

提高细胞重编程效率和安全性的策略

虞欣璐 张红霞 王辰 于斌 朱海英*

(第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433)

摘要 细胞重编程是指分化的细胞在特定条件下经过去分化恢复到全能性或多能性状态, 或者通过转分化将一种类型的体细胞转变成另外一种类型的细胞的过程。利用重编程技术获得的诱导型多能干细胞, 谱系重编程技术获得的组织干细胞或组织细胞, 具有患者特异性或者疾病特异性, 可以显著减少免疫反应, 同时也解决了临床细胞治疗的种子细胞来源问题, 具有极大的临床应用价值。但是, 另一方面, 重编程效率低下和安全性问题却一直是其临床应用的瓶颈。近年来, 人们围绕如何优化重编程方法进行了深入的研究, 特别是对细胞重编程过程所涉及到的分子机制, 包括表观遗传调控机制和上皮间质转化机制在这个过程中作用有了更深入的认识。此外, 采用非整合型载体和利用化学诱导方法替代转录因子的方式也提高了重编程的安全性。该文将就这一领域的研究进展作一综述。

关键词 细胞重编程; 诱导型多能干细胞; 谱系重编程; 化学诱导; 表观遗传调控

Strategies to Enhance the Efficiency and Safety of Cell Reprogramming

Yu Xinlu, Zhang Hongxia, Wang Chen, Yu Bin, Zhu Haiying*

(Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences,
Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Cell reprogramming refers to the process of converting somatic cells to totipotent or pluripotent stem cell by dedifferentiation, or to another type of somatic cells or somatic stem cells by transdifferentiation under certain conditions. The cells derived from patient's cells by reprogramming as seed cells for cell therapy, shares the specificity of patient, which could significantly reduce immune responses, provides multiple options in the source of seed cells with great value of clinical application. However, how to increase the efficiency of reprogramming and improve the safety of seed cells has been studied as a critical point in future clinic application. In recent years, researchers have been done a lot of work on how to optimize reprogramming strategy and have more comprehensive knowledge of the molecular mechanism involved in the process, such as epigenetic regulation and EMT. On the other hand, researchers adopt non-integrating episomal vectors and chemical induction to improve the safety of reprogramming. In this review, we have introduced the up-dated progress of this field.

Keywords cell reprogramming; iPSCs; lineage reprogramming; chemical induction; epigenetic regulation

收稿日期: 2016-04-01 接受日期: 2016-08-01

国家自然科学基金项目(批准号: 31471284)和上海市教委科技创新重点项目(批准号: 14ZZ078)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-81870944(0), E-mail: zinnia69@163.com

Received: April 1, 2016 Accepted: August 1, 2016

This work was supported by the National Natural Science foundation of China (Grant No.31471284) and Scientific Research Innovation Projects of Shanghai Education Committee (Grant No.14ZZ078)

*Corresponding author. Tel: +86-21-81870944(0), E-mail: zinnia69@163.com

网络出版时间: 2016-11-04 17:11:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161104.1711.002.html>

