

网络出版时间:2012-07-18 11:16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1116.030.html>

SMAD2 介导的 Activin A 信号对人胚胎干细胞向限定性内胚层细胞诱导分化的促进作用

孙 懿^{1,2,3}, 周 静¹, 卢光琇^{1,2,3}, 林 戈^{1,2,3}

(1 中南大学 生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078; 2 人类干细胞国家工程研究中心, 湖南 长沙 410078;

3 卫生部人类干细胞与生殖工程重点实验室, 湖南 长沙 410078)

【摘要】 **【目的】**研究 SMAD2 在 Activin A 促进人胚胎干细胞向限定性内胚层诱导分化中的作用。**【方法】**在人胚胎干细胞中转染 SMAD2 基因 siRNA 或者过表达质粒后,收集经 Activin A 分别诱导 0,6,12,24,48,72,96 和 120 h 的细胞各 100 ng/mL,采用实时定量 PCR 检测 SMAD2 与内中胚层共同前体标记 *Brachyury* 和内胚层标记 *Sox17* 的表达,进一步通过 Western-blot 分析 Activin A 诱导中 SMAD2 和磷酸化 SMAD2(p-SMAD2)表达的变化。**【结果】**在 Activin A 诱导人胚胎干细胞向限定性内胚层细胞分化的过程中,干扰 SMAD2 后 48 h 时才检测到 *Brachyury* 强表达,而单纯 Activin A 处理组 24 h 就检测到强表达;*Sox17* 的表达始终较单纯 Activin A 处理组明显降低,因此,干扰 SMAD2 直接抑制了 Activin A 的诱导作用。而过表达 SMAD2,*Brachyury* 和 *Sox17* 的表达水平较单纯 Activin A 处理组明显增加,促进了限定性内胚层的发生;并且在 Activin A 诱导过程中,p-SMAD2 的表达水平明显提高,而 SMAD2 的表达没有明显改变。**【结论】**SMAD2 作为关键因子,介导了 Activin A 诱导人胚胎干细胞向限定性内胚层的分化,并转录调控 *Brachyury* 和 *Sox17* 的表达;SMAD2 的磷酸化,激活并介导了 Activin A 诱导的信号转导通路。

【关键词】 胚胎干细胞;限定性内胚层;Activin A;SMAD2;人

【中图分类号】 Q291;Q813. 1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)08-0028-06

SMAD2 mediates Activin signaling in promoting definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells

SUN Yi^{1,2,3}, ZHOU Jing¹, LU Guang-xiu^{1,2,3}, LIN Ge^{1,2,3}

(1 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hu'nan 410078, China;

2 National Research and Engineering Center of Human Stem Cells, Changsha, Hu'nan 410078, China;

3 Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Engineering of Chinese Ministry of Health, Changsha, Hu'nan 410078, China)

Abstract: **【Objective】** The study was conducted to confirm the affection of SMAD2 by which Activin A promoted the definitive endoderm (DE) differentiation from human embryonic stem cells (hESCs). **【Method】** hESCs were transfected with SMAD2 siRNA or expression plasmids, and were detected with the mesoendoderm precursor related gene *Brachyury* and endodermal gene *Sox17* expression changes by real-time quantitative PCR on 0,6,12,24,48,72,96 and 120 h respectively, with the treatment of 100 ng/mL Activin A. Furthermore, Western-blot analysis was carried out to detect the SMAD2 and p-SMAD2 expression levels. **【Result】** In the process of Activin A induction in DE differentiation of hESCs, *Brachyury* ex-

* [收稿日期] 2012-03-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81101510);湖南省自然科学基金青年基金项目(09JJ4009);高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金项目(200805331133);国家“863”计划项目(2006AA02A102);中央高校基本科研业务费青年教师助推基金项目(201012200219)

[作者简介] 孙 懿(1979—),女,湖南邵阳人,助理研究员,主要从事干细胞与再生医学研究。

[通信作者] 林 戈(1974—),男,广东潮州人,副研究员,硕士生导师,主要从事干细胞与再生医学及生殖与不孕研究。

E-mail: linggf36@yahoo.com.cn

pression was significantly increased after 24 h in Activin A simply treated group, while it was significantly increased after 48 h with SMAD2 interference. SMAD2 RNAi inhibited the process of Activin A induction in DE differentiation. Compared with the *Brachyury* and *Sox17* expressions in Activin A treated group, SMAD2 overexpression promoted the *Brachyury* and *Sox17* genes expressions in the process of Activin A induction in DE differentiation of hESCs. With Activin A induction, the p-SMAD2 expression levels were also upregulated. 【Conclusion】 These data indicate that SMAD2 is a key regulator of Activin A induction in DE differentiation of hESCs, which regulates developmental events through SMAD2 transcriptional modulators and promotes *Brachyury* and *Sox17* expression. In the process of Activin A induction, p-SMAD2 expression was upregulated to promote the transcription of target genes of Activin A induction.

