

文章编号: 1004-0374(2009)01-0086-06

体细胞重编程为多能干细胞的研究进展

张卫琴, 曹鸿国, 张运海, 殷慧群, 陈涛, 章孝荣*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 体细胞通过重编程转变成其他类型的细胞, 在再生医学方面具有重要的应用前景。细胞重编程的方法主要有体细胞核移植、细胞融合、细胞提取物诱导、限定因子诱导等, 这些方法可以不同程度地改变细胞命运。最近, 限定因子诱导的多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)为重编程提供了一种崭新的方法, 不仅可以避免伦理争议, 还提供了一种更为便利的技术, 为再生医学开辟了新的天地; 同时, iPS 技术为研究基因表达调控、蛋白质互作、机体生长发育等提供了一个非常重要的研究手段。本文主要论述了体细胞重编程的方法及 iPS 细胞的进展、面临的问题和应用前景。

关键词: 体细胞; 重编程; iPS 细胞

中图分类号: Q343.5; Q813 **文献标识码:** A

Progress in reprogramming somatic cells into pluripotent stem cells

ZHANG Wei-qin, CAO Hong-guo, ZHANG Yun-hai, YIN Hui-qun,

CHEN Tao, ZHANG Xiao-rong*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Cellular reprogramming could dedifferentiate somatic cells into pluripotent state, which has tremendous potential in regenerative medicine. To date, somatic cell nuclear transfer, cell fusion, induction with extracts from oocytes or stem cells, and induction with recipe of defined factors are four major strategies to achieve reprogramming and therefore change the cell fate in different degrees. Among these, generation of induced pluripotent stem cells (iPS) by using defined factors not only usher stem cell research and cellular reprogramming into a new era, but also offer a new technology evidenced by less ethical issues and more convenient and cost-effective system of harvesting pluripotent stem cells for regenerative medicine. Moreover, iPS technology also could facilitate researches in regulation of genes, interaction of proteins, as well as development and differentiation. Therefore, the methods of somatic cell reprogramming, advances and future perspectives of iPS technology were reviewed here.

Key words: somatic cells; reprogramming; induction of pluripotent stem cell

体细胞重编程(reprogramming)是在一定环境条件下体细胞的记忆被擦除, 重新程序化产生新的表型和功能, 导致细胞的命运发生改变。细胞重编程主要发生在表观遗传水平上, 不涉及基因组 DNA 序列改变的基因表达水平的变化, 包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、印记基因表达、端粒长度恢复、X 染色体失活等。对于体细胞重编程的深入研究有助于掌握机体细胞的发生发育机制, 为解决再生医学种子细胞来源问题提供理论基础。目前, 体细胞重

编程的方法主要有核移植、细胞融合、细胞提取物诱导和限定因子诱导^[1-3]。在这些方法中, 限定因子诱导能将已分化的体细胞重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS), 不受伦理道德和实验材料等问题的束缚, 另外, iPS 细胞不会

收稿日期: 2008-07-28; 修回日期: 2008-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(30700574, 30600432)

*通讯作者: zxr@ahau.edu.cn

导致机体发生免疫排斥现象, 因此限定因子诱导在目前的体细胞重编程研究中日益受到重视。

1 核移植

1997年, 克隆绵羊“多莉”诞生以来, 核移植技术成为研究体细胞重编程的有力工具, 为研究卵母细胞胞质与供体核的互作奠定了基础。核移植受体卵母细胞胞质把供体细胞的分化状态通过表观遗传重编程, 恢复到胚胎正常发育所必需的胚胎化基因表达的特殊编程状态。表观遗传的重编程在体细胞核移植后进行, 主要包括DNA甲基化和组蛋白乙酰化的变化、印迹基因的表达、端粒长度的恢复及X染色体的失活等, 其中, DNA甲基化和组蛋白乙酰化在重编程过程中发挥着重要的作用。

