

文章编号: 1004-0374(2012)04-0380-05

细胞融合致体细胞重编程机制研究进展

吴 畏^{1,2}, 徐海伟^{1,2}, 屈 娅^{1,2}, 阴正勤^{1,2*}

(1 第三军医大学西南眼科医院, 重庆 400038;

2 视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室, 重庆 400038)

摘要: 已分化的体细胞能够通过重编程转化回多能干细胞, 在细胞移植、疾病细胞模型的制备以及药物筛选等领域具有重要意义。通过干细胞和体细胞的细胞融合, 可使体细胞重编程。细胞融合致体细胞重编程速度快、效率高, 是一种研究重编程机制的重要手段。对细胞融合致体细胞重编程的机制作一综述。

关键词: 细胞融合; 体细胞重编程; 去甲基化; 表观遗传学

中图分类号: Q28; Q813 **文献标识码:** A

Progress in the mechanisms of somatic cells reprogramming induced by cell fusion

WU Wei^{1,2}, XU Hai-Wei^{1,2}, QU Ya^{1,2}, YIN Zheng-Qin^{1,2*}

(1 Southwest Hospital, Southwest Eye Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2 Key Lab of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing, Chongqing 400038, China)

Abstract: Differentiated somatic cells can dedifferentiate into pluripotent state by reprogramming, which makes great sense in cell transplantation, disease modeling as well as drug screening. Cell fusion between somatic cells and stem cells can reprogram somatic cells quickly and efficiently, which is an important means to explore the mechanisms of cell reprogramming. In this paper, we summarize the recent advances in cell fusion methods and the mechanisms of somatic cells reprogramming by cell fusion.

Key words: cell fusion; reprogramming; demethylation; epigenetics

已分化的体细胞可以通过重编程来改变其命运, 在一定条件下可以转分化为其他类型的细胞, 甚至回到多能状态。而由患者自身体细胞重编程而来的多能性细胞, 可作为细胞移植的种子细胞使用, 这种来源的多能性细胞避免了使用胚胎干细胞所面临的伦理学障碍, 并且在疾病模型的制备和药物筛选领域有广阔的应用前景。

目前, 体细胞重编程的方法有体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、限定因子诱导、干细胞提取物共培养和细胞融合^[1]。SCNT由于克隆动物生产效率低下和发育异常等制约了该技术的发展^[2]; 而Takahashi和Yamanaka^[3]利用限定因子诱导来重编程体细胞, 由此得来的诱导性多能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞类似于胚胎干细

胞, 在再生医学方面显示出巨大的潜力, 但由于病毒载体的利用, 安全性还有待确认; 并且这两种方法均表现出重编程耗时长、效率低下等缺点。相比之下细胞融合耗时最短, 可在1~2 d内激活多能性基因, 重编程效率也最高, 而且将不同物种的细胞进行融合后杂合细胞将不能分裂增殖, 这有利于研究细胞重编程的机制。本文介绍了应用于体细胞重编程的细胞融合方法的进展, 重点在于阐述体细胞重编程的机制, 为进一步研究奠定基础。

收稿日期: 2012-01-16; 修回日期: 2012-02-27

基金项目: 重庆市留学回国人员启动基金项目(cstc 2011jjzt0137); 国家自然科学基金项目(31071299)

*通信作者: E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

1 应用于体细胞重编程的细胞融合方法

细胞融合 (cell fusion), 也称细胞杂交, 是在自发或人工诱导下, 将两个或多个不同细胞或原生质体融合形成一个双核或多核的杂合细胞, 融合后的细胞获得来自于两个亲本细胞的遗传物质, 具有新的遗传或生物学特性。细胞融合在 20 世纪 60 年代发展起来, 目前常用的方法有 3 种: 化学方法 [如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 诱导融合法]、生物方法 (如病毒诱导融合法) 和物理方法 (如电场诱导融合法)。这三种方法均已应用于体细胞重编程。

