

## Id2 诱导 Myc 表达促进小鼠胚胎干细胞自我更新\*

郭蒙蒙<sup>1)</sup> 应其龙<sup>2)</sup> 叶守东<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> 安徽大学干细胞及转化医学研究中心, 合肥 230601;

<sup>2)</sup> Department of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90033, USA)

**摘要** 小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 分离自小鼠的囊胚内细胞团, 在体外具有无限的自我更新能力和多向分化的潜能, 因此拥有重大的社会和经济效益。前期人们发现, DNA 结合抑制因子 1 (inhibitor of DNA binding 1, *Id1*) 在含血清培养条件下, 可以促进 mESCs 自我更新, 但其家族成员, 如 *Id2* 和 *Id3*, 在 mESCs 中的作用尚不清楚。本课题在 mESCs 里分别上调 *Id2* 和 *Id3* 基因的表达, 发现它们在含血清的培养条件下均具有促进 mESCs 自我更新的能力, 但 *Id2* 促进自我更新的能力大于 *Id3*。通过转录组测序技术发现 *Id2* 上调 *c-Myc* 和 *n-Myc* 基因的表达水平。最后功能性验证实验证实, 只有同时干扰 *c-Myc* 和 *n-Myc* 基因的表达才能够极大地削弱 *Id2* 维持 mESCs 未分化状态的作用, 表明 *Id2* 主要通过诱导 Myc 家族成员的表达来促进 mESCs 的自我更新。本研究结果将扩大人们对干细胞多能性调控网络的认识, 利于干细胞未来的基础研究和安全应用。

**关键词** 胚胎干细胞, 自我更新, *Id2*, Myc

**学科分类号** Q254

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2017.0183

小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 是分离自小鼠早期囊胚内细胞团的细胞, 在适宜的体外培养条件下可以进行自我复制式地增殖 (自我更新), 同时还保持着分化成内、中、外三个胚层来源的各种细胞的能力 (多能性), 在再生医学领域具有重要的应用价值<sup>[1-3]</sup>。mESCs 建系之初需要维持在含有血清的培养基中, 并以灭活的成纤维细胞作为饲养层, 随后发现饲养层细胞主要通过分泌白血病抑制因子 (LIF) 来维持 mESCs 的未分化状态<sup>[4-5]</sup>。LIF 结合细胞膜表面的异二聚体受体 (LIFR/gp130), 通过 JAK 激酶磷酸化 STAT3 蛋白, 磷酸化的 STAT3 蛋白形成同二聚体进入细胞核内激活靶基因的表达<sup>[6]</sup>。在无血清的 N2B27 培养条件下, 则需要添加 2 种小分子抑制剂 (2i): CHIR99021 和 PD0325901<sup>[7]</sup>。前者抑制 GSK3 激酶从而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 后者抑制 MEK 激酶阻断 FGF/MEK/ERK 信号通路<sup>[7]</sup>。2i/LIF 通过诱导 *Tfcp2l1*、*Esrrb*、*Nanog* 及 *Klf2* 等转录因子的表达来维持 mESCs 的未分化状态<sup>[8-9]</sup>。但目前所鉴定出的这些基因是如何发挥作用的, 尚不清楚。

Id 家族基因, 如 *Id1*、*Id2* 和 *Id3*, 在 mESCs

中均是 BMP 信号通路的靶基因<sup>[10]</sup>。在无血清的培养条件下, 过表达 *Id1*、*Id2* 和 *Id3* 都可以促进 mESCs 的自我更新<sup>[11]</sup>。前期有研究表明 *Id1* 在 mESCs 中一方面通过与 *Zrf1* 相互作用抑制神经外胚层的形成<sup>[12]</sup>, 另一方面通过上调多能性基因 *Nanog* 的表达水平来抑制干细胞的分化<sup>[13]</sup>。在本研究中, 我们发现过表达 *Id2* 可以在含血清的培养基中促进 mESCs 的自我更新。通过转录组测序及基因的过表达和干扰实验, 鉴定出 Myc 家族的 *c-Myc* 和 *n-Myc* 是 *Id2* 发挥作用的关键下游基因。此研究结果利于人们对胚胎干细胞多能性调控网络的认识。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

46C 小鼠胚胎干细胞系, 由美国南加州大学应

\* 国家和安徽省自然科学基金(31501191, 31671535, 1508085SQC204) 以及安徽大学科研条件建设基金(J01006068, J01006045)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0551-63861819, E-mail: shdye@126.com

收稿日期: 2017-05-17, 接受日期: 2017-09-08

其龙教授馈赠。所用 KOD Hot Start DNA Polymerase PCR 试剂盒购自 EMD Millipore 公司; *Bgl* II、*Xho* I 和 T4 连接酶购自 TAKARA 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 TIANGEN 公司; LTX 脂质体、Puromycin 购自 Invitrogen 公司; 碱性磷酸酶检测试剂盒购自 Sigma 公司;  $\alpha$ -tubulin、Oct4、Nanog、STAT3 磷酸化和 Flag 等抗体购自 Santa Cruz、Sigma 和 CST 等公司。