1.1 DNA甲基化 DNA甲基化是基因组表观遗传的最常见修饰之一, 为基因组功能调节的重要途径。真核生物DNA甲基化主要对称地发生在CpG双核苷酸序列中胞嘧啶残基第5号碳原子上, 与基因表达的抑制有关^[4]。终末分化阶段体细胞的甲基化形式是稳定的、可遗传的, 然而在哺乳动物中, 至少有两个发育阶段(原始生殖细胞和着床前胚胎)甲基化形式发生基因组范围内的重排^[5], 首先CpG岛的DNA甲基化水平急剧下降, 因而出现转录活性, 但此后可通过从头甲基化恢复, 使基因在不同发育时期特异表达。

DNA甲基化通过去甲基化和从头甲基化调节细胞重编程, 是对基因组进行表观遗传修饰的主要方式。目前DNA去甲基化有两种机制^[6]: 一种是主动去甲基化, 其催化DNA去甲基化的过程是在DNA糖苷酶的作用下切除甲基化碱基, 类似于损伤DNA的碱基切除修复, 此过程需要双链RNA的参与; 另一种是复制相关的DNA去甲基化, 即被动去甲基化。DNA甲基化是真核细胞基因失活的重要机制, 为正常发育所必需。DNA甲基化反应分为两种类型: 从头甲基化和维持甲基化。DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)在DNA甲基化过程中发挥重要作用^[4], Giraldo等^[7]的研究结果表明, DNMT1在克隆胚胎中的异常表达导致核重编程的效率低, 胚胎发育受阻。另外, 在甲基化过程中附件因子(蛋白质、RNA等)募集到特定基因组序列或染色体结构中, DNMTs并不是同等地接近细胞核所有染色体区域, 具有染色体重构和DNA螺旋酶活性的蛋白质能影响DNA甲基化^[8]。

1.2 组蛋白乙酰化 表观遗传修饰的另一主要形式

是组成核小体的组蛋白修饰, 常见的组蛋白外在修饰作用包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化等。乙酰化是常见的一种修饰方式, 尽管已开展了很多研究, 但对其发生的分子机制的了解才刚刚起步。组蛋白乙酰化由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetyltransferase, HDACs)协调进行。HATs主要是在组蛋白H3、H4的N端末尾的赖氨酸加上乙酰基; HDACs的功能则相反, 不同位置修饰均需要特定的酶完成^[6]。乙酰化修饰大多在组蛋白H3的Lys9、Lys14、Lys18、Lys23和H4的Lys5、Lys8、Lys12、Lys16等位点, 这两种修饰结果既能激活基因表达, 也能使基因表达沉默。在猪的克隆胚中, 组蛋白去乙酰化抑制剂曲古抑菌素(TSA)能促进供体细胞基因组的重编程, 提高胚胎在体外的发育率^[9]; 组蛋白去乙酰化的另一种抑制剂丁酸钠(NABU)也起到同样的效果, 在供体细胞和克隆胚胎中组蛋白乙酰化与发育潜能相关^[10]。DNA甲基转移酶抑制剂5-氮脱氧胞苷酸(5-aza-dC)和组蛋白去乙酰化抑制剂TSA, 分别具有去甲基化和增加组蛋白乙酰化的作用, 它们联合作用比任何一种单独作用更能促进重编程^[11], 显示乙酰化、甲基化在细胞重编程中发挥重要的作用。

目前体细胞在核移植重构胚中的不完全重编程是导致克隆动物生产效率低下和发育异常等问题的主要原因^[12]。另外, 对于人类再生医学而言, 来源于核移植技术的多能干细胞面临着伦理道德、效率低下及受体卵母细胞不足等问题的挑战。

2 细胞融合

体细胞通过与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)融合能够发生重编程, 细胞融合使体细胞表现出多能干细胞特征^[13], 因此, 目前细胞融合也是研究体细胞重编程的一个重要手段。Cowan等^[14]运用细胞融合技术发现hES细胞能够使人皮肤成纤维细胞发生重编程, 人皮肤成纤维细胞在形态、生长增殖、干细胞体内和体外分化等方面呈现出hES细胞的特征, 但通过融合形成的杂合细胞保持四倍体基因型。对杂合细胞基因组转录子活性、报告基因激活、特异的等位基因表达和对DNA甲基化等进行分析, 得知杂合细胞基因组被重编程到胚胎状态。Tada等^[15]将ES细胞与胸腺细胞融合, 检测发现, 在杂合细胞基因组DNA的许多位点出现甲基化改变。Silva等^[16]用小鼠ES细胞与神经干细胞融