1.1 化学融合

目前应用于细胞融合的化学试剂有高级脂肪酸衍生物、脂质体、钙离子、水溶性蛋白质等, 而应用最广泛的是 PEG, 因为它简便、易得, 且融合效果稳定。PEG 能够改变细胞的生物膜结构, 使两细胞接触点处质膜的脂类分子发生疏散和重组, 由于两细胞接口处双分子层质膜的相互亲和以及彼此的表面张力作用, 从而使细胞发生融合。

1976 年, Miller 和 Ruddle^[4] 首次通过 PEG 将小鼠的胸腺细胞和胚胎癌细胞融合, 证实了细胞融合可以使体细胞重编程, 并揭开了通过细胞融合方法来重编程体细胞的序幕。Do 和 Schöler^[5] 分别将小鼠的胚胎干细胞的细胞核和细胞质与神经球细胞在 PEG 介导下融合, 发现只有小鼠的胚胎干细胞的细胞核能够激活神经球细胞多能性基因 Oct4 的表达, 从而证实了具有启动重编程功能的 Oct4 基因是通过小鼠胚胎干细胞的细胞核激活的, 并且发现了这个激活功能不依赖于 DNA 复制和细胞分裂。Cowan 等^[6] 将人胚胎干细胞和人皮肤成纤维细胞在 PEG 介导下融合, 证实了人胚胎干细胞也能够通过细胞融合重编程人体细胞。Ambrosi 等^[7] 通过将小鼠的胚胎干细胞和成纤维细胞在 PEG 介导下融合, 揭示了在细胞融合诱导体细胞重编程过程中基因表达的调控, 从而为研究体细胞重编程机制奠定了基础。最近 Bhutani 等^[8] 将小鼠的胚胎干细胞和人成纤维细胞通过 PEG 的作用融合, 成功地将人成纤维细胞诱导为多能性细胞, 通过 RNA 干扰技术证实了活化诱导胞苷脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 在多能性基因的去甲基化方面发挥了重要作用。

1.2 生物融合

生物融合一般指病毒介导的细胞融合方法, 病

毒融合蛋白能够使细胞膜蛋白质和脂质分子重排, 使细胞膜打开, 从而发生细胞融合, 当病毒作用去除后, 细胞膜分子结构恢复。诱导细胞融合的病毒有日本血凝集病毒 (hemagglutinating virus of Japan, HVJ; 或称仙台病毒)、新城鸡瘟病毒、副流感病毒、疱疹病毒等, 其中最常用的是仙台病毒, 因为其融合效率较高、应用范围广, 且容易培养。1957 年, 冈田善雄首次发现通过灭活的仙台病毒的作用可以使艾氏腹水瘤细胞融合成多核细胞, 从而为利用病毒诱导细胞融合奠定了基础。最近, Yue 等^[9] 在仙台病毒包膜介导下, 将小鼠胚胎成纤维细胞与小鼠胚胎干细胞融合, 成功得使体细胞重编程, 并证明了融合细胞的多能性, 表明 HVJ 也可应用于重编程体细胞。

1.3 电融合

电融合是通过短时间强电场的作用, 使两个相互靠近的细胞膜发生可逆性电击穿, 瞬时失去其高电阻和低通透特性; 在此期间, 细胞可通过胞膜接触区的融合而形成一个杂合细胞, 数分钟后, 胞膜恢复原状。1978 年, Zimmermann 首先采用电脉冲方法成功诱导了细胞融合, 此后, 电融合技术得到了飞速发展。Tada 等^[10] 利用电融合技术, 将小鼠胚胎生殖细胞和胸腺淋巴细胞融合, 研究了胚胎生殖细胞 - 胸腺淋巴细胞杂合子中体细胞核的表观遗传学变化, 并证明了这个杂合子的多能性。2001 年, Tada 等^[11] 再次利用电融合技术, 将小鼠胚胎干细胞和胸腺细胞融合, 发现杂合细胞中一些体细胞抑制基因被激活, 并表现出多能性, 表明胚胎干细胞能够重编程胸腺细胞。

