



评述

人胚胎干细胞向滋养层分化的研究进展

杨艳艳[†], 白杨[†], 王雁玲, 吉蕾^{*}

中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: jilei@ioz.ac.cn

收稿日期: 2008-06-01; 接受日期: 2008-08-17

国家自然科学基金重点(批准号: 30530760)项目资助

摘要 哺乳动物胚胎发育产生的第一个细胞系的分离是内细胞团和滋养层的分离, 不同哺乳动物之间胚胎干细胞向滋养层细胞分化不同, 滋养层细胞对胚胎的植入、促进胚胎在子宫内的生存和生长至关重要。人胚胎干细胞为研究人类胚胎发育及向滋养层分化提供了一个独特的模型。人胚胎干细胞可以在实验室条件下保持无限期稳定的培养, 用于最初胚胎和滋养外胚层发生的机制研究。目前人胚胎干细胞分化为滋养层细胞在体外可以通过自发分化、基因敲除、分离 EB 小体和 BMP4 诱导等几种途径实现。不同哺乳动物之间胚胎干细胞向滋养层分化机制, 主要通过信号通路如 BMP4, LIF 等以及某些标志基因如 *OCT4*, *CDX2*, *Eomes* 等的变化调节。人胚胎干细胞向滋养层分化的研究为临床应用提供了一定的基础。

关键词胚胎干细胞
滋养层细胞
BMP4
胚胎植入
胚状体

胚胎植入前, 囊胚包括两种细胞类型: 多能的内细胞团和滋养层。哺乳动物胚胎分化的第一步是滋养层的形成和内细胞团形成细胞 3 胚层, 滋养层形成滋养层系细胞, 形成胎盘的主要组成部分。滋养层对胚胎的植入、促进胚胎在子宫内的生存和生长是至关重要的。滋养层发育无序会导致稽留流产(怀孕 1~2 个月流产)、胎儿宫内生长迟缓(IUGR)和先兆子痫。而且, 滋养层对外胚层建立胚胎中轴起重要作用。早期胚胎植入后原肠胚形成前, 外胚层和滋养层衍生物, 提供全面信息促进外胚层下中胚层特定基因的表达, 滋养层与内细胞团的正确分离对胚胎生长和发育至关重要^[1]。目前对决定这些细胞命运的内在信号仍不清楚, 对滋养层细胞的发育机制研究尤为重要。过去研究滋养层细胞的发育主要通过从肿瘤细胞中建立的细胞自发分化成更大, 贴壁的细胞, 呈现出进一步分化的表型。但这些细胞系与原代的滋养

层细胞又有着很大的不同^[2,3]。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)的出现为研究人类胚胎的早期发育提供了一个非常好的模型。本文主要对人胚胎干细胞向滋养层细胞分化的研究现状及其相关机制做一综述。

1 滋养层细胞与胚胎植入

受精后的 2~3 天, 胚胎发育形成囊胚, 产生第一次的细胞分化事件, 孕体表层细胞分化成滋养层细胞, 将来形成胚外结构, 包括胎盘; 内细胞团将发育为整个胚胎。受精后的 6~7 天胚胎植入发生, 此时, 滋养层细胞向子宫内膜侵入并且合体滋养层细胞穿过子宫内膜。直至受孕后第 10 天, 囊胚完全包被于子宫内皮下侧的基质组织中, 并且在植入点处被破坏的子宫上皮开始生长愈合。随后, 细胞滋养层细胞进

一步侵入到整个子宫内膜以及子宫肌层的上 1/3 处^[4], 同时侵入到母体子宫血管^[5]. 此时, 胎盘发生起始, 建立起真正的子宫胎盘循环, 使胎儿的滋养层细胞与母体的血液直接接触. 囊胚腔形成时, 滋养外胚层作为胎盘滋养层的来源, 在哺乳动物孕体发育过程中延伸并提供第一个可以观察的细胞系分离的证据, 形成母体和胎儿胎盘的主要部分. 滋养外胚层祖细胞来源于孕体早期发育过程中的多能祖先^[6].

从整个胚胎植入和胎盘发生的过程来看, 滋养层细胞对于胚胎成功的植入以及建立完善的胎儿和母体间的血液循环起重要作用, 这些都是保证正常妊娠的前提, 许多疾病如先天缺陷、流产、先兆子痫等都是此过程中的某个环节出现差错所导致. 胚胎植入前, 滋养层细胞和内细胞团这一分化事件内在机制的阐明将从根本上解决早期发育的障碍问题.

