

Chir99021 联合 PD0325901 对小鼠胚胎干细胞中 miRNAs 差异表达的影响

马一翔

上海市第二人民医院, 上海 200011

摘要: **目的** 通过研究 Chir99021 联合 PD0325901 对小鼠胚胎干细胞中 miRNAs 差异表达的影响, 为揭示胚胎干细胞的自我更新和分化的机制提供更多线索。**方法** 采用 miRNA 基因芯片技术检测 Chir99021 联合 PD0325901 处理组和 PD0325901 处理组 miRNAs 的表达谱差异。选取 3 倍以上及通过查文献与胚胎干细胞自我更新相关的 1.5 倍以上 3 倍以下的 miRNAs, 采用实时荧光定量 PCR 法验证, 利用 miRDB、Miranda 两个数据库交叉预测差异表达的靶基因, 并应用 KEGG Pathway 进行靶基因功能富集分析。**结果** 与 PD0325901 单独处理相比, Chir99021 联合 PD0325901 处理组有 47 种 miRNAs 上调 1.5 倍以上, 75 种 miRNAs 下调 1.5 倍以上; 用实时荧光定量 PCR 验证差异表达的 miRNAs, 结果显示 13 个 miRNAs 与芯片结果相符。靶基因预测分析显示, miR-466a-5p、miR-466d-5p 处于重要位置, Plcb1、Prkcb 处于关键基因位置。**结论** Chir99021 可引起小鼠胚胎干细胞中的 miRNAs 差异表达, 差异表达的 miRNAs 可能通过调控 Plcb1、Prkcb 基因而影响胚胎干细胞的自我更新。

关键词: Chir99021; PD0325901; 胚胎干细胞; miRNAs; 芯片; 生物信息学分析

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)11-1203-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.003

Effect of Chir99021 combined with PD0325901 on differential expression of miRNAs in embryonic stem cells of mouse

MA Yi-xiang

Shanghai Second People's Hospital, Shanghai 200011, China

Abstract: **Objectives** To study the effect of Chir99021 combined with PD0325901 on differential expression of miRNAs in embryonic stem cells of mouse, and to provide more clues for revealing the mechanism of embryonic stem cell self-renewal and differentiation. **Methods** The miRNA chip method was used to detect the differences of miRNAs expression between Chir99021 combined with PD0325901 treatment group and PD0325901 treatment group. The miRNAs which differentiated from PD0325901 group more than 3 times and between 1.5 and 3 times but relating self-renewal through previous literature were selected. The differentially expressed miRNAs were then verified by qRT-PCR method. The target genes of differentially expressed miRNAs were cross-forecast by miRDB and Miranda databases, and functional rich products of these target genes were assayed by KEGG Pathway. **Results** Compared with PD0325901 treatment group, 47 miRNAs were up-regulated more than 1.5 times and 75 miRNAs were down-regulated more than 1.5 times in Chir99021 combined with PD0325901 treatment group. qRT-PCR method verified 13 miRNAs. MiroRNA-Gene-Network showed that 466d-5p and 466a-5p might be critical miRNAs and play a key role in Plcb1 and Prkcb gene expression. **Conclusion** Chir99021 can induce differentially expressed miRNAs in embryonic stem cells, which may affect the embryonic stem cells self-renewal through miRNAs-induced Plcb1 and Prkcb gene expression.

Key words: Chir99021; PD0325901; embryonic stem cell; miRNAs; microarray; bioinformatic analysis

在干细胞定向分化过程中, 胚胎干细胞的自我更新被认为扮演重要角色。Ying 等^[1]发明了 Chir99021、PD0325901 屏蔽胚胎干细胞分化信号从

而维持其自我更新的培养方法, 即在无血清培养体系中, 通过 Chir99021、PD0325901 分别抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和糖原合成酶激酶 3 (GSK3)