Key words: embryonic stem cell; definitive endoderm; Activin A; SMAD2; human

诱导人类胚胎干细胞(hESCs)向胰腺 β 细胞的定向分化,将为 I 型糖尿病的细胞治疗提供充足的细胞来源,而将 hESCs 诱导成为限定性内胚层(Definitive endoderm, DE)细胞,是诱导分化这些功能细胞的重要前提。转化生长因子 β 家族(Transforming growth factor beta superfamily, TGF beta superfamily)包含一类结构与功能相关的多肽生长因子亚家族,如 TGF- β 、激活素 A(Activin A)、骨形态发生蛋白(BMP)、生长分化因子(GDF)等,其在胚胎发育、胞外基质形成、骨形成和重建等方面发挥着重要作用^[1]。SMAD2 是 TGF- β 信号转导途径的下游信号蛋白,通过直接与 DNA 结合作为转录因子,或与其他转录因子及活化因子相互作用诱导对 TGF- β 信号转录的应答,从而在信号由细胞膜到细胞核的传递过程中发挥关键作用^[1]。Activin A 是 TGF- β 中的一员,许多研究表明,Activin A 可特异性诱导 hESCs 向 DE 分化^[2-4]。而模式动物和体外 DE 诱导的研究表明,SMAD2 是原条形成及内胚层特化的中介因子,对于 Activin A 信号诱导 DE 的发育至关重要^[4-6]。Payne 等^[7]和 Watabe 等^[8]指出, WNT 和 Activin A/Nodal 对 hESCs 维持不分化和向内胚层分化都是必需的。2010 年,Chng 等^[9]发现,在 hESCs 中,Activin 信号协同 Nanog、Oct4 和 Sox2 调控 SMAD 相互作用蛋白(SIP1),从而抑制其对神经外胚层的促分化作用,而 SIP1 对 Activin 诱导的中内胚层分化具有抑制作用,Activin 信号通过 SIP1 蛋白调控细胞向神经外胚层或者中内胚层分化。但截止目前,很少有在 hESCs 中,针对 SMAD2 表达水平的改变及 Activin A 诱导不同时间对 DE 诱导分化的促进作用及信号通路分子的详细监测报道。为此,本研究探讨在 Activin A 信号诱导 hESCs 向 DE 分化的过程中,SMAD2 的表达对内中胚层共同前体标记 *Brachyury* 和内胚层标

记 *Sox17*^[1]表达的影响,从多方面揭示 SMAD2 在 Activin A 信号诱导 hESCs 向 DE 分化过程中的重要作用,为进一步探索 Activin A 信号诱导 hESCs 向 DE 分化中的具体作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 细 胞 试验用人胚胎干细胞细胞系 chHES-8,由中南大学生殖与干细胞研究所在人源性饲养层(HEF)上建立^[10],核型正常,取建系后传代 20~50 代的用于试验。

1.1.2 试剂及仪器 DMEM、F12、替代血清、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、成纤维细胞生长因子 2(Fibroblast growth factor 2, FGF2)、胎牛血清、RPMI1640、D-PBS,均为 Gibco 公司产品; Matrigel, BD 公司产品; mTeSR[®] 1, STEMCELL[™] 公司产品; 引物、TRIzol[®] plus RNA 纯化系统, Invitrogen 公司产品; 逆转录试剂盒, Promega 公司产品; iQTM SYBR[®] Green Supermix, BIO-RAD 公司产品; Activin A, Sigma 公司产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗, Santa cruz 产品; 鼠抗人 SMAD2, CST 公司产品; 带 FLAG 标签的 SMAD2 表达质粒 LPCX SMAD2 与 SMAD2 干扰质粒 pRetroSuper-GFP SMAD2, 来自 Addgene; 荧光显微镜, 为日本 Nikon 公司产品。