人类滋养外胚层主要形成两个细胞种系: 一个是绒毛状细胞滋养层, 分布在胎盘绒毛的周围, 在这些地方, 绒毛状细胞滋养层分离融合形成合体滋养层, 直接接触母体血液和产生HCG等激素^[7,8]. 另一个是绒毛外细胞滋养层, 来源于滋养层干细胞, 没有极性并且是多层的, 形成胎盘的浸润部分^[9].

目前, 体外研究人类胎盘的模型大多是由绒毛膜上皮癌得到的滋养层细胞系, 如JAr或JEG3. 但这些细胞不能模拟正常的滋养层细胞行为, 尤其是早期的发育过程. 人胚胎干细胞的出现对于研究滋养层细胞的来源和发育提供了很好的模型. 人胚胎干细胞主要的优点有: (1) 在实验室条件下可以保持无限期的稳定培养; (2) 具有研究最初胚胎和滋养外胚层发生的能力^[6].

2 胚胎干细胞

人胚胎干细胞是取自人囊胚内细胞团, 经体外分离、培养获得的一种多能干细胞. 目前有 5 个胚胎干细胞系(H1, H7, H9, H13 和H14), 其中H1, H13 和H14 是XY染色体组型, H7 和H9 是XX染色体组型^[10]. hESCs细胞具有在体外无限增殖, 并保持未分化状态的自我更新能力和多向分化潜能, 能分化为外、中和内胚层来源的细胞.

hESCs的分子标志如下: (1) 碱性磷酸酶(AKP): 鉴定hESCs细胞分化与否的重要标志, 已分化的细胞呈弱阳性或阴性^[10]; (2) 胚胎干细胞表面标志物:

阶段特异性胚胎表面抗原在胚胎发育早期受到严密的调节^[11], 胚胎干细胞表面标志物是鉴定hESCs的重要工具. 未分化的hESCs 表达干细胞表面标志物SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 当细胞分化时这些抗原的表达量显著下降. 未分化的hESCs不表达SSEA-1, 分化时SSEA-1表达量略有提高^[10]; (3) 端粒酶: 端粒酶是一种逆转录酶, 在维持染色体长度及决定细胞寿命方面有重要作用. 体外培养的hESCs高表达端粒酶, 提示这种细胞比体细胞的寿命长, 且长时间体外培养仍可保持未分化状态^[10]; (4) 转录因子OCT4: OCT4 属于POU家族转录因子, 对全能细胞的发育很重要, 仅在卵母细胞、分裂早期胚胎、内细胞团、原始外胚层和原始生殖细胞中表达, OCT4 阳性表达也是hESCs细胞保持其全能性的标志之一.

3 人胚胎干细胞分化为滋养层细胞的途径

人胚胎干细胞形成滋养层细胞主要通过: (1) 自发分化, 在缺乏维持生长因子bFGF或饲养层细胞的情况下胚胎干细胞会自发分化, 其中部分分化的细胞表现滋养层细胞特性^[10]; (2) 在缺乏bFGF2 培养基中POU5F1 基因的沉默可以导致滋养外胚层的出现, 同时有CDX2, CGA, CGB, EOMES, GATA2, GCM1 和ID2 的表达^[12,13]. NANOG基因沉默也可以导致滋养层标志基因的上调和细胞形态的改变^[14]; (3) 无论是外源因素的诱导, 还是内源关键性基因的沉默, 所诱导出的滋养层细胞只具有有限的增殖能力. 研究表明, 类胚体的悬浮培养能比贴壁培养的hES更有效地促进滋养层细胞的分化. 由于胚胎植入过程依赖于滋养层细胞侵入子宫内膜基质的能力, 部分靠蛋白酶降解基膜成分和细胞外基质, 所以将类胚体移植到胶筏上进行培养, 模拟胚胎与细胞外基质外环境的相互作用. 结果发现, 在第 20 天时绒毛促性腺激素, 孕酮和雌激素的分泌量增加, 并且在之后的 30 天中一直保持增长趋势. 这些结果说明, 细胞外基质与细胞的相互作用可以进一步促进滋养层细胞的分化^[15]. 另外, 富集高表达 β -HCG的类胚体, 经过几轮富集后, 分离出细胞滋养层干细胞系(CTBS), CTBS呈现出典型的细胞滋养层和合体滋养层的特点并且能进一步分化出血管内皮滋养层细胞. 球状的滋养层小体在Matrigel中培养, 可以很好地模拟胚胎植入早期的侵入行为^[16]. 因此, 类胚体三维培养比前