合, 在ES细胞中过表达的Nanog因子能够使融合效率提高200倍, 显示Nanog因子在细胞融合的重编程动态变化中发挥着重要的作用。

目前通过细胞融合诱导的体细胞重编程存在着融合效率低和杂合细胞四倍体基因型等问题, Do和Schöler^[17]研究证实ES细胞在细胞融合过程中的重编程主要是依靠ES细胞核发挥作用。因此, 目前针对体细胞重编程过程中杂合细胞四倍体基因型还是一个有待解决的难题。

3 提取物诱导

多能性干细胞或卵母细胞的提取物包含有能重编程体细胞核能力的调节成分, 具有一定的重编程能力^[18], 能使分化的体细胞被诱导转分化为其他类型的细胞^[19]。胚胎癌性细胞或ES细胞的提取物与体细胞共孵育后能上调ES细胞基因并表达胚胎细胞特异性标记, 下调特异的体细胞标记和表观遗传修饰的组蛋白^[20]。将经过透性化处理后的蛙体细胞置入非洲爪蟾卵母细胞的提取物中短暂孵育, 爪蟾的卵母细胞提取物通过DNA去甲基化可以促进哺乳动物的体细胞核重编程到胚胎细胞状态, 表达ES细胞的标记因子Oct4, 并且体细胞专一性的TATA-结合蛋白从染色质中解离^[21], 暗示主要的染色质重塑复合体与重编程有关。Hansis等^[22]将经过透性化处理的人类细胞置入非洲爪蟾卵母细胞或早期胚胎的提取物中, 能上调多能性标记因子Oct4、生殖细胞碱性磷酸酶等的水平。

细胞提取物诱导的体细胞重编程具有简单、灵活和可控的特点, 但是这种方法引起体细胞发生重编程的程度是有限的, 并且重编程后的体细胞容易发生返祖现象。

4 限定因子诱导

细胞的多能性受到多种因子的精细调控^[23]。细胞融合诱导的重编程表明ES细胞包含具有重编程作用的诱导多能性因子, 这些诱导多能性因子在ES细胞维持多能性方面发挥重要作用^[1]。Takahashi和Yamanaka^[24]选择了三组诱导多能性因子, 第一组为ES细胞特异表达的转录因子: Nanog、Oct3/4、Sox2、UTF1、Sall4、Sox15、Resx1; 第二组为与细胞生长和肿瘤相关的基因: c-Myc、Stat3、 β -catenin、Grb2、Klf4、TCL1、Eras; 第三组为在ES细胞中特异表达但迄今还未明确功能的因子: ECAT1、ESG1、Fbx15、DNMT3L、ECAT8、GDF3、ECAT15-1、ECAT15-2、Fth117、Stella。

三组诱导多能性因子共有24个, 将24个因子经过不同组合导入小鼠成纤维细胞, 产生表达报告基因的细胞群体, 结果发现了4个重要限定因子, 即Oct4、Sox2、Myc和Klf4在成纤维细胞重编程过程中具有重要作用。4种因子导入后, 小鼠成纤维细胞呈现形态和功能的变化, 转变成具有分化能力的多能性干细胞, 即iPS细胞。接着证明了用这种方法培育出的小鼠iPS细胞可以和小鼠胚胎嵌合, 嵌合胚胎能够发育成嵌合体小鼠^[25, 26]。采用导入限定因子的方法, 外源限定因子能够使人类的体细胞转变成人iPS细胞^[27, 29]。Nakagawa等^[30]从Oct4、Sox2、Myc和Klf4 4个限定因子中去除Myc后可以不通过药物筛选也能有效地分离iPS细胞, 但是iPS细胞产生的效率明显降低^[31, 32]。在国内, Qin等^[33]运用逆转录病毒将4个限定因子导入未经遗传修饰的小鼠成纤维细胞, 获得小鼠iPS细胞, 优化了iPS细胞诱导方案, 探索出了直接获得iPS细胞的新途径。通过限定因子诱导, 终末分化的成体细胞也能重编程为多能状态, Hanna等^[34]将终末分化的成熟B淋巴细胞诱导为iPS细胞。另外, iPS细胞具有治疗潜能, 试验研究在患有人镰刀型细胞贫血症^[35]和帕金森症^[36]的小鼠模型上获得成功。Hanna等^[35]从患有镰刀贫血症小鼠的尾部提取皮肤成纤维细胞, 通过转基因诱导获得的自体的iPS细胞, 给这些细胞添加修复血色素基因使它们成为造血干细胞, 将这种分化的细胞注入患有镰刀贫血症小鼠的体内, 明显减缓了镰刀贫血症的症状。

