

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.005.html>

抑制 LIF/Stat3 信号通路促进小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化

杨谋广 徐岩 邹传德 王爱玲

摘要 目的 研究 LIF/Stat3 信号通路对小鼠胚胎干细胞 (mESCs) 分化成心肌细胞的影响。方法 利用 mESCs 形成拟胚体 (EBs) 进行心肌分化。在野生型 mESCs 形成 EBs 的过程中加入 Janus 激酶 (JAK) 抑制剂以抑制 LIF/Stat3 信号通路 (JAKi 组)。而在融合表达雌激素受体 (ER) 和 Stat3 的 Stat3ER 细胞株进行分化过程中添加 4-羟基他莫西酚 (4HT) 以激活 LIF/Stat3 信号通路 (4HT 组)。用 qRT-PCR 检测心脏特异转录因子 NKX2.5、 α -肌球蛋白重链 (α -MHC) 和连接蛋白 43 (Cx43) 以及 mESCs 自我更新基因 *oct4*、*nanog* 和 Stat3 下游基因 *socs3* 的表达水平。用 Western blot 检测和免疫荧光染色法验证 α -MHC 和 Cx43 的相对表达。结果 免疫荧光结果显示在自发搏动的 EBs 中出现 α -MHC 和 Cx43 的荧光, 表明心肌细胞分化成功。随着分化时间的延长, NKX2.5、 α -MHC 和 Cx43 的 mRNA 表达量逐渐增加, 至第 15 天时最为明显, 且 JAKi 组高于对照组 ($P < 0.01$); 对照组高于 4HT 组 ($P < 0.01$)。而 *nanog*、*oct4* 随着分化时间的延长逐渐降低, 且 JAKi 组低于对照组 ($P < 0.05$), 而 4HT 组高于其对照组 ($P < 0.05$)。*Socs3* 的表达量在 JAKi 组一直较低且低于对照组, 在 4HT 组表达较高且高于对照组 ($P < 0.01$)。Western blot 检测结果显示第 15 天的 Cx43 和 α -MHC 蛋白表达量 JAKi 组明显高于对照组 ($P < 0.05$), 4HT 组低于其对照组 ($P < 0.05$)。结论 抑制 LIF/Stat3 信号通路促进小鼠胚胎干细胞分化成心肌细胞; 激活 LIF/Stat3 信号通路抑制小鼠胚胎干细胞的心肌细胞分化。

关键词 LIF; Stat3; 小鼠胚胎干细胞; 心肌细胞

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0645-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.005

小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 来源于着床前囊胚的内胚层, 是一种多能干细胞, 能够在体外合适的培养条件下长期保持自我更新的状态, 同时还具有分化成三个胚层的多能性^[1]。白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 属于白介素-6 家族, 能于细胞表面低亲和力的

LIFR β -gp130 异质二聚体结合, 激活胞质内 JAK, 激活后的 JAK 磷酸化转录因子 Stat3, 从而使细胞保持自我更新状态^[2]。目前 LIF 血清培养液作为保持 mESCs 多能性的标准培养条件, 无 LIF 培养的 mESCs 能够自发分化成三个胚层来源的多种细胞类型^[3]。该研究主要通过抑制和激活 LIF/Stat3 信号通路, 观察该通路对小鼠胚胎干细胞分化成心肌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系 46C 和 46C-STAT3ER 小鼠胚胎干细胞由美国南加州大学再生医学及干细胞研究中心应其龙教授赠送。

1.2 主要试剂 基础培养液 (高糖 DMEM、10% 胎牛血清) 购于美国 HyClone 公司; 1% 非必须氨基酸、1% 丙酮酸钠购于美国 Invitrogen 公司; 0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 g/L 双抗购于美国 Gibco 公司; 1 000 U/ml LIF 购于美国 Chemicon 公司; 5 μ mol/L JAK 酶抑制剂购于德国 Calbiochem 公司; 1 μ mol/L 4-羟基他莫西酚 (4-hydroxytamoxifen, 4HT)、Hoechst33258 购于美国 Sigma 公司; TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 小鼠抗心肌肌球蛋白重链抗体和兔抗连接蛋白 43 (Cx43) 抗体购于英国 Abcam 公司; 小鼠抗磷酸化 Stat3 (705p-Stat3) 抗体、小鼠抗雌激素 α (estrogen receptor α , ER α) 抗体、小鼠抗 α -Tubulin 抗体、HRP 标记的羊抗小鼠抗体和羊抗兔抗体购于美国 Santa Cruz 公司; Alexa-488 标记羊抗小鼠和羊抗兔荧光抗体购于武汉博士德公司。

