

文章编号: 1004-0374(2009)03-0357-06

细胞重编程与表观遗传学调控

习佳飞, 岳文, 裴雪涛*

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要: 细胞重编程是生命科学研究的热点之一, 目前体细胞核移植、细胞融合和特定转录因子诱导等方法都可以实现体外细胞重编程, 而在细胞重编程过程中表观遗传学发挥关键的调控作用, 因此对重编程过程中表观遗传学调控机制开展深入研究具有重要的意义。本文简要综述细胞重编程的研究现状和表观遗传学调控细胞重编程机制的研究进展, 并对小分子化合物和 microRNA 提高细胞重编程效率的最新进展进行了介绍。

关键词: 细胞重编程; 表观遗传学; 诱导性多能干细胞

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Cellular reprogramming and epigenetic gene regulation

XI Jia-fei, YUE Wen, PEI Xue-tao*

(Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Beijing Institution of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: Cellular reprogramming is the process of directing mature cells to a primitive state of gene expression. Now three reprogramming strategies have been studied extensively: somatic cell nuclear transfer, cell fusion, and introduction of specific transcriptional factors. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in cellular reprogramming, so a greater understanding of epigenetics will continue to be enlightened by advances in cellular reprogramming. Here we review the recent literature on cellular reprogramming and epigenetic gene regulation mechanisms underlying nuclear reprogramming. We also highlight the research progresses on increasing reprogramming efficiency by using small molecular compound and microRNA.

Key words: cellular reprogramming; epigenetics; induced pluripotent stem cells

发育分化调控机制一直是生命科学研究中最重要的问题之一, 发育生物学的首要研究内容就是探讨细胞如何定向分化。近年来, 干细胞尤其是胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)的体外定向诱导分化为发育生物学的研究提供了良好的模型。除了正向细胞分化外, 研究者一直以来都在尝试逆转细胞分化过程, 为更深入地研究发育分化提供新的思路和方向, 我们将这种成熟终末分化的细胞逆转为原始的多能, 甚至是全能干细胞细胞状态的过程称为细胞重编程(cellular reprogramming)。

目前已经可以通过多种方法实现细胞重编程, 包括体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)实现重编程, 与多能干细胞融合实现重编程。自2006年以来, 诱导多能干细胞(induced

pluripotent stem cells, iPS细胞)的出现大大地拓展了细胞重编程的研究内容。细胞重编程领域日新月异的研究进展无疑使得人们有机会更加深入和全面地探讨细胞发育分化机制。不仅如此, 细胞重编程调控机制的探讨与阐明将使人们有望早日实现干细胞用于临床组织器官修复与再生的梦想, 有助于人们对疾病发生机制的明确以及新的疾病诊治药物的开发, 因此具有重要的理论和实际意义。而且, 越来越多的研究表明表观遗传学在细胞重编程中扮演

收稿日期: 2009-05-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863计划”)领域重大项目(2006AA02A107); 国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522702, 2009CB941100)

*通讯作者 E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

着至关重要的角色。本文就细胞重编程以及细胞重编程过程中的表观遗传学调控相关研究进展做出综述。

1 细胞重编程

利用体细胞核移植、细胞融合和特定转录因子转染等方法科学家已经能够成功将体细胞重编程建立多能性干细胞系,通过核移植技术还可以培育出克隆动物。

1.1 体细胞核移植重编程 在20世纪50年代早期Briggs和King^[1]成功地将囊胚期细胞核移植到去核的豹纹蛙(*Rana pipiens*)卵母细胞内,继续体外培养使其发育为蝌蚪,这就是最早的细胞核移植(nuclear transfer, NT)技术。Gurdon和Byrne^[2]将蝌蚪的肠细胞核移植到去核卵母细胞内最终形成有生育能力的成年个体。由于哺乳动物细胞体积非常小,哺乳动物核移植重编程要面临更多的技术挑战,直到1975年首次报道利用细胞核移植技术建立了兔的桑椹期胚胎,但是效率非常低^[3]。随着细胞核移植技术的不断成熟,利用胚胎期细胞作为供核细胞成功获得了不同种类克隆动物^[2],但是利用终末分化细胞作为供核细胞获得克隆动物却一直未能成功,直到1996年克隆羊“多莉”的出生才实现巨大的突破,成为里程碑式的研究成果。自“多莉”之后,利用终末分化的成体细胞作为供核细胞建立了包括牛、小鼠、山羊、猪、猫和兔等物种克隆动物^[2]。

