

文章编号 :1004-0374(2010)02-0129-04

# Wnt 信号在胚胎干细胞自我更新和分化中的作用

叶守东, 谭理, 宋后燕, 李平\*

(复旦大学分子医学教育部重点实验室 上海 200032)

**摘要:** 胚胎干细胞分离自胚泡内细胞团, 具有无限自我更新和多向分化潜能, 有很大的医学应用前景。Wnt 家族是一类分泌型的细胞信号传导蛋白, 可以通过复杂的信号传递通路调控胚胎的早期发育, 对细胞的分化、增殖及生长具有重要的调节作用。该文就 Wnt 信号通路调节胚胎干细胞的自我更新和分化作一综述。

**关键词:** Wnt 信号通路; 自我更新; 分化

**中图分类号:** Q75; Q813

## Role of Wnt signalling in the self-renewal and differentiation of embryonic stem cells

YE Shou-dong, TAN Li, SONG Hou-yan, LI Ping\*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 20032, China)

**Abstract:** Embryonic stem cells, derived from the inner cell mass of blastocysts, hold significant potential for clinical therapies because of their distinctive capacity to both self-renew and differentiate into a wide range of specialized cell types. Wnts comprise a large family of secreted glycoproteins that regulate a variety of developmental changes, including cellular proliferation, differentiation and migration. Here, we will review the importance of the Wnt signalling pathway in regulating the self-renewal and differentiation of embryonic stem cells.

**Keywords:** Wnt; self-renew; differentiation

胚胎干细胞可分化成三个胚层的各类细胞, 具有发育为任何组织或器官的细胞的能力, 阐明胚胎干细胞的转录调控网络和分化机制是了解人类发育和基于干细胞治疗的基础<sup>[1]</sup>。而近年来对果蝇、两栖类、哺乳类到人类 Wnt 家族基因、编码产物及其生物学效应的研究表明, Wnt 信号途径参与了从胚胎到成体的一系列控制细胞生长发育及分化的调控过程, 越来越多的研究表明其在发育生物学研究中具有广泛而重要的影响。本文就 Wnt 信号通路在胚胎干细胞自我更新和分化中的调节作一简述。

### 1 胚胎干细胞的生物学特性

胚胎干细胞的自我更新可通过联合使用饲养层细胞、条件性培养液及各种细胞因子等来维持, 目前对小鼠和人的胚胎干细胞研究表明, 前者多能性维持可通过外源性的信号通路, 如 LIF-gp130-Stat3、BMP-Smad-Id 进行调控; 而后者依赖于 bFGF 和

Activin A/TGF  $\beta$  信号, 并受各自内源性的调节因子, 如 OCT4、Nanog、Sox2、Fgf4 等影响<sup>[1,2]</sup>, 内外因素形成一个复杂的调控网络来控制胚胎干细胞的自我更新和分化。作为在调控细胞生长、发育和分化上起重要作用的 Wnt 信号途径, 在这个调控网络中的作用也受到越来越多的重视和了解。

### 2 Wnt 信号通路概述

Wnt 基因是鼠类乳腺癌病毒诱导的小鼠乳腺癌中克隆出的一种原癌基因, 由 Nusse 等<sup>[3]</sup>报道并称为 *int-1* 基因, 与 1973 年 Sharma 报道的果蝇的无翅基因 Wingless(wg) 为同源基因, 故将两者合并命名

收稿日期: 2009-07-27; 修回日期: 2009-09-01

基金项目: 上海市自然科学基金 (09ZR1404000)

\* 通讯作者: E-mail: pingli2009@fudan.edu.cn; Tel: 021-54237926

为 Wnt<sup>[3]</sup>。Wnt 蛋白家族有 18 种分泌型的糖蛋白，根据其转导信号的方式，将 Wnt 信号转导途径分为经典 Wnt 信号途径(classical Wnt signal pathway)和非经典 Wnt 信号途径(nonclassical Wnt signal pathway)<sup>[4]</sup>

### 2.1 经典的 Wnt 信号通路

经典 Wnt 信号途径也称为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号。在没有 Wnt 信号的情况下，细胞质中的  $\beta$ -catenin 和大肠腺瘤息肉蛋白 (APC)、骨架蛋白 AXIN、酪蛋白激酶 (casein kinase, CK)-1、糖原合成激酶(GSK-3 $\beta$ ) 一起形成多蛋白复合物，GSK-3 $\beta$  和 CK-1 对  $\beta$ -catenin N 末端第 41 位苏氨酸及 33、37 和 45 位丝氨酸进行磷酸化，磷酸化的  $\beta$ -catenin 与泛素结合，最终被蛋白酶体降解。而当 Wnt 蛋白(如 Wnt1, Wnt3a)与跨膜受体 frizzled(Fzd)，以及共同受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP5/6)结合后，激活 Dsh

