doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.001

・基础研究・

Lefty1对小鼠胚胎干细胞分化过程的影响*

刘 洋 杜 晋 吴 平 李 轩 张 璐 (清华大学生命科学学院 北京 100084)

摘要 目的:研究 Lefty1 在小鼠胚胎干细胞分化过程中的作用。方法:根据染色质免疫沉淀测序结果,在临近 Lefty1 转录起始位点 以及与之相距 10 kb 的上游区域有 TGF-β 信号通路 Smad2/3 蛋白的四个结合区域,通过 CRISPR/Cas9 方法获得四个区域敲除的 单克隆细胞,利用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)检测各细胞中 Lefty1 的转录水平,并用 TGF-β 信号通路的激活剂 AC 和抑制剂 SB 分别处理敲除的细胞,检测其对 TGF-β 信号的响应,最后通过胚状体形成实验,检测敲除细胞系在中内胚层分化过程中的标 志分子 Gsc 和 Mix11 的表达。结果:利用 CRISPR/Cas9 方法成功获得不同区域敲除的单克隆细胞,与野生型 E14 细胞相比,四种 区域敲除的细胞中 Lefty1 RNA 含量明显降低,并且在干细胞状态和分化状态下,敲除细胞系对 TGF-β 信号的响应减弱。在胚状 体形成的实验中,与野生型 E14 细胞相比,敲除细胞系在分化过程中 Lefty1 表达的基础水平明显降低,中内胚层分化的标志分子 Gsc 和 Mix11 转录水平也明显下降。结论: 在胚胎干细胞中,Lefty1 转录起始位点附近以及上游 10 kb 的这四段区域通过 TGF-β 信号通路对 Lefty1 的转录发挥调控作用,从而影响中内胚层分化过程中的标志分子 Gsc 和 Mix11 的表达。

关键词:TGF-β 信号通路; Lefty1;转录调控;胚胎干细胞分化

中图分类号:Q789;R-33;Q132.7;R329 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)02-201-06

The Role of *Lefty1* in the Process of Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation*

LIU Yang, DU Jin, WU Ping, LI Xuan, ZHANG Lu

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To study the role of *Lefty1* in the process of mouse embryonic stem cell differentiation. **Methods:** According to the chromatin immunoprecipitation sequencing results, there are four binding regions of Smad2/3 protein near above and 10 kb upstream from *Lefty1* transcription starting site. To achieve knock out cell lines of four different regions by the CRISPR/Cas9 system, the transcription level of *Lefty1* was detected by using real-time quantitative PCR. The knockout cells were treated with the TGF- β activator AC and inhibitor SB, to detect TGF- β signal response. Then, the expression level of mesendoderm markers *Gsc* and *Mix11* was detected during embryoid body formation in knockout cell lines. **Results:** The different four regions were knocked out by the CRISPR/Cas9 system. Compared with the wild type, the transcription level of *Lefty1* RNA in knockout cell lines was significantly decreased, and the TGF- β signal response of knockout cell lines was lower in ES state and EB state. Compared with the wild type, the basal level of *Lefty1* reasscription level of mesendoderm markers *Gsc* and *Mix11* was also decreased significantly during embryoid body formation. **Conclusions:** The regions near above and 10 kb upstream from *Lefty1* transcription start site regulate the transcription process of *Lefty1* through the TGF- β pathway-dependent manner, which further regulates the expression of mesendoderm markers Gsc and Mix11.