### 1.2 mESCs 的培养与传代

mESCs 的血清培养体系为: DMEM(Hyclone)、10% 胎牛血清(Hyclone); 1×MEM (Invitrogen)、0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇(Sigma)以及 1 000 U/ml LIF (Millipore)。在接种细胞前, 培养皿用 0.1% 的 Gelatin (Sigma) 进行包被。当细胞生长密度达 60%~70% 时, 用胰酶(Invitrogen)消化成单个细胞进行传代培养。

### 1.3 Id 基因重组质粒的构建、转染和筛选

克隆 *Id2* 和 *Id3* 基因编码区所需要的引物序列为: *Id2*-Forward, aagatctatgaaagccttcagtcgggtg; *Id2*-Reverse, cctcgagtagccacagagtagcttgcatacaaa; *Id3*-Forward, atctaacaatgaagcgcgtgagcccg; *Id3*-Reverse, ccctcgag-tcagtggaacaaagctcctctgtgcc。在上下游引物两端分别添加 *Bgl* II 和 *Xho* I 的限制性内切酶位点, 并连入携带 Flag 标签蛋白的 PiggyBac (PB) 系统。利用 LTX 脂质体转染进 mESCs, 2 天后加入终浓度为

2 mg/L 的 Puromycin 进行药物筛选。

### 1.4 慢病毒的包装与感染

所需的质粒与辅助质粒 VSVG 以及 PSPAX2 混合后利用 Lipfectamin2000 将其转染到 293FT 细胞中, 2 天后收集并过滤分泌到培养液中的慢病毒。将收集到的慢病毒与培养液一起加入到 mESCs 中。2 天后分别用终浓度为 2 mg/L 的 Puromycin 或 8 mg/L 的 Blasticidin S HCl 进行药物筛选。

### 1.5 蛋白质印迹检测

收集各组细胞, 利用添加了蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, BCA 法测定总蛋白质浓度。用 10% 的 SDS-PAGE 胶分离各蛋白组分。利用湿转系统将蛋白转移至 PVDF 膜上, 经过封闭、一抗孵育、TBST 洗脱、HRP 标记的二抗孵育、TBST 再洗脱等步骤后, 使用 ECL 化学发光及 X 光片曝光, 经显影和定影处理后, 获得清晰条带。

### 1.6 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)

用 Trizol 法抽提细胞总 RNA, 参照 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (TransGen) 试剂盒说明书进行第一链 cDNA 的合成。参照 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (TransGen) 试剂盒说明进行荧光实时定量 PCR。 $\beta$ -actin 基因表达水平作为内参。引物序列见表 1。

Table 1 Primers for qRT-PCR

Genes	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
<i><math>\beta</math>-actin</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
<i>c-Myc</i>	ATGCCCTCAACGTGAACTTC	CGCAACATAGGATGGAGAGCA
<i>n-Myc</i>	ACCATGCCGGGATGATCT	ATCTCCGTAGCCCAATTCGAG
<i>Id2</i>	GACCACCCTGAACACGGAC	TGCTATCATTGACATAAGCTCAGA
<i>Sox3</i>	ATTCACCCAGGTGGCTACAG	GCCAATGTCTTCCCAGTGTT
<i>Axin2</i>	GGGGGAAAACACAGCTTACA	TTGACTGGGTCGCTTCTCTT
<i>Egr1</i>	CCACAACAACAGGGAGACCT	ACTGAGTGGCGAAGGCTTTA

### 1.7 碱性磷酸酶染色

待细胞长到 70% 左右时, 弃掉对照组和实验组细胞培养液, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 2 min。按照碱性磷酸酶检测试剂盒中的说明书将两种染液按照 24:1 的比例混合。然后弃掉多聚甲醛, 并加入混合染液, 室温避光 30 min 后用 PBS 漂洗并在显微镜下观察。

### 1.8 免疫荧光

待细胞长到 70% 左右时弃培养液, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min。PBS 漂洗后加入封闭液(含 5% BSA, 0.2% Triton X-100 的 PBS), 37°C 温箱孵育 1 h 后加入含有一抗的稀释液, 4°C 过夜。次日用 PBS 漂洗 3 次并加入含有荧光基团的二抗以及 Hoechst (1:5 000, Invitrogen) 染料的稀释液,

37°C避光孵育 1 h 后, 用 PBS 漂洗后在荧光显微镜下观察拍照。

### 1.9 转录组测序 (RNA-sequencing)

空白对照组(PB)和过表达 *Id2* 基因的实验组(PB-*flag-Id2*)的 46C mESCs 用 Trizol 收集裂解后送至上海晶能生物公司, 利用 Illumina HiSeq4000 平台进行转录组测序, 测序结果已上传至 NCBI 的 GEO 数据库, 编号为: GSE98759.