1.3 方法

1.3.1 mESCs 培养 小鼠胚胎干细胞 (46C 和 46C-STAT3ER) 复苏后接种于 0.1% 明胶包被的细胞培养皿中, 加入含有 LIF 的基础培养液置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.3.2 拟胚体 (embryonic bodies, EBs) 的形成及诱导分化 将需要传代的 mESCs 弃培养液并用 PBS 洗 2 遍后用胰酶消化可得到 mESC 单细胞悬液, 用细胞计数板进行计数, 并将细胞数目调整为 1×10^6 个/ml。取 1×10^6 个 mESCs 接种于 100 mm 的无菌

2017-01-20 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研重点项目 (编号: 2010B005)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心内科, 合肥 230022

作者简介: 杨谋广, 男, 硕士研究生;

徐岩, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: anyi_xuyan@hotmail.com

表1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>cx43</i>	ACAGCGGTTGAGTCAGCTTG	GAGAGATGGGGAAGGACTTGT
<i>nkx2.5</i>	CAAGTGCTCTCCTGCTTTCC	GGCTTTGTCCAGCTCCACT
<i>α-mhc</i>	AGCTGACAGGGGCCATCAT	ACATACTCGTTCCCCACCTTC
<i>oct4</i>	GAAGCAGAAGAGGATCACCTTG	TTCTTAAGGCTGAGCTGCAAG
<i>nanog</i>	TCCAGAAGAGGGCGTCAGAT	CAAATCCCAGCAACCACATG
<i>socs3</i>	ATTGACCCAGGTGGCTACAG	GCCAATGTCTTCCCAGTGT
<i>gapdh</i>	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	TGTTCTACCCCAATGTCT

细菌培养皿中,皿中加入 10 ml mESCs 基础培养液,实验组加入 JAK 酶抑制剂或 4HT,对照组无特殊处理。将各皿放入 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,采用悬浮培养法形成 EBs。做分化培养的当天即第 0 天,每 2 d 换液,每天用移液管轻吹 EBs 一次阻止 EBs 贴壁。实验过程中加入 JAK 酶抑制剂称为 JAKi 组,加入 4HT 称为 4HT 组,未特殊处理的组称为对照组。

1.3.3 EBs 的贴壁培养及自发搏动情况的观察
在分化的第 7 天将各组悬浮培养的 EBs 移入 15 ml 离心管让其自由下沉并吸出培养液,将沉底的 EBs 移入 0.1% 明胶包被的 24 孔板中贴壁培养,每组 60 个 EBs,每天用相差显微镜观察 EBs,及时记录出现自发搏动的 EBs 的最初时间和数量。根据自发搏动的 EBs 数算出心肌细胞的诱导效率即出现自发搏动的 EBs 数与总的 EBs 数的比率。

1.3.4 qRT-PCR 检测 在分化培养过程中分别在第 0、5、10、15 天用 TRIzol 提取总 RNA,具体步骤见说明书。用 RNA 逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA,并用逆转录产物为模板进行 PCR 反应。分别检测心肌前体细胞标志基因 NKX2.5、心肌细胞特异性标志基因 α-肌球蛋白重链(cardiac myosin heavy chain, α-MHC) 和连接蛋白 43(connexin-43, Cx43) 以及干细胞自我更新的基因 *nanog*、*oct4* 和 Stat3 下游基因 *socs3* 的表达水平。实验以 GAPDP 为内参,各基因 mRNA 相对表达水平用 2^{-ΔΔCt} 法分析,各基因的引物序列见表 1。

1.3.5 Western blot 法检测 分别用 RIPA 裂解第 15 天 EBs,并检测蛋白浓度,然后加入上样缓冲液于沸水中煮 10 min,进行电泳、转膜、封闭和一抗的孵育。一抗 Cx43(1:1000)、α-MHC(1:1000)、⁷⁰⁵p-stat3(1:1000)或 α-Tubulin(1:1000)在 4 °C 孵育过夜,次日室温孵育二抗(1:5000)2 h,ECL 显色、曝光并采集图像。