(Dishevelled)蛋白，Dsh 可诱导 GSK-3 $\beta$  发生磷酸化，使其与 Axin 脱离，拮抗  $\beta$ -catenin-AXIN-APC-GSK3 复合物的形成，进而阻断  $\beta$ -catenin 的磷酸化、泛素化降解，使得大量游离的  $\beta$ -catenin 在细胞质中聚集，最后进入细胞核内与 Tcf /Lef 家族转录因子结合，调节靶基因，如 c-myc, cyclinD1 等的表达水平，启动靶基因的转录，促进细胞的增殖或活化<sup>[4]</sup>(图 1)。

### 2.2 非经典的 Wnt 信号通路

$\beta$ -catenin 非依赖性的 Wnt 信号通路由 Wnt5a、Wnt11 等配体介导，主要由 Wnt/planar cell polarity (PCP)和 Wnt/ $Ca^{2+}$  两条信号通路发挥作用，前者通过激活小 G 蛋白(包括 Rho 和 Rac)、Jun N-末端激酶(JNK)和 Rho 激酶，促进肌动蛋白骨架的变化；后者增加胞内  $Ca^{2+}$  的浓度并激活钙离子依赖性的蛋白激酶(CaMKII)及 PKC，负性调节  $\beta$ -catenin 依赖性

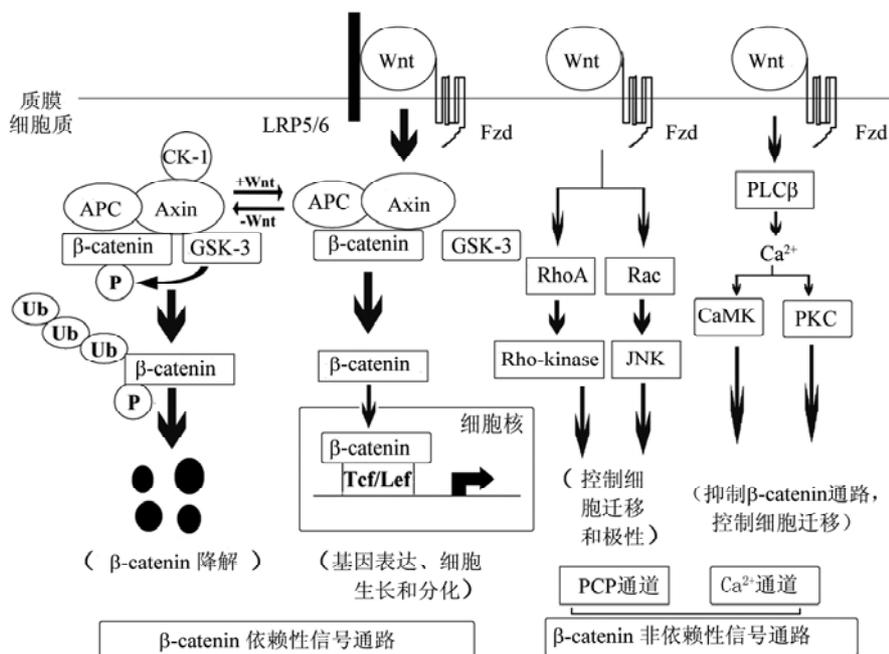


图1 Wnt信号通路示意图

通路或刺激细胞迁移<sup>[4,5]</sup>(图 1)。

## 3 Wnt信号通路在胚胎干细胞中的作用

### 3.1 维持胚胎干细胞多能性和自我更新能力

Wnt 信号通路的激活可由外源添加 Wnt 蛋白启动或通过抑制 GSK3 或 APC 等信号通路中成分的活性间接激活 Wnt 信号通路<sup>[4]</sup>。Hao 等<sup>[6]</sup>把小鼠胚胎干细胞分别培养在饲养层细胞 C-STO，或表达 Wnt 蛋

白的饲养层细胞 C-STO-Wnt5a、C-STO-Wnt6 和 C-STO-Wnt3a 上，发现经过 2 次传代，对照组 C-STO 上的胚胎干细胞不能形成克隆，不能有效地增殖，OCT-4 表达下降，而产生 Wnt 的 C-STO 却能有效地维持胚胎干细胞的自我更新和产生嵌合体的能力。进一步研究发现 Wnt5a 和 Wnt3a 在胚胎干细胞内通过阻止  $\beta$ -catenin 的磷酸化而激活 Wnt 信号途径，上调 Stat3 的表达水平，并和 LIF 磷酸化 Stat3