### 1.10 统计学处理

实验数据用 mean ± SD 表示, 采用 SPSS 15.0 统计分析软件进行统计检验, 组间比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  时认为组间具有显著差异,  $P < 0.01$  时认为组间具有非常显著差异, 结果具有统计学意义。

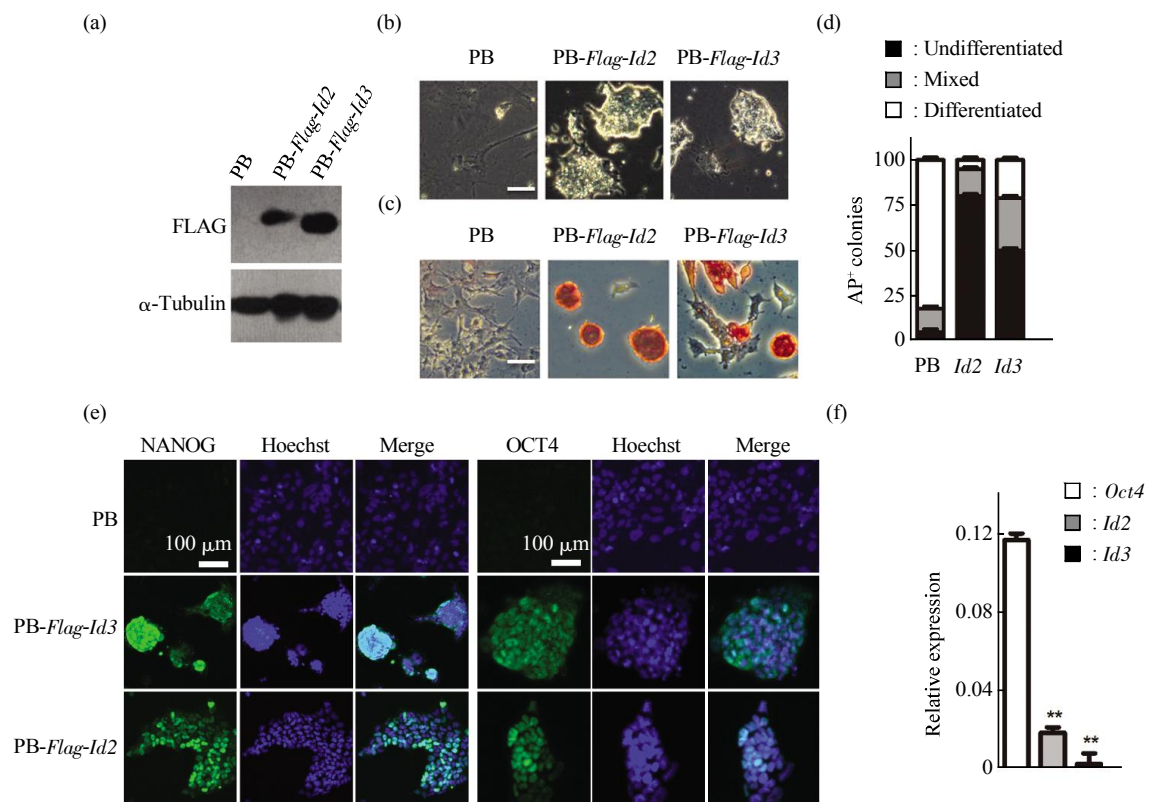
## 2 结 果

### 2.1 *Id2*和 *Id3*对 mESCs 自我更新的影响

将对照组 PB 质粒及实验组 PB-*Flag-Id2* 和 PB-*Flag-Id3* 的重组质粒联合 Transposon 质粒, 利用 LTX 分别转染进 46C mESCs 中. 经 2 mg/L

Puromycin 药物筛选一周后, 用蛋白质印迹 (Western blotting) 检测过表达的效果, 结果显示: 实验组中(PB-*Flag-Id2* 和 PB-*Flag-Id3*)能够检测到 Flag 蛋白的表达(图 1a), 说明过表达 *Id2* 和 *Id3* 的 mESCs 株构建成功。

为了检测 *Id2* 和 *Id3* 对 mESCs 自我更新的影响, 我们在不同的细胞培养皿中接种起始数目相同的 PB, PB-*Flag-Id2* 或 PB-*Flag-Id3* 细胞, 培养在不含有 LIF 的血清培养基中, 每 2 天换液一次, 观察细胞生长情况. 8 天之后传一代, 结果显示: PB 细胞全部分化, PB-*Flag-Id2* 或 PB-*Flag-Id3* 细胞内仍有许多未分化的 mESCs (图 1b), 多能性的标志碱性磷酸酶染色结果呈阳性, 且 *Id2* 产生的阳性克隆数多于 *Id3*(图 1c, d). 多能性基因 *Oct4* 和 *Nanog* 的免疫荧光也呈阳性(图 1e), 说明 *Id2* 和 *Id3* 均具有促进 mESCs 自我更新的能力, 且 *Id2* 的作用强于 *Id3*. 此外, 内源性的 *Id2* 表达水平虽然低于 *Oct4*, 但高于 *Id3*(图 1f). 后续研究我们将重点聚焦 *Id2* 基因。



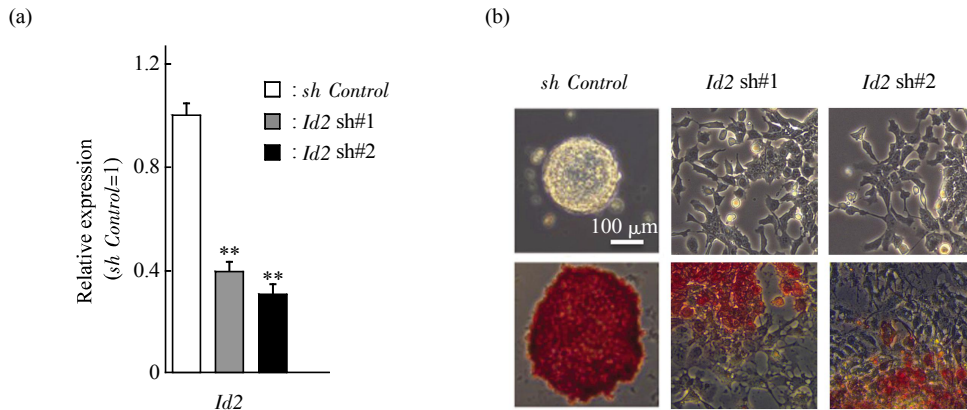
**Fig. 1 Overexpression of *Id2* or *Id3* is able to promote mESC self-renewal**