1.3.6 免疫荧光检测 贴壁培养 7 d 后即分化第 15 天,用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后加入 PBS-BSA

(5% BSA,0.2% TritonX-100 的 PBS 溶液),在 37 °C 孵育 1 h 后加入一抗,抗 Cx43 抗体/抗 α-MHC 抗体/抗 ERα 抗体(1:200)4 °C 孵育过夜。次日用 PBS-BSA 洗涤 3 次,每次 5 min,然后加入含有 Hoechst 染料(DAPI,1:5000)的二抗(1:1000),锡箔纸包住 37 °C 孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,用荧光显微镜观察。

1.3.7 AP 染色 取正常培养的 mESCs 弃去培养液,用 PBS 洗 2 遍后加入 4% 多聚甲醛固定 2 min,然后弃去并用 PBS 洗 2 遍,用 AP 染色试剂盒按照说明书进行操作,避光 30 min 后显微镜下观察。

1.4 统计学处理 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学处理,组间比较使用独立样本 *t* 检验,每组实验重复 3 次,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 LIF/STAT3 信号通路促进心肌分化

2.1.1 拟胚体的形成及搏动的观察 消化成单个细胞的 mESCs 计数后悬浮培养(图 1A)2 d 后可见大小不一、直径 150~210 μm 的球形结构即 EBs,见图 1B。悬浮培养 7 d 后将 EBs 进行贴壁培养,贴壁后的 EBs 像荷包蛋样向四周生长,见图 1C。JAKi 组在第 8 天可看到少数 EBs 开始出现自发性搏动,对照组第 10 天有小部分 EBs 出现自发性搏动,JAKi 组搏动的 EBs 多于对照组,且随着分化天数的增加,两组搏动的 EBs 均逐渐增加,见图 2。表明抑制

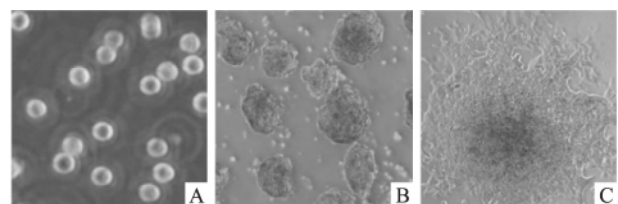


图1 相差显微镜观察不同分化天数 EBs 的形态 ×100

A: 悬浮培养的 mESCs(0 d); B: 悬浮培养的 EBs(4 d); C: 贴壁培养的 EBs(10 d)

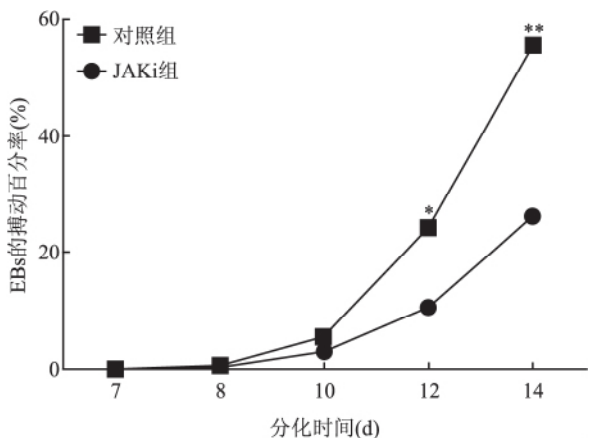


图2 相差显微镜观察 EBs的搏动
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

JAK 后促进了心肌的分化。

2.1.2 抑制 JAK 后促进心肌分化的 qRT-PCR 检测

提取各不同分化时间段 EBs 的 RNA, 逆转录成 cDNA 后用 qRT-PCR 检测, 结果显示随着分化培养时间增加, NKX2.5、Cx43 和 α -MHC 表达量增加, 且 JAKi 组高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3A ~ C。JAKi 组的 *socs3* 表达量一直较低且低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3D。 *nanog* 和 *oct4* 的表达量随着分化时间的增加而减少, 但 JAKi 组低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 3E ~ F。说明抑制 JAK 后促进小鼠胚胎干细胞向心肌分化。

