

DOI: 10.13376/j.cblls/2016110

文章编号: 1004-0374(2016)08-0839-05



景乃禾, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员、研究组长、博士生导师。景乃禾研究员二十年来一直从事中枢神经系统发育的分子机制和多能干细胞神经定向诱导分化的调控机制研究。近年来的研究主要集中在: (1) 小鼠早期胚胎发育的分子机制研究; (2) 多能干细胞神经定向诱导分化的调控机制研究; (3) 神经退行性疾病干细胞治疗的再生医学研究。目前担任 *Cell Research*、*Mechanisms of Development*、*Acta Biochimica Biophysica Sinica*、*Neuroscience Bulletin* 等国际期刊编委, *BMC Developmental Biology* 和 *J Mol Cell Biol* 副主编。研究工作发表在包括 *Dev Cell*、*PNAS*、*Nature Communications*、*Cell Res*、*eLife*、*Development* 等学术期刊上。研究成果荣获 2014 年度上海市自然科学奖一等奖。

早期胚胎细胞谱系研究 ——揭示生命发育早期的黑盒子

彭广敦, 景乃禾*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: 哺乳动物的早期胚胎发育, 通过多个层次的细胞命运决定, 建立了胚胎器官发生、形态建成的整体发育蓝图, 是生命体最重要的分子事件之一。早期胚胎发育过程伴随了全能性的维持和分化, 以及各种多能干细胞命运的次序决定, 任何发育进程上的缺陷都会对整个胚胎个体产生深远的影响。因此, 研究早期胚胎谱系建立的过程、不同胚层和组织前体细胞的命运决定及其发生与发展的调控机制, 不仅仅是面对国家人口政策的变化以及优生优育的需求, 预防和减少早期发育疾病, 还能够指导胚胎干细胞及各种多能干细胞的分化和进一步转化医学应用, 因而具有极其重要的生物学意义。

关键词: 胚胎早期发育; 细胞谱系; 胚层分化; 原肠运动; 命运决定

中图分类号: Q813; Q954.4 文献标志码: A

Early embryo development and lineage determination

PENG Guang-Dun, JING Nai-He*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The progression of the mammalian embryo from fertilization to gastrulation involves an ordered series of hierarchical lineage determination and specifications that ensures the establishment of a blueprint for the whole animal body. For a better understanding of the pluripotency and the translational application of stem cells, it is crucial to investigate the molecular regulation underlying the sequential lineage specification. This article reviewed

收稿日期: 2016-04-14

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01010201), 国家自然科学基金项目(31430058)

*通信作者: E-mail: njing@sibcb.ac.cn

the recent progress in our efforts to explore the key regulation of stem cell lineage, especially under the support of “Strategic Priority Research Project on Stem Cell and Regenerative Medicine” by the Chinese Academy of Sciences.

Key words: early embryo development; cell lineage; lineage differentiation; gastrulation; fate determination

胚胎的早期发育过程对于干细胞和组织再生工程具有十分重要的指导意义。体内决定多能性上胚层细胞发生功能特化的转录因子、信号通路和基因动态表达变化特征,是体外进行多能干细胞分化和转化医学应用的基础。因而,研究早期胚胎不同胚层的发育来源,尤其是决定这一过程的分子机制,具有极其重要的生物学意义。

在早期胚胎谱系建立过程中,细胞极性、不对称分裂以及胚胎多能性与分化的关系对于整个胚胎个体的发育至关重要^[1-3]。长期以来,小鼠作为研究最多的模式动物,人们对其早期胚胎发育了解得较为清楚。在小鼠早期胚胎发育的4.5 d (E4.5),囊胚在子宫壁上着床(implantation)。着床是早期胚胎发育中一个极为重要的分界线。哺乳动物胚胎通过在子宫壁上紧密的附着,从母体获得氧气和营养供应,为进一步的发育提供了物质基础。以此为界,可将胚胎早期发育大致分为着床前与着床后两个阶段。着床前主要是受精卵至囊胚的(blastocyst)发育,这一阶段发生了胚胎的第一次与第二次细胞命运决定。起始于精子与卵子结合形成的受精卵,通过剧烈的细胞分裂,胚胎细胞数量快速增加,胚胎产生第一次极性分裂,即由多个细胞组成的桑椹胚(morula)分化为滋养外胚层(trophectoderm, TE)与内细胞团(inner cell mass, ICM)。滋养外胚层将来发育成为胚外外胚层(extraembryonic ectoderm, ExE)和外胎盘锥(ectoplacental cone);内细胞团具有全能性,通过第二次细胞命运决定,分化为位于外层的原始内胚层(primitive endoderm, PE)与位于里层、具有多能性的上胚层(epiblast)^[1],并进一步发育分化为完整胚胎个体。

