

文章编号: 1004-0374(2009)05-0631-08

调控胚胎干细胞自我更新的关键转录因子研究进展

李令杰, 金颖*

(中国科学院上海生命科学研究院 / 上海交通大学医学院健康科学研究所
干细胞重点实验室, 上海 200025)

摘要: 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)具有自我更新和发育多能性的特点, 在再生医学研究中有着广泛的应用前景。ES细胞多能性和自我更新的维持受到复杂的调控, 涉及到转录调控、信号转导以及表观遗传调控等多个方面。转录因子Oct4、Sox2、Nanog在其中扮演着非常重要的角色, 对干细胞特性的维持必不可少。本文着重讨论了这些关键转录因子的研究进展。这些研究促进了对ES细胞自我更新机制的深入理解, 并为进一步的临床研究提供了理论基础。

关键词: 胚胎干细胞; 自我更新; 多能性; 关键转录因子; Oct4; Sox2; Nanog

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Research progress on the key transcription factors governing the self-renewal of embryonic stem cells

LI Ling-jie, JIN Ying*

(Key Laboratory of Stem Cell Biology, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences/Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Embryonic stem (ES) cells are pluripotent and capable of self-renewal, thus holding the promise for regenerative medicine. The mechanism underlying pluripotency and self-renewal is governed at multiple levels, involving the transcriptional regulation, signal transduction and epigenetic regulation and so on. Transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog play a critical role in this regulatory network and are critical for maintaining ES cell identity. In this review, we discuss the recent advances of these key regulators. These studies will facilitate the understanding of the mechanisms of self-renewal in ES cells and provide theoretical basis on its clinical application.

Key words: ES cells; self-renewal; pluripotency; key transcription factors; Oct4; Sox2; Nanog

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)是胚胎发育早期囊胚阶段(blastocyst stage)的内细胞团(inner cell mass, ICM)在体外特定的培养条件下所得到的一类具有无限自我更新(self-renewal)与发育多能性(pluripotency)的细胞^[1-3]。在体外合适的条件下, ES细胞能够无限制地进行完全的对称分裂并保持未分化状态; 另一方面, 它们又可以分化为外、中、内三胚层来源的各种细胞。此外, ES细胞易于冻存、培养, 便于遗传操作。这些特性使它成为研究发育调控、基因功能等理论问题的重要模

型。更重要的是, ES细胞多向分化的潜能也使它成为组织工程、细胞移植的理想来源。1998年, 人胚胎干细胞系被成功地分离培养^[3], 这为治疗帕金森病、糖尿病等难治性疾病打开了新的窗口。为了更好地利用ES细胞, 需要深入了解其维持自我更新状态的分子机制。近年来的研究表明: 这一状

收稿日期: 2009-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570907)

*通讯作者 E-mail: yjin@sibs.ac.cn

态的维持是转录因子、信号转导通路、表观遗传修饰因子等多种因素联合作用的结果。其中转录因子 Oct4、Sox2、Nanog 在其中处于至关重要的地位。深入研究这些转录因子的功能，必将有助于进一步了解 ES 细胞维持自我更新和发育多能性的分子机制，为更好地应用于临床提供坚实的理论基础。

1 概述

Oct4 由 *Pou5f1* 编码，属于 POU (Pit-Oct-Unc) 转录因子家族。它通过结合含有 ATGCAAAT 的八碱基保守序列来参与对下游基因的调控^[4]。Oct4 主要表达于受精卵、桑椹胚 (morula)、囊胚的内细胞团以及着床后胚胎的上胚层 (epiblast) 和原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs)。在小鼠中，敲除 *Oct4* 基因导致胚胎死于着床前期 (胚胎发育 3.5—4.5 d)。该囊胚由于不能形成多能性的内细胞团，并且不能正常着床而发育停滞^[5]。这说明 Oct4 对于胚胎发育早期多能性细胞的形成是必需的。在体外培养的 ES 细胞中，只有当 Oct4 的表达量在一个特定的范围内，细胞才能保持未分化状态。当 *Oct4* 表达量高于正常水平两倍时，会导致 ES 细胞向原始内胚层 (primitive endoderm) 和中胚层分化；而当表达量低于正常水平 50% 时，ES 细胞则会向滋养层 trophectoderm 和原始内胚层分化^[6-8]。这提示 Oct4 在 ES 细胞中受到了精确调控，而且它的表达水平决定了 ES 细胞的命运。