2.1.3 抑制 JAK 后促进心肌分化的 Western blot 检测

分化培养第 15 天的 EBs, 提取蛋白后用于检测, 结果显示 JAKi 组的心肌细胞特异蛋白 α -MHC

和 Cx43 表达量高于对照组。此外, 对照组的磷酸化 Stat3 蛋白 (705 p-stat3) 高于 JAKi 组, 见图 4。说明抑制 JAK 后促进心肌分化。

2.1.4 抑制 JAK 后促进心肌分化的免疫荧光检测

分化培养第 15 天的 EBs 用免疫荧光检查, 检查结果显示两组都有 Cx43 蛋白和 α -MHC 蛋白的表达, 且 JAKi 组的荧光强于对照组, 见图 5。说明抑制 JAK 后促进心肌分化。

2.2 激活 LIF/STAT3 信号通路抑制心肌分化

2.2.1 4HT 激活 LIF/STAT3 信号通路和维持 46C-Stat3ER 自我更新

46C-Stat3ER mESC 可以在 LIF 血清培养液中长期保持自我更新的状态, 而撤出 LIF 后出现分化, 但加入 4HT 后 46C-Stat3ER 继续较长时间保持自我更新状态, 碱性磷酸酶染色呈红色, 见图 6。传代的 mESC 消化成单个细胞后做悬浮培养, 2 d 后 4HT 组和对照组都可见球形结构即 EBs, 悬浮培养 7 d 后将 EBs 进行贴壁培养, 贴壁后的 EBs 用免疫荧光检测 ER α , 两组胞质内都见到荧光, 但 4HT 组胞核内可见大量荧光而对照组没有, 见图 7。说明 4HT 可以将 Stat3ER 转入核, 激活 LIF/STAT3 信号通路, 阻止细胞分化。

2.2.2 4HT 抑制心肌的分化的 Western blot 检测

分化培养第 15 天的 EBs, 提取蛋白后用于检测, 结果显示 4HT 组的心肌细胞特异蛋白 α -MHC 和 Cx43 表达量低于对照组。此外, 对照组的外源性磷酸化 Stat3ER 蛋白 (705 p-stat3ER) 低于 4HT 组, 而两组的内源性 stat3 蛋白表达量相近, 见图 8。说明 4HT 增