细胞重编程是指分化的细胞在特定条件下经过分化恢复到全能性或多能性状态,或者通过转分化将一种类型的体细胞转变成另外一种类型的细胞的过程,前者称为体细胞重编程(somatic cell reprogramming),后者称为谱系重编程(lineage reprogramming)。体细胞重编程概念的真正形成,源于2006年Takahashi等^[1]的研究。他们借助逆转录病毒载体,将Oct3/4(又名Pou5f1, POU domain, class 5, transcription factor 1)、Sox2(SRY-box 2)、Klf4(Kruppel-like factor 4)和c-Myc(c-Myelocytomatosis oncogene)(OSKM)四个转录因子导入小鼠皮肤成纤维细胞中,将其重编程为诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1],这些细胞不仅具有类似胚胎干细胞的多能性,而且又避开了胚胎干细胞应用的伦理学限制,极大地促进了再生医学、药物研发、疾病模型建立以及细胞治疗的发展,被视为细胞治疗的新希望。目前,体细胞重编程可通过转染特定转录因子^[1]、体细胞核移植^[2]、细胞融合^[3]来实现。其中,通过转染特定转录因子来获得诱导型多能干细胞的方法发展最为成熟,而较为成熟的谱系重编程策略也是利用转染特定转录因子实现体细胞向另一类型的体细胞或干细胞的转化。显而易见,谱系重编程方法提供了除iPSCs外更广泛的细胞来源,它同样具有患者特异性或者疾病特异性,可以显著减少免疫反应。虽然从研究的深度和广度上讲,谱系重编程技术的发展还远远落后于体细胞重编程技术,但由于可以借鉴体细胞重编程的研究策略和方法,谱系重编程技术有望成为在细胞治疗、组织工程等领域得到广泛应用的新型技术。目前谱系重编程已经取得了一些成果,例如,Ieda等^[4]利用早期心脏发育相关的三个转录因子Gata4(GATA binding protein 4)、Mef2c(myocyte enhancer factor 2C)和Tbx5(T-box 5),将小鼠皮肤成纤维细胞直接重编程为小鼠诱导型心肌细胞(mouse induced cardiomyocytes, miCMs)。利用神经谱系特异转录因子Ascl1(achaete-scute family bHLH transcription factor 1)、Brn2(又名Pou3f2, POU domain, class 3, transcription factor 2)和Myt11(myelin transcription factor 1-like)可以将小鼠胚胎干细胞及成纤维细胞诱导成功能性的神经细胞(mouse

induced neuronal cells, miNCs)^[5]。利用Gata4、Hnf1a(HNF1 homeobox A)、Foxa3(forkhead box A3),同时敲除p19^{arf},可以将小鼠成纤维细胞重编程为小鼠诱导肝样细胞(mouse induced hepatocyte-like cells, miHeps)^[6]。利用Hnf1b(HNF1 homeobox B)和Foxa3这两个肝脏器官发生相关的转录因子,可以将小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)重编程为诱导型肝干细胞(mouse induced hepatic stem cells, miHepSCs)^[7]。

无论是体细胞重编程还是谱系重编程,重编程效率低下一直是基础研究和临床运用的瓶颈,相关数据显示,iPSCs的重编程效率一般在0.01%~0.20%之间。另外,就是诱导细胞的安全性问题,人们最初使用逆转录病毒载体进行诱导^[8-9],但病毒载体和转基因会永久地整合进宿主的基因组,很大可能会影响细胞功能和分化^[8],甚至使机体产生肿瘤,这极大地影响了诱导型细胞的临床应用^[10]。因此,要实现重编程技术应用于临床疾病治疗的目标,提高重编程效率和安全性是个迫在眉睫的问题。近年来,人们从不同的角度对重编程方法进行了优化,同时对重编程过程所涉及的分子机制也进行了探讨。

1 提高重编程效率的策略

1.1 通过影响间充质上皮转化过程提高重编程效率

用OKSM四因子诱导MEF细胞的重编程过程可分为三个阶段:起始阶段、成熟阶段和稳定阶段。起始阶段的MEF重编程需要经历从间充质细胞表型过渡到上皮细胞表型的过程,即间充质上皮转化(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)^[11],这个过程涉及间充质细胞基因的抑制和上皮细胞基因的激活^[12],前者包括一些在间充质上皮转化中编码转录因子的基因,如*Snai1*(snail family zinc finger 1,又名*Snail1*)、*Snai2*(snail family zinc finger 2,又名*Slug*)、*Zeb1*(Zinc finger E-box-binding homeobox 1)、*Zeb2*(Zinc finger E-box-binding homeobox 2),后者主要包括*Cdh1*(E-cadherin)、*EpCAM*(epithelial cell adhesion molecule)、*Ocln*(occludin)。

很多研究显示,miR-200家族能促进iPSCs形成,这与MET过程密切相关。Wang等^[13]研究发现,Oct4

和Sox2能直接结合到miR-200的启动子区并直接激活它的表达, miR-200能直接靶向结合ZEB2的3'UTR来抑制其表达, 这样就促进了MET进程, 进而促进了iPSCs的产生。

