

维持胚胎干细胞自我更新 分子机制的研究进展*

姜祖韵¹⁾ 袁毅君^{1,2)} 明镇寰¹⁾ 张 铭¹⁾**

(¹⁾浙江大学生命科学学院, 杭州 310012; ²⁾天水师范学院生命科学与化学学院, 天水 741000)

摘要 胚胎干细胞通过特殊内源性分子的表达, 以及微环境中多种细胞因子和胞外基质的刺激, 构成信号网络, 共同调控自我更新。近年来, 通过对 Oct3/4、Nanog 等胚胎干细胞特殊分子标记, 以及 LIF-STAT3, Wnt- β -连环素, BMP-Id 等信号通路的研究, 探讨了胚胎干细胞自我更新信号网络的分子机制。维持自我更新的关键在于胚胎干细胞生长微环境中的各种细胞因子和胞外基质的含量, 以及细胞内源性特异分子表达量之间的平衡。

关键词 胚胎干细胞, 自我更新, 信号网络, 分子机制

学科分类号 Q813, R394

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 是一类具有自我更新能力的多潜能性细胞, 在体外特定培养条件下, 能维持不分化状态, 并具有增殖能力。从囊胚期的内细胞团 (ICM) 和早期胚胎的原始生殖细胞 (PGCs) 中可以分离得到 ESC, 分别命名为 ES 和 EG。1981 年, Evans 等建立了第一个小鼠胚胎干细胞 (MES) 系。1998 年, Thomson 等^[1]建立了人胚胎干细胞 (HES) 系。研究揭示 LIF 能够维持 MES 的自我更新, 但不能维持 HES 的自我更新, 由此发现维持 ESC 自我更新的是一个复杂体系。ESC 自身表达一些特异的分子, 并且受到一系列可溶性细胞因子和不溶性胞外基质的共同刺激, 引起多个转录因子通过不同的信号通路, 构成复杂的信号网络系统, 在基因水平共同调节 ESC, 最终决定其自我更新或者分化。本文就 ESC 自我更新的最新研究进展进行综述, 旨在初步探明 ESC 自我更新信号网络的分子机制。

1 胚胎干细胞特殊分子标记 (ESC-specific markers)

ESC 表达一些特殊的分子标志, 如细胞内转录因子 Oct3/4、Rex-1 和 UTF-1 等, 碱性磷酸酶 (AP)、阶段特异性胚胎抗原 (SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4)、转录调控抗原 (TRA-1-60、TRA-1-81)、同源蛋白转录因子 (Nanog) 等。在启动分化过程中, 这些分子的表达量都有明显的下调^[2, 3]。

1.1 Oct3/4 在 ESC 中维持自我更新和促进分化的双重作用

Oct3/4 由 *Pou5f1* 基因编码, 在所有的 ESC 细

胞中都有表达。如果没有外源性白血病抑制因子 (LIF) 存在, 缺失 Oct3/4 基因的 ESC 会分化成滋养层细胞^[4], 即便 Oct3/4 在外源性启动子作用下持续表达, 仍不足以维持干细胞的不分化状态, 而且 Oct3/4 过量表达会导致 ESC 的分化^[5]。推测 Oct3/4 可能控制 ESC 自我更新和分化两条途径: 一条通路是 Oct3/4 阻止 ESC 向滋养层方向分化; 另一条是 Oct3/4 会引起 ESC 向内胚层分化。

1.2 同源蛋白转录因子 Nanog

同源蛋白转录因子 Nanog 是最近在小鼠和人的 ESC 中发现的一类新的特异性分子标记^[6, 7]。其同源域在不同品系小鼠中有 94% 相同, 在不同人种中有 87% 相同。Nanog 的 cDNA 由 2 184 个核苷酸组成, 包含一个开放阅读框, 编码 305 个氨基酸。其 3' 端有一个由 1 077 个碱基组成的非翻译区域, 包含一个 B2 重复元件。B2 在胚胎细胞中高水平表达, 调节 Nanog 的表达。

Nanog 在维持干细胞和小鼠囊胚外胚层的多潜能性中是必需的, 在 ICM、ES 和 EG 中都有表达。缺失 Nanog 基因引起 ESC 向体壁和内脏方向的内胚层分化。Nanog 抑制分化的一个机制可能是抑制了一些促分化基因如 *gata4* 和 *gata6* 的转录。因为在 ES 细胞中强制性表达 *gata4* 和 *gata6* 会使其向内胚层分化^[8], 在 *gata6* 过量表达的细胞和 Nanog 缺