两种方法更有效地促进hES向滋养层细胞分化; (4) 骨形态发生蛋白(BMPs)是转化生长因子 β 超家族的成员, 在许多器官的发生中作为关键的形态发生素起作用. Xu等人^[12]在无饲养层培养中, 成功地用骨形态发生蛋白 4(bone morpho-genetic protein 4, BMP4)诱导人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES)产生滋养层细胞, 并且发现低密度种植处理后的单个hES, 会形成合体滋养层细胞. 在hES自发向滋养层细胞分化的基础上, BMP4 可以加强这种分化, 并呈现出剂量正依赖效应. 同时, 骨形态发生蛋白家族的其他成员, 如BMP2, BMP7 和生长与分化因子 5 (growth and differ-entiation factor 5)也可以诱导hES产生类似的形态变化. 经BMP4 处理后, 促性腺激素, 雌二醇以及孕酮的表达水平显著升高^[12], 而在非条件培养基中加入成纤维生长因子 2(fibroblast growth factor 2)和BMP4 的拮抗剂noggin, 可以维持hES的未分化状态^[17].

目前报道的几种 hESCsC 分化为滋养层细胞的情况见表 1.

4 人胚胎干细胞向滋养层细胞分化调控的信号通路

4.1 Activin/Nodal 信号通路抑制人类胚胎干细胞向滋养层分化

Activin 和 Nodal 是 TGF- β 家族的成员, TGF- β 家族信号通路的细胞表面受体是一种复杂的单向跨膜受体, 由类型 I 和类型 II 两个跨膜蛋白组成. 结合配体后类型 II 单方向磷酸化类型 I 使激酶区域激活, 从而传导到SMADs蛋白^[24]. 在哺乳动物中目前发现

有 7 种类型 I 和 5 种类型 II. Activin和Nodal在类型 I (Alk4 和Alk7)和类型 II (ActR II B)的Activin受体之间形成异二聚体复合物, 通过Smad2/3 信号通路起作用. Nodal和 Activin 共同使用类型 I (Alk4)和类型 II (ActR II B)受体并利用相同的Smad信号通路. 然而 TGF β 1 优先利用 TGF β 1 的受体 (Alk5, T β R II) 和 Smad2/3. Nodal信号通路被一种细胞外GPI结合蛋白 Cripto调控, 其抑制剂为Lefty和Cerb-S^[25].

Beattie等人^[26]发现, 小鼠的成纤维细胞层可以分泌Activin A, 在没有饲养层细胞的情况下, 培养基中添加一定量的Activin A可维持人胚胎干细胞处于正常的未分化状态. Vallier等人^[27]研究发现, 当Nodal生长因子过量表达时可以阻止EB形成时的神经外胚层缺失分化, 同时证明Activin/Nodal信号通路通过 Smad2/3 的激活维持hESCSc的多能性, 单独的 Activin不能保持hESCScs的多能性. Smith等人^[28]通过 Nodal信号通路的内源性抑制剂Lefty和Cerb-S的表达或加入Activin/Nodal信号通路的抑制剂SB431542, hESCScs形成的EB中可以形成神经外胚层. 最近, Wu等人^[1]使用Activin受体ALK4/5/7 的抑制剂 SB431542 和Follistatin, 直接结合Activin和阻止 Activin受体复合物的组合表现作用从而抑制Activin/Nodal信号通路, 导致hESCScs分化过程加快, *p-Smad- 2*, *Nodal*, *Lefty-A*和*Lefty-B*基因的表达水平被显著抑制, 多能性标志Oct4, Nanog和SSEA4 也明显下降, 而滋养层的标志蛋白hCG的单元Cdx2, GATA2, Msx2, CG- α 和 CG- β 等都有一定程度的上调. Activin/Nodal 信号通路的抑制可导致 hESCScs 向滋养层分化, 得到的滋养层细胞分泌胎盘激素. Activin/Nodal 信号通路抑制 FGF 和 Wnt 信号下调, BMP 信号上调

表 1 诱导人胚胎干细胞分化为滋养层细胞的主要方式^[18]

外加刺激物	细胞系	参考文献
BMP4/BMP2/BMP7/GDF5	H1, H7, H9, H14	[12]
	H1	[19]
	H1	[20]
siOct4 treatment	H1	[21]
	H9, H7, H14	[22]
siNanog treatment	H9	[23]
	H1, hESCScs-NCL1	[14]
Culture in Matrigel	H1	[15]
	H1	[20]

作用. 因此, Activin/Nodal 信号通路的抑制对向滋养层方向分化是必需的.