Key words: TGF-β signaling pathway; *Lefty1*; Transcription regulation; Embryonic stem cell differentiation Chinese Library Classification(CLC): Q789; R-33; Q132.7; R329 Document code: A Article ID: 1673-6273(2019)02-201-06

前言

胚胎干细胞在生物医药领域中一直是研究的热点。一方面,胚胎干细胞自我更新和定向分化的能力为人体组织和器官的再生与修复提供了希望^[1,2]。另一方面,胚胎干细胞能够整合

到宿主的囊胚中形成嵌合体,这为研究基因和发育提供了非常 有利的技术手段^[3]。TGF-β家族的蛋白在胚胎干细胞中高表达, 表明 TGF-β 信号通路对维持细胞的多能性发挥着重要的作用 ^[45]。在调控 TGF-β 信号通路的因子中, *Lefty1* 被发现是该通路 的抑制剂^[6]。研究发现, *Lefty1* 在未分化的细胞中表达量较高,

^{*} 基金项目:科技部 - 清华大学 - 北京大学生命学院联合中心基金项目 作者简介:刘洋(1991-),硕士研究生,主要研究方向:胚胎干细胞,E-mail: <u>liuyang1991523@163.com</u> (收稿日期:2018-03-30 接受日期:2018-04-27)

Lefty1 是维持细胞干性的重要因子^{ITI}。此外,在干细胞分化为胚状体的过程中,Lefty1 的表达量随着天数的增加呈现出先上升、再下降的变化趋势,表明 Lefty1 在细胞分化的初始阶段也有一定的作用^{IRSI}。因此,研究 Lefty1 的转录调控机制对探索干细胞状态的维持和胚胎发育的过程具有重要意义。

本文主要研究 Lefty1 的转录调控机制及其在胚胎干细胞 分化过程中的作用。根据染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)结果, 在临近 Lefty1 转录起始位点以及与之相距 10 kb 的上游区域 有 TGF-β 信号通路蛋白(Smad2/3)的结合位点,表明 TGF-β 信 号通路对 Lefty1 基因在转录过程中可能具有重要调控作用。目 前为止,没有研究用基因敲除的方法直接验证上述区域对 Lefty1 转录的调控作用,本课题的目的是利用 CRISPR/Cas9 的 技术获得上述区域敲除的细胞系,从而研究 Lefty1 的转录调控 机制及其在细胞分化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

老鼠的胚胎干细胞 (mESC)E14Tg2a.IVE14 细胞系; DMEM 培养基、0.25%胰酶、L-谷氨酸、非必需氨基酸、β-巯基 乙醇、Opti-MEM、Anti-anti 均来自于 Gibico 公司;Thermo II 牛 胎血清、384 孔板及反转录试剂盒均来自于 Thermo 公司、丙酮 酸钠(SIGMA 公司)、Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司);荧 光定量基因扩增仪 (ABI 公司,V7)、PCR 仪 (Bio-rad 公司, T100)、RNA 提取试剂盒(GeneMark 公司)、增强型染料法实时 荧光定量 PCR 预混液(GeneStar 公司);LIF(Leukemia Inhibitory Factor;Thermo 公司)、ActivinA (50 ng/mL;R&D 公司)、 SB431542(10 mM;英国 Tocris 公司)。

1.2 方法

1.2.1 胚胎干细胞培养 在 DMEM 培养基中加入 15 % 的胎 牛血清,1%的 L-Glutamine、Sodium Pyruvate、双抗(青霉素、链 霉素混合液;Anti-anti)、Non-essential Amino Acid,以及维持细 胞干性的生长因子 LIF(1.4 µg/mL), 配制成干细胞培养基(简 称 ES 培养基)。提前在 T25 的细胞瓶中铺上 Gelatin 明胶,以 利于胚胎干细胞贴壁,置于环境为 37 ℃、5 % CO₂ 的细胞培养 箱培养^{□0}。在液氮罐中取出 E14 的冻存管,迅速放入 37 ℃ 水浴 箱中复温解冻,用吸管吸出解冻液,加入离心管中,吹打混匀, 密封后置离心机中离心 (1000 r/min,5 min), 弃上清, 吸去 Gelatin 明胶,用培养基重悬移入培养瓶中,于 37 ℃,5 % CO₂ 培养箱中常规培养。当培养瓶(或培养皿)中细胞密度为80% -90%时应进行传代,用巴式管吸去培养基。将适量胰酶加入培 养瓶(或培养皿)中,平放培养瓶,室温放置 30 s 至 1 min,直至 晃动培养瓶时细胞成片掉落,迅速加入胰酶体积 5-6 倍的培养 基中和。用巴式管吸去上清液,重新加入适量培养基悬起细胞, 转移到新的培养瓶培养,复苏后的细胞传 2-3 代后再进行后续 实验。

