

DOI: 10.13376/j.cblls/2017135

文章编号: 1004-0374(2017)10-1016-09



陈晔光, 2002 年以来任清华大学教授。先后担任 *Cell Res*、*J Biol Chem*、*Biochem J*、*Exp Cell Res*、*Open Biol*、*Cell Discovery* 期刊编委和中国细胞生物学学报副主编。长期从事细胞生物学的研究与教学工作, 试图了解 TGF- $\beta$  信号和 Wnt 信号转导的调控机制, 以及它们在干细胞自我更新和分化、胚胎发育和肿瘤发生中的作用。作为通讯作者在 *Science*、*Cell Stem Cell*、*Nat Cell Biol*、*Mol Cell* 等期刊发表 100 多篇研究论文; 主编的《分子细胞生物学》入选“十一五国家级规划教材”。

## 胚胎干细胞向中内胚层分化的调控机制

徐玄昊, 陈晔光\*

(清华大学生命科学学院膜生物学国家重点实验室, 北京 100084)

**摘要:** 在哺乳动物胚胎发育过程中, 中内胚层 (mesendoderm) 也被称为原条 (primitive streak), 是中胚层和内胚层分化的过渡时期。中内胚层的存在时间较短, 但成功的中内胚层分化对随后进行的中胚层与内胚层发育至关重要。发育生物学的研究极大地推动了人们对胚胎发育的认识, 同时, 越来越多体外分化系统的建立也加深了对环境信号如何影响胚层分化的理解。近些年来, 通过表观遗传的研究, 人们逐渐认识到染色体结构与组蛋白修饰的改变也在分化发育过程中起到重要作用。通过胚胎干细胞定向诱导中内胚层分化来探究相关分子机制, 不仅有助于对早期胚胎发育的了解, 也有助于临床应用与疾病治疗。现总结了 TGF- $\beta$  信号、Wnt 信号和 FGF 信号调控中内胚层分化的研究现状, 并概述了这些信号如何与表观修饰共同调控胚胎干细胞向中内胚层分化的进展。

**关键词:** 胚胎干细胞; 中内胚层; TGF- $\beta$  信号; Wnt 信号; FGF 信号; 表观遗传修饰

**中图分类号:** Q132.4; R321 **文献标志码:** A

### Regulation of mesendoderm differentiation of embryonic stem cells

XU Xuan-Hao, CHEN Ye-Guang\*

(State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** During early development of mammalian embryos, there exists an intermediate state, called primitive streak, also known as mesendoderm (ME), from which mesoderm and endoderm are derived. Although it is a transient stage during embryogenesis, successful differentiation of ME is critical for the following formation of mesoderm and endoderm. Developmental biology studies have greatly advanced our knowledge on embryogenesis, while *in vitro* chemical defined differentiation systems facilitate dissection of the influence of extracellular signals on germ layer formation. In addition, epigenetic regulations such as chromatin structure changes and histone modification alterations are appreciated to play critical roles in the process of cell differentiation and embryo

收稿日期: 2017-08-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(91519310)

\*通信作者: E-mail: ygchen@tsinghua.edu.cn

development. In this review, we summarize recent progress on how extracellular signals (TGF- $\beta$ , Wnt, FGF) are integrated with intracellular epigenetic modifications during ME differentiation.

**Key words:** embryonic stem cells; mesendoderm; TGF- $\beta$ ; Wnt; FGF; epigenetic modification

哺乳动物的胚胎发育进入桑椹胚胎期后, 细胞在不断分裂时会形成内部含有空腔的囊胚, 其中处于外部的细胞被称为滋养外胚层 (trophectoderm, TE), 在随后的发育过程中形成胎盘, 而滋养外胚层细胞所包裹的空腔内部还有一小团细胞被称为内细胞团 (inner cell mass, ICM), 这些细胞随后分化发育为整个胎儿。小鼠囊胚的内细胞团大约含有 12 个细胞, 包裹在外部的滋养外胚层的细胞为 20~24 个<sup>[1-2]</sup>。根据细胞极性不同, 内细胞团又分为靠近滋养层细胞的上胚层 (primitive ectoderm, 或称 epiblast) 和靠近空腔的下胚层 (primitive endoderm, 或称 hypoblast)。上胚层细胞在胚胎发育的第 4.5~5.5 天开始进行原肠胚发育 (gastrulation), 在形成中胚层与内胚层之前, 细胞会先形成原条 (primitive streak), 这种细胞状态相当于体外分化系统中的中内胚层 (mesendoderm)。原条沿其中线延伸, 形成身体左右、头尾两条对称轴线, 标志着原肠胚发育的开始, 在这一过程中, 细胞由紧密连接的状态逐渐变得松散, 有一部分细胞内陷并迁移形成中胚层 (mesoderm) 和内胚层 (endoderm), 与上胚层剩余细胞分化形成的外胚层共同组成完整的原肠胚<sup>[3-4]</sup>。胚胎干细胞则是将分离的内细胞团在合适的体外培养条件下建立起来的, 这些细胞同样具有分化发育为完整三胚层以及后续组织器官的能力, 因此可作为研究胚胎发育和疾病发生的理想生物模型<sup>[5]</sup>。

体外诱导中内胚层分化的研究对于了解早期胚胎发育过程至关重要, 目前已有大量研究证明, 在原条期或在中内胚层存在一类标记基因, 它们不仅在这一时期表达量较高, 同时在中内胚层的分化过程中起重要作用, 例如 T-box 转录因子 T (Brachyury), 可以调控大量发育相关基因的表达, 在中内胚层分化过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>, 其他的标记基因还包括 MIXL1<sup>[8-9]</sup>、EOMES<sup>[10]</sup>、NODAL<sup>[10]</sup>、FGF8<sup>[11]</sup> 和 WNT3<sup>[12]</sup> 等等。

