

bFGF激活PI3K信号通路调控大鼠 胚胎干细胞自我更新

林敏¹ 李平^{2*} 钱其军^{1,2*}

(¹浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; ²第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘要 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在小鼠和人胚胎干细胞自我更新和分化过程中起着重要的调控作用,但目前关于bFGF在大鼠胚胎干细胞中的调控作用并不是很清楚。该文在无饲养层细胞的条件下,通过碱性磷酸酶染色、免疫荧光、RT-PCR等方法对大鼠胚胎干细胞在激活bFGF相关信号通路后自我更新、细胞分化潜能等进行了分析。结果显示,在白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)加GSK3抑制剂(CHIR99021)和ERK抑制剂(PD0325901)(简称L/2I)基础上, bFGF能明显促进大鼠胚胎干细胞的增殖。L/2I/b(L/2I+bFGF)条件下培养的大鼠胚胎干细胞能维持干性标志基因*Oct-4*、*Nanog*的表达,同时也保持了向不同胚层细胞分化的能力。另外, L/2I/b也能支持从大鼠囊胚原代分离胚胎干细胞。Western blot结果显示, bFGF能促进PI3K下游分子AKT的磷酸化。小分子化合物SU5402或LY294002分别抑制FGF受体及PI3K均能阻断bFGF激活的AKT磷酸化,并抑制bFGF对大鼠胚胎干细胞自我更新的促进作用。这些结果表明, bFGF通过激活大鼠胚胎干细胞PI3K/AKT相关的信号通路促进大鼠胚胎干细胞自我更新。

关键词 大鼠胚胎干细胞; 自我更新; 碱性成纤维细胞生长因子

Regulation of Rat Embryonic Stem Cell Self-renewal by bFGF via Phosphoinositide 3-kinase-dependent Signaling

Lin Min¹, Li Ping^{2*}, Qian Qijun^{1,2*}

(¹College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract Basic fibroblast growth factor (bFGF) plays important roles in the control of pluripotency and lineage specification in mouse or human embryonic stem cells (ES cells) states. However, it is unclear whether bFGF signaling is involved in self-renewal of rat ES cells. To investigate the effect of bFGF on rat ES cells, rat ES cells were cultured in serum free medium supplemented with LIF, PD0325901 and CHIR99021 (L/2I) and with or without bFGF. Small molecular chemical SU5402 and LY294002 were used to inhibit FGF receptor and PI3K, respectively. Alkaline phosphatase staining, immunostaining and RT-PCR were performed to identify the pluripotency of rat ES cells. Western blot was used to analysis the phosphorylation level of AKT. The results showed that bFGF promoted self-renewal of rat ES cells under a feeder cell and serum free condition. Rat ES cells maintained with L/2I and bFGF expressed *Oct-4* and *Nanog* and could differentiate to cells of ectoderm, mesoderm and endo-

收稿日期: 2016-01-06 接受日期: 2016-04-08

*通讯作者。Tel: 021-81875373, E-mail: pingli2014sh@163.com; Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@sino-gene.com

Received: January 6, 2016 Accepted: April 8, 2016

*Corresponding authors. Tel: +86-21-81875373, E-mail: pingli2014sh@163.com; Tel: +86-21-81875371, E-mail: qianqj@sino-gene.com

网络出版时间: 2016-05-27 16:34:52 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160527.1634.006.html>

derm. Furthermore, bFGF promoted the phosphorylation level of AKT and this effect could be inhibited by SU5402 or LY294002. Both SU5402 and LY294002 abolished the promoting effect of bFGF on the self-renewal of rat ES cells. In conclusion, our results indicated that bFGF promoted self-renewal of rat ES cells and this effect may mainly be regulated by PI3K/AKT dependent signaling pathway.