4.1 iPS细胞的限定因子 Oct4、Sox2、Myc和Klf4 4个限定因子在体细胞重编程过程中相互协作, 但每个限定因子在细胞生长发育过程中具有不同的功能。

Oct4属于POU转录因子家族的一员, 在着床前胚胎、内细胞团(inner cell mass, ICM)、生殖细胞、ES细胞等中均有较高的表达水平。Oct4作为与胚胎发育多能性相关的转录因子, 通过多种调控机制激活或抑制不同靶基因的转录, 在维持ES细胞的多能性和自我更新方面起着重要作用, 是哺乳动物胚胎发育过程中一个关键的调控因子。在胚胎发育过程中丧失Oct4表达的细胞将分化为体细胞系, 而维持Oct4表达的细胞具有全能性, 并能够发育成为生殖细胞。Oct4在ES细胞中特异表达, 在成体干细胞如间充质干细胞中也能检测到。

转录因子Sox2是SOX基因家族的一员, SOX

基因家族编码一组进化上高度保守, 结构上与哺乳动物性别决定基因相关的转录因子。Sox2在胚胎发育的早期表达, 由于Sox2与Oct4在桑葚胚、ICM和生殖细胞等的表达广泛重叠, 提示两者在维持多能性方面具有平行作用。Sox2作为早期胚胎多能性谱系细胞和胚胎外胚层具有多种发育潜能的一个标志物, 外源性表达的限定因子Sox2与Oct4发挥协同作用, 共同维持iPS细胞的ES细胞特征。

Myc癌基因家族能促进肿瘤的发生, 在哺乳动物体内, 其家族有4种相关基因: C-myc、N-myc、L-myc、S-myc。B-myc编码的蛋白与其他myc编码的蛋白不同, 虽然N末端有显著的同源性, 但C末端缺少一个基本的区域, 目前在生物学上对B-myc了解较少^[37]。Myc能使全基因组广泛去甲基化松散染色质, 使Oct4和Sox2接近到各自的转录调节位点控制下游基因的转录, 从而使iPS细胞获得多能性。在诱导产生iPS细胞过程中如果没有Myc, 重编程的进程将减慢, 将显著降低iPS细胞形成效率和推迟iPS细胞克隆的产生^[38], 其原因主要是由于Myc具有增强细胞增殖能力; 同时Myc也是iPS细胞引发肿瘤形成的关键因素之一。

锌指转录因子Klf4像Myc一样, 都是与癌症相关的基因, 都是LIF诱导ES细胞中活化的STAT3的下游靶点。Klf4的作用主要有两方面: 一方面作为Oct4和Sox2的协同因子^[39]; 另一方面发挥抑制细胞凋亡的作用。它的过表达导致Oct4的持续表达, 而且在ES细胞中抑制分化。与Sox2相似, Klf4也能作为Oct4介导的基因转录调控的辅助因子。由于Klf4和Myc是慢性修饰物并能使细胞长久保存, 这两个转录因子在iPS细胞中可能会由另外一些转录因子或小分子取代。

4.2 iPS细胞的筛选 iPS细胞的筛选有两种方法: 通过形态学特征或用药物对转染的细胞进行选择。通过形态学筛选主要根据iPS细胞与ES细胞具有相似的形态学特征, 即单个细胞呈圆形或卵圆形, 细胞小, 核大, 彼此间紧密接触, 能够呈现指数生长趋势; 另一种方法是通过在特异性启动子作用下的药物筛选。Yamanaka^[40]在研究中选用了Fbx15作为筛选iPS细胞的报告基因, 通过同源重组技术将 β -geo序列(融合的 β -半乳糖苷酶基因和新霉素抗性基因)插入到小鼠Fbx15序列中, 当Fbx15被激活时, ES细胞能产生对高浓度G418(12mg/mL)的抗性, 而体细胞衍生的Fbx15 β geo/ β geo鼠对选择是敏感的, 即

