

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.12.001

Prdm14 对 C3H10T1/2 细胞增殖及干性的影响^{*}

龙春兰¹, 周 宇², 易 勤³, 谭 彬⁴, 许 皓⁵, 魏光辉⁶, 朱 静^{1△}

1. 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 重庆 400014; 2. 扬州大学附属淮安市妇幼保健院儿童康复科, 江苏淮安 223001; 3. 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014; 4. 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; 5. 重庆医科大学附属儿童医院检验科, 重庆 400014; 6. 重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 重庆 400014

摘 要:目的 探讨 PR 结构域蛋白 14(Prdm14)对 C3H10T1/2 细胞增殖及干性的影响。方法 该实验分为空白对照组(正常 C3H10T1/2 细胞)、阴性对照组(感染慢病毒空载体的 C3H10T1/2 细胞)以及实验组(感染 Prdm14 慢病毒的 C3H10T1/2 细胞),分别采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、蛋白质印迹法(WB)检测 Prdm14 mRNA 及蛋白水平。采用 CCK-8 及细胞克隆形成实验检测 C3H10T1/2 细胞增殖情况;通过碱性磷酸酶(ALP)染色及活性测定,观察 ALP 活性情况;采用 WB 检测干性因子 Sox2、Nanog、Oct4 表达。结果 与阴性对照组相比,实验组 Prdm14 mRNA 及蛋白水平均明显升高($P<0.05$),ALP 活性及细胞增殖能力增强($P<0.05$),干性因子 Sox2、Nanog 蛋白水平均明显升高($P<0.05$),Oct4 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Prdm14 可促进 C3H10T1/2 细胞增殖及干性因子表达。

关键词:PR 结构域蛋白 14; C3H10T1/2 细胞; 增殖; 干性

中图法分类号:Q813

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)12-1665-05

Effects of Prdm14 on proliferation and stemness of C3H10T1/2 cells^{*}

LONG Chunlan¹, ZHOU Yu², YI Qin³, TAN Bin⁴, XU Hao⁵, WEI Guanghui⁶, ZHU Jing^{1△}

1. National Clinical Research Medical Center for Child Health and Disorders, Chongqing 400014, China; 2. Department of Children's Rehabilitation, Affiliated Huaian Maternal and Child Health Care Hospital, Yangzhou University, Huainan, Jiangsu 223001, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China; 4. Chongqing Municipal Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China; 5. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; 6. Department of Urologic Surgery, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of PR domain zinc finger protein 14 (Prdm14) on the proliferation and stemness of C3H10T1/2 cells. **Methods** In the experiment, blank control group (normal C3H10T1/2 cells), negative control group (C3H10T1/2 cells infected with lentivirus empty vector) and experimental group (C3H10T1/2 cells infected with Prdm14 lentivirus) were set up, and the mRNA and protein levels of Prdm14 were detected by real time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting (WB). The proliferation of C3H10T1/2 cells was tested by CCK8 and cell clonal formation assay. The alkaline phosphatase (ALP) staining and activity determination were performed to observe the ALP activity. The expression of Sox2, Nanog and Oct4 were detected by WB. **Results** Compared with the negative control group, the levels of Prdm14 mRNA and protein in the experimental group increased significantly ($P<0.05$), the ALP activity and cell proliferation ability increased ($P<0.05$), the levels of dry factor Sox2 and Nanog protein increased significantly ($P<0.05$), and the OCT4 protein level had no statistical significant different ($P>0.05$). **Conclusion** Prdm14 can promote the proliferation and stem factor expression of C3H10T1/2 cells.