4.2 BMP4 信号通路促进人类胚胎干细胞向滋养层分化

2002 年, Xu 等人^[12]首先报道 BMP4 可以促进 hESCs 向滋养层分化. BMP4 也是 TGF- β 家族的成员. 在具有饲养层细胞和 bFGF 存在下, 用 BMP4 处理单层 hESCs, 通过 DNA 芯片和 RT-PCR 证明了 BMP4 诱导 hESCs 产生的细胞具有滋养层的特征, 能产生 hCG- α , hCG- β , 孕酮和雌二醇. 同时, 多能性的标志基因 *OCT4* 等下降. BMP 家族的其他成员 BMP2, BMP7 和 GDF5 也可使 hESCs 具有类似 BMP4 处理得到的效果.

目前的研究发现, Activin/Nodal 信号通路被抑制时, BMP4 的表达上调. BMP 信号通路依赖于一个通用受体 Dragon, 而 Dragon 是一个 GPI-AP. Wu 等人^[1]发现, 在 GPI-AP 缺陷的 hESCs 系 AR1-C1 中 Dragon 功能紊乱是由于缺乏 GPI 锚定. 因此, 细胞外的 BMP 不能很好地结合受体从而 BMP 信号通路被阻断. BMP 诱导 hESCs (G-GFP) 产生滋养层, 而 BMP 诱导 AR1-C1 hESCs 则不产生滋养层. 同时发现滋养层的标志基因 *CDX2*, *CG- α* 和 *CG- β* 在 AR1-C1 hESCs 中表达量降低.

然而, BMP4 在神经外胚层缺失途径下能阻碍小鼠 ES 分化^[29]. Kobayashi 等人^[30]用 BMP4 诱导猴的胚胎干细胞, 发现诱导后产生的是内胚层细胞而非滋养层细胞.

4.3 FGF 信号通路维持人胚胎干细胞的未分化状态

FGFs 在胚胎到成体的各种细胞类型中都有表达, 组成信号多肽家族, 目前已知的 FGF 因子有 22 种^[31]. FGF 结合 FGF 受体二聚体化能产生酪氨酸激酶活性和受体的自磷酸化, 从而产生作用. 在胚胎发育期间, FGF 具有促进细胞增殖、分化和迁移等多种功能. 在哺乳动物胚胎中, 胚胎发育不同时期 FGF 表达量不同. 通过 cDNA 芯片分析, 未分化的 hESCs 中 bFGF, FGF-11, FGF-13, FGFR1, FGFR2, FGFR3 和 FGF4 等的表达都明显升高^[32]. 目前研究证实, hESCs 可以接受和传导 FGF 信号. FGF 信号具有多表达形式, 在 hESCs 中通过自分泌行使功能, 而且随着细胞的分化

接受 FGF 信号的能力增加.

Vallier 等人^[27]证实了 FGF 信号通路维持 hESCs 的多能性, 通过酪氨酸激酶抑制剂 SU5402 可以抑制 FGF 信号通路, 导致 hESCs 的分化. Xu 等人^[17]发现在无饲养层条件下, noggin 结合 bFGF 达到一定高的浓度 (40 ng/mL) 或 bFGF 达到一定高的浓度 (40 ng/mL) 时, 两种实验条件均可保持 hESCs 的未分化状态.

4.4 Wnt 信号通路在人胚胎干细胞中的作用

Wnt 信号通路具有 19 个成员, 参与很多发育过程. 经典的 Wnt 信号通路作用途径是 Wnt 接合 Frizzled 受体和 LRP5/LRP6 辅助受体维持细胞质 β -catenin 的稳定, 然后移位到细胞核与 LEF/TCF 家族的转录因子 (LEF1, TCF1, TCF3 和 TCF4) 相联系导致靶基因的转录^[33], 不依赖于丝氨酸 9 的磷酸化. 最近研究发现, TCF3 可以抑制 *Nanog* 的表达^[34]. 经典的 Wnt 信号通路在癌变过程中比较活跃^[35]. 在非经典的信号通路中, Wnt 信号通路控制细胞的运动和组织的极性, 并且通过 FZD 家族受体和辅助受体 ROR2 和 RYK 传导. Wnt3, Wnt5a 和 Wnt10b 在人胚胎干细胞中表达, Wnt6, Wnt8b 和 Wnt10b 在内胚层祖细胞中表达, Wnt6 在肠隐窝处的干祖细胞中有表达^[36].

