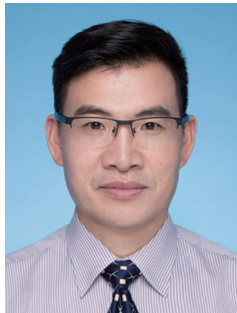




王译萱, 女, 同济大学生命科学与技术学院教授, 博士生导师, “青年百人计划”研究员, 上海市“扬帆计划”及“晨光计划”项目入选者。2006年本科毕业于北京大学生命科学学院, 2011年博士毕业于清华大学北京协和医学院/北京生命科学研究所, 致力于以人诱导多能干细胞(iPSC)技术为基础的体细胞重编程转化应用和干细胞多能性建立、维持的表观遗传机制研究, 在国际上首次建立基于iPSC技术及原态多能性诱导系统的 β -地中海贫血症基因治疗模型, 相关论文发表于*Cell Stem Cell*、*Science*、*Cell Research*、*Nature Communications*、*Elife*等国际知名期刊。



高绍荣, 同济大学生命科学与技术学院教授、院长, 国家杰出青年科学基金获得者、教育部“长江学者”特聘教授、中组部“万人计划”领军人才、国家基金委创新研究群体学术带头人、科技部“干细胞及转化研究”重点研发计划项目负责人。先后获得国家自然科学二等奖、“周光召基金会杰出青年基础科学奖”、“谈家桢生命科学创新奖”和“药明康德生命化学研究奖”等奖项。1993年获山东农业大学学士学位, 1996年获中国农业大学硕士学位, 2000年获中国科学院动物研究所博士。1998~2005年先后在美国、英国从事博士后研究。长期从事哺乳动物早期胚胎发育和体细胞重编程表观调控机制研究, 是国际上首次证明诱导多能干细胞即iPS细胞真正多能性的两个实验室之一。在包括*Nature*、*Science*、*Nature Genetics*、*Cell Stem Cell*、*Nature Cell Biology*等国际权威学术期刊上发表论文百余篇。

<http://life.tongji.edu.cn/gaolab/>

体细胞重编程机制研究进展

周建锋 郭明岳 王译萱* 高绍荣*

(同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 体细胞重编程是生命科学以及再生医学领域的研究热点之一, 目前包括体细胞核移植、细胞融合和转录因子诱导等几种方法都可以实现体外重编程。数量众多的表观遗传修饰在重编程过程中发挥着关键作用, 因此, 了解表观遗传修饰的动态变化以及各自的作用有助于更好地理解、优化以及运用重编程技术。该文简要阐述了体细胞核移植技术和诱导多能干细胞技术的发展历程和研究进展, 并讨论这两种重编程过程中的表观遗传调控机制。

关键词 细胞重编程; 表观遗传学; 体细胞核移植; 诱导多能干细胞

Research Progress on Somatic Cell Reprogramming Mechanism

Zhou Jianfeng, Guo Mingyue, Wang Yixuan*, Gao Shaorong*

(College of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

国家重点研发计划“干细胞及转化研究”(批准号: 2016YFA0100400)资助的课题

*通讯作者. Tel: 021-65982278, E-mail: wangyixuan@tongji.edu.cn; gaoshaorong@tongji.edu.cn

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2016YFA0100400)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-65982278, E-mail: wangyixuan@tongji.edu.cn; gaoshaorong@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-13 17:54:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1754.018.html>

Abstract Somatic cell reprogramming is one of the research focuses in life sciences and regenerative medicine fields. At present, several methods such as somatic cell nuclear transfer, cell fusion and transcription factor induction can achieve *in vitro* reprogramming. A large number of epigenetic modifications play a key role in the reprogramming process. Therefore, understanding the dynamic changes of epigenetic modifications and their respective roles helps to better comprehend and apply reprogramming techniques. This article briefly reviews the development history and research progress of somatic cell nuclear transfer technology and induced pluripotent stem cell technology, and discusses the epigenetic mechanisms existing in these two reprogramming processes.