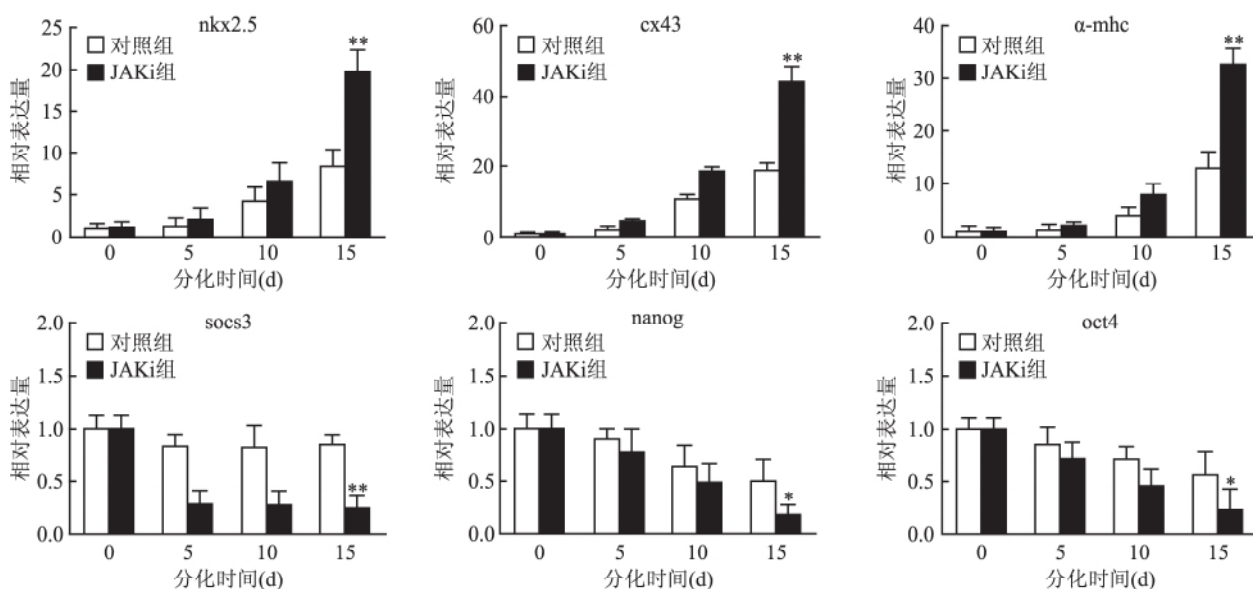


图3 不同分化时间的各种基因表达情况
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

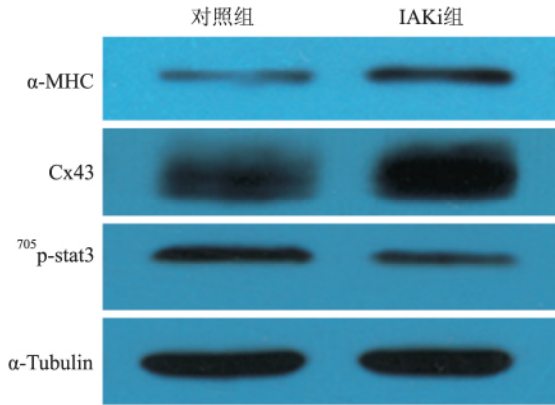


图4 分化第15天各种蛋白表达情况

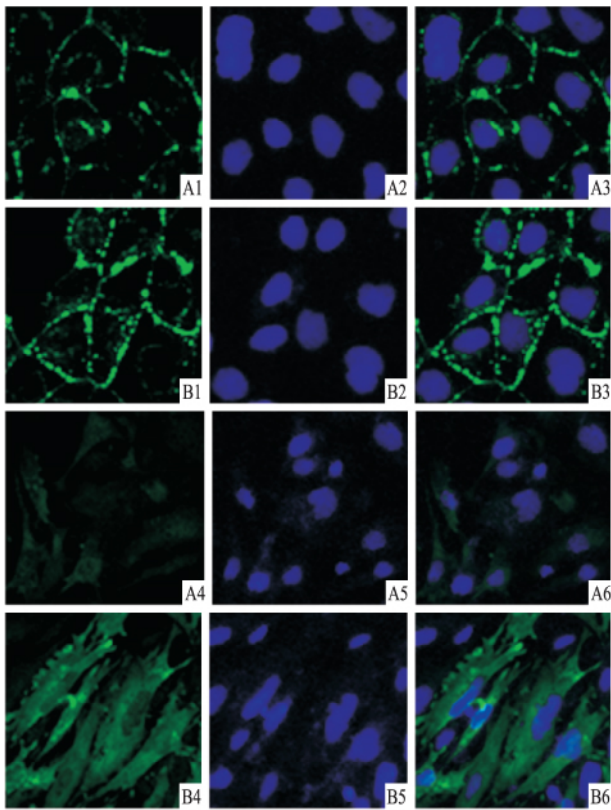


图5 免疫荧光检查 α-MHC 蛋白和 Cx43 蛋白 ×200

A: 对照组; B: JAKi 组; 1: Cx43 染色(绿色); 2: DAPI 染色(蓝色); 3: Cx43 染色和 DAPI 染色的融合; 4: α-MHC(绿色) 5: DAPI 染色(蓝色); 6: α-MHC 和 DAPI 染色的融合

加 Stat3ER 磷酸化 抑制心肌的分化。

2.2.3 4HT 抑制心肌的分化的 qRT-PCR 检测 提取各不同分化时间段 EBs 的 RNA 经过逆转录成 cDNA 后用于 qRT-PCR 检测,结果显示随着分化培养时间增加,NKX2.5、Cx43 和 α-MHC 表达量增加,且 4HT 组明显低于对照组($P < 0.01$),见图 9A ~ C。4HT 组的 *socs3* 表达量一直较高且高于对照组($P < 0.01$),见图 9D,对照组的 *nanog* 和 *oct4* 的表达量随

着分化时间的增加而减少,而 4HT 组无明显变化且高于对照组($P < 0.01$),见图 9E ~ F。说明 4HT 激活 LIF/STAT3 信号通路,且抑制心肌的分化。