Sato 等人^[37]证实 Wnt 信号通路在维持 hESCs 和鼠 ES 的多能性方面有重要作用, 是两者都具有维持胚胎干细胞未分化状态的信号通路. 但是 Dravid 等人^[38]的研究证实, 在 hESCs 中 Wnt 的激活可以促进人类胚胎干细胞的增殖, 但是不足以维持胚胎干细胞的多能性. Wnt/ β -catenin 信号通路在未分化的人胚胎干细胞中活性是很低的, 但在分化的人胚胎干细胞中显著上调. 目前关于 Wnt 信号通路在鼠中的研究比较多, 在人胚胎干细胞分化方面尚存在较大争议, 有待进一步研究.

4.5 Activin/Nodal, BMP4, FGF 和 Wnt 信号通路在人胚胎干细胞向滋养层分化中的相互作用

Activin/Nodal, BMP4, FGF 和 Wnt 信号通路组成了一个维持组织稳定、自我更新和干细胞的增殖、分化的信号通路网络^[35] (图 1). Wu 等人^[1]设想, 如果 Activin/Nodal 信号通路被抑制, 并且由 BMP 激活的 BMP 信号通路不是滋养层分化所必需的, 则当 Activin/Nodal 信号通路被抑制时, AR1-C1 细胞应该会分化为滋养层. 反之如果 BMP 信号通路是向滋养层分化所

必需的, 那么当 Activin/Nodal 信号通路被抑制时, AR1-C1 细胞不会分化为滋养层。当 AR1-C1 细胞用抑制 Activin/Nodal 信号通路的 SB431542 处理后不能向滋养层分化。因此, Activin/Nodal 信号通路的抑制和 BMP 信号通路的激活对于 hESCs 向滋养层分化是必需的。BMP4 的作用与 Activin/Nodal 信号通路的抑制相关。Activin/Nodal 信号通路的抑制和 BMP 的激活形成一个相互的反馈回路。Activin/Nodal 信号通路的抑制产生 BMP 的表达和激活 BMP 信号通路; BMP 信号通路进一步抑制 Activin/Nodal 信号通路。Activin/Nodal 信号通路的抑制和 BMP 信号通路的激活对于滋养层产生都是必需的。

Vallier 等人^[27]研究证明, Activin/Nodal 信号通路和 FGF 信号通路可以共同维持 hESCs 的多能性, 但是当 Activin/Nodal 信号通路表达非常活跃时, FGF 信号通路被阻止, hESCs 仍能保持不分化状态, FGF 信号通路严格依赖于 Activin/Nodal 信号通路, Alk4/5/7 受体对于 Activin/Nodal 和 FGF 信号通路维持多能性基因的表达都是必需的, 因此 FGF 也是 Activin/Nodal 信号通路的竞争因子。此前 Cornell 等人^[39]曾报道, FGF 在两栖类和鱼类的发育中是 TGF- β 信号通路的竞争因子。Mathieu 等人^[40]在斑马鱼中发现, FGF 可以增加 Nodal 辅因子 Cripto 的表达, 这种现象可能与 FGF 为什么是 Nodal 信号通路的竞争因子有关。

Xu 等人^[17]在无饲养层细胞的情况下利用 BMP 的拮抗剂 noggin (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 与 bFGF (40 ng/mL) 结合可以抑制 BMP 信号通路并保持 hESCs 的多能性。Wnt 信号通路 FGF 信号通路下游调控需要 GSK3 β 的激活, GSK3 β 的激活不需要丝氨酸 9 的磷酸化。FGF 信号通路下游的调控需要 GSK3 β 的激活, 这依赖丝氨酸 9 的磷酸化^[41]。这可能暗示了两条信号通路在人胚胎干细胞中行使不同的功能。Gadue 等人^[42]利用他们建立的 CD4-Foxa2 和 GFP-Bry 的胚胎干细胞系, 证明了 Wnt 和 TGF- β /Activin/Nodal 信号通路在 ES 细胞分化为 PS (primitive streak) 是必要的。Wnt 倾向促进产生晚期的 PS, 而 Activin 可以对早期和晚期 PS 的产生都有作用。这说明 Wnt 和 TGF- β /Activin/Nodal 信号通路在促进人胚胎干细胞向滋养层分化上, 可能有未被发现的作用, 有待进一步研究。在 FGF 家族中, *FGF16*, *FGF18* 和 *FGF20* 基因都受 Wnt 调控^[43]。但是 Wnt 和 FGF 在人胚胎干细胞中是否存在调控还未知, 尚需进一步研究。