克隆胚胎除了用于培育克隆动物外还用于建立ES细胞系^[4]。建立的ES细胞系与供体细胞具有相同的遗传背景,能解决今后应用于临床治疗时免疫排斥问题^[5]。但是遗憾的是,目前还不能通过体细胞核移植建立人ES细胞系,虽然最近有研究表明可以利用细胞核移植技术建立灵长类动物ES细胞系^[6]。另外,需要指出的是,在体细胞核移植研究中目前一般认为分化的程度与克隆胚胎形成的效率成反比^[7],但是也有研究在造血细胞中发现成熟分化的细胞具有较高的克隆成功率^[8]。

通过细胞核移植技术建立人ES细胞系的一个非常大的限制是人卵母细胞的获取受到很多伦理学问题的困扰。最近的一项研究利用受精卵作为受核细胞成功建立小鼠ES细胞系,尽管该方法目前只在小鼠实现,但是该研究提示今后可能利用临床体外受精技术遗弃的受精卵来建立人ES细胞系,从而避免人体细胞核移植中备受争议的卵母细胞获取问题^[9]。

1.2 细胞融合实现重编程 多能干细胞在体外能够维持其多能性,其胞质内存在调控和维持这种多能性的关键作用分子,同样可能存在能够重编程体细胞的关键分子,将多能干细胞和体细胞融合能够将体细胞重编程为多能性干细胞。早在1976年研究者已将胸腺细胞与胚胎癌(embryonic carcinoma, EC)细胞融合,融合后的体细胞表现出分化上的多能性^[10],同样将体细胞与小鼠ES细胞融合也实现了重编程体细胞为多能性干细胞^[11]。最近的研究表明与人ES细胞融合同样能够实现体细胞的重编程^[12, 13]。

细胞融合重编程体细胞同样存在重大的缺陷,那就是重编程后的多能干细胞是四倍体细胞,为了解决该问题,最近研究建立了从融合细胞中选择性地去除特定染色体的方法,并利用该方法将ES细胞来源的含有Nanog基因的染色体特异性地去除,但是并不影响融合细胞的多能性,进一步证明体细胞重编程后获得了自主的多能性^[14]。然而,利用该方法去除所有的ES细胞来源的染色体目前仍无法实现。另外,还有不少研究利用ES细胞的提取物来重编程体细胞,这些也再次验证了ES细胞内含有的一些关键的调控分子可以实现体外重编程体细胞为多能性干细胞^[15-17]。

1.3 特定转录因子诱导体细胞重编程 上述体细胞核移植重编程和细胞融合重编程研究的开展对于研究如何逆转体细胞为多能性干细胞积累了大量的经验,科学家们也一直在寻找体外“直接重编程”(direct reprogramming)体细胞的方法。2006年,日本京都大学Yamanaka研究小组发现,把4种与维持ES细胞全能性相关的基因(*Oct4*、*Sox2*、*c-myc*和*Klf4*)通过逆转录病毒载体转入小鼠的成纤维细胞,可以把成纤维细胞变成类似于ES细胞的多能干细胞,并将其命名为iPS细胞。iPS细胞在形态、增殖分化能力、细胞表面抗原、基因表达模式等方面,均与ES细胞有着极大的相似性^[18]。随后,2007年底日本Yamanaka和美国Thomson实验室分别在Cell^[19]和Science^[20]杂志上报道他们利用人皮肤成纤维细胞培育出了人iPS细胞。随后美国的另一个研究小组也发表了其独立建立的人iPS细胞的研究成果,并尝试利用多种细胞来诱导生成iPS细胞,其中包括成人来源的间充质干细胞^[21]。iPS细胞建立是干细胞研究领域的又一里程碑式的研究成果,自问世以来引起了研究者的极大关注,围绕iPS细胞开展了大量的研究,最新的研究进展层出不穷,包