1.2 人胚胎干细胞培养

将 hESCs 按常规方法培养在丝裂霉素处理的人成纤维细胞(HEF)制备的饲养层上,培养基为添加了体积分数 15% 替代血清、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、质量分数 1% 非必需氨基酸以及 4 ng/mL bFGF 的 DMEM/F12。取出制备好的人饲养层细胞, D-PBS 洗涤 1 次, 更换人胚胎干细胞培养基。用机械切割的方法将人胚胎干细

胞于体视镜下切割成小块,按适当比例传到新制备的饲养层细胞上,每隔 6 d 传代 1 次。

1.3 细胞转染与限定性内胚层的诱导与检测

将 hESCs 传代至用 Matrigel 预铺皿的 6 孔培养板上,用 mTeSR® 1 培养基培养 2 d 后,转染 SMAD2 过表达质粒 LPCX SMAD2、SMAD2 干扰质粒 pRetroSuper-GFP SMAD2;转染 24 h 后用 100 ng/mL Activin A 诱导 120 h。分对照组、Activin A 组、SMAD2 干扰后 Activin A 处理组 (siSMAD2+Activin A)、SMAD2 过表达后 Activin A 处理组 (Flag-SMAD2+Activin A) 4 组进行试验。其中添加 Activin A 的 3 个处理组采用的方法是: hESCs 细胞经 D-PBS 洗 2 遍后,换入诱导培养基 (RPMI1640,添加 100 ng/mL Activin A 和体积分数 1% L-谷氨酰胺),24 h 后换入含有体积分数 0.2% FBS 的诱导培养基培养 24 h,再换用含有体积分数 2% FBS 的诱导培养基持续培养至第 5 天,每天换液并观察细胞的生长状况^[2];对照组为在 Activin A 组基础上去掉 Activin A 成分的阴性对照组。收集处理 0,6,12,24,48,72,96 和 120 h 的细胞,抽提 RNA;实时荧光定量 RT-PCR 检测 SMAD2 基因、限定性内胚层标志基因 *Sox17*、原条/内中胚层共同前体标志基因 *Brachyury* 的表达。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR

按 TRIzol® plus RNA 纯化系统说明书提取总 RNA,取 2 μ g 总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA。荧光定量 PCR 引物 SMAD2 的上游引物序列为 5'-AACAGGACGATTAGATGAGC-3',下游引物序列为 5'-GACCTGGTTTGTTCAGAGAAGC-3'^[11]; *Brachyury*、*Sox17* 和 28S 引物序列参考周静等^[12]的方法设计。实时定量 RT-PCR 反应体系^[13]包括 2 μ L cDNA、2 μ L 的 SYBR Green 1 混合染料、0.5 μ L 的 10 μ mol/L PCR 上游引物、0.5 μ L 的 10 μ mol/L PCR 下游引物和 14 μ L 去离子水。荧光 PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40~50 个循环;60~95 $^{\circ}$ C 绘制溶解曲线。试验结果自动以 CT 值给出,相对表达量的计算按照 Livak 等^[14]的方法进行。试验至少重复 3 次。

1.5 Western-blot 检测

将在 HEF 饲养层培养体系下传代 5~6 d 完全未分化的 hESCs,分 Activin A 组和对照组进行试验。其中 Activin A 组诱导方法同前^[2],对照组为在 Activin A 组的基础上去掉 Activin A 成分的阴性对照组。Activin A 组和对照组均于分化 0,6,

12,24,48,72,96 和 120 h 收取细胞,PBS 充分清洗后加入预冷的细胞裂解缓冲液(含 50 mmol/L Tris (pH7.4),100 mmol/L NaCl,1 mmol/L MgCl₂,2.5 mmol/L Na₃VO₄,1 mmol/L PMSF,2.5 mmol/L EDTA,体积分数 0.5% Triton X-100,体积分数 0.5% NP-40,5 mg/L aprotinin,pepstatin A 和 leupeptin 1),冰上裂解 40 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 15 min,取上清液即为细胞总蛋白。用 Bradford 方法测定蛋白质浓度后,将上清液(总蛋白)500 μ g 用体积分数 10% SDS-PAGE 进行分离,蛋白质转移至 PVDF 膜上,印迹膜用质量分数 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,对 1:1 000 稀释的 SMAD2、p-SMAD2、GAPDH 一抗于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。对 1:2 000 稀释的羊抗鼠二抗室温温育 1 h,PBS 洗涤 3 次,用 ECL 试剂发光及显影。