(a) Western blotting analysis of *Flag* tagged *Id2* and *Id3* in 46C mESCs cultured in LIF/serum media.  $\alpha$ -Tubulin is a loading control. (b, c) Morphology and alkaline phosphatase (AP) staining of PB, PB-*Flag-Id2* and PB-*Flag-Id3* mESCs cultured in serum medium in absence of LIF for 8 days. (d) Quantification of AP positive colonies. Data represent mean ± SD from triplicate experiments. (e) Immunostaining for Nanog and Oct4 expression. Nuclear were stained by Hoechst. (f) qRT-PCR analysis of the expression levels of *Oct4*, *Id2* and *Id3* in mESCs. Data represent mean ± SD of three biological replicates. \*\* $P < 0.01$  vs *Oct4*.

## 2.2 下调 *Id2* 对 mESCs 自我更新的影响

为了进一步验证 *Id2* 对 mESCs 自我更新的影响, 我们将对照组慢病毒 *sh Control* 以及 *Id2* 的 shRNA 干扰慢病毒 (*Id2 sh#1* 和 *Id2 sh#2*), 分别感染 46C mESCs, 2 天后用 2 mg/L 的 Puromycin 药物筛选 1 周, 用荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测

下调的效果, 结果显示: 与对照组相比, *Id2* 的转录水平明显减少 (图 2a). 细胞的形态也发生了变化, 不能形成明显的克隆, 且多能性标志碱性磷酸酶呈阴性 (图 2b), 表明 *Id2* 对于维持 mESCs 自我更新的状态是必需的.



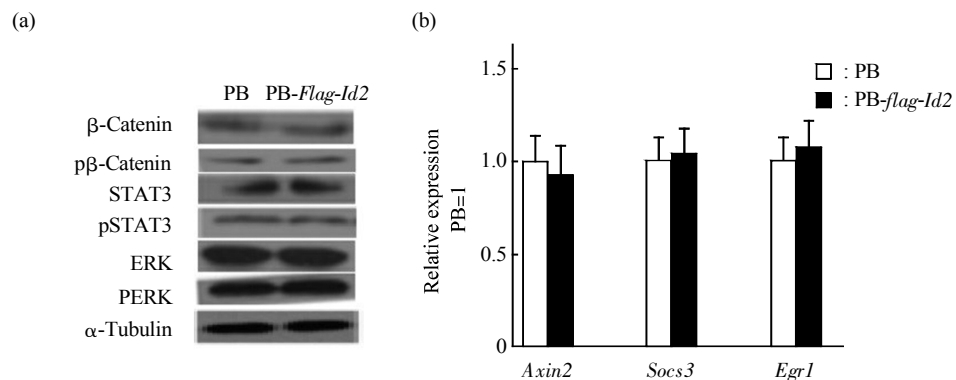
**Fig. 2** Knockdown of *Id2* induces mESC differentiation

(a) qRT-PCR analysis of *Id2* expression in *sh Control* and *Id2* knockdown mESCs cultured in LIF/serum condition. Data represent mean  $\pm$  SD of three biological replicates. \*\* $P < 0.01$  vs *sh Control*. (b) Morphology and AP staining of *sh Control* and *Id2* knockdown mESCs.

## 2.3 *Id2* 对自我更新信号通路的影响

影响 mESCs 自我更新的信号通路有 LIF/STAT3、Wnt/ $\beta$ -catenin 和 FGF/MEK/ERK. 为了检测 *Id2* 对这些信号通路是否有影响, 我们分别在 PB 和 PB-*Flag-Id2* 中检测 STAT3、 $\beta$ -catenin 和 ERK 磷酸化水平的变化. 结果显示和对照组 PB 相比, *Id2* 并未改变它们的磷酸化水平 (图 3a). 与此结果一

致, qRT-PCR 检测显示: *Id2* 也并未改变 LIF/STAT3 信号通路的靶基因 *Socs3*、Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的靶基因 *Axin2* 和 FGF/MEK/ERK 通路的靶基因 *Egr1* 的表达水平 (图 3b), 说明 *Id2* 不在 LIF/STAT3、Wnt/ $\beta$ -catenin 和 FGF/MEK/ERK 信号通路的上游发挥促进 mESCs 自我更新的作用.