Keywords cell reprogramming; epigenetics; somatic cell nuclear transfer; induced pluripotent stem cells

重编程是指将体细胞现有的分化记忆抹去,使之回到类似胚胎细胞的状态,重新获得全能性或者多能性的过程。重编程技术的发展克服了胚胎干细胞来源稀少、个体差异性大等缺陷,并避免了破坏胚胎带来的一系列伦理学争议,因而在疾病模拟、药物筛选、个体化治疗以及早期胚胎发育机制研究等方向具有更为广阔的应用前景,成为干细胞领域研究的热点。半个世纪以来,研究者们尝试多种技术手段使体细胞完成重编程,并取得了一系列突破性的进展。目前常用的体细胞重编程手段主要有三种:体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、诱导多能干细胞技术(induced pluripotent stem cells, iPSCs)和细胞融合技术(cell fusion)。其中,产生于19世纪60、70年代的细胞融合技术通过化学刺激或者电击手段,将体细胞与胚胎干细胞融合,从而获得多能性。然而,由于融合后产生的细胞为四倍体,往往难以应用于临床研究,这一技术并未得以推广。为此,本综述将重点介绍体细胞核移植技术和诱导多能干细胞技术的研究历史和研究进展,并讨论这两种重编程过程中发生的表观遗传机制。

1 体细胞核移植技术

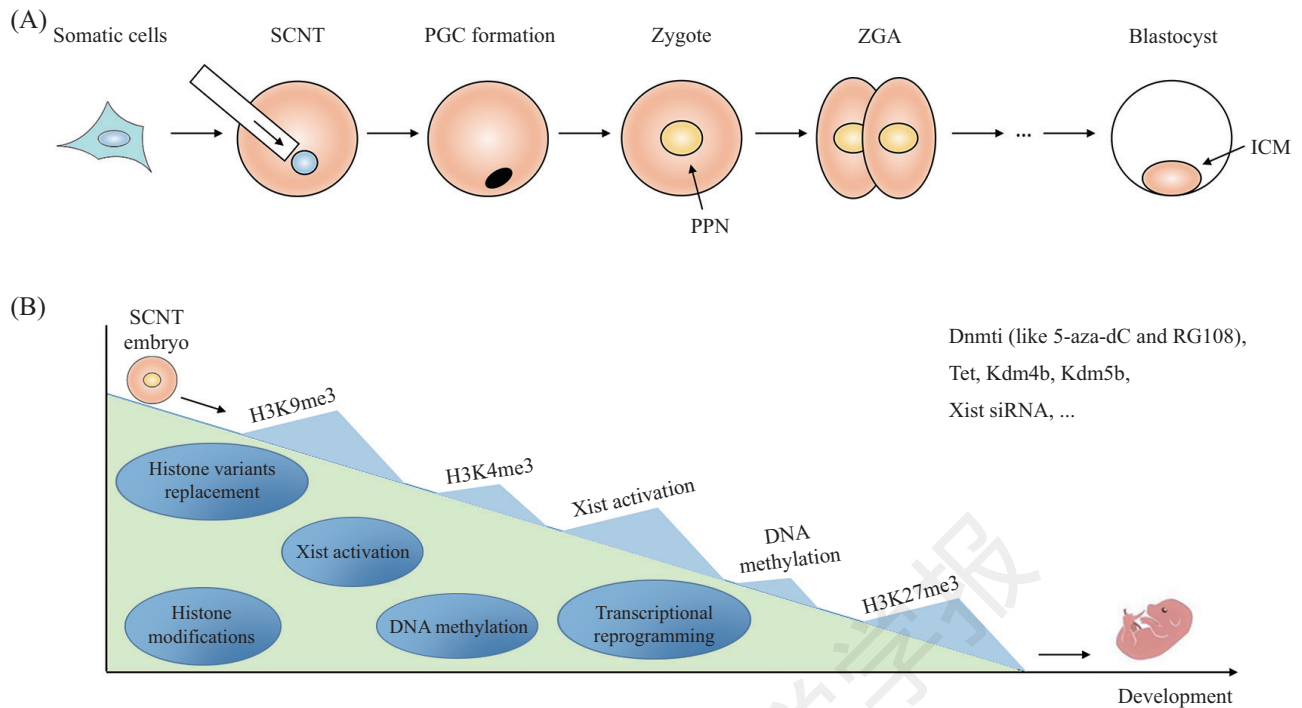
哺乳动物的精子与卵子在输卵管中结合形成受精卵,受精卵随后经过多次卵裂和细胞分化最终发育成具有成千上万种细胞类型的新个体,胚胎发育初期细胞发育为包括胚内和胚外组织在内的整个生物个体的能力被定义为全能性^[1]。虽然近期的研究证明,小鼠二细胞胚胎两个卵裂球的异质性直接决定了早期胚胎发育过程中的细胞命运^[2-3],但是早在1959年已经证明小鼠二细胞胚胎每个卵裂球都能够独立发育成完整的生物体^[4],而在四或八细胞时期,小鼠胚胎的卵裂球就已经丧失了这种能力^[5]。因此科学界普遍认为在正常的小鼠胚胎发育过程中