1.2.2 胚状体(Embryoid body, EB)的形成 胚状体的形成是胚胎干细胞分化过程中的重要一环。当胚胎干细胞处于不含有白血病抑制因子 LIF 时,干细胞会自发地分化,形成拥有三维空间结构的聚合体,即胚状体^{III,12]}。首先配制不含 LIF 的 EB 培养基,即 ES 培养基中不加入 LIF。当 T25 培养瓶的细胞密度为80-90 %时,消化细胞,收集细胞沉淀,用 EB 培养基重悬后用血

细胞计数板计数,用 12 mL EB 培养基重悬 1.5× 10⁶ 个细胞,加 入低吸附 10 cm 盘中,左右晃动使细胞分布均匀,将 10 cm 盘 放入 37 ℃,5% CO₂的培养箱培养。分别第 0 至 6 天固定时间 取样(第 0 天的样品在分化实验开始前收集),第 1、2、3、4、5、6 天取样,其中第 2 天需对细胞进行胰酶刺激,以便分化更好地 进行,第 4 天取样后需为细胞更换培养液。取样时用移液器吹 匀 10 cm 盘中的液体,保证细胞均匀分布。从中吸取 3 mL 液体 至 15 mL 离心管,用 1000 rpm 离心 5 min 后弃上清,将样品保 存在 -80 ℃冰箱。

1.2.3 构建 CRISPR/Cas9 系统及筛选单克隆 选取 Addgene 上的 PX458 质粒,主要包括 U6 启动子、酶切位点 BbSI、Cas9 蛋白基因、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因和氨苄青霉素抗 性(AmpR)基因^[13-15]。其中酶切位点 BbSI用于插入 guide RNA 片段,AmpR 为构建 Cas9 质粒时的筛选标记,EGFP 为 Cas9 质 粒转染细胞后的筛选标记,我们进行了质粒优化,即在 PX458 的 U6 启动子后面加入一段多克隆位点,这样可以实现一个质 粒上同时带有两个 guide RNA,只需要转染一个质粒就可以实 现基因的敲除。将目标序列输入 CRISPR Design 网站(http: //crispr.mit.edu/),根据综合得分、脱靶基因的位置和序列本身 的特点选取合适的 oligo 序列。将最终构建好的质粒转染到 E14 细胞中,48 h 后用流式细胞仪将细胞自动分选到 96 孔板 中,保证每孔一个细胞,待长成单克隆之后进行后续细胞的基 因鉴定。

1.2.4 **实时荧光定量** PCR 检测基因的表达 利用 RNA 提取 试剂盒提取细胞中的总 RNA,用 NanoDrop 定量后,采用 Thermo 的反转录试剂盒,用两步法按说明书进行反转录,得到 cD-NA 样本,进行稀释后用于实验。整个反应以 GAPDH 为内参, 采用的 qPCR 体系:10 µL 的 cDNA,22.5 µL 的荧光染料 Mix, 4.5 µL(1 µM)的正反向引物,8 µL 的 DEPC 水,混匀后均分到 384 孔板中。具体反应条件为:预变性 95 ℃,10 min,95 ℃, 10s,60 ℃,42 s,一共 40 个循环,每组设定 3 个复孔,用相对定 量法^{△Δα}进行数据分析^[16]。

1.3 统计学分析

数据处理采用 SPSS17 软件进行统计分析,计量资料以 mean± SD 表示,进行两组数据组间差异比较时采用独立样本 t 检验,P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 染色质免疫沉淀(ChIP-seq)测序结果