括如何提高诱导分化的效率 and 安全性, 并对 iPS 细胞产生的机制进行了初步地研究探讨^[22]。

围绕 iPS 细胞实际应用的研究进展也非常迅速, iPS 细胞建立后, 首先将其向造血细胞诱导分化, 并用于治疗患镰刀状细胞性贫血的小鼠^[23]。同时还将小鼠 iPS 细胞诱导分化为神经元和神经胶质细胞, 体外诱导的神经细胞能够在体内整合入小鼠大脑组织内发挥功能^[24]。iPS 细胞技术的建立使得在获得患者的 iPS 细胞方面取得了鼓舞人心的突破, 如 Dimos 等^[25]成功将一个患家族性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的 82 岁女性患者的成纤维细胞重编程为 iPS 细胞, 并且诱导 iPS 细胞获得有一定功能缺陷的运动神经元, 该模型的建立可以用来研究该疾病的发病机制, 筛选可能的治疗药物, 并有可能最终应用于自体细胞移植治疗 ALS。Ebert 等^[26]从患脊髓性肌萎缩的儿童患者皮肤成纤维细胞成功获得 iPS 细胞, 其能够在体外增殖, 并且能够保持疾病的基因表型, 体外诱导分化能够形成运动神经元^[26]。此外, 更多种类的人类疾病 iPS 细胞系已经成功建立^[27], 这些细胞系的建立为研究相关疾病的发生机制和相关药物开发提供了十分珍贵的模型。

iPS 细胞的建立将整个细胞重编程的研究推向了一个新的高潮, 为体外研究发育分化机制提供了更加方便的模型, 而且使得将干细胞发育分化研究应用于临床治疗、药物筛选和相关疾病的发病机制研究推进了一大步。但是, 目前 iPS 细胞建立的效率与细胞核移植建立克隆胚胎一样, 效率仍然非常低, 而且其建立方法仍然有安全风险, 需要进一步对 iPS 细胞形成的机制进行更详细的研究, 并且利用相关的研究成果, 提高其建立的效率。

在体细胞核移植过程中研究者已经发现表观遗传学调控发挥了关键的核心调控作用^[28], 而且表观遗传学在细胞重编程过程中的作用也得到了较好的阐述。目前随着 iPS 细胞建立, 我们一方面可以利用表观遗传学的相关研究提高 iPS 细胞建立的效率; 另一方面利用 iPS 细胞作为体外模型深入研究细胞重编程过程中表观遗传学的调控机制。

2 表观遗传学与细胞重编程

表观遗传学调控指在不改变基因 DNA 序列的前提下, 通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑以及非编码 RNA 调控等途径影响和调节基因表达和功能发挥。作为近几年来生命科学领域的研究热

点, 表观遗传学研究手段得到了日新月异的发展, 与之相关的研究领域日益拓宽, 目前已有的研究表明, 表观遗传学在胚胎早期发育特别是干细胞的分化与成熟过程中扮演着重要的角色。Reik^[29]提出“发育的过程实际上就是表观遗传学发挥作用的过程”。在具有多向分化潜能的干细胞阶段, 决定细胞分化和成熟的系列基因由于受到表观遗传学的修饰而沉默, 其中包括组蛋白的去乙酰化或者基因启动子区域的高甲基化等。随着多潜能干细胞向成熟细胞分化, 这些基因因组蛋白乙酰化或者 DNA 的去甲基化而开始表达, 与此相反的是, 许多在干细胞早期发育阶段表达的印迹基因或多潜能相关基因却由于 DNA 高甲基化等原因在成熟体细胞中向沉默转归。因而对干细胞发育中的表观遗传学调控机制的研究在干细胞生物学领域中方兴未艾, 并已经取一系列的重要成果。体细胞经过重编程成功诱导为 iPS 细胞无疑是目前干细胞生物学研究领域最为激动人心的进展, 探讨 iPS 的重编程机制无疑是科学家们进一步研究的热点, 而作为在干细胞发育与分化中具有重要作用的表观遗传学就有可能在重编程过程中扮演重要角色。