收稿日期: 2014-07-14

作者简介: 马一翔, 男, 主治医师, 研究方向为骨科创伤。Tel: 13262751953 E-mail: happyma0512@163.com

后, 就能够维持小鼠胚胎干细胞的自我更新。可见 Chir99021 能影响胚胎干细胞的自我更新与分化, 但其具体机制目前并不清楚。miRNAs 是一类内源性的小分子非编码单链 RNA, 含 19~22 个核苷酸, 能够通过靶 mRNA 特异性地结合而导致靶 mRNA 降解或抑制其翻译, 从而对基因进行转录后调控^[2]。在胚胎或成体干细胞中存在特异的 miRNA, 在维持干细胞自我更新、多向分化潜能中起着重要作用^[3-4]。通过研究 miRNAs 在干细胞中的作用, 可进一步阐明干细胞自我更新和分化过程的内在机制。因此, 本实验考察 Chir99021 处理胚胎干细胞后引起的 miRNAs 的表达改变, 通过芯片和生物信息学分析拟揭开 Chir99021 影响胚胎干细胞自我更新和分化的作用机制。

1 材料

1.1 实验细胞株

E14Tg2a 小鼠 ESC 系为美国南加州大学应其龙教授惠赠。

1.2 细胞培养试剂

PD0325901 (规格 10 mg, 批号 S103606, 质量分数 99.68%)、Chir99021 (规格 10 mg, 批号 S292402, 质量分数 99.07%) 购于 Stemgent 公司, DMEM/F12 培养液、Neurobasal 培养液购自 Gibco 公司, 非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、谷氨酰胺替代品购自 Invitrogen 公司, 0.25%胰酶购自 Sigma 公司。

1.3 主要试剂

反转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒购自 Takara 公司, 转染试剂 (lipofectamine2000)、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, miRNeasyminikit 购自 Qiagen 公司, 引物由 Invitrogen 公司合成, 采用 PAGE 纯化。

2 方法

2.1 胚胎干细胞培养

E14Tg2a 细胞培养于 DMEM 高糖+0.15%的胎牛血清+0.1 mmol/L β -巯基乙醇+10 g/L 非必需氨基酸+2 mmol/L 谷氨酰胺。0.25%胰酶消化, 按照 1:8 传代, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。待实验时, 撤除血清加入 Chir99021、PD0325901, 48 h 后进行相关检测。

2.2 碱性磷酸酶 (AKP) 染色

细胞培养 48 h 后, PBS 洗 2 遍, 加入无水乙醇 4 °C 固定 10 min, PBS 漂洗 2 次, 25 mmol/L Tris-Cl (pH 9.0) 漂洗 1 次, 加入新鲜配制的坚牢红 AP 染

色液 (Sigma 公司) 室温放置, 15~30 min 后阳性细胞即呈现红色, PBS 清洗以终止反应。使用前用 25 mmol/L Tris-Cl (pH 9.0) 配制, 含 0.4 mg/mL α -萘基磷酸酯 (Sigma 公司), 1 mg/mL Fast Red TR (Sigma 公司), 8 mmol/L MgCl₂。

2.3 miRNAs 基因芯片

miRNAs 芯片由上海康成生物工程有限公司完成。用 Trizol 试剂、miRNeasyminikit 按照说明书抽提实验组和对照组细胞的总 RNA, 并利用 RNA NanoDrop 1000 分光光度计进行质量检测。采用 miRCURY™ Array Labeling Kit 试剂盒按说明书提示方法对 miRNA 进行标记。应用 miRCURY™ Hy3TM/Hy5TM 标记试剂盒标记 miRNA, 得到用于与芯片杂交的探针, 与 miRCURY™ LNA Array (v.16.0) 芯片进行杂交。使用 Axon GenePix 4000B 生物晶片扫描器进行图像扫描。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (q-RT-PCR)

按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 经 PrimeScript RT reagent Kit 合成 cDNA。cDNA 以 1:20 稀释, 取 2 μ L 作为模板, 进行 PCR 扩增特异性基因片段, 并以 U6 作为内参对照。U6 的引物序列: 上游引物 (CTCGCTTCGGCAGCACA), 下游引物 (AACGCTTCACGAATTTGCGT), Hi-Rev 反向引物序列为 CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC。按照 Takara 的 SYBR GREEN 荧光定量试剂盒的说明进行。上游引物见表 1, 下游引物为通用引物 Hi-Rev。采用 U6 作为内参进行归一化。

