

DOI: 10.13376/j.cbils/2017139

文章编号: 1004-0374(2017)10-1046-06



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。景乃禾研究员二十多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 Res*、*Mech Dev*、*Acta Biochim Biophys Sin*、*Neurosci Bull* 等国际期刊编委, *BMC Dev Biol* 和 *J Mol Cell Biol* 副主编。研究工作发表在 *Dev Cell*、*PNAS*、*Nat Commun*、*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。

哺乳动物早期胚胎发育及干细胞分化 过程中的表观遗传调控研究

杨贤法^{1,2,3}, 景乃禾^{1,2,3*}

(1 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 分子细胞科学卓越创新中心, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; 2 中国科学院大学, 北京 100864; 3 上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210)

摘要: 哺乳动物早期发育过程伴随着细胞的增殖、迁移以及细胞命运的层级特化。体外干细胞系在合适刺激下的定向分化可以部分模拟早期胚胎发育及细胞命运决定的历程。在细胞命运层级特化过程中, 细胞通过多重调控机制协调全能性相关基因的维持及关闭、特定谱系关键基因的时空特异性表达, 表观遗传调控在该过程中发挥着十分重要的作用。开展针对体内胚胎发育及体外干细胞定向分化过程中细胞命运决定表观调控机制的研究, 将推动对发育生物学基本科学问题的认识, 同时也将进一步推动再生医学的发展, 最终服务于国家人口健康发展战略。

关键词: 胚胎发育; 干细胞; 表观遗传调控; 细胞命运决定; 原肠运动

中图分类号: Q813; Q954.4 **文献标志码:** A

The epigenetic mechanism of cell fate determination during early embryo development and stem cell differentiation

YANG Xian-Fa^{1,2,3}, JING Nai-He^{1,2,3*}

(1 State Key Laboratory of Cell Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China;

3 School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China)

收稿日期: 2017-08-14

基金项目: 国家自然科学基金“细胞编程和重编程的表观遗传机制”重大研究计划集成项目(91519314)

*通信作者: E-mail: njing@sibcb.ac.cn; Tel: 021-54921381

Abstract: During the early developmental process of mammalian embryo, cells proliferate rapidly, migrate extensively and cell fate will be finally determined. *In vitro* stem cells will differentiate into mature functional cells under proper stimuli, which partially recapitulate the process of cell fate determination in the embryo. Multiple regulatory mechanisms have been identified to be involved in the process of cell fate determination to regulate the expression of pluripotency genes and spatial-temporal distribution of lineage related genes. Epigenetic regulation has been reported as an important regulatory mechanism in ensuring the processing of cell fate determination. This article reviews the very recent progress in the study of epigenetic regulation of cell fate determination in stem cell-based and early embryo system, especially our efforts concerning this cutting edge field under the support from the key research plan of “Epigenetic Mechanisms of Cell Programming and Reprogramming” by the National Natural Sciences Foundation of China.

Key words: embryo development; stem cell; epigenetic regulation; cell fate determination; gastrulation

哺乳动物受精卵在体内不断增殖分化, 历经胚胎着床前的合子期、桑椹胚期、囊胚期以及着床后的原肠胚期、器官发生期等阶段, 命运不断特化并最终发育形成能够行使复杂生物学功能的个体^[1]。在该过程中, 具有全能性的上胚层细胞命运逐渐特化, 其背后的分子机制是当前细胞生物学和发育生物学的重点。研究人员通过建立干细胞体外定向分化系统, 能够较好地模拟体内胚胎发育过程中细胞命运决定的历程。同时, 体外干细胞系统的易操作性及低成本也为研究方案的选择等提供了便利。研究人员对胚胎发育及体外干细胞定向分化系统中的细胞命运决定分子机制的探究, 无疑将极大提高人们对生命科学基础理论的认识, 对推动再生医学等的发展具有重大意义。

针对细胞命运决定和层级分化分子机制的研究主要涉及对该过程中具有重要作用的多种调控方式, 如信号通路、代谢调控、转录调控以及表观遗传调控等。越来越多的研究表明, 表观遗传调控在哺乳动物的早期胚胎发育以及干细胞的细胞命运决定过程中发挥着重要的作用^[2-4]。