只有受精卵和二细胞胚胎是具有全能性的。受精后,卵母细胞能够将已分化的精子重编程,继而获得具有全能性的受精卵。

除了正常受精发育之外,因克隆(cloning)而被人们所熟知的体细胞核移植人工技术也可以实现细胞全能性的获得。20世纪60年代,诺贝尔生理学或医学奖得主John Gurdon^[6-7]通过SCNT技术获得正常发育形成蝌蚪和性成熟的成体克隆动物爪蛙(*Xenopus laevis*),首次证明分化的供体细胞可以在去核受精卵中重编程获得全能性,进而发育为克隆个体。1997年,英国科学家Wilmot^[8]将血清饥饿处理过的成年羊乳腺上皮细胞与去核的卵母细胞融合,获得了克隆动物明星“多莉”羊,首次证明克隆技术可以应用于哺乳类动物;2018年,得益于前期体细胞重编程机制的研究成果^[9-12],中国科学院神经科学研究所孙强与刘真^[13]利用食蟹猴胎儿皮肤成纤维细胞进行核移植,成功获得了两只健康的克隆猴个体,首次利用SCNT技术真正意义上实现了灵长类动物的克隆。在过去的二十多年,通过SCNT技术成功获得多种克隆哺乳动物^[8,13-26],但是,在SCNT技术的实际应用中仍然存在一些障碍,主要表现为几乎所有物种的克隆效率都很低、克隆胚胎的胚外组织发育异常^[27],以及克隆动物出生后出现免疫缺陷甚至早期死亡等异常^[27-28]。由于没有充分理解SCNT重编程过程中的障碍,哺乳动物的克隆效率一直没有得到有效提高。最近几年,测序技术的发明和推广使得研究SCNT重编程期间胚胎转录组和表观遗传组的变化成为了可能,逐渐完善的核移植胚胎发育机制为哺乳动物的克隆效率提升,包括克隆猴的出生提供了坚实有效的理论基础。体细胞核移植胚胎发育过程中的细胞及分子事件简要总结见图1。

1.1 SCNT胚胎的发育机制

SCNT技术的核心主要包括三部分,去除受体



A: SCNT重编程过程中的细胞事件; PGC: 原生殖细胞; PPN: 假原核; ZGA: 合子基因组激活; ICM: 内细胞团; B: SCNT重编程过程中的分子事件与主要的重编程障碍, 以及提高SCNT重编程效率的一些小分子化合物、RNA等。

A: cellular events during SCNT reprogramming; PGC: primordial germ cells; PPN: pseudo pronuclei; ZGA: zygotic genome activation; ICM: inner cell mass; B: molecular events and major reprogramming barriers in SCNT reprogramming, as well as some methods to improve SCNT reprogramming efficiency (adding small molecule inhibitors and RNA, etc.).