5 应用前景

滋养层细胞在胚胎发育过程中具有重要意义, 对胚胎的植入影响很大, 植入失败可能导致严重的妊娠疾病。例如植入不完全会导致流产和先兆子痫, 植入

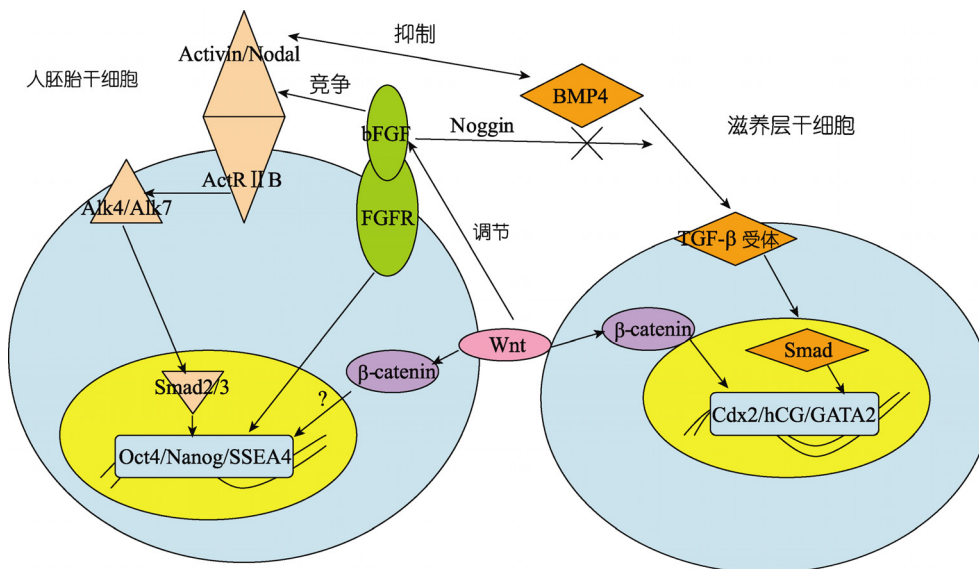


图1 人胚胎干细胞向滋养层细胞的分化调控的信号通路

过度会导致葡萄胎和绒毛膜上皮癌, 对婴儿和母体都会造成很大的影响. 随着干细胞技术的发展, 胚胎干

细胞将是研究滋养层细胞体外分化的良好模型, 为进一步研究胚胎植入调控机制和相关疾病奠定了基础.

参考文献

- 1 Wu Z, Zhang W, Chen G, et al. Combinatorial signals of activin/nodal and bone morphogenic protein regulate the early lineage segregation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2008, 283: 24991—25002[DOI]
- 2 Hohn H P, Linke M, Ugele B, et al. Differentiation markers and invasiveness: discordant regulation in normal trophoblast and choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, 1998, 244: 249—258[DOI]
- 3 Zhang J, Cao Y J, Zhao Y G, et al. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 659—666[DOI]
- 4 Pijnenborg R, Bland J M, Robertson W B, et al. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta*, 1981, 2: 303—316[DOI]
- 5 Pijnenborg R, Robertson W B, Brosens I, et al. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*, 1981, 2: 71—91
- 6 Schulz L C, Ezashi T, Das P, et al. Human embryonic stem cells as models for trophoblast differentiation. *Placenta*, 2008, 29: S10—S16[DOI]
- 7 Georgiades P, Ferguson-Smith A C, Burton G J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, 2002, 23: 3—19[DOI]
- 8 Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*, 2002, 19: 3—11[DOI]
- 9 Bischof P, Campana A. Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14: 801—814[DOI]
- 10 Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145—1147[DOI]
- 11 Henderson J K, Draper J S, Baillie H S, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 2002, 20: 329—337[DOI]
- 12 Xu R H, Chen X, Li D S, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1261—1264[DOI]
- 13 Babaie Y, Herwig R, Greber B, et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25: 500—510[DOI]
- 14 Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*, 2005, 23: 1035—1043[DOI]
- 15 Gerami-Naini B, Dovzhenko O V, Durning M, et al. Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology*, 2004, 145: 1517—1524[DOI]
- 16 Harun R, Ruban L, Matin M, et al. Cytotrophoblast stem cell lines derived from human embryonic stem cells and their capacity to mimic invasive implantation events. *Hum Reprod*, 2006, 21: 1349—1358[DOI]
- 17 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: 185—190[DOI]
- 18 Golos T G, Pollastrini L M, Gerami-Naini B. Human embryonic stem cells as a model for trophoblast differentiation. *Semin Reprod Med*, 2006, 24: 314—321[DOI]
- 19 Ezashi T, Das P, Roberts R M. Low O² tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4783—4788[DOI]
- 20 Liu Y P, Dovzhenko O V, Garthwaite M A, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 636—645[DOI]
- 21 Hay D C, Sutherland L, Clark J, et al. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22: 225—235[DOI]
- 22 Matin M M, Walsh J R, Gokhale P J, et al. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells*, 2004, 22: 659—668[DOI]

