

文章编号: 1004-0374(2009)05-0608-06

· 评述与综述 ·

核移植与诱导多能干细胞技术在体细胞 重编程研究中的应用

蒋 婧, 李劲松*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,
中国科学院分子细胞生物学重点实验室, 上海200031)

摘 要: 体细胞重编程是指分化的体细胞在特定的条件下被逆转后恢复到多能性或全能性状态, 或者形成多能干细胞系, 或者形成早期胚胎然后发育成一个新的个体的过程。诱导体细胞重编程的方法有许多, 如核移植(nuclear transfer, NT)、细胞融合、细胞培养和通过导入特定因子获得诱导多能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞的方法等。其中核移植和iPS技术是到目前为止诱导体细胞为多能干细胞最为完全、最具有运用于临床再生医学潜能的方法。然而, 它们的效率都很低, 机制也不清楚, 如何将两个方法结合在一起, 提高重编程的效率, 揭示重编程的机制, 进而促进其在患者特异性治疗中的运用将是下阶段的努力方向。

关键词: 干细胞; 核移植; iPS 技术; 体细胞重编程; 胚胎干细胞

中图分类号: Q813; Q819 **文献标识码:** A

Application of nuclear transfer and iPS techniques in the study of somatic reprogramming

JIANG Jing, LI Jin-song*

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The differentiated state of a somatic nucleus can be reversed to an undifferentiated stem cell with pluripotent state or a reconstructed zygote with totipotent state, which is defined as somatic reprogramming. Adult cells can be successfully reprogrammed into pluripotent stem cells in various ways, including nuclear transfer (NT), cellular fusion, culture-induced reprogramming and induced pluripotent stem cell (iPS) by expression of transcription factors in somatic cells, in which, NT and iPS techniques offer tremendous promise for future development of patient-specific therapy. However, the reprogramming efficiency of NT and iPS are still low and the mechanisms remain elusive. The future challenge will be to reveal the molecular mechanisms potentially underlying reprogramming of somatic cell using NT and iPS techniques together.

Key words: stem cell; nuclear transfer; iPS technique; somatic reprogramming; embryonic stem cell

1 体细胞重编程

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)是从早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM)中分离得到的一种具有发育多能性的细胞^[1,2], 它具有自我更新能力, 能在体内或体外分化成机体的所有细胞类型, 但不能分化为胚外滋养细胞(extraembryonic tro-

phoblast lineage)^[3]。人类的胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)也已经成功建系^[4], 这

收稿日期: 2009-08-11

基金项目: 上海市科委重大项目(08DJ1400500); 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2009CB941100)

*通讯作者 E-mail: jsli@sibs.ac.cn

将广泛运用于细胞移植治疗,如幼年型糖尿病、帕金森症以及心力衰竭等等。然而对患者而言,目前已建系的hESC是来自异体,移植后会产生免疫排斥反应。要解决这一问题,最佳方法是直接利用来自患者的多能性细胞,即将患者的体细胞在体外重编程(reprogramming)为多能性细胞。

正常的发育是由精子和卵子受精后形成受精卵,然后发育为囊胚,最后分化成特定的组织和细胞,在这一过程中,细胞逐步丧失其核的全能性。体细胞核移植的成功证明分化的体细胞能够被卵胞质中的物质重编程为胚胎状的细胞,这说明哺乳动物在发育过程中,细胞虽然逐渐丢失了其发育成各种组织细胞的能力,但其仍然保存了发育成一个完整个体所需要的全部遗传物质,并且在特定的条件下可以发生逆转。这一成果的获得为开展患者特异的细胞治疗提供了一条新的途径,即通过核移植后获得来自患者的核移植胚胎干细胞系,然后将这些细胞分化成所需要的细胞用于治疗。