Sox2 属于 HMG (high mobility group) 转录因子家族。Sox2 通过结合 DNA 上含有 A(T)A(T)CAAAG 的保守序列来调控基因表达^[9]。Sox2 在胚胎发育过程中表达于内细胞团、上胚层、前部外胚层 (anterior ectoderm)、生殖细胞和胚外外胚层 (extra embryonic ectoderm)^[10, 11]。随着组织分化的进行，Sox2 表达逐渐减弱。Sox2 基因敲除小鼠能形成正常囊胚，但由于不能继续发育出上胚层而在着床后 (胚胎发育 6.0 d 左右) 死亡。Sox2 缺失的胚胎，上胚层严重缺失，胚外组织结构紊乱^[10]。在小鼠 ES 细胞中，抑制 Sox2 的表达会引起细胞向滋养层等多个方向分化^[12]。这些都提示 Sox2 对于维持 ES 细胞多能性的重要性^[12]。Sox2 经常与 Oct4 协同作用共同调节下游基因的表达^[13]。有研究发现 Sox2 缺失引起的细胞表型可以被过表达 *Oct4* 所逆转，提示 Sox2 的主要生理功能是通过协助 Oct4 的转录活性而实现的^[14]。

Nanog 属于 NK-2 家族的同源域蛋白。Nanog 在小鼠胚胎发育早期表达于致密型桑椹胚的内部以及

囊胚中的内细胞团。在分化细胞中，Nanog 呈现低表达或不表达^[15, 16]。有趣的是，当去除外源性 LIF (leukemia inhibitory factor, LIF) 时，持续表达 *Nanog* 仍能够使小鼠 ES 细胞保持未分化状态^[16]。此外，*Nanog* 过表达的 ES 细胞可以在不添加 BMP (bone morphogenetic proteins) 的无血清培养条件下持续扩增^[17]。*Nanog* 基因敲除小鼠在着床后很快死亡 (胚胎发育 5.5 d 左右)。进一步研究表明，*Nanog* 缺失导致囊胚中的内细胞团不能继续发育成上胚层，而仅仅产生结构异常的胚外组织。*Nanog* 缺失的 ES 细胞丧失多能性，分化成胚外内胚层细胞 (extra embryonic endoderm cell)^[15]。在人 ES 细胞当中，过表达 *Nanog* 可以使细胞在无饲养层的条件下保持多能性传代^[18]。

2 关键转录因子表达的转录调控：

Oct4 基因的上游有两个不同的增强子元件，它们以细胞类型特异性的方式调节 *Oct4* 的表达。远端增强子 DE (distal enhancer) 位于启动子上游 5 kb 处，调节 *Oct4* 在着床前胚胎 (桑椹胚，内细胞团)、原始生殖细胞以及 ES 细胞、F9 胚胎癌细胞 (embryonal carcinoma cell, EC 细胞) 和胚胎生殖细胞 (embryonic germ cell, EG 细胞) 中的表达。近端增强子 PE (proximal enhancer) 位于启动子上游 1.2 kb 处，调控 *Oct4* 在外胚层以及 P19 胚胎癌细胞中的表达^[19]。

孤核受体 Lrh1 (liver receptor homolog 1) 能够正向调节 *Oct4* 的表达。在 *Lrh1* 敲除胚胎的上胚层中 Oct4 表达缺失；在 ES 细胞中，*Lrh1* 缺失能够加速 Oct4 在分化过程中的下降趋势^[20]。与此相反，Gcnf (germ cell nuclear factor) 被认为是 *Oct4* 表达的负性调节因子。在 *Gcnf* 缺失胚胎的神经上皮中，Oct4 的表达区域以及表达时间都有所增加^[21]；在 *Gcnf* 缺失的 ES 细胞中，Oct4 随分化而降低的趋势也有所延迟^[22]。

此外，Coup-tf I、II (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors I, II) 能够负性调节 *Oct4* 的表达^[23]。值得一提的是，Oct4 与 Sox2 还能够相互作用，调节自身的表达^[24]。这些调节因子的协同作用，使得 Oct4 在不同的发育阶段及不同的细胞类型中能够维持在一个合适的表达水平^[14]。

Nanog 基因 5' 启动子区域含有多个顺式调控元件控制 *Nanog* 的表达调控。这其中含有 Oct4/Sox2 蛋白复合物 (转录起始 -180 区域) 和 Foxd3 的结合位点 (转录起始 -270 区域)^[25-27]。

转录因子 Sp1、Sp3 可以特异性地结合在 *Nanog* 基因上游调控区(转录起始-50--76区域)并促进该基因的表达^[28]。Tcf3 可以结合 *Nanog* 上游调控区, 抑制 *Nanog* 的表达, 使其维持在稳态水平, 保持 ES 细胞的自我更新状态。Tcf3 缺失引起 *Nanog* 水平升高和 ES 细胞延迟分化^[29]。当 DNA 损伤时, 激活并发生 Ser315 磷酸化的 p53 能够招募共抑制因子 mSin3a 共结合于 *Nanog* 的启动子, 抑制它的表达, 促进细胞分化^[30]。最新的研究表明, 共激活因子(coactivator)p300 也参与 *Nanog* 在 ES 细胞分化过程中的表达调控^[31]。

