



体细胞重编程研究进展

李鑫^{①②}, 王加强^{①②}, 周琪^{①*}

① 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;

② 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

* 联系人, E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn

收稿日期: 2015-07-23; 接受日期: 2015-08-20

国家自然科学基金(批准号: 31471395)资助

摘要 多细胞生物个体的分化细胞均通过一系列动态调控机制维持其稳态, 不同类型分化细胞之间的转化在自然条件下不会自发发生. 通过实验手段可以逆转细胞分化的进程使之改变状态, 从一种基因表达谱转换成另一套表达谱, 从而实现细胞类型的转化也即重编程. 目前已知可以通过4种不同途径, 即核移植、细胞融合、胞质孵育及诱导多能干细胞, 将终末分化的体细胞重编程为类胚胎干细胞的多能性干细胞状态, 而后者具有发育成为动物个体所有细胞的能力. 由于细胞重编程的过程能够将细胞命运逆转成为具有再生能力干细胞的状态, 因此, 这一领域的系列发现为再生医学、疾病个体化治疗及药物筛选提供了巨大的前景.

关键词 体细胞重编程, 核移植, 细胞融合, 诱导多能干细胞

多细胞生物体发育是一个非常精细和复杂协调的过程, 多细胞生物个体从单细胞受精卵到复杂组织器官的220多种分化细胞的过程, 也是从全能性的状态到逐步丧失多能性的过程. 从受精卵到不同的多能性干细胞, 到前体细胞, 再到终末分化的成体细胞, 每一多能性等级的细胞都有其独特的表现状态, 为此Waddington等人^[1]提出了“滚落”模型, 认为不同种类的细胞群体有其独特的稳态, 自然条件下不会轻易向其他细胞群体转化.

重编程是细胞从一种基因表达谱转换为另一套不相关表达谱的过程. 狭义的重编程一般指转换为分化能力更强的表达谱, 即逆转了机体既定的正常发育程序. 广义的重编程还包括转分化, 即转换前后

两种细胞类型的分化潜能差异不明显. “滚落”模型^[1]描述得很贴切: 沿着既定轨道逆行或者跳转到其他轨道都是重编程.

虽然体细胞的分化状态是稳定的, 但通过实验手段可以将体细胞或体细胞核重编程至广泛的发育可塑状态. 诱导重编程的经典方法有4种: 核移植(nuclear transfer, NT)、胞质孵育、细胞融合、以及转录因子过表达. 受精卵是生命周期中全能性最高的细胞, 因此核移植及卵胞质孵育是最早用于体细胞重编程的手段. 随着治疗性克隆的发展, 核移植重编程一直是研究的热点. 某些特定的胚胎细胞, 例如, 小鼠(*Mus musculus*)囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞、胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、胚胎癌

引用格式: 李鑫, 王加强, 周琪. 体细胞重编程研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 4-15

Li X, Wang J Q, Zhou Q. Review of somatic cell reprogramming. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 4-15, doi: 10.1360/N052015-00247

(embryonal carcinoma, EC)细胞,具有很强的自我更新能力,由此引发了人们通过细胞融合实现重编程的研究.但细胞融合产生异核体或杂种细胞,虽然可以作为理论研究的良好材料,并且已经有移除主导细胞基因组的尝试^[2],但依然不能用于再生治疗.过表达转录因子诱导转分化早在1987年就已经出现^[3],而2006年Takahashi和Yamanaka^[4]诱导多能性干(induced pluripotent stem, iPS)细胞的成功无疑是重编程领域的里程碑.由于iPS细胞具有与ES细胞一致的发育全能性^[5],而且不存在伦理争议,更重要的是其作为自体来源易于取材且不存在免疫排斥反应,因此很快成为再生医学等领域的热点.重编程的关键是有效开启基因组,从而使得重编程因子与调节区域结合,便于染色质重构,介导基因表达改变.卵具有开启精子基因组的能力,因此被用于核移植重编程;一些具有开启基因组能力的母源蛋白^[6]及小分子^[7]被用于提高iPS诱导效率;用激活内源免疫反应的poly(I:C)诱导基因组开放能高效促进经典4因子蛋白(OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc)诱导iPS^[8].采用更加高效和安全的诱导方法对于iPS细胞的应用十分重要,因此,探索诱导多能干细胞的方法以及细胞重编程的机制具有重要意义.

本综述将分别介绍重编程的各种方法,探讨重编程的效率及机制.

1 核移植

受精卵毋庸置疑是生命周期中具有最高全能性的细胞,精核在受精后极短的一段时间里发生快速重组,鱼精蛋白被组蛋白替换,并经历主动DNA去甲基化^[9],全基因组范围内组蛋白修饰重建.最新研究表明,雌原核也会发生主动去甲基化^[10].这些过程引起谱系特异性表观重编程,使终末分化的精卵细胞回归全能性.正基于此,卵或受精卵成为了体细胞重编程的最早材料.

1.1 低等动物核移植

最早的核移植实验设计是1952年由Briggs和King^[11]在两栖类动物建立的,即将破裂细胞获得的细胞核注入去核未受精卵内.1958年Gurdon等人^[12]首次成功实现了核移植重编程:核移植后大部分非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵开始发育,发生皮质旋转及

早期卵裂,部分能正常卵裂并通过正常胚胎发育,最终发育为成体非洲爪蟾.Gurdon^[13]发现不同分化程度的供核细胞的重编程效率差异很大:当使用胚胎细胞(如囊胚细胞)的核进行核移植时,囊胚率高达32%,但发育为成体非洲爪蟾的效率浮动很大,最高可达30%;当使用分化细胞的核进行核移植时,重编程效率非常低,例如,皮肤细胞做供核细胞时囊胚率仅5%^[14],而且大部分NT胚胎都不能发育形成蝌蚪,更谈不上发育到成体非洲爪蟾.因此,供核细胞分化程度越高,NT核重编程效率越低.连续核移植可以提高重编程效率.如果供核细胞为皮肤细胞,仅有1.3%能发育为能游泳的蝌蚪;但如果将第一次NT得到的囊胚细胞作为供核细胞,第二次NT得到能游泳的蝌蚪的效率会提高至43%^[14].通过连续核移植及外植体技术,内胚层细胞重编程为功能性肌肉及神经细胞(即能游动的蝌蚪)的效率会提高到30%^[15].