Key words: PR domain zinc finger protein 14; C3H10T1/2 cells; proliferation; stemness

PR 结构域蛋白 14(Prdm14)为 PRDM 家族重要成员,具有 1 个 PR 结构域和 6 个简单重复的锌指结构(C2H2)。Prdm14 没有组蛋白甲基转移酶活性,但它可以募集一系列组蛋白修饰酶到靶启动子,通过表

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(82270271);教育部重点实验室基础研究青年项目[(2021)345 号-YBRP-202114]。

作者简介:龙春兰,技师,主要从事儿童生殖发育与组织工程方面的研究。△ 通信作者, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230427.1808.002.html\(2023-04-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230427.1808.002.html(2023-04-28))

观遗传重编程控制基因表达活性^[1-2],也可以通过锌指结构与序列 5'-GGTTAGAGACCC-3'结合,直接调控靶基因的转录^[3]。因此,Prdm14 拥有转录因子和甲基转移酶的双重功能,被认为通过协同其他因子参与特定基因的转录调节过程。

Prdm14 在早期多能性细胞、原始生殖细胞(PGCs)以及胚胎干细胞(ESCs)中表达,具有维持细胞干性和抑制细胞分化的效应^[4-5]。ESCs 中,多能性主要由转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 等构成的核心转录调控网络来维持^[6]。全基因组定位分析显示,Prdm14 与 Oct4、Nanog、Sox2 等其他关键转录因子广泛共定位,表明 Prdm14 已整合到核心转录调控网络中^[7-8]。在 PGCs 发育过程中,重获多向分化潜能是 PGCs 命运决定的重要调控事件之一,而 Prdm14 是 PGCs 能否重新获得多向分化潜能的关键调控因子。在 PGCs 中,Prdm14 与 Tfap2c 和 Blimp1 协同作用,上调生殖细胞和多能性基因,同时抑制 WNT 信号和体细胞标记物^[9]。Prdm14 的表达随着 PGCs 分化而受到抑制,在一定条件下,来源于 Prdm14^{+/+}胚胎的 PGCs 能够去分化形成多能性的胚胎生殖细胞,而 Prdm14^{-/-}胚胎的原始生殖样细胞(PGCLCs)几乎不能形成胚胎生殖细胞样克隆,并且 Prdm14^{-/-}的 PGCLCs 中,其核心多能性基因及生殖细胞相关基因未能重新激活^[10]。

Prdm14 也有助于在缺乏多向分化潜能的细胞中诱导多能性。研究显示,当 Prdm14 与 Oct4、Sox2、Klf4 共同表达时能够提高成纤维细胞的重编程效率^[7]。与植入后的外胚层和 ESCs 相比,外胚层干细胞(EpiSC)不表达 Prdm14,并且不具备向 PGCs 特化的潜能,外源性 Prdm14 能与 Klf2 协同作用,加速和促进小鼠 EpiSCs 向幼稚多能状态的 ESCs 逆转及向 PGC 特化^[11-12]。

Prdm14 可通过干性因子等构成的转录调控网络来调节 ESCs、生殖细胞的多能性,然而,Prdm14 在其他细胞中的表达及作用如何,尚不清楚。因此,本研究拟探讨 Prdm14 对 C3H10T1/2 细胞增殖及干性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 C3H10T1/2 细胞(中国科学院细胞库)。

1.2 仪器与试剂 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置荧光显微成像系统(日本 Nikon 公司),柱式 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司],过表达 Prdm14 慢病毒(上海吉凯基因化学技术有限公司),胎牛血清、DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗 Prdm14 抗体(Abcam 公司,批号:187881),兔抗 Sox2 抗体(ProteinTec 公司,批号:11064-1-AP),兔抗 Oct4 抗体(ProteinTec 公司,批号:11263-1-AP),兔抗

Nanog 抗体(Zenbio 公司,批号:385080),小鼠抗 β -actin、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗、Cy3 山羊抗兔二抗、Cy3 山羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、Hoechst 33342(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 取生长良好的对数期 C3H10T1/2 细胞,消化传代后,补充新鲜完全培养基(含 10%胎牛血清)至 10 mL,晃动培养皿,使细胞均匀分布,于 37℃、5%CO₂ 恒温细胞培养箱中培养。