以上研究表明, 这些关键转录因子的表达受到多方面复杂的调控。它们处于适当的表达范围对于维持 ES 细胞的自我更新状态具有重要的意义。

3 关键转录因子对下游基因的调控及其机制

Oct4 能够单独或通过与其他因子相互作用的方式调控众多的下游基因。它通过激活那些有利于维持多能性的基因, 或抑制一些促进细胞分化的基因来维持 ES 细胞的多能性。在早期的报道中, 那些参与维持多能性的基因, 如 *Fgf4*、*Utf1*、*Zfp42/Rex1*、*Opn* 等均是受到 Oct4 激活的下游基因^[4]。另一方面, Oct4 可以抑制人绒毛膜促性腺激素 β 亚基(human chorionic gonadotropin β subunit, *hCG β*)的表达; Oct4 还可以通过抑制 *Cdx2*、*Hand1* 的表达来阻止 ES 细胞向滋养层方向分化^[4]。这些基因的表达调控区域大多含有如前所述的 Oct4 和 Sox2 的结合序列, 受到 Oct4/Sox2 转录复合物的调控。

与 Oct4、Sox2 具有明确的结合序列不同, *Nanog* 所结合的靶序列尚不完全明确。通过 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术, Mitsui 等^[15]发现 *Nanog* 可结合含有 TAAT 核心序列的靶基因。此后这一序列又被扩充为 TAATGG^[32]。与以上体外结合筛选靶序列不同, 通过在 ES 细胞全基因组范围内对 *Nanog* 所结合的基因序列的分析发现, *Nanog* 所结合的保守序列为 CATT^[33]。

Mitsui 等^[15]发现 *Gata6* 在 *Nanog* 缺失的 ES 细胞中表达上升, 并发现其增强子区域含有 *Nanog* 的结合位点。他们认为 *Nanog* 可直接结合到 *Gata6* 的增强子区并抑制 *Gata6* 的表达, 从而阻止 ES 细胞向胚外内胚层方向分化。Shi 等^[34]报道 *Nanog* 还可以直接结合并激活 *Rex1* 基因的启动子。在 ES 细胞中, *Nanog* 可以与 Sox2 相互作用协同促进 *Rex1* 表达, 抑

制 *Nanog* 的表达会造成 *Rex1* 表达减少。此外, *Nanog* 的 C 末端对于 *Rex1* 转录激活是必不可少的。

目前, 以染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)结合芯片以及测序等方法而发展起来的 ChIP-on-chip、ChIP-PET(paired end tag sequencing)等全基因组序列分析方法已经应用于对小鼠以及人 ES 细胞中转录因子调控网络的研究^[33, 35, 36]。在对以 Oct4、*Nanog*、Sox2 为核心的转录调控网络的分析中发现, 这三个转录因子经常共结合于同一个靶基因。这些靶基因大多参与 ES 细胞自我更新和分化过程。在小鼠 ES 细胞中, 345 个 Oct4 的下游基因的调控区同时结合有 *Nanog*^[33]。在人的 ES 细胞中, 一半的 Oct4 结合的调控区同时结合 Sox2, 其中 90% 以上与 Oct4/Sox2 结合的启动子同时结合 *Nanog*。352 个基因同时结合 Oct4/Sox2/*Nanog*^[35]。另一方面, Oct4/Sox2 可结合 *Nanog* 的启动子, 它们又可以结合自身的启动子, 以此形成了 ES 细胞中前馈调控环路(feedforward loops)和自我调控环路(autoregulatory loops)。这些结果提示, ES 细胞的多能性主要是通过促进自我更新基因的表达以及抑制胚层特异性分化基因的表达而实现的。关键转录因子在多数情况下是通过调节一套共同的下游基因, 而不是相互独立地行使其功能的。它们之间存在的自我调节与相互调节方式, 有利于基因表达的稳定性, 使得 ES 细胞维持在未分化状态^[37]。

通过全基因组的序列分析并结合功能实验研究, 很多新的参与调控自我更新与分化的重要靶基因相继被发现。*Esrrb*、*Sall4*、*Rif1*、*Tcf1* 等被证明是受 Oct4、*Nanog* 调节的新的靶基因, 它们的缺失导致 ES 细胞丧失全能性和分化^[13, 36, 38-40]。此外, 参与组蛋白修饰的基因 *Jmjd1a*、*Jmjd2c* 被发现是受 Oct4 调控的靶基因^[41]。Wnt 通路中的下游分子 *Tcf3* 被证明含有 Oct4、Sox2、*Nanog* 的结合位点^[42, 43]。*mir-137*、*mir-301* 等一批 miRNA 的调控区也含有这些转录因子的结合位点^[35]。这些发现一方面丰富了转录因子对新的靶基因调控机制的研究; 另一方面也提示这些转录因子参与到表观遗传修饰、信号转导、miRNA 表达等复杂的调控网络中, 加深了人们对多能性机制的认识。