随着体细胞被证明能够被重编程后恢复全能性,这一领域的研究成为了生命科学的热点,出现了许多新的诱导体细胞重编程的方法。到目前为止,有效的体细胞重编程的方法有核移植(nuclear transfer)、细胞融合(cell fusion)、细胞培养(cell explantation)和iPS(induced pluripotent stem)技术。判断体细胞重编程的成功与否可以有两个标准,一是能否获得多能干细胞系,并在体内外证明其能够分化成三个胚层的组织和细胞;二是能否通过重编程首先获得全能性的细胞,即早期胚胎,然后其进一步发育成全部的组织 and 细胞,包括胚胎和胚外的组织和细胞。以上列举的方法均能达到第一个标准,即体细胞被重编程为多能性细胞的状态;而要完成第二个标准,只能通过核移植。对体细胞重编程的机制进行探讨或应用于细胞治疗达到第一个标准即可,而在优良家畜繁殖、转基因家畜的制备、宠物的克隆以及动物保护等应用领域则需要通过核移植的方法获得克隆动物。

ES细胞融合技术,是通过将分化细胞与ES细胞融合,从而得到具有ES细胞多能性的杂交细胞系。虽然已有实验证明细胞融合之后体细胞的核能够被成功地重编程,但其细胞融合效率很低,并且产生的是四倍体的细胞,故其应用前景较为局限^[5],然而该方法也是探讨重编程机制的重要手段^[6]。

细胞培养的方法是通过改变细胞生活条件,使

得原本要走向分化的细胞停止分化或者逆转而变成一种多能干性的维持状态,如从囊胚时期的ICM细胞体外分离培养得到ESC^[1,2]、原始外胚层(epiblast)体外分离培养得到原始外胚层干细胞(epiblast stem cell, EpiSC)^[7,8]、原始生殖细胞(primordial germ cells)体外分离培养得到胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EGC)^[9]、出生后的生精干细胞(spermatogonial stem cells, SSC)体外分离培养得到多能性成体生殖干细胞(multipotent adult germline stem cells, maGSCs)^[10]等。到目前为止,SSC是惟一能从出生后个体中分离得到的多能性干细胞,而且只能在雄性个体中获得,故其应用前景也较为局限。

核移植和iPS技术是通过特定的外界条件使得分化的体细胞逆转为多能干细胞的过程,所获得的多能干细胞是二倍体,且受体细胞类型的影响小,被认为是最具有应用前景的两种重编程的方法。然而这两种方法均效率低下,且重编程机制不清楚,是否两种方法有着相似的重编程机制,是否两种方法的结合能够促进体细胞机制的研究,还不得而知。下面将介绍核移植和iPS技术在体细胞重编程研究中的应用,并对两者结合应用于体细胞重编程研究的可能性进行初步的探讨。

2 核移植在体细胞重编程研究中的应用

1952年,Briggs和King^[11]首次成功地通过核移植方法获得了来自囊胚细胞的克隆蝌蚪,从此揭开了核移植的序幕。1997年,克隆羊“多莉”的报道,证明了哺乳动物体细胞也能用于核移植获得个体^[12],在世界范围内引起了一场动物克隆的风暴,许多哺乳动物先后被成功克隆^[13]。

所谓核移植,就是利用显微操作方法把供体细胞核移植入去核的受体卵母细胞中,然后经过活化后获得重构胚胎的过程。判断体细胞核移植后是否重编程成功可以有两个标准,一是获得多能干细胞的能力,即重构胚胎在体外发育到囊胚阶段后,是否能建立核移植胚胎干细胞系(nuclear transfer embryonic stem cell, ntES);二是获得克隆动物的能力,即将重构囊胚移入受体动物中是否能获得克隆动物。目前,通过胚胎移植后直接获得克隆动物的效率非常低,仅占重构囊胚的1%—3%^[14],而ntES细胞系的建立效率却能达到10%以上^[15,16]。在获得ntES细胞以后,一方面我们从一个供体细胞获得了大量的细胞可以用于其他研究,如探讨嗅觉神经细胞嗅觉受体基因选择机制^[15],另外可以将此细胞注入四