在国家自然科学基金委重大研究计划“细胞编程和重编程的表观遗传机制”大力支持下, 本课题组对哺乳动物早期胚胎发育及体外胚层干细胞的建立和多能干细胞定向分化过程中的表观遗传学机制进行了深入的研究, 取得了一些有意义的结果。

1 干细胞命运决定过程中的表观遗传学机制

胚胎干细胞作为目前研究最为广泛的细胞系统, 在多种生物学问题的研究中发挥着重要作用。越来越多的研究表明, 表观遗传修饰在干细胞命运决定过程中的特征性变化模式对调控元件活性状态的动态变化、调控元件与核心转录因子之间的互作

等具有重要的调控作用。来自美国纽约大学的 Brian David Dynlacht 教授对小鼠干细胞向肌肉细胞分化过程中的组蛋白修饰变化情况进行了研究, 发现了肌肉细胞分化过程中 myogenin 基因周围的新调控元件^[5], 还揭示了肌肉细胞分化过程中“瞬时抑制”以及“永久关闭”两类基因所受表观调控的差别。美国加州大学圣迭亚哥分校的任兵教授开展了针对人胚胎干细胞向胰腺细胞分化过程中表观遗传调控的研究, 阐明了在该分化过程中 H3K4me1 和 H3K27ac 能够标记胰腺细胞分化过程中的一类处于准备状态的增强子 (poised enhancers), 通过与先行因子 (pioneer factor) 的相互作用从而介导分化过程中细胞对于外界信号的响应^[6]。美国哈佛大学的 Alexander Meissner 教授通过研究人胚胎干细胞神经分化过程中表观遗传修饰的变化, 尤其是调控元件区域的表观遗传修饰变化, 发现并验证了一系列能够与表观修饰变化相互作用的核心或时期特异性的转录因子, 从而推动神经命运的决定^[7]。

在基金委“细胞编程和重编程的表观遗传机制”重大研究计划的大力支持下, 景乃禾课题组对特定胚层干细胞的建立以及多能干细胞神经定向分化过程中的表观遗传调控机制做了系统性的研究。外胚层谱系的建立是小鼠原肠运动过程中的重要事件之一。在体外建立合适的外胚层干细胞系, 将为揭示胚层分化过程中的分子机制、确定外胚层的分子标记、体外高效获得外胚层来源的神经细胞和毛囊细胞等具有临床应用前景的种子细胞提供强有力的工具。通过对上胚层干细胞加以适当的信号刺激, 在体外获得了能够稳定传代的外胚层样干细胞; 进而, 通过对该细胞系及其建立过程中的表观遗传修饰, 如 H3K4me3、H3K27me3、H3K27ac 等组蛋白修饰的研究, 发现在外胚层干细胞的建立及特化过程中

胚层发育关键基因启动子区的二价修饰状态 (bivalent, H3K4me3 + H3K27me3) 和活性状态 (active, H3K4me3 + H3K27ac) 之间的相互转变, 对于外胚层命运的特化及中内胚层命运的丧失发挥着重要的作用。景乃禾课题组还利用小鼠胚胎干细胞体外神经分化系统模拟体内神经诱导过程, 发现组蛋白乙酰化修饰的去除主要发生在神经命运起始阶段, 且与上胚层细胞神经命运决定密切相关。在上胚层细胞阶段, 通过组蛋白去乙酰化酶抑制剂阻断组蛋白去乙酰化酶活性, 或条件性敲除组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 都能够显著抑制神经分化, 促进干细胞向中内胚层分化。在神经分化的不同时间点, 针对组蛋白乙酰化修饰的染色质免疫沉淀及测序 (ChIP-seq) 结果表明, 随着上胚层细胞神经分化的进行, 组蛋白乙酰化修饰水平在一系列已知的神经命运抑制性基因位点逐渐降低, 其中包括 *Nodal* 基因。在此基础上, HDAC1 蛋白特异 ChIP-seq 结果显示, HDAC1 蛋白特异地结合在 *Nodal* 基因位点, 通过去除其内含子区域的组蛋白乙酰化修饰, 抑制 *Nodal* 基因的转录。进一步的功能实验证明, *Nodal* 信号介导了组蛋白去乙酰化酶抑制剂及 HDAC1 缺失导致的神经命运决定的抑制。在小鼠 7.0 d 胚胎中, 抑制前端上胚层细胞的组蛋白去乙酰化, 可以激活 *Nodal* 基因表达, 进而抑制神经命运决定。因此, 这一研究揭示了组蛋白去乙酰化作为细胞内一种重要的表观遗传调控机制, 在胚胎前端通过抑制 *Nodal* 信号而促进上胚层细胞的神经命运决定^[8]。