由胚胎干细胞向中内胚层的分化受到细胞内转录因子和细胞外生长因子的共同调节, 在众多生长因子中, 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族成员 (Activin、Nodal、BMP4)、Wnt 家族成员和成纤维细胞生长因子 (FGF) 均发挥了重要作用<sup>[12-17]</sup>; 同时,

随着对组蛋白修饰和染色体调控因子的深入研究, 人们发现表观遗传修饰 H3K4me3、H3K9me3 和 H3K27me3 以及调控因子 EZH2、JMJD3 和 UTX 等均在原条形成和中内胚层分化过程中发挥重要调节作用<sup>[18-21]</sup>。本文就中内胚层分化过程中的调控机制的研究进展进行简单概述。

## 1 信号通路与中内胚层分化

在体外胚胎干细胞定向分化为中内胚层的研究中, 多个信号通路被证明在其中发挥了重要作用, 包括 TGF- $\beta$  信号通路、Wnt 信号通路以及 FGF 信号通路, 它们之间相互协同共同决定了胚胎干细胞的分化命运<sup>[22-23]</sup>。

### 1.1 TGF- $\beta$ 信号通路在中内胚层分化中的作用

TGF- $\beta$  超家族包括众多生长因子, 如 TGF- $\beta$ 、Nodal、Activin、BMPs 和 GDFs 等。这些由细胞分泌的生长因子通过与对应的细胞膜表面的丝氨酸/苏氨酸激酶受体 (包括 I 型受体和 II 型受体) 结合, 实现信号由胞外向胞内的转导<sup>[24-25]</sup>。在结合配体后, II 型受体会磷酸化 I 型受体, 后者进而磷酸化并激活细胞质中的 R-Smad 蛋白, 磷酸化的 R-Smad 蛋白和 Smad4 形成复合物进入细胞核与 DNA 结合, 继而控制下游靶基因的转录。由于配体受体的特异性, 不同的 TGF- $\beta$  超家族因子激活的 R-Smad 也不同, Activin 与 Nodal 激活并利用 Smad2/3 介导信号转导, 而 BMPs 则利用 Smad1/5/8, 但它们都需要 Smad4 来传递信号。

TGF- $\beta$  信号在胚胎干细胞干性维持过程中发挥着重要作用, Smad2 可以结合在干性因子 Nanog 的调控区正向调控其表达, 维持细胞干性; 当敲低 Smad2 后, 干性因子表达降低, 细胞开始向中胚层以及滋养外胚层分化<sup>[26]</sup>。在小鼠胚胎干细胞中, BMP 信号可以协同 LIF 信号共同维持细胞干性<sup>[27-28]</sup>, BMP 通过 Smad1/4 上调 ERK 磷酸酶 Dusp9 的表达, 从而抑制由 LIF 激活的 ERK 活性, 促进细胞干性维持<sup>[29]</sup>。虽然 TGF- $\beta$  信号在维持细胞干性过程中发挥作用, 但在胚胎干细胞分化过程中其功能更加明显。

Activin/Nodal 信号在原肠胚形成过程中起关键

作用。原肠胚形成之前的上胚层细胞中, Nodal 就有表达, 其作用区域出现在上胚层后侧, 这里正是原条形成的地方<sup>[30]</sup>。Nodal 突变会导致胚胎滞留在卵圆柱期并且无法形成原条<sup>[31]</sup>。作为 Activin/Nodal 信号的下游信号介导分子, Smad2 同样在早期胚胎发育过程中起重要作用, Smad2 缺失的小鼠不仅着床后的胚胎较小, 其胚层的组织发育严重受阻<sup>[32]</sup>。体外胚胎干细胞的研究同样证实 Activin/Nodal 信号对于中内胚层的分化至关重要, 通过小分子抑制剂 SB431542 阻断 Activin/Nodal I 型受体活性或是敲低 Smad2 后, 中内胚层的分化均会受到不同程度的抑制<sup>[33-34]</sup>。

大规模高通量测序技术(如 RNA-seq 和 ChIP-seq)得到的数据显示, 在 Activin/Nodal 信号激活后, Smad2/3/4 复合物会结合到中内胚层标记基因 T、Mixl1、Eomes 等的调控区域, 从而促进标记基因的表达<sup>[35]</sup>。同时, 这些标记基因有一部分本身作为转录因子, 继续放大信号, 进而激活其他下游的中内胚层基因, 共同影响细胞向中内胚层分化<sup>[9]</sup>。Smad2/3 还可以与其他辅助因子相互作用, 如 Foxh1 以及 Mixer, 这些因子同样可以结合在特定基因的启动子区域, 共同激活下游靶基因<sup>[14,36-37]</sup>。