Keywords rat embryonic stem cells; self-renewal; basic fibroblast growth factor

大鼠是常用的实验动物模型之一,在生理病理等方面与人类更为接近,因此更适合用于模拟人类各种疾病的实验研究^[1]。但由于白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、血清以及饲养层细胞等常规小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)的培养条件无法维持大鼠ES细胞的自我更新,这一问题极大地限制了大鼠实验动物模型的构建和应用。2007年, Austin Smith和应其龙教授等^[2]发现,通过ERK抑制剂(PD0325901)和GSK3抑制剂(CHIR99021)这两种抑制剂(简称2I)共同作用,可以维持小鼠ES细胞在无血清、无LIF和饲养层细胞条件下的自我更新。基于这一发现,2008年, Austin Smith和应其龙教授实验室同时报道了利用2I体系建立起了大鼠ES细胞株,嵌合体实验也证明这种大鼠ES细胞具有形成嵌合体和生殖细胞遗传的能力^[3-4]。利用这种2I条件下获得的大鼠ES细胞,应其龙实验室进一步获得了*p53*基因敲除大鼠,证实了大鼠ES细胞可用于构建基因敲除大鼠模型^[5]。目前,大鼠ES细胞仍是除小鼠ES细胞以外唯一被证明具有生殖遗传能力的干细胞。但与小鼠ES细胞不同的是,2I条件维持大鼠ES细胞自我更新时仍需要饲养层细胞的支持,去除饲养层细胞将导致大鼠ES细胞的分化。以往的研究表明,饲养层细胞分泌LIF^[6]、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)^[7]等细胞因子促进小鼠或人ES细胞的自我更新。LIF通过激活STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)信号通路从而促进小鼠ES细胞的自我更新^[8]。Chen等^[9]发现,在2I条件下, LIF对于大鼠胚胎干细胞的自我更新也有促进作用。但饲养层细胞是否也通过bFGF信号通路促进大鼠ES细胞自我更新这一问题此前未有报道。

本研究通过对大鼠ES细胞在无饲养层条件的培养,发现除了LIF和2I, bFGF同样对大鼠ES细胞的自我更新有促进作用,同时发现, bFGF激活PI3K/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein

kinase)相关信号通路在这一过程中起着重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠ES细胞株DAc8由美国南加州大学应其龙教授惠赠。碱性磷酸酶检测试剂盒(85L3R)购自美国Sigma公司。RNA提取试剂Trizol购自Thermo Fisher公司。RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。Oct-4、SSEA-1、Nanog抗体购自Santa Cruz公司。AKT和磷酸化AKT抗体购自碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠ES细胞的分离和培养 原代大鼠ES细胞的分离提取参考文献[3]进行。大鼠ES细胞维持培养于丝裂霉素C处理后的小鼠成纤维细胞上,细胞培养液为N2B27添加3 $\mu\text{mol/L}$ Chir99021和1 $\mu\text{mol/L}$ PD0325901。无饲养层培养大鼠ES细胞时,培养液中添加10 ng/mL LIF和10 ng/mL bFGF。诱导大鼠ES细胞分化时, N2B27培养液中添加等比例的饲养层细胞条件培养液,同时去除LIF、bFGF和小分子抑制剂,悬浮培养形成EB, 8 d后检测基因表达变化。

1.2.2 免疫荧光染色 1×10^4 细胞接种至24孔板中,当细胞生长至合适密度时,去除细胞培养液。4%多聚甲醛固定20 min后,弃去固定液,然后用PBS洗涤3次。加入含5% BSA的细胞通透液(PBS加0.1% Triton X-100),处理细胞,同时封闭非特异性吸附位点。细胞处理30 min后吸去封闭液,加入一抗(1:250稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后PBS洗涤细胞3次,加入二抗(1:1 000)室温孵育1 h,同时加入DAPI进行细胞核染色,最后PBS洗涤3次,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 RT-PCR检测基因表达 细胞总RNA提取采用Trizol试剂进行,具体步骤按试剂说明操作。然后取1 μg 总RNA进行逆转录反应,反应体系为20 μL ,反应条件为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。RT反应产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或进一步进行PCR分析。PCR反应

表1 PCR引物序列

Table 1 The sequence of primers for PCR

基因 Gene	引物(5'→3') Primers (5'→3')	产物长度(bp) Product length (bp)	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)
<i>Oct-4</i>	F: GAG ATA TGC AAA TCG GAG ACC R: GCC TGG AGC ACC AAA GTG	317	60
<i>Nanog</i>	F: GCC CTG AGA AGA AAG AAG AG R: CTG ACT GCC CCA TAC TGG AA	355	60
<i>Sox17</i>	F: AGG AGA GGT GGT GGC GAG TAG R: GTT GGG ATG GTC CTG CAT GTG	267	63
<i>GATA4</i>	F: GCA TCC ATT TCC ACC TCT T R: TCC ATC ACC CTT GTC CTT T	313	57
<i>AFP</i>	F: GTC CCA CCC TTC CAC TTT R: CCA TCC TGT AGG CAC TCC	436	59
<i>Nestin</i>	F: AGC CAT TGT GGT CTA CTG A R: TGC AAC TCT GCC TTA TCC	367	54
<i>GAPDH</i>	F: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC R: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	452	62