景乃禾课题组还对人胚胎干细胞神经命运决定过程中的表观遗传机制做了深入研究。通过对人胚胎干细胞神经分化不同阶段的基因表达情况进行系统性分析, 确定了人胚胎干细胞神经命运决定过程中的不同阶段特异表达的表观调控因子。结果表明, 表观遗传因子 AF9 的表达随着人胚胎干细胞神经分化逐步上调; 过表达 AF9 能够显著促进人胚胎干细胞的神经分化, 并上调一系列神经命运调控因子的表达。进一步研究发现, AF9 能够特异地与 DNA 羟化酶 TET2 相互作用, 并协同促进人胚胎干细胞的神经分化过程。机制研究揭示, AF9 能够通过识别特异性的 DNA 元件, 结合在下游靶基因增强子区域, 并进一步通过与 TET2 相互作用招募 TET2 到相邻的 GC-rich 区域, 促进该区域 DNA 羟甲基化的发生, 从而增强了 SOX5、ZNF521、MASH1 等重要神经调控因子的表达, 最终推动了人胚胎干细胞的神经命运决定过程^[9]。景乃禾课题组还对人胚

胎干细胞神经分化过程中的组蛋白乙酰化修饰变化做了深入研究^[10]。通过向人胚胎干细胞神经分化过程不同阶段的培养体系中添加组蛋白去乙酰化酶的抑制剂, 检测相应阶段标记基因的表达, 发现 H3K9ac 在从多能性人胚胎干细胞分化到神经干细胞的过程中呈现先降低后升高的动态变化趋势。在分化起始阶段, 细胞 H3K9ac 总体水平呈现下降趋势, 从而促进全能性基因的关闭; 而在神经命运决定阶段, 细胞 H3K9ac 总体水平呈现上升趋势, 从而促进神经发育相关基因的表达上调。利用去乙酰化酶抑制剂阻断乙酰化的下调, 抑制神经细胞的产生而使全能性基因维持高表达状态; 而在神经命运决定阶段利用去乙酰化酶抑制剂上调组蛋白乙酰化, 则促进神经干细胞的产生。ChIP-seq 实验发现 H3K9ac 在胚胎干细胞中主要分布在全能性相关基因的启动子区域, 而该修饰在神经干细胞中则主要分布在神经发育相关调控因子的启动子区域, 从而证明 H3K9ac 在人胚胎干细胞和神经前体细胞中具有不同的下游靶基因。

综上所述, 景乃禾课题组系统地研究了小鼠胚层干细胞的建立、小鼠胚胎干细胞神经定向分化以及人胚胎干细胞神经定向分化过程中的表观遗传修饰的变化规律及对细胞命运决定基因的调控机制。这些发现极大地丰富了人们对于哺乳动物早期神经发育过程的理解, 有助于提高人的胚胎干细胞及诱导性多能干细胞向特定亚型神经元分化的效率, 对于再生医学的发展具有重要意义。