作为 ES 细胞内重要的转录因子, 它们并不是孤立地发挥作用的。它们受到多种蛋白水平的调节, 并且能够与多种共作用因子(cofactor)相互作用, 构成复杂的蛋白质调控网络, 以此来促进 ES

细胞保持未分化状态。

如上所述, Oct4/Sox2 构成了 ES 细胞内重要的转录调控复合物。除此而外, 锌指蛋白 *Sall4* 能够与 *Nanog* 形成复合物, 共同调节 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Sall4* 以及其他干细胞相关基因的表达。*Nanog/Sall4* 可以形成与 Oct4/Sox2 相类似的调控环路, 对 ES 细胞的自我更新起着重要的作用^[38, 39, 44]。

Oct4 和 *Nanog* 除了与 ES 细胞内特异表达的转录因子协同作用并维持多能性相关基因的表达之外, 还可以与一些分化相关的转录因子相互作用, 调控 ES 细胞向特定胚层的分化。

Cdx2 是促进滋养层分化的转录因子。在 ES 细胞中, Oct4 能够抑制 *Cdx2* 的表达, 阻止向滋养层方向分化。研究表明, Oct4 能够与 *Cdx2* 相互作用, 形成一个抑制复合物, 阻止 *Cdx2* 在 ES 细胞以及 Oct4 在滋养层细胞中的表达。两者之间的相互抑制作用决定了胚胎发育早期第一次分化事件中内细胞团与滋养层的分离^[45]。

Gata6 是促进胚外内胚层分化的转录因子。抑制 *Nanog* 表达, 可导致 *Gata6* 上升并使得 ES 细胞向胚外内胚层方向分化。作为 *Nanog* 的靶基因, *Gata6* 可能与 *Nanog* 相互作用形成与 Oct4/*Cdx2* 类似的抑制复合物, 调控 ICM 向上胚层和胚外内胚层的分化。但这一假设还缺少进一步的实验证据。

近年来, 在蛋白质组学迅速发展的背景下, 以亲和层析为基础并结合质谱分析等手段, 研究人员发现了一系列与 Oct4、*Nanog* 等关键转录因子相互作用的蛋白因子。它们之间所构成的蛋白质调控网络为理解 ES 细胞维持多能性的机制提供了新的思路^[44, 46]。

研究表明, 以 Oct4、*Nanog* 为核心的蛋白调控网络中集中了多个参与调控自我更新的关键因子, 它们构成了调控多能性网络中的关键节点。这些因子包括: *Dax1*、*Sall4*、*Nac1*、*Zfp281*、*Esrrb* 等^[46]。除了以上转录因子之外, 还包括转录抑制复合物中的协同因子, 如组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 和 polycomb 家族 *YY1*、*Rnf2*、*Rybp* 等^[44, 46]。值得关注的是, 研究还发现了一个含有 HDAC1/2 和 *Mtal* 2 的新型调控复合物 NODE (*Nanog*- and *Oct4*-associated deacetylase), NODE 复合物协同 Oct4、*Nanog* 参与抑制有关下游基因的表达。NODE 复合物中某些组分的缺失会导致发育相关基因的表达和 ES 细胞的分化^[44]。

转录调控网络和蛋白相互作用网络是密不可分的, 对它们的深入研究将有利于更好地理解 ES 细胞内复杂的基因调控机制。

4 关键转录因子与 ES 细胞内主要信号通路之间的调控关系

LIF/STAT3 通路的激活对于小鼠 ES 细胞多能性的维持起着非常重要的作用。Oct4 表达水平异常升高和 STAT3 失活可以引起相似的细胞分化表型, 这提示两者之间可能存在着某种联系^[6]。Oct4 与 STAT3 可能间接地相互作用。它们能调控一系列相同的下游基因, 如 polycomb 抑制因子 *Eed*、锌指蛋白 *Zfp-57*、孤核受体 *Dax1* 等^[47-49]。

Nanog 过表达能够使 ES 细胞在无 LIF 条件下仍能保持未分化状态, 而此时磷酸化的 STAT3 未发生明显改变^[16]。*Nanog* 虽然能够不依赖 LIF/STAT3 通路而发挥作用, 但内源性的 *Nanog* 并不足以维持 ES 细胞的未分化状态。这表明在正常情况下, 两者协同作用来维持 ES 细胞自我更新能力。当 *Nanog* 过表达和 LIF 同时存在时, ES 细胞得到更大程度的自我更新。最近研究表明, STAT3 和中胚层标志蛋白 T (*brachyury*) 能够结合在小鼠 *Nanog* 基因上游 5 kb 区域, 参与 *Nanog* 基因的表达调控。*Nanog* 与 STAT3 均能结合到依赖 STAT3 的启动子上, 两者协同作用调节下游基因的表达^[50]。这些结果表明 *Nanog* 与 LIF/STAT3 通路之间存在着密切的联系。