使多能性只是部分诱导, 体细胞也能抗普通浓度(0.3 mg/mL)的G418。限定因子通过逆转录病毒转染导入Fbx15 β geo/ β geo小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, ME), 这些细胞培养在含有G418的ES细胞培养基中, 用任何一种单一因子都没有抗G418的细胞集落产生。通过4种限定因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4结合, 获得了多重抗G418的细胞集落。这些细胞在形态和增殖特性上显示了与ES细胞相似的特征, 而且, 当植入有免疫缺陷的小鼠体内后, 这些ES细胞样细胞能产生包含三胚层的畸胎瘤, 证实通过限定因子作用, 成纤维细胞能够转变成多能干细胞。经Fbx15选择的iPS细胞能形成畸胎瘤, 但不能形成嵌合体小鼠。DNA微阵列分析表明, 经Fbx15选择的iPS细胞和ES细胞在总体基因表达模式上有较大的差异, 而且经Fbx15选择的iPS细胞在Oct4和Nanog启动子区保持甲基化, 表明Fbx15-iPS细胞只有ES细胞的部分特征, 可能表示重编程不完全。为了克服这个问题, Oct4或Nanog作为启动子选择多能性细胞是一种比较适合的选择标记^[25, 26, 41]。与Fbx15相比, Nanog或Oct4更能呈现出iPS细胞多能性的形态特征和功能, 因此是一个更好的选择标记。通过Nanog或Oct4选择的iPS细胞在基因表达和表观遗传状态上与ES细胞几乎无法区别, 而且Nanog或Oct4选择的iPS细胞能产生成年和种系嵌合能力的嵌合体^[42]。

4.3 iPS细胞的鉴定 iPS细胞与ES细胞具有相似的生物学特性、自我更新和分化能力, 主要表现在形态学、标记基因表达、甲基化和乙酰化的表观遗传状态、体外胚状体的形成、体外及体内分化、畸胎瘤形成等方面^[43], 基因组DNA分析和短串联重复分析证实, 独立的人iPS细胞克隆的遗传来源是其亲本成纤维细胞, DNA微阵列分析揭示了人iPS细胞和人ES细胞的整个基因表达图谱极为相似。Wernig等^[41]证实iPS细胞对整个基因组的去甲基化具有耐受的能力, 与ES细胞相似。目前建立的iPS细胞在形态和生长特性方面与ES细胞基本一致, 同时具有发育为三个胚层细胞的能力, 能参与生殖系的发育; 在表观遗传学特征方面, iPS细胞与ES细胞具有相似的DNA甲基化和组蛋白修饰模式^[44], iPS细胞与ES细胞在总体基因表达方面的DNA微阵列分析表明上调了iPS细胞中许多基因, 这些基因在ES细胞中有特异表达, 但在小鼠胚胎成纤维细胞MEF中没有特异表达^[45]。用形态学、标记基因表达、甲

基化和乙酰化的表观遗传状态、体外胚状体的形成、体外及体内分化、畸胎瘤形成等方面的指标能够评判获得的 iPS 细胞是否具有 ES 细胞的多能性特征。

4.4 iPS 细胞存在的问题及展望 iPS 细胞诱导技术提供了一种全新的体细胞核重编程方法,但是这种技术还有一些问题尚待进一步解决,如安全性与诱导效率等。Takahashi 和 Yamanaka^[24]用 Oct4、Sox2、Klf4 与 Myc 4 种转录因子诱导出小鼠 iPS 细胞,用这种 iPS 细胞构建的小鼠肿瘤发生率高达 20%,可能是由于 Myc 基因诱发和逆转录病毒插入激发的癌变造成的。