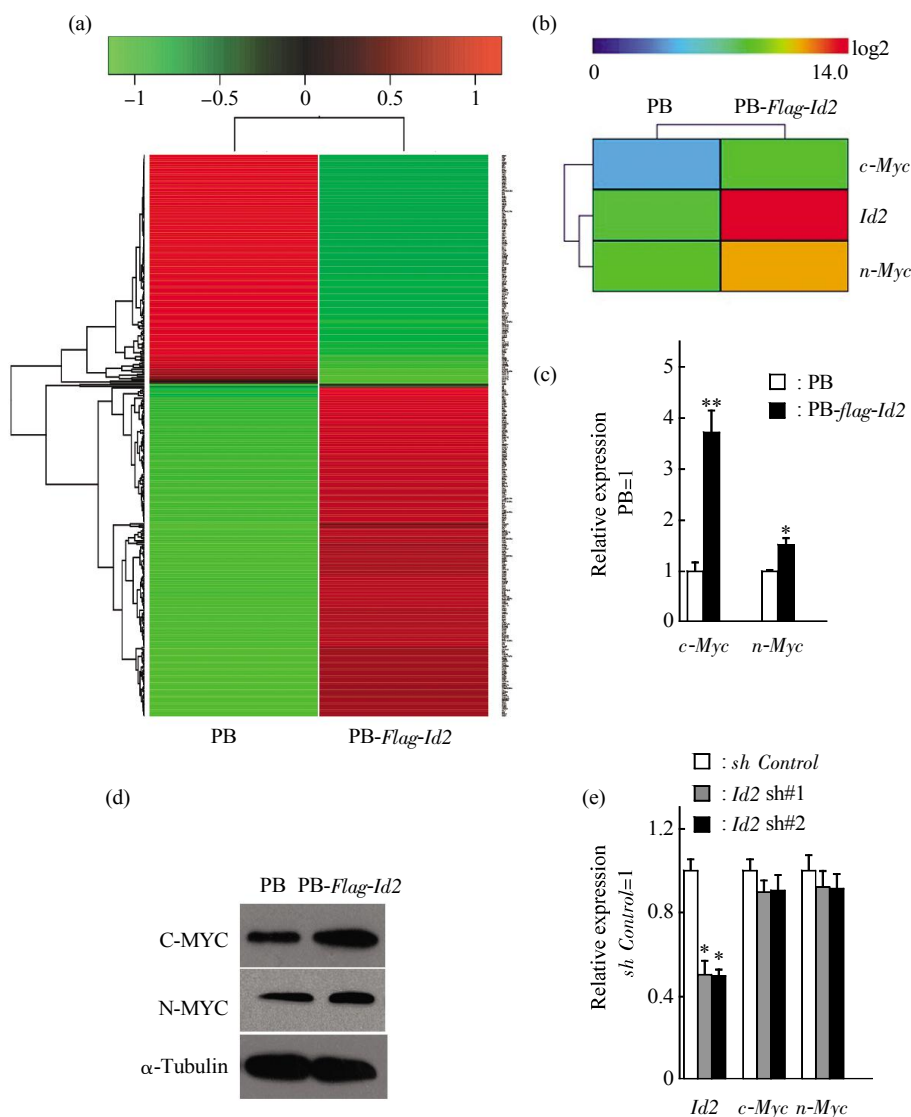
**Fig. 3** Effects of *Id2* on the mESCs self-renewal pathways

(a) Western blotting analysis of the indicated genes in the PB and PB-*flag-Id2* mESCs cultured in LIF/serum media. (b) qRT-PCR analysis of the expression levels of *Axin2*, *Socs3* and *Egr1* in PB and PB-*Flag-Id2* transfectants. Data represent mean  $\pm$  SD of three biological replicates.

### 2.4 转录组测序筛选 *Id2* 调控的靶基因

为了鉴定 *Id2* 促进 mESCs 自我更新的下游靶基因, 我们利用 illumina HiSeq 4000 平台对 PB 及 PB-*Flag-Id2* mESCs 进行转录组测序(GEO number: GSE98759), 结果显示 PB 和 PB-*Flag-Id2* mESCs 间有很多差异性基因表达(图 4a). 利用 GO 分析, 发现在测序数据里与多能性基因相关的基因 *c-Myc* 和 *n-Myc* 的表达水平上调(图 4b), qRT-PCR 验证

结果与转录组测序结果一致(图 4c). 同样, Western blotting 验证结果也显示过表达 *Id2* 的 mESCs 中, C-MYC 的蛋白水平升高明显, N-MYC 蛋白的表达水平微弱提高(图 4d). 表明在 mESCs 中, *c-Myc* 和 *n-Myc* 基因是 *Id2* 的下游基因. 但是 *c-Myc* 和 *n-Myc* 的转录本在 *Id2* shRNA 中并没有出现明显的下调(图 4e), 说明 *c-Myc* 和 *n-Myc* 可能不是受 *Id2* 直接调控.



**Fig. 4 Identification of downstream targets of *Id2* associated with pluripotency**

(a, b) The heat map shows the expression levels of total gene expression differences, *c-Myc* and *n-Myc* levels in PB and PB-*flag-Id2* mESCs cultured in LIF/serum media. (c) qRT-PCR was used to confirm the expression of *c-Myc* and *n-Myc* in PB and PB-*flag-Id2* mESCs. (d) Western blotting analysis of the indicated genes in the PB and PB-*flag-Id2*. Data represent mean  $\pm$  SD of three biological replicates. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs PB. (e) qRT-PCR analysis of the expression levels of *c-Myc* and *n-Myc* in *Id2* shRNA cells. Data represent mean  $\pm$  SD of three biological replicates.