条件为: 95 °C变性5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共30个循环; 再于72 °C延伸5 min。所用PCR引物序列见表1。PCR完毕后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察拍照。

1.2.4 Western blot检测蛋白质水平 不同培养条件处理大鼠ES细胞后, 收集细胞, 然后加入200 μ L RIPA缓冲液裂解细胞。冰浴孵育5 min后, 10 000 r/min离心5 min, 去除没有完全溶解的细胞碎片, 上清加入等体积的2 \times 蛋白质上样缓冲液, 混匀, 95 °C孵育5 min, 变性后进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后, 将蛋白质转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 加入一抗孵育液, 4 °C孵育过夜。然后, 用含0.1% Tween 20的TBS洗涤3次, 每次5 min。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育液, 室温孵育1 h。二抗孵育完毕后, 再用含0.1% Tween 20的TBS洗涤3次, 每次5 min。最后, 加入ECL发光试剂, 将膜置于Bio-Rad Image系统中观察并拍照。

1.2.5 碱性磷酸酶活性检测 按试剂盒操作说明配制碱性磷酸酶检测底物反应液, 当ES细胞生长形成明显克隆后, 弃培养液, 用PBS洗涤细胞1次, 然后加入适量体积的4%多聚甲醛固定细胞2 min。固定完毕后用PBS洗涤细胞3次, 然后加入碱性磷酸酶检测底物反应液, 室温避光孵育15 min, 然后PBS洗涤细胞, 显微镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 bFGF促进大鼠ES细胞自我更新

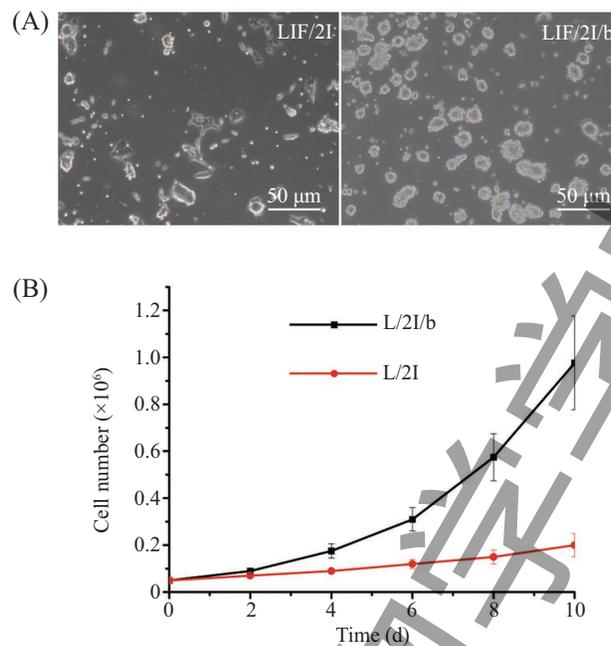
大鼠ES细胞DAc8通常维持培养在2I条件下, 同时需要饲养层细胞的支持。LIF促进大鼠ES细胞的自我更新, 但在2I条件下仅添加LIF还不能完全维持大鼠ES细胞的生长, 细胞生长缓慢, 同时分化的细胞明显。而当在L/2I条件的基础上再添加bFGF即L/2I/b时, 可以看到细胞分化明显减少, 同时克隆形态也更为均一(图1A); 连续培养绘制生长曲线, 可以看到bFGF明显促进大鼠ES细胞的生长(图1B)。

2.2 大鼠ES细胞表达干性标志物

碱性磷酸酶染色结果显示, 维持在L/2I条件下的大鼠ES细胞分化明显, 而再添加bFGF可以显著减少细胞的分化, 细胞形成明显的碱性磷酸酶阳性克隆(图2A)。进一步对培养在L/2I/b条件下大鼠ES细胞进行免疫荧光染色分析, 结果显示, 大鼠ES细胞表达Oct-4、Nanog和SSEA-1这几个胚胎干细胞标志物, Oct-4和Nanog主要表达在细胞核内, 而SSEA-1主要表达在细胞表面(图2B)。