1.3.2 构建 Prdm14 过表达细胞株 本研究选用 Tet-on 可诱导基因表达慢病毒系统,可在目的细胞中获得可灵敏调控的目的基因表达。在细胞培养基中不含多西环素(Dox)时,目的基因本底表达量极低,加入 Dox 后,目的基因诱导表达量极高。载体信息如下:基因名称为 Prdm14(NM_001081209),载体名称为 CV259,元件顺序为 TetIIP-MCS-3FLAG-CMV-EGFP-Ubi-TetR-IRES-Puromyc。本实验分为空白组(正常 C3H10T1/2)、阴性对照组(感染慢病毒空载体的 C3H10T1/2)以及实验组(感染 Prdm14 慢病毒的 C3H10T1/2)。

按 2×10^4 个细胞/孔于无菌 6 孔板中均匀接种细胞,培养 12 h 后,加入适量病毒,感染 24 h 后更换为完全培养基,继续培养 48 h,倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况,以确定慢病毒是否感染成功。嘌呤霉素筛选后,经 Dox 诱导 48 h,收集细胞用作后续检测。

1.3.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Prdm14 mRNA 表达 参考 RNA 柱式提取试剂盒说明书,提取总 RNA 进行反转录,随后将经反转录产物进行 RT-qPCR,以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量,检测 3 组细胞中 Prdm14 mRNA 表达情况,引物见表 1。

表 1 引物序列	
引物名称	引物序列(5'-3')
Prdm14	F:ACAGCCAAGCAATTTGCACTAC
	R:TTACCTGGCATTTCATTGCTC
β -actin	F:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R:GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

1.3.4 蛋白质印迹法(WB)检测 收集细胞沉淀,加入 400 μ L 裂解液[含 10%苯甲基磺酰氟(PMSF)],直接混匀,冰上裂解 10 min 离心,取上清液,即为总蛋白;变性后的蛋白经聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳、转膜、封闭后,加入稀释好的一抗(Prdm14、Sox2、Oct4、Nanog),4℃过夜。次日,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜经复温、TBST 缓冲液漂洗后,加入相应的二抗,室温孵育 1 h,随后采用电化学发光(ECL)试剂,于化学发光显影成像系统成像,采集图片,通过 Image J 对图像灰度值进行分析。

1.3.5 碱性磷酸酶(ALP)检测 ALP 主要存在于物质交换活跃处。ESCs、PGCs 前体细胞等干性细胞均呈 ALP 阳性,为进一步探索高表达 Prdm14 对 C3H10T1/2 细胞的作用,本研究进行了 ALP 活性检测。分别收集阴性对照组和实验组细胞,制成细胞悬液,取 100 μ L 细胞悬液滴于防脱载玻片,室温充分干燥后,4%多聚甲醛固定,滴加配制好的 ALP 孵育液,进行 ALP 染色,镜检,ALP 活性部位为蓝色;根据 ALP 活性检测试剂盒说明书,检测在不同组别培养上清液中的 ALP 活性,以 DEA 酶活力单位表示。

1.3.6 细胞增殖能力检测 96 孔板中按 3 000 个细胞/孔加入细胞悬液,每组细胞设 6 个复孔,轻晃培养板,使细胞均匀分布,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 恒温细胞培养箱中培养;实验设置 5 个 Dox 诱导时间点:0、24、48、72、96 h,每日观察细胞生长状况并及时更换新的诱导培养基,在不同时间点吸弃板中的旧培养基,每孔重新加入含 10 μ L CCK-8 的完全培养基 100 μ L,于恒温细胞培养箱中孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)。

1.3.7 细胞克隆形成实验 取生长良好的对数期细胞,以每孔 400、800、1 600 个细胞的梯度密度分别接种于 6 cm 培养皿中,混匀,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下,静置培养 14 d,培养 7 d 时换液。14 d 后,终止培养。多聚甲醛固定后采用结晶紫染色,洗去染色液,

空气干燥。采用 Image J 测定克隆直径,并计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 SNK-*q* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