通过染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)的结果,在ES状态 下,临近 Leftyl转录起始位点以及与之相距 10 kb 的上游区域 有 TGF-β 信号通路蛋白(Smad2/3)的结合位点。图中蛋白起峰 的高度代表该蛋白与基因结合的概率(或者可以理解为结合的 强度),起峰的位置代表蛋白与基因的结合位点。将加入 TGF-β 信号通路的激活剂 Activin A(简称 AC)¹⁰⁷和抑制剂 SB431542 (简称 SB)¹¹⁸的两组数据对比,加入 AC 的实验组显示,TGF-β 信号通路被活化后,Smad2/3 蛋白在 Leftyl 转录起始位点和与 之相距 10 kb 的上游区域有很强的结合作用;加入 SB 的实验 组显示,TGF-β 信号通路被抑制后,Smad2/3 蛋白的结合作用 几乎没有,这些表明 TGF-β 信号通路对 Leftyl 基因在转录过 程中具有重要调控作用(图 1)。



Fig.1 The results of Chromatin precipitation sequencing

2.2 CRISPR/CAS9 技术敲除的细胞系的鉴定及其对 Leftyl 转录的影响

利用 CRISPR/CAS9 技术,根据图 1 的 ChIP-seq 中的结合 位点,设计 guide RNA 序列,分别针对距离 Lefty1 转录起始位 点(转录起始位点为+1)上游-10389 到 -10188,-10389 到 -8813,-1408 到 -659,-1408 到 -51 这四个区域进行敲除,通过 流式分选单克隆之后,分别在敲除区域的内部和外部设计引 物,进行基因型鉴定。对于野生型 E14 细胞(WT)来说,两对引 物都能得到 PCR 产物;而对于敲除的细胞,内部引物无法得到 PCR 产物,并且外部引物得到的 PCR 产物比 WT 短,减少的长度约为敲除区域的长度。最终得到四个区域分别敲除的细胞系,并用测序手段也确认了敲除的正确性,为了方便表示,-10389 到 -10188 区域的敲除是 KO1 细胞系,-10389 到 -8813 区域的敲除是 KO2 细胞系,-1408 到 -659 区域的敲除是 KO3 细胞系,-1408 到 -51 区域的敲除是 KO4 细胞系(图 2)。





Transcription start site for + 1, KO1 cell line: knockout of the -10389 to -10188 region, KO2 cell line: knockout of the -10389 to - 8813 region, KO3 cell line: knockout of the -1408 to -659 region, KO4 cell line: knockout of the - 1408 to -51 region

同时,利用 qRT-PCR 对各细胞中 Lefty1 的转录水平进行 了检测。与 WT 相比,四种敲除的细胞中 Lefty1 RNA 含量分别 降低了 80 %、90 %、60 %、97 %,即 Lefty1 RNA 含量明显降低 (P<0.01),表明上述区域的基因敲除对 Lefty1 在干细胞状态下 的转录确实有影响,从而证明这些区域对 Lefty1 的转录有重要 作用(图 3)。

2.3 Lefty1 敲除细胞系对 TGF-β 信号的响应

利用 TGF-β 信号通路的激活剂 AC 和抑制剂 SB 分别处 理了野生型和敲除的细胞系,分别在这些细胞在干细胞状态 (ES)和分化状态(EB)下,检测 Leftyl 对 TGF-β 信号的响应。



从图 4A 的结果可以看出,与野生型细胞相比,在干细胞状态下, 敲除的细胞中 AC 处理下的基因表达至少降低 4 倍, AC/SB 的比值有显著性降低(P<0.01);从图 4B 的结果可以看

出,与野生型细胞相比,在分化状态下,敲除的细胞中AC处理 下的基因表达也有显著性降低(P<0.01),表明这四段敲除的区 域是通过TGF-β信号来调控Leftyl的转录水平的(图4)。





Note: *P<0.5,**P<0.01, compared with wild type.

2.4 Lefty1 敲除细胞系对胚状体分化的影响

对敲除细胞系进行了胚状体形成实验,检测分化过程中 Lefty1、Gsc和 Mix11的表达。首先检测了四种敲除细胞系中 Lefty1在EB 状态下的转录水平,从图 5A 和 B 可以看出,与野 生型E14 细胞相比, 敲除的细胞系在分化过程起峰的最高值降低了 8 倍, 即 Lefty1 在分化过程中表达的基础水平有显著性降低(P<0.01)(图 5)。



Note: **P<0.01, compared with wild type.