2.3 大鼠ES细胞体外分化

为检测维持在L/2I/b条件下大鼠ES细胞的分化能力, 进一步进行体外拟胚体分化实验。结果显示, 当去除LIF、2I和bFGF, 将大鼠ES细胞转换到分化诱导培养液后悬浮培养, 细胞能逐渐聚集形成拟胚

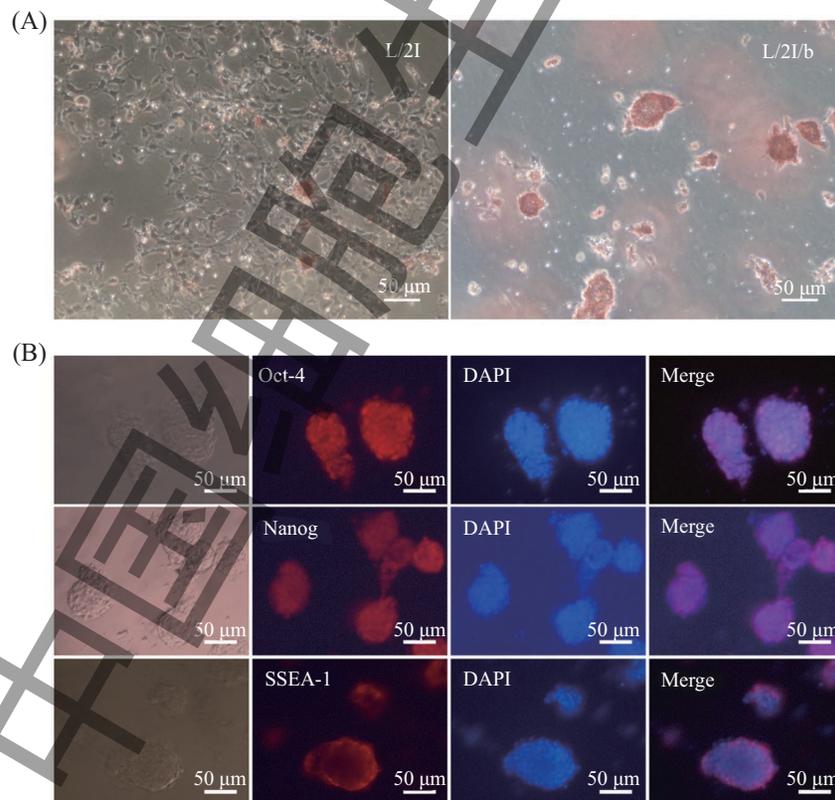


A: 不同条件下的大鼠ES细胞相差显微镜图片; B: 不同培养条件下大鼠ES细胞的生长曲线($n=3$, mean±S.D.)。

A: phase contrast image of rat ES cells cultured in different medium; B: plot of rat ES cell numbers during progressive passaging in medium supplemented with bFGF or without bFGF ($n=3$, mean±S.D.).

图1 bFGF促进大鼠ES细胞自我更新

Fig.1 bFGF promote self-renewal of rat ES cells



A: 大鼠ES细胞碱性磷酸酶染色结果; B: 免疫荧光检测L/2I/b条件下大鼠ES细胞Oct-4、Nanog、SSEA-1表达。

A: alkaline phosphatase staining of DA rat ES cells; B: immunofluorescence staining for Oct-4, Nanog, SSEA-1 of rat ES cells cultured in L/2I/b medium.

图2 大鼠ES干细胞标志物检测

Fig.2 Rat ES cells express pluripotency markers

体结构(图3A)。RT-PCR结果显示,当大鼠ES细胞形成拟胚体后,胚胎干细胞干性标志物*Oct-4*、*Nanog* mRNA水平逐渐降低,而内、中、外胚层相关的基因逐渐开始表达(图3B),这提示, L/2I/b条件下维持的大鼠ES细胞仍保持了分化为不同胚层细胞的能力,是具有多能性的干细胞。