BMP 信号在胚胎发育过程中也发挥了重要作用。在原肠胚形成之前的胚胎中, BMP4 表达量较低, 但在发育至原条后其表达量到达峰值, 它参与了神经系统、肺、肾脏等不同组织器官的形成, 缺失 BMP4 的小鼠胚胎在原肠胚时期就会出现明显缺陷<sup>[15,38]</sup>。在小鼠胚胎干细胞中, BMP4 信号不仅调控着胚胎干细胞干性的维持和滋养层细胞的分化, 同样也调控小鼠上胚层干细胞和人胚胎干细胞向中内胚层的分化<sup>[39-40]</sup>。但是, BMP4 信号在调控中内胚层分化过程中的作用较为复杂, 并且该信号常常被认为是间接作用, 因为当使用抑制剂 Noggin 或是敲低 Smad1/5/8 时, 中内胚层的分化并未受到明显影响。有研究证实 BMP 不仅可以和 FGF 信号协同调控 MAP 激酶 ERK 的磷酸化, 进而调控 Dusp6 和 Nanog 的转录, 同时 Smad1/5/8 也可以调控中内胚层的标记基因<sup>[41]</sup>。因此, 对于中内胚层分化这一生物学过程而言, BMP 的具体功能还需更多的实验探究。

## 1.2 Wnt信号通路在中内胚层分化中的作用

Wnt 蛋白调控细胞增殖、分化、迁移以及极性, 在胚胎发育过起关键作用<sup>[42]</sup>。经典的 Wnt 信号是通过 Wnt 配体分子结合细胞膜上的七次跨膜受

体 Frizzled 和共受体 LRP5/6 而起始, 引起胞内 Axin 蛋白与 Frizzled 结合以及 Dishevelled 蛋白与 LRP5/6 结合, 进而打散了由 Axin、Dishevelled、APC 和 GSK3 $\beta$  等蛋白组成的  $\beta$ -catenin 降解复合体, 导致  $\beta$ -catenin 积累并进入细胞核, 同 TCF 蛋白形成复合物调控靶基因的表达<sup>[43]</sup>。在小鼠胚胎发育过程中, Wnt 蛋白不仅在内细胞团中大量表达, 同时在滋养外胚层中也可以检测到,  $\beta$ -catenin 的表达量从内细胞团到原条期间都维持相对较高的水平, 表明了经典 Wnt 信号在原肠胚发育和原条形成过程中的重要作用<sup>[44]</sup>。在体外胚胎干细胞分化实验中, 激活 Wnt 信号可以诱导细胞向中内胚层分化, 而通过 DKK1 或小分子 IWR1 抑制 Wnt 信号则极大地降低分化效率<sup>[45]</sup>。在数个激活经典 Wnt 信号的 Wnt 配体蛋白中, Wnt3 的失活会造成原肠胚发育受阻以及原条的缺失。在体外分化实验中, Wnt3 基因同样也是中内胚层的重要标记基因<sup>[46]</sup>。相反, 通过非经典 Wnt 信号发挥作用的 Wnt4、Wnt5a 和 Wnt11 则无法在小鼠胚胎的原条区域中检测到表达, 进一步说明  $\beta$ -catenin/TCF 经典 Wnt 信号调控 T、MIXL1 等基因, 在中内胚层分化过程中起重要作用<sup>[47]</sup>。

## 1.3 FGF信号通路在中内胚层分化中的作用

FGF 信号在小鼠原肠胚发育阶段发挥重要作用。FGF 信号是由配体结合膜表面的受体酪氨酸激酶启动, 通过受体二聚化激活受体的酪氨酸激酶, 从而导致下游 PI3K/Akt 通路的激活, 产生生物学效应<sup>[48]</sup>。受体 Fgfr1 失活后, 小鼠出现原肠胚期致死表型, 同时, 中胚层的形成也受到影响。虽然 Fgf3、Fgf8、Fgf17 在胚胎条纹期均有高表达, 但只有 Fgf8 缺失的胚胎才会出现原条发育障碍和原肠胚发育缺陷<sup>[11]</sup>。在体外胚胎干细胞分化实验中, 大量实验也证明了 FGF 信号可以协同 BMP4、Activin 等信号共同促进中内胚层的分化<sup>[41,48]</sup>。

## 1.4 中内胚层分化过程中的信号协同作用

体外胚胎干细胞系的建立为深入了解胚胎早期发育过程中信号通路之间的相互作用提供了理想模型, 通过不同的细胞因子处理, 人们对特定的信号通路调控中内胚层分化进行详细的研究。利用胚胎干细胞, 目前已经建立了多种体外中内胚层分化体系: (1) Activin 信号协同 FGF2 以及 PI3K 抑制剂 LY294002<sup>[33]</sup>; (2) 高浓度 Activin A<sup>[49]</sup>; (3) 高浓度 Wnt3a<sup>[50]</sup>; (4) BMP4 协同 FGF2 或 PI3K 抑制剂 LY294002<sup>[41]</sup>; (5) 低浓度的 Activin A 和 Wnt3a 组合<sup>[21]</sup>。此外, BMP4 单独处理同样也可以诱导中内胚层标