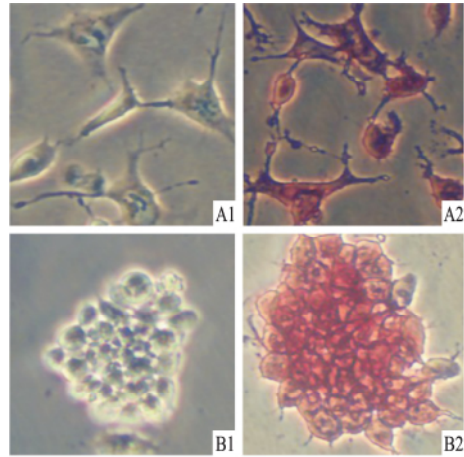


图6 碱性磷酸酶染色 ×100

A: 对照组; B: 4HT 组; 1: AP 染色前; 2: AP 染色后

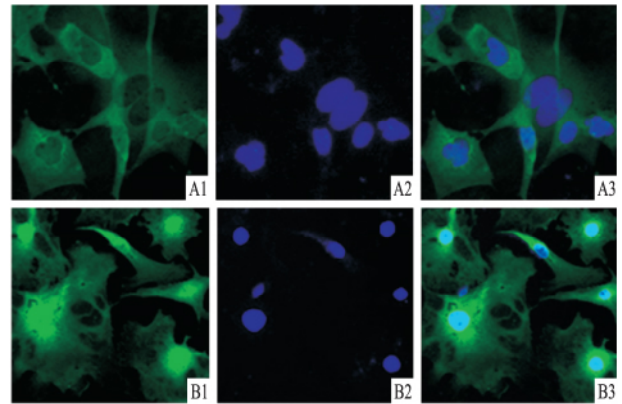


图7 免疫荧光检测 ERα 蛋白 ×100

A: 对照组; B: 4HT 组; 1: ERα 染色(绿色); 2: DAPI 染色(蓝色); 3: ERα 染色和 DAPI 染色的融合

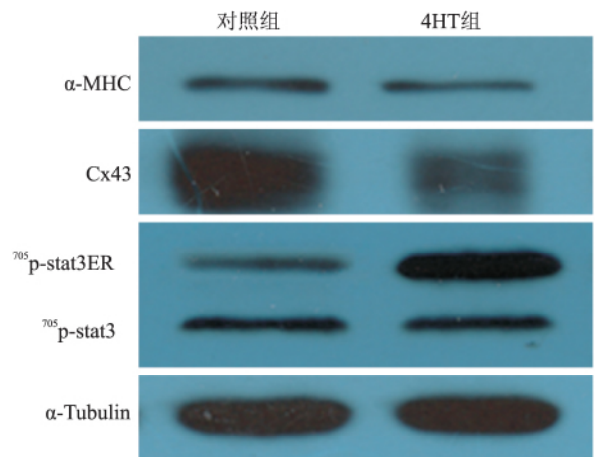


图8 分化第15天各种蛋白表达情况

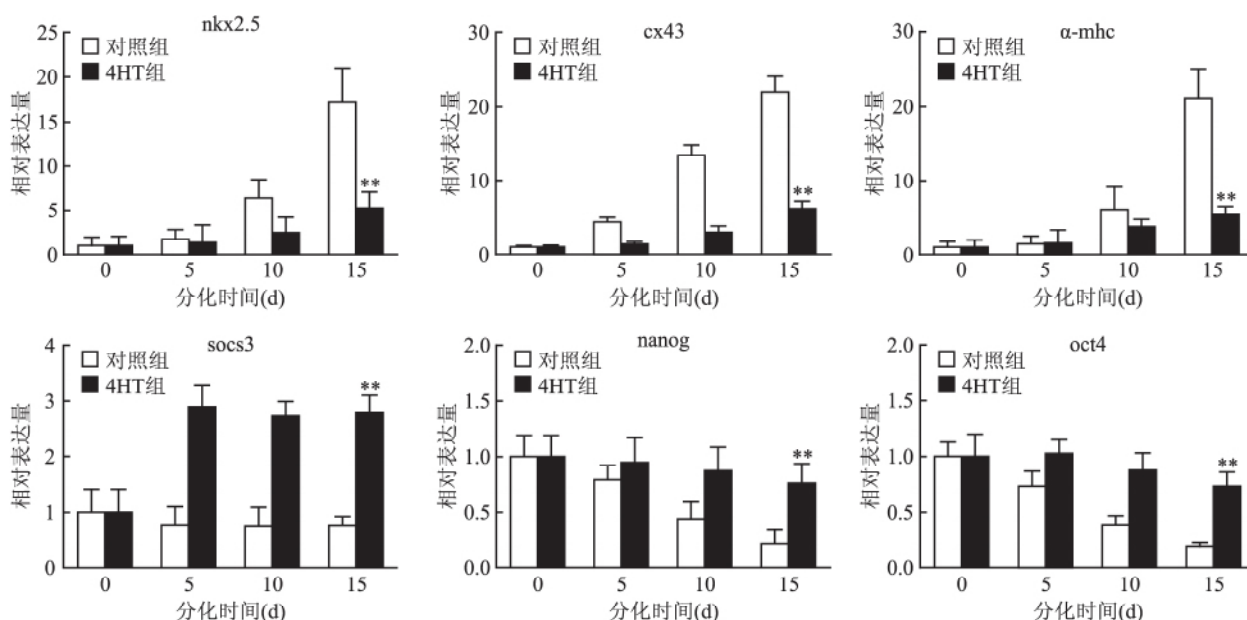


图9 不同分化时间的各种基因表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

mESCs 自我更新能力的维持依赖于 LIF/Stat3 信号通路,同时,该通路对干细胞的心肌细胞分化具有重要的作用^[4]。该研究使用的细胞株 46C 小鼠胚胎干细胞培养前用明胶包板不需要滋养层细胞^[5],先用 JAK 酶抑制剂抑制 JAK 酶,使其不能磷酸化 Stat3,进而抑制 LIF/Stat3 信号通路,观察小鼠胚胎干细胞的心肌细胞分化;用 4-HT 将 Stat3ER 拉入核内,激活 LIF/Stat3 信号通路。实验结果从正反两个方面反映出 LIF/Stat3 信号通路对小鼠胚胎干细胞的心肌细胞分化的影响。

LIF 属于白介素-6 家族的一种,是培养 mESCs 保持其自我更新的重要因子,撤出 LIF 后 mESCs 即发生分化。当 LIF 与细胞表面低亲和力的 LIFR β -gp130 异质二聚结合,使胞质内 JAK 酶发生磷酸化并激活,激活的 JAK 酶是胞质内细胞因子受体的酪氨酸残基发生磷酸化,进而通过 SH2 结构域提供 Stat3 单体的结合位点。