2.1 表观遗传学与细胞核移植 体细胞核移植入去核卵母细胞后, 要成功实现细胞重编程, 首先, 体细胞必须停止表达其自身特定的基因产物; 其次, 细胞核在卵母细胞细胞质的作用下重新建立新的基因表达模式; 再次, 移植入细胞核的可遗传的表观遗传学记忆必须删除。所有这些改变并不改变基因组序列, 而是通过表观遗传学改变来实现^[30]。在细胞核移植过程中供核细胞的表观遗传学标志的删除和多能干细胞相关表观遗传学标志的重新建立对于核移植成功与否是至关重要的, 在正常发育的胚胎中, 表观遗传学的标记是经过配子发生和受精等在较长时间内形成的, 而核移植时, 整个过程需要在极短的时间内完成, 在此过程中极可能会发生表观遗传学异常改变, 使得重编程不完全^[31]。例如 Bourchis 等^[32]证明克隆胚胎细胞中的某些基因具有高甲基化水平, 与供体细胞核非常相似, 其去甲基化状态明显不足, 提示核移植后的细胞重编程并不完全。

与此同时, 研究也发现大部分的克隆胚胎并不完全健康, 克隆动物胚胎经常会出现一种称为“胎儿过大综合征”(large offspring syndrome) 的症状, 这与临床上所见的印记基因相关疾病 Beckwith-

iedemann 综合征非常相似,其临床表现包括胚胎过度增生、巨舌、发育巨大等^[33],研究表明,该病的主要原因在于 11 号染色体上的 IGF2 和 CDKN1C 两个印记基因的错误表达引起,同样提示核移植过程中的体细胞重编程并不完全^[34]。另外,很多看起来健康的克隆动物面临很多不同的健康问题,而且克隆动物细胞基因表达谱不正常^[35]。这些问题的产生机制目前尚不完全清楚,但是科学家们一直推测其可能与包括印记基因在内的表观遗传学调控机制有关^[36]。印记基因是一组独特的调控胚胎生长和发育的基因,特别是在胎盘中发挥作用,而且对于出生后的行为和认知亦发挥作用。印记基因的表达对于环境的改变非常敏感,研究表明,通过辅助生殖建立的人类胚胎和核移植建立的不同物种的克隆胚胎中印记基因存在广泛的甲基化缺陷^[37, 38]。在整个基因组范围内,近 50% 的克隆牛和羊的胚胎有严重 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化重编程错误,而且在一些特定的基因位点甲基化错误的概率更高^[39, 40]。

这些结果都表明了表观遗传学在细胞重编程中具有关键调控作用,细胞重编程是否成功的关键就在于表观遗传学是否能够重建,细胞重编程其实可以看作就是表观遗传学的重编程。

2.2 表观遗传学与诱导性多能干细胞 很多研究已经表明表观遗传学对于维持干细胞多能性发挥着非常关键的作用^[41],因此表观遗传学的改变在 iPS 细胞建立过程中同样具有关键的作用。

随着大规模测序技术的发展,使得在全基因组范围内研究表观遗传学的变化成为可能。Mikuelson 等^[42]通过基因组学分析方法对重编程的机制进行了研究,结果提示 iPS 细胞建立效率极低主要由于两方面的原因:一是重编程过程中对分化相关的转录因子抑制不完全;二是 DNA 的去甲基化不完全。该研究小组分别对特定转录因子进行 knockdown 和使用 DNA 甲基转移酶抑制剂影响表观遗传学改变,两种方法的结果均显示可以提高重编程的效率。

成功的重编程体细胞成为 iPS 细胞需要可靠的重构表观遗传学改变,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰及雌性细胞内静息的 X 染色体的重新激活等^[43]。在 iPS 细胞实际应用中同样需要特别关注表观遗传学的改变,因为表观遗传学的异常可以引起肿瘤等疾病的发生^[44]。最近的研究在基因水平、染色体水平和整个基因组水平分析了 iPS 细胞表观遗传学的改变,结果表明其表观遗传学与 ES 细胞非常类似^[45]。