此外, 有研究报道提出, 骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)能够协同OKSM诱导miR-205和miR-200家族, 从而促进MET, 改善重编程起始阶段^[14], 这提供了miR-200家族作为MET过程促进因素的另一个证据。另一方面, 促进上皮间充质转化(EMT)的因素则会导致干细胞分化, 所以会抑制iPSCs的形成。有研究显示, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)通过激活Snail诱导EMT过程, 从而抑制重编程^[15]。Li等^[16]在另一项实验中也证实了这一观点, 他们在利用OSKM四因子诱导iPSCs的过程中加入TGF- β 1, 发现它抑制上皮标志基因*Ocln*和*EpCAM*的上调和*Snail*的下调, 导致阳性克隆率降低约70%。很有趣的是, OSKM四因子可以通过阻断TGF- β 信号通路来抑制EMT过程从而完成重编程, 其中Sox2和Oct4抑制Snail、c-Myc能下调TGF- β 1和TGF- β 受体2的表达, Klf4则可以诱导一些上皮基因如E-cadherin、EpCAM的表达。

1.2 通过影响细胞的表现遗传状态来提高重编程效率

表观遗传虽然不涉及DNA序列改变, 但可以改变DNA的修饰, 从而影响基因表达的调控模式。目前已知的表观修饰主要包括基因组印记、DNA碱基的化学修饰、组蛋白化学修饰及染色质重塑。细胞重编程过程涉及原有体细胞表观标记的去除和新的细胞特异性的表观标记的建立, 其中, DNA和组蛋白的表观改变至关重要^[17-22]。有研究表明, DNA去甲基化、抑制组蛋白去乙酰化能有效提高重编程效率^[23]。

1.2.1 DNA甲基化和去甲基化

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下, DNA的CG二核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基, 形成5-甲基胞嘧啶(5-mC)。通常认为, DNA甲基化与基因沉默相关。

Fidalgo等^[24]的研究表明, 转录抑制子Zfp281(zinc finger protein 281)能直接招募组蛋白去乙酰化复合物NuRD至Nanog基因座而抑制Nanog的重

新激活, 从而抑制iPSCs形成。有研究进一步表明, NuRD的一个亚型——甲基结合域蛋白3(Mbd3)的缺失能上调Nanog、Oct4和Sox2表达并且提高重编程效率^[25-26]。

Tet(ten-eleven translocation)家族是生物体内存在的一种 α -酮戊二酸(α -KG)和Fe²⁺依赖的双加氧酶, Tet蛋白质可以催化5-mC转化为5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC), 是DNA去甲基化过程中的一种重要的酶。徐国良课题组的研究表明, 在敲除MEF细胞中Tet家族的三个基因或胸腺嘧啶-DNA糖基化酶(thymine-DNA glycosylase, TDG)后, MEF细胞由于Tet或TDG缺失导致氧化去甲基化过程不能进行, 从而导致miR-200家族基因不能被激活, 最后造成MET过程无法完成从而导致重编程失败^[27]。

Gao等^[28]的研究证实, Tet1能够代替内源性的Oct4促进重编程, 并且他们发现利用TSKM(Tet1、Sox2、Klf4、c-Myc)诱导的重编程分为两个阶段。第一个阶段涉及体细胞的表现改变, 在这一阶段, 5-甲基胞嘧啶和5-羟甲基胞嘧啶水平均升高, 这可能是由于Tet催化5-甲基胞嘧啶转变为5-羟甲基胞嘧啶所致。第二阶段以胚胎干细胞样的表现重建为特征, 在这一阶段, 广泛的DNA去甲基化伴随着5-羟甲基胞嘧啶的富集, 在多潜能基因和胚胎干细胞激活调控区, 5-羟甲基胞嘧啶水平的上升尤为明显。这充分表明, 在重编程过程中DNA甲基化和羟甲基化对全基因组的表观重置起了十分重要的作用。而在他们的另一项研究中, 利用Tet1与Oct4、Sox2、Klf4诱导MEF细胞可以大大提高重编程效率, 与单纯利用Oct4、Sox2和Klf4诱导相比, 能将重编程的效率从0.075%提升至0.125%^[29]。

Tet1在谱系重编程中也有着重要的作用。在诱导人胚肺成纤维细胞转变为多巴胺能神经元的研究中, 研究者发现, 过表达Tet1不仅能够提高重编程的效率, 而且能够提高细胞的存活率。虽然Tet1在此过程中的作用机制尚不清楚, 但考虑到Tet1在体细胞重编程中的重要作用, 研究者认为, Tet1可能是通过促进成纤维细胞向神经元细胞的表现改变来促进重编程^[26]。