图1 体细胞核移植胚胎发育过程中的细胞和分子事件

Fig.1 Cellular and molecular events during somatic cell nuclear transfer embryo development

卵母细胞或受精卵的遗传物质, 注射供体细胞核或供体细胞与去核受体细胞融合, 以及重组胚胎的激活。

供体细胞核的核膜在进入去核卵母细胞后迅速破裂, 形成浓缩染色体, 这个过程被称为早熟染色体浓缩(premature chromosome condensation, PCC), 是由卵母细胞胞质中的M期促进因子(M-phase-promoting factors, MPFs)介导的^[29]。PCC过程是SCNT胚胎重编程必需的, 不经历PCC过程的SCNT胚胎会出现发育障碍^[30]。MPFs是卵母细胞中最重要的胞质影响因子, 其活性在卵母细胞减数分裂的MI期和MII期达到峰值。在SCNT受体细胞的选择上, 采用MII时期的卵母细胞比原核期的合子效果更好, 因为MII时期卵母细胞中高水平的MPFs可以有效介导供体细胞核发生PCC, 而原核期合子的MPFs活性因受精或胚胎激活已经开始快速下降^[31]。随着受精正常进行, 精子携带的磷脂酶CZ1(phospholipase C zeta 1, PLCZ1)通过引发卵母细胞胞质内的钙离子振荡, 同时伴随MPFs失活, 使卵母细胞活化并起始后续发育^[32]。由

于供体细胞中不存在PLCZ1, 激活小鼠SCNT重组胚胎最常用的方法是人工氯化铯处理, 即在胚胎培养基中加入氯化铯以模拟受精信号。

在正常受精的合子中, 来自精子和卵母细胞的两个核分别称为父本和母本原核, 原核的一个独有之处是体积较大。小鼠胚胎受精后6小时左右, 合子开始长达7个小时的DNA复制过程^[33]。哺乳动物合子形成初期, 卵母细胞和精子的转录都是沉默的, 随后合子基因组逐渐开始转录的过程称为合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA), 这一过程伴随着母源RNA的快速降解, 合子RNA被大量合成。小鼠的ZGA起始于一细胞胚胎的S期, 在二细胞时期达到顶点^[34-35]。在SCNT胚胎中, 供体细胞基因组在G₁期形成核膜进而形成假原核, 根据PCC染色体的随机分布情况, SCNT胚胎通常形成一个或两个假原核。与正常胚胎的原核一样, SCNT胚胎假原核的体积也比供体细胞核大得多^[36]。尽管SCNT胚胎的DNA复制及ZGA动态变化与正常胚胎相似, 但是每个SCNT胚胎起始DNA复制的时间是不一致的, 并

且SCNT胚胎中很多基因在ZGA期间不能被有效激活^[11,37]。近期的研究表明, SCNT胚胎相较于正常受精胚胎或体外受精(*in-vitro-fertilized*, IVF)胚胎, 在转录组、表观遗传组以及染色质结构方面都存在一些缺陷, 这些阻碍重编程的壁垒可能是长期以来限制哺乳动物克隆胚胎成功率的主要原因。

1.2 SCNT胚胎与转录组重编程

SCNT胚胎能否正常发育很大程度上取决于供体细胞转录组的充分重编程, 这些基因表达的变化主要影响到表观遗传的擦除与建立, 继而促进供体细胞相关基因的沉默和重组胚胎ZGA的成功发生。小鼠SCNT胚胎常常无法有效抑制伴随供体细胞而来的一些体细胞相关基因的表达^[38-40], 即存在残留的表观遗传记忆; 还有许多基因在二细胞时期的SCNT胚胎中不能被有效激活, 这些因素都阻碍着重组胚胎重编程的进行。之后的研究发现这些不能被有效沉默或激活的重编程抵抗区域(基因)与表观遗传修饰异常密切相关^[11,41-42]。我们课题组^[9]近期通过微量细胞测序技术对不同发育阶段的SCNT胚胎进行了详细的转录组分析, 发现其与正常发育的SCNT胚胎相比, 大量转录因子和表观遗传调控因子在发育阻滞的SCNT胚胎中没有被激活, 同时过表达表观遗传调控因子*Kdm4b*和*Kdm5b*可以有效提高SCNT胚胎的囊胚率以及克隆小鼠的出生率。这表明, 表观遗传的正确重编程也是提高SCNT胚胎成功率不能忽视的重要因素。