记基因 T 的表达, 但其中还伴随着滋养层标记基因 CGa 的表达<sup>[39,41]</sup>。

大量的研究证明, 多个信号通路通过复杂但精细的协调作用, 维持着胚胎干细胞干性和分化状态的动态平衡<sup>[22,34]</sup>。单独使用 Activin A 或 Wnt3a 处理均可以促进中内胚层分化, 而不论是使用哪种生长因子, 如果抑制 Activin 或 Wnt 信号, 分化过程会受到不同程度的抑制<sup>[21]</sup>, 说明 Activin 和 Wnt 信号在中内胚层分化过程中可能有协同作用。在人胚胎干细胞中,  $\beta$ -catenin 可以协同 Smad2/3 与 Oct4 共同调控中内胚层分化, 通过 GSK3 $\beta$  的抑制剂 CHIR99021 处理, 激活的 Wnt 信号上调了标记基因 T、MIXL1 和 EOMES 的表达, 而这种表达依赖于  $\beta$ -catenin 和 Smad2 的存在; 同时, 在中内胚层标记基因的调控区域, 均能发现  $\beta$ -catenin 和 Smad2 的共同结合区。当 Activin/Smad 信号被抑制时,  $\beta$ -catenin 促进了神经嵴分化, 进一步证明了 Activin/Smad 通路与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在中内胚层定向分化中的重要作用<sup>[51]</sup>。作为胚胎干细胞的重要的干性因子, Oct4 在中内胚层的分化过程中也发挥了重要作用, 在中内胚层标记基因的调控区域内不仅有  $\beta$ -catenin 的结合, 同样也有 Oct4 的富集<sup>[52]</sup>。另一项研究从新的角度同样证明了 Activin 和 Wnt 信号在调控中内胚层分化中的协同作用<sup>[53]</sup>: 高浓度的 Wnt3a 处理人胚胎干细胞后, RNA 聚合酶 II 通过  $\beta$ -catenin/LEF-1 作用聚集在中内胚层标记基因 MIXL1、EOMES、NODAL 等的启动子区, 招募第 5 位丝氨酸磷酸化的 RNA 聚合酶 II (Ser5P-RNAPII) 到标记基因的调控区, 随后 Activin/Smad 信号协同  $\beta$ -catenin 促进转录延伸, 在 Activin/Smad 信号激活后, 可检测到第 7 位丝氨酸磷酸化的 RNA 聚合酶 II (Ser7P-RNAPII) 同样在中内胚层标记基因的调控区富集, 进一步加强了转录延伸的过程。另外, Hippo 信号通路的调控因子 YAP 同样对中内胚层的分化产生影响, 在 Wnt 和 Activin 信号调控的基因中, 有接近 50% 的基因的启动子区域内存在 TEAD4 的结合, 敲低 TEAD4、YAP 或其直系同源基因 TAZ 会极大地促进中内胚层的分化进程。进一步研究发现, YAP 协同 TEAD4 募集转录抑制复合物 NELF (negative elongation factor) 抑制 Activin/Smad 信号, 从而维持细胞内动态平衡。因此, 在中内胚层分化的早期, 当 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 Activin/Smad 信号增强, YAP 的抑制作用被抵消, 从而中内胚层基因的转录顺利进行, 继而推动细胞分化。此结论支持了早期

的一项研究<sup>[37]</sup>: YAP/TAZ-TEAD4 同 Smad2/3、Oct4 形成 TSO 复合物, 募集核小体去乙酰化复合物 NuRD 富集在基因的调控区域, 维持干性基因的适度表达, 同时抑制了中内胚层基因的转录。随着外源信号刺激的增强, Smad-FOXH1 复合体破坏了原有的 TSO 复合体, 进而通过转变基因调控区域上的复合物实现了同一信号通路在不同细胞背景下截然不同的功能。肿瘤抑制因子 p53 家族蛋白 p53/p63/p73 同样可以协同 Wnt 信号与 Activin/Nodal 信号促进中内胚层分化<sup>[54]</sup>: 在分化过程中 Nodal 信号激活 Smad2/3, 而作为 p53 靶基因的 Wnt3 则激活下游 Wnt 信号, 促进  $\beta$ -catenin/Tcf3 协同 Smad2/3 结合在中内胚层标记基因 Eomes、Foxa2、Gsc 的增强子区域, 共同促进中内胚层分化。

## 2 表观遗传修饰对中内胚层分化的调控

胚胎干细胞的分化不仅受到信号通路的精细调节, 表观修饰的影响同样重要, 组蛋白修饰的改变被认为是转录激活和细胞分化的先决条件之一<sup>[55]</sup>。基因组 DNA 的基本结构单位核小体, 由 4 种核心组蛋白 (H2A、H2B、H3、H4) 各 2 个构成的八聚体和包裹在外部长约 150 bp 的 DNA 片段组成。4 种组蛋白均包含 N 端柔性尾部结构, 其中的赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸可以发生甲基化、乙酰化、泛素化或磷酸化等修饰, 进而影响染色体结构和基因转录活性<sup>[56]</sup>。赖氨酸上的甲基化和乙酰化修饰对于表观调控尤为重要, 其中又以组蛋白 H3 的研究最多。通常来说, H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac、H3K36me3 等修饰与基因的转录激活相关, 而 H3K9me3、H3K27me3 与转录抑制相关<sup>[36,55]</sup>。在胚胎干细胞中, 大量的分化基因同时具有转录激活标记 H3K4me3 以及转录抑制标记 H3K27me3, 当受到合适的外界信号刺激时, H3K4me3 与 H3K27me3 的平衡态受到改变, 从而影响基因表达并促进胚胎干细胞向特定的命运分化。研究表明, 不仅 H3K4me3 和 H3K27me3 影响细胞分化过程, H3K4ac、H3K9ac、H3K27ac、H3K4me1 和 H3K9me3 等修饰同样也在多个发育过程中发挥重要作用, 这包括中内胚层分化以及随后发生的胰腺分化、类滋养层细胞分化和神经前体细胞分化<sup>[55,57]</sup>。在这些组蛋白修饰中, H3K4me3、H3K9ac 和 H3K27me3 与中内胚层的分化关系最为密切<sup>[19,55]</sup>。中内胚层标记基因 T、Eomes、Sox17 和 Gsc 等的表达受到这些组蛋白修饰的严格调控。