中国科学家童第周早在1963年就通过将一只雄性鲤鱼的遗传物质注入雌性鲤鱼的卵中而成功克隆了鲤鱼.这是我国在克隆领域的第一步.当时世界上的克隆实验均采用蛙、蟾等两栖类动物为实验材料,童第周却独辟蹊径,以鱼类为实验材料,由此成为世界上研究鱼类克隆技术的第一人.1973年,童第周获得了第一批鲤鲫核移植鱼,并发现细胞质对个体的发育有一定影响.研究结果以中英文发表在1973年出版的《动物学报》上.1977年,童第周等人首先向国内外报道了对脊索动物海鞘的核移植.1980年,童第周等人报告在中国成功获得了第一批具有“发育全能性”的克隆鱼.这是世界上报道的第一例发育成熟的异种间的胚胎细胞克隆动物.1981年,中国科学院水生生物研究所的一个研究小组将成年三倍体鲫鱼的肾脏细胞核移植到二倍体鲫鱼去核的卵子中,获得了三倍体的克隆鱼,并发育成成体,证明成年鱼的体细胞也可以去分化和再程序化,具有发育成个体的全能性.这是世界上第一次报道的体细胞克隆动物,比用成年体细胞克隆出的多莉羊早了15年.

1.2 高等动物核移植

将哺乳动物体细胞核移植入MII期卵母细胞也能得到NT胚胎^[16,17].1997年,Wilmot等人^[16]通过将去核的卵母细胞与血清饥饿处理的细胞进行融合,获得了世界上第一只克隆羊“多莉”,标志着克隆技术可以应用于哺乳类动物.1998年Wakayama等人^[17]克

隆出了第一只小鼠, 随后牛(*Bovine*)^[18,19]、山羊(*Capra aegagrus hircus*)^[20]、猪(*Sus scrofa domestica*)^[21-23]、猫(*Felinae*)^[24]、兔(*Leporidae*)^[25]、骡子(*Equus ferus x asinus*)^[26]、马(*Equus caballus*)^[27]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[28]、狗(*Canis lupus familiaris*)^[29]、雪貂(*Mustela Pulourius Furo*)^[30]和骆驼(*Camelus bactrianus*)^[31]等相继被克隆。然而体细胞克隆的成功率很低, 一般只有1%~3%。

和非洲爪蟾一样, 不同分化程度细胞的重编程效率差异很大。约50%的小鼠尾尖成纤维细胞NT胚胎能发育到囊胚, 但很少能发育到晚期^[32,33]; 而桑葚胚/囊胚及ES的NT囊胚率却高达44%, 到晚期高达2.4%^[32,34]。ES-NT囊胚获得ES细胞系的效率约为50%, 而成纤维细胞NT后建立ES细胞系的效率约为30%^[33,34]。ES-NT获得NT小鼠是相对高效的(<2.4%)^[32], 高度分化细胞NT则效率很低^[35]。

NT至MII卵母细胞涉及一系列DNA复制及细胞分裂事件, 不能直接激活转录, 很难确定和分析NT至MII期卵母细胞策略中转录谱重编程的时间。例如, 小鼠体细胞核移植获得生殖细胞需要平均25次细胞分裂; NT后*Oct4*基因激活需要1~2次细胞分裂^[36,37]。发育中ICM内多能基因调节表达及Xi(失活的X染色体)再激活发生在几次分裂后^[38-40]。

1.3 影响核移植效率的因素及机制

普遍认为, 核移植至去核卵母细胞策略的效率低与DNA甲基化有关。NT胚胎发育异常往往与DNA甲基化缺陷有关^[41-44]。用非甲基化的胞嘧啶类似物5-Aza-dC处理供体核并不能提高NT胚胎发育率^[45,46]; 而用*Dnmt1*突变的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)做供体, 获得NT-ES的效率增加约3倍^[47]。

组蛋白的翻译后修饰在基因表达调控方面非常关键^[48]。组蛋白乙酰化可以松散高度致密的核小体结构, 使转录因子等转录调控因子更容易与染色质结合。核移植后, 抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)能促进染色质重构、DNA复制及转录^[49,50]。

重编程的关键是有效开启基因组。开启基因组使得重编程因子与调节区域结合, 便于染色质重构, 介导基因表达改变。Gurdon^[51]发现, 体细胞核移植后, 卵或卵母细胞会高效诱导不明机理的核肿胀及染色

质解凝缩。核肿胀可能有助于重编程过程中*Ring1b*等抑制性表观因子从染色质移除, 进而有助于染色质解凝缩^[52]。

DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重构等表观因素, 对于有效重编程很重要。有学者已经将克隆胚胎的表观缺陷进行了归纳^[41,53], 表观缺陷都是由重编程不足造成的, 导致某些基因的表达状态与重编程细胞或正常胚胎不一致。肌肉细胞核植入两栖动物卵后持续表达*MyoD*, 且在错误细胞系(如内胚层)持续表达, 证明其表观状态逆转是失败的^[54]。

克隆胚胎表观缺陷的另一实例来自对雌性小鼠体细胞Xi的研究。雌性小鼠体细胞NT后, 随着发育过程中重编程的进行, Xi在多能的ICM中被重新激活^[38,40]。但是, Xi的染色体状态在早期NT胚胎没有完全逆转^[39,55], 并且诱导X染色体失活的非编码RNA(Xist)在分化中的上胚层细胞中异常表达, 细胞中Xist RNA团有0~2个不等^[55]。该缺陷表明, 可能由于DNA甲基化的原因, 克隆胚胎某些细胞的Xist位点没有彻底逆转。