1.3 SCNT胚胎与DNA甲基化

一般认为, DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)主要包括两类: 依赖DNA复制并且受到Uhrf1蛋白招募、对于复制过程中子代DNA甲基化的维持至关重要的Dnmt1, 以及不依赖DNA复制可以在特定位点进行起始性从头(*de novo*)甲基化的Dnmt3a和Dnmt3b。最近我们课题组在与中国科学院生物物理研究所朱冰课题组^[43]合作研究卵子发生过程中DNA甲基化模式建立机制时, 首次在体内(*in vivo*)证实了Dnmt1也可以作为DNA起始性从头甲基转移酶。

供体细胞DNA甲基化状态的不完全重编程也是限制SCNT胚胎成功率的主要原因之一。在正常小鼠植入前胚胎发育过程中, DNA通过被动和主动去甲基化两种方式进行大量的去甲基化, 在囊胚时期DNA甲基化水平达到最低^[44-45]。DNA被动去甲基

化是指由于Dnmt1表达的缺失, 导致新合成的DNA不能被甲基化进而使得基因组DNA甲基化水平随着DNA复制和细胞分裂而降低; DNA主动去甲基化是指由DNA甲基氧化酶Tet1、Tet2或Tet3联合胸腺嘧啶DNA糖基化酶Tdg及DNA碱基修复途径共同作用, 去除DNA甲基化修饰^[46]。与正常胚胎相比, SCNT胚胎中的DNA甲基化存在异常^[47], 此外, 近期我们课题组^[37]发现, 在SCNT胚胎早期发育过程中还存在着异常的DNA再甲基化(DNA re-methylation)现象, 进一步分析揭示, DNA再甲基化是导致SCNT胚胎中合子基因和部分逆转座子不能被完全激活的关键原因。

在DNA甲基化方面, 抑制DNA甲基转移酶的活性以及利用DNA被动、主动去甲基化途径来降低SCNT胚胎中的DNA高甲基化水平, 是提高SCNT胚胎的成功率的两个途径。5-杂胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)和RG108是两种常见的Dnmt抑制剂, 使用5-aza-dC或RG108处理可以提高SCNT胚胎的囊胚率和多能性基因的表达^[48-50]。使用Dnmt1杂合敲除的小鼠胚胎成纤维细胞做供体, 可以显著提高得到SCNT胚胎干细胞的效率^[51]。我们课题组^[52]证明了小鼠受精卵中雌雄原核的重编程能力是不对称的, 重编程因子主要集中在雄原核内, 而IVF胚胎中DNA甲基氧化酶Tet3正是位于受精后的雄原核中, 可以帮助重编程因子实现去甲基化; 存在于SCNT胚胎假原核中的Tet3同样可以促进去甲基化^[53-54]。这都表明, Tet3介导的DNA去甲基化在SCNT胚胎的发育中发挥着重要作用。

1.4 SCNT胚胎与组蛋白修饰

SCNT是否成功还取决于供体细胞的组蛋白修饰模式能否重编程到受精卵的组蛋白修饰状态。通过免疫荧光染色发现, SCNT胚胎整体的组蛋白乙酰化和甲基化都与IVF胚胎存在着差异^[55]。最近几年, 少量细胞免疫共沉淀测序技术(ultra-low-input micrococcal nuclease-based native chromatin immunoprecipitation and sequencing, ULI-NChIP-seq)^[56]和CUT&RUN^[57]技术的开发及应用, 为描绘样品细胞数量较少的早期胚胎尤其是SCNT胚胎的组蛋白修饰图谱提供了技术支撑^[9,58-59]。

2014年, 哈佛大学张毅课题组^[11]提出供体细胞基因组的H3K9me3修饰是SCNT高效重编程的主要障碍, 并鉴定出重编程抵抗区域(reprogramming re-