组蛋白甲基化在大量生物学过程中发挥重要作用,其中 H3K27me3 在原肠胚发育和中内胚层分化过程中主要行使转录抑制功能<sup>[58]</sup>。调控 H3K27me3 修饰水平的 PRC2 复合物 (polycomb repressive complex 2) 是原肠胚发育以及胚胎干细胞向中内胚层分化过程中的重要表观遗传调控分子。PRC2 复合物具有组蛋白甲基转移酶活性,特异甲基化组蛋白 H3 上 27 位的赖氨酸,即 H3K27me3 修饰。PRC2 复合物主要由 EZH2、EED 和 SUZ12 等蛋白组成,其中 EZH2 具有组蛋白甲基转移酶活性, SUZ12 具有锌指蛋白结构域,可能参与 DNA 或 RNA 的结合,而 EED 具有 WD40 结构域,这一结构与 H3K27me3 的结合密切相关,通过 EED 与组蛋白 H3K27me3 的相互作用,PRC2 的活性会极大增强,这种调节方式类似结合在 H3K9me3 上的异染色体蛋白 HP1 $\gamma$ <sup>[59-60]</sup>。体外实验证实 EZH2 在行使其功能时,必须同 EED、SUZ12 形成复合物。PRC2 复合物在早期胚胎发育中发挥重要作用,缺失 EZH2 的胚胎虽然能够向原肠胚分化,但无法形成原条<sup>[61]</sup>。同样,缺失 EED 或 SUZ12 也会造成原条发育障碍。与此一致,敲除 EED 和 SUZ12 的胚胎干细胞不仅会影响中内胚层的定向分化,而且会导致细胞分化的无序和杂乱<sup>[62-63]</sup>。EZH2 和 SUZ12 在胚胎干细胞分化过程中可以调控下游重要因子的表达,这些关键的因子包括 FOX 家族<sup>[64]</sup>、HOX 家族<sup>[59]</sup>、SOX 家族以及其他例如 T-box 家族的 TBX 蛋白<sup>[65]</sup>。这些蛋白的作为转录因子,在干细胞分化过程中有放大信号的作用,对于胚胎发育至关重要。除 EZH2 外,其他一些甲基转移酶,如同样能够调控 H3K27me3 修饰的 PRC1 复合物成员 RING1B<sup>[66]</sup>、调控 H3K9me2 修饰的 G9A<sup>[67]</sup> 以及调控 H3K4me3 修饰的 MLL 蛋白<sup>[68]</sup>,在原肠胚形成和早期胚胎发育过程中也发挥着关键作用。

由于组蛋白甲基化修饰的动态变化,因此,在中内胚层分化以及之后的中胚层和内胚层定向分化过程中,不仅 EZH2 等甲基转移酶有重要作用,去甲基化酶也同样重要。H3K27me3 的去甲基化酶 UTX (KDM6A) 和 JMJD3 (KDM6B),通常与分化基因的激活有关,抑制 JMJD3 的活性会显著降低中内胚层标记基因的表达<sup>[69-70]</sup>。

### 3 Activin和Wnt信号与表观遗传修饰的相互作用对中内胚层分化的影响

越来越多的研究开始关注细胞命运决定过程

中,信号通路如何调控染色体状态进而改变相关基因的表达。在胚胎干细胞干性维持过程中,Activin/Smad 协同 Nanog 募集 DPY30-COMPASS 复合物,维持基因组特定区域 H3K4me3 修饰水平,当抑制 Activin 信号后, H3K4me3 修饰水平下降,同时,干性因子的表达也出现下调,由此证明了干性维持过程中信号通路协同表观修饰发挥重要作用<sup>[71]</sup>。

除了细胞干性的维持,中内胚层的分化过程也受到外部信号通路与内部表观修饰的共同调节。我们研究发现,低浓度 (25 ng/ml) Activin A 和 Wnt3a 的协同作用可以有效诱导胚胎干细胞向中内胚层分化<sup>[21]</sup>。这一过程中,Activin A 处理早期伴随着 H3K27me3 修饰水平的下降,这对于中内胚层的分化至关重要,而 H3K4me3 修饰水平则无明显变化。更进一步的实验表明,PRC2 复合物中的 EZH2 受到 Activin/Smad2 的调控而下降,当敲低 Smad2 表达量时, H3K27me3 和 EZH2 的水平不再发生变化。同时,在中内胚层标记基因 T、MIXL1 等的启动子区, H3K27me3 的修饰会随着 Activin A 的处理而降低,但当使用小分子抑制剂 SB431542 阻断 Activin I 型受体活性时, H3K27me3 修饰水平则不随 Activin 信号的激活而改变。这些结果说明,Activin/Smad 信号可以通过下调 EZH2 而有效地降低 H3K27me3 水平。低浓度 Activin 可以导致 H3K27me3 水平的下调,但并不能激活中内胚层标记基因的有效表达,说明需要 Wnt/ $\beta$ -catenin 协同 Activin/Smad 促进中内胚层分化。ChIP-assay 实验证明,Smad2 和  $\beta$ -catenin 可以结合在中内胚层标记基因 T、MIXL1、FGF8 和 NODAL 的同一调控区域,而抑制 Smad2 后,  $\beta$ -catenin 在这些标记基因调控区的结合会明显下降,反之亦然。由此证明了在 H3K27me3 修饰水平下降后,处于待激活状态的分化基因受到 Smad2 和  $\beta$ -catenin 的共同调控,从而激活并促进中内胚层的分化 (图 1)。

