: 600–605
- 18 Yu L, Wei Y, Duan J, et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature*, 2021, 591: 620–626
- 19 Liu X, Tan J P, Schröder J, et al. Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature*, 2021, 591: 627–632
- 20 Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1016–1022.e4
- 21 Sozen B, Jorgensen V, Weatherbee B A T, et al. Reconstructing aspects of human embryogenesis with pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 2021, 12: 5550
- 22 Yang Y, Liu B, Xu J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with *in vivo* embryonic and extraembryonic potency. *Cell*, 2017, 169: 243–257.e25
- 23 Posfai E, Schell J P, Janiszewski A, et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 49–60
- 24 Liu K, Xu X, Bai D, et al. Bilineage embryo-like structure from EPS cells can produce live mice with tetraploid trophectoderm. *Protein Cell*, 2023, 14: 262–278
- 25 Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A K, et al. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, 1998, 282: 2072–2075
- 26 Perez-Garcia V, Lea G, Lopez-Jimenez P, et al. BAPI/ASXL complex modulation regulates epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation and invasion. *eLife*, 2021, 10: 10.7554–63254
- 27 Theunissen T W, Powell B E, Wang H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 523
- 28 Bredenkamp N, Stirparo G G, Nichols J, et al. The cell-surface marker sushi containing domain 2 facilitates establishment of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 1212–1222
- 29 Zhao C, Reyes A P, Schell J P, et al. Reprogrammed iBlastoids contain amnion-like cells but not trophectoderm. *bioRxiv*, 2021, 2021.05.07.442980
- 30 Tu Z, Bi Y, Zhu X, et al. Modeling human pregastrulation development by 3D culture of blastoids generated from primed-to-naive transitioning intermediates. *Protein Cell*, 2023, 14: 337–349
- 31 Okae H, Toh H, Sato T, et al. Derivation of human trophoblast stem cells. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 50–63.e6
- 32 Guo G, von Meyenn F, Santos F, et al. Naive pluripotent stem cells derived directly from isolated cells of the human inner cell mass. *Stem Cell Rep*, 2016, 6: 437–446
- 33 Vrij E J, Espinoza S, Heilig M, et al. 3D high throughput screening and profiling of embryoid bodies in thermoformed microwell plates. *Lab Chip*, 2016, 16: 734–742
- 34 Zhong K, Luo Y X, Li D, et al. Generation of blastoids from human parthenogenetic stem cells. *Life Med*, 2023, 2: 10.1093
- 35 Popovic M, Azpiroz F, Chuva de Sousa Lopes S M. Engineered models of the human embryo. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 918–920
- 36 Io S, Kabata M, Iemura Y, et al. Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells *in vitro*. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1023–1039.e13
- 37 Macfarlan T S, Gifford W D, Driscoll S, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, 2012, 487: 57–63
- 38 Morgani S M, Brickman J M. The molecular underpinnings of totipotency. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369, doi: 10.1098/rstb.2013.0549
- 39 Condit M L. Totipotency: What it is and what it is not. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 796–812
- 40 Torres-Padilla M E. On transposons and totipotency. *Phil Trans R Soc B*, 2020, 375: 20190339
- 41 Baker C L, Pera M F. Capturing totipotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2018, 22: 25–34
- 42 Iturbide A, Torres-Padilla M E. A cell in hand is worth two in the embryo: recent advances in 2-cell like cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*, 2020, 64: 26–30
- 43 Shen H, Yang M, Li S, et al. Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression. *Cell*, 2021, 184: 2843–2859.e20
- 44 Yang M, Yu H, Yu X, et al. Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 400–418.e13
- 45 Xu Y, Zhao J, Ren Y, et al. Derivation of totipotent-like stem cells with blastocyst-like structure forming potential. *Cell Res*, 2022, 32: 513–529
- 46 Liu X, Ouyang J F, Rossello F J, et al. Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature*, 2020, 586: 101–107
- 47 Hu Y, Yang Y, Tan P, et al. Induction of mouse totipotent stem cells by a defined chemical cocktail. *Nature*, 2023, 617: 792–797
- 48 Schulz K N, Harrison M M. Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nat Rev Genet*, 2019, 20: 221–234