Stat3 与 SH2 结合后 Stat3 的 705 位酪氨酸被 JAK 酶磷酸化,然后 Stat3 通过两个 SH2 内部作用形成二聚体并进入核内激活靶基因转录^[6]。Stat3 的靶基因很多如 Klf4、Socs3 和 SP5 等,其中 Socs3 是 Stat3 的直接靶基因,可以反映 Stat3 的激活情况^[7-8]。Stat3 融合雌激素受体(es-trogen receptor, ER)的结构域(Stat3ER),转入干细胞后可以在 4HT 取代 LIF 的条件下保持未分化状

态^[9]。4HT 将 Stat3ER 转入核,刺激 Stat3 直接靶基因,且此过程不受内源性 Stat3 影响^[10]。本研究用 4HT 刺激 Stat3ER 激活 LIF/Stat3 信号通路可以排除内源性 Stat3 对实验结果的影响,用 JAK 酶抑制剂抑制 Stat3 的磷酸化,抑制 LIF/Stat3 信号通路。通过抑制和激活 LIF/Stat3 信号通路,检测该通路对 mESCs 分化成心肌细胞的影响。当抑制该信号通路时 mESCs 将不能维持自我更新的作用, mESCs 发生分化;当激活该信号通路时 mESCs 可以较长时间保持未分化状态,抑制 mESCs 的分化。LIF 最初被公认为诱导 M1 骨髓白血病细胞分化的重要因子^[11],现在被作为抑制分化的重要细胞因子,这两种相反的效应与 LIF 的两种亚型有关。LIF 同时存在着促分化作用和抑分化作用,而具体是哪种生物学作用与两种亚型的生物利用度、时间和 LIF 的处理剂量有关^[12]。LIF/Stat3 信号通路不仅跟干细胞的增殖分化有关,还跟肿瘤的发生和 DNA 甲基化有关^[13]。此外,该通路对心肌损伤的修复具有重要作用,敲出 Stat3 的小鼠容易发生心衰,且心衰的患者体内 Stat3 水平较低^[14]。