1.6 统计学分析

数据以“ $\bar{x} \pm SD$ ”表示,使用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学分析,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示有显著差异,证明有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 干扰或者过表达 SMAD2 对 Activin A 诱导 hESCs 向 DE 分化的影响

在无饲养层体系下,用 hESCs 分别转染带 FLAG 标签的 SMAD2 表达质粒 LPCX SMAD2 和 SMAD2 干扰质粒 pRetroSuper-GFP SMAD2,24 h 后用 100 ng/mL Activin A 诱导 120 h,对 Activin A 诱导不同时间(0,6,12,24,48,72,96,120 h)的细胞进行 Real-time PCR 检测,分析 SMAD2 表达对 Activin A 特异性诱导的下游靶基因内中胚层共同前体标记基因 *Brachyury* 和内胚层标记基因 *Sox17*^[1]的影响,其结果如图 1 所示。由图 1 可知,与对照相比,Activin A 组 SMAD2 的表达无明显差异;但干扰组 (siSMAD2+Activin A) 中 SMAD2 的表达均有不同程度下调,在转染干扰质粒后 36 h (即 Activin A 诱导 12 h) SMAD2 基因表达明显下调,并在转染干扰质粒后 48 h (即 Activin A 诱导 24 h) 达到下降的峰值 ($P < 0.05$);过表达 SMAD2 组 (Flag-SMAD2+Activin A) 在 Activin A 诱导的 0 h (即转染后 24 h) SMAD2 表达即显著 ($P < 0.05$) 上调,其高表达可维持到诱导后的 120 h,提示 SMAD2 得到有效干扰和过表达。

在 Activin A 组中,Activin A 的靶基因内胚层前体基因 *Brachyury* 在诱导 6 h 时表达明显增加,

提示在无饲养层体系下,Activin A 作用 6 h 即可有效地促进原肠作用的进行,并于 48 h 达到高峰($P<0.05$),随后表达水平降低;在 siSMAD2+Activin A 组中,*Brachyury* 的表达水平于诱导的 24 h 内较 Activin A 组明显下调,至 48 h 才检测到强表达,96 h 后其表达水平又明显下调,提示 SMAD2 干扰有效阻止了 Activin A 激活原肠作用的发生;在 Flag-SMAD2+Activin A 组中,诱导 6 h 就检测到了明显的 *Brachyury* 强表达,且较 Activin A 组有明显增强,于 48 h 达高峰后一直处于较高的表达水平($P<0.05$),提示提高 SMAD2 表达水平能有效促进 Activin A 激活原肠作用的发生。

与对照组相比,内胚层基因 *Sox17* 在 Activin A 诱导 48 h 即有强表达,提示内胚层细胞在此时开始

出现,随后在诱导 72 h 达到高峰,之后表达维持到诱导后的 120 h($P<0.05$),提示内胚层细胞正经历着原肠作用快速而大量的形成,这一结果与以前的报道^[15]一致;在 siSMAD2+Activin A 组中,诱导 48 h *Sox17* 表达上调,于 72 h 达到高峰,并维持较低的表达水平到诱导后的 120 h,与对照组没有明显差异,提示 SMAD2 干扰有效地阻止了 Activin A 激活原肠作用的发生,导致细胞全过程中向内胚层的进一步分化受阻;在 Flag-SMAD2+Activin A 组中,*Sox17* 的表达较其他组均有明显增强($P<0.05$),在诱导 72 h 达到高峰后一直处于较高的表达水平,提示 SMAD2 表达水平的提高能有效促进 Activin A 激活原肠作用的发生,并使内胚层细胞快速而大量地形成。