重编程效率低可能是表观重编程不彻底造成的。基因再激活效率低充分反映出表观缺陷的存在。NT胚胎多能基因不适当地再激活可能与基因启动子去甲基化无效有关^[44,56]。

1.4 治疗性克隆

治疗性克隆是指用患者的体细胞作为核移植供核细胞, 移到去核卵母细胞中形成重构胚, 体外培养到囊胚后建立ES细胞系, 再诱导ES细胞定向分化为所需的特定类型细胞, 用于细胞替代治疗。2004年Hwang等人^[57]建立了第一个核移植ES干细胞系(embryonic stem cell line derived from somatic cell nuclear transfer blastocyst, SCNT-ES), 是治疗性克隆领域的里程碑。

2 胞质孵育重编程

另一设计完全不同的核移植方案是将多个细胞核注射到两栖类动物第一次减数分裂前期卵母细胞生发泡(germ-vesicle, GV)内^[58], 这属于胞质孵育诱导重编程的范畴。GV由多种组分高度浓缩形成, 减数分裂成熟后GV组分散布到卵中, 对于胚胎发育至关重要^[59]。不过这种重编程策略不能产生新类型细

胞. 注入 GV 内的体细胞核不经历 DNA 合成及细胞分裂, 但 RNA 合成剧烈, 这与正常 GV 期卵的行为是一致的. 将多个哺乳动物细胞核移植到两栖类卵母细胞中, 可以在完全不涉及 DNA 复制的情况下观察到体细胞核中处于抑制状态基因的直接激活, 表明存在不受 DNA 复制干扰或辅助的、直接调控转录谱从体细胞状态向类卵母细胞状态转变的开关. 转换过程涉及的分子改变直接反映了转录谱的重编程过程.

GV 期非洲爪蟾卵重编程体细胞的基因再激活的频率和速率是很高的, 如果用 HeLa 细胞, 18°C 条件下 *Oct4* 的再激活只需 8 h^[60], *Sox2* 的再激活只需要 48 h^[61]. 因此, 非洲爪蟾卵内一定含有高效诱导转录谱重编程的因子. 2010 年 Jullien 等人^[62]的研究表明, 卵母细胞特异的连接组蛋白 B4 是诱导高效重编程的必需因子. NT 后 B4 随着 H1 的丢失逐渐掺入染色质, 大部分实验都有超过 90% 的核出现这种替换现象. 2010 年 Murata 等人^[63]发现体细胞核进入 GV 期非洲爪蟾卵后, 染色质组蛋白转录后修饰发生全基因组范围的重建.

卵的重编程因子是卵子发生过程中合成并存储在卵母细胞中的天然物质, 这些因子在受精后可以 100% 重编程雄原核. 用卵抽提物卵质蛋白实验证明, 卵质蛋白是参与精核及体细胞核解凝缩的重要因子^[64]. 因此从卵或卵母细胞中寻找有效的重编程因子是研究重编程的有效途径之一. 有研究对卵胞质内重编程物质的本质进行了探索, 通过比较不同时期卵母细胞的蛋白谱揭示了潜在的重编程关键因子^[65].

3 细胞融合重编程

细胞融合能发生重编程. 细胞融合产生的多核细胞称为异核体. 融合的两个细胞中一个对另一个起明显支配作用, 将自己的状态强加于另一个细胞. 1967 年 Harris^[66]发现, 成熟鸡红细胞在与快速增殖的 HeLa 细胞融合后, 鸡红细胞核肿胀, 开始 RNA 转录. 异核体在不分裂的情况下即可诱导一些沉默基因重编程, 例如, 人类非肌性羊膜细胞与小鼠肌细胞融合后, 肌细胞特异基因启动表达^[67]. 异核体的重编程不仅是迅速的——一般在融合后 1~2 天内即可实现重编程, 而且是 DNA 合成非依赖的^[68,69]——用细胞分

裂抑制剂丝裂霉素 C 处理的小鼠 ES 细胞与神经干细胞(neural stem cell, NSCs)融合后, 依然能诱导多能性标志 *Oct4* 的表达^[70].

异核体进行细胞分裂时核膜破裂, 两细胞核混合, 最终形成杂种细胞. 通过与 ES、胚胎生殖(embryonic germ, EG)细胞、EC 细胞等多能性细胞融合形成杂种细胞, 实现了体细胞重编程^[71-74]. 杂种细胞中多能性细胞处于统治地位, 因而体细胞会向类多能性细胞转变, NSC 与 ES 融合 2 天后可检测到 *Oct4* 高水平表达^[75]. 多能性杂种细胞中体细胞原本表达的组织特异性基因一般会沉默. 但在某些情况下组织特异性基因不沉默, 这取决于细胞类型及融合反应前的比例^[76,77], 例如, 人 B 淋巴细胞与小鼠肌细胞融合形成的杂种细胞不会沉默体细胞基因^[78].

胸腺细胞等体细胞与 EG 细胞融合后的表观修饰类似于多能性细胞^[72], 包括多能性基因再激活、Xi 再激活、自我更新、DNA 去甲基化^[79]. 与多能性细胞融合形成的杂种细胞具有多能性细胞所有的分子特征. 转基因表达分析显示, 四倍体杂种细胞做囊胚嵌合可参与三胚层^[73,80,81]. 由于目前缺乏生殖系嵌合的证据, 因此四倍体杂种细胞是否是真正的全能细胞有待进一步确认.

Silva 等人^[82]的研究发现, NSCs 与过表达多能性因子 *Nanog* 的 ES 细胞融合后的杂种细胞形成率较与普通 ES 细胞提高约 200 倍(<0.014% 到约 3%); 用成纤维细胞和胸腺细胞, 杂种细胞形成率也提高, 不过程度低些. 2010 年 Bhutani 等人^[83]研究表明, 异核体主动 DNA 去甲基化需要诱导活性胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID).