根据 Lefty1 转录水平在分化过程中的变化,KO3 和 KO4 这两种敲除的细胞,在分化过程中,Lefty1 表达水平降低最明显,因此选择 KO3 和 KO4 这两种敲除的细胞进行 Gsc 和 Mix11 转录水平的检测,结果显示与野生型 E14 细胞相比,敲除的细胞系在分化过程中 Gsc 和 Mix11 最高点峰值有极显著性降低(P<0.01),表明 Lefty1 会影响中内胚层的分化。

3 讨论

胚胎干细胞是从早期胚胎的内细胞团中分离出来的一类 传代细胞,能够在适宜的体外条件下维持早期胚胎的多能性。 它可以自我更新,也能够在胚胎发育过程中向外、中、内三个胚 层进行分化,并且 TGF-β 家族的信号通路与细胞胚层的分化 这一生物过程密切相关^[1921]。TGF-β 这个信号通路的失调往往 会导致癌症等疾病的发生^[223],TGF-β 超家族因子通过结合特 异的受体来激活受体复合物,包括一对 Ι 型受体和一对 ΙI 型受 体。激活的 I 型受体进一步激活 Smad 蛋白(R-Smad)磷酸化: TGF-β/Nodal/activin 通路中 Smad2/3 被磷酸化;而 BMP 通路 中 Smad1/5/8 被磷酸化。激活的 R-Smad 在核中聚集与共同通 路型 Smad4 结合,招募转录因子进而调控上百个基因的转录^[24]。 在众多 TGF-β 家族的蛋白中, *Lefty1* 是唯一富集在干细胞中并 且起到抑制 TGF-β 信号通路作用的细胞因子,它在 TGF-β 信 号通路参与的生物过程中发挥重要的调节作用^[78]。

因此,本文想通过鉴定和研究 TGF-β 通路中的 Lefty1 在 早期小鼠胚胎干细胞自我更新及分化中的调控,更全面地解析 TGF-β 通路的调控作用,对探索干细胞状态的维持和胚胎发育 的过程具有重要意义。本文主要研究 Lefty1 对胚胎干细胞分化 过程的作用。根据染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)结果,在 ES 状态下,临近 Lefty1 转录起始位点以及与之相距 10 kb 的上游 区域有 TGF-β 信号通路蛋白 (Smad2/3) 的结合位点,表明 TGF-β 信号通路对 Lefty1 基因在转录过程中具有重要调控作





Note: **P<0.01, compared with wild typeq.

用。为了直接验证上述区域对 Lefty1 转录的调控作用,本课题 采用小鼠胚胎干细胞这一生物模型研究发育过程中基因的调 控机制,研究 Lefty1 在胚胎干细胞分化过程中的作用。根据图 1 中 ChIP-seq 中的结合位点,设计 guide RNA 序列,分别针对 距离 Lefty1 转录起始位点 -10389 到 -10188, -10389 到 -8813, -1408 到 -659,-1408 到 -51 这四个区域进行敲除, 通过 CRISPR/Cas9 技术并经过流式分选单克隆之后,获得了不同区 段敲除的细胞单克隆,并利用 qRT-PCR 对各细胞中 Lefty1 的 转录水平进行了检测,结果表明这四个区域的敲除对 Lefty1 在 干细胞状态下的转录有影响。同时,利用 TGF-β 信号通路的激 活剂 AC 和抑制剂 SB 分别处理了实验组和对照组的细胞,检 测这些细胞在干细胞状态和分化状态下, Lefty1 对 TGF-β 信号 的响应,结果显示这四段敲除的区域是通过 TGF-β 信号来调 控 Lefty1 的转录水平的。最后,对敲除细胞进行了胚状体形成 实验,检测分化过程中 Lefty1、Gsc 和 MixII 的表达。根据 Lefty1转录水平在分化过程中的变化,KO3和 KO4 这两种敲 除的细胞,在分化过程中,Leftyl表达水平降低最明显。选择 KO3 和 KO4 这两种敲除的细胞进行 Gsc 和 Mixll 转录水平的 检测,表明 Leftyl 会影响中内胚层的分化。