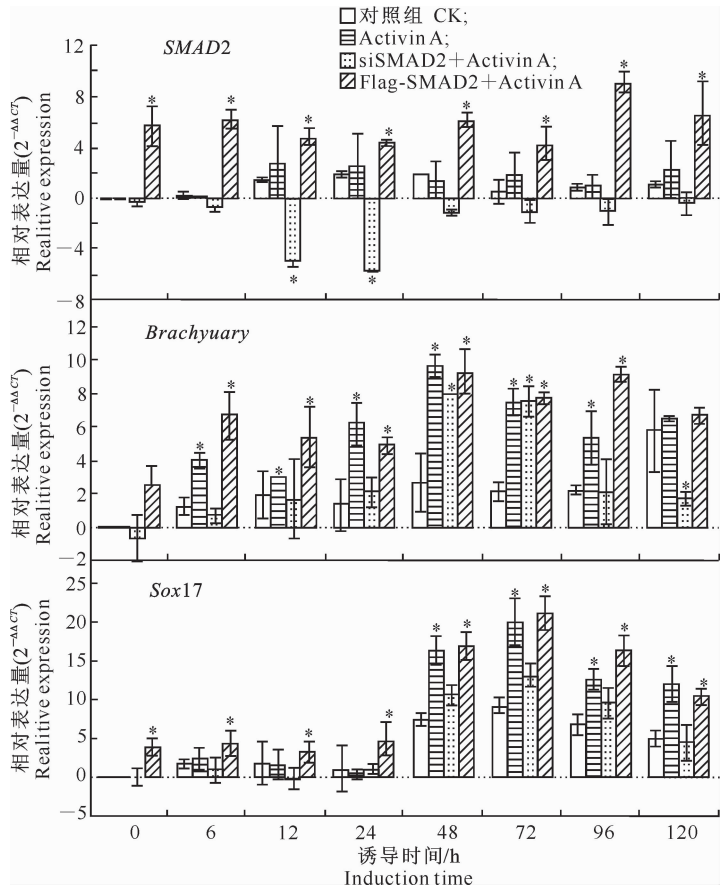


图 1 SMAD2 表达对 Activin A 诱导不同时间 SMAD2、*Brachyury* 及 *Sox17* 表达的影响
与对照组相比,标 * 表示差异显著($P<0.05$)

Fig. 1 Effect of SMAD2 expression on SMAD2, *Brachyury* and *Sox17* genes expression on different time points of cells after the treatment of Activin A
Compared with CK, * stand significant difference ($P<0.05$)

2.2 hESCs 诱导分化过程中 SMAD2 和磷酸化 SMAD2(p-SMAD2)的表达

本试验提示,高浓度 Activin A 通过 SMAD2 激活其下游的靶基因 *Brachyury* 和 *Sox17*^[2,15],进

而诱导 hESCs 向 DE 分化,干扰或者增强 SMAD2 的表达能够抑制或者促进 Activin A 的诱导作用, SMAD2 是高浓度 Activin A 诱导 hESCs 向 DE 分化的关键因子。但在 Activin A 组中,SMAD2 的表

达并无明显改变,维持相对稳定的水平(图 1)。为了进一步研究 SMAD2 蛋白在 Activin A 诱导过程中表达是否变化,以及 Activin A 的诱导作用与 SMAD2 蛋白磷酸化水平的关系,于诱导不同时间(0,6,12,24,48,72,96,120 h)收集细胞,对 SMAD2 及 p-SMAD2 蛋白的表达水平进行 Western-blot 分析,结果见图 2。图 2 显示,在 Activin A 的诱导过程中,SMAD2 的表达水平与对照相比无明显变化,

而 SMAD2 的磷酸化水平在 Activin A 作用起始即较对照显著增高,并持续到诱导的 120 h。孙懿等^[15]在 mRNA 水平和蛋白质水平的检测中证实,在 Activin A 的诱导过程中,*Brachyury* 和 *Sox17* 出现了明显的高表达。与之相对应,本试验结果提示,Activin A 通过 SMAD2 的磷酸化来激活启动特定的靶基因如 *Brachyury* 及 *Sox17* 等基因的表达^[2,15],从而高效诱导 hESCs 向 DE 分化。

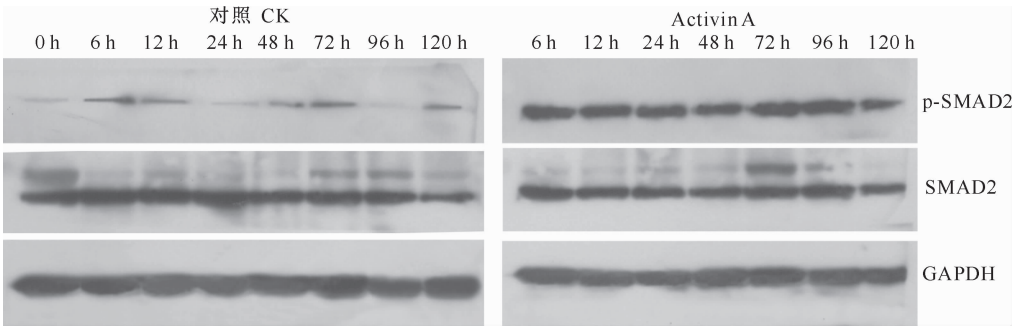


图 2 Activin A 作用不同时间 SMAD2 和 p-SMAD2 表达的 Western-blot 检测
Fig. 2 SMAD2 和 p-SMAD2 protein expression on different time points of cells after the treatment of Activin A by Western-blot analysis