- 49 Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. [Nature](#), 1988, 332: 459–461
- 50 Guo G, Stirparo G G, Strawbridge S E, et al. Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. [Cell Stem Cell](#), 2021, 28: 1040–1056.e6
- 51 Mazid M A, Ward C, Luo Z, et al. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage. [Nature](#), 2022, 605: 315–324
- 52 Yu X, Liang S, Chen M, et al. Recapitulating early human development with 8C-like cells. [Cell Rep](#), 2022, 39: 110994
- 53 Taubenschmid-Stowers J, Rostovskaya M, Santos F, et al. 8C-like cells capture the human zygotic genome activation program *in vitro*. [Cell Stem Cell](#), 2022, 29: 449–459.e6
- 54 Li J, Zhu Q, Cao J, et al. Cynomolgus monkey embryo model captures gastrulation and early pregnancy. [Cell Stem Cell](#), 2023, 30: 362–377.e7
- 55 Pinzón-Arteaga C A, Wang Y, Wei Y, et al. Bovine blastocyst-like structures derived from stem cell cultures. [Cell Stem Cell](#), 2023, 30: 611–616.e7

Summary for “源于干细胞的囊胚样结构: 研究现状与展望”

Blastoids derived from pluripotent cells: Current research status and future prospect

Yuxin Luo¹, Yanan Qi¹ & Yang Yu^{1,2,3*}

¹ Center for Reproductive Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

² Clinical Stem Cell Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

³ Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Tianjin 300051, China

* Corresponding author, E-mail: yuyang5012@hotmail.com

Due to sample and ethical limitations, many mysteries still exist in the study of early human embryonic development, among which the first lineage specification, the interplay between inner cell mass and trophoctoderm and the interaction of uterine endometrium and blastocysts remain to be fully elucidated. The emergence of blastoids makes it possible to obtain models that mimic embryonic development *in vitro*, especially regarding the preimplantation, implantation and early postimplantation processes. Blastoids are organoid models of blastocysts derived from stem cells that resemble natural blastocysts at the morphological and transcriptomic levels; that is, blastoids comprise an outer layer of trophoctoderm-like cells enclosing a cavity and a population of epiblast-like cells and primitive endoderm-like cells. Moreover, blastoids can enable the recapitulation of key events in preimplantation development, such as compaction, polarization, cavitation and cell lineage specification. Moreover, blastoids also partially exhibit postimplantation potential *in vivo* and *in vitro*.

However, the efficiency of the blastoid induction system has been relatively low, and there are some defects in blastoid modelling blastocysts, which has inspired researchers to improve these systems. To date, various mouse and human blastoids using different cell types and induction systems have been developed. The blastoid induction efficiency has significantly increased, and these blastoids are more similar to natural blastocysts at the morphological and transcriptomic levels. In addition to transcriptomic analysis, proteomic and posttranslational modification analyses have also been used to explore the molecular mechanisms underlying blastoid formation and their similarities and differences to natural blastocysts. Moreover, human parthenogenic embryonic stem cells have been employed to generate parthenogenic blastoids and detect the impacts of parental genomes and genome imprinting on human embryonic development. In addition to pluripotent stem cells, totipotent-like cells have been proposed as preferred cell resources to construct blastoids for their greater developmental potential. In recent years, many kinds of mouse and human stable totipotent-like cells have been generated that have shown totipotent features and exhibited greater developmental potential. Moreover, some attempts to generate blastoids using totipotent-like cells have been made, and such blastoids have shown typical blastocyst features. In addition, great progress has also been made in research on primate blastoids, which will augment the knowledge regarding human embryonic development.

Here, we summarize recent advances in the blastoid research field and discuss future prospects for the involvement of novel totipotent-like cells in blastoid formation. These findings have shown that blastoids have important research and application potential in the elucidation of early embryo development mechanisms, the illumination of peri-implantation embryo development events, the screening of new drug molecules for reproductive diseases and the assessment of the reproductive toxicity of new drugs. However, there are still some unresolved issues and challenges in the development of blastoids that are also discussed in this review.

embryonic development, blastocysts, blastoids, implantation, pluripotent stem cells, totipotent-like cells

doi: [10.1360/TB-2023-0485](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0485)