2.5 生物信息学分析

由上海其明信息技术有限公司完成。芯片的分析主要设定在经过 qRT-PCR 验证与芯片结果相符的 13 个 miRNAs。用 miRDB、Miranda 两个靶标基因数据库对 miRNAs 进行交叉预测, 找出共同的靶基因。Pathway-Analysis 对筛选出的差异 miRNA 的靶基因进行信号通路分析, 按照 $P \leq 0.01$ 筛选出具有显著性、可靠性的信号通路。MiroRNA-Gene-Network 构建 Pathway 分析结果中显著性信号通路基因群及其对应差异 miRNA 的相互作用网络, 定位核心调控 miRNA。Signal-Net 基于 KEGG 数据库, 利用 KEGG 数据库中的基因之间, 基因产物之间的作用关系, 通过数据库搜索得到每个基因与其他基因的作用关系, 可全面发现目标基因群之间作用关系, 然后构建基因间的相互作用关系, 定位核心靶基因。

表 1 32 个 miRNAs 及对应的正向引物序列
Table 1 32 miRNAs and related forward primer sequences

引 物	序 列
mmu-mir-466a-3p	GCTATACATACACGCACACATAAGA
mmu-mir-466d-3p	CTGACTATACATACACGCACACA
mmu-mir-466d-5p	GACTTGTGTGTGCGTACATGTA
mmu-mir-467b-5p	CGGAGTAAGTGCCTGCATGTATA
mmu-mir-467d-3p	GCCATATACATACACACACCTACAC
mmu-mir-467e-5p	CGGATAAGTGTGAGCATGTATATGT
mmu-mir-669a-5p	GCGTCTAGTTGTGTGTGCATGTTTAT
mmu-mir-669e-5p	CAGTGTCTTGTGTGTGCATGTT
mmu-mir-669o-5p	GCGTAGTTGTGTGTGCATGTTTAT
mmu-mir-669i	TGCTGCATATACACACATGCATAC
mmu-mir-669k-5p	TGTGCATGTGTGTATAGTTGTGTG
mmu-mir-181d-5p	CCAACATTCATTGTTGTCGGTGCGT
mmu-mir-20b-3p	ACCACTGCAGTGTGAGCACTTCTAG
mmu-mir-302d-3p	CCATAAGTGCTTCCATGTTTGAGTGT
mmu-mir-674-5p	GCACTGAGATGGGAGTGGTGTAA
mmu-mir-23a-3p	GCCGCATCACATTGCCATTTATTTCC
mmu-mir-466a-5p	TATGTGTGTGTACATGTACATA
mmu-miR-883b-5p	CTACTGAGAATGGGTAGCAGTCA
mmu-miR-302a-3p	GCTAAGTGCTTCCATGTTTTGGTGA
mmu-miR-302b-3p	CGTAAGTGCTTCCATGTTTGTAGTAG
mmu-miR-542-3p	CGGTGTGACAGATTGATAACTGAA
mmu-miR-700-5p	GTCATAAGGCTCCTTCTGTGCT
mmu-miR-144-3p	CGCGCTACAGTATAGATGATGTACT
mmu-miR-493-5p	GCCGATTGTACATGGTAGGCTTTC
mmu-miR-367-3p	CGCAATTGCACTTTAGCAATGGTGA
mmu-miR-300-3p	GATATGCAAGGGCAAGCTCTCTTC
mmu-miR-190-5p	GCGTGATATGTTTGATATATTAGG
mmu-miR-376c-3p	CGCGAACATAGAGGAAATTCACGT
mmu-miR-758-3p	GCGTTTGTGACCTGGTCCACTA
mmu-miR-499-5p	GCCTCGTTAAGACTTGCAAGTGTATGT
mmu-miR-431-3p	CAGGTCGTCTTGACAGGGCTTCT
mmu-miR-451	GCCGAAACCGTTACCATTACTGAG

3 结果

3.1 细胞培养和鉴定

单独添加 PD0325901 0.3 nmol/L 组小鼠胚胎干细胞生长缓慢, 经过 2 次传代后, 细胞发生部分的分化和死亡; 同时添加 PD0325901 0.3 nmol/L 和 Chir99021 5 nmol/L 处理组细胞呈现典型的干细胞克隆生长, 并且可以持续传代。见图 1。