3 讨 论

Activin A/Nodal 信号通过 SMAD2/3 转录调控网络,激活内胚层基因的表达(如 *mixer*, *GA-TA5*, *Sox17* 等),从而维持内胚层的分化,在原条形成、中内胚层分化以及内胚层的维持中发挥重要作用^[4]。Tremblay 等^[5]在小鼠胚胎研究中发现,SMAD2 是原条形成及内胚层特化的中介因子,SMAD2 依赖信号在早期胚外组织中出现,并限制原条的形成位置以及上胚层前后轴的建立,SMAD2^{-/-}胚胎在植入后很短时间内即出现异常,各胚层组织完全缺失,虽然有胚外内胚层出现,但不能表达前端标志。在 SMAD2 敲除嵌合体中,SMAD2 敲除的细胞参与外胚层和中胚层的正常发育,但在原肠作用时无法参与内胚层系统的发育,这一系列研究成果有力证明了 SMAD2 在内胚层发育中的重要作用。2011 年,Fei 等^[6]研究发现,在鼠 ES 细胞中,Activin A/Nodal 信号通过 SMAD2/3 不同的转录调控网络对 ESCs 维持不分化以及向内胚层分化都是必需的,SMAD2 介导 Activin A/Nodal 信号诱导鼠 ES 细胞向中内胚层分化。本试验通过改变 SMAD2 的表达水平,研究 Activin A 信号诱导 hESCs 向 DE 分化过程中中内胚层共同前体标记 *Brachyury* 和内胚层标记 *Sox17* 表达水

平的变化,结果发现,干扰 SMAD2 的表达能有效抑制 Activin A 信号诱导 hESCs 原肠作用的发生以及进一步向 DE 的分化。本试验结果表明,在 Activin A 诱导作用下,在 SMAD2 干扰效果最强的 24 h 时间点,即转染干扰质粒 48 h 时,内中胚层共同前体标记 *Brachyury* 的表达水平较 Activin A 处理组明显降低,而与对照组无明显差异,内胚层标记 *Sox17* 在诱导 48 h 表达上调后,其表达水平相对于 Activin A 处理组,一直维持较低的表达水平到诱导后的 120 h,并且与对照组没有明显差异;而在过表达 SMAD2 的情况下,SMAD2 的表达在试验检测的各个时间点始终保持较高的表达水平,与之相对应的是,*Brachyury* 和 *Sox17* 的表达水平较干扰组以及单纯的 Activin A 处理组明显增加,表明 SMAD2 的高表达有效促进了 Activin A 诱导 hESCs 向 DE 的分化。本试验从不同时间点,动态检测了 SMAD2 不同表达水平对 Activin A 信号诱导 hESCs 向 DE 分化过程中的影响,进一步证实 SMAD2 是高浓度 Activin A 诱导 hESCs 向 DE 分化作用信号通路中的关键介质,与 Tremblay 等^[5]和 Fei 等^[6]在小鼠中的研究结果相一致。

在 TGF-β 信号转导通路中,TGF-β 超家族成员与细胞膜上的 TGF-β II 型受体结合后,吸收 I 型受体,并磷酸化 I 型受体使其活化。活化的 I 型受体