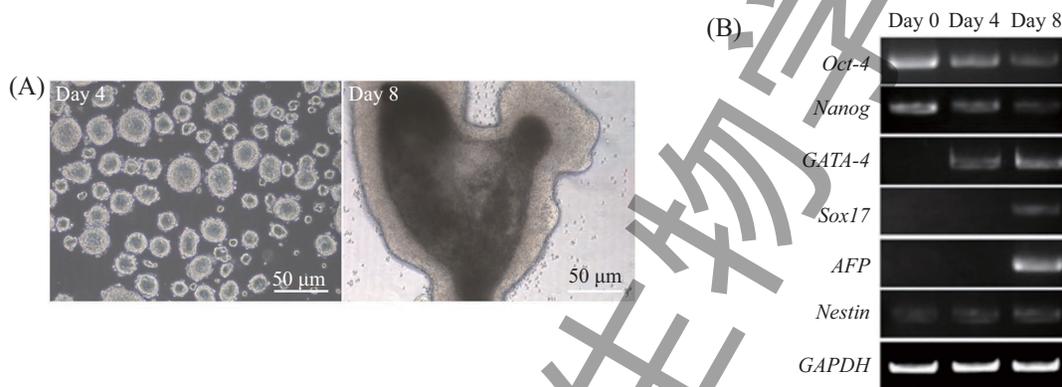
2.4 bFGF激活大鼠ES细胞PI3K信号途径

bFGF是一种多效应的细胞因子,它通过激活PI3K信号通路促进人胚胎干细胞的自我更新,但在大鼠ES细胞中的作用未见报道。Western blot检测结果显示, bFGF能促进大鼠ES细胞内AKT蛋白质磷酸

化(图4A),提示bFGF同样激活大鼠ES细胞PI3K下游信号通路。而bFGF受体抑制剂SU5402以及PI3K特异性的抑制剂LY294002同样能抑制bFGF引起的磷酸化AKT水平的上升。碱性磷酸酶检测克隆形成结果显示, bFGF促进大鼠ES细胞的克隆形成, SU5402和LY294002均显著抑制了大鼠ES细胞的克隆形成(图4B)。这些结果表明, bFGF对大鼠ES自我更新具有促进作用,并且PI3K/AKT介导的信号通路起着关键作用。

2.5 大鼠ES细胞的原代分离

为检测L/2I/b能否支持大鼠原代胚胎干细胞的

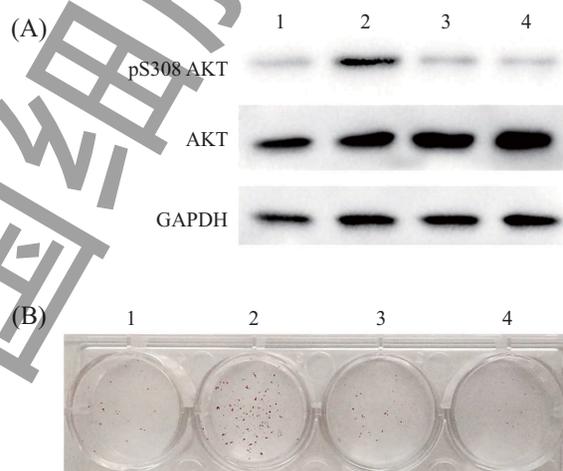


A: 大鼠ES细胞悬浮培养4 d和8 d后形成的拟胚体; B: RT-PCR检测大鼠ES细胞形成拟胚体过程中基因表达变化。

A: phase contrast image of Day 4 and Day 8 EBs formed from rat ES cells; B: RT-PCR analysis of gene expression in undifferentiated rat ES cells and EBs formed from rat ES cells.

