

DOI: 10.13376/j.cblls/2019137

文章编号: 1004-0374(2019)11-1116-10

中胚层细胞的形成及向血系分化的研究进展

刘光辉¹, 马晴雯¹, 曾凡一^{1,2*}

(1 上海交通大学附属儿童医院, 上海市儿童医院, 上海交通大学医学遗传研究所, 国家卫健委医学胚胎分子生物学重点实验室, 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040;

2 上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025)

摘要:在原肠运动过程中, 原条的位置上出现一类新的细胞将上胚层和下胚层分隔开, 并且形成新的胚层, 这层新的细胞称为中胚层。中胚层细胞将来分化为血液、骨骼、肌肉、肾脏、结缔组织、真皮、泌尿生殖系统等重要的组织和器官。其中, 血液系统是维持正常生命活动的重要组成部分。血液系统形成过程受到复杂而又精细的分子调控。近年来, 随着单细胞 RNA 高通量测序技术和生物信息学分析方法的不断发展, 中胚层细胞的分子特性、命运图谱及其血系分化机理的神秘面纱被逐步揭开。

关键词: 原肠运动; 原条; EMT; 中胚层; 单细胞 RNA-seq; 血系分化

中图分类号: Q28; R331.14 **文献标志码:** A

Mesoderm formation and hematopoietic lineage commitment from mesoderm

LIU Guang-Hui¹, MA Qing-Wen¹, ZENG Fan-Yi^{1,2*}

(1 Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Key Laboratory of Embryo Molecular Biology of National Health Commission, Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China; 2 Department of Histoembryology, Genetics & Development, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract: The mesoderm derives from a new layer between epiblast and hypoblast during gastrulation, and the vertebrate mesoderm can differentiate into various tissues including blood, skeleton, muscles, kidney, connective tissue, dermis, and urogenital system. Blood is one of the most important constitutions for maintaining life activity. Blood derivation process is regulated by complex and sophisticated molecular events. Recent years, the development of high-throughput RNA sequencing (RNA-seq) at the single-cell level and analytical method in bioinformatics has already led to profound new discoveries in molecular properties of mesoderm, lineage separation and cell fate commitment, and mechanism of hematopoietic lineage commitment.

Key words: gastrulation; primitive streak; EMT; mesoderm; single cell RNA-seq; hematopoietic lineage commitment

中胚层 (mesoderm) 起源于表胚层上皮, 是在原肠期上胚层和下胚层之间形成的新的胚层结构^[1]。原肠运动是脊椎动物身体形成过程中的一个很重要的发育时期。原始外胚层后端部位上原条的形成标志着哺乳动物原肠运动的开始。从原始外胚层增殖的细胞向原条迁移, 这些迁移的细胞聚集的部位介于原始外胚层和原始内胚层之间, 因此称为中胚层^[2]。新形成的胚层随后发生形态移动, 导致终末内胚层 (definitive endoderm, DE) 和中胚层的分离、不同器官原基的出现。多项小鼠早期胚胎研究

针对原条和外胚层进行了细胞谱系示踪实验, 广泛地分析了中胚层细胞的形成和分布^[2-4]。研究表明,

收稿日期: 2019-07-11; 修回日期: 2019-08-28

基金项目: 国家重大科学研究计划(2014CB964700); 国家重点研发项目(2016YFC1000503, 2016YFC0905102); 国家自然科学基金项目(31871484); 上海市重中之重项目(2017ZZ02019); 上海市自然科学基金项目(16ZR1428600)

*通信作者: E-mail: fzens@sjtu.edu.cn; Tel: 021-62472308

胚内的外胚层、中胚层和内胚层由起初的单层上皮样的上胚层迁移分化而来, 随后三胚层进一步分化为体内各种组织和器官。随着胚胎的继续发育, 不同的中胚层细胞将会产生不同的重要的细胞类型, 其中包括血细胞、血管细胞、骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、结缔组织细胞、肾细胞和皮肤细胞, 因此, 中胚层的研究在临床应用上具有极其重要的价值。由于中胚层细胞的特殊性, 如何捕获特定类型的中胚层细胞群体是研究中胚层细胞功能的关键。

上皮细胞向间充质细胞转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 发生在原肠运动中, 促使细胞向胚胎的特定部位迁移^[5]。EMT 在进化上是一个非常重要和非常保守的发育过程。在早期胚胎发育的过程中, EMT 的发生促使胚胎形态结构形成; 在胚胎发育的后期, EMT 还参与组织器官的发生。小鼠早期胚胎发育进入到原肠运动时, 胚胎后端的原条区域细胞中的 EMT 被激活, 促使原始外胚层细胞开始向内迁移形成中胚层和终末内胚层, 胚胎开始形成三胚层的结构^[5]。

在小鼠体内, 原肠运动起始于 E6.5 (embryonic day 6.5), 并且持续进行到 E7.5。大约在 E5.5, 胚胎中的基因表达出现区域差异^[6-8], 在这种分子模式的启动下, 随后在原肠运动中发生明显的形态改变, 形成三胚层的形态结构, 即外胚层、中胚层和终末内胚层, 将来发育成所有胚胎组织的祖细胞^[9]。细胞离开原条的时间点决定了细胞将来具有不同的命运。起初离开原条的细胞形成胚外中胚层、心脏中胚层、颅中胚层以及终末内胚层; 后来离开的细胞形成侧板中胚层和轴旁中胚层。这样, 原条在它的稳定的区域中, 通过 EMT 过程持续性地增殖生成一系列有序的细胞类型。在 EMT 的持续作用下, 胚胎的形态结构发生一系列的转变^[10-13]。原肠期发生的 EMT 过程受到了一些关键分子的调控。例如, EMT 的启动受控于分泌因子 (如 Wnt、Nodal、FGF 和 BMP 等)、多能性因子 (如 SOX2) 和间充质因子 (如 SNAIL1) 等的作用^[14-15]。上胚层细胞向原条的迁移能力受到细胞表面蛋白 Crumbs2 和 myosin IIB 表达分布的调控^[16]。原条中 E-cadherin (EMT 的关键分子) 的表达在转录水平和翻译后水平分别受到 Snail 和 P38-MAP 激酶复合物的调控^[17-19]。可见, 原肠期中胚层细胞的出现和三胚层结构形成受到了非常精密和复杂的分子调控。