倍体囊胚中形成clonal小鼠^[17]或用作供体细胞进行第二次核移植获得克隆小鼠，也就是所谓的两步法核移植技术。研究人员先后成功地利用两步法核移植技术获得了来自终末分化的成熟B细胞、T细胞和嗅觉神经细胞的ntES细胞系、clonal小鼠和二次核移植后的克隆小鼠^[15, 18, 19]。另一方面，ntES细胞可以在体外被诱导形成特定的体细胞用于治疗，许多研究证明ntES细胞与ES细胞的多能性基本相当^[17, 20, 21]。这样利用核移植技术可以获得来自供体的胚胎干细胞，在体外诱导后可获得表达任何特异性基因的细胞类型，就可以用于替代不可修复或受损的细胞进行相关疾病的治疗，即所谓的“治疗性克隆”^[22]。虽然人类的ES细胞系于1998年成功建立^[4]，但至今人类的ntES细胞却没能建立，这一方面因为人卵不易获取；另一方面，该技术涉及到伦理问题，因此大大影响了人的核移植技术的建立及其在人类再生医学领域的应用。

3 iPS技术在体细胞重编程研究中的应用

2006年，Yamanaka课题组^[23]将24个对维持ES多能性有重要作用的因子，经逆转录病毒导入小鼠胚胎或成体的成纤维细胞中，诱导形成iPS细胞，通过不同因子组合的分析和比较，最后筛选出能诱导形成iPS细胞最具功能的4个因子，即Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4。由于iPS技术的可操作性强，在过去的三年时间里，该技术取得了许多重大的突破，如不需要通过药物的筛选获得的iPS细胞^[24, 25]；通过采用*Nanog*基因^[26]或*Oct4*基因^[27]作为筛选标记获得了具有和ES细胞几乎一样表达谱的iPS细胞系；iPS细胞用于治疗小鼠镰刀性贫血模型^[28]和缓解帕金森症小鼠的症状^[29]；不需要致癌基因*c-Myc*参与的iPS细胞的建立^[30, 31]，以及通过添加小分子化合物大大提高iPS细胞的获得率^[32-34]等等。特别值得一提的是人的iPS细胞的获得^[35-38]，以及来自多种疾病病患的iPS细胞的建立^[39, 40]，这些成果的取得使得iPS技术获得了广泛的关注，它让人们看到了运用该技术进行疾病治疗的希望，特别是患者特异的移植治疗。

然而，iPS细胞存在外源因子整合到基因组中的缺点，这增加了细胞发生变异的风险，阻碍了其在再生医学上的运用。因此，在过去的一年中，许多实验室都致力于研究如何避免外源基因的整合，并取得了非常显著的研究成果。如Jaenisch实验室^[41]利用Cre-Loxp系统成功得到切除了外源基因的帕金

森症患者的iPS细胞，并利用它诱导了神经细胞的产生。Thomson课题组^[42]则利用非整合载体成功诱导出人的iPS细胞，尽管效率极低，但得到了完全没有外源基因整合的人类iPS细胞，其意义重大。随后，Ding课题组^[43]报导了利用这四因子重组蛋白的多次孵育，成功诱导得到小鼠的piPS (protein-induced pluripotent stem) 细胞。Kim等^[44]成功利用这四因子重组蛋白诱导得到人类的piPS细胞。与基因诱导的iPS细胞不同，piPS细胞一旦诱导成功，就不再需要添加4个蛋白，也就消除了Oct4和c-myc致癌的因素，因此piPS衍生的细胞治疗手段的癌变风险比基因诱导的iPS细胞大大降低，且重组蛋白诱导技术简单易行，只需在细胞培养液中加入蛋白即可，避免了外源因子诱导过程中的基因转染、病毒操作和从基因组中清除外源基因等过程。

人iPS细胞的成功获得不仅避免了人体细胞克隆技术引发的伦理争议，而且突破了以往只能利用卵子和胚胎的取材限制，为再生医学应用打开了大门。而这个领域的快速发展，为未来干细胞用于个体治疗带来了希望。