着床后,胚胎的上胚层细胞继续增殖,经历了一个称之为原肠运动(gastrulation)的生物学过程。小鼠胚胎通过原肠运动过程中剧烈的细胞迁移和分化,决定了各个胚层形成以及细胞的发育命运图谱^[4],并进而形成形态功能各异的器官组织^[5-7]。这一复杂的生物学过程起始于小鼠早期胚胎大约E6.5。此前较为均一的胚胎于此时在后端出现一个原条(primitive streak)结构。随后,胚胎内的上胚层细胞发生上皮-间充质转换(epithelial mesenchymal transition, EMT),越过原条并继续向外包裹,形成新生的中

胚层和内胚层^[8]。相应的,留在上胚层前端的细胞将发育成为外胚层。大约在E7.5,原肠运动完成。胚胎由一个简单的假单层柱状上皮的卵筒状结构,最终发育成为具有不同细胞组成,包含外、中、内三个胚层的复杂结构。这时细胞的发育潜能也逐步受限,由多能的上胚层干细胞转变为中内胚层或者外胚层的前体细胞^[6-7]。

1 着床前的细胞谱系决定研究

着床前的早期胚胎可停留在输卵管中,相对易于获取,而且可以通过辅助生殖等手段在体外很好地模拟体内发育过程,因此相关研究相对较多。在合子发育阶段,来源于精子的父本基因组发生特异性的去甲基化。中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所徐国良、李劲松课题组揭示了Tet3 DNA双加氧酶负责卵细胞重编程的作用机理^[9]。进一步,该研究团队与北京大学生物动态光学成像中心汤富酬研究组合作发现,母源与父源基因组在单细胞的受精卵阶段均发生大规模DNA主动和被动去甲基化^[10],是表观遗传调控参与早期胚胎发育的重要发现。从合子到囊胚的发育过程,受益于单细胞转录组、单细胞基因组以及单细胞表观遗传组等相关技术的快速发展,有众多的研究成果涌现,国内的一些研究因此有一定的技术领先,很具特色。例如,单细胞转录组技术的发明者之一、北京大学生物动态光学成像中心汤富酬教授研究组,针对人着床前的胚胎进行了单细胞转录组测序,分别收取体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)获得的卵子、合子、2\4\8细胞期、桑椹胚以及晚期囊胚等阶段的胚胎细胞样品,考察了人着床前胚胎细胞的转录组变化特征,鉴定出了Epiblast、PE和TE的特征性代表基因,一些新的长链非编码RNA(lncRNA)以及新的基因可变剪切形式。他们的研究结果还表明,实验室常用的人胚胎干细胞(hESC)与囊胚中的上胚层细胞具有较大基因表达的差异,提示体外建系的人胚胎干细胞可能在体外培养体系中响应bFGF与IGF等信号通路,而类似体内较为晚期的上胚层细胞^[11]。同时,他们课题组与北京大学谢晓亮课题组、北京大学第三医院乔杰课题组合作也对人的单个卵子细胞进行了单细胞基因组的分

析^[12], 对人胚胎从精子、卵子到 ICM 时期的胚胎细胞进行了单细胞 DNA 甲基化修饰分析^[13]。此外, 同济大学孙毅与加州大学洛杉矶分校范国平研究组也从事了类似的人胚胎着床前单细胞转录组分析, 并比较了人与小鼠在着床前细胞基因表达的差异^[14]。因此, 着床前哺乳动物的谱系分化过程、关键的细胞内细胞外机制等已经获得了较为清晰的发育图谱。

对以猴子为代表的非人灵长类方面, 也有许多针对着床前胚胎细胞谱系分化的研究。例如中国科学院昆明动物研究所郑萍实验室, 利用单细胞测序技术, 分析了猕猴胚胎着床前两次命运决定的转录组变化。

2 着床后胚胎细胞谱系的建立

着床后的胚胎与母体建立了紧密的联系, 受到物理限制研究材料很难获取, 并且人的着床后胚胎研究受限于伦理、法律等因素基本上是空白, 以非人灵长类为对象的研究也较少, 故而着床后哺乳动物的胚层分化与细胞谱系主要集中在小鼠胚胎上进行。