中胚层向血系分化的过程同样也受到了关键基

因和重要信号通路的调控。例如, *Flk1* 基因的表达有助于中胚层细胞迁移和早期造血的激活^[20]; *SCL*^[21]、*ETV2*^[22]、*Runx1*^[23]、*GATA1*^[24] 和 *GATA2*^[25] 等关键转录因子的表达促使中胚层向造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 和祖细胞分化; BMP、Notch 和 Wnt 等信号转导通路的激活促进中胚层细胞向血液和血管发育^[26-27]。可见, 中胚层向血系分化的过程也是一个非常复杂的过程, 该过程受到转录因子、膜蛋白和信号转导通路的协同调控。

近年来, 生物技术的发展有利于更好地认识生命体的发生和发展。例如, 单细胞 RNA-seq 技术不断地发展成熟, 为研究小鼠早期胚胎发育和早期胚胎 HSCs 起源提供了新的技术手段, 有利于更加细致地了解生命个体的复杂性和独特性。这项技术的发展有助于打破原有的思维认知, 更加接近生命个体的本来面貌, 为基础医学向临床转化提供了新的思路和方法。

1 中胚层的发生和血系分化的分子机理研究

1.1 中胚层关键基因的表达和信号通路的激活

中胚层形成的过程中涉及到很多关键基因的表达和信号通路的激活。其中, 细胞内的转录因子 (如 *Brachyury*、*Lhx1*、*Mesp1*、*Smad2*、*Smad3* 和 *Fubp1* 等) 的表达调控很大程度上决定了中胚层的命运。*Brachyury* (*T*) 基因的表达产物是一种 T-box 转录因子, *T* 基因的突变导致小鼠早期胚胎不能产生足够多的中胚层, 严重阻碍了中胚层衍生结构的形态发生, 尤其是影响后期脊索的形成^[28-29]。初期的中胚层细胞的形成需要表达 *T* 基因, 在原肠作用过程中 *T* 基因是最先原条部位表达的基因, 随后在脊索和尾芽中也发现 *T* 基因的表达^[30-31]。在胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和原肠作用研究中, *T* 基因最早被用来作为早期中胚层和内胚层分化的标志基因, 因为这两类细胞是从原条迁移分化而来的^[32]。*Lhx1* 在中胚层和内胚层形态发生运动过程中发挥很重要的作用, *Lhx1* 的缺失影响中胚层的迁移, 同时会下调 PAPC (由 *Pcdh8* 基因编码) 的表达^[33]。在非洲爪蟾的胚胎发育过程中, PAPC 通常与 Frizzled 7 受体相互作用, 激活 RhoA-JNK 通路, 可能通过非经典的 Wnt 信号通路来控制细胞的迁移运动^[34-35]。但是, 在小鼠早期胚胎发育过程中, *Lhx1* 参与中胚层的迁移运动是否通过 PAPC^[36] 或通过 Wnt 信号通路发挥作用, 到目前还不是很清楚。另外, 小鼠胚胎中缺少 *Mesp1* 的表达将会抑制中胚

层细胞的移动能力^[37]。Smad3 为着床后的早期胚胎发育阶段提供重要的信号。当 Smad3 缺失时, 会阻碍前轴中内胚层的形成。当上胚层同时缺失 Smad2 和 Smad3 时, 会严重阻碍轴旁中胚层的形成, 这说明早期胚胎发育和细胞命运决定受控于 Smad2 和 Smad3 信号量^[38]。当 ESCs 缺失转录因子 *Fubp1* 表达时, ESCs 将会延迟向中胚层分化, 并且, ESCs 向拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 分化过程中胚层标志基因 *T* 和 *Flk1* 的表达受到抑制, *T* 的靶基因 *Snai2* 和 *Foxa2* 的表达也显著降低。并且, *Fubp1* 敲除 (knock out, KO) 的 ESCs 向红系分化的能力显著减弱^[39]。总之, 转录因子是否正常表达直接影响哺乳动物中胚层的形成。

信号转导通路 (如 FGF、Wnt、BMP 和 Nodal) 上的关键基因的表达激活, 可促进原肠期中胚层的形成。当胚胎中 *Fgfr1* 发生突变, 上胚层细胞内 *Snai1* 的上调和 *Cdh1* 的下调受到抑制, 不能够进行正常的 EMT 过程, 可导致细胞不能在胚胎后端迁移分化形成原条^[40]。*Fgfr1*^{-/-} 胚胎中 *Tbx6* 和 *T* 的表达也下调了, 直接影响中胚层细胞的迁移能力^[40-41]。无论是 *Wnt3* 和 β -catenin 的突变^[42], 还是 Wnt 共受体 LRP5 和 LRP6 同时缺失^[43], 结果都无法形成中胚层。相反, 缺失 Wnt 通路上的负调控因子 *axin2*^[44] 或异常表达 *Wnt8C*^[45] 均会诱导形成异常的原条。FGFR1 与 Wnt 信号的互作可直接调控 *T* 基因的表达。*Fgfr1*^{-/-} 细胞具有高 E-cadherin 活性, 改变细胞中 E-cadherin 和 β -catenin 之间的物理关联, 会减少 β -catenin 在细胞核的停留, 最终导致 Wnt/ β -catenin 信号通路下的靶基因 *T* 的表达下调^[40-41]。胚胎缺失 BMP 受体 BMPRI1A 后不能形成中胚层, 甚至胚胎在原肠运动前就被阻断^[46-47]。在中胚层祖细胞中, *T* 与 BMP4 信号分子 SMAD1 相结合发挥作用。BMP4-SMAD1 和 *T* 的互作确保了中胚层细胞的分化, 同时, 抑制了细胞向内胚层方向分化的命运^[48]。Nodal 信号通路的完全缺失会阻碍三胚层的形成。如果逐渐降低 Nodal 信号的转导将会导致轴旁中胚层的大量缺失, 这说明原条前端的形成需要高浓度的 Nodal 信号来诱导^[49]。若同时缺失 Nodal 的拮抗因子 CER1 和 LEFTY1 会诱导形成异常的原条^[50]。小鼠早期胚胎发育过程中 *Lefty2* 发生突变, 会导致原条扩张而过度生成中胚层细胞^[51]。小鼠早期胚胎同时缺失 *Tet1*、*Tet2* 和 *Tet3* 基因的表达时, E6.5 的外胚层细胞中的 *Lefty1* 启动子区域的 DNA 甲基化水平显著性升高, 也使得 E7.25 的胚胎后端细胞中