细胞融合有很多劣势, 例如, (i) 细胞融合率很低, 一般仅有 0.6%~1%; (ii) 需要强烈的细胞筛选辅助; (iii) 具有细胞特异性: 人成纤维细胞与小鼠 ES 细胞融合后多能性基因再激活效率高达 70%^[83], 但淋巴细胞与小鼠 ES 融合后基因再激活水平仅为 ES 细胞中 *Oct4* 水平的 0.01%~1%^[84]; (iv) 杂种细胞内存在多重基因组, 不能用于基因治疗, 但已有移除主导细胞基因组的尝试^[2]. 虽然如此, 由于细胞融合在细胞不分裂条件下即发生主动 DNA 去甲基化等重编程过程, 例如, 人 B 细胞与小鼠 ES 细胞融合的杂种细胞的多能性基因 *Oct4* 和 *Nanog* 的启动子, 在融合后 1 天内发生 DNA 去甲基化^[84], 因此细胞融合仍然是研究主动去甲基化等重编程机制的良好模型.

4 诱导重编程

早在 1987 年就已经出现过表达转录因子诱导转分化的报道^[3], *MyoD* 的发现开启了诱导重编程领域. 2006 年 Takahashi 和 Yamanaka^[4]通过过表达 4 个转录因子, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*, 成功将 MEFs 诱导为多能性干(iPS)细胞, 这无疑是重编程领域的里程碑. 由于 iPS 细胞具有与 ES 细胞一致的发育全能性^[5], 而且不存在伦理争议, 更重要的是其作为自体来源易于取材且不存在免疫排斥反应, 使得其很快成为再生医学等领域的热点.

4.1 诱导转分化

发育生物学很早之前就得出结论: 过表达 1 种或几种转录因子可以深刻影响细胞表型及特性. 1987 年 Davis 等人^[3]通过过表达 *MyoD* 将成纤维细胞有效诱导转变为肌细胞, 效率为 25%~50%, 这是转分化重编程领域的开拓性研究之一. 过表达 *C/EBP α* 可以使前 T 细胞转分化为巨噬细胞, 效率高达 60%^[85]. 过表达转录因子这种重编程策略往往涉及几次细胞分裂及筛选, 但也有例外, 例如, 培养的胰腺外分泌细胞过表达 *C/EBP α* 不需经过细胞分裂即可转分化为肝细胞^[86]. 通过该策略重编程的细胞, 基因再激活程度非常高, 例如, 前 B 细胞过表达 *C/EBP α* 4 天后, 巨噬细胞标志 *Mac1* 再激活水平与巨噬细胞 *Mac1* 表达水平一致^[87], 同时, 起始细胞特异表达的基因发生沉默, 表明重编程是完全的.

2010 年, Vierbuchen 等人^[88]用特定因子诱导小鼠成纤维细胞(MEFs)直接转分化为功能性神经细胞, 有 19 个神经特异的基因过表达后可使小鼠胚胎成纤维细胞转分化为神经细胞. 理论上转录因子过表达能够使体细胞重编程为任意理想细胞类型, 但目前转录因子过表达重编程体细胞仅限于几种特定细胞, 且通常是谱系相近的细胞类型, 例如, *MyoD* 过表达不能诱导肝细胞重编程为肌细胞^[3,89]. 2012 年, 通过在睾丸支持细胞中过表达特定转录因子而使其直接转分化为神经干细胞^[90], 这是首次将成体细胞直接转分化为另一类群细胞的前体干细胞, 前体干细胞可以扩增和分化从而获得大量的转分化细胞, 这在某种意义上克服了转分化效率低的问题, 对于转分化的应用具有重要意义.

2008 年, Zhou 等人^[91]通过腺病毒转染, 过表达与胰腺胚胎发育期间功能建立密切相关的 3 个关键基因 *Pdx1*, *Ngn3*, *Mafa*, 体内实现了由胰腺腺泡细胞向胰岛 B 细胞的转分化, 效率高达 20%. 感染 3 天后转分化的产胰岛素细胞的胰岛素表达水平很低, 1 个月后即已激活至高水平. 诱导的产胰岛素细胞, 具有胰岛 B 细胞的所有表型特征. 该策略基本不涉及或仅涉及几次细胞分裂. 过表达特定细胞或器官在胚胎发育早期特异表达的转录因子, 是实现某类型细胞重编程至另一类型细胞的很有前景的策略.

4.2 诱导多能性

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[4]的杰出工作——过表达 4 因子 *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* 使小鼠成纤维细胞重编程为类 ES 的多能细胞——无疑是重编程领域的里程碑. 诱导的类 ES 细胞通过了大部分严格的多能性检验, 在形态学、增殖性、转录组、表观组等方面具有很多小鼠 ES 特征, 因此被命名为诱导多能性干(iPS)细胞. iPS 细胞有以下特点: Xi 再激活^[92]、端粒末端转移酶活性恢复、全基因组组蛋白甲基化模式与 ES 一致^[4,93]. 因此, 过表达一些因子可以直接将一系列不同来源的体细胞重编程获得多能性. 2009 年通过优化 iPS 细胞诱导及培养体系获得了世界上第一只完全由 iPS 细胞分化得到的四倍体补偿小鼠“小小”^[5], 标志着 iPS 细胞的革命性胜利, 同时也标志着重编程进入了 iPS 细胞时代.

2011 年, Anokye-Danso 将 miR-302/367 转入成纤维细胞, 在不添加任何转录因子的情况下, 激活了 *Oct4* 和 *Sox2*, 获得了 iPS 细胞, 其多能性标记的表达和畸胎瘤的形成等性能都与经典 4 因子获得的 iPS 细胞类似, 且具有生殖系嵌合能力^[94]. 该研究大大减少了外源基因的导入, 使 iPS 细胞离临床细胞治疗更近了一步.