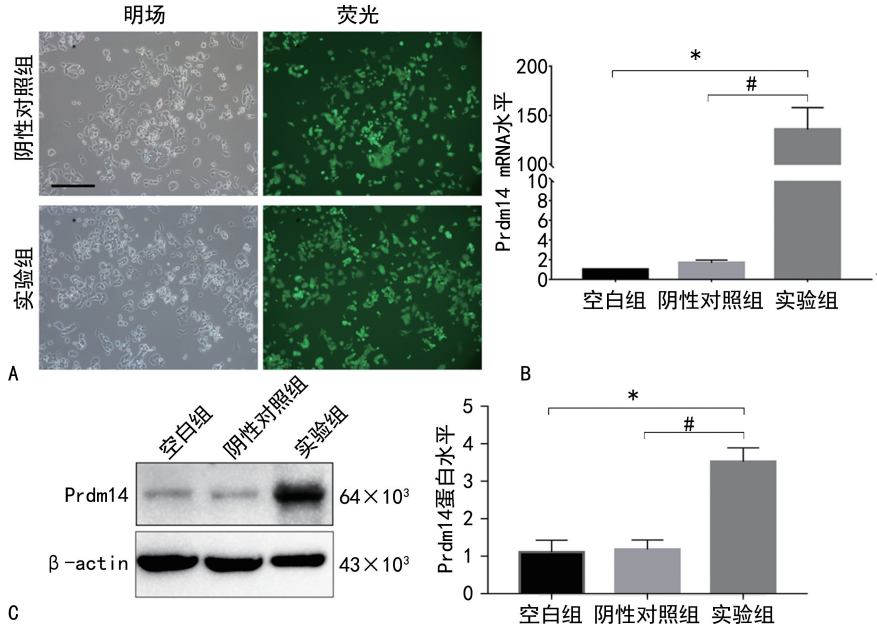
2 结 果

2.1 构建 C3H10T1/2-Prdm14 过表达细胞株 采用 Tet-on 系统构建 C3H10T1/2-Prdm14 过表达细胞株,经嘌呤霉素筛选后,Dox 诱导 48 h,可以在荧光显微镜下观察到绿色荧光,见图 1A。进一步采用 qRT-PCR 和 WB 分别检测 Prdm14 的 mRNA 和蛋白表达情况,结果显示,与阴性对照组相比,实验组中 Prdm14 的 mRNA 和蛋白水平均明显升高($P < 0.05$),见表 2 和图 1B、C。

表 2 各组 Prdm14 的 mRNA 和蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白
空白组	1.00 $\pm$ 0.00 [*]	1.11 $\pm$ 0.32 [*]
阴性对照组	1.67 $\pm$ 0.28 [*]	1.18 $\pm$ 0.25 [*]
实验组	135.83 $\pm$ 22.20	3.52 $\pm$ 0.37

注:与实验组相比,^{*} $P < 0.05$ 。



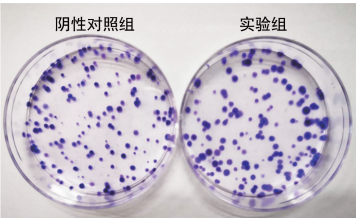
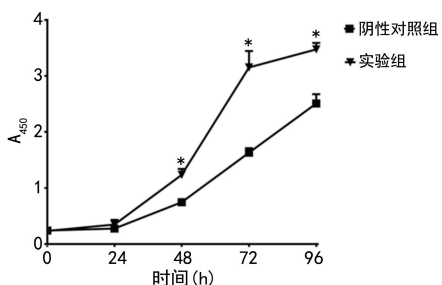
注:A表示慢病毒感染细胞经Dox诱导48 h后,绿色荧光蛋白表达情况;B表示不同组别细胞中Prdm14 mRNA表达情况;C表示不同组别细胞中Prdm14蛋白水平;实验组与空白组相比,^{*} $P < 0.05$;实验组与阴性对照组相比,[#] $P < 0.05$ 。