Lefty2 的启动子区域甲基化水平显著升高, 引起 Nodal 信号放大, 进而阻碍了中胚层细胞迁移和中胚层的形成^[52]。可见, FGF、Wnt、BMP 和 Nodal 信号转导通路的正常激活是哺乳动物原肠期中胚层形成的关键。

1.2 中胚层向血系分化

在小鼠早期胚胎发育过程中, 有些中胚层细胞将会向着血系方向分化, 进而形成 HSCs, 最终生成所有类型的血细胞。因此, 寻找并研究这些特殊的中胚层细胞成为揭示早期胚胎造血过程的关键。在此, 以 *Flk1* 基因的研究进展为例, 阐明中胚层向血系分化的发育过程^[53]。

Rossant 等^[20]发现, *Flk1*⁺ 中胚层细胞起初会向卵黄囊迁移分化负责原始造血, 随后迁移到胎肝和成体中形成永久造血; *Flk1* 的表达有助于胚胎后端原条部位的中胚层细胞向卵黄囊和胚内的早期造血部位移动, *Flk1* 的缺失则会导致中胚层细胞不能准确向血岛移动和定位。*Flk1* 在中胚层细胞的表达象征胚胎造血的开始, 在小鼠的卵黄囊、胎肝和骨髓中出现的 *Flk1*⁺ 细胞是一类 HSCs 的祖细胞^[54]。

造血细胞系和内皮细胞系都是由中胚层细胞衍生分化而来, 这两类细胞由同一类成熟的祖细胞发育而来, 这类祖细胞称为成血-血管细胞 (hemangioblast)^[55]。由于缺少细胞表面标志物, 很难获取成血-血管细胞的祖细胞, 这对研究成血-血管细胞之前的发育阶段造成了很大的困难。Fehling 等^[56]利用转基因技术, 在小鼠 ESCs 中将 GFP 打靶到中胚层基因 *T* 上, 来探究中胚层细胞特异性地向成血-血管细胞分化的发育调控过程。该研究根据 GFP 和 *Flk1* 的表达情况, 将细胞分成 GFP⁻*Flk1*⁻、GFP⁺*Flk1*⁻ 和 GFP⁺*Flk1*⁺ 共 3 个亚群, 用来呈现从中胚层前体细胞到成血-血管细胞的发育过程。在 ES 向 EB 分化的前 3 天里, 不同阶段的细胞的基因表达情况是不同的; CD31⁺Kit⁺*T*⁻*Flk1*⁻ 可代表未分化的 ES 细胞; GFP⁻*Flk1*⁻ 中胚层前体细胞表达 *Nodal* 和 *Fgf5*; GFP⁺*Flk1*⁻ 成血-血管中胚层细胞除了表达 *Nodal* 和 *Fgf5* 以外, 还特异性表达 *Bmp2*、*Wnt3a* 和 *Wnt8a*; GFP⁺*Flk1*⁺ 成血-血管细胞中 *Nodal* 和 *Fgf5* 的表达下调的同时, 还特异性表达 *Bmp2*、*Bmp4*、*Runx1* 和 *Scl*^[56]。可见, GFP-T 的 ES 细胞模型提供了一种可用于评估新的因子和基因在中胚层细胞向血系分化过程中调节作用的新方法。

VE-cadherin、PECAM-1 (CD31)、Tie2、Endoglin

和 CD34 是成体内皮细胞和胚胎内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的表面分子。Ema 等^[57] 利用免疫组化实验发现, 表达这些标志基因的 EC 细胞来源于小鼠 E6.75 胚外的 Flk1⁺ 中胚层细胞的一类亚群细胞。利用流式细胞技术对表达标志基因的 ECs 进行检测, 发现 ECs 中存在一类表达 GATA1 (原始红细胞标志基因) 的细胞亚群。另外, 原始造血集落形成实验结果也表明, 原始红细胞祖细胞富集于 PECAM-1 和 Tie2 阳性细胞中。可见, 原始红细胞的生成起源于一类表达 VE-cadherin、PECAM-1、Tie2、Endoglin 和 CD34 的 Flk1⁺ 中胚层祖细胞^[57]。

Lancrin 等^[55] 发现, Flk1⁺T⁺ 中胚层祖细胞具有内皮细胞潜能和 HSCs 潜能, 该类细胞属于成血-血管细胞。在小鼠早期胚胎 E7.5 神经板阶段, Flk1⁺T⁺ 细胞在转录因子 SCL 的作用下, 生成 Tie2^{hi}c-Kit⁺CD41⁻ 生血内皮细胞, 随后在头褶期 Flk1⁺T⁺ 细胞可能会进一步迁移到血岛部位, 在 E10.5 的主动脉-性腺-中肾区 (aorta-gonad-mesonephros, AGM) 的背主动脉中也存在这类细胞。Tie2^{hi}c-Kit⁺CD41⁻ 生血内皮细胞可在转录因子 Runx1 的作用下向 CD41⁺CD45⁺ 永久造血细胞分化; 相反, 当缺失表达 *Runx1* 时, Tie2^{hi}c-Kit⁺CD41⁻ 生血内皮细胞无法向永久造血细胞分化, 而是分化成 CD41⁺CD45⁻ 原始造血细胞^[55,58]。可见, Flk1⁺T⁺ 中胚层祖细胞在关键转录因子的调控下向造血细胞分化。