PEG 在融合过程中, 对细胞损伤大、残留毒性、融合率较低, 而灭活的仙台病毒则存在病毒制备困难、操作复杂、灭活病毒的效价差异大、实验重复性差等缺点。相比之下, 电融合操作简单、无化学毒性、对细胞损伤小、可在显微镜下观察融合过程、融合率也更高。除了上述三种方法外, 还有激光诱导细胞融合的方法, 该技术最大的特点就是高度选择性, 可使任意的两个细胞融合, 从而实现特异性细胞融合, 且具有实验重复性好、操作简便、损伤小、无菌、无毒性等特点。虽然目前还没有应用于重编程体细胞, 但相信随着该项技术的不断改进与完善, 未来很有可能得到广泛应用。除此之外, 基于微流控芯片的细胞融合、高通量细胞融合芯片等新技术也在不断开发中, 这些技术大大地提高了融合效率, 从不同方面改进了细胞融合技术, 对于通过细胞融

合重编程体细胞大有帮助。本实验室开发了一种拥有致密微电极阵列的细胞电融合芯片,能够通过控制双向电泳装置和电穿孔,使大量细胞同时高效精确地配对和电融合。利用该芯片,实现了小鼠体细胞和小鼠胚胎干细胞在低电压下高效率地融合,提供了一种通过细胞电融合来研究体细胞重编程的平台^[12]。

2 体细胞重编程的机制

目前关于体细胞重编程的机制知之甚少,但普遍认为在重编程过程中,体细胞多能性基因的表现遗传学修饰起关键作用。这些表现遗传学的修饰包括:染色质重塑、组蛋白修饰和DNA的去甲基化。其中Nanog基因的激活显得尤为重要,Silva等^[13]研究发现,提高胚胎干细胞中Nanog基因的表达水平能够在胚胎干细胞和体细胞融合中,大大提高其重编程效率。Wong等^[14]发现婆罗双树样基因4(sal-like 4, SALL4)具有与Nanog类似的提高重编程效率的作用。除了激活多能性基因,一些维持细胞多能性的信号通路也在体细胞重编程中发挥了重要作用。

2.1 染色质重塑

染色质重塑在基因激活和维持多能性方面有重要作用^[15]。在体细胞中,染色质密度和凝集程度都较高。Maherali等^[16]通过研究发现,在体细胞重编程后染色质密度和凝集程度都降低,呈现出与胚胎干细胞类似的染色质状态。那么在体细胞重编程过程中,是如何发生染色质重塑的呢?虽然具体机制还没有研究清楚,但是推测一些染色质重塑因子在这一过程中发挥了作用。Gaspar-Maia等^[17]发现染色质结构域解旋酶DNA结合蛋白1(chromodomain helicase DNA binding protein 1, Chd1)在维持小鼠胚胎干细胞多能性和重编程体细胞过程中不可或缺,当利用RNA干扰技术下调Chd1的作用时,可以发现小鼠胚胎干细胞中异染色质增多,倾向于朝神经元方向分化并且不能分化为原始内胚层细胞,同时也会严重抑制体细胞重编程,从而证实了Chd1在染色质重塑方面是必需的,但是Chd1的具体作用机制还不清楚,有待于进一步的研究。

2.2 组蛋白修饰

组蛋白的修饰包括组蛋白乙酰化、甲基化等,可通过影响组蛋白与DNA双链的亲合性,从而改变染色质的疏松或凝集状态,或通过影响转录因子与结构基因启动子的亲合性来发挥基因调控作用。