* 浙江省重大项目 (J 20020579-30116), 湖州中心医院合作项目 (H20010984-32536)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-88273423, E-mail: zhangming_ls@zju.edu.cn

收稿日期: 2004-05-18, 接受日期: 2004-08-31

失的细胞中, 其他标志基因的表达模式基本一样. *gata6* 是 *gata4* 的上游基因, *gata6* 直接影响 *gata4*. *gata6* 增强子区域中包含一个 Nanog 的 DNA 识别序列, 表明 Nanog 可能直接调控 *gata6*. 另外, Nanog 的共有序列在 Rex-1 的增强区域中发现, 显示 Nanog 也可能通过调节一些 ESC 特异性基因维持其多潜能性.

2 胚胎干细胞自我更新的信号通路

信号传导途径在 ESC 的自我更新中有很重要的作用, LIF-STAT3 在 MESC 中维持自我更新^[9]. Sato 等^[2]研究表明, 在 HES 的 918 个丰富表达的基因中, 有 17% 与信号通路相关, 包括 FGF、BMP 和 Wnt 途径等.

2.1 LIF-STAT 信号通路

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是一种多功能糖蛋白, 有分泌型和基质型两种. 在 MESC 体外培养过程中, 单独利用小鼠成纤维饲养层或者 LIF 可以维持自我更新. LIF 通过两条途径作用于 MESC, 以维持自我更新, 并促进增殖. LIF 能引起 LIF 受体和 Gp130 形成异源二聚体, 进一步激活酪氨酸激酶 JAK (Janus tyrosin kinase), 激活转录因子 STAT3 (signal transducers and activators of transcription); LIF 也可通过 MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase) 途径调节 MESC^[9]. 但 LIF 对 HESC 无明显作用^[1], HESC 需要饲养层或者饲养层的条件培养液和胞外基质 Matrigel 共同维持自我更新^[10].

2.2 Wnt 信号通路

Wnt (wingless int) 信号通路参与多种细胞的基因表达、增殖、分化和凋亡途径, 其中 Wnt- β -连环素通路已经研究得比较清楚, Wnt 信号蛋白结合细胞表面受体蛋白 Frizzled, 受体下游信号导致糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 失活, 造成 APC 蛋白 (adenomatous polyposis coli protein) 和 GSK-3 形成不稳定的蛋白复合物, 最终导致核内的 β -连环素 (β -catenin) 积累, 引起一系列 Wnt 目标信号, 如细胞周期蛋白 D1、c-myc、Axin 2 和 BMP 等, 调节细胞增殖、分化和凋亡等功能.

最近, 发现 Wnt- β -连环素通路能维持 ESC 的

自我更新^[11,12]. Wnt 蛋白的受体 Frizzled 5、下游目标调控因子 FRAT2 和细胞周期蛋白 D1 在 MESC 中大量表达, 没有发现其他的相关配体表达, 说明这条途径不是细胞自分泌途径^[2]. 在不添加 LIF 时, 利用一种新的来源于软体动物海螺体的 GSK-3 特异性抑制剂 6-溴靛红-3'-脒 (6-bromoindirubin-3'-oxime, BIO), 能维持 ESC 的自我更新. 撤去 BIO 后, ESC 恢复分化能力^[12]. 这进一步说明了 Wnt 信号通路在维持 ESC 自我更新中的重要作用. 饲养层中分泌能维持 HES 自我更新的物质是否和 Wnt 信号蛋白相关呢?

2.3 BMP 信号通路

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是属于 TGF- β 家族的细胞因子, 在未分化的 ESC 中发现有大量的 GDF-3/BMP-R1A 信号富集^[2]. 无血清的培养条件下, LIF 不能维持 MES 的自我更新, 而向神经样细胞分化, 这表明血清中的一些因子和 LIF 共同维持 MES 的不分化状态. 但是相同无血清条件下, 添加 BMP4 和 LIF 却能维持 MES 的自我更新. TGF- β 家族的另外两种细胞因子 GDF6 和 MIS 也有这种作用. 在 BMP4 和 GDF6 表达的 ESC 细胞中, 下游信号蛋白 Smad1 发生快速磷酸化作用, 最终激活 *Id* (inhibitor of differentiation) 基因, 产生负调节因子, 调节 ESC. 在血清存在条件下, *Id* 基因的表达增加. 在外源性持续表达 *Id* 基因的 ES 细胞中, 只添加 LIF, 也能维持 ESC 自我更新. 如果没有 LIF, 那么 ESC 向神经细胞分化. 在 ESC 细胞中, 有神经元基因 *Mash-1* 表达, 从而推测 *Id* 基因阻碍 *Mash-1* 的表达. 这说明血清中存在 BMP, 是另外一条维持 ESC 自我更新的平行通路^[13].