1.3 转录因子与血系分化

在小鼠早期胚胎发育过程中, 有些关键的转录因子 (如 SCL、ETV2、Runx1、GATA1 和 GATA2 等) 在促进早期胚胎中胚层细胞向血系形成的过程中起到重要的作用。在此, 对部分关键的转录因子在血系分化过程中发挥的作用进行简单介绍。

Ismailoglu 等^[21] 发现, 在 ES 细胞分化过程中, 转录因子 SCL 的持续性表达可以显著提高 ES 细胞向 HSCs 分化。同时, 在早期的中胚层分化过程中, 脉冲似地表达 SCL 可以促使 PDGFR α ⁺Flk1⁻ 轴旁中胚层细胞向 Flk1⁺PDGFR α ⁻ 侧板中胚层细胞分化^[21]。SCL⁺ 的中胚层细胞通过细胞自分泌作用向 HSCs 分化, 在此过程中细胞可能通过激活 *Ihh*^[59]、BMP-4^[60-61]、Activin A^[62]、VEGF^[63] 等分泌因子的分泌, 并作用在细胞自己身上来促使其向造血分化。在红系中, SCL 可能还与 LMO2^[64]、GATA1^[65]、GATA2^[66] 等红系转录因子共同作用来维持细胞的特性。

ETV2 是另一个在血系分化过程中起重要作用的转录因子。在小鼠的胚胎发育过程中, ETV2 在

一个很短的发育窗口期进行表达, 起始表达于 E7.0, E8.5 之后其表达量开始降低, ETV2 还在 E7.75 的卵黄囊中参与生血内皮的发育^[22]。早期胚胎发育过程中如果 ETV2 发生突变, 胚胎可因缺失 HSCs 和内皮细胞而无法存活^[67]。另外, *Etv2* 的过表达可以促使小鼠胚胎诱导形成 Flk1⁺ 中胚层细胞, 在 BMP、Notch、Wnt 受到抑制的情况下 *Etv2* 的表达可以促使胚胎 Flk1⁺ 中胚层细胞的生成, 缓解抑制作用, 同时, 促使 Flk1⁺ 中胚层细胞向 HSCs 和内皮细胞方向分化。Lee 等^[63] 证明了 ETV2 作用于下游的 BMP、Notch 和 Wnt 信号, 进而调节 Flk1⁺ 中胚层细胞、血液和血管的发育。Park 等^[68] 在研究中发现, ETV2、VEGF 和 FLK1 之间的作用可以诱导调节血管的再生。在成年鼠后肢缺血损伤后, 内皮细胞中的 *Etv2* 基因被再次激活, 接着通过调节 VEGF/FLK1 信号通路来促使血管再生。2017 年, Xu 等^[69] 发现, 骨髓移植或 HSCs 损伤后, 造血干细胞祖细胞中的 *Etv2* 基因被活性氧激活, 这有利于造血干细胞祖细胞发生自分泌、迁移和再生。另外, *c-Kit* 的表达可以缓解因 *Etv2* 缺失表达而导致的体外造血细胞祖细胞的增殖缺陷和体内短效的骨髓移植等症状, 因此, 造血干细胞祖细胞的再生能力可能和 ETV2 在细胞中激活下游基因 *c-Kit* 的信号通路有关。

Runx1 是另一个与血系分化相关的转录因子。在胚胎发育过程中, Runx1 参与在卵黄囊内由生血内皮细胞生成红系 / 髓系祖细胞 (erythroid/myeloid progenitors, EMPs) 和 HSCs 的过程。*Runx1* 的缺失会减少卵黄囊内的 EMP 的形成, 但不影响胎肝中的 EMP 的数量。另外, 在生血内皮生成 EMP 的过程中, 需要持续性地表达 *Runx1*。Tober 等^[70] 在 Tanaka 等^[71] 的研究结果基础上, 进一步发现了在小鼠胚胎从 E7.5 发育到 E10.5 的 3 d 内, EMP 的生成依赖于 *Runx1* 的表达。*Runx1* 的缺失不影响中胚层细胞向 I 型造血干细胞前体细胞 (pre-HSCs type I) VE-cad⁺CD45⁻CD41⁺ 细胞的形成, 但却阻碍 II 型造血干细胞前体细胞 CD45⁺ 细胞之后的发育^[72]。在 HSCs 和造血祖细胞形成过程中, 发现转录因子 Runx1 与 GATA2、SCL、ERG 之间发生直接的蛋白质互作。在造血作用刚刚开始阶段, 在生血内皮细胞中发现有 *Runx1* 的表达, 并且 Runx1 可以迅速地与 SCL/TAL1、FLI1 结合, 进而促使细胞进入造血的命运^[73]。因此, 造血系统的发育过程受到 Runx1 的精细调控。