- 23 Zaehres H, Lensch M W, Daheron L, et al. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 299—305[DOI]
- 24 Attisano L, Wrana J L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 2002, 296: 1646—1647[DOI]
- 25 Schier A F. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 589—621[DOI]
- 26 Beattie G M, Lopez A D, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, 2005, 23: 489—495[DOI]
- 27 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[DOI]
- 28 Smith J R, Vallier L, Lupo G, et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Developmental Biology*, 2008, 313: 107—117[DOI]
- 29 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: 281—292[DOI]
- 30 Kobayashi M, Takada T, Takahashi K, et al. BMP4 induces primitive endoderm but not trophectoderm in monkey embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2008
- 31 Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43: 203—208
- 32 Dvash T, Mayshar Y, Darr H, et al. Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum Reprod*, 2004, 19: 2875—2883[DOI]
- 33 Moon R T, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*, 2002, 296: 1644—1646[DOI]
- 34 Pereira L, Yi F, Merrill B J. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 7479—7491[DOI]
- 35 Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4042—4045[DOI]
- 36 Katoh M. WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Curr Drug Targets*, 2008, 9: 565—570[DOI]
- 37 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: 55—63[DOI]
- 38 Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 1489—1501[DOI]
- 39 Cornell R A, Musci T J, Kimelman D. FGF is a prospective competence factor for early activin-type signals in *Xenopus* mesoderm induction. *Development*, 1995, 121: 2429—2437
- 40 Mathieu J, Griffin K, Herbomel P, et al. Nodal and Fgf pathways interact through a positive regulatory loop and synergize to maintain mesodermal cell populations. *Development*, 2004, 131: 629—641[DOI]
- 41 Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 1059—1064
- 42 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[DOI]
- 43 Katoh Y, Katoh M. FGF signaling inhibitor, SPRY4, is evolutionarily conserved target of WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int J Mol Med*, 2006, 17: 529—532

Studies on the differentiation of trophoblast from human embryonic stem cell

YANG YanYan, BAI Yang, WANG YanLing & JI Lei

State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

The emergence of the inner cell and the trophoblast is the first step in cell lineage segregation of the developing mammalian embryos. Embryonic stem cells in different mammals are different to the trophoblast differentiation, the trophoblast is crucial for embryo implantation, as well as promotion of embryo survival and growth in the uterus. Human embryonic stem cells provide a unique model for studying human early embryonic development. As a model, the advantages of human embryonic stem cells are that they can maintained indefinitely in the laboratory and provide the ability to study the initial embryonic/trophectoderm transition. Human embryonic stem cells can be prompted to form trophoblast by self-differentiation, the transgenic knockdown of genes associated with pluripotency, separate of embryoid bodies(EB), BMP4 treatment of stem cells. Between different mammalian embryonic stem cells to the trophoblast differentiation in the signal pathway, such as BMP4, LIF, and so on, and certain marker genes such as *OCT4*, *CDX2*, *Eomes* have some similarities and differences. Human embryonic stem cells to the trophoblast differentiation of clinical research provides some basis.

embryonic stem cell, trophoblast, BMP4, implantation, embryoid body

doi: 10.1360/052009-388