图3 大鼠ES细胞体外分化

Fig.3 Differentiation of rat ES cells *in vitro*

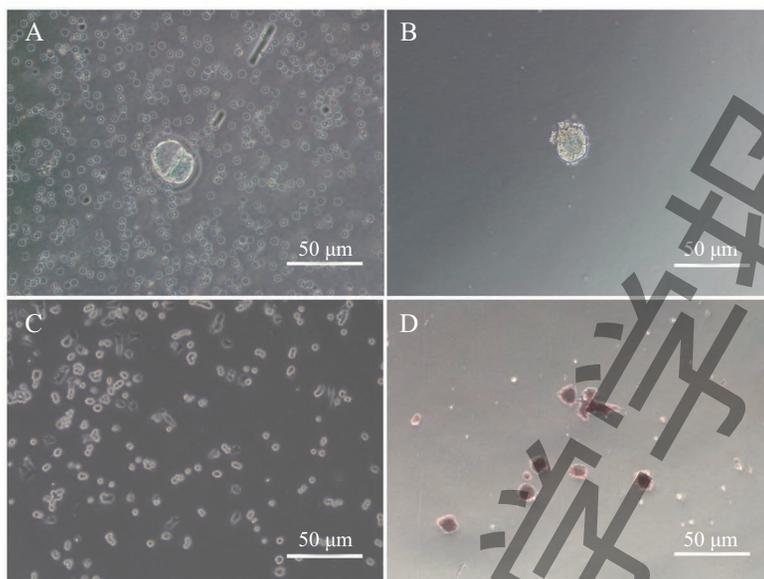


A: Western blot检测大鼠ES细胞AKT和AKT磷酸化水平; B: 碱性磷酸酶检测大鼠ES细胞克隆形成。1: L/2I; 2: L/2I/b; 3: L/2I/b+Su5402; 4: L/2I/b+LY294002。

A: Western blot analysis of AKT and phosphorylated AKT levels in rat ES cells; B: alkaline phosphatase staining of rat ES cells colonies cultured in different medium. 1: L/2I; 2: L/2I/b; 3: L/2I/b+Su5402; 4: L/2I/b+LY294002.

图4 bFGF激活大鼠ES细胞PI3K信号通路

Fig.4 Activation of PI3K signaling in rat ES cells by bFGF



A: 大鼠4.5 d囊胚; B: 囊胚培养形成细胞团; C: 光镜下的第2代大鼠ES细胞; D: 碱性磷酸酶检测结果。

A: 4.5 dpc (days post coitum) rat blastocyst; B: outgrowth of rat blastocyst; C: phase contrast image of rat ES cells at passage 2; D: alkaline phosphatase staining of rat ES cells.

图5 L/2I/b条件下大鼠ES细胞原代分离

Fig.5 Derivation of Rat ES cells in L/2I/b medium

分离提取, 将发育至4.5 d的大鼠囊胚培养于L/2I/b条件下, 经过5 d培养, 囊胚逐渐形成克隆, 进一步将克隆消化后培养, 细胞可以长期稳定维持培养在L/2I/b这一条件下, 细胞克隆呈碱性磷酸酶阳性(图5)。这些结果显示, bFGF结合L/2I可以支持大鼠ES细胞的原代分离。

3 讨论

随着对ES细胞自我更新机制的深入研究, 目前对于ES细胞的自我更新调控机制有了越来越清楚的认识。GSK3抑制剂抑制GSK3后激活Wnt信号通路, 稳定 β -catenin进一步入核后去除T细胞因子3(T cell factor 3, TCF-3)对Nanog的抑制作用, 从而促进小鼠ES细胞的自我更新^[10]。抑制ERK信号通路可以稳定细胞内KLF2和Nanog的水平, 促进小鼠ES细胞的自我更新^[11]。利用GSK3抑制剂与ERK抑制剂同时作用(2I)可以维持小鼠ES细胞在无血清和无饲养层细胞的条件下长期自我更新。2I培养体系下获得的小鼠ES细胞相比传统的LIF和血清培养体系下维持的小鼠ES细胞具有更均一的干性相关基因表达, 与早期囊胚内细胞团的基因表达谱更加相似。这一发现为进一步大鼠ES细胞的分离成功奠定了

基础^[12]。但是, 2I体系维持大鼠ES细胞的自我更新仍依赖于饲养层细胞的支持作用。饲养层细胞的存在一方面增加了细胞培养的难度, 同时也为分析细胞内在的调控机制增加了复杂性。