在胚胎干细胞分化至中内胚层并向内胚层发育的长时程分化过程中, H3K27me3 的去甲基化酶同样发挥了重要作用,Activin 和 Wnt 信号精细地调控了这一过程。在高浓度 Activin A 诱导的中内胚层分化系统中,去甲基化酶 JMJD3 与 UTX 的表达量随着分化的进行不断增高;与此一致,通过基因敲低 JMJD3 和 UTX,分化效率明显下降,通过流式细胞仪分选得到的标记基因阳性细胞个数显著减少;激活的 Wnt 信号可以部分补偿 JMJD3 和 UTX 缺失导致的分化抑制,但 FGF2 或 BMP4 却无法起

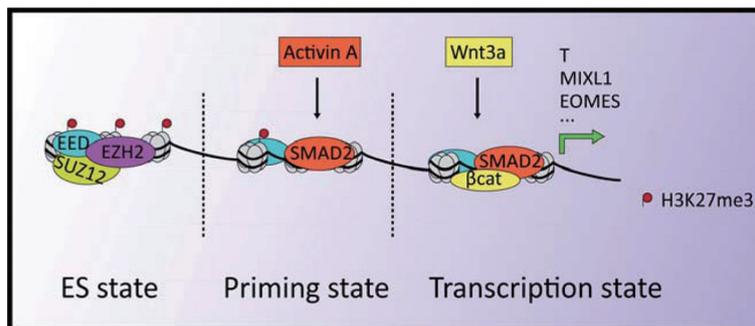
到这种补偿作用<sup>[69]</sup>。在胚胎干细胞中, Wnt 信号靶基因的调控区域富集了大量的 H3K27me3 修饰, JMJD3 和 UTX 可能调控了这些基因的激活。在中内胚层分化早期阶段, Wnt3 受到 JMJD3 和 UTX 的正向调控, 促进分化; 在分化后期, JMJD3 和 UTX 同样促进 Wnt 信号的靶基因以及同时作为其抑制因子的 DKK1 的表达, 引导内胚层分化。因此, H3K27me3 去甲基化酶 JMJD3 和 UTX 在 Activin 诱导下, 调控 Wnt 信号在分化的不同阶段行使不同功能(图 2)。

除了调控表观修饰的改变之外, 作为转录因子的 Smad2/3 和  $\beta$ -catenin 还可以通过招募其他因子共同组成调控复合物, 如 Smad 结合蛋白 TRIM33, 它包含 Smad 结构域和 PHD-Bromo 结构域, 其中 PHD 结构域可以识别组蛋白 H3K9me3 修饰, 而 Bromo 结构域则可以同 H3K18ac 结合。在 Activin/Nodal 信号激活后, Smad2/3 与 TRIM33 形成 Smad2/3-TRIM33 复合物并结合在中内胚层标记基因 Gsc、

Mixl1 的启动子区域, 这一区域富集表观修饰 H3K9me3 与 H3K18ac, TRIM33 通过 Smad2/3- TRIM33 复合物移除了异染色体蛋白 HP1 $\gamma$ , 从而使染色体上的 Activin/Nodal 信号调节区域暴露出来, 随后 Smad2/3-Smad4 复合物募集 RNA 聚合酶 II, 启动中内胚层标记基因的转录<sup>[72]</sup>。由此, 在 H3K9me3-K18ac 修饰区域, 不同的 Smad 复合物在分化过程中行使了不同的功能(图 3)。

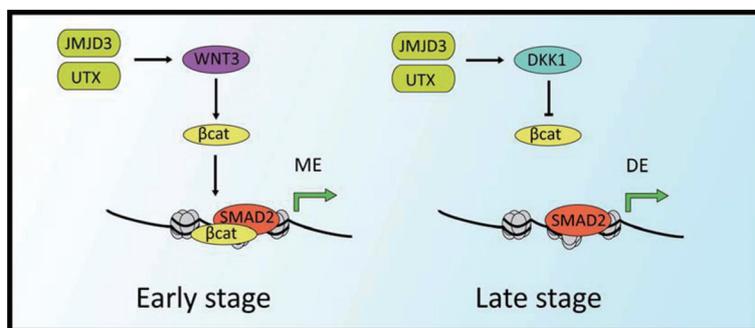
#### 4 总结

哺乳动物胚胎发育过程中原条的形成是多种信号通路共同作用的结果, 对于体外胚胎干细胞向中内胚层的分化也是这样, Activin 和 Wnt 信号的作用尤为重要<sup>[22]</sup>。虽然目前关于中内胚层的分化已经取得了一定的认识, 但对于信号通路、表观遗传修饰以及染色体活性调节之间的关系仍然需要更加深入的研究。对于信号通路的调控而言, 不同的作用时间可能产生不同的调控结果, 中内胚层分化这一



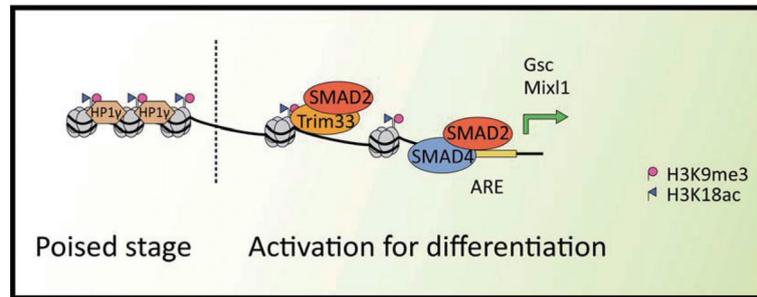
Activin/Smad影响了PRC2复合物中EZH2的蛋白水平, 进而降低了H3K27me3修饰, 随后Smad2与Wnt/ $\beta$ -catenin协同促进中内胚层标记基因的转录。