为了避免外源基因对基因组的破坏, 多个研究组采用 4 因子的蛋白进行 iPS 诱导, 取得了可喜的成果^[8,95-97]. 2013 年, 邓宏魁研究组开辟了一条全新的 iPS 诱导途径——仅使用小分子化合物实现体细胞诱导重编程. 小分子诱导 iPS 完全避免了外源基因的插入, 大大降低了 iPS 诱导造成基因突变的风险. 不经过基因修饰的 iPS 细胞的获得是 iPS 走向临床应用的关键之一.

4.3 诱导多能性的效率以及机制

体细胞重编程至 iPS 细胞的效率一直是研究的热点. 效率最初是以向 MEFs 添加 4 因子 2 周后获得的 iPS 细胞克隆数计算的^[4]. 按这种算法, 2 周内仅有 0.01%~0.05% 的起始细胞重编程为 iPS 细胞^[4], 这增加了重编程细胞是起始细胞中易于重编程的细胞亚群的可能性. 人们认为 iPS 细胞诱导过程中多能性诱导是随机的^[98], 诱导成功后, 完整的多能性转录网络建立, 多能基因激活至 ES 水平, 起始细胞特异的分化基因沉默. 和 NT 一样, 起始细胞分化程度越高, 转录因子诱导细胞核重编程的效率越低, 分化程度较低的细胞的重编程效率显著高于终末分化细胞^[99]. 如果 4 因子通过整合诱导表达系统导入细胞, 重编程效率将由 0.05% 提高到 5%, 尽管 5% 仍然很低^[100].

由于通过某些转录因子重编程体细胞的过程很长, 因此很难确定 iPS 细胞的起源细胞. 2010 年 Smith 等人^[101]通过连续几周实时拍摄 MEFs 重编程至 iPS 细胞的过程研究了该问题. 该实验可以只计数能追踪回单个 MEFs 的 iPS 细胞克隆, 因此能代表重编程的标准化效率. 实验发现, 除了能追踪至单个 MEFs 的 iPS 细胞克隆, 培养过程中还存在不能追踪至单个 MEFs 的次级卫星 iPS 细胞, 这不能代表新的重编程事件.

使用小分子可显著提高重编程效率^[7]. 小分子包括: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸(valproic acid, VPA)^[102]; DNA 甲基转移酶抑制剂^[102,103]; 组蛋白甲基转移酶抑制剂 BIX-01294^[104]; 维生素 C^[105]等. 添加小分子不仅能显著提高重编程效率, 而且可以替代一些因子, 例如, 可以用 VPA 替代 *Klf4* 和 *c-Myc*. 2008 年 Huangfu 等人^[102]的研究发现, VPA 可将 MEFs 的 *Oct4* 表达水平由 0.03% 提高至 11%, 用 HDAC 抑制剂处理后, iPS 细胞基因再激活效率明显提高. iPS 细胞在重编程过程中会出现表观缺陷, 例如, 印记 *Dlk1-Dio3(D-D)* 区失活, 这导致 iPS 细胞发育潜能受限, 用曲古霉素 A(hachimycin A, TSA) 处理可以解决这个缺陷, 有助于获得全能性 iPS 细胞^[92].

干扰 p53 能有效地使 MEFs 重编程为 Nanog 阳性细胞的效率由 0.2% 提高至 20%^[106-108], 但值得注意的是, p53 敲除的 MEFs 重编程为 *Cdh1* 阳性且 Nanog 阳性的克隆的效率很低, 仅约 0.2%^[101].

上文提到, Anokye-Danso 等人^[94]将 miR-302/367

转入成纤维细胞, 在不添加任何转录因子的情况下, 激活了 *Oct4* 和 *Sox2*, 获得了 iPS 细胞. miR-302 能够抑制细胞周期调控相关基因(*Cdkn1a*, *Rbl2*, *Lats2*, *Cdc216*, *Tgfb2*, *Rhoc* 等), 抑制表观调控基因(*Mecp2*, *Mbd2*, *Smarcc2* 等), 抑制细胞信号通路(*Akt1*, *Arhgap26* 等), 抑制膜泡运输(*Rab5c*, *Rab11fip5* 等). 但 miR-367 的作用仍有待确定. 与 miR-367 密切相关的 miR-92b 可以抑制与 ES 细胞周期相关的 *Cdkn1c*, 说明 miR-367 有可能通过促进细胞增殖来辅助重编程. Anokye-Danso 的实验还发现, 加入 VPA 抑制 Hdac2 通路, 可以进一步提高 iPS 细胞诱导效率^[94].

2014 年, Shinagawa 等人^[6]发现母源因子 TH2A 和 TH2B 不仅参与了受精后精核的重编程, 而且可以与 *Klf4* 和 *Oct4* 一起高效诱导 iPS 细胞. 在重编程过程中 TH2A 和 TH2B 在 X 染色体上聚集, 增加 X 染色体活化程度, 而且敲除 *Xist* 能提高 TH2A 和 TH2B 及 4 因子共同诱导 iPS 细胞的效率, 却不能提高单独 4 因子诱导 iPS 细胞的效率, 说明 TH2A 和 TH2B 可能主要通过活化 X 染色体参与重编程.

用病毒转染的方法虽然可以有效诱导 iPS, 但会改变基因组. 用 4 因子的重组蛋白代替逆转录病毒载体诱导 iPS 细胞可以解决外源基因插入基因组的问题, 但效率很低(约 0.001%)^[95-97]. 用激活内源免疫反应的 poly(I:C) 诱导基因组开放能高效促进经典 4 因子蛋白诱导 iPS 细胞^[8], 表明打开体细胞基因组是重编程起始的关键.

内源逆转录病毒的活性与 ES 的多能性状态有很大内在联系^[109-113], 对于 iPS 的诱导也非常关键. 诱导人 iPS 过程中, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 会在全基因组范围内激活 HERVH 相关 lncRNA, 如 *lncRNA-RoR*, 且表达水平会高于人 ES 中的水平, 重编程结束后 HERVH 活性降到人 ES 水平. 干扰 *lncRNA-RoR* 会导致 iPS 诱导效率严重下降^[112]. 一些分化能力差的人 iPS 中 HERVH 表达异常: 过高表达失去神经分化能力; 过低表达分化能力极差. 过表达或干扰 HERVH 使其回到人 ES 水平后会改善 iPS 的分化能力^[112].