以往研究表明, 在ES细胞培养过程中, 饲养层细胞主要分泌LIF、bFGF等细胞因子促进ES细胞的自我更新。其中, LIF在小鼠ES细胞中的作用已经广泛报道, LIF通过STAT3信号通路激活KLF4(Kruppel-like factor 4)的表达从而进一步促进干性相关基因Oct-4的表达^[13]。而FGF是一种多功能的细胞因子, 通过与受体结合后激活下游的信号通路, FGF在调节细胞生长、分化、存活和迁移等过程中发挥着重要的作用。FGF激活的下游信号通路最主要包括PI3K和ERK信号通路^[14]。在小鼠ES细胞中, FGF激活ERK信号通路促进ES细胞的分化, 抑制ERK信号通路后, 可以促进小鼠ES细胞的自我更新。而相比小鼠ES细胞, 从植入后小鼠胚胎epiblast分离获得的多能性细胞(epiblast stem cell, EpiSC)则需要bFGF的作用来维持自我更新^[15]。人ES细胞与小鼠EpiSC相似, 相对小鼠ES细胞处于发育更为晚期的阶段。bFGF信号通路一方面抑制人ES细胞的分化, 同时也抑制人ES细胞向Naïve状态转变, 使人ES细胞稳定

维持在primed状态,抑制ERK信号通路促进人ES细胞分化^[16]。

本文通过对大鼠ES细胞培养条件的摸索发现,在2I培养体系的基础上,发现除了LIF, bFGF同样对大鼠ES细胞的自我更新具有促进作用。这主要是通过bFGF激活PI3K信号通路起作用。我们的结果显示, bFGF能提高大鼠ES细胞内的AKT磷酸化水平,大鼠ES细胞PI3K/AKT信号水平处于较低的水平,而bFGF可能通过提升大鼠ES细胞内PI3K/AKT的水平从而促进大鼠ES细胞的自我更新。以往研究已经表明,ES细胞的自我更新需要细胞内各种信号通路精确调控并维持在合适的水平,如Oct-4水平^[17]、Wnt信号^[9]、STAT3磷酸化水平^[18]等。我们的结果提示,适当水平的PI3K/AKT信号通路同样对大鼠ES细胞自我更新起着重要作用。同时, LIF和bFGF结合2I培养体系可以维持大鼠ES细胞在无饲养层条件下的自我更新,这一结果与目前在人ES细胞中获得的数据非常相似。由于不同物种来源的ES细胞调控机制存在一定的差异,能否获得人或者其他物种naïve状态的ES细胞是目前ES细胞研究的热点方向之一。Gafni等^[19]通过对培养体系的摸索,发现bFGF在维持naïve状态的人ES细胞也有重要的作用。这种naïve状态的ES细胞形态、基因表达谱等方面更加类似于小鼠ES细胞。不同于常规的人ES细胞, naïve状态的人ES细胞不依赖于ERK下游的信号通路^[20], bFGF激活PI3K下游的信号通路可能对维持naïve状态的人以及猴^[21]ES细胞的自我更新更加关键。

综合分析这些结果,我们推测, bFGF激活的PI3K信号通路可能在小鼠、大鼠以及人多能干细胞自我更新的调控过程中具有一定的共性,利用不同物种ES细胞研究所获得的结果将为深入理解ES细胞自我更新的机制提供更多的信息,从而更好地理解胚胎干细胞自我更新的调控机制。

参考文献 (References)

- Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: Attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 2002; 3(1): 33-42.
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al.* Germ-line competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1299-310.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1287-98.
- Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2010; 467(7312): 211-3.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336(6200): 688-90.
- Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, *et al.* Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 2005; 23(3): 315-23.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2048-60.
- Chen Y, Blair K, Smith A. Robust self-renewal of rat embryonic stem cells requires fine-tuning of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *Stem Cell Rep* 2013; 1(3): 209-17.
- Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol* 2011; 13(7): 838-45.
- Yeo JC, Jiang J, Tan ZY, Yim GR, Ng JH, Goke J, *et al.* Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014; 14(6): 864-72.
- Marks H, Kalkan T, Menafra R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, *et al.* The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 2012; 149(3): 590-604.
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009; 460(7251): 118-22.
- Lanner F, Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 2010; 137(20): 3351-60.
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448(7150): 191-5.
- Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, *et al.* Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(3): 215-26.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24(4): 372-6.
- Tai CI, Schulze EN, Ying QL. Stat3 signaling regulates embryonic stem cell fate in a dose-dependent manner. *Biol Open* 2014; 3(10): 958-65.
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 2013; 504(7479): 282-6.
- Duggal G, Warrier S, Ghimire S, Broekaert D, van der Jeught M, Lierman S, *et al.* Alternative routes to induce naive pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2015; 33(9): 2686-98.
- Fang R, Liu K, Zhao Y, Li H, Zhu D, Du Y, *et al.* Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2014; 15(4): 488-96.