但也有研究表明在对成纤维细胞和多能干细胞包括 iPS 细胞的甲基化水平分析时,发现 iPS 细胞与胚胎干细胞相比呈现出较高的甲基化水平^[46]。

调控 iPS 细胞建立的确切机制虽然尚未明确,但是,Jaenisch 和 Young^[47]指出, DNA 新生的甲基化和整体低甲基化水平对于细胞重编程和维持细胞多能性非常关键,另外,组蛋白修饰和 PcG (Polycomb-group) 蛋白对于 ES 细胞的干性也是必需的,需要在重编程的细胞中重新表达。针对这些认识,研究者利用调控表观遗传学改变的小分子化合物可以明显提高 iPS 细胞生成的效率,并简化 iPS 细胞诱导的方法。

研究表明,利用两个小分子化合物和 Oct4 及 Klf4 两个转录因子可以成功诱导小鼠胚胎成纤维细胞形成 iPS 细胞,所用小分子化合物分别为 BIX-01294 [G9a histone methyltransferase (G9a HMTase) Inhibitor, G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂] 和 BayK8644 (L-channel calcium agonist, 一种钙激动剂)^[48]。另外, DNA 甲基转移酶抑制剂和组蛋白脱乙酰化酶抑制剂亦可提高重编程效率,尤其是丙戊酸 (valproic acid, VPA, 一种组蛋白脱乙酰化酶抑制剂) 可以提高重编程效率超过 100 倍^[49]。更进一步的研究表明,添加 VPA 的 Oct4、Sox2 两因子诱导体系中,重编程也可以进行,说明小分子化合物不仅可以提高诱导重编程的效率,同时可以替代某个诱导因子来进行重编程^[50]。这些调控表观遗传学改变的小分子化合物在诱导 iPS 生成过程中具有确定的作用,还具有更大的开发前景,仅利用小分子化合物就能实现 iPS 的重编程是今后研究人员努力的方向。

表观遗传学另一个重要的组成部分是非编码 RNA,包括小核仁 RNA、microRNA、干涉 RNA 和小双链 RNA 等多种 RNA 分子。其中 microRNA 在干细胞发育分化调控中发挥着关键的调控作用,在 ES 细胞发育分化和胚胎发育过程中表达很多特异性的 miRNA^[51],而且在神经细胞^[52]和造血细胞分化^[53]中很多 miRNA 发挥重要调控作用。Wang 等^[54]研究表明, miRNA290 家族可以调控 mES 细胞的 G1/S 期的转换,进而促进 ES 细胞的增殖,最近的研究表明 microRNA 可以和 Nanog、Oct4、Sox2 基因的编码区发挥作用调控 ES 细胞的发育分化^[55],这为 microRNA 直接参与干细胞多能性的维持提供了直接的证据。

在 iPS 细胞诱导形成过程中 microRNAs 同样发挥关键的作用。最近的一篇文章用 microRNA 基因芯片分析 iPS 细胞、ES 细胞和胎儿成纤维细胞中 microRNA 表达情况, 结果表明在多能性干细胞中存在明显上调的 microRNA, 如 miR-302 等, 而且在 iPS 和 ES 细胞比较时同样有 microRNA 表达不同存在, 如 miR-371/372/373 等^[56]。最新的一项非常有意义的研究表明, 单用 Mir-302 可以将皮肤癌细胞重编程为 ES 细胞样的多能干细胞, 获得的多能干细胞通过基因芯片检测表明其与人 ES 细胞系 H1 和 H9 相比, 基因表达有 86% 的相似性, microRNA 诱导的多能干细胞同样具有多向分化能力^[57]。利用 miR-291-3p、miR-294 和 miR-295 可以提高 Oct4、Sox2 和 Klf4 三个因子重编程效率, 但是在添加 c-Myc 后其促进作用消失, 进一步研究表明 c-Myc 可以结合这些 microRNA 的启动子, 因此, 这些 microRNAs 可能是 c-Myc 的下游调控靶基因^[58]。

microRNAs 在干细胞干性维持及 iPS 细胞建立中的相关研究表明其在体外 iPS 细胞建立中发挥关键的作用, 利用小分子化合物和 microRNAs 结合有可能简单高地效建立 iPS 细胞系。