参考文献

- [1] Tai C I, Ying Q L. Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state [J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt5): 1093-8.
- [2] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic

- stem cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18(15): 4261–9.
- [3] He Z, Li J J, Zhen C H, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(1): 80–90.
- [4] Veselá I, Kotasová H, Jankovská S, et al. Leukaemia inhibitory factor inhibits cardiomyogenesis of mouse embryonic stem cells *via* STAT3 activation[J]. *Folia Biol(Praga)*, 2010, 56(4): 165–72.
- [6] Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture[J]. *Nat Biotechnol* 2003, 21(2): 183–6.
- [6] Huang G, Ye S, Zhou X, et al. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(9): 1741–57.
- [7] Ye S, Liu D, Ying Q L. Signaling pathways in induced naive pluripotency[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 28: 10–5.
- [8] Ye S, Zhang D, Cheng F, et al. Wnt/ β -catenin and LIF-Stat3 signaling pathways converge on Sp5 to promote mouse embryonic stem cell self-renewal[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(2): 269–76.
- [9] Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18(15): 4261–9.
- [10] Bourillot P Y, Aksoy I, Schreiber V, et al. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1760–71.
- [11] Ichikawa Y. Further studies on the differentiation of a cell line of myeloid leukemia[J]. *J Cell Physiol*, 1970, 76(2): 175–84.
- [12] Rajasingh J, Bord E, Hamada H, et al. STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte pre-committed mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2007, 101(9): 910–8.
- [13] Urayama S, Semi K, Sanosaka T, et al. Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation[J]. *Cell Struct Funct*, 2013, 38(1): 55–66.
- [14] Zouein F A, Kurdi M, Booz G W. LIF and the heart: just another brick in the wall[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2013, 24(1): 11–9.

Differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cell *via* inhibiting LIF/Stat3 signaling pathway

Yang Mouguang, Xu Yan, Zou Chuande, et al

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the roles of LIF/Stat3 signaling pathway in differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs) into cardiomyocytes. **Methods** Inducing mESCs differentiate into cardiomyocytes through forming embryoid bodies (EBs). In the process of wild type mESCs transforming to EBs administration with JAK inhibitor to inhibit LIF/Stat3 signaling pathways (JAKi group). In the fusion expression of estrogen receptor (ER) and Stat3 (Stat3ER) cell lines 4-hydroxytamoxifen (4HT) to activate the LIF/Stat3 signaling pathways during the process of differentiation (4HT group). The mRNA expression levels of NKX2.5, α -myosin heavy chain (α -MHC) and connection 43 (Cx43) as well as stem cell self-renewal marker genes *nanog* and *oct4* and Stat3 downstream gene *socs3* were analyzed through qRT-PCR. The relative expression of α -MHC and Cx43 were detected by Western blot and immunofluorescence staining. **Results** Spontaneously beating EBs were positively stained with α -MHC and Cx43, showed that myocardial cell differentiation. The mRNA expression levels of NKX2.5, α -MHC and Cx43 increase gradually, showing a peak of expression on the fifteenth day during the differentiation. JAKi group produced higher gene expression compared with control group ($P < 0.01$). The control group was higher than 4HT group ($P < 0.01$). *Nanog* and *oct4* were reduced gradually, and JAKi group was lower than the control group ($P < 0.05$), while 4HT group was higher than the control group ($P < 0.05$). In JAKi group had low expression levels of *socs3* and lower than that of control group ($P < 0.01$), whereas 4HT group had the opposite results. Western blot analysis suggested that the expression of α -MHC and Cx43 in JAKi group were higher than those of control group ($P < 0.05$), and 4HT group was slightly lower than that of control group on the 15th day ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of LIF/Stat3 signaling pathway promote mouse embryonic stem cells to differentiate into myocardial cells; activation the LIF/Stat3 signaling pathway inhibiting myocardial cells differentiation of embryonic stem cell in mice.

Key words LIF; Stat3; mouse embryonic stem cells; cardiomyocyte