信号通路协同作用维持胚胎干细胞自我更新。

Pereira等<sup>[7]</sup>发现由Wnt信号控制的TCF3在胚胎干细胞中抑制Nanog启动子的活性及其蛋白水平的表达。Yi等<sup>[8]</sup>研究也表明TCF3可减弱和自我更新密切相关的*Nanog*、*Tcl1*、*Tbx3*及*Esrrb*基因表达,缺失TCF3的胚胎干细胞能够在不加LIF的培养基中维持长期的自我更新能力,并延迟拟胚体的分化。Cole等<sup>[9]</sup>研究推测Wnt通过TCF3进入胚胎干细胞调控网络,从而参与维持胚胎干细胞自我更新和分化间的平衡。

Sato等<sup>[10]</sup>分析未分化的人胚胎干细胞表达谱发现,Wnt信号通路受体Frizzled5及其靶基因FRAT2和Cyclin D1在人胚胎干细胞中大量表达。他们也报道用GSK-3 $\beta$ 的抑制剂6-bromoindirubin-3'-oxime(BIO)在缺少LIF的条件下可有效地维持小鼠和人胚胎干细胞中Oct3/4、Rex1及Nanog的表达水平,从而维持细胞的未分化状态<sup>[11]</sup>,因为LIF对人胚胎干细胞的维持没有作用<sup>[11,12]</sup>,已有研究也表明小鼠和人胚胎干细胞需要不同的信号通路来维持其自我更新,但BIO激活Wnt通路对小鼠和人ES细胞自我更新均具有促进作用,这其中的分子机制仍值得进一步研究分析,而BIO为人胚胎干细胞未分化状态保持提供了新的思路。

Ying等<sup>[13]</sup>采用三种化学小分子:CHIR99021、PD184352和SU5402,分别抑制小鼠的胚胎干细胞GSK3、Mitogen-activated protein kinase kinase(MEK)和Fibroblast growth factor(FGF)受体酪氨酸激酶这3个与细胞分化相关的信号通路后,发现小鼠胚胎干细胞可长期保持自我更新而不需要促进细胞自我更新相关的信号,如LIF等的作用。在这其中CHIR99021抑制GSK3后激活Wnt信号通路可能与细胞代谢以及ERK等信号受到抑制后细胞的生长有关。这种“3I”方法同样可以用于大鼠胚胎干细胞株的分离建株<sup>[14]</sup>。Hanna等<sup>[15]</sup>也发现CHIR99021抑制GSK3有助于Nonobese Niabetic(NOD)鼠系早期胚胎干细胞及重编成的多功能干细胞多能性的维持。小鼠、大鼠和人的胚胎干细胞通过抑制GSK3信号都能够长期的维持多能性状态和自我更新能力,提示它们存在着共同的调控通路。

另外,对胚胎干细胞的研究发现APC基因突变则可抑制胚胎干细胞向三胚层组织分化而维持其增殖状态,这一效应主要是通过胞内 $\beta$ -catenin浓度的升高来实现的<sup>[16]</sup>。以上研究都表明了Wnt信号通路

与胚胎干细胞的多能性和自我更新能力的维持是密切相关的。

### 3.2 影响胚胎干细胞分化能力

胚胎干细胞的全能性潜能可定向分化形成多种细胞类型,如神经细胞、造血细胞、心肌细胞等等,维甲酸可诱导其向神经细胞分化<sup>[17]</sup>,Aubert等<sup>[18]</sup>发现分泌型的frizzled相关蛋白-2(secreted frizzled-related protein-2, sfrp2)作为Wnt胞外拮抗因子,在胚胎干细胞向神经分化过程中在有或没有维甲酸的存在下,都能够显著地诱导胚胎干细胞表达 $\beta$ -tublin(TuJ<sup>+</sup>)、Ngn2、Pax6、Pax7和ShcC等神经元或神经前体细胞的标志基因,但过表达Wnt1或用LiCl(GSK3的抑制剂)处理能够降低这些基因的表达水平。Yoshikawa等<sup>[19]</sup>也发现Wnt3a突变的小鼠胚胎发育时有异位的神经管形成。此外,Haegeler等<sup>[20]</sup>发现抑制APC的活性能阻止胚胎干细胞向神经干细胞的分化,同时引发Wnt信号通路的下游靶基因Cyclins、C-Myc、BMP等的转录,BMP在体外具有抑制胚胎干细胞向神经细胞分化的作用,但加入BMP的拮抗因子Noggin可促进胚胎干细胞向神经干细胞的分化程序,上述研究说明某些Wnt信号可影响胚胎干细胞向神经细胞的分化命运。