图 1 C3H10T1/2-Prdm14 过表达细胞株构建及鉴定

2.2 细胞增殖能力检测 采用 CCK-8 检测了阴性对照组和实验组细胞的增殖能力,结果显示,实验组细胞增殖能力较阴性对照组明显增加($P < 0.05$),见图 2A。细胞克隆形成实验显示,实验组克隆数与阴性对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),但实验组平均克隆直径增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),

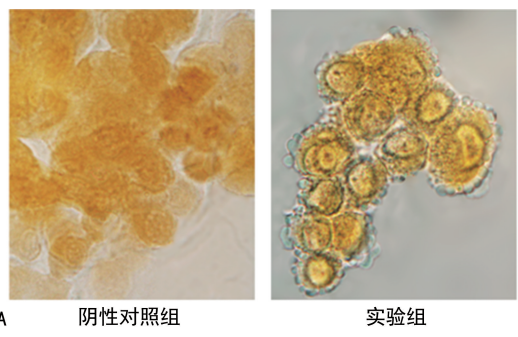
见图 2B 和表 3。

2.3 ALP 检测 ALP 检测结果显示:C3H10T1/2 过表达 Prdm14 后,细胞膜、细胞质出现蓝色颗粒(图 3A),其分泌的 ALP 活性[(20.76 $\pm$ 0.52)个 DEA 酶活力单位]也较阴性对照组[(8.37 $\pm$ 1.44)个 DEA 酶活力单位]明显增加($P < 0.05$),见图 3B。



注: A 表示细胞增殖能力情况; B 表示细胞克隆形成能力情况; 同一时间点实验组与阴性对照组相比, * $P < 0.01$ 。

图 2 Prdm14 高表达对细胞增殖能力的影响



注: A 为 ALP 在细胞中的染色; B 为培养液中细胞分泌的 ALP 活性检测; 实验组与阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

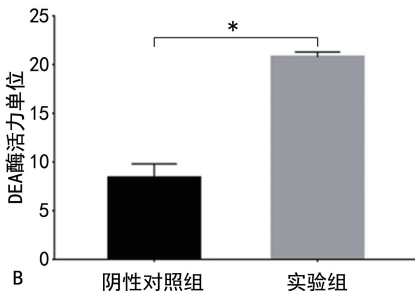
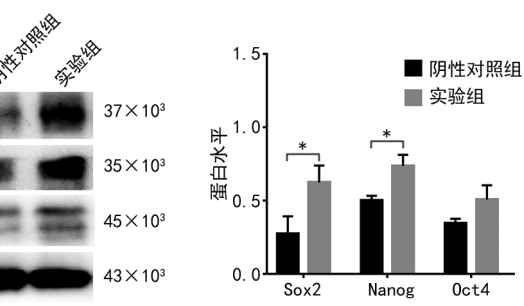


图 3 Prdm14 高表达对 ALP 活性的影响



注: A 为 WB 检测不同组别细胞中干性因子 Sox2、Nanog 以及 Oct4 蛋白水平; B 为对 A 图进行灰度值量化结果; 实验组与阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 C3H10T1/2 高表达 Prdm14 后干性因子的表达情况

3 讨 论

间充质干细胞(MSCs)来源于胚胎发育早期的中胚层未成熟的胚胎结缔组织,是一类具有自我更新和多种分化潜能的成体干细胞,在特定情况下可诱导分化为多种组织细胞。作为优选的组织工程种子细胞,在细胞替代治疗、基因治疗以及组织器官再造中具有重要的临床应用价值。C3H10T1/2 细胞是由 REZNIKOFF 等^[13]于 1972 年从 C3H 系小鼠胚胎分离建立的 MSCs 株,其形态为成纤维细胞样,也称为小鼠胚胎成纤维细胞,它具有多能分化的功能,可向脂肪、骨、肌等分化^[14-16]。在体外培养早期,未分化的

2.4 干性因子表达检测 C3H10T1/2 细胞中过表达 Prdm14 后,采用 WB 检测主要干性因子的表达情况。结果显示,实验组干性因子 Sox2、Nanog 蛋白水平均较阴性对照组升高($P < 0.05$),Oct4 蛋白水平与阴性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4 和图 4。