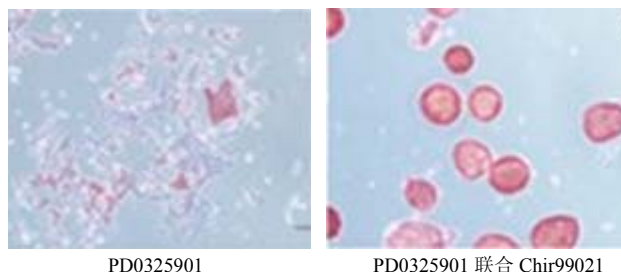


图 1 细胞形态学

Fig. 1 Cell morphology

3.2 miRNAs 基因芯片

结果显示, 与 PD0325901 0.3 nmol/L 组比较, 同时添加 PD0325901 0.3 nmol/L 和 Chir99021 5 nmol/L 处理组 miRNAs 上调 1.5 倍及以上的有 47 个, 下调 1.5 倍及以上的有 75 个。

3.3 实时荧光定量 q-RT-PCR

芯片的验证分析主要设定在 3 倍以上差异表达及与干细胞自我更新、细胞周期相关的 1.5 倍以上 miRNAs 中。所以纳入后续验证分析的 miRNAs 共 32 个。其中 3 倍以上差异表达的 miRNAs 共 23 个, 分别为 miR-144-3p、miR-181d-5p、miR-190-5p、miR-20b-3p、miR-23a-3p、miR-451、miR-466a-5p、miR-466d-5p、miR-467b-5p、miR-499-5p、miR-669a-5p、miR-669o-5p、miR-674-5p、miR-700-5p、miR-300-3p、miR-302b-3p、miR-367-3p、miR-376c-3p、miR-431-3p、miR-493-5p、miR-542-3p、miR-758-3p、miR-883b-5p, 1.5 倍以上 3 倍以下的 miRNAs 共 9 个, 分别为 miR-302a-3p、miR-302d-3p、miR-466a-3p、miR-466d-3p、miR-467d-3p、miR-467e-5p、miR-669e-5p、miR-669i、miR-669k-5p。

对 32 个 miRNAs 进行实时荧光定量 q-RT-PCR 验证, 结果 13 个 miRNAs 与芯片结果相符, 分别为 mmu-mir-466a-3p、mmu-mir-466d-3p、mmu-mir-466d-5p、mmu-mir-467b-5p、mmu-mir-467d-3p、mmu-mir-669a-5p、mmu-mir-669e-5p、mmu-mir-669k-5p、mmu-mir-466a-5p、mmu-mir-302a-3p、mmu-mir-302b-3p、mmu-mir-302d-3p、mmu-mir-367-3p。

3.4 miRNAs 靶基因预测及显著性信号通路分析

用 miRDB、Miranda 两个靶标基因数据库对 miRNAs 进行交叉预测, 找出共同的靶基因, 13 个 miRNAs 共有 726 个两个数据库交集的靶基因。对 miRNAs 进行信号通路的显著性分析, 按照 $P \leq 0.01$ 得到差异表达的 miRNAs 参与的上调 (图 2) 和下调显著性 Pathway (图 3)。