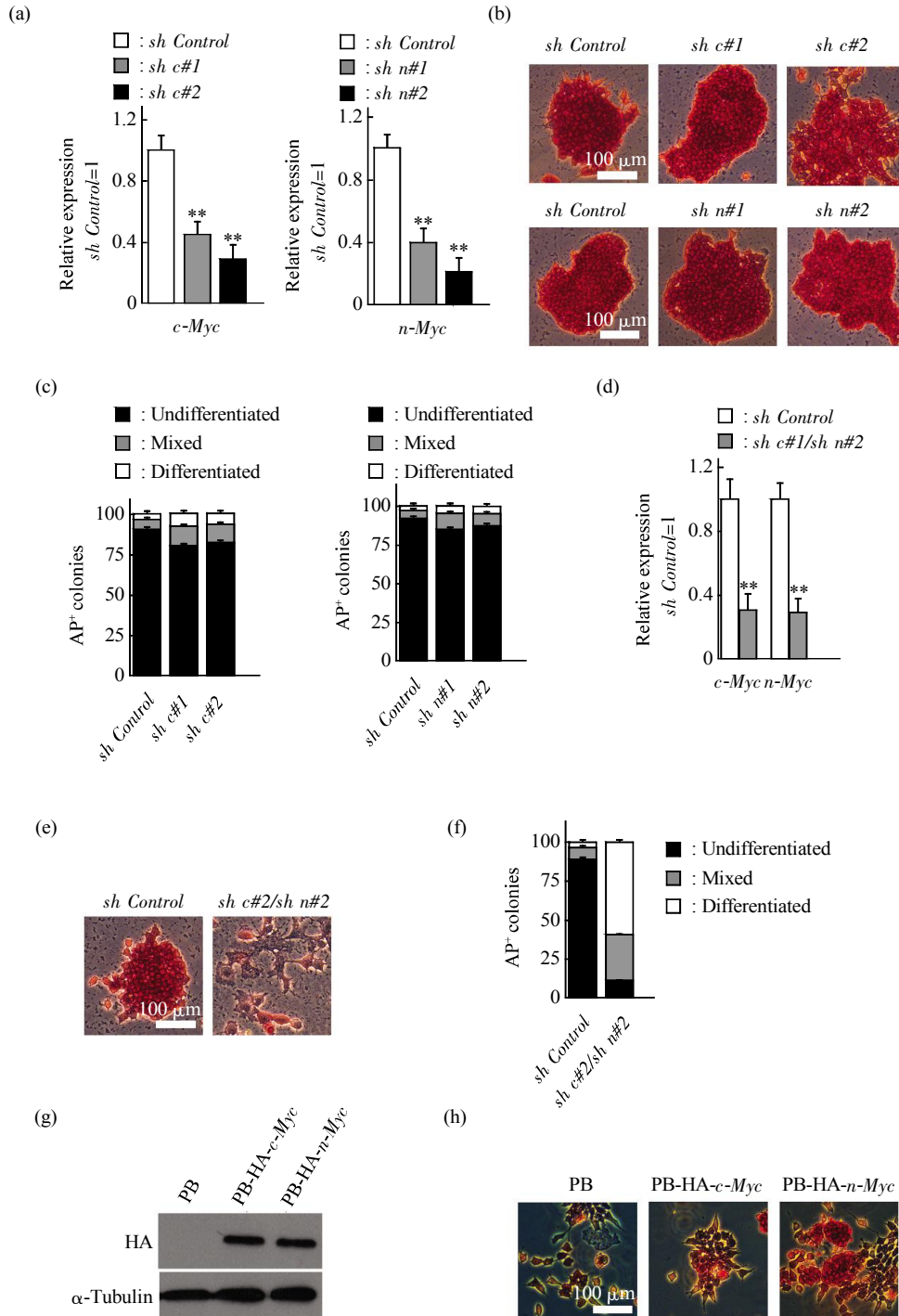
### 2.5 *c-Myc* 和 *n-Myc* 介导 *Id2* 促进 mESCs 自我更新的功能

为了验证 *Id2* 在 mESCs 中是否是通过上调

*c-Myc* 和 *n-Myc* 的表达来发挥功能, 我们在过表达 *Id2* 的 mESCs 中分别下调 *c-Myc* (*sh c#1*, *sh c#2*) 和 *n-Myc* (*sh n#1*, *sh n#2*) 基因的转录本, 发现 mESCs

仍能保持在未分化的状态(图 5a, b). 因为 mESCs 仍然有较高的碱性磷酸酶活性且未分化的克隆数与对照相比基本无差异(图 5c). 前期报道 *c-Myc* 和

*n-Myc* 在维持 mESCs 干性方面具有互补作用<sup>[4]</sup>. 因此我们接下来在 *Id2* 过表达的 mESCs 中同时干扰 *c-Myc* 和 *n-Myc* 基因(图 5d). 碱性磷酸酶染色显示