BMP 通路在小鼠 ES 细胞保持多能性方面扮演着重要的角色。无 LIF 时, BMP 诱导中胚层的分化; 当 LIF 存在时, BMP 通过抑制神经外胚层的分化来促进 ES 细胞多能性的维持^[17, 51]。研究表明, 过表达 *Nanog* 可以使 ES 细胞在无 BMP/血清刺激下持续扩增。这主要是由于 *Nanog* 可以促进 *Id* (inhibitor of differentiation) 基因的表达, 从而抑制神经外胚层的分化^[17]。另一方面, 在 LIF 的作用下, STAT3 和 T (*brachyury*) 能协同激活 *Nanog* 的表达, *Nanog* 通过结合 BMP 下游的 *Smad1*, 干扰其招募共激活因子 p300 并抑制 T (*brachyury*) 等下游基因的转录^[51]。*Nanog*/BMP 之间的负反馈 (negative feedback) 机制阻止了 ES 细胞向中胚层方向分化, 对维持多能性起了重要作用。

LIF、BMP 通路中的重要成分除了在蛋白水平与 Oct4、*Nanog* 等转录因子有相互作用之外, 它们下游的靶基因也有很多相同之处。在对 ES 细胞中重要转录因子结合位点的分析当中发现, 87.4%

的 Smad1 结合位点和 56.8% 的 STAT3 结合位点都与 Oct4/Nanog/Sox2 转录复合物相关。抑制 *Oct4* 表达会降低 STAT3 和 Smad1 与相关位点的结合^[52]。这提示, Oct4 对 STAT3、Smad1 结合靶基因的调控, 体现并协调了 LIF、BMP 通路与关键转录因子之间的汇集作用^[37]。

Wnt 通路与关键转录因子之间的关系主要是通过其下游分子 Tcf3 所体现的。如前所述, Tcf3 能够结合 *Nanog* 启动子, 抑制该基因的表达。Tcf3 缺失导致 *Nanog* 表达升高和细胞的延迟分化^[29]。利用 ChIP-on-chip 技术在全基因组范围内对 Tcf3 结合位点分析发现, Tcf3 可以结合并调控多能性相关以及发育相关的两类基因, 而且 Tcf3 与 Oct4、Sox2、Nanog 之间存在着大量的共结合位点。进一步研究发现, Tcf3 可以拮抗 Oct4、Nanog 的作用, 对分化和保持多能性之间的平衡产生影响^[42, 43]。因此, Tcf3 介导了 Wnt 信号通路与关键转录因子之间的信号对答(cross talk), 参与了对自我更新和多能性机制的调控。

抑制 PI3K/Akt 通路导致 ES 细胞自我更新能力下降^[53], 而持续激活形式的 Akt 可使 ES 细胞在去除 LIF 情况下仍保持未分化状态^[54]。研究表明, PI3K/Akt 可以激活 *Nanog* 的表达, 而该通路的下游分子 *Tcf11* 的调控区又含有 Oct4 的结合位点, 受到 Oct4、Jmjd1a、Zfx 等蛋白的激活^[41, 55, 56]。由此可以推断, 转录因子调控网络与 PI3K/Akt 通路构成了一个正反馈调控环路(positive feedback loop), 从而调节 ES 细胞的自我更新状态。

其他如 TGF- β 、Grb2/Mek 通路等, 都与这些关键转录因子之间存在着调控关系, 如 *Nanog* 被认为是受 Grb2/Mek 通路抑制的下游分子^[57]等。最近我们的研究发现, Oct4 能通过调控 Erk/MAPK 通路的一些组分的表达实现对该信号通路的抑制。这些研究拓展了关键转录因子的作用范围, 揭示了外界刺激引发的信号通路与内部的转录调控网络存在着广泛而复杂的联系, 为深入理解 ES 细胞自我更新和多能性的机制提供了新的思路。

5 关键转录因子与表观遗传调控

表观遗传调控主要涉及 DNA 及染色质的修饰和结构的改变等方面, 包括 DNA 甲基化修饰、组蛋白甲基化、乙酰化修饰以及 X 染色体活性的改变等。表观遗传调控在维持 ES 细胞多能性中的作用越来越受到关注。而最近的研究表明, 关键转录因