与受体激活型 SMAD(R-SMADs)暂时结合后,磷酸化 R-SMADs C 端 SS(V/M)S 区的 ser 残基,活化的 SMADs 构象发生变化后从受体上解离下来,与 SMAD4 结合,异源寡聚物转移到核内,激活特定基因的转录^[8,15]。SMAD2 属于 R-SMADs,作为 TGF- β 受体特异性蛋白,其是 TGF- β 信号通路中的关键介质,经磷酸化及活化后与 SMAD4 结合形成异三聚体进入胞核,可激活下游基因转录^[16]。研究发现,高浓度(100 ng/mL)Activin A 可高效诱导 hESCs 细胞向 DE 分化^[2],而低浓度的 Activin A 对于维持 hESCs 的不分化也有着重要作用。James 等^[16] 研究发现,添加低浓度的 Activin A 25 ng/mL,能够支持 hESCs 的未分化状态。2006 年, Xiao 等^[17] 研究表明,5 ng/mL Activin A 能够促进 *Oct4*、*Nanog* 等基因的表达,并能抑制 BMP 信号,从而维持 hESCs 的未分化状态。Jiang 等^[18] 报道, SMAD2 蛋白介导了 TGF β /Activin/nodal 信号的转导通路,能直接调控 *Nanog* 的表达,维持胚胎干细胞的未分化状态。本研究表明, SMAD2 在高浓度(100 ng/mL)Activin A 高效促进 hESCs 向 DE 的分化作用与 SMAD2 蛋白的磷酸化水平增高相关,而其表达水平没有明显改变,证实在 hESCs 中, SMAD2 蛋白的磷酸化能激活 Activin A 启动的信号转导,与 SMAD2 蛋白介导 TGF β /Activin/nodal 信号维持胚胎干细胞未分化状态的报道相一致^[15],而 SMAD2 转录激活下游不同靶基因是导致不同浓度 Activin A 在 hESCs 中不同作用的主要原因。

综上所述, SMAD2 是 Activin A 诱导 hESCs 向 DE 分化的关键因子,并通过 SMAD2 的磷酸化介导 Activin A 信号转导通路,诱导 hESCs 高效分化为限定性内胚层细胞。

[参考文献]

[1] Derynck R,Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [J]. Nature,2003,425 (6958):577-584.

[2] D'Amour K A,Agulnick A D,Eliazer S,et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm [J]. Nat Biotechnol,2005,23(12):1534-1541.

[3] McLean A B,D'Amour K A,Jones K L,et al. Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed [J]. Stem Cells,2007,25(1):29-38.

[4] Brown S,Teo A,Pauklin S,et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors [J]. Stem Cells,2011, 29(8):1176-1185.

[5] Tremblay K D,Hoodless P A,Bikoff E K,et al. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process [J]. Development,2000,127:3079-3090.

[6] Fei T,Zhu S,Xia K,et al. Smad2 mediates Activin/Nodal signaling in mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Cell Res,2010,20(12):1306-1318.

[7] Payne C,King J,Hay D. The role of activin/nodal and Wnt signaling in endoderm formation [J]. Vitam Horm,2011,85:207-216.

[8] Watabe T,Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation [J]. Cell Res, 2009, 19 (1):103-115.

[9] Chng Z,Teo A,Pedersen R A,et al. SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell,2010,6(1):59-70.

[10] Lin G,Xie Y B,Ouyang Q,et al. HLA matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China [J]. Cell Stem Cell,2009,5(5):461-465.

[11] Coutts S M,Childs A J,Fulton N,et al. Activin signals via SMAD2/3 between germ and somatic cells in the human fetal ovary and regulates kit ligand expression [J]. Dev Biol,2008, 314(1):189-199.

[12] 周 静,李 进,林 戈,等. Wnt3a 和 Activin A 共同促进人胚胎干细胞向限定性内胚层细胞分化 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(4):37-41.

Zhou J,Li J,Lin G,et al. Wnt3a synergized with Activin A promote differentiation of human embryonic stem cells into definitive endoderm [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat Sci Ed,2010,38(4):37-41. (in Chinese)

[13] Sun Y,Yi H,Zhang P F,et al. Identification of differential proteins in nasopharyngeal carcinoma cells with p53 silence by proteome analysis [J]. FEBS Lett,2007,581(1):131-139.

[14] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) [J]. Methods,2001,25:402-408.

[15] 孙 懿,周 静,林 戈,等. Activin A 特异性对人胚胎干细胞向限定性内胚层诱导分化的促进作用 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(6):13-18.

Sun Y,Zhou J,Lin G,et al. Activin A specifically promotes definitive endoderm differentiation from human embryonic stem cells [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat Sci Ed,2012,40(6):13-18. (in Chinese)

[16] James D,Levine A J,Besser D,et al. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells [J]. Development,2005,132(6): 1273-1282.

[17] Xiao L,Yuan X,Sharkis S J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells,2006,24(6):1476-1486.

[18] Jiang J,Ng H H. TGFbeta and SMADs talk to NANOG in human embryonic stem cells [J]. Cell Stem Cell,2008,3(2): 127-128.