综上所述, 在胚胎干细胞中 Leftyl 转录起始位点上游 -10389 到 -10188,-10389 到 -8813,-1408 到 -659,-1408 到 -51 这四个区域通过 TGF-β 信号通路对 Leftyl 的转录发挥调控作 用,从而影响在干细胞分化早期中内胚层分化的标志分子 Gsc 和 Mixl1 的转录。接下来我们还需进一步探究在干细胞分化过 程中,Leftyl 转录起始位点上游的区域对 Gsc 和 Mixl1 的转录 调节方式,是通过顺式作用(即基因区段本身的作用,通过形成 特定的染色体空间结构)还是反式作用(即 Leftyl 蛋白)来实现 的,这就需要在干扰 Leftyl 蛋白合成的同时保留完整的基因序 列。如果在基因结构未遭到破坏的情况下, Gsc 和 MixII 的转 录依然被抑制,则说明 Leftyl 转录起始位点上游的基因起到反 式调控作用;如果 Gsc 和 Mixl1 的转录与野生型相比没有明显 差异,则说明利用起顺式调控作用。实现针对 Leftv1 蛋白合成 的干扰有两种简单易行的方式。第一种方法是利用 Cas9 技术 编辑 Leftyl 编码区的第一个外显子。被 Cas9 剪切后的染色体 大多数情况下采用非同源末端连接(Nonhomologous end-joining)进行修复,这样端口的 DNA 会缺失或增添几个核苷酸,使 下游的编码区产生移码突变,从而干扰 Lefty1 蛋白的形成。第 二种方法是设计针对 Lefty1 mRNA 的短发夹 RNA,利用 RNA 干扰的手段来降低 Leftyl 蛋白的合成。由于实验室已经搭建了 成熟的 CRISPR/Cas9 系统,我们倾向于采用第一种方法。通过 设计 sgRNA, 使其尽量分布在 Leftyl 第一个外显子靠近转录 起始位点的区域,减少 sgRNA 上游被正常翻译出来的蛋白质 对实验带来的干扰。本文通过研究 Leftyl 对胚胎干细胞早期分 化的影响,有助于更全面解析 TGF-β 通路如何在表观遗传水 平调控基因转录,将对研究干细胞状态的维持、细胞分化早期 命运的决定、机体发育过程中相关疾病的发病机理和治疗方法 等方面提供重要的信息和参考。

参考文献(References)

- Liu N, Lu M, Tian X, et al. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells [J]. J Cell Physiol, 2007, 211(2): 279-286
- Ghanem AM. Molecular regulation of Sox2 expression during differentiation of chick embryonic stem cells[J]. UCL Discovery, 2010, 19: 191-202

- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282: 1145-1147
- [4] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-β family signaling in stem cell renewal and differentiation[J]. Cell Research, 2009, 19: 103-115
- [5] Massagué J, and Xi Q. TGF-β Control of stem cell differentiation genes[J]. FEBS Letters, 2012, 586: 1953-1958
- [6] Ulloa L, and Tabibzadeh S. Lefty inhibits receptor-regulated Smad phosphorylation induced by the activated transforming growth factor-β receptors[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 21397-21404
- [7] Shiratori H, Hamada H. TGFβ signaling in establishing left-right asymmetry[J]. Semin Cell Devl Biol, 2016, 32: 80-84
- [8] Kim DK, Cha Y, Ahn HJ, et al. Lefty1 and lefty2 control the balance between self-renewal and pluripotent differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2014,23: 457-466
- [9] Tabibzadeh S, Hemmati Brivanlou. Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events[J]. Stem Cells, 2006, 24: 1998-2006
- [10] Tamm C, Galitó SP, Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing[J]. PLoS ONE, 2013: 156-181
- [11] Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells [J]. J Biosci Bioeng, 2007, 103: 389-398
- [12] Batalov, Feinberg. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture [J]. Biomarker Insights, 2015, 10: 71-76
- [13] Barrangou R. Cas9 targeting and the CRISPR revolution[J]. Science, 2014, 344: 707-708
- [14] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337: 816-821