组蛋白乙酰化表明染色质的活化,而组蛋白去乙酰化则表明染色质的失活。胚胎干细胞中组蛋白普遍处于乙酰化状态,而分化细胞中普遍处于去乙酰化状态,根据细胞谱系的不同,去乙酰化程度不同。Kimura等^[18]将小鼠胚胎干细胞和小鼠胸腺细胞融合,发现体细胞重编程后,组蛋白H3、H4高度乙酰化,组蛋白H3赖氨酸4(H3K4)高度二甲基化和三甲基化。其中在多能性基因Oct4启动子区域,组蛋白H3、H4乙酰化,H3K4高度三甲基化;而在一些诸如神经丝-M(neurofilament-M, Nfm)、神经丝-I(Nfl)等沉默基因的启动子区域中,H3K4也是二甲基化和三甲基化。由此可见,H3K4的二甲基化和三甲基化与单个体细胞基因的活性无关,而是标志着体细胞整个基因组重编程正处于转录激活状态,也说明了在体细胞重编程过程中,发生了组蛋白的修饰,该组蛋白的修饰激活了多能性基因的表达。Pfannkuche等^[19]发现用组蛋白去乙酰化抑制剂丙戊酸(valproic acid, VPA)处理HeLa细胞后,多能性基因Nanog的表达会增加。Huangfu等^[20]发现,在Takahashi等^[21]2007年通过慢病毒将Oct4、Klf4、Sox2和c-Myc导入人成纤维细胞成功诱导出iPS细胞的实验中,若通过VPA提前处理被转染基因的成纤维细胞,诱导效率将提高100倍。这些研究都确定了组蛋白修饰在体细胞重编程过程中的重要作用,但具体作用机制还有待发现。

2.3 DNA去甲基化

Deng^[22]研究表明,体细胞核中多能性基因的去甲基化是体细胞重编程的关键步骤。众所周知,在甲基转移酶的作用下,DNA的CG两个核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基,形成5-甲基胞嘧啶,常见于基因的5'-CpG-3'序列,从而使DNA甲基化,而DNA甲基化则可引起染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式的改变,引起基因的失活。体细胞重编程的关键在于多能性基因的去甲基化,那么多能性基因是如何发生去甲基化的呢?虽然研究多年,但并没有在哺乳动物体内发现确切的去甲基化酶^[23],Gehring等^[24]推测哺乳动物DNA没有发生直接去甲基化,而是在甲基化的胞嘧啶脱氨基后,通过DNA修复来间接去甲基化的。那么又是如何发生甲基化胞嘧啶的脱氨基作用以及DNA修复呢?

Bhutani等^[8]通过PEG介导将小鼠干细胞和人成纤维细胞融合,发现在RNA干扰AID后会抑制体细胞重编程中的多能性基因去甲基化;在此基础

上再过表达 AID 基因, 则会解除多能性基因去甲基化的抑制, 从而证实了 AID 对体细胞重编程过程中多能性基因去甲基化发挥的重要作用。

AID 属于胞嘧啶脱氨酶家族, 最初发现其在 B 淋巴细胞中大量表达, 主要参与免疫球蛋白的种型转换重组 (class switch recombination, CSR) 和体细胞高频突变 (somatic hypermutation)^[25]。2004 年, Morgan 等^[26]首次发现了 AID 在免疫系统以外的作用, 他们通过体外实验证实了 AID 与同家族的胞苷脱氨酶 APOBEC1 能够在单链 DNA 中使 5- 甲基胞嘧啶脱氨基为胸腺嘧啶。随后发现, AID 在 B 淋巴细胞之外的表达会引起基因组的点突变、DNA 双链打开和染色体的易位。Okazaki 等^[27]发现在这些基因突变过程中, AID 会导致肿瘤发生。Marr 等^[28]和 Rai 等^[29]又分别在爪蟾和鲑等动物的早期发育中发现了 AID 的表达。由此可见, AID 在免疫、遗传、肿瘤、发育等方面都发挥了不同程度的作用。那么 AID 在体细胞重编程过程中究竟怎么使多能性基因去甲基化的呢? Bhutani 等^[8]推测 AID 使 5- 甲基胞嘧啶脱氨基为胸腺嘧啶, 从而导致胸腺嘧啶与鸟嘌呤的错配, 再通过胸腺嘧啶 -DNA 糖基化酶 (thymine DNA glycosylase, TDG) 或甲基化 CpG 结合结构域蛋白 4 (methyl-CpG-binding domain protein 4, MBD4) 的作用来去除错配的胸腺嘧啶, 而缺失的碱基位点则通过碱基切除 DNA 修复 (base excision DNA repair, BER) 通路来将非甲基化的胞嘧啶填补上去, 从而使 DNA 去甲基化。然而, 这只是一个猜测, AID 也很有可能是通过在目前已知的加速 iPS 细胞产生的方法中发挥作用, 如与 P53 基因、组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 抑制剂丙戊酸、DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 抑制剂 5- 氮杂胞苷、组蛋白甲基转移酶 (HMTs) 抑制剂 BIX-01294 等共同作用, 来加强表观遗传的重编程过程。