1.2.2 组蛋白去乙酰化作用

组蛋白去乙酰酶(histone deacetylases, HDAC)催化组蛋白的去乙酰化

作用,与基因转录抑制密切相关。

研究显示, DNA甲基转移酶和组蛋白去乙酰酶抑制剂可以提高重编程效率,尤其是丙戊酸(valproic acid, VPA)(一种HDAC抑制剂),它不但可以将重编程效率提高100倍,而且在没有转入c-Myc的情况下仍然可以有效地进行重编程^[30]。

Mu等^[31]的研究显示,在重编程的起始阶段激活组蛋白乙酰转移酶MOF(males absent on the first,又名MYST1或KAT8)十分必要。他们的研究证实,在重编程过程中,MOF与组蛋白H3K4甲基转移酶的核心复合物Wdr5相互作用来促进内源的Oct4表达,而敲低MOF则降低H4K16ac和H3K4me3在Oct4启动子区的修饰作用。

2 影响重编程安全性的因素

2.1 利用非整合型载体诱导细胞重编程,提高安全性

体细胞的重编程需要几个转录因子的共同作用,所以,提高因子的共表达效率可以提高重编程效率。Kaji等^[32]利用一个以2A序列连接c-Myc、Klf4、Oct4和Sox2四因子的非病毒共表达载体将重编程的效率提高到2.5%,但是仍然无法避免外源基因的整合宿主基因组而造成的突变的可能性,这会直接影响重编程的稳定性和重编程细胞的应用安全性。但如果将这个共表达载体与piggyBac转座子组合,则可以成功地将人的胚胎成纤维细胞进行重编程。这套重编程系统只进行最小程度的基因组修饰,并且在重编程完成之后,外源转录基因可以被完全去除。

Stadtfield等^[33]利用非整合型腺病毒载体瞬时表达Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc,将鼠的成纤维细胞或者肝细胞诱导成iPSCs,虽然用这种方法诱导的iPSCs依旧只有很低的获得率,并且载体在细胞内的表达时间过短,限制了其在人类细胞中的运用。但他们的研究提示,体外重编程并不一定需要基因的插入突变,这为临床治疗中iPSCs技术的运用提供了新的思路。

Yu等^[34]通过转染一个以oriP/EBNA1为基础的游离型载体(episomal vectors)成功诱导出了人的iPSCs,而在将MEF细胞诱导为肝脏细胞的研究中,

研究者们同样利用以oriP/EBNA1为基础的,包含*Gata4*、*Hnf1a*、*Foxa3*基因的游离型载体,通过核转染的方式转染进小鼠成纤维细胞,成功诱导出了可再生的小鼠肝脏样细胞(mouse induced hepatocyte-like cells, miHeps),并且在诱导获得的miHeps中,检测不到外源转录因子的表达^[35]。他们的研究证明了重编程过程不需要整合基因组或者外源基因的持续表达。使用基于oriP/EBNA1的游离型载体时,外源DNA不整合进人类iPS细胞基因组,而且在没有药物选择压力的情况下,细胞游离型载体会逐渐丢失,这样,没有载体和转基因的人iPS细胞就会在形成克隆的过程中在没有进一步遗传操作的情况下被分离出来。

为了有效避免外源基因组的整合和修饰,也有人采用合成修饰mRNAs(synthetic modified mRNAs, mmRNAs)进行诱导。例如,在将人的成纤维细胞诱导为肝细胞的过程中,研究者将各个因子分别合成mmRNA,通过阳离子脂质体转染的方式将mmRNA转染进细胞进行诱导^[36]。有研究显示,利用仙台病毒(一种RNA病毒)能够高效地诱导出iPSCs,并且不改变宿主基因组^[37]。