对小鼠着床后细胞谱系的研究, 传统上主要依靠以下两种关键技术: 其一, 是通过遗传操作对特定基因进行完全敲除或者条件性敲除, 并在形态学以及分子层面上考察缺失相关基因后的生物学功能, 借助胚胎的原位杂交技术考察基因表达的变化。通过这样的分析方法, 早期发育中决定胚层分化的重要信号通路、转录因子已经逐渐被了解。然而, 这种研究策略通量较低, 每次只能关注于单个基因或者单个信号通路, 并且由于不同遗传背景的一些差异, 还存在动物之间研究结果不一致等难以解释的问题。其二, 是对哺乳动物早期胚胎细胞命运决定进行谱系示踪^[15-16]。这种研究方法通过在胚胎发育的早期对部分特异位置细胞进行染色, 或者外源移植进特异标记的细胞, 在体外的胚胎培养体系中考察标记细胞的发育命运。通过这样的细胞命运谱系追踪, 人们建立了着床后胚胎发育粗略的命运图谱。然而, 这种方法也有其内在的缺陷: 首先, 体外培养的时间有限, 最多只能培养到 48 h, 在一个相对较短时间窗口内得到的细胞命运决定信息不够完整; 其次, 对广泛发生的细胞命运决定缺乏机制的认识。

原肠运动这一关键的生物学过程, 从起始期 E6.5 大约 660 个细胞发育到三胚层完成阶段 (E7.5

时期) 约 1.5 万个细胞, 短短一天之内发生了极为剧烈的细胞增殖与细胞迁移^[17]。研究表明, 原肠运动时期胚胎细胞所在的空间位置与所受信号通路的影响决定了这些细胞的发育走向。例如, 在胚胎的前端主要发育为神经外胚层与表皮外胚层。神经外胚层细胞随着胚胎前后轴的位置差别, 其发育命运存在区域性的特化: 在胚胎前端靠近近端的区域走向前脑的命运, 在前端靠近远端的区域发育为端脑, 而处于中间的区域则主要被决定为中脑。与此相对的, 在胚胎的后端, 主要发育为中胚层与内胚层。沿着原条从近端到远端, 依次会发育为胚外中胚层 (extraembryonic mesoderm)、侧板中胚层 (lateral plate mesoderm) 以及轴旁中胚层 (paraxial mesoderm), 靠近原条最前端的细胞继续发育为轴索中胚层 (axial mesoderm)。胚外中胚层会参与胎盘以及羊膜等胚外组织的发育; 侧板中胚层是血液和心脏的前体; 轴旁中胚层将来发育为肌肉以及腔体间的组织; 轴索中胚层会发育为脊索 (notochord)^[2,7,18]。因此, 原肠运动时期胚胎的区域性分布是细胞发育命运的反映, 具有极其重要的生物学意义。在胚胎的不同区域, 伴随着进一步的细胞命运决定, 大量的基因开放和表达, 在全基因组水平来考察胚层分化和谱系建立中的分子事件具有重要的意义。

2007 年, Baker 实验室对包含原肠运动全过程的小鼠胚胎进行了基因芯片转录组分析^[19]。该工作首次在全胚胎水平上观察到了大量的基因表达变化: 与细胞代谢、细胞周期等紧密相关的基因在原肠运动中期被富集, 与胚层分化和器官发育相关的基因则在原肠运动的后期被上调。这种全胚胎转录组分析揭示了细胞谱系建立过程中的剧烈分子活动。然而, 由于所收取的样品是多个胚胎样本集中在一起, 无法区别胚胎不同区域的基因变化特征, 因此, 基因表达信息无法与胚层特化的发育命运相关联, 并且采用基因芯片分析的方法获得的基因表达数量有限。

在中科院“干细胞与再生医学研究”先导科技专项项目一“细胞谱系的建立与发育调控”的支持下, 中科院上海生命科学研究院生化细胞所景乃禾课题组对小鼠原肠运动中期 (E7.0) 的胚胎进行了精细的转录组分析^[20]。为了弥补全胚胎转录组分析无法获得区域位置信息的缺憾, 该项研究结合激光显微切割技术与单细胞测序技术, 建立了一整套空间转录组的分析方案, 实现了在 10~20 个细胞的精度上位置特异的转录组测序。

在原肠运动的中期 (E7.0), 三个胚层的命运处于分化的过渡状态, 全能性逐渐退出, 依照胚胎上的位置不同, 各种细胞谱系的多能干细胞/干细胞前体细胞逐渐产生, 因而是一个极具代表性的发育时期。景乃禾研究团队在 E7.0 时期单个胚胎上逐层切片, 通过激光显微切割选取每个切片前端、后端以及侧面四个区域, 每个区域约 20 个细胞, 进行转录组测序。并与中科院上海生命科学研究院计算生物学研究所韩敬东课题组合作, 完成了单个胚胎上空间转录组数据的三维重建。该项研究发现, E7.0 时期小鼠胚胎主要可以划分为四个空间表达结构域: 胚胎的前后区域是最显著的两个独立结构域, 也是细胞增殖最为强烈的两个结构域, 分别代表了外胚层以及中内胚层的分化命运; 在胚胎的侧面, 依据增殖、代谢等细胞活动差别, 分为近端和远端两个结构域, 反映了胚胎在这个时期能量代谢状态上的独特特征。