目前,在胚胎造血过程研究中已发现起关键作用的转录因子十分有限,胚内中胚层细胞是通过怎样的分子调控机制逐步地形成造血细胞,仍值得进行深入的研究。

2 单细胞RNA-seq技术在小鼠中胚层和胚胎造血方面的研究应用

RNA-seq 技术问世之前, Mitiku 和 Baker^[74] 利用基因芯片技术对 E3.5 到 E7.5 的整个小鼠胚胎进行了转录组的检测和评价。然而,小鼠早期胚胎从 E3.5 到 E7.5 的发育过程是一个细胞大量增殖、分化,胚胎形态结构发生剧变的连续性事件。在此发育期间的细胞之间存在极显著的差异,那么整体评价胚胎的转录组信息不能反映中胚层细胞的转录特征。为了还原细胞的真实转录组信息,需要解决两个方面的问题,一方面需要捕获到单个细胞,另一方面要对单个细胞的转录本进行检测。捕获单个细胞有多种方法,如口吸管法、显微操作法、荧光激活细胞分选法(FACS)、激光显微捕获切割法(LCM)、微流控法等^[75]。单个哺乳动物细胞总 RNA 含量为 10~30 pg,其中, mRNA 占 1%~5%^[76],直接检测这么低含量的 mRNA 是不可能的。为了解决该问题,汤富酬研究员于 2009 年结合单细胞 mRNA 扩增技术和 RNA-seq 测序平台建立起第一个单细胞 RNA-seq 技术(scRNA-seq)^[77]。随后,科学家们又相继开发出 STRT-Seq、SMART-Seq、CEL-Seq、Quartz-Seq、DP-Seq、SMART-Seq2、STRT-Seq UMI、MARS-Seq、CEL-Seq UMI、SCRB-Seq、Cyto-Seq、SC3-Seq、Drop-Seq 等单细胞 RNA-seq 技术^[78]。这项技术的不断发展将科学家们的眼光聚焦到胚胎发育、器官发生、HSCs 起源分化、循环肿瘤细胞等方面的研究上。

2.1 单细胞RNA-seq技术在早期胚胎中胚层研究中的应用

2016 年, Göttingen 课题组^[79] 利用单细胞 RNA-seq 技术获得并分析了 1 205 个来源于小鼠 E6.5、E7.0、E7.5、E7.75 的早期外胚层细胞、Flk1⁺ 细胞、Flk1⁺CD41⁺ 细胞以及 CD41⁺ 细胞的转录组信息。根据关键标志基因表达的不同,他们将 1 205 个细胞分为脏壁内胚层、胚外外胚层、外胚层、早期中胚层祖细胞、后端中胚层、内皮细胞、血液祖细胞、原始红细胞、尿囊中胚层、咽中胚层等 10 组。转录组数据经降维处理和分析发现, Flk1⁺ 中胚层细胞与由后端原条发育而来的尿囊、血液、内皮细胞

之间有关联。GO 分析显示,假定的前端的基因与体节发育、内胚层发育、NoctH 信号通路有关联,具有前端中胚层的特性。相反,假定的后端中胚层基因簇与 BMP 信号通路、下肢的发育、内皮细胞的分化等有关联,这些特性与后端原条的细胞特性一致。另外,与正常的胚胎比较, *Tall1*^{-/-} 胚胎中没有发现表达血液祖细胞和原始红细胞的基因表达簇的细胞,这与 *Tall1*^{-/-} 胚胎不能形成原始的红细胞的表型一致,说明 *Tall1* 是小鼠早期胚胎发育过程中一个重要的调控因子。该课题组从单细胞水平上对关键调控因子重新评价,有助于更深入精细地认识小鼠胚胎发育过程中细胞命运方向和分子水平的变化之间的关系。

2017 年,金颖课题组^[80] 在小鼠早期胚胎发育中的细胞谱系分离研究方面有了新的进展。该课题组从 E5.5、早期 E6.5 和晚期 E6.5 的小鼠早期胚胎中分离得到约 600 个单细胞,随后利用单细胞 RNA-seq 技术和高通量 qPCR 技术对这些单细胞进行了检测,获得了早期外胚层、脏壁内胚层和胚外外胚层的转录组信息,在生物信息学的分析过程中引入 65 个细胞谱系分化的特异性标记基因和 90 个胚层特异性标记基因,并且与 Göttingen 课题组^[79] 的 E6.5~E7.75 早期胚胎单细胞转录组数据进行比对分析。从分析结果中发现, *Oct4*⁺ 早期的外胚层细胞中存在早期的中胚层前体细胞、晚期的中胚层前体细胞和其他类型的早期外胚层细胞;根据胚胎的发育时期不同,发现早期的中胚层前体细胞存在于 E5.5 的早期胚胎中,这类细胞进入到 E6.5 早期发育阶段时分化为晚期的中胚层前体细胞,到了 E6.5 晚期发育阶段这类细胞分化为中胚层前体细胞,随后在原条部位出现中胚层细胞,胚外部分开始出现胚外中胚层细胞。经主成分分析(principal component analysis, PCA)和扩散映射(diffusion map)降维分析发现,中胚层前体细胞是来源于 *Oct4*⁺*Gata6*⁺*Hand1*⁻ 的早期外胚层细胞,在 E6.5 晚期的原条部位存在一类 *Oct4*⁺*Gata6*⁺ 细胞,它们将来会迁移分化成为中胚层细胞和终末内胚层细胞^[80]。这项研究一方面提升了对小鼠早期胚胎细胞向中胚层和内胚层迁移分化过程的理解,另一方面也为在单细胞水平上研究小鼠早期胚胎发育细胞命运决定提供了一个很好的范例。

2019 年, Göttingen 课题组^[81] 利用商业化的单细胞 RNA-seq 技术(10 × genomics)从 E6.5 至 E8.5 中 9 个连续的时间点的小鼠胚胎中获取到 116 312