2 哺乳动物早期胚胎发育过程中的表观遗传调控机制

小鼠胚胎的早期发育历程及分子机制是目前发育生物学领域中研究最为广泛的方向之一。小鼠早期胚胎的发育过程历经合子期、桑椹胚期、囊胚期, 胚胎着床后经过原肠胚期等, 命运不断特化, 最终发育成为能够行使复杂功能的生命个体。其中细胞的剧烈增殖、迁移、不对称分裂等, 推动了细胞极性以及胚胎模式的建立。发生在受精后约 4.5 d 的胚胎着床作为一个标志性的事件, 将整个小鼠胚胎发育的过程分成了两个大的阶段。其中着床前, 胚胎由一个具有全能性的合子 (zygote) 逐渐形成内细胞团 (inner cell mass, ICM)、原始内胚层 (primitive endoderm, PE) 和滋养外胚层 (trophoblast, TE)。着床后的胚胎上胚层细胞经过剧烈的细胞增殖和迁移, 特化为具有不同发育命运的外、中、内 3 个胚

层。小鼠的原肠运动起始于受精后 6.5 d, 此时原条的出现标志着胚胎前后轴 (A-P) 的建立。具有全能性的上胚层细胞经过上皮-间充质转换 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 越过原条向前端迁移包裹, 逐渐特化形成中、内胚层, 而胚胎前端的上胚层细胞将发育形成外胚层^[11-12]。研究人员利用基于少量细胞的转录组测序手段以及 DNA 甲基化亚硫酸盐测序手段, 系统性地研究了小鼠胚胎早期发育过程中的基因表达图谱以及 DNA 甲基化修饰的动态变化模式。尤其值得一提的是, 中国科学院上海生化细胞所景乃禾研究员和计算生物学研究所韩敬东研究员通过深度合作, 结合激光显微切割、少量细胞转录组测序和生物信息学大数据分析手段, 在极高分辨率水平上解析了小鼠原肠运动中期胚胎的空间转录组模式图, 对解析和认识小鼠胚胎原肠运动过程中的细胞谱系层级特化的范式具有重要意义^[13]。对小鼠胚胎发育过程中 DNA 甲基化修饰的动态变化及变化背后的分子机制研究, 主要集中在小鼠胚胎发育着床前阶段和原始生殖细胞发育的过程中。中国科学院上海生化细胞所徐国良研究员和北京大学汤富酬研究员等在该领域做了大量杰出工作。

然而, 由于早期胚胎细胞数量较少这一限制因素, 在小鼠早期胚胎发育系统中, 表观遗传学, 尤其是针对组蛋白修饰的相关研究长期处于空白状态。随着高通量测序技术的不断发展, 越来越多针对少量细胞的表观遗传学研究手段被建立起来。这些技术的发展也使得在更高精度上研究小鼠早期胚胎发育过程中的表观遗传机制成为可能。2016 年, 清华大学颜伟研究员^[14]、同济大学高绍荣教授^[15]以及美国加州大学圣迭亚哥分校任兵教授^[16]同期分别在 *Nature* 上报道了他们关于着床前小鼠胚胎发育过程中的组蛋白修饰 H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 的重建过程的研究成果, 他们发现在该过程中不同修饰的重建过程具有较大差别。令人印象深刻的是, 在着床前小鼠胚胎中, H3K4me3 修饰会在发育相关重要基因的启动子区域形成大于 5 kb 的宽峰。功能实验也证明, 相关修饰酶的缺失会造成胚胎的发育异常。此后, 清华大学颜伟研究员^[17-18]、哈佛大学张毅教授^[19-20]和中国科学院刘江研究员^[21]等分别对着床前胚胎的染色质开放状态、染色质高级结构、印记基因的调控机制等做了大量杰出的原创研究。这些研究极大地推动了人们对于哺乳动物早期胚胎发育阶段表观遗传编程与重编程