4 核移植与iPS技术在体细胞重编程研究中的应用

核移植和iPS技术都能成功地诱导体细胞发生重编程，两者各有优缺点。首先，核移植可以直接获得动物，而iPS技术只是在细胞水平对体细胞进行重编程，因此获得来自体细胞的克隆动物只能通过核移植。第二，核移植后能够获得胚胎干细胞系，然而目前这只局限应用于能获得ES细胞的物种，包括人、小鼠和大鼠，而人的ntES细胞系的建立仍是一个技术难题，大鼠体细胞核移植技术仍然有待于进一步地完善^[45]。iPS技术的建立，使得获得各个物种的多能干细胞系成为可能，在过去的三年中，先后建立了小鼠、人、大鼠和猪的iPS细胞系^[23, 35, 36, 46-48]。第三，iPS技术仅限于可培养的细胞系，对于一些不能进行体外培养的细胞类型，如终末分化的神经细胞^[15]或死亡的细胞^[49, 50]，就不能用iPS的方法进行重编程，只能通过核移植。第四，由于人的ntES细胞尚未建立，因此，到目前只能通过iPS的技术获得来自患者的多能干细胞系以用于疾病机理、药物筛选及治疗应用方面的研究^[39, 40]。核移植与iPS技术虽然都能对体细胞进行重编程，但重编程的效率均非常低，重编程的机制也不清楚，特别是关于体细胞重编程的基础问题，即被重编程的供体细胞的相关问题还不清楚^[14, 51]，如是否供体细胞中的少

量组织干细胞被重编程、是否供体细胞的分化状态会影响重编程的效率等, 均没有严格的实验予以证明。

通过核移植与 iPS 技术这两种重编程的方法, 都能得到与 ES 细胞相似的多能性干细胞 (ntES 细胞与 iPS 细胞), 而且都被证明能够用于治疗小鼠的疾病模型^[28, 52]。那么这些细胞与 ES 细胞有多大的相似度, 是否能完全取代 ES 细胞? ntES 细胞已被证明与 ES 细胞有着相似的基因表达谱、相似的体内外发育潜能^[17, 20, 21, 53], 能通过四倍体囊胚注射获得小鼠证明 ntES 细胞能够发育成一个完整的个体 (clonal 小鼠), 能通过核移植获得克隆小鼠证明 ntES 细胞除了能发育成克隆个体外, 还能发育成胚外组织。这些试验证明 ntES 细胞与 ES 细胞几乎是相同的, 理论上可以作为 ES 细胞的替代物用于治疗。小鼠的 iPS 细胞也被证明与 ES 细胞有着相似基因表达、DNA 甲基化、染色质状态以及生物学潜能^[27]。然而, 对于 iPS 细胞生物学功能的研究, 大量的研究证明小鼠的 iPS 细胞注射到二倍体囊胚中后能获得具有生殖腺遗传的嵌合体小鼠。生殖腺遗传只能遗传一半的遗传物质, 另外, 在生殖细胞形成过程中会发生染色体的交换, 因此, 这并不能说明 iPS 细胞本身具有发育成一个完整个体的能力。要进一步证明 iPS 细胞与 ES 细胞具有相似的生物学功能, 需要通过四倍体囊胚注射获得小鼠以及通过核移植获得克隆小鼠。令人高兴的是, 最近两个中国的实验室通过四倍体囊胚注射获得了来自 iPS 细胞的小鼠^[54, 55], 这说明 iPS 细胞离 ES 细胞更近了一步。然而, 研究也表明大部分的 iPS 细胞系不能通过四倍体囊胚注射获得小鼠, 本实验室用多株 iPS 细胞进行四倍体囊胚注射及核移植也均未能获得小鼠。因此, 对于 iPS 细胞生物学功能的研究以及其安全性的研究, 还有待于进一步的深入。最新的研究表明, 人 iPS 细胞与 ES 细胞存在基因表达的不同^[56], 因此, 只有当 iPS 细胞被证明与 ES 细胞有相同的生物学功能时, 才能取代 ES 细胞应用于人类的疾病治疗。

iPS 技术取得的许多进展与核移植技术的研究是分不开的, 过去十几年对核移植技术的研究, 特别是对核移植过程中体细胞重编程的研究为 iPS 细胞的研究提供了许多有益的参考和思路。反过来, iPS 技术的进展也会为核移植的研究提供新的启发。总之, 两种技术均处于其发展的早期, 均能诱导体细胞成为多能干细胞, 均是探讨体细胞重编程的有效