胚胎干细胞诱导分化为造血细胞的过程类似于胚胎在体内的发育,已作为研究造血发育调控的模型得到广泛研究,而Wnt通路在这个分化过程中调控的重要性已引起了研究者的兴趣。Feng等<sup>[21]</sup>用IL-3、IL-6和EPO(促红细胞生成素)把胚胎干细胞形成的拟胚体诱导成造血祖细胞,在分化细胞中检测到了高表达的CD3e、CD11b、CD45R/B220、Ly-6G及TER-119等造血标志基因,但RT-PCR和Western blot分析发现Wnt信号通路中的 $\beta$ -catenin, Axin, GSK-3 $\beta$ 和TCF4表达均受到了抑制。Vijayaragavan等<sup>[5]</sup>发现人胚胎干细胞形成的拟胚体向造血细胞发育的过程中,Wnt11通过Fzd7受体在造血分化早期通过非经典的Wnt信号通路上调CaMKII,下调 $\beta$ -catenin、OCT-4、Nanog及内胚层相关基因(FoxA2、Gata5、Hnf3)表达水平,诱导中胚层标志基因Brachury及与中胚层相关的E-cadherin共表达,而Wnt3a则在后期通过经典的Wnt信号通路促进造血谱系的分化。Lengerke等<sup>[22]</sup>也发现BMP4通过激活Wnt3a,促进*Cdx*和*Hox*基因使中胚层细胞发育成血液成分。此外Nostro等<sup>[23]</sup>发现在Flk1<sup>+</sup>中胚层向造血系统分化过程中,需要VEGF

和 Wnt，其中 Wnt 信号对于原始红系细胞很关键。因此 Wnt 信号在胚胎干细胞向血细胞的分化决定中也具有精确的调节。

#### 4 结语

Wnt 信号通路的激活，对于维持多种干细胞的稳定增殖起着关键作用，已在胚胎干细胞、肠道干细胞、造血干细胞(HSC)、皮肤干细胞内观察到该信号通路在自我更新和分化方面的重要作用<sup>[24]</sup>，但目前对于 Wnt 信号通路在胚胎干细胞的调控研究都处于初级的探索阶段，而且 Wnt 信号往往与其他信号形成一个复杂的调控网络共同作用，因此有必要去阐明 Wnt 信号在胚胎干细胞和其它干细胞中的精确功能，这对干细胞治疗和再生医学研究等方面都具有非常重要的意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] Niwa H. How is pluripotency determined and maintained. *Development*, 2007, 134(4): 635-46
- [2] Xu RH, Peck RM, Li DS, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, 2(3):185-90
- [3] Nusse R, Brown A, Papkoff J, et al. A new nomenclature for *int-1* and related genes: the *Wnt* gene family. *Cell*, 1991, 64(2): 231
- [4] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(3):119-29
- [5] Vijayaragavan K, Szabo E, BosséM, et al. Noncanonical Wnt signaling orchestrates early developmental events toward hematopoietic cell fate from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3):248-62
- [6] Hao J, Li TG, Qi X, et al. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 2006, 290(1):81-91
- [7] 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
- [8] Yi F, Pereira L, Merrill BJ. Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2008, 26(8):1951-60
- [9] 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, 2(6):746-55
- [10] Sato N, Sanjuan IM, Heke M, et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol*, 2003, 260(2):404-13
- [11] 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(1):55-63
- [12] Noggle SA, James D, Brivanlou AH. A molecular basis for human embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Rev*, 2005, 1(2):111-8.
- [13] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23
- [14] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7):1299-310
- [15] Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, et al. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6):513-24
- [16] Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, et al. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of  $\beta$ -catenin signaling. *Nat Genet*, 2002, 32(4):594-605
- [17] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 2002, 110(3):385-97
- [18] Aubert J, Dunstan H, Chambers I, et al. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(12): 1240-5
- [19] Yoshikawa Y, Fujimori T, McMahon AP, et al. Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev Biol*, 1997, 183(2):234-42
- [20] Haegele L, Ingold B, Naumann H, et al. Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(3):696-708
- [21] Feng Z, Srivastava AS, Mishra R, et al. A regulatory role of Wnt signaling pathway in the hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(4):1333-9
- [22] Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, et al. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the *Cdx-Hox* pathway. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1):72-82
- [23] Nostro MC, Cheng X, Keller GM, et al. Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1):60-71
- [24] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 2005, 434(7035):843-50