表 3 细胞克隆数和克隆直径情况($\bar{x} \pm s$)

组别	克隆数	克隆直径(mm)
阴性对照组	166.67±7.37	0.57±0.06
实验组	171.00±14.53	0.86±0.01*

注:与阴性对照组相比,* $P < 0.01$ 。

表 4 Sox2、Nanog 以及 Oct4 蛋白水平变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	Sox2	Nanog	Oct4
阴性对照组	0.27±0.12	0.50±0.03	0.35±0.03
实验组	0.62±0.12*	0.74±0.08*	0.51±0.10

注:与阴性对照组相比,* $P < 0.05$ 。

MSCs 可表达转录因子 Oct4、Nanog 和 Sox2,但随着培养时间的延长,其增殖能力、分化潜能减弱,甚至检测不到 Oct4 表达^[17]。与之类似,本研究发现,在 C3H10T1/2 细胞中,主要干性因子 Sox2、Nanog、Oct4 表达均不高;并且 ESCs、PGCs 前体细胞等干性细胞表达的 ALP 在 C3H10T1/2 细胞也表现为阴性,这可能与 MSCs 经过长时间的体外培养自身的干性减弱,发生自发性分化有关。离体培养的 MSCs 干细胞注入体内后,其干性降低,往往不能按照预期的方向进一步分化,进而限制了其应用。因此,干细胞干性的维持对其临床应用具有重要意义。

Prdm14 为 PRDM 家族的重要成员,通过表观遗传学重编程、转录激活、抑制等过程,调节 ESCs 多能性、生殖细胞特化和发育^[5,10,18-19],然而,Prdm14 在 MSCs 中的表达及作用少见报道。本研究发现,C3H10T1/2 细胞中内源性 Prdm14 水平较低,当过表达 Prdm14 后,C3H10T1/2 细胞增殖能力增强,ALP 活性增加,表明 Prdm14 在一定程度上能提升 C3H10T1/2 细胞自我更新能力。OKASHITA 等^[12]报道,在外胚层样细胞(EpiLCs)中,诱导 Prdm14 表达可上调干性相关基因。与之类似,本研究也发现 Prdm14 在 C3H10T1/2 细胞过表达能上调干性因子 Sox2、

Nanog 的表达,进一步证实 Prdm14 对 C3H10T1/2 细胞的干性具有一定的促进作用。有研究显示, Prdm14 在多种肿瘤中表达,能赋予癌细胞干性特性,促进细胞生存及肿瘤发生^[20]。但在本研究中,Oct4 的表达并未明显增加,细胞克隆数亦无明显变化,表明 Prdm14 对于 C3H10T1/2 细胞干性的诱导是有限的,并不会导致其向肿瘤方向发展。

值得注意的是,Prdm14 既能与 Oct4、Sox2 等基因位点结合,自身的位点又是 Nanog、Sox2 等的靶点^[3]。因此,尽管 Prdm14 能促进 C3H10T1/2 细胞干性因子表达,但其功能可能存在差异。在 ESCs 中, Prdm14 与核心干性因子共同调控多能性相关基因网络,抑制促分化基因,维持 ESCs 可塑状态^[18]。但在 EpiLCs 建立过程中,幼稚状态的 ESCs 多能性网络解体,EpiLCs 的 Nanog 结合模式在全基因组范围内发生了变化:ESCs 中,Nanog 结合多能性因子,促进多能性状态,而 EpiLCs 中,Nanog 结合并激活 PGCs 特化的关键因子 Prdm1 和 Prdm14 的增强子,进而诱导 EpiLCs 分化为 PGCLCs^[21]。

Prdm14 在不同细胞中发挥的作用不尽相同。C3H10T1/2 细胞中,Prdm14 过表达能促进其增殖以及干性相关因子表达增加,但是否能进一步向生殖系方向分化及其调控机制均值得进一步深入研究。

参考文献

[1] OKASHITA N,KUMAKI Y,EBI K,et al. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells[J]. *Development*,2014,141 (2):269-280.