手段, 因此将两种技术结合起来, 比较地进行研究, 会加速我们对体细胞重编程的理解。

核移植技术和 iPS 技术都能成功的诱导体细胞发生重编程, 那么它们诱导重编程的分子机制是否相同呢? 从两种技术诱导体细胞重编程的过程来看, 似乎有着不同的重编程的方式。核移植诱导体细胞重编程需要供体细胞处于休眠状态^[12], 不需要致癌基因的介入, 重编程的过程主要发生在短短的几个细胞周期中。iPS 技术诱导体细胞重编程需要供体细胞处于快速的细胞分裂周期中, 需要致癌基因的参与, 而整个过程需要在长达几个星期的时间内完成。然而仔细分析后, 不难发现两种也有着许多相似之处。休眠细胞应用于核移植是为了适合卵子所处的细胞周期, 而快速增殖的细胞用于 iPS 技术也是为了适应干细胞的快速分裂周期。虽然核移植诱导体细胞重编程可以在几个细胞周期中发生, 如重构胚在 2—4 细胞阶段即能被测出 Oct4 的表达^[57], 但体细胞重编程的完成也是一个较长的过程, 若要形成胚胎干细胞系需要几周的时间, 而形成克隆个体则需要 20 d (小鼠), 在这个过程中一直有着重编程事件的发生^[58]。虽然 iPS 技术需要致癌基因的参与, 但最新的研究发现在没有致癌基因参与的情况下, 也能产生 iPS 细胞, 只是效率大大降低^[30, 31, 36, 59]。另外, 两者都需要激活内源的 Oct4、Nanog 等与细胞干性相关的基因的表达。重编程过程中的表观遗传改变相似, 如 DNA 去甲基化、X 染色体重新激活、组蛋白修饰变化以及非编码 RNA 改变等。对核移植效率有显著提高的小分子化合物组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA (trichostatin A)^[60], 同样也能提高诱导 iPS 细胞的效率^[32]。

由此可见, 对于核移植技术和 iPS 技术诱导体细胞重编程过程中到底发生了什么分子事件, 它们是相同的还是不同的过程, 我们还不清楚。但是可以肯定的一点是与表观遗传有着密切的关系。越来越多的证据证明, 在核移植诱导体细胞重编程的过程中主要是发生了表观遗传学的变化, 另外核移植效率的低下以及重构胚胎发育的异常也与表观遗传有着重要的关系。研究已经发现体细胞重编程后发育的各个阶段存在着 DNA 甲基化异常以及组蛋白修饰的异常^[53]。iPS 技术路线诱导体细胞重编程的过程中是否也类似于核移植诱导体细胞重编程的过程, 发生了表观遗传学的变化、是否也存在表观遗传学的异常、是否 iPS 诱导体细胞重编程的低效率

也与表观遗传的异常有关等问题,还不得而知。因此,将核移植及iPS技术结合起来,比较两种技术路线诱导体细胞重编程过程中表观遗传的变化,从而揭示两种体细胞重编程方法是否存在相似的规律。另外,将两个领域的研究成果应用到对方,如将通过iPS系统筛选出来的能促进重编程效率的化学小分子物质应用到核移植的研究中,另外核移植研究中发现的与重编程相关的因子应用到iPS系统中观察对iPS细胞形成的影响。通过这种交叉的研究,一方面可以进一步的阐明是否两种重编程方法有着相同的重编程机理,加速我们对重编程机制的理解并提高重编程的效率;另一方面,可以找到一条有效的结合核移植与iPS技术的探讨重编程机理的新的途径。由此我们相信,核移植技术和iPS技术结合起来对于体细胞重编程的研究会起到促进作用^[61]。