规律的认识 (图 1), 为进一步阐释胚胎模式建成以及命运决定过程中的关键机制等重大基础生命科学问题打下了坚实的基础。

为了进一步探究表观遗传修饰在小鼠胚胎发育过程中的调控机制, 景乃禾课题组与北京大学汤富酬课题组合作开展了针对小鼠原肠胚阶段 (pre-streak, mid-streak, late-streak) 的转录组图谱和表观遗传图谱的研究 (未发表结果)。针对小鼠原肠胚细胞量较少, 表观修饰研究难度较大的问题, 研究人员建立了一套针对起始细胞量低至 1 万个细胞的染色质免疫沉淀技术手段。同时, 根据小鼠原肠胚区域特异性的发育命运, 将胚胎切割成胚外部分、前端上胚层部分、后端上胚层部分等, 并分别对相应组分的 H3K4me1、H3K4me3、H3K9ac、H3K27ac、H3K27me3、DNA 甲基化和基因表达谱进行了细致的分析。通过对大数据的整合分析发现, 在小鼠原肠运动时期, 胚胎的各组蛋白修饰区域呈现剧烈的去除与重建的过程, 其中 H3K27me3 的重建过程最为剧烈。通过对调控元件的分析, 研究人员确认了原肠胚各细胞谱系特异性的增强子和超级增强子, 对原肠运动过程中细胞的命运决定起着重要的推动作用。同着床前胚胎的组蛋白修饰模式相比, 原肠期小鼠胚胎具有完全不同的组蛋白修饰模式。同时, 该研究也表明, 在原肠运动过程中发育基因在不同细胞谱系中受到不同方式的表观调控, 以推动细胞命运的决定和胚胎模式的建成。

目前, 景乃禾课题组正通过整合激光显微切割技术、少量细胞表观遗传学研究手段、大数据生物信息学分析等手段, 试图阐明着床后胚胎模式建成及谱系命运决定中转录因子、信号通路、表观遗传机制间的相互作用, 从而在更高精度、更多维度上理解早期胚胎命运决定背后的运作机制。

3 结语和展望

综上, 随着技术的不断推进, 研究人员对体外干细胞的命运决定及体内胚胎细胞谱系层级特化过程中相关分子机制的研究 (尤其是表观调控机制的研究) 不断深入, 极大地拓展了人们对生命起源本质的认识。然而, 如何挖掘小鼠胚胎发育历程中表观修饰变化的生物学意义, 并将相关研究拓展至非人灵长类和人类胚胎发育过程, 仍将是未来很长一段时间内生命科学领域内的重大课题。未来, 对非人灵长类模式动物发育过程以及相关疾病发生发展过程中表观遗传调控机制的研究, 将无疑为解决