2.2 小分子化合物诱导细胞重编程,替代转录因子的诱导作用

Esteban等^[38]发现,维生素C可以缓解细胞衰老,促进小鼠和人来源的细胞进行重编程,加快基因表达改变并且促进iPS前体细胞向完全iPSCs转变。在随后的研究中,他们进一步阐明了其作用机制。他们发现,组蛋白去甲基化酶Jhdm1a/1b(JmjC domain-containing histone demethylase 1a/1b)是位于维生素C下游的体细胞重编程中的关键效应物,维生素C通过Jhdm1a/1b降低组蛋白H3K36me2/3水平,而Jhdm1a/1b通过抑制Ink4/Arf基因座加快细胞周期进程和抑制细胞衰老。另外, Jhdm1a/1b与Oct4一起激活miRNA 302/367家族^[17],而之前已经有研究表明,miRNA 302/367家族可以促进由SKO(Sox2、Klf4、Oct4)调控的重编程^[39]。

丁胜研究团队利用两个小分子化合物BIX和BayK,成功地将只转染了Oct4和Klf4两个转录因子的鼠胚胎成纤维细胞诱导成iPSCs,证明了小分子化合物能够替代某些转录因子进行重编程^[40]。此后,

他们发现, CHIR99021——糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)抑制剂在转染Oct4、Sox2和Klf4三个转录因子的情况下能显著地提高MEF细胞的重编程效率, 并且它也能在只有Oct4和Klf4两个转录因子的情况下成功将MEF细胞进行重编程, 而它与赖氨酸特异去甲基酶1抑制剂反苯环丙胺联合运用时能将只转染了Oct4和Klf4两个转录因子的人原代角质细胞诱导成iPSCs^[41]。今年, 他们利用九种化合物组合将人的成纤维细胞诱导成化学诱导的心肌样细胞(chemically induced cardiomyocyte-like cells, CiCMs), 诱导出的CiCMs在转录水平、细胞表型、电生理学上都与人心肌细胞一致^[42], 这是利用化学诱导的方式进行谱系重编程的成功例子。而在利用人的成纤维细胞诱导为多巴胺能神经元细胞的实验中, 研究者们发现, 在培养基中添加一些小分子化合物, 如ROCK抑制剂Y27632、CHIR99021、维生素C等, 可以显著提高被转染细胞的存活率, 从而提高重编程效率^[43]。

邓宏魁课题组的研究证明了利用小分子化合物完全代替病毒载体诱导的可能性^[45]。他们使用七个小分子化合物的组合诱导的重编程的效率高达0.2%。化学诱导多能干细胞(chemically induced pluripotent stem cells, CiPSCs)有类似于胚胎干细胞的基因表达谱, 表观遗传状态和分化潜能。另有研究进一步证实了在利用小分子诱导时, 外源性“主基因”对重编程细胞而言是可有可无的^[44]。最近, 利用谱系追踪的方式, 他们证明了来自外胚层的神经干细胞和来自内胚层的肠上皮细胞都可以利用化学重编程的方式诱导出CiPSCs^[45]。这种CiPSCs的增殖速度、全基因组表达谱、表观状态、自我更新和分化能力都与小鼠ES细胞类似, 这说明, 化学重编程不依赖于细胞的原始类型。

裴钢课题组证实, 在低氧条件下, 小分子化合物组合VCR[V: VPA; C: CHIR99021; R: Repsox(一种TGF- β 通路抑制剂)]可以将MEF细胞重编程为化学诱导型神经前体细胞(chemical-induced neural progenitor cells, ciNPCs)。他们进一步研究证实, 利用VCR组合, 还可以将小鼠尾尖成纤维细胞(mouse tail-tip fibroblasts, TTFs)和人尿液细胞(human urinary cells, HUCs)重编程为ciNPCs^[46]。他们的另

一项研究证明, 利用VCRFSGY组合[F: Forskolin; S: SP600125——JNK(c-Jun N-terminal kinase)抑制剂; G: GO6983——PKC(protein kinase C)抑制剂; Y: Y-27632]可以绕过神经前体细胞阶段, 直接将正常人或阿尔兹海默病患者的成纤维细胞重编程为化学诱导型神经元细胞(human chemical-induced neuronal cells, hciNs)。这种hciN细胞与利用hiPS细胞诱导获得的神经元细胞及人诱导型神经细胞在形态、基因表达谱和电生理学特性上一致^[47]。这种直接利用小分子化合物进行谱系重编程的方式, 缩短了重编程的时间进程, 获得的细胞也更加安全。