用 4 因子诱导 iPS 过程中会经历间质上皮转化过程(mesenchymal-to-epithelial transition, MET). 2010 年 Samavarchi-Tehrani 等人^[114]通过 RNAi 筛选与诱导重编程相关的基因, 发现干扰掉 *Smad1*, *Smad4*, *Alk3* 等 BMP4 信号通路组分后抑制 iPS 重编程, 深入研究发现, BMP 通路可通过激活 miR-205 及 miR-200 家族,

抑制 *Zed1* 及 *Zeb2*, 从而促进 E-cadherin 表达, 促进 MET 过程. 2015 年邓宏魁研究组^[115]报道, 用小分子诱导 iPS 过程中会出现胚外中胚层(extra-embryonic endoderm, XEN)样细胞阶段, 但 4 因子诱导 iPS 过程则不出现该阶段. 邓宏魁等人以 XEN 样状态作为指标, 细化了小分子诱导重编程的每个步骤, 采用一些促进剂(SGC0946 等)大大提高了效率.

诱导 iPS 过程中母源染色体 D-D 区由非甲基化的开放状态变为甲基化的关闭状态, 是大部分 iPS 不能实现 4 倍体补偿的关键因素^[92,116]. 诱导过程中添加维生素 C, 可以有效防止该区域 H3K27ac 及 H3K4me2 的丢失, 进而可以有效建立 H3K4me3, 防止该区域被 DNMT3A 甲基化^[117]. 2015 年 Das 等人以小鼠 ES 为材料研究发现, *Gtl2* 的可顺式通过结合 PRC2 复合体保护 D-D 区免受 DNMT3A 的甲基化作用, 为 iPS 诱导过程中 D-D 区甲基化关闭的机制探索指明了方向^[118].

4.4 最高多能性的鉴定标准以及安全性评估

iPS 细胞在功能上等同于 ES 细胞, 与 ES 细胞具有同样的多能性特点, 包括多能基因的表达、三胚层分化潜能、生殖系嵌合能力, 甚至是四倍体补偿能力. 然而 iPS 细胞与 ES 细胞是否完全一样, 是否具有相同的安全性, 是 iPS 细胞应用的关键问题.

科学家们比较了 iPS 细胞和 ES 细胞的转录组、蛋白组以及表观组, 揭示了 iPS 细胞与 ES 细胞的差异, 对 iPS 细胞的生物安全性进行了深入探讨^[119~125]. 关于 iPS 细胞与 ES 细胞的相似性主要有 3 种看法. 第一种看法认为, iPS 细胞与 ES 细胞之间存在明确的微小差异, 可以找到严格区分二者的特异性标志物^[92,119]. D-D 区在多数小鼠 iPS 细胞内是沉默的, 这可能是 iPS 细胞特有的, 但通过比较不同发育潜能的 iPS 细胞, 证明 D-D 区的沉默是重编程因子表达异常导致的, 而且 D-D 区的开放和沉默可以作为判断 iPS 细胞是否具有四倍体补偿能力的标准^[123]. 第二种看法认为, iPS 细胞和 ES 细胞是两个在基因组水平和表观组水平有很高相似性的群体^[120,121,126]. 第三种看法认为, iPS 细胞某些特定基因位点的表观组具有可变性, 这

些位点是重编程异常的热点. 不是所有的 iPS 细胞在所有这些热点区域都存在异常, 异常热点的不同组合造成了 iPS 细胞的异质性. 去甲基化不完全的位点倾向位于端粒远端^[125]. 5 羟甲基胞嘧啶(5hmC)水平异常的基因区域的表达水平与 ES 细胞中差异较大^[123]. 重编程异常热点中有 20 个热点富含抑制性染色质修饰 H3K9me3. 转染进入的 4 因子在 24 h 内不能与这些富含 H3K9me3 的区域结合, 更谈不上招募组蛋白去甲基化酶、招募 TET 蛋白及 DNMT3a/b 进行去甲基化, 最终导致这些位点成为重编程异常的热点. 综上, 对于 iPS 细胞与 ES 细胞的异同以及对于 iPS 细胞的安全性问题的讨论始终是 iPS 细胞走向应用的必须克服的瓶颈, 对于 iPS 细胞的评判也需要进一步的探索.

5 未来的挑战

2012 年的诺贝尔生理学或医学奖颁发给了 Shinya Yamanaka 和 John Gurdon 两位科学家以表彰他们对体细胞重编程的发现. 从 2006 年 iPS 细胞建立至今已有大量的工作对于不同重编程过程的机制进行探索, 但是重编程过程是一个复杂的网络化的协作过程, 目前仍然有大量的问题等待探索. 而对于重编程机制的研究会对两个基本的发育生物学问题提供答案: (i) 多能性是如何建立的, 而细胞的命运又是如何决定的; (ii) 体细胞重编程过程的染色体表观状态的转化是如何完成的, 哪些因素影响了重编程的效率, 如何获得最为高效和安全的 iPS 细胞等.

重编程细胞的未来价值之一是, 可以建立长期稳定传代的病人特异的细胞系, 用以进行个体化药物筛选. 另一个巨大的实用价值在于, 来自病人的体细胞获得的干细胞可作为细胞治疗的良好材料. 当然, 用于细胞治疗的细胞系不仅需要充足的细胞量, 而且必须具有标准的生物学功能, 更重要的是不能有致癌性等安全问题. 因此, 更加深入理解重编程过程以及更加完善和创新的技术, 依然是重编程领域不可或缺的. 也正因为此, 重编程依然是生物学领域的研究重点、难点和热点.