个单细胞的转录组信息, 连续检测整个原肠胚形成过程中各个细胞的基因表达信息。采用生信计算分析手段, 研究人员通过聚类和细胞注释鉴定出 37 个主要的细胞群, 还构建了多能细胞向多谱系分化过程中的分子图谱。通过对细胞转录组数据的分析, 研究人员发现随着胚胎的发育, 多能的原始上胚层细胞数量逐渐减少, 在 E6.75 开始出现中胚层和定向内胚层谱系细胞。从 E7.5 开始, 外胚层的谱系细胞出现, 同时, 伴随着从每个胚层中出现多样的细胞类型, 这象征着器官发生的开始。通过比较三胚层的细胞群之间转录组的相似性发现, 原始上胚层与神经外胚层、原条相近, 原条与中胚层、内胚层相近, 这个结果与前人的研究结论相一致。在 E8.25 至 E8.5 的器官发生时期, 从神经中胚层祖细胞群衍生而来的神经和中胚层彼此相连, 进而分化成躯干中胚层和脊髓神经组织^[82-83]。哺乳动物原肠运动时期, 胚胎形态和细胞数量发生剧烈变化, 细胞之间异质性很大, 以前的研究结果无法解释胚层谱系分化的问题。Göttgens 课题组^[80]发表的这项最新的研究成果, 有助于从单细胞水平的层面上认识中胚层细胞衍变的全过程。

可见, 单细胞 RNA-seq 技术的发展推动了国内外科学家对于哺乳动物胚胎着床后多能干细胞向中胚层分化机制的深入研究, 有助于从单细胞的水平认识哺乳动物胚胎中胚层的发育轨迹。

2.2 单细胞RNA-seq技术在胚胎造血研究中的应用

虽然小鼠早期胚胎的生血内皮细胞和造血干细胞前体细胞 (pre-HSCs) 将来衍生为 HSCs, 但这个过程发生的分子机理依然不清楚。随着近年来专注于潜在的 HSCs 细胞群的分子表达谱研究的增多, 从细胞表达谱所呈现出来的信息可以为 HSC 发生的分子机理研究提供新的突破口。刘兵课题组^[84]利用新的细胞表面标志物的组合捕捉到了未成熟的 pre-HSCs, 随后利用单细胞 RNA-seq 技术检测主动脉-性腺-中肾区 (AGM 区) 的内皮细胞、CD45⁻ pre-HSCs、CD45⁺ pre-HSCs 以及胎肝中的 HSCs 的转录组, 并利用生物信息学方法对转录组进行分析, 发现与 HSCs 发生相关的细胞之间存在非常显著的异质性, 与血系分化相关的转录因子在这些细胞中的表达模式也各不相同。另外, 该课题组还发现, 在小鼠胚胎发育过程中 mTOR (mechanistic targets of rapamycin) 复合体 2 信号通路的激活对于 HSCs 的生成是必不可少的; 相反, 在 HSCs 的祖细胞中 mTOR 信号通路并未激活。此研究首次在单细胞、

单碱基水平上综合性地对小鼠胚胎发育过程中生成的 pre-HSCs 和 HSCs 的转录组进行了探究, 为 HSCs 发生的分子机理研究提供了数据支持。

小鼠胚胎发育过程中, 在卵黄囊部位发生两个连续的造血波形成红系细胞。第一次造血波发生在 E7.5, 第二次造血波发生在 E8.25^[85]。第一次造血波 (原始造血) 产生有核的原始红细胞, 在 E12.5~16.5 细胞核逐渐消失^[86-87]。第二次造血波 (定向造血) 从卵黄囊的生血内皮生成 EMPs, 随后迁移至胎肝产生定向红系细胞^[85]。尽管对原始造血和定向造血在一些关键的表型和分子水平上的差异有了一定的了解, 但对于它们各自祖细胞的认识还不是很清楚。Göttgens 课题组^[81]从 E6.5~E8.5 小鼠胚胎的 116 312 个单细胞转录组数据中提取与胚胎造血相关的数据并进行聚类分析, 其中有 15 875 个细胞与胚胎造血有关, 他们将这些细胞分成了红系细胞、生血内皮细胞、血细胞祖细胞、内皮细胞和中胚层等 5 个不同的细胞群, 绘制了初级红系细胞发生的轨迹图。中胚层细胞分化形成造血内皮祖细胞 (造血内皮祖细胞 1 和造血内皮祖细胞 2), 造血内皮祖细胞向下分化为造血祖细胞 (造血祖细胞 1 和造血祖细胞 2) 和血管内皮细胞, 造血祖细胞再向下分化形成原始红系细胞 (红系细胞 1~4)。分析结果显示, 第一波原始造血过程不经过高表达 *Cdh5* 和 *Pecam1* 的成熟的内皮细胞状态^[81]。有些内皮细胞表达造血标志基因 *Spil* 和 *Itga2b*, 这些内皮细胞可能参与第二波造血过程, 在这个过程中 HSCs 和 EMPs 从不同类型的内皮细胞分化而来^[81,88-89]。上述研究从单细胞水平揭示了胚胎原始造血和定向造血祖细胞的区别。

3 展望

哺乳动物的原肠运动产生三胚层是一个剧烈变化的生物学过程, 中胚层的形成和中胚层向血系分化过程有一些关键的转录因子或信号转导通路发挥重要的作用。如果早期胚胎在原肠运动过程中出现中胚层细胞的缺失或发育异常, 将会导致多种中胚层组织或器官的疾病, 如血液性疾病、肌肉萎缩、肌营养不良及骨质疏松等。所以, 针对中胚层细胞的特性和中胚层细胞向组织器官分化的分子机理的研究, 对于发育生物学领域和转化医学领域都具有非常重要的意义。

以前, 科学家们利用体外胚胎干细胞分化系统和转基因小鼠模型, 发现了中胚层发生和中胚层向

血系分化过程中发挥关键作用的一些基因和信号通路。但是,事实上,人们对中胚层细胞在生物体内的细胞特性和向不同组织器官分化的分子机制还知之甚少。其主要原因有4点,一是中胚层细胞在早期胚胎中存在的数量少,位置特殊,没有公认的表面标志物,很难分离得到中胚层细胞;二是胚胎发育早期中胚层细胞增殖、迁移和分化的速度快,在发育的短时间内就已决定了细胞命运,难以捕捉中胚层早期细胞;三是中胚层细胞之间具有显著的异质性,不同位置上的中胚层细胞可能具有不同的分子特性和功能特征;四是中胚层细胞具有多种类型,在体外条件下还没有建立出可以维持特定类型中胚层细胞干性的培养体系。基于以上的因素,目前我们对于中胚层细胞的认知仍然不足,对于中胚层细胞仍然缺乏系统性的研究。为了能够对中胚层有更加深入的研究,首先要解决的是如何捕获到具有特征类型的中胚层细胞,然后才能对其进行分子水平、细胞水平和功能水平上的研究。