子与表观遗传调控也存在着广泛而复杂的联系。

首先, 转录因子可以调控表观遗传因子的表达。Oct4、Sox2、Nanog 可以共同结合并调节参与染色质重塑和组蛋白修饰的基因的表达, 如 *SMARCA1*、*MYS3* 和 *SET* 等^[35]。其次, 转录因子可以和众多参与表观遗传修饰的蛋白复合物相互作用, 共同结合并调节下游基因的表达, 如 PcG 蛋白复合物(polycomb group, PcG)、染色质重塑因子 SWI-SNF (switch-sucrose non-fermentable) 复合物以及去乙酰化复合物 NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase) 等^[46]。在对 PcG 蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 的靶基因分析发现, 约有 1/3 受到 Oct4、Sox2 或 Nanog 调控。而 Oct4/Sox2/Nanog 三者都参与抑制的发育相关基因几乎都被 PRC2 所结合^[58]。此外, 转录因子的表达也同样受到表观遗传修饰的调控。例如组蛋白去甲基化酶 *Jmjd1a*、*Jmjd2c* 被证明是 Oct4 的靶基因。*Jmjd2c* 可以使 *Nanog* 启动子区域 H3K9Me3 发生去甲基化, 阻止转录抑制复合物 HP1、KAP1 等的结合, 从而促进 *Nanog* 基因的表达。*Jmjd1a* 可以使一些多能性相关因子 *Tcf11*、*Tcfcp2l1* 和 *Zfp57* 启动子区 H3K9Me2 去甲基化, 从而激活这些基因的表达^[41]。

最近研究表明, Oct4/Sox4/Nanog 复合物对于 ES 细胞内 X 染色体的活化状态起着重要的作用。Oct4/Sox4/Nanog 复合物能够结合在 *Xist* 基因的第一个内含子上, 通过抑制 *Xist* 的表达来重新激活雌性 ES 细胞中两个 X 染色体^[59]。当利用 ZHBTc4 细胞抑制 *Oct4* 的表达时, *Nanog*、*Sox2* 也不能够结合在 *Xist* 的染色体上, *Xist* 表达量显著上升。而在 ES 细胞内敲除 *Nanog* 时, Oct4、Sox2 仍旧结合在 *Xist* 基因的内含子上, *Xist* 表达量则只有适度的升高^[59]。这种相互依赖的调控关系也体现在早期胚胎发育过程中。有研究表明, 着床前的早期雌性胚胎中表达 Oct4 和 Sox2, 而不表达 *Nanog*。此时父本来源的 X 染色体由于带有表观遗传印记修饰, 导致 Oct4/Sox2 不能结合在 *Xist* 染色体区域, 父本 X 染色体被 *Xist* RNA 所覆盖而失活。当胚胎发育进行到晚期桑椹胚直至囊胚阶段时, *Nanog* 开始表达, 它通过招募以及解除 *Xist* 区域的表观遗传修饰等方式, 促使 Oct4/Sox2 更好地结合在该区域, 抑制 *Xist* 表达, 从而激活父本 X 染色体^[60, 61]。

miRNA 为含有 18 - 25 个核苷酸的单链非编码 RNA, 其表达水平的调控也是表观遗传修饰的方式

之一。miRNA 通过特异性地结合靶 mRNA 引起 mRNA 降解、脱腺苷化(deadenylation)以及转录抑制,从而调控靶基因的表达^[62]。最近研究表明,miRNA 也参与了 ES 细胞的自我更新以及分化的调控^[63]。ES 细胞关键转录因子与 miRNA 之间的关系主要体现在,miRNA 可以参与转录因子的表达调控。例如 miR-296、miR-470 以及 miR-134 能够结合在 *Nanog*、*Oct4* 和 *Sox2* mRNA 的编码区抑制它们的表达,并影响细胞的分化^[64,65]。另一方面,miRNA 也受到这些转录因子的调控。通过全基因组序列分析发现,在小鼠 ES 细胞中,共有 55 个 miRNA 转录单元(编码 81 个成熟 miRNA)的启动子区受到 Oct4、Sox2、Nanog 和 Tcf3 的结合和调控。其中多数为 ES 细胞特异性表达的 miRNA;而部分细胞分化相关的 miRNA 则被这些转录因子以及 PcG 蛋白所结合而表达受到抑制^[66]。在人 ES 细胞中也发现 OCT4、SOX2、NANOG 参与调控 14 个 miRNA 的表达,其中 *mir-137* 和 *mir-301* 的启动子被这些转录因子共同结合^[35]。最近的研究表明,miR-145 能够结合在 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4* mRNA 的 3' 非翻译区(untranslated regions,UTRs),抑制这些转录因子在分化过程中的表达。另一方面,OCT4 也可以结合 *miR-145* 的启动子区并抑制 *miR-145* 在未分化细胞中的表达。它们之间所构成的双效负反馈调控环路(double-negative feed back loop)对核心转录因子的表达以及 ES 细胞的自我更新与分化调控起了很重要的作用^[67]。