图1 Activin A和Wnt3a协同诱导中内胚层分化



在胚胎干细胞向中内胚层分化过程中, 组蛋白去甲基化酶UTX和JMJD3 降低了WNT3基因调控区的H3K27me3修饰, 进而促进其转录; 而在随后向内胚层分化过程中, DKK1同样受到UTX和JMJD3的激活, 进而抑制了Wnt信号, 使细胞向内胚层特异分化。

图2 JMJD3和UTX在不同分化阶段对Wnt信号的不同调控作用



在胚胎干细胞状态，由于异染色蛋白HP1 $\gamma$ 结合H3K9me3，使得Activin/Nodal调节区域无法暴露出来；当激活Activin/Nodal信号后，Smad2/3-Trim33复合物移除HP1 $\gamma$ ，因此，Smad2/3-Smad4复合物能够结合在Activin/Nodal调节区域，调控中内胚层标记基因的转录。

图3 Smad2/3-Trim33复合物介导Activin/Nodal信号调控中内胚层标记基因的转录

复杂过程中信号通路的作用也常常被划分为不同阶段，而这些不同阶段中表观遗传修饰也有所不同，因此，如何证实信号通路在不同阶段中调节表观遗传修饰的改变进而影响基因表达变化和细胞分化状态，是个亟待解决的问题<sup>[21,71]</sup>。由于胚胎干细胞在发育过程中逐渐分化出不同细胞类型，并在随后逐渐分化成为各个组织器官，因此，越来越多的研究使用单细胞测序技术来鉴定发育早期不同的细胞类群，从而探究不同类群的细胞其表观遗传修饰水平的差异以及响应信号通路的不同，这为了解分化过程不同阶段的细胞差异提供了更加有效的研究方法<sup>[23]</sup>。

作为分化过程中的过渡时期，外部信号的刺激会进一步诱导中内胚层向中胚层或内胚层分化。由于这一时期存在时间较短，目前的体外培养系统难以长期维持中内胚层的细胞状态。对中内胚层发育过程中的信号通路、表观修饰以及染色体活性调控机制的认识，不仅扩充了人们对于早期胚胎发育的理解，也加深了对细胞分化为不同器官组织的认识，也使得体外长期维持中内胚层细胞成为可能。这些工作对于深入理解中胚层和内胚层组织器官的分化发育意义重大，并有助于定向高效地诱导相关组织器官，从而为再生医学服务。

#### [参 考 文 献]

- [1] Suwińska A, Czołowska R, Ożdżeński W, et al. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol*, 2008, 322: 133-44
- [2] Marikawa Y, Alarcón VB. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76: 1019-32
- [3] Downs KM. The enigmatic primitive streak: prevailing notions and challenges concerning the body axis of mammals. *BioEssays*, 2009, 31: 892-902
- [4] Mikawa T, Poh AM, Kelly KA, et al. Induction and patterning of the primitive streak, an organizing center of gastrulation in the amniote. *Dev Dynam* 2004, 229: 422-32
- [5] Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev*, 1997, 68: 3-25
- [6] Kispert A, Herrmann BG. Immunohistochemical analysis of the brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev Biol*, 1994, 161: 179-93
- [7] Lolas M, Valenzuela PD, Tjian R, et al. Charting brachyury-mediated developmental pathways during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 4478-83
- [8] Zhang H, Fraser ST, Papazoglu C, et al. Transcriptional activation by the Mixl1 homeodomain protein in differentiating mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 2884-95
- [9] Pereira LA, Wong MS, Mossman AK, et al. PDGFR $\alpha$  and Flk1 are direct target genes of Mixl1 in differentiating embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 2012, 8: 165-79
- [10] Teo AK, Arnold SJ, Trotter MW, et al. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through coesodermin. *Genes Dev*, 2011, 25: 238-50
- [11] Crossley PH, Martinez S, Martin GR. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 1996, 380: 66-8
- [12] Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet*, 1999, 22: 361-5
- [13] Zhou X, Sasaki H, Lowe L, et al. Nodal is a novel TGF- $\beta$ -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*, 1993, 361: 543-7
- [14] Schier AF. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 589-621
- [15] Zinski J, Tajer B, Mullins MC. TGF- $\beta$  family signaling in early vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, [Epub ahead of print]
- [16] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development.