除了多能性基因的激活, 一些细胞信号通路也在体细胞重编程中发挥了重要作用。Lluis 等^[30]利用 Wnt3a 和糖原合酶激酶 -3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 抑制剂 6- 溴靛红 -3- 肟 (6-bromoindirubin-3-oxime, BIO) 来周期性地激活小鼠胚胎干细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路, 能够使小鼠胚胎干细胞和体细胞融合后, 提高体细胞重编程的效率, 并且 β -catenin 与重编程是呈剂量依赖性关系的, 当 β -catenin 过多或过低时, 都无法使体细胞重编程。更令人吃惊的是, 用 Wnt3a 和 BIO 处理小鼠胚胎干细胞后, 其多能性基因 (Nanog、Oct4、Rex1、

Fgf4) 的表达无差异, 而 β -catenin 的靶基因 (Cdx1、Axin2、Dkk4) 表达上调, 可见 Wnt/ β -catenin 信号通路并不是通过激活 Nanog、Oct4、Rex1、Fgf4 等多能性基因来重编程体细胞的。Nakamura 等^[31]发现激活胚胎干细胞的 Akt 信号通路也能够在胚胎干细胞和体细胞融合后, 提高体细胞重编程的效率。那么 Akt 信号通路又是如何重编程体细胞的呢? 作者发现虽然 Akt 信号通路也能够抑制 GSK-3 的作用, 但并不能激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 也无法通过抑制 GSK-3 来上调 Nanog 基因的表达; 而在 Akt 信号通路的下游分子中, 组蛋白乙酰转移酶 p300 和组蛋白甲基转移酶 Ezh2 也无法影响体细胞重编程的效率。由此可见, Akt 信号通路也不是通过表观遗传学来重编程体细胞的。虽然具体机制还未阐明, 但可以预计的是 Akt 信号通路是通过大量下游分子的共同作用来实现体细胞重编程的。

3 问题与展望

通过重编程而来的多能性细胞具有与胚胎干细胞类似的多能性和自我更新能力, 之前认为若将宿主自身来源的体细胞重编程后, 再移植到宿主体内可不受免疫排斥; 但在 2011 年, Zhao 等^[32]的研究发现, 通过逆转录病毒和附加型载体将特定因子转入 B6 小鼠体细胞内诱导出的 iPS 细胞, 在 B6 小鼠体内形成的畸胎瘤出现了 T 细胞介导的免疫反应, 可见 iPS 细胞的临床应用还有很长的路。而通过细胞融合得到的杂合子包含胚胎干细胞所携带的外源性基因, 在植入体内后也必定会产生免疫排斥反应, 并且细胞融合后, 杂合细胞为四倍体。虽然 Tada 等^[33]发现, 利用 Cre/loxP 系统可以靶向敲除部分染色体, 但无法敲除杂合细胞中胚胎干细胞的全部染色体成分。随着技术的发展, 如果能使杂合细胞发生减数分裂, 再筛选出重编程后的体细胞, 则能够克服细胞融合的免疫排斥和四倍体问题。细胞融合较低的融合效率是一个难题, 重编程的机制尚未完全阐明, 而通过细胞融合重编程而来的多能性细胞的成瘤性问题也在讨论之中。随着研究的深入, 细胞融合的效率在逐步提高, 重编程的机制也在一步步揭开神秘的面纱, 当融合细胞四倍体的问题被解决时, 相信该方法必定会在生物医学工程领域大放异彩。