**Fig. 5** *Id2* depends on *c-Myc* and *n-Myc* to promote mESCs self-renewal

(a) qRT-PCR analysis of the expression levels of *c-Myc* and *n-Myc* in *c-Myc* (sh c#1, sh c#2) and *n-Myc* (sh n#1, sh n#2) shRNA cells overexpressed PB-*flag-Id2* cultured in LIF/serum condition. Data represent mean±SD of three biological replicates. \*\**P* < 0.01 vs Control. (b) AP staining of *c-Myc* or *n-Myc* knockdown mESCs overexpressed PB-*flag-Id2* cultured in serum medium with LIF for 3 passages. (c) Quantification of AP positive colonies in Figure 5b. (d) qRT-PCR analysis of the expression levels of *c-Myc* and *n-Myc* in *c-Myc* and *n-Myc* double knockdown mESCs overexpressed PB-*flag-Id2*. Data represent mean±SD of three biological replicates. \*\**P* < 0.01 vs Control. (e) AP staining of *c-Myc* and *n-Myc* double knockdown mESCs overexpressed PB-*flag-Id2* cultured in serum medium without LIF for 2 passages. (f) Quantification of AP-positive colonies in Figure 5e. (g) Western blotting analysis of HA tagged *c-Myc* or *n-Myc* in *Id2* shRNA mESCs cultured in LIF/serum media α-Tubulin is a loading control. (h) AP staining of empty vector, *c-Myc* or *n-Myc* transgenes mESCs infected with *Id2* shRNA lentivirus cultured in LIF/serum for 2 passages.

*Id2* 过表达的 mESCs 中出现了分化(图 5e, f). 接下来, 为了检测 *c-Myc* 和 *n-Myc* 是否可以阻止 *Id2* shRNA 导致的细胞分化, 我们在 *Id2* shRNA 细胞中分别过表达 *c-Myc* 和 *n-Myc* (图 5g), 结果表明 *c-Myc* 和 *n-Myc* 均可以部分抑制 *Id2* 基因下调引起的细胞分化(图 5h). 以上结果说明 *c-Myc* 和 *n-Myc* 在维持 mESCs 干性方面具有互补性, 同时也表明 *Id2* 促进干细胞自我更新依赖 *c-Myc* 和 *n-Myc*.

### 3 讨 论

本课题揭示了 *Id2* 促进 mESCs 自我更新的分子机制. *Id2* 在血清的培养条件下, 可以部分替代 LIF 的功能来维持 mESCs 的未分化状态; *Id2* 并没有影响 LIF/STAT3、WNT/ $\beta$ -catenin 和 FGF/MEK/ERK 信号通路的活性; 利用转录组测序技术, 筛选出了 *Id2* 会诱导 Myc 家族成员 *c-Myc* 和 *n-Myc* 的表达; 最后功能性实验证明了 *c-Myc* 和 *n-Myc* 在维持干细胞方面具有互补性, 且是 *Id2* 发挥作用的下游关键基因. 本研究结果扩大了人们对 ESCs 自我更新调控网络的认识.

胚胎干细胞取自早期胚胎的囊胚内细胞团, 体外合适的培养条件下能够长期保持着干性和多能性, 研究胚胎干细胞干性维持的分子机制是其安全应用的前提和基础<sup>[1]</sup>. 目前虽然已鉴定出了多个可以促进 mESCs 自我更新的信号通路和转录因子, 如 LIF/STAT3、WNT/ $\beta$ -catenin、FGF/MEK/ERK 和 BMP/SMAD 等信号通路, 以及 *Tfcp2l1*、*Esrrb*、*Nanog* 和 *Gbx2* 等转录因子<sup>[15]</sup>. 但是对这些通路和基因作用的分子机制还知之甚少. Id 基因家族成员拥有 helix-loop-helix (HLH) 结构域, 能够抑制不同种类前体细胞的分化、延迟细胞死亡、促进细胞周期和迁移等, 因此在干细胞维持和肿瘤生成等过程中具有重要的作用<sup>[16]</sup>. 前期已揭示在无血清 N2B27 的培养条件下, *Id1*、*Id2* 和 *Id3* 基因是 BMP4/SMAD 信号通路的下游靶基因, 过表达每一个都可替代 BMP4 维持 mESCs 的未分化状态<sup>[11]</sup>. *Id1* 在 mESCs 中不仅可以上调 *Nanog* 的表达, 还会抑制中内胚层标志基因 *T* 的 mRNA 水平以及外胚层相关基因的表达<sup>[12-13]</sup>. 但是 *Id2* 和 *Id3* 作用的下游分子机制还不知道. 它们的表达水平随着 mESCs 分化的进行, 先降低后逐渐恢复, 表明它们可能存在抑制分化的功能<sup>[13]</sup>. 我们的研究表明, 在有血清的培养条件下, 上调 *Id2* 的表达确实可以维持 mESCs 的干性. 接着通过转录组测序技

术, 结合基因的过表达和干扰技术, 我们发现 Myc 基因家族的 *c-Myc* 和 *n-Myc* 可以介导 *Id2* 促进 mESCs 自我更新的功能. Myc 家族有 *c-Myc*、*n-Myc* 和 *l-Myc* 三个成员, 但在本研究中未观察到 *l-Myc* 水平的上升<sup>[14]</sup>. *c-Myc*, 作为 LIF/STAT3 的靶基因, 其表达水平也会随着 mESCs 的分化而先降后升, 过表达时不仅可以在含血清的培养条件中替代 LIF 来维持 mESCs 的自我更新<sup>[17]</sup>, 联合 *Oct4*、*Sox2* 和 *Klf4* 还可以把成纤维细胞重编程回到胚胎干细胞样状态<sup>[18]</sup>. *n-Myc* 同样也可以促进 mESCs 干性的维持<sup>[14, 17, 19]</sup>. 值得注意的是 *c-Myc* 和 *n-Myc* 在 mESCs 中的作用具有互补性, 因为单独下调 *c-Myc* 或 *n-Myc* 并不会影响 mESCs 的未分化状态, 只有同时干扰它们的表达才会导致干细胞分化<sup>[14, 17]</sup>, 结果与本研究一致. 实际上, *c-Myc* 和 *n-Myc* 在蛋白质结构、序列和长度方面非常相似<sup>[20]</sup>. 在小鼠胚胎生长和分化过程中, *n-Myc* 不仅能够体内替代 *c-Myc* 的作用<sup>[20]</sup>, 在体外还可以替代 *c-Myc* 去重编程体细胞产生诱导性多能性干细胞<sup>[21]</sup>. 但是 *c-Myc* 和 *n-Myc* 可能并不是 *Id2* 的直接靶基因(图 4e), 加之 *Id2* 还具有其他生物学功能, 还有待于去确定 *Id2* 是否能够替代 Myc 进行体细胞的重编程.