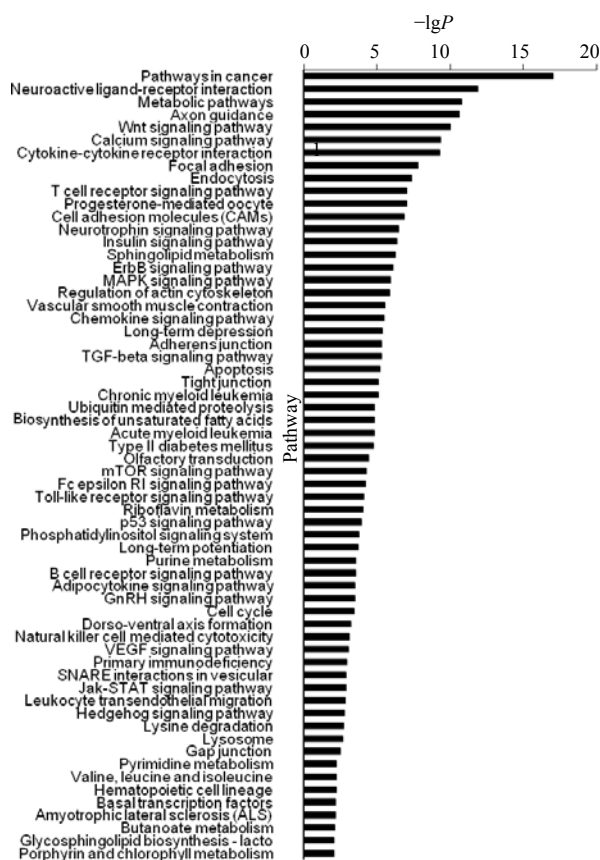


图 2 上调显著性的 Pathway 值柱状图

Fig. 2 Significant up-regulation Pathway

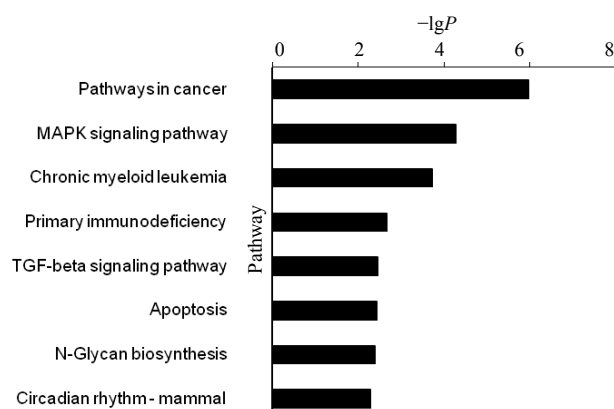


图 3 下调显著性的 Pathway 值柱状图

Fig. 3 Significant downward Pathway

可以看出, 上调差异基因参与的显著性信号转导通路包括癌症信号通路、刺激神经组织的配体与受体相互作用、代谢相关通路、轴突导向相关通路和 Wnt 信号通路等; 下调差异基因参与的显著性信号转导通路包括癌症信号通路、MAPK 信号通路和慢性白血病相关通路等。

纵坐标表示 Pathway 种类, P 值取对数再取负值, $-\lg P$ 值越大表明 P 值越小, 说明 Pathway 显著

性水平越高

3.5 miRNAs 与交集靶基因的调控网络

构建 Pathway 分析结果中显著性信号通路基因群及其对应差异 miRNA 的相互作用网络, 定位核心调控 miRNA(表 2、图 4)。可以看出 miR-466d-5p、miR-466a-5p、miR-466a-3p、miR-466d-3p、miR-181d-5p 等是网络中相对关键的 miRNAs, 在 PD0325901 和 Chir99021 作用中有可能参与调控更多靶基因。

表 2 MiroRNA-Gene-Network 图

Table 2 MiroRNA-Gene-Network

MicroRNA	调控方式	靶基因个数
mmu-miR-466d-5p	up	238
mmu-miR-466a-5p	up	104
mmu-miR-466a-3p	up	71
mmu-miR-466d-3p	up	67
mmu-miR-669k-5p	up	47
mmu-miR-467d-3p	up	45
mmu-miR-302a-3p	down	33
mmu-miR-302b-3p	down	31
mmu-miR-302d-3p	down	29
mmu-miR-669a-5p	up	24
mmu-miR-669e-5p	up	19
mmu-miR-367-3p	down	12
mmu-miR-467b-5p	up	6

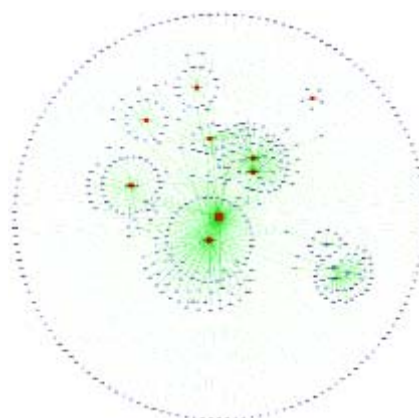


图 4 13 个 miRNAs 与靶基因的网络图

Fig. 4 Network of 13 miRNAs and target gene

3.6 Singal-net

通过构建得到的基因相互作用网络, 可以发现目标基因群之间的关系, 并定位目标基因的上游蛋白和下游蛋白, 最终定位关键基因(图 5)。利用网络中基因的 Betweenness centrality 和 Degree 可以得到网络中的关键基因, 结果见表 3 ($\text{degree} \geq 5$ 及