近年来,单细胞 RNA-seq 技术迅猛发展,可以满足科学家对于大量的单细胞进行高通量的研究需求。这个技术很快被应用于脊椎动物(如人、小鼠、斑马鱼和非洲爪蛙等)早期胚胎发育的研究中,并且在在中胚层的研究方面也取得了一定的成果,其中就包含了对脊椎动物不同发育阶段不同类型的中胚层细胞和血系细胞的转录组数据的捕获。这些数据有助于分析和解读中胚层发生和血系谱系分化的发生机制。

随着生物技术的迅猛发展,在不久的将来,希望将中胚层细胞的研究成果早日应用于临床疾病,如血液性疾病、肌肉萎缩、肌营养不良及骨质疏松等中胚层相关疾病的治疗上。

[参 考 文 献]

- [1] Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 1991, 113: 891-911
- [2] Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev*, 1997, 68: 3-25
- [3] Yamamoto A, Kemp C, Bachiller D, et al. Mouse paraxial protocadherin is expressed in trunk mesoderm and is not essential for mouse development. *Genesis*, 2000, 27: 49-57
- [4] Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, et al. The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development*, 1999, 126: 4691-701
- [5] Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 2012, 139: 3471-86
- [6] Tam PP, Loebel DA, Tanaka SS. Building the mouse gastrula: signals, asymmetry and lineages. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16: 419-25
- [7] Robb L, Tam PP. Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15: 543-54
- [8] Tam PP, Loebel DA. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 368-81
- [9] Gouti M, Delile J, Stamataki D, et al. A gene regulatory network balances neural and mesoderm specification during vertebrate trunk development. *Dev Cell*, 2017, 41: 243-61. e7
- [10] Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, 2003, 120: 1351-83
- [11] Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT: 2016. *Cell*, 2016, 166: 21-45
- [12] Williams M, Burdsal C, Periasamy A, et al. Mouse primitive streak forms *in situ* by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev Dyn*, 2012, 241: 270-83
- [13] Voiculescu O, Bodenstern L, Lau IJ, et al. Local cell interactions and self-amplifying individual cell ingressions drive amniote gastrulation. *Elife*, 2014, 3: e01817
- [14] 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
- [15] Acloque H, Ocana OH, Matheu A, et al. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell*, 2011, 21: 546-58
- [16] Ramkumar N, Omelchenko T, Silva-Gagliardi NF, et al. Crumbs2 promotes cell ingressions during the epithelial-to-mesenchymal transition at gastrulation. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 1281-91
- [17] Zohn IE, Li Y, Skolnik EY, et al. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell*, 2006, 125: 957-69
- [18] Lee JD, Silva-Gagliardi NF, Tepass U, et al. The FERM protein Epb4.115 is required for organization of the neural plate and for the epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak of the mouse embryo. *Development*, 2007, 134: 2007-16
- [19] Hirano M, Hashimoto S, Yonemura S, et al. EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2008, 182: 1217-30
- [20] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376: 62-6
- [21] Ismailoglu I, Yeaman G, Daley GQ, et al. Mesodermal patterning activity of SCL. *Exp Hematol*, 2008, 36: 1593-603
- [22] Koyano-Nakagawa N, Kweon J, Iacovino M, et al. ETV2 is

- expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates *Lmo2* gene expression. *Stem Cells*, 2012, 30: 1611-23
- [23] Yzaguirre AD, de Bruijn MF, Speck NA. The role of Runx1 in embryonic blood cell formation. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 962: 47-64
- [24] Fujimoto T, Ogawa M, Minegishi N, et al. Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation. *Genes Cells*, 2001, 6: 1113-27
- [25] Kang H, Mesquita WT, Jung HS, et al. GATA2 is dispensable for specification of hemogenic endothelium but promotes endothelial-to-hematopoietic transition. *Stem Cell Rep*, 2018, 11: 197-211
- [26] Wang Y, Nakayama N. WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells. *Stem Cell Res*, 2009, 3: 113-25
- [27] Gama-Norton L, Ferrando E, Ruiz-Herguido C, et al. Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nat Commun*, 2015, 6: 8510
- [28] Papaioannou VE. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*, 2014, 141: 3819-33
- [29] Showell C, Binder O, Conlon FL. T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn*, 2004, 229: 201-18
- [30] Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, et al. Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature*, 1990, 343: 617-22
- [31] Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature*, 1990, 343: 657-9
- [32] Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008, 132: 661-80
- [33] Hukriede NA, Tsang TE, Habas R, et al. Conserved requirement of *Lim1* function for cell movements during gastrulation. *Dev Cell*, 2003, 4: 83-94
- [34] Medina A, Swain RK, Kuerner KM, et al. *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *EMBO J*, 2004, 23: 3249-58
- [35] Unterseher F, Hefele JA, Giehl K, et al. Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J*, 2004, 23: 3259-69
- [36] Kim SH, Yamamoto A, Bouwmeester T, et al. The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development*, 1998, 125: 4681-90
- [37] Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, et al. *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, 1999, 126: 3437-47
- [38] Dunn NR, Vincent SD, Oxburgh L, et al. Combinatorial activities of *Smad2* and *Smad3* regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo. *Development*, 2004, 131: 1717-28
- [39] Wesely J, Steiner M, Schnutgen F, et al. Delayed mesoderm and erythroid differentiation of murine embryonic stem cells in the absence of the transcriptional regulator FUBP1. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5762301
- [40] Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*, 2001, 1: 37-49
- [41] Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, et al. *T* (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*, 1999, 13: 3185-90
- [42] Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, et al. β -Catenin regulates *Cripto*- and *Wnt3*-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development*, 2003, 130: 6283-94
- [43] Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. The Wnt co-receptors *Lrp5* and *Lrp6* are essential for gastrulation in mice. *Development*, 2004, 131: 2803-15
- [44] Jho EH, Zhang T, Domon C, et al. Wnt/ β -catenin/*Tcf* signaling induces the transcription of *Axin2*, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 1172-83
- [45] Popperl H, Schmidt C, Wilson V, et al. Misexpression of *Cwnt8C* in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development*, 1997, 124: 2997-3005
- [46] Miura S, Davis S, Klingensmith J, et al. BMP signaling in the epiblast is required for proper recruitment of the prospective paraxial mesoderm and development of the somites. *Development*, 2006, 133: 3767-75
- [47] Xiao C, Shim JH, Kluppel M, et al. *Ecsit* is required for *Bmp* signaling and mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, 2003, 17: 2933-49
- [48] Faial T, Bernardo AS, Mendjan S, et al. Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. *Development*, 2015, 142: 2121-35
- [49] Vincent SD, Dunn NR, Hayashi S, et al. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev*, 2003, 17: 1646-62
- [50] Perea-Gomez A, Vella FD, Shawlot W, et al. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell*, 2002, 3: 745-56
- [51] Meno C, Gritsman K, Ohishi S, et al. Mouse *Lefty2* and zebrafish *antivin* are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell*, 1999, 4: 287-98
- [52] Dai HQ, Wang BA, Yang L, et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating *Lefty*-Nodal signalling. *Nature*, 2016, 538: 528-32
- [53] Era T, Izumi N, Hayashi M, et al. Multiple mesoderm subsets give rise to endothelial cells, whereas hematopoietic cells are differentiated only from a restricted subset in embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, 2008, 26: 401-11
- [54] Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, et al. *Flk-1* expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*, 1997, 124: 2039-48