以上研究也提示,关键转录因子的靶基因不但受到转录水平的直接调控,还受到这些转录因子所调控的 miRNA 在转录后水平的调控。这为研究 ES 细胞内的转录因子调控网络提供了新的视角。例如,Oct4/Sox2/Nanog/Tcf3 可以促进下游靶基因 *Lefty1* 和 *Lefty2* 的表达,同时这些转录因子激活的下游 miR-290-295 可以通过结合 *Lefty1* 和 *Lefty2* mRNA 的 3' UTRs 区而抑制它们的表达。这种靶基因同时受转录因子正向和负向的调控方式被称作“非一致型前馈”调控(incoherent feed-forward regulation)^[66,68]。这种调控方式使得干细胞内重要靶基因的激活受到精细的调控并维持在稳态或动态的水平。与此不同的是转录因子对下游 miRNA *Lin28* 和 *Let-7g* 的非一致型前馈调控则有利于细胞分化的快速启动^[66]。此外,DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)基因 *Dnmt3a*、*Dnmt3b* 受

到 Oct4/Sox2/Nanog/Tcf3 正调控,并被它们调控的 miR-290-295 间接激活则体现了另一种“一致型前馈调控”(coherent feed-forward regulation)模式^[66]。总之,关键转录因子与下游靶基因以及 miRNA 之间存在着复杂的转录水平与转录后水平的调控。这种方式使得 ES 细胞内重要靶基因的表达受到精确调控以利于自我更新和多能性的维持,并通过调节相关基因的表达使 ES 细胞为进一步的有效分化做好准备。

6 结语与展望

ES 细胞多能性和自我更新状态的维持涉及到细胞内多个层次、多种因子参与的复杂的调控网络。而 Oct4、Sox2、Nanog 则在这一复杂调控体系中处于核心地位。它们不但可以调控多个维持多能性和分化相关基因的表达,还参与到诸如信号转导、表观遗传调控等多个过程。近几年的研究表明,这些关键转录因子在体细胞重编程过程中扮演着极为重要的角色。通过基因转染引入外源转录因子的表达,终末分化的体细胞可以重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)^[69-71]。这一突破性成果不但加深了人们对于多能性和重编程的认识,更是为今后的细胞移植临床治疗提供了强大的推动力。

尽管如此,对于 ES 细胞内的关键转录因子的研究还有待于进一步深化和探索。例如,这些关键转录因子自身的表达调控目前还不十分明确。通过全基因组序列分析,我们对它们的多种作用方式有了总体认识,但仍需进一步分析和相关的功能实验阐明具体的作用机制。ES 细胞如何协调外部因素介导的信号转导通路和内部转录因子之间的关系还不十分明确。除了 Oct4、Sox2、Nanog 之外,对其他重要的转录因子,如 *Sal14*、*Tbx3* 等的研究还有待进一步深化。人与小鼠 ES 细胞在信号通路和转录因子调控方式上还存在着很多差异,需要进一步研究和比较。关键转录因子所介导的重编程过程的作用机制目前还不明确。此外,这些关键转录因子还表达于部分肿瘤细胞^[72],还参与 X 染色体的激活^[60]和细胞融合过程中干细胞相关基因的激活^[73]等多种事件。综上所述,对以上问题的研究必将深化对关键转录因子作用的认识,有助于全面揭开 ES 细胞维持自我更新和发育多能性的分子机制,促进人们更有效地分离、扩增 ES 细胞和进一步的定向分化,促进干细胞研究在临床疾病治疗中的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture. *Stem Cells*, 2004, 22(5):790-7
- [2] Martin GR. 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):7634-8
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391):1145-7
- [4] Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, 2001, 26(3):137-48
- [5] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, 95(3):379-91
- [6] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, 24(4):372-6
- [7] Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, 2004, 22(4):522-30
- [8] Zafarana G, Avery SR, Avery K, et al. Specific knockdown of OCT4 in human embryonic stem cells by inducible short hairpin RNA interference. *Stem Cells*, 2009, 27(4):776-82
- [9] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 2000, 227(2):239-55
- [10] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, 17(1):126-40
- [11] Alldridge L, Metodieva G, Greenwood C, et al. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2008, 7(4):1458-69
- [12] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 2006, 442(7102):533-8
- [13] Yuan H, Corbi N, Basilico C, et al. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 1995, 9(21):2635-45
- [14] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):625-35
- [15] 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):631-42
- [16] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113(5):643-55
- [17] Ying QL, 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):281-92
- [18] Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*, 2006, 133(6):1193-201
- [19] Minucci S, Botquin V, Yeom YI, et al. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy *in vivo*. *EMBO J*, 1996, 15(4):888-99
- [20] Gu P, Goodwin B, Chung AC, et al. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(9):3492-505
- [21] Fuhrmann G, Chung AC, Jackson KJ, et al. Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell*, 2001, 1(3):377-87
- [22] Gu P, LeMuet D, Chung AC, et al. Orphan nuclear receptor GCNF is required for the repression of pluripotency genes during retinoic acid-induced embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(19):8507-19
- [23] Ben-Shushan E, Sharir H, Pikarsky E, et al. A dynamic balance between ARP-1/COUP-TFII, EAR-3/COUP-TFI, and retinoic acid receptor:retinoid X receptor heterodimers regulates Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(2):1034-48
- [24] Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, et al. Oct-3/4 and Sox2 regulate *Oct-3/4* gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(7):5307-17
- [25] Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of *Nanog* by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 2005, 280(26):24731-7
- [26] Pan G, Li J, Zhou Y, et al. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J*, 2006, 20(10):1730-2
- [27] Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cisregulation of *Nanog* gene expression. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(6):2475-85
- [28] Wu DY, Yao Z. Functional analysis of two Sp1/Sp3 binding sites in murine *Nanog* gene promoter. *Cell Res*, 2006, 16(3):319-22
- [29] Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of *Nanog* gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20):7479-91
- [30] Lin T, Chao C, Saito S, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing *Nanog* expression. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(2):165-71
- [31] Zhong XM, Jin Y. Critical roles of coactivator p300 in mouse embryonic stem cell differentiation and *Nanog* expression. *J Biol Chem*, 2009, 284(14):9168-75
- [32] Jauch R, Ng CK, Saikatendu KS, et al. Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *J Mol Biol*, 2008, 376(3):758-70
- [33] Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The *Oct4* and *Nanog* transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2006, 38(4):431-40
- [34] Shi W, Wang H, Pan G, et al. Regulation of the pluripotency marker *Rex-1* by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 2006, 281(33):23319-25
- [35] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122(6):947-56
- [36] Loh YH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*,