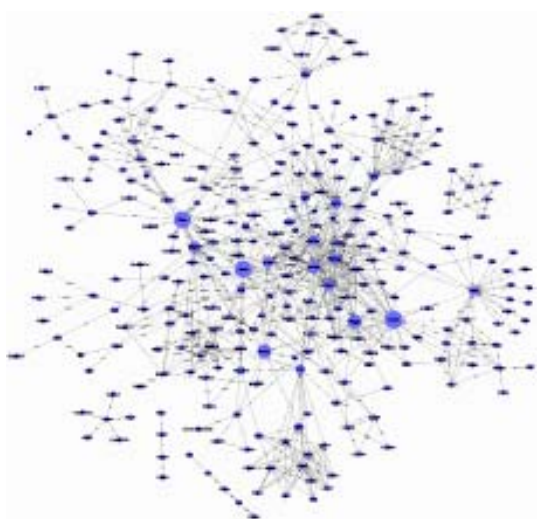


图 5 基因间相互作用网络

Fig. 5 Interaction network in genes

表 3 基因间相互作用网络中的关键基因

Table 3 Key genes of interaction network

Gene symbol	betweenness centrality	degree	indegree	outdegree
Plcb1	0.999 951 144	31	29	21
Akt3	0.935 097 563	20	7	13
Prkx	0.926 581 505	21	7	17
Prkcb	0.691 755 834	14	3	12
Plcg2	0.680 012 619	26	24	19
Pik3r5	0.536 620 376	33	25	14
Mapk1	0.484 766 453	25	14	11
Igflr	0.473 912 028	24	16	10
Pik3r1	0.445 458 928	32	24	13
Pik3ca	0.436 749 883	31	23	13
Pik3cg	0.435 779 124	31	22	13
Kras	0.405 709 523	28	18	10
Gnaq	0.343 990 527	22	21	1
Crk	0.321 058 644	15	11	8
Tyk2	0.307 874 482	18	13	5
Gnal	0.268 093 439	12	9	4
Fgfr2	0.235 560 542	19	13	7
Mdm2	0.233 438 074	5	1	4
Itgb3	0.221 832 010	10	9	4
Irs4	0.211 611 056	11	7	4

Betweenness centrality ≥ 0.2)。可以看出, Plcb1、Akt3、Prkx、Prkcb 等在整个 Signal-Net 中处于相对关键的位置。将 13 个阳性 miRNAs 和 Signal-net 关键基因对应的关键 miRNAs 结合分析, 可以看出, miR-466a-5p、miR-466d-5p 处于重要位置, 很可能

靶向抑制关键基因 PKC、Plcb1 等, 从而维持胚胎干细胞的自我更新。

4 讨论

胚胎干细胞在再生医学、组织工程、药物研究等领域有着广阔的应用前景, 但需要对于干细胞自我更新和分化的调控机制进一步阐明才能将其真正应用于临床。Ying 等^[1]的研究表明在无血清培养条件下 Chir99021 能提高小鼠胚胎干细胞的存活率, 促进其自我更新。本实验单独添加 PD0325901 组细胞在单独条件下, 克隆边缘有分支、密度低; 而在同时添加 PD0325901 和 Chir99021 处理条件下, 细胞克隆较大、密度较高、且可以多次传代, 表明 Chir99021 在细胞自我更新和维持中发挥着非常重要的作用。

近年来研究发现, miRNAs 在胚胎干细胞自我更新中起重要作用。如 Viswanathan 等^[5]报道细胞内的 RNA 结合蛋白 Lin28 在未分化的胚胎干细胞中阻止 pri-let7 加工成熟, 维持胚胎干细胞的多能性状态。本研究发现 122 个 miRNAs 存在着 1.5 倍以上差异表达, 其中上调的有 47 种, 下调的有 75 种。