整个胚胎位置特异空间转录组分析的完成, 绘制了该时期大于 2 万个基因的三维分子表达图谱, 可作为电子原位杂交, 一次性揭示了 E7.0 时期所有基因的空间表达特征; 同时, 许多新的胚层特异代表基因和新的长链非编码 RNA 被发现和鉴定, 使得原肠运动中细胞谱系建立的分子调控得到了深入的解析。这项工作还验证了决定胚层分化的信号通路作用, 也是第一次在全基因组水平上对这些调控信号通路的活化情况进行了完整的阐述。空间转录组数据有力地证明了胚胎的主要发育信号集中在后端, 胚胎前端, 特别是即将发育为神经外胚层的区域类似于一个信号通路“真空”的区域, 提示神经外胚层发育可能是一种自发进行的过程。

空间转录组数据包含每个样品精确的位置信息, 通过对各个转录结构域的代表性基因进行整合分析, 这项工作还构建了 E7.0 时期发育参考坐标系的一套“邮政编码”。进一步, 该项工作还发现从 E7.0 时期胚胎分离获取的单个细胞, 能通过参考坐标系“邮政编码”(zipcode) 准确地还原到胚胎上不同的位置。并且, 多个体外不同发育时期建立的上胚层干细胞 (EpiSC), 通过“邮政编码”基因与 E7.0 时期胚胎进行参考对比, 其不同的分化潜能也能被还原到胚胎不同的发育位置上, 从而准确地标识出了其细胞身份 (identity) 的差别。因此, 这一套参考系统的建立, 使得体外分化的多能干细胞或者其他胚胎来源的组织干细胞, 通过与此参考坐

标系基因进行对比获得了体内胚胎发育的位置定位。考虑到胚胎上这些不同的位置对应着不同的细胞发育命运, 因而, 这种对比分析也使得体外干细胞系的发育潜能得到了体内真实而直观的揭示。各种类别的多能干细胞以及干细胞的分化过程也可以通过与参考坐标系直接对比, 获得谱系分化的信息^[20]。

目前, 景乃禾与韩敬东研究团队正在对原肠运动起始阶段 (E6.5) 与完成阶段 (E7.5) 时期的小鼠胚胎进行空间转录组分析和整合。整个发育动态过程的时空四维转录组图谱完成将可以实现对胚层分化、干细胞谱系建立的全方位定位和深层次解析, 有望打开原肠运动这个极为重要的困扰发育和干细胞生物学界多年的“黑盒子”。

[参 考 文 献]

- [1] Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 91-103
- [2] Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*, 2009, 136: 701-13
- [3] Takaoka K, Hamada H. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development*, 2012, 139: 3-14
- [4] Tam PP, Loebel DA. Specifying mouse embryonic germ cells. *Cell*, 2009, 137: 398-400
- [5] Solnica-Krezel L, Sepich DS. Gastrulation: making and shaping germ layers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28: 687-717
- [6] Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev*, 1997, 68: 3-25
- [7] Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 368-81
- [8] Wang Y, Steinbeisser H. Molecular basis of morphogenesis during vertebrate gastrulation. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2263-73
- [9] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10
- [10] Guo F, Li X, Liang D, et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 447-58
- [11] Yan L, Yang M, Guo H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1131-9
- [12] Hou Y, Fan W, Yan L, et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 2013, 155: 1492-506
- [13] Guo H, Zhu P, Yan L, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature*, 2014, 511:

- 606-10
- [14] Xue Z, Huang K, Cai C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature*, 2013, 500: 593-7
- [15] Quinlan GA, Williams EA, Tan SS, et al. Neuroectodermal fate of epiblast cells in the distal region of the mouse egg cylinder: implication for body plan organization during early embryogenesis. *Development*, 1995, 121: 87-98
- [16] Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 1991, 113: 891-911
- [17] Kojima Y, Tam OH, Tam PP. Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 34: 65-75
- [18] Pfister S, Steiner KA, Tam PP. Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7: 558-73
- [19] Mitiku N, Baker JC. Genomic analysis of gastrulation and organogenesis in the mouse. *Dev Cell*, 2007, 13: 897-907
- [20] Peng G, Suo S, Chen J, et al. Spatial transcriptome for the molecular annotation of lineage fates and cell identity in mid-gastrula mouse embryo. *Dev Cell*, 2016, 36: 681-97