- 2006, 38:431-40
- [37] Chen X, Vega VB, Ng HH. Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73:203-9
- [38] Wu Q, Chen X, Zhang J, et al. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2006, 281(34):24090-4
- [39] Zhang J, Tam WL, Tong GQ, et al. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(10):1114-23
- [40] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, et al. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20):7772-82
- [41] Loh YH, Zhang W, Chen X, et al. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2007, 21(20):2545-57
- [42] Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, et al. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2008, 22(6):746-55
- [43] Tam WL, Lim CY, Han J, et al. T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *Stem Cells*, 2008, 26(8):2019-31
- [44] Liang J, Wan M, Zhang Y, et al. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(6):731-9
- [45] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 2005, 123(5):917-29
- [46] Wang J, Rao S, Chu J, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 2006, 444(7117):364-8
- [47] Sun C, Nakatake Y, Ura H, et al. Stem cell-specific expression of Dax1 is conferred by STAT3 and Oct3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1):91-6
- [48] Akagi T, Usuda M, Matsuda T, et al. Identification of Zfp57 as a downstream molecule of STAT3 and Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1):23-30
- [49] Ura H, Usuda M, Kinoshita K, et al. STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2008, 283(15):9713-23
- [50] Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF κ B and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2):194-201
- [51] Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, et al. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27):10294-9
- [52] Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 133(6):1106-17
- [53] Paling NR, Wheadon H, Bone HK, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279(46):48063-70
- [54] Watanabe S, Umehara H, Murayama K, et al. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 2006, 25(19):2697-707
- [55] Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, et al. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell*, 2007, 129(2):345-57
- [56] Matoba R, Niwa H, Masui S, et al. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS One*, 2006, 1:e26
- [57] Hamazaki T, Kehoe SM, Nakano T, et al. The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20):7539-49
- [58] Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006, 125(2):301-13
- [59] Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V, et al. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science*, 2008, 321(5896):1693-5
- [60] Navarro P, Avner P. When X-inactivation meets pluripotency: an intimate rendezvous. *FEBS Lett*, 2009, 583(11):1721-7
- [61] Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 2009, 136(14):2311-22
- [62] Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 2005, 132(21):4645-52
- [63] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 2006, 11(4):441-50
- [64] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455(7216):1124-8
- [65] Tay YM, Tam WL, Ang YS, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRHI. *Stem Cells*, 2008, 26(1):17-29
- [66] Marson A, Levine SS, Cole MF, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 134(3):521-33
- [67] Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 2009, 137(4):647-58
- [68] Alon U. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(6):450-61
- [69] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858):1917-20
- [70] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4):663-76
- [71] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5):861-72
- [72] Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, et al. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(2):157-62
- [73] Silva J, Chambers I, Pollard S, et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, 2006, 441:997-1001