参考文献

- 1 Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 526-537

- 2 Matsumura H, Tada M, Otsuji T, et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods*, 2007, 4: 23–25
- 3 Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 1987, 51: 987–1000
- 4 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 5 Zhao X Y, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461: 86–90
- 6 Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, et al. Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 217–227
- 7 Feng B, Ng J H, Heng J C, et al. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 301–312
- 8 Lee J, Sayed N, Hunter A, et al. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell*, 2012, 151: 547–558
- 9 Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403: 501–502
- 10 Wang L, Zhang J, Duan J, et al. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 2014, 157: 979–991
- 11 Briggs R, King T J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, 38: 455–463
- 12 Gurdon J B, Elsdale T R, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*, 1958, 182: 64–65
- 13 Gurdon J B. The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 1960, 8: 505–526
- 14 Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 34: 93–112
- 15 Byrne J A, Simonsson S, Gurdon J B. From intestine to muscle: nuclear reprogramming through defective cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 6059–6063
- 16 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810–813
- 17 Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369–374
- 18 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256–1258
- 19 Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095–2098
- 20 Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 456–461
- 21 Bethausser J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1055–1059
- 22 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188–1190
- 23 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86–90
- 24 Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859
- 25 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 366–369
- 26 Woods G L, White K L, Vanderwall D K, et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 2003, 301: 1063
- 27 Galli C, Lagutina I, Crotti G, et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, 424: 635
- 28 Zhou Q, Renard J P, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302: 1179
- 29 Lee B C, Kim M K, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436: 641
- 30 Li Z, Sun X, Chen J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 2006, 293: 439–448
- 31 Wani N A, Wernery U, Hassan F A, et al. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2010, 82: 373–379
- 32 Wakayama T, Rodriguez I, Perry A C, et al. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14984–14989
- 33 Wakayama S, Ohta H, Kishigami S, et al. Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues. *Biol Reprod*, 2005, 72: 932–936
- 34 Blelloch R H, Hochedlinger K, Yamada Y, et al. Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 13985–13990
- 35 Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*, 2006, 235: 2460–2469

- 36 Egli D, Birkhoff G, Eggan K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 505–516
- 37 Boiani M, Gentile L, Gambles V V, et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells*, 2005, 23: 1089–1104
- 38 Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, et al. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*, 2000, 290: 1578–1581
- 39 Bao S, Miyoshi N, Okamoto I, et al. Initiation of epigenetic reprogramming of the X chromosome in somatic nuclei transplanted to a mouse oocyte. *EMBO Rep*, 2005, 6: 748–754
- 40 Silva J, Nichols J, Theunissen T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 2009, 138: 722–737
- 41 Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13734–13738
- 42 Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, 28: 173–177
- 43 Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, et al. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis*, 2001, 30: 45–50
- 44 Yamazaki Y, Fujita T C, Low E W, et al. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 180–188
- 45 Enright B P, Kubota C, Yang X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2003, 69: 896–901
- 46 Enright B P, Sung L Y, Chang C C, et al. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2005, 72: 944–948
- 47 Brelloch R, Wang Z, 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: 2007–2013
- 48 Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128: 693–705
- 49 Bui H T, Wakayama S, Kishigami S, et al. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2010, 83: 454–463
- 50 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: 183–189
- 51 Gurdon J B. Injected nuclei in frog oocytes: fate, enlargement, and chromatin dispersal. *J Embryol Exp Morphol*, 1976, 36: 523–540
- 52 Eskeland R, Leeb M, Grimes G R, et al. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol Cell*, 2010, 38: 452–464
- 53 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: 1542–1546
- 54 Ng R K, Gurdon J B. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 102–109
- 55 Nolen L D, Gao S, Han Z, et al. X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Biol*, 2005, 279: 525–540
- 56 Boiani M, Eckardt S, Scholer H R, et al. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, 2002, 16: 1209–1219
- 57 Hwang W S, Ryu Y J, Park J H, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 2004, 303: 1669–1674
- 58 Byrne J A, Simonsson S, Western P S, et al. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr Biol*, 2003, 13: 1206–1213
- 59 Gao S, Gasparrini B, McGarry M, et al. Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2002, 67: 928–934
- 60 Koziol M J, Garrett N, Gurdon J B. Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei. *Curr Biol*, 2007, 17: 801–807
- 61 Halley-Stott R P, Pasque V, Astrand C, et al. Mammalian nuclear transplantation to Germinal Vesicle stage *Xenopus* oocytes—a method for quantitative transcriptional reprogramming. *Methods*, 2010, 51: 56–65
- 62 Jullien J, Astrand C, Halley-Stott R P, et al. Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5483–5488
- 63 Murata K, Kouzarides T, Bannister A J, et al. Histone H3 lysine 4 methylation is associated with the transcriptional reprogramming efficiency of somatic nuclei by oocytes. *Epigenetics Chromatin*, 2010, 3: 4