sistance regions, RRRs)。体外表达H3K9me3去甲基化酶Kdm4d可以去除小鼠供体细胞中富集H3K9me3的RRRs, 显著提高了SCNT的效率; 此外, 使用抑制H3K9甲基转移酶活性的供体细胞核也可以显著提高SCNT的效率。我们课题组^[9]通过建立小鼠早期SCNT胚胎命运追溯系统, 发现内源H3K9me3去甲基化酶相关基因*Kdm4b*的表达与SCNT胚胎的发育潜能密切相关, 进一步验证了H3K9me3是SCNT胚胎重编程的一个主要障碍。最近的研究同样表明, H3K9me3去甲基化酶Kdm4d与Kdm4e在牛的SCNT胚胎重编程中也至关重要^[60]。除了H3K9me3修饰, 我们还发现, H3K4me3也是SCNT胚胎重编程的一个障碍, H3K4me3去甲基化酶Kdm5b的表达水平对于小鼠SCNT胚胎顺利渡过4细胞时期至关重要^[9]。在非洲爪蟾的SCNT胚胎中也得到了类似的结果^[42], 进一步证实, H3K4me3也会阻碍重编程的发生。

近期, 张毅课题组^[61]发现一种与H3K27me3修饰相关的基因组印记机制。H3K27me3广泛分布于母源基因组, 在小鼠植入前胚胎中, 它会抑制多个母源等位基因的表达。但在SCNT胚胎的囊胚期, 所有检测到的H3K27me3依赖的印记基因基本都失去这种修饰印记, 表现为双等位基因异常表达^[62], 这种印记丢失被认为是供体细胞中H3K27me3修饰的缺失导致。由于H3K27me3抑制的部分印记基因对于植入后胚胎发育具有重要的作用, 这些基因印记的丢失可能导致小鼠SCNT植入后胚胎的发育阻滞^[62]。H3K27me3修饰在IVF植入前胚胎的基因启动子区域是缺失的^[63], 但能发育到桑葚胚的SCNT胚胎的启动子区域也是如此^[61]。这些研究证明了H3K27me3修饰对印记基因的调控显著影响了SCNT重编程过程。

1.5 SCNT胚胎与组蛋白变体

除了几种常见的组蛋白, 一些组蛋白变体也可以参与核小体的形成, 大大增加了核小体乃至染色体结构的多样性和复杂性。这些组蛋白变体与经典组蛋白相比, 具有一个或几个氨基酸差异; 它们的表达水平相对较低, 主要通过改变核小体的构象来行使不同的生物学功能。在生殖细胞生成以及受精过程中可以观察到非经典组蛋白变体大量替代经典组蛋白, 这与细胞重编程、细胞命运改变等密切相关。

正常胚胎受精后, 被鱼精蛋白包装的精子基因组发生染色质重塑, 一些母源组蛋白变体参与了精子基因组的重新包装, 例如H3.3、H2AFX^[64-66]。在

SCNT胚胎中, 同样也发现了类似的供体细胞组蛋白被母源储存的组蛋白快速替换的情况。供体细胞来源的组蛋白H3变体以及H2A和H2A.Z, 在SCNT胚胎的染色质中被快速消除; 伴随这种去除, 卵母细胞中储存的组蛋白H3变体和H2A.X掺入到SCNT胚胎的细胞核中^[67]。组蛋白变体macroH2A在SCNT胚胎中从供体细胞核中被快速去除^[68], 体细胞中的经典连接组蛋白H1也被卵母细胞特异性组蛋白变体H1FOO全部替换^[69]。在SCNT之前敲降组蛋白变体H3.3会影响多能性基因的激活以及SCNT胚胎的后续发育^[70-71]。这些研究表明, 卵母细胞储存的组蛋白替代供体细胞组蛋白在SCNT胚胎的基因组重塑中发挥着关键作用, 对于SCNT成功重编程至关重要。阐明这些组蛋白变体在基因组的分布以及在SCNT胚胎中的功能有助于我们更好地理解SCNT重编程过程。