- [55] Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*, 2009, 457: 892-5
- [56] Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, et al. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development*, 2003, 130: 4217-27
- [57] Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, et al. Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood*, 2006, 108: 4018-24
- [58] Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 1996, 84: 321-30
- [59] Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, et al. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, 2001, 128: 1717-30
- [60] Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 141-51
- [61] Park C, Afrikanova I, Chung YS, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development*, 2004, 131: 2749-62
- [62] Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, et al. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*, 2008, 135: 1525-35
- [63] Lee D, Park C, Lee H, et al. ER71 acts downstream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 497-507
- [64] Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, et al. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 8617-21
- [65] Wadman IA, Osada H, Grutz GG, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J*, 1997, 16: 3145-57
- [66] Anguita E, Hughes J, Heyworth C, et al. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J*, 2004, 23: 2841-52
- [67] Rasmussen TL, Kweon J, Diekmann MA, et al. ER71 directs mesodermal fate decisions during embryogenesis. *Development*, 2011, 138: 4801-12
- [68] Park C, Lee TJ, Bhang SH, et al. Injury-mediated vascular regeneration requires endothelial ER71/ETV2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36: 86-96
- [69] Xu CX, Lee TJ, Sakurai N, et al. ETV2/ER71 regulates hematopoietic regeneration by promoting hematopoietic stem cell proliferation. *J Exp Med*, 2017, 214: 1643-53
- [70] Tober J, Yzaguirre AD, Piwarzyk E, et al. Distinct temporal requirements for Runx1 in hematopoietic progenitors and stem cells. *Development*, 2013, 140: 3765-76
- [71] Tanaka Y, Hayashi M, Kubota Y, et al. Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 4515-20
- [72] Liakhovitskaia A, Rybtsov S, Smith T, et al. Runx1 is required for progression of CD41⁺ embryonic precursors into HSCs but not prior to this. *Development*, 2014, 141: 3319-23
- [73] Lichtinger M, Ingram R, Hannah R, et al. RUNX1 reshapes the epigenetic landscape at the onset of haematopoiesis. *EMBO J*, 2012, 31: 4318-33
- [74] Mitiku N, Baker JC. Genomic analysis of gastrulation and organogenesis in the mouse. *Dev Cell*, 2007, 13: 897-907
- [75] Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for single-cell collection and analysis. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 807
- [76] Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al. Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2: 739-52
- [77] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6: 377-82
- [78] Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*, 2015, 58: 610-20
- [79] Scialdone A, Tanaka Y, Jawaid W, et al. Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling. *Nature*, 2016, 535: 289-93
- [80] Wen J, Zeng Y, Fang Z, et al. Single-cell analysis reveals lineage segregation in early post-implantation mouse embryos. *J Biol Chem*, 2017, 292: 9840-54
- [81] Pijuan-Sala B, Griffiths JA, Guibentif C, et al. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. *Nature*, 2019, 566: 490-5
- [82] Koch F, Scholze M, Wittler L, et al. Antagonistic activities of *Sox2* and *Brachyury* control the fate choice of neuro-mesodermal progenitors. *Dev Cell*, 2017, 42: 514-26.e7
- [83] Tzouanacou E, Wegener A, Wymeersch FJ, et al. Redefining the progression of lineage segregations during mammalian embryogenesis by clonal analysis. *Dev Cell*, 2009, 17: 365-76
- [84] Zhou F, Li XL, Wang WL, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature*, 2016, 533: 487-92
- [85] Palis J. Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo. *FEBS Lett*, 2016, 590: 3965-74
- [86] Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, et al. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood*, 2004, 104: 19-25
- [87] Fraser ST, Isern J, Baron MH. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression.

- Blood, 2007, 109: 343-52
- [88] McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, et al. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep*, 2015, 11: 1892-904
- [89] Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, et al. Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 541-52