3 结语

细胞重编程技术, 尤其是体细胞重编程技术经过十年发展, 其重编程效率已经有了极大的提高, 而在此基础上建立起来的谱系重编程技术也取得了一些进展, 但是, 对于其中所涉及的分子机制我们还不完全清楚。因此, 想要找到高效又安全的重编程方法, 还需要更为深入的研究。我们期望能早日获得可供临床运用的诱导型细胞。

参考文献 (References)

- 1 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.
- 2 Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001; 292(5517): 740-3.
- 3 Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001; 11(19): 1553-8.
- 4 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashim Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 5 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 6 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 7 Yu B, He ZY, You P, Han QW, Xiang D, Chen F, *et al.* Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2013; 13(3): 328-40.
- 8 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines

- derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 9 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 10 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- 11 Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; 454(7200): 49-55.
- 12 Esteban MA, Bao X, Zhuang Q, Zhou T, Qin B, Pei D. The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(5): 423-8.
- 13 Wang G, Guo X, Hong W, Liu Q, Wei T, Lu C, *et al.* Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(8): 2858-63.
- 14 Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 64-77.
- 15 Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278(23): 21113-23.
- 16 Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 51-63.
- 17 Wang T, Chen K, Zeng X, Yang J, Wu Y, Shi X, *et al.* The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 575-87.
- 18 Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha A U, Zhu N, Bernt KM, *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 2012; 483(7391): 598-602.
- 19 Singhal N, Graumann J, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Han DW, Greber B, *et al.* Chromatin-remodeling components of the BAF complex facilitate reprogramming. *Cell* 2010; 141(6): 943-55.
- 20 Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128(4): 747-62.
- 21 Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* 2013; 14(6): 427-39.
- 22 Theunissen TW, Jaenisch R. Molecular control of induced pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014; 14(6): 720-34.
- 23 Plath K, Lowry WE. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 2011; 12(4): 253-65.
- 24 Fidalgo M, Faiola F, Pereira CF, Ding J, Saunders A, Gingold J, *et al.* Zfp281 mediates Nanog autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(40): 16202-7.
- 25 Luo M, Ling T, Xie W, Sun H, Zhou Y, Zhu Q, *et al.* NuRD blocks reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2013; 31(7): 1278-86.
- 26 Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, *et al.* Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013; 502(7469): 65-70.
- 27 Hu X, Zhang L, Mao SQ, Li Z, Chen J, Zhang RR, *et al.* Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(4): 1-11.
- 28 Gao Y, Chen J, Li K, Wu T, Huang B, Liu W, *et al.* Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4): 453-69.
- 29 Chen J, Gao Y, Huang H, Xu K, Chen X, Jiang Y, *et al.* The combination of Tet1 with Oct4 generates high-quality mouse-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2015; 33(3): 686-98.
- 30 Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- 31 Mu X, Yan S, Fu C, Wei A. The histone acetyltransferase MOF promotes induction of pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 2015; 17(4): 259-67.
- 32 Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-5.
- 33 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322(5903): 945-9.
- 34 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324(5928): 797-801.
- 35 Kim J, Kim KP, Lim KT, Lee SC, Yoon J, Song G, *et al.* Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Sci Rep* 2015; 5: 15706.
- 36 Simeonov KP, Uppal H. Direct reprogramming of human fibroblasts to hepatocyte-like cells by synthetic modified mRNAs. *PLoS One* 2014; 9(6): e100134.
- 37 Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, *et al.* Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(34): 14234-9.
- 38 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-9.
- 39 Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, *et al.* MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem* 2011; 286(19): 17359-64.
- 40 Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(6): 525-8.
- 41 Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, *et al.* Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cell* 2009; 27(12): 2992-3000.

- 42 Cao N, Huang Y, Zheng J, Spencer CI, Zhang Y, Fu JD, *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 2016; 352(6290): 1216-20.
- 43 Jiang H, Xu Z, Zhong P, Ren Y, Liang G, Schilling HA, *et al.* Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat Commun* 2015; 6: 10100.
- 44 Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013; 341(6146): 651-4.
- 45 Ye J, Ge J, Zhang X, Cheng L, Zhang Z, He S, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res* 2016; 26(1): 34-45.
- 46 Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 2014; 24(6): 665-79.
- 47 Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, *et al.* Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 204-12.

中国细胞生物学学报