综上所述, 本研究首次探讨了 *Id2* 在 mESCs 中的作用及部分机制, 对于更加深入和全面地了解 ESCs 内部的调控网络具有重要意义. 但 *Id2* 的表达如何被调控? 会不会直接抑制分化基因的表达? 是如何调控 *c-Myc* 和 *n-Myc* 的表达? 此一系列问题的解决将会加深人们对于干细胞调控网络的认识.

### 参 考 文 献

- [1] Smith A G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, **17**: 435-462
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(12): 7634-7638
- [3] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154-156
- [4] Smith A G, Heath J K, Donaldson D D, *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988, **336**(6200): 688-690
- [5] Williams R L, Hilton D J, Pease S, *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988, **336**(6200): 684-687
- [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] Ying Q L, Wray J, Nichols J, *et al.* The ground state of embryonic

- stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, **453**(7194): 519–523
- [8] Ye S, Li P, Tong C, *et al.* Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO J*, 2013, **32**(19): 2548–2560
- [9] Martello G, Bertone P, Smith A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J*, 2013, **32**(19): 2561–2574
- [10] Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, *et al.* Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 1999, **274**(28): 19838–19845
- [11] 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
- [12] Aloia L, Gutierrez A, Caballero J M, *et al.* Direct interaction between *Id1* and *Zrf1* controls neural differentiation of embryonic stem cells. *EMBO Rep*, 2015, **16**(1): 63–70
- [13] Romero-Lanman E E, Pavlovic S, Amlani B, *et al.* *Id1* maintains embryonic stem cell self-renewal by up-regulation of Nanog and repression of Brachyury expression. *Stem Cells Dev*, 2012, **21**(3): 384–393
- [14] Smith K N, Singh A M, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(3): 343–354
- [15] Huang G, Ye S, Zhou X, *et al.* Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol Life Sci*, 2015, **72**(9): 1741–1757
- [16] Ling F, Kang B, Sun X H. Id proteins: small molecules, mighty regulators. *Curr Top Dev Biol*, 2014, **110**: 189–216
- [17] Varlakhanova N V, Cotterman R F, Devries W N, *et al.* myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation*, 2010, **80**(1): 9–19
- [18] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4): 663–676
- [19] Ye S, Tan L, Yang R, *et al.* Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. *PLoS One*, 2012, **7**(4): e35892
- [20] Malynn B A, De Alboran I M, O'hagan R C, *et al.* N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev*, 2000, **14**(11): 1390–1399
- [21] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(1): 101–106



## Id2 Promotes Mouse Embryonic Stem Cell Self-renewal Through Induction of The Expression Levels of Myc Family Members\*

GUO Meng-Meng<sup>1)</sup>, YING Qi-Long<sup>2)</sup>, YE Shou-Dong<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Center for Stem Cell and Translational Medicine, Anhui University, Hefei 230601, China;

<sup>2)</sup> Department of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90033, USA)

**Abstract** Mouse embryonic stem cells (mESCs) are isolated from the inner cell mass (ICM) of the pre-implantation embryos. They can be maintained indefinitely as self-renewing populations while retaining the pluripotency to differentiate into the cells of all three primary germ layers when cultured under appropriate conditions *in vitro*. The transcriptional factor inhibitor of DNA binding 1 (*Id1*) can promote mESC self-renewal in serum condition without LIF. However, whether the other Id family members, such as *Id2* and *Id3*, have similar function in mESCs is still unclear. In this study, we overexpressed *Id2* and *Id3* in 46C mESCs respectively, and found that both factors are able to support mESC self-renewal in the absence of LIF, while the self-renewal-promoting effect of *Id2* is stronger than *Id3*. RNA-sequence approach revealed that *Id2* is capable of upregulating *c-Myc* and *n-Myc* expression levels. Functional studies demonstrated that knockdown of *c-Myc* and *n-Myc* together could greatly reduce the function of *Id2* in sustaining the undifferentiated state of mESCs, indicating that Myc family members have functional redundancy and can mediate the self-renewal-promoting effect of *Id2* in mESCs. Our results will expand the current understanding of the pluripotency regulation network of embryonic stem cells.

**Key words** embryonic stem cell, self-renewal, *Id2*, Myc

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2017.0183

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China and Anhui Province (31501191, 31671535, 1508085SQC204) and the 211 Scientific Research Startup Fund of Anhui University (J01006068, J01006045).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-551-63861819, E-mail: shdye@126.com

Received: May 17, 2017 Accepted: September 8, 2017