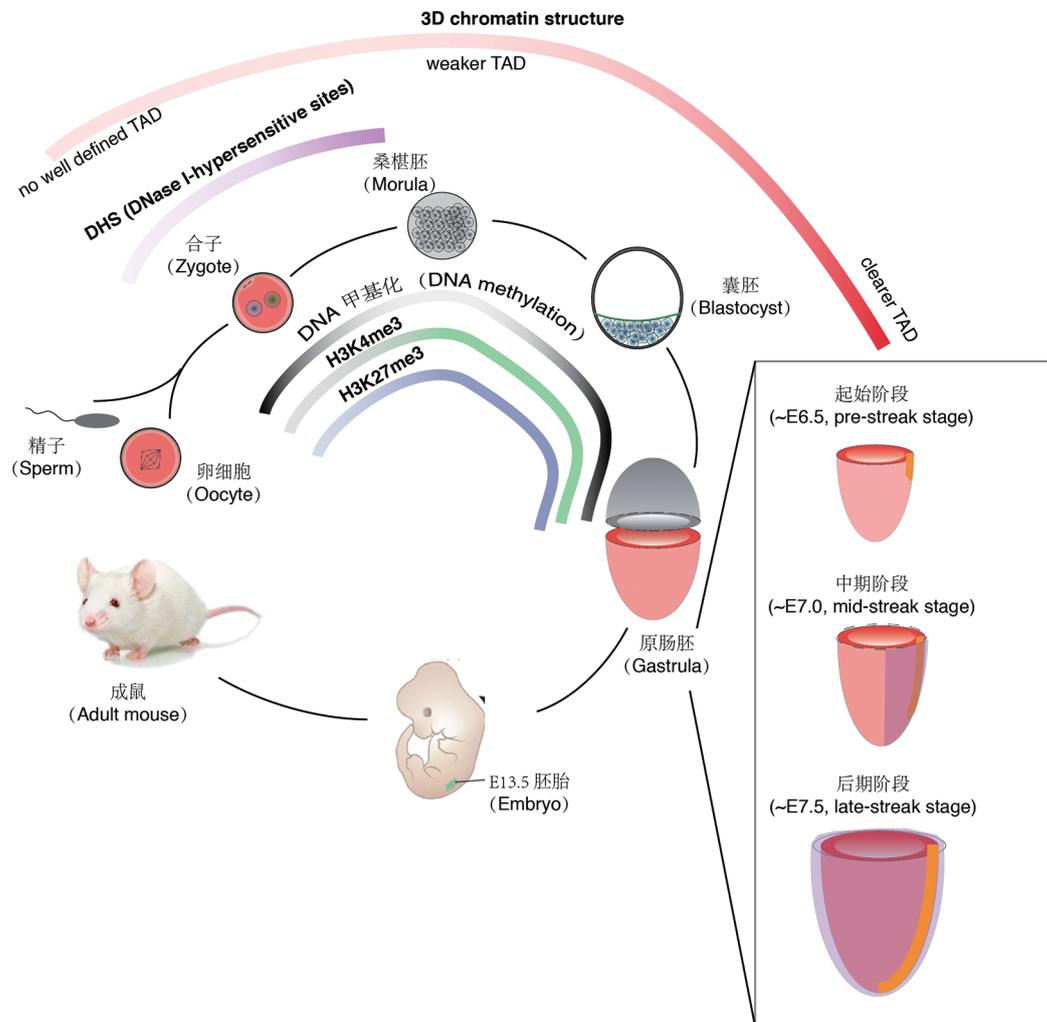


图1 小鼠胚胎发育过程中的表观遗传修饰重建情况

人类发展过程中的重大问题以及国家的人口发展战略的关键部署提供重要帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Downs KM, Davies T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development*, 1993, 118: 1255-66
- [2] Burton A, Torres-Padilla ME. Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 723-34
- [3] Qiao Y, Yang X, Jing N. Epigenetic regulation of early neural fate commitment. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 1399-411
- [4] Peng G, Jing N. The genome-wide molecular regulation of mouse gastrulation embryo. *Sci Chn Life Sci*, 2017, 60: 363-9
- [5] Asp P, Blum R, Vethantham V, et al. Genome-wide remodeling of the epigenetic landscape during myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: E149-58
- [6] Wang A, Yue F, Li Y, et al. Epigenetic priming of enhancers predicts developmental competence of hESC-derived endodermal lineage intermediates. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 386-99
- [7] Ziller MJ, Edri R, Yaffe Y, et al. Dissecting neural differentiation regulatory networks through epigenetic footprinting. *Nature*, 2015, 518: 355-9
- [8] Liu P, Dou X, Liu C, et al. Histone deacetylation promotes mouse neural induction by restricting Nodal-dependent mesendoderm fate. *Nat Commun*, 2015, 6: 6830
- [9] Qiao Y, Wang X, Wang R, et al. AF9 promotes hESC neural differentiation through recruiting TET2 to neurodevelopmental gene loci for methylcytosine hydroxylation. *Cell Discov*, 2015, 1: 15017
- [10] Qiao Y, Wang R, Yang X, et al. Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *J Biol Chem*, 2015, 290: 2508-20
- [11] 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

- [12] Wang Y, Steinbeisser H. Molecular basis of morphogenesis during vertebrate gastrulation. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2263-73
- [13] 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
- [14] Zhang B, Zheng H, Huang B, et al. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature*, 2016, 537: 553-7
- [15] Liu X, Wang C, Liu W, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature*, 2016, 537: 558-62
- [16] Dahl JA, Jung I, Aanes H, et al. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 2016, 537: 548-52
- [17] Wu J, Huang B, Chen H, et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos. *Nature*, 2016, 534: 652-7
- [18] Du Z, Zheng H, Huang B, et al. Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature*, 2017, 547: 232-5
- [19] Lu F, Liu Y, Inoue A, et al. Establishing chromatin regulatory landscape during mouse preimplantation development. *Cell*, 2016, 165: 1375-88
- [20] Inoue A, Jiang L, Lu F, et al. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature*, 2017, 547: 419-24
- [21] Ke Y, Xu Y, Chen X, et al. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis. *Cell*, 2017, 170: 367-81, e20