限定因子诱导的体细胞重编程为多能干细胞是生命科学领域的又一次重大突破。iPS 细胞的诞生打开了在生物医学和再生医学的广泛应用局面,打破了再生医学种子细胞短缺的窘境,使细胞组织器官移植与受体具有免疫兼容性,有望医治临床上的疑难疾病,如糖尿病、帕金森病、老年痴呆症、心力衰竭和脊髓损伤等^[40]。iPS 细胞诱导技术除其在干细胞治疗与再生医学的应用价值外,也为研究发育与生殖、疾病发生发展机制、基因表达调控、蛋白质互作、RNA 功能等提供了一个非常重要的实验模型。目前,iPS 细胞诱导技术还处于起步阶段,一些问题尚待解决,但随着利用这项技术掌握细胞重构的发生发展机制后,iPS 细胞将会造福于人类。

【参 考 文 献】

- [1] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 39-49
- [2] Cibelli JB, Kocabas AM, Beyhan Z, et al. Cellular reprogramming for the creation of patient-specific embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(4): 289-95
- [3] Park IH, Daley GQ. Debugging cellular reprogramming. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(8): 871-3
- [4] Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 626: 1-15
- [5] Farthing CR, Ficuz G, Ng RK, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet*, 2008, 4(6): e1000116
- [6] 薛京伦. 表观遗传学——原理、技术与实践[M]. 上海: 科技出版社, 2006: 81-90
- [7] Giraldo AM, Hylan DA, Ballard CB, et al. Effect of epigenetic modifications of donor somatic cells on the subsequent chromatin remodeling of cloned bovine embryos. *Biol Reprod*, 2008, 78(5): 832-40
- [8] Dennis K, Fan T, Geiman T, et al. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev*, 2001, 15(22): 2940-4
- [9] Li J, Svarcova O, Villemoes K, et al. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 2008, 70(5): 800-8
- [10] Yang FK, Hao R, Kessler B, et al. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 2007, 133(1): 219-30
- [11] Ding X, Wang Y, Zhang D, et al. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 2008, 70(4): 622-30
- [12] Cezar GG. Epigenetic reprogramming of cloned animals. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(3): 165-80
- [13] Ma DK, Chiang CH, Ponnusamy K, et al. G9a and Jhd2a regulate embryonic stem cell fusion-induced reprogramming of adult neural stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(8): 2131-41
- [14] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309(5739): 1369-73
- [15] Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1553-8
- [16] Silva J, Chambers I, Pollard S, et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, 2006, 441(7096): 997-1001
- [17] Do JT, Schöler HR. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 941-9
- [18] Bru T, Clarke C, McGrew MJ, et al. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res*, 2008, 314(14): 2634-42
- [19] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006, 441(7097): 1061-7
- [20] Collas P, Taranger CK. Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(4): 309-17
- [21] Kikyo N, Wade PA, Guschin D, et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science*, 2000, 289(5488): 2360-2
- [22] Hansis C, Barreto G, Maltry N, et al. Nuclear reprogramming of human somatic cells by *Xenopus* egg extract requires BRG1. *Curr Biol*, 2004, 14(16): 1475-80
- [23] Yamanaka S, Li J, Kania G, et al. Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1): 5-22
- [24] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [25] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germ-line competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-7
- [26] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70
- [27] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined

- factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [28] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [29] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-6
- [30] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 101-6
- [31] Pera MF, Hasegawa K. Simpler and safer cell reprogramming. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 59-60
- [32] 刘爽, 段恩奎. 诱导产生多能性干细胞(iPS细胞)的研究进展. *科学通报*, 2008, 53(4): 377-85
- [33] Qin DJ, Li W, Zhang J, et al. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by oct4/sox2/myc/kif4. *Cell Res*, 2007, 17(11): 959-62
- [34] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250-64
- [35] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-3
- [36] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-61
- [37] Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8): 635-45
- [38] Knoepfler PS. Why Myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 18-21
- [39] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, et al. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the *Lefty1* core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7772-82
- [40] Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif*, 2008, 1: 51-6
- [41] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES cell-like state. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-24
- [42] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008, 132(4): 567-82
- [43] Zaehres H, Scholer HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*, 2007, 131(5): 834-5
- [44] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-9
- [45] Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(5): 467-73