[2] YAMAMOTO M,SUWA Y,SUGIYAMA K,et al. The PRDM14-CtBP1/2-PRC2 complex regulates transcriptional repression during the transition from primed to naïve pluripotency [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133 (15): jcs240176.

[3] MA Z,SWIGUT T,VALOUEV A,et al. Sequence-specific regulator Prdm14 safeguards mouse ESCs from entering extraembryonic endoderm fates[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2011,18(2):120-127.

[4] SEKI Y. PRDM14 is a unique epigenetic regulator stabilizing transcriptional networks for pluripotency[J]. *Front Cell Dev Biol*,2018,6:12.

[5] LI Y,YANG Z,LI X,et al. Prdm14 promotes mouse ESC self-renewal and PGCLC specification through enhancement of Stat3 activity[J]. *iScience*,2022,25(11):105293.

[6] WANG Z,ORON E,NELSON B,et al. Distinct lineage specification roles for NanoG, Oct4, and Sox2 in human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2012,10(4): 440-454.

[7] CHIA N Y,CHAN Y S,FENG B,et al. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity[J]. *Nature*,2010,468(7321):316-320.

[8] COLLIER A J,BENDALL A,FABIAN C,et al. Genome-wide screening identifies Polycomb repressive complex 1.3 as an essential regulator of human naïve pluripotent cell reprogramming[J]. *Sci Adv*,2022,8(12):eabk0013.

[9] SYBIRNA A,TANG W,PIERSON S M,et al. A critical role of PRDM14 in human primordial germ cell fate revealed by inducible degrons[J]. *Nat Commun*,2020,11 (1):1282.

[10] YAMAJI M,SEKI Y,KURIMOTO K,et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice[J]. *Nat Genet*,2008,40(8):1016-1022.

[11] GILLICH A,BAO S,GRABOLE N,et al. Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors[J]. *Cell Stem Cell*,2012,10(4):425-439.

[12] OKASHITA N,SUWA Y,NISHIMURA O,et al. PRDM14 drives OCT3/4 recruitment via active demethylation in the transition from primed to naïve pluripotency[J]. *Stem Cell Reports*,2016,7(6):1072-1086.

[13] REZNIKOFF C A,BRANKOW D W,HEIDELBERGER C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division[J]. *Cancer Res*,1973,33(12):3231-3238.

[14] 杨春梅,许皓,易勤,等. Islet-1 促 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化过程中的电生理特性[J]. *临床心血管病杂志*,2015,31(10):1100-1105.

[15] MUKAI T,KUSUDO T. Bidirectional effect of vitamin D on brown adipogenesis of C3H10T1/2 fibroblast-like cells [J]. *Peer J*,2023,11:e14785.

[16] ALONSO-PÉREZ A, GUILLÁN-FRESCO M, FRANCO-TREPAT E,et al. Improved protocol to study Osteoblast and adipocyte differentiation balance[J]. *Biomedicines*, 2022,11(1):31.

[17] GRECO S J,LIU K,RAMESHWAR P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*,2007, 25(12):3143-3154.

[18] YAMAJI M,UEDA J,HAYASHI K,et al. PRDM14 ensures naïve pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2013,12(3):368-382.

[19] GRABOLE N,TISCHLER J,HACKETT J A,et al. Prdm14 promotes germline fate and naïve pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation[J]. *EMBO Rep*,2013, 14(7):629-637.

[20] KIM M,LY S H,XIE Y,et al. YAP1 and PRDM14 converge to promote cell survival and tumorigenesis[J]. *Dev Cell*,2022,57(2):212-227.

[21] MURAKAMI K,GÜNESDOĞAN U,ZYLICZ J J,et al. NANOG alone induces germ cells in primed epiblast in vitro by activation of enhancers[J]. *Nature*,2016,529 (7586):403-407.