5 结语

核移植与iPS技术诱导体细胞重编程中均面临重编程的效率低、机制不清等问题。如果我们能知道为什么卵母细胞具有重编程能力,即卵母细胞中有什么物质或是什么机制参与了重编程过程,那将有利于iPS诱导的研究。反过来,iPS研究中的任何重大发现也将大大促进核移植的研究。这就需要两者取长补短,共同促进^[61]。

在临床上,将体细胞重编程成多能干细胞,得到ntES或iPS细胞,只是第一步,我们还需要解决获得的多能干细胞体外培养后的安全性问题,以及如何从体外将多能性细胞分化成各种体细胞,这一过程还有相当长的路要走,还需要许许多多的科研人员坚持不懈的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [2] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-8
- [3] Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell*, 2008, 132(4): 527-31
- [4] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7
- [5] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006, 441(7097): 1061-7
- [6] Lluís F, Pedone E, Pepe S, et al. Periodic activation of Wnt/ β -catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 493-507
- [7] Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 2007, 448(7150): 191-5
- [8] Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 2007, 448(7150): 196-9
- [9] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-2
- [10] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440(7088): 1199-203
- [11] 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
- [12] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3
- [13] Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8048-52
- [14] Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 2009, 136(4): 509-23
- [15] Li JS, Ishii T, Feinstein P, et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature*, 2004, 428(6981): 393-9
- [16] 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
- [17] Li JS, Ishii T, Wen D, et al. Non-equivalence of cloned and clonal mice. *Curr Biol*, 2005, 15(18): R756-7
- [18] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, 415(6875): 1035-8
- [19] Eggan K, Baldwin K, Tackett M, et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 2004, 428(6978): 44-9
- [20] Wakayama S, Jakt ML, Suzuki M, et al. Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2023-33
- [21] Brambrink T, Hochedlinger K, Bell G, et al. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 933-8
- [22] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med*, 2003, 349(3): 275-86
- [23] 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
- [24] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1177-81
- [25] Qin D, Li W, Zhang J, et al. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res*, 2007, 17(11): 959-62

- [26] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-7
- [27] 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
- [28] 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
- [29] 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
- [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] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 10-2
- [32] 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
- [33] Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 132-5
- [34] Shi Y, Do JT, Desponts C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 525-8
- [35] 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
- [36] 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
- [37] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-6
- [38] Liao J, Wu Z, Wang Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, 2008, 18(5): 600-3
- [39] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877-86
- [40] 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
- [41] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136(5): 964-77
- [42] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324(5928): 797-801
- [43] Zhou HY, Wu SL, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5): 381-4
- [44] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472-6
- [45] Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302(5648): 1179
- [46] Li WL, Wei W, Zhu SY, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 16-9
- [47] Liao J, Cui C, Chen SY, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-5
- [48] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, inpress.
- [49] Li J, Mombaerts P. Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant. *Biol Reprod*, 2008, 79(4): 588-93
- [50] Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, et al. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17318-22
- [51] Lin JW, Li JS. Nuclear transfer and donor cells. *Chin Bul Life Sci*, 2009, 21(3): 347-52
- [52] Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G, et al. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med*, 2008, 14(4): 379-81
- [53] Yang X, Smith SL, Tian XC, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295-302
- [54] Kang L, Wang JL, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135-8
- [55] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90
- [56] Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 111-23
- [57] Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, et al. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, 2002, 16(10): 1209-19
- [58] Latham KE. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning. *Biol Cell*, 2005, 97(2): 119-32
- [59] Knoepfler PS. Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 18-21
- [60] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183-9
- [61] Gurdon J, Murdoch A. Nuclear transfer and iPS may work best together. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 135-8