3 胚胎干细胞各条信号通路之间的网络模式

多个因素构成一个庞大的维持 ESC 自我更新能力的网络, 其中特异分子和各种转录因子的最终表达量是决定 ESC 是否分化的关键. 当各种因子分泌量达到相互平衡的状态时, ESC 维持自我更新, 但是如果其中一个或几个因子的表达量改变时, 就会促使 ESC 向某个方向分化. 从现有的研究来看, 主要有 Oct3/4、Nanog、LIF、Wnt 和 BMP 等几条既平行又相互交错的通路在决定 ESC 的自我更新 (图 1).

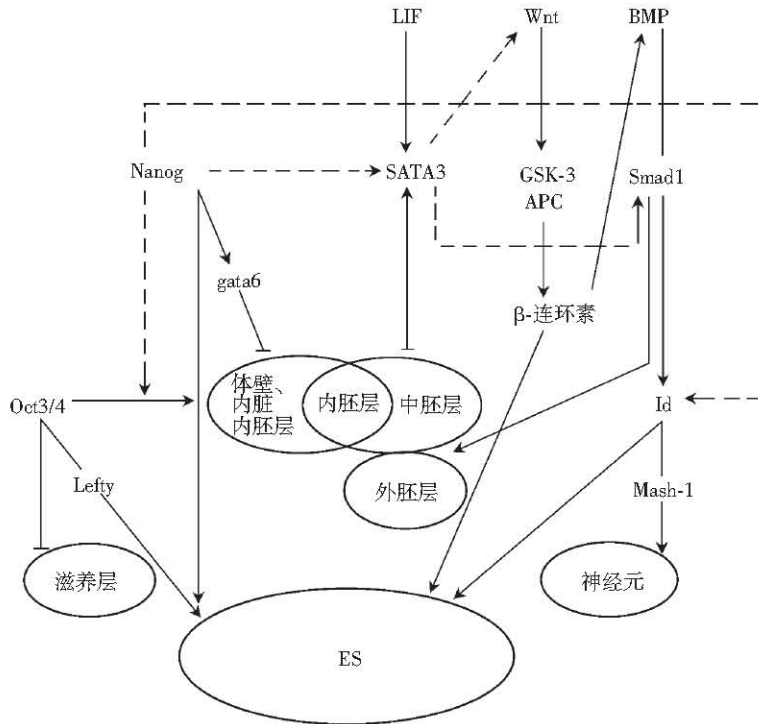


Fig. 1 The regulation of embryonic stem cells self renewal

图1 影响胚胎干细胞自我更新分子机制的信号网络模式图^[5-7,12,13]

(实线表示已经明确的信号通路, 虚线表示相关可能的信号通路)

在无血清培养体系中, 单独或综合添加层粘连蛋白、纤粘连蛋白、LIF 和 FGF4 四种成分, 结果发现任何单独的成分对维持 MESC 自我更新的能力很小, 如果联合添加 LIF、FGF4 和层粘连蛋白则会引起 MESC 的分化. 这说明 ESC 的自我更新是多个因素的综合, 并非单独作用, 并且表达量的多少也直接影响自我更新^[2].

缺失 Oct3/4 基因, 导致 ESC 分化, 但是 Nanog 仍能表达. 在 Nanog 过量表达的 ESC 细胞中, 不能逆转由于缺失 Oct3/4 基因而引起的 ESC 分化, 也没有 Oct3/4 表达量增加的现象, 说明 Nanog 不直接作用 Oct3/4 的表达^[6]. Nanog 可能阻碍 Oct3/4 向内胚层分化之间的信号通路, 从而保持 ESC 的不分化状态. 由此看来, Oct3/4 和 Nanog 在 ESC 的自我更新中控制两条途径, 但是 Nanog 可能控制 Oct3/4 在 ESC 分化作用途径中的一些位点.