1.6 SCNT胚胎与Xist激活

SCNT胚胎与X染色体失活之间也存在着紧密的联系, 许多X染色体连锁基因在SCNT胚胎中被特异性地抑制, 且与性别无关^[72]。在正常胚胎中, X染色体失活是一种雌性特异的剂量补偿机制, 通常以印记形式出现在植入前胚胎和胚外组织的父源X染色体上, 但是在胚胎外胚层细胞中却是随机出现的^[73]。X染色体失活是由X染色体连锁的父源等位基因非编码RNA Xist控制的, Xist覆盖整条X染色体并介导建立抑制性组蛋白修饰H3K27me3, 进而使得整条X染色体异染色质化^[74-75]。母源X染色体则不会发生类似的情况, 从而使得在雌性(XX)和雄性(XY)细胞中X连锁基因的表达剂量相近。在一些发育异常的SCNT胚胎中观察到Xist的异常活化, 母源和父源两条X染色体都发生沉默, 这可能是影响SCNT胚胎正常发育的重要原因。使用杂合敲除Xist的供体细胞进行SCNT可以克服这种异常的X染色体失活, 使得SCNT克隆胚胎的出生率提高了8~9倍^[72]。在1细胞时期的雄性SCNT胚胎中敲降Xist基因也可以大大提高SCNT胚胎的发育率^[76]。这些研究也为进一步提高SCNT重编程效率提供了新的思路。

2 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术介导的重编程

SCNT技术和细胞融合技术可以使得分化的细胞重编程获得发育全能性^[7,77-78], 这提示我们, 卵母

细胞和多能性细胞中存在着重要的细胞因子,在诱导体细胞获得多能性甚至全能性的过程中起到重要的作用。2006年,日本京都大学的Takahashi和Yamanaka^[79]筛选出24个与干细胞或多能性相关的转录因子,成功诱导体细胞重编程到多能性状态。通过排除法,他们从24个因子中找到了最为重要的4个因子OSKM: Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc。利用这4个经典的Yamanaka因子可以将小鼠胚胎成纤维细胞或成年小鼠成纤维细胞诱导为具有干细胞性质的多能性iPS细胞,同样也可以获得人的iPS细胞^[80-81]。iPS细胞在形态、增殖能力、多能性基因表达、表观遗传修饰状态、类胚体和畸胎瘤生成能力以及分化潜能方面都与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)相似。2009年,我们课题组^[82]和中国科学院动物研究所周琪院士课题组^[83]分别通过四倍体囊胚互补实验得到了完全由iPS细胞发育而来的小鼠,证明了iPS细胞的完全多能性。iPS细胞技术的建立,打破了干细胞研究领域对胚胎来源干细胞的依赖,为病人特异性干细胞的诱导和再生医学研究提供了重要的理论支持和技术保障。

虽然经典的OSKM诱导体系可以得到具有嵌合能力的iPS细胞,并且可以通过生殖系传递。但是在这种经典的诱导体系中,约有20%的嵌合体小鼠发生了肿瘤,这与外源整合的诱导因子c-Myc在iPS细胞中仍然表达有一定的关系^[84]。原癌基因c-Myc的异常表达可能导致肿瘤、逆转录病毒的使用和iPS细胞诱导效率低等因素都给iPS细胞的临床应用中带来了巨大的障碍。因此近些年来,围绕着诱导因子替换、使用非整合载体和添加化学小分子替代诱导因子等方面,开发出多种iPS细胞诱导体系,有效提高了iPS细胞的质量和诱导效率,尤其是成分明确不含血清诱导培养体系的使用,更为iPS细胞重编程机制的研究提供了基本前提。

2.1 经典的iPS细胞诱导体系及机制

Yamanaka四因子OSKM在iPS细胞重编程中的作用机制从各个角度得到了充分的研究和解释。在重编程初期,外源OSKM在基因组中有很多潜在的结合位点,但是在起始诱导的体细胞中,多能性转录因子的结合位点被包装在核小体中,并且有抑制型复合物和组蛋白修饰以及高级染色质结构保护^[85]。为了克服这些障碍,OSK可以作为先驱因子与核小体封闭位点结合^[86-87]。我们在研究Oct4在重编程中