- 64 Tamada H, Van Thuan N, Reed P, et al. Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasmin. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 1259–1271
- 65 Ma M, Guo X, Wang F, et al. Protein expression profile of the mouse metaphase-II oocyte. *J Proteome Res*, 2008, 7: 4821–4830
- 66 Harris H. The reactivation of the red cell nucleus. *J Cell Sci*, 1967, 2: 23–32
- 67 Blau H M, Chiu C P, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 1983, 32: 1171–1180
- 68 Han D W, Do J T, Gentile L, et al. Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. *Stem Cells*, 2008, 26: 445–454
- 69 Palermo A, Doyonnas R, Bhutani N, et al. Nuclear reprogramming in heterokaryons is rapid, extensive, and bidirectional. *FASEB J*, 2009, 23: 1431–1440
- 70 Do J T, Han D W, Scholer H R. Reprogramming somatic gene activity by fusion with pluripotent cells. *Stem Cell Rev*, 2006, 2: 257–264
- 71 Miller R A, Ruddle F H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 1976, 9: 45–55
- 72 Tada M, Tada T, Lefebvre L, et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997, 16: 6510–6520
- 73 Matveeva N M, Shilov A G, Kaftanovskaya E M, et al. *In vitro* and *in vivo* study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. *Mol Reprod Dev*, 1998, 50: 128–138
- 74 Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, et al. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 5710–5720
- 75 Do J T, Han D W, Gentile L, et al. Erasure of cellular memory by fusion with pluripotent cells. *Stem Cells*, 2007, 25: 1013–1020
- 76 Lee J H, Bugarija B, Millan E J, et al. Systematic identification of cis-silenced genes by trans complementation. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 835–846
- 77 Kruglova A A, Matveeva N M, Gridina M M, et al. Dominance of parental genomes in embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells depends on the ploidy of the somatic partner. *Cell Tissue Res*, 2010, 340: 437–450
- 78 Terranova R, Pereira C F, Du Roure C, et al. Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *J Cell Sci*, 2006, 119: 2065–2072
- 79 Pralong D, Trounson A O, Verma P J. Cell fusion for reprogramming pluripotency: toward elimination of the pluripotent genome. *Stem Cell Rev*, 2006, 2: 331–340
- 80 Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 2001, 11: 1553–1558
- 81 Ying Q L, Nichols J, Evans E P, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, 416: 545–548
- 82 Silva J, Chambers I, Pollard S, et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*, 2006, 441: 997–1001
- 83 Bhutani N, Brady J J, Damian M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 2010, 463: 1042–1047
- 84 Pereira C F, Terranova R, Ryan N K, et al. Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000170
- 85 Laiosa C V, Stadtfeld M, Xie H, et al. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*, 2006, 25: 731–744
- 86 Shen C N, Slack J M, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 879–887
- 87 Xie H, Ye M, Feng R, et al. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*, 2004, 117: 663–676
- 88 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z P, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463: 1035–1041
- 89 Schafer B W, Blakely B T, Darlington G J, et al. Effect of cell history on response to helix-loop-helix family of myogenic regulators. *Nature*, 1990, 344: 454–458
- 90 Sheng C, Zheng Q, Wu J, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res*, 2012, 22: 208–218
- 91 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 2008, 455: 627–632
- 92 Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 465: 175–181
- 93 Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 55–70

- 94 Anokye-Danso F, Trivedi C M, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376–388
- 95 Cho H J, Lee C S, Kwon Y W, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*, 2010, 116: 386–395
- 96 Kim D, Kim C H, Moon J I, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 472–476
- 97 Zhou H, Wu S, Joo J Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 381–384
- 98 Hanna J, Saha K, Pando B, et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 2009, 462: 595–601
- 99 Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, et al. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*, 2009, 41: 968–976
- 100 Stadtfeld M, Maherali N, Breault D T, et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 230–240
- 101 Smith Z D, Nachman I, Regev A, et al. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 521–526
- 102 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: 795–797
- 103 Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454: 49–55
- 104 Shi Y, Do J T, Despons C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 525–528
- 105 Esteban M A, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 71–79
- 106 Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 2009, 460: 1132–1135
- 107 Kawamura T, Suzuki J, Wang Y V, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 2009, 460: 1140–1144
- 108 Li H, Collado M, Villasante A, et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, 2009, 460: 1136–1139
- 109 Grow E J, Flynn R A, Chavez S L, et al. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature*, 2015, 522: 7555
- 110 Wang J, Xie G, Singh M, et al. Primate-specific endogenous retrovirus-driven transcription defines naive-like stem cells. *Nature*, 2014, 516: 405–409
- 111 Lu X, Sachs F, Ramsay L, et al. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21: 423–425
- 112 Ohnuki M, Tanabe K, Sutou K, et al. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12426–12431
- 113 Macfarlan T S, Gifford W D, Driscoll S, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, 2012, 487: 57–63
- 114 Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 64–77
- 115 Zhao Y, Zhao T, Guan J, et al. A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical reprogramming. *Cell*, 2015, 163: 1678–1691
- 116 Liu L, Luo G Z, Yang W, et al. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19483–19490
- 117 Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, et al. Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet*, 2012, 44: 398–405, S391–S392
- 118 Das P P, Hendrix D A, Apostolou E, et al. PRC2 is required to maintain expression of the maternal *gtl2-rian-mirg* locus by preventing de novo dna methylation in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2015, 12: 1456–1470
- 119 Chin M H, Mason M J, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 111–123
- 120 Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of

- pluripotent cell lines. *Cell*, 2011, 144: 439–452
- 121 Lister R, Pelizzola M, Kida Y S, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471: 68–73
- 122 Nazor K L, Altun G, Lynch C, et al. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 620–634
- 123 Ruiz S, Diep D, Gore A, et al. Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 16196–16201
- 124 Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 149–159
- 125 Wang T, Wu H, Li Y, et al. Subtelomeric hotspots of aberrant 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic modifications during reprogramming to pluripotency. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 700–711
- 126 Liu L, Luo G Z, Yang W, et al. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285: 19483–19490
- 127 Kim K, Zhao R, Doi A, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 1117–1119

Review of Somatic Cell Reprogramming

LI Xin^{1,2}, WANG JiaQiang^{1,2} & ZHOU Qi¹

1 State Key Laboratory of Stem cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2 College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Every single differentiated cell situates at a stable and potentially irreversible state through a series of dynamic regulatory mechanisms. Transdifferentiation from one kind of differentiated cells to another can never occur under natural condition. However, the highly stable, differentiated state of somatic cells can be experimentally reversed reflecting in gene expression from one cell type to an unrelated type, which is called reprogramming. Reprogramming has been achieved by nuclear transfer to eggs, cell fusion, incubation with ooplasmic, and overexpression of pluripotency transcription factors, by which somatic cells would achieve a pluripotent state similar to that of embryonic stem cell, which can be differentiated into all kind of cell types. Reprogramming is a bridge connecting differentiated somatic cells and the regeneration capacity of stem cells, thus it makes a great prospect for regenerative medicine, individualized disease treatment, and drug screening.

somatic cell reprogramming, nuclear transfer, cell fusion, ips cells

doi: 10.1360/N052015-00247