- Curr Opin Genet Dev, 1996, 6: 432-8
- [17] Yamaguchi TP. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol*, 2001, 11: R713-24
- [18] Lachner M, O'Carroll D, Rea S, et al. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 2001, 410: 116-20
- [19] Xie W, Schultz Matthew D, Lister R, et al. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, 2013, 153: 1134-48
- [20] Xie R, Everett LJ, Lim HW, et al. Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 224-37
- [21] Wang L, Xu X, Cao Y, et al. Activin/Smad2-induced histone H3 lys-27 trimethylation (H3K27me3) reduction is crucial to initiate mesendoderm differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2017, 292: 1339-50
- [22] Wang L, Chen YG. Signaling control of differentiation of embryonic stem cells toward mesendoderm. *J Mol Biol*, 2016, 428: 1409-22
- [23] Loh KM, Chen A, Koh PW, et al. Mapping the pairwise choices leading from pluripotency to human bone, heart, and other mesoderm cell types. *Cell*, 2016, 166: 451-67
- [24] Massague J, Chen YG. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev*, 2000, 14: 627-44
- [25] Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 659-93
- [26] Sakaki-Yumoto M, Liu J, Ramalho-Santos M, et al. Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *J Biol Chem*, 2013, 288: 18546-60
- [27] Fei T, Xia K, Li Z, et al. Genome-wide mapping of Smad target genes reveals the role of bmp signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome Res*, 2010, 20: 36-44
- [28] Zhang J, Fei T, Li Z, et al. BMP induces Cochlin expression to facilitate self-renewal and suppress neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2013, 288: 8053-60
- [29] Li Z, Fei T, Zhang J, et al. Bmp4 signaling acts via dual-specificity phosphatase 9 to control Erk activity in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 171-82
- [30] Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, et al. A primary requirement for Nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development*, 1994, 120: 1919-28
- [31] Brennan J, Lu CC, Norris DP, et al. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature*, 2001, 411: 965-9
- [32] Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, 1998, 393: 786-90
- [33] Bernardo AS, Faial T, Gardner L, et al. Brachyury and Cdx2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 144-55
- [34] Singh AM, Reynolds D, Cliff T, et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 312-26
- [35] Massagué J, Xi Q. TGF- $\beta$  control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett*, 2012, 586: 1953-8
- [36] Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 2011, 144: 940-54
- [37] Beyer TA, Weiss A, Khomchuk Y, et al. Switch enhancers interpret TGF- $\beta$  and hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2013, 5: 1611-24
- [38] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, 1996, 10: 1580-94
- [39] Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1261-4
- [40] Chiang PM, Wong PC. Differentiation of an embryonic stem cell to hemogenic endothelium by defined factors: essential role of bone morphogenetic protein 4. *Development*, 2011, 138: 2833-43
- [41] Yu P, Pan G, Yu J, et al. FGF2 sustains Nanog and switches the outcome of Bmp4-induced human embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 326-34
- [42] Holland JD, Klaus A, Garratt AN, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25: 254-64
- [43] Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127: 469-80
- [44] Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, et al. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*, 2006, 133: 3787-96
- [45] Kemp C, Willems E, Abdo S, et al. Expression of all wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev Dynam*, 2005, 233: 1064-75
- [46] Tran TH, Wang X, Browne C, et al. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 1869-78
- [47] Lickert H, Kispert A, Kutsch S, et al. Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mech Dev*, 2001, 105: 181-4
- [48] Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*, 2001, 1: 37-49
- [49] Yao S, Chen S, Clark J, et al. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6907-12
- [50] Hay DC, Fletcher J, Payne C, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires Activin A and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12301-6
- [51] Funa NS, Schachter KA, Lerdrup M, et al.  $\beta$ -catenin regulates primitive streak induction through collaborative interactions with Smad2/Smad3 and Oct4. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 639-52

- [52] Ying L, Mills JA, French DL, et al. Oct4 coordinates with Wnt signaling to pre-pattern chromatin at the Sox17 locus during human ES cell differentiation into definitive endoderm. *Stem Cell Rep*, 2015, 5: 490-8
- [53] Estarás C, Benner C, Jones KA. Smads and YAP compete to control elongation of  $\beta$ -catenin:Lef-1-recruited RNAPII during hESC differentiation. *Mol Cell*, 2015, 58: 780-3
- [54] Wang Q, Zou Y, Nowotschin S, et al. The p53 family coordinates wnt and Nodal inputs in mesendodermal differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 70-86
- [55] Li M, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 524-35
- [56] Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Human Genet*, 2013, 58: 439-45
- [57] Dixon JR, Jung I, Selvaraj S, et al. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature*, 2015, 518: 331-6
- [58] Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/Ezh2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14: 155-64
- [59] Kassis JA, Kennison JA, Tamkun JW. Polycomb and trithorax group genes in *Drosophila*. *Genetics*, 2017, 206: 1699-725
- [60] Poynter ST, Kadoch C. Polycomb and trithorax opposition in development and disease. *Wiley Interdiscip Rev: Dev Biol*, 2016, 5: 659-88
- [61] Collinson A, Collier AJ, Morgan NP, et al. Deletion of the polycomb-group protein EZH2 leads to compromised self-renewal and differentiation defects in human embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2016, 17: 2700-14
- [62] Faust C, Schumacher A, Holdener B, et al. The Eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development*, 1995, 121: 273-85
- [63] Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, et al. Suz12 is essential for mouse development and for Ezh2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*, 2004, 23: 4061-71
- [64] Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, et al. Fox's in development and disease. *Trends Genet*, 2003, 19: 339-44
- [65] Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, et al. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 219-39
- [66] Qin J, Whyte WA, Anderssen E, et al. The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 319-32
- [67] Zhang T, Termanis A, Ozkan B, et al. G9a/Glp complex maintains imprinted DNA methylation in embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2016, 15: 77-85
- [68] Grandy RA, Whitfield TW, Wu H, et al. Genome-wide studies reveal that H3K4me3 modification in bivalent genes is dynamically regulated during the pluripotent cell cycle and stabilized upon differentiation. *Mol Cell Biol*, 2015, 36: 615-27
- [69] Jiang W, Wang J, Zhang Y. Histone H3K27me3 demethylases KDM6a and KDM6b modulate definitive endoderm differentiation from human ESCs by regulating wnt signaling pathway. *Cell Res*, 2013, 23: 122-30
- [70] Chen S, Ma J, Wu F, et al. The histone H3 lys 27 demethylase JMJD3 regulates gene expression by impacting transcriptional elongation. *Genes Dev*, 2012, 26: 1364-75
- [71] Bertero A, Madrigal P, Galli A, et al. Activin/Nodal signaling and Nanog orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes Dev*, 2015, 29: 702-17
- [72] Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, et al. A poised chromatin platform for TGF- $\beta$  access to master regulators. *Cell*, 2011, 147: 1511-24