在 LIF 的存在下, 缺失 Nanog 基因仍能保持 ESC 的自我更新能力. 用 LIF 受体缺失的 ESC 细胞的实验结果显示了 Nanog 不受 LIF-R-Gp130 信号

途径的调控. Nanog 能在 JAK 阻断的前提下, 保持 ESC 自我更新的能力^[6]. Nanog 可能本身就调节 STAT3, 而无需通过 LIF-STAT 途径, 或者通过另外一条完全和 LIF 平行的途径而实现自我更新.

在 Nanog 过量表达的 ESC 细胞中, 不需要添加 BMP 也能维持 ESC 的自我更新, 并且 Nanog 维持 Id 基因的表达^[13], 显示 BMP 信号和 Nanog 之间有着密切的关系. BMP 和 LIF 信号途径共同作用维持 MESC 的自我更新. 过量表达 Smad1 或者持续激活 BMP 受体, 即便在 LIF 存在的条件下, 也导致其向非神经元方向分化^[13]. 表明 STAT3 和 Smad1 相对平衡的表达量决定 MESC 的自我更新. 在 Wnt 信号通路中, 如果 APC 突变或者 β-连环素持续表达, BMP 水平上调, 抑制 ESC 向神经细胞分化, 但是促进其向外胚层和中胚层分化. 这说明 Wnt 途径直接调控 BMP, 阻止 ESC 向神经细胞分化^[11].

目前的研究结果还不能确切知道细胞内部如何维持 ESC 自我更新的精确途径. MESC 和 HESC 的分子机制并不完全相同, 这种差异的本质是通过哪

些信号途径来实现, 如 LIF 途径和 Wnt 途径之间共同作用的位点分子是什么? 在 HESC 中, 需要碱性成纤维生长因子 (bFGF) 来维持其自我更新, bFGF 又通过哪条信号通路? 随着 ESC 分子机制的进一步研究, 相信网络信号的调控机制将真正揭开 ESC 自我更新的面纱.

参 考 文 献

- 1 Thomson J, Itskovitz J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282** (5391): 1145 ~ 1147
- 2 Sato N, Sanjuan I M, Heke M, *et al.* Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol*, 2003, **260** (2): 404 ~ 413
- 3 Carpenter M K, Rosler E S, Fisk G J, *et al.* Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn*, 2004, **229** (2): 243 ~ 258
- 4 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell*, 1998, **95** (3): 379 ~ 391
- 5 Niwa H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat genet*, 2000, **24** (4): 372 ~ 376
- 6 Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression

- cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cell. *Cell*, 2003, **113** (5): 643 ~ 655
- 7 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
 - 8 Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev*, 2002, **16** (7): 784 ~ 789
 - 9 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
 - 10 Xu C H, Inokuma M S, Denham J, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (10): 971 ~ 974
 - 11 Haegele L, Ingold B, Naumann H, *et al.* Wnt signaling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci*, 2003, **24** (3): 696 ~ 708
 - 12 Sato N, Meijer L, Skaltsounits 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
 - 13 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

Progress in The Study of Molecular Mechanism Maintaining Embryonic Stem Cells Self-renewal*

JIANG Zu-Yun¹⁾, YUAN Yi-Jun^{1,2)}, MING Zhen-Huan¹⁾, ZHANG Ming¹⁾**

(¹⁾ College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China;

²⁾ College of Life Science and Chemistry, Tianshui normal University, Tianshui 741000, China)

Abstract Some intrinsic ESC-specific markers, cytokines and extracellular matrix in the microenvironment compose of a complex network to co-regulate ESC self-renewal. The molecular mechanism of signal network maintaining ESC self-renewal was investigated by studying the ESC-specific markers, such as Oct-4 and Nanog recently. Moreover, ESC signal pathways, just like LIF-STAT3, Wnt- β -catenin and BMP-Id, were further deeply studied. In conclusion, the most important key to maintain ESC self-renewal is the balance among the content of various cytokines, extracellular matrix, and expressing quantity of intrinsic ESC-specific markers by different signal stimulators.

Key words embryonic stem cell, self-renewal, signal network, molecular mechanism

* This work was supported by grants from The Major Research Program of Zhejiang Province from The Science and Technique Department of Zhejiang Province (J 20020579-30116) and The Central Hospital of Huzhou City (H20010984-32536).

** Corresponding author. Tel: 86-571-88273423, E-mail: zhangming_js@zju.edu.cn

Received: May 18, 2004 Accepted: August 31, 2004