虽然研究表明利用基因芯片筛选差异 miRNAs 是可行的, 但是由于芯片检测存在一定的假阳性率、不稳定性及可重复性较差等缺点, 需要进一步对 miRNAs 进行实时定量 RT-PCR 验证。选取 3 倍以上差异表达的 23 个 miRNAs 及与胚胎干细胞自我更新相关的、差异 1.5 倍以上的 9 个 miRNAs 进行 qRT-PCR 验证, 结果显示 13 个 miRNAs 芯片结果相符, 分别为 mmu-mir-466a-3p、mmu-mir-466d-3p、mmu-mir-466d-5p、mmu-mir-467b-5p、mmu-mir-467d-3p、mmu-mir-669a-5p、mmu-mir-669e-5p、mmu-mir-669k-5p、mmu-mir-466a-5p、mmu-mir-302a-3p、mmu-mir-302b-3p、mmu-mir-302d-3p、mmu-mir-367-3p。

生物信息学方法近年来得到广泛应用。实验中首先用 miRDB、Miranda 两个靶标基因数据库对上述 13 个 miRNAs 进行交叉预测, 找出共同的靶基因总和为 726 个。将差异基因参与的信号转导通路按 $P\leq 0.01$ 进行一个显著性 Pathway 分析, 上调差异基因参与的显著性信号转导通路有 62 项, 下调差异基因参与的显著性信号转导通路有 8 项。构建 Pathway 分析结果中显著性信号通路基因群及其对应差异 miRNA 的相互作用网络, 定位核心调控 miRNA, 将 13 个阳性 miRNAs 与关键 miRNAs 结合分析, 13 个阳性 miRNAs 中关键 miRNAs 按次序

排列依次为 miR-466d-5p、miR-466a-5p、miR-466a-3p、miR-466d-3p、miR-669k-5p、miR-467d-3p、miR-320a-3p、miR-302b-3p、miR-302d-3p、miR-669a-5p、miR-669e-5p、miR-367-3p、miR-467b-5p。可以看出 miR-466d-5p、miR-466a-5p 是比较关键的 miRNAs。

构建 Pathway 分析结果中显著信号通路基因群之间的相互作用网络,可发现核心的调控基因,将 13 个 miRNAs 及对应的靶基因结合分析,可以看出靶基因 *Plcb1*、*Prkcb* 既是比较关键靶基因,其对应的 miRNAs: miR-466a-5p、miR-466d-5p 也是关键的 miRNA。

Chir99021 已被证明抑制 GSK3 后激活 Wnt 通路,通过下游一些分子最终来维持胚胎干细胞的自我更新^[6-7],但 Chir99021 抑制 GSK3 引起的 miRNAs 变化未见报道。本实验从 miRNAs 的角度探讨 Chir99021 对胚胎干细胞的影响,同时添加 PD0325901 和 Chir99021 处理组细胞在 Chir99021 的作用下影响关键 miRNAs,如 miR-466a-5p、miR-466d-5p 的表达。从上述结果可以推断出,Chir99021 抑制 GSK3 激活 Wnt 通路后,引起细胞内 miRNAs 表达谱的变化,一些 miRNAs,如 miR-466a-3p、miR-466a-5p、miR-466d-5p 等通过靶向作用于负向调控胚胎干细胞自我更新的分子,最终促进胚胎干细胞的自我更新。

后续对于筛查的 miRNAs 及其靶基因功能的调节探索将进一步揭示胚胎干细胞的自我更新与分化的机制,并可能为骨科肿瘤及人工骨关节再生与置换提供更多线索。

参考文献

- [1] Ying Q L, Wray J, Nichols J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-523.
- [2] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 9-14.
- [3] Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific microRNAs [J]. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351-358.
- [4] Ishii H, Saito T. Radiation-induced response of micro RNA expression in murine embryonic stem cells [J]. *Med Chem*, 2006, 2(6): 555-563.
- [5] Viswanathan S R, Daley G Q, Gregory R I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28 [J]. *Science*, 2008, 320(5872): 97-100.
- [6] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(3): 119-129.
- [7] Vijayaragavan K, Szabo E, Bossé M, *et al.* Noncanonical Wnt signaling orchestrates early developmental events toward hematopoietic cell fate from human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 248-262.