3 结语

尽管细胞重编程研究领域取得了突飞猛进的进展, 但是该领域中依然有很多重要的问题有待于科学家们进一步探讨和解决。科学家的关注的焦点将进一步集中在对细胞重编程的表观遗传学调控机制上, 包括细胞重编程的过程中, 在表观遗传学水平上究竟发生了什么变化; iPS 细胞又是如何通过细胞分裂和分化重新改变其表观遗传学特性; 通过怎样的表观遗传学调控机制最终可以使人们安全高效获得 iPS 细胞, 等等。以上问题的阐明可以使重编程技术更好的应用于基础研究和临床应用, 有助于人们对疾病发生机制的明确, 对新的疾病诊治药物的开发也具有重要的理论和实际意义。

[参 考 文 献]

- [1] Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc Natl Acad Sci USA, 1952, 38(5): 455-63
- [2] Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8048-52
- [3] Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg. Nature, 1975, 258(5537): 719-22
- [4] Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Science, 2001, 292(5517): 740-3
- [5] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N Engl J Med, 2003, 349(3): 275-86
- [6] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature, 2007, 450(7169): 497-502
- [7] Blelloch R, Wang ZD, Meissner A, et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. Stem Cells, 2006, 24(9): 2007-13
- [8] Sung LY, Gao SR, Shen HM, et al. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. Nat Genet, 2006, 38(11): 1323-8
- [9] Egli D, Rosains J, Birkhoff G, et al. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. Nature, 2007, 447(7145): 679-85
- [10] Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. Cell, 1976, 9(1): 45-55
- [11] 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
- [12] 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
- [13] Junying Y, Ping H, Slukvin II, et al. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. Stem Cells, 2006, 24(1): 168-76
- [14] Matsumura H, Tada M, Otsuji T, et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. Nat Methods, 2007, 4(1): 23-5
- [15] Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, et al. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. Mol Biol Cell, 2005, 16(12): 5719-35
- [16] Rajasingh J, Lambers E, Hamada H, et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from nih3t3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair. Circ Res, 2008, 102(11): e107-17
- [17] Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, et al. Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. Biol Reprod, 2009, 80(5): 935-43
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007, 318(5858): 1917-20
- [21] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature, 2008, 451(7175): 141-6
- [22] Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and in-

- duced pluripotency. *Development*, 2009, 136(4): 509–23
- [23] 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
- [24] 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
- [25] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218–21
- [26] Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277–80
- [27] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877–86
- [28] Armstrong L, Lako M, Dean W, et al. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 805–14
- [29] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, 447(7143): 425–32
- [30] Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 2001, 414(6859): 122–8
- [31] Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: R47–58
- [32] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1542–6
- [33] Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, 1998, 3(3): 155–63
- [34] Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*, 2001, 27(2): 153–4
- [35] Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of *Oct4*-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, 2003, 130(8): 1673–80
- [36] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 6–21
- [37] Mann MRW, Lee SS, Doherty AS, et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*, 2004, 131(15): 3727–35
- [38] Humphreys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12889–94
- [39] Shiota K, Yanagimachi R. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation*, 2002, 69(4–5): 162–6
- [40] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1116–21
- [41] Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, 2007, 128(4): 747–62
- [42] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49–55
- [43] Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293(5532): 1093–8
- [44] Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 2003, 300(5618): 489–92
- [45] 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
- [46] Deng J, Shoemaker R, Xie B, et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(4): 353–60
- [47] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008, 132(4): 567–82
- [48] Shi Y, Despons C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by *Oct4* and *Klf4* with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568–74
- [49] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795–7
- [50] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269–75
- [51] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351–8
- [52] Suh MR, Lee Y, Kim JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, 270(2): 488–98
- [53] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654): 83–6
- [54] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1478–83
- [55] Tay Y, Zhang JQ, Thomson AM, et al. MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455(7216): 1124–8
- [56] Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, et al. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009 Jan 12. [Epub ahead of print]
- [57] Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA-Publ RNA Soc*, 2008, 14(10): 2115–24
- [58] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 459–61