[参 考 文 献]

- [1] Hasegawa K, Zhang P, Wei Z, et al. Comparison of

- reprogramming efficiency between transduction of reprogramming factors, cell-cell fusion, and cytoplasm fusion. *Stem Cells*, 2010, 28(8): 1338-48
- [2] Cezar GG. Epigenetic reprogramming of cloned animals. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(3): 165-80
- [3] 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
- [4] Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 1976, 9(1): 45-55
- [5] Do JT, Schöler HR. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 941-9
- [6] 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
- [7] Ambrosi DJ, Tanasijevic B, Kaur A, et al. Genome-wide reprogramming in hybrids of somatic cells and embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1104-13
- [8] Bhutani N, Brady JJ, Damian M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 2010, 463(7284): 1042-7
- [9] Yue XS, Fujishiro M, Toyoda M, et al. Reprogramming of somatic cells induced by fusion of embryonic stem cells using hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E). *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(4): 1053-7
- [10] Tada M, Tada T, Lefebvre L, et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6510-20
- [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] Qu Y, Hu N, Xu HW, et al. Somatic and stem cell pairing and fusion using a microfluidic array device. *Microfluid Nanofluidics*, 2011, 11(3): 633-41
- [13] Silva J, Chambers I, Pollard S, et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, 2006, 441(7096): 997-1001
- [14] Wong CC, Gaspar-Maia A, Ramalho-Santos M, et al. High-efficiency stem cell fusion-mediated assay reveals *Sall4* as an enhancer of reprogramming. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1995
- [15] Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, et al. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(5): 437-47
- [16] 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
- [17] Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, et al. *Chd1* regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 460(7257): 863-8
- [18] Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, et al. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(13): 5710-20
- [19] Pfannkuche K, Hannes T, Khalil M, et al. Induced pluripotent stem cells: A new approach for physiological research. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26(2): 105-24
- [20] Huangfu D, Maehr R, Guo WJ, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795-7
- [21] 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
- [22] Deng W. AID in reprogramming: quick and efficient. *BioEssays*, 2010, 32(5): 385-7
- [23] Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 2008, 133(7): 1145-8
- [24] Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet*, 2009, 25(2): 82-90
- [25] Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 2000, 102(5): 553-63
- [26] Morgan HD, Dean W, Coker HA, et al. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: Implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52353-60
- [27] Okazaki I M, Kotani A, Honjo T. Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol*, 2007, 94: 245-73
- [28] Marr S, Morales H, Bottaro A, et al. Localization and differential expression of activation-induced cytidine deaminase in the amphibian *Xenopus* upon antigen stimulation and during early development. *J Immunol*, 2007, 179(10): 6783-9
- [29] Rai K, Huggins IJ, James SR, et al. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and *gadd45*. *Cell*, 2008, 135(7): 1201-12
- [30] Lluis 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
- [31] Nakamura T, Inoue K, Ogawa S, et al. Effects of Akt signaling on nuclear reprogramming. *Genes Cells*, 2008, 13(12): 1269-77
- [32] Zhao TB, Zhang ZN, Rong ZL, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 474(7350): 212-5
- [33] Tada M, Matsumura H, Kurose Y, et al. Target chromosomes of inducible deletion by a Cre/inverted loxP system in mouse embryonic stem cells. *Chromosome Res*, 2009, 17(4): 443-50