- [15] Haifeng Wang, Marie La Russa, Lei S Qi. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond [J]. Annual Review of Biochemistry, 2016, 85: 227-264
- [16] Real-Time PCR Applications Guide. 2006, Bio-Rad Laboratories, Inc
- [17] Xi Q, Wang Z, Massagué J. A poised chromatin platform for TGF-β access to master regulators[J]. Cell, 2011, 147: 1511-1524
- [18] Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, et al. Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system[J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105: 6608-6613
- [19] Itoh F, Tetsure W, Miyazono K. Roles of TGF-β family signals in the fate determination of pluripotent stem cells[J]. Semin Cell Devl Biol, 2014, 32: 98-106
- [20] Massagué J. TGFβ signalling in context [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13: 616-630
- [21] Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 435-462
- [22] Massague J. TGF-beta in Cancer[J]. Cell, 2008, 134(2): 215-230
- [23] Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGF-beta signaling and disease [J]. FEBS Lett, 2012, 586 (14): 2003-2015
- [24] Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis[J]. Dev Cell, 2009, 16(3): 329-343
- [25] Kagey MH, Young RA. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture[J]. Nature, 2010, 467: 430-435
- [26] Dowen JM, Fan ZP, Young RA, et al. Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes [J]. Cell, 2014, 159: 374-387
- [27] Yan J, Enge M, Taipale J, et al. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites [J]. Cell, 2015, 154: 801-813

(上接第 235 页)

- [8] Sun T, Aceto N, Meerbrey KL, et al. Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase[J]. Cell, 2011, 144: 703-718
- [9] Han T, Xiang DM, Sun W, et al. PTPN11/Shp2 overexpression enhances liver cancer progression and predicts poor prognosis of patients[J]. J Hepatol, 2015, 63: 651-660
- [10] Yuan T, Wang Y, Zhao ZJ, et al. Protein-tyrosine phosphatase PTPN9 negatively regulates ErbB2 and epidermal growth factor receptor signaling in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 14861-14870
- [11] Du WW, Fang L, Li M, et al. MicroRNA miR-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling[J]. J Cell Sci, 2013, 126: 1440-1453
- [12] Ahmad KA, Iskandar KB, Hirpara JL, et al. Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells [J]. Cancer Res, 2004, 64: 7867-7878
- [13] Zhao LC, Li J, Liao K, et al. Evodiamine Induces Apoptosis and Inhibits Migration of HCT-116 Human Colorectal Cancer Cells[J]. Int J

Mol Sci, 2015, 16: 27411-27421

- [14] Bu Y, Su F, Wang X, et al. Protein tyrosine phosphatase PTPN9 regulates erythroid cell development through STAT3 dephosphorylation in zebrafish[J]. J Cell Sci, 2014, 127: 2761-2770
- [15] Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7: 833-846
- [16] Den Hertog J, Ostman A, Böhmer FD. Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms[J]. FEBS J, 2008, 275: 831-847
- [17] Hu B, Yan X, Liu F, et al. Downregulated Expression of PTPN9 Contributes to Human Hepatocellular Carcinoma Growth and Progression [J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22: 555-565
- [18] Ray S, Zhao Y, Jamaluddin M, et al. Inducible STAT3 NH2 terminal mono-ubiquitination promotes BRD4 complex formation to regulate apoptosis[J]. Cell Signal, 2014, 26: 1445-1455
- [19] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. Science, 2014, 344: 310-313
- [20] Inghirami G, Chiarle R, Simmons WJ, et al. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer[J]. Cell Cycle, 2005, 4: 1131-1133