决定细胞命运转变的机制时发现,Oct4在基因组上的结合对于重编程过程中多能性网络的有序激活具有重要作用,但是Oct4的结合受到基因组上原有表观遗传修饰的影响^[88],这表明,转录因子和表观遗传修饰相互关联和互作,共同调控重编程的进程。近期的研究也验证了我们的结论,OSK除了可以直接结合在多能性相关区域对染色质的可接近性进行重编程^[89-90],也可以直接结合在活跃的体细胞增强子区域,通过招募组蛋白去乙酰化酶HDAC1抑制体细胞相关转录因子的活性^[91],还可以通过激活Sap30的表达间接关闭体细胞相关基因区域促进iPS细胞的重编程^[89]。Sap30可以招募组蛋白去乙酰化酶来降低体细胞关键基因区域H3K27ac的修饰水平,重编程过程中缺少Sap30将导致H3K27ac的异常升高,从而导致体细胞相关基因的持续表达和iPS细胞重编程的失败。早期的研究表明,OSK更倾向于结合在增强子区域^[92-93],成功的重编程过程中体细胞相关基因增强子的失活与多能性相关基因增强子的激活是由OSK与诱导阶段特异性转录因子相互协作共同完成的^[90-91]。c-Myc主要结合在启动子区域^[87,94],在重编程的早期阶段发挥促进细胞存活和增殖的作用^[95]。c-Myc与OSK在基因组结合区域附近的DNA存在着相互作用^[86],这表明,c-Myc本身不具有先驱因子的活性,可能在经典的诱导体系中是不重要的。事实上在不含Myc的诱导体系下,也可以将小鼠或人的成纤维细胞重编程为形态更加单一的iPS细胞,但诱导周期增长,诱导效率降低^[96-97]。成纤维细胞是间充质细胞,ES细胞是上皮样细胞,在iPS细胞诱导过程中发生的间充质细胞向上皮细胞转变(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)是重要的重编程事件^[98]。OSKM直接参与了MET过程,OSM三因子分别可以通过抑制TGF- β 的信号传导进而抑制上皮向间充质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要调节因子Snail的表达^[99],Klf4可以直接激活上皮细胞相关基因*Cdh1*的表达^[98]。

2.2 iPS细胞诱导因子替代体系及机制

为了避免c-Myc在iPS细胞中被激活带来致癌风险,Myc家族的成员L-Myc和N-Myc可以有效代替c-Myc诱导获得人和小鼠的iPS细胞,其中L-Myc可以提高iPS细胞形成具有生殖系传递嵌合小鼠的能力,并且所得到的小鼠没有出现肿瘤^[100]。多能性相关因子Glis1也可以替代c-Myc促进人和小鼠的iPS

细胞重编程, 所得到的小鼠iPS细胞生成的嵌合体也具有生殖系传递的能力。Glis1通过影响多种重编程途径来促进iPS细胞的诱导, 包括促进基因*Myc*、*Nanog*、*Lin28*、*Wnt*、*Esrrb*的表达和MET过程^[101]。

Klf4除了可以被Klf1、Klf2和Klf5替代^[22], 还可以被孤核受体*Esrrb*替代和OS两因子一起实现iPS细胞的诱导, *Esrrb*通过上调多能细胞特异性基因来介导重编程^[102]。骨形成蛋白*Bmp4*也可以替代Klf4促进重编程, 其作用机制主要是促进MET过程^[103]。*Nanog*和*Lin28*可以替代*c-Myc*和Klf4获得人的iPS细胞^[104], *Nanog*是维持小鼠胚胎干细胞多能性的重要因子之一, 与*Oct4*和*Sox2*等转录因子协同调节多能性网络, RNA结合蛋白*Lin28*可以间接调节*c-Myc*的表达来完成重编程。

同样*Sox2*可以被*Sox*家族的*Sox1*、*Sox3*、*Sox15*和*Sox18*替代^[97]。我们课题组^[105]早期的研究证明, *Rcor2*在小鼠和人的iPS细胞诱导中可以有效地取代外源*Sox2*, 最近我们又发现, 卵源因子*Obox1*可以替代*Sox2*获得iPS细胞。*Obox1*可以调节细胞周期相关基因的表达, 减缓重编程细胞的过度增殖, 促进MET过程来促进体细胞重编程^[106]。外胚层细胞谱系特化因子GMNN也可以替换*Sox2*得到人的iPS细胞^[107]。卵母细胞中大量表达的组蛋白变体TH2A和TH2B可以替代*Sox2*和*c-Myc*来促进iPS细胞的重编程, 其机制是在X染色体上富集来抑制X染色体失活^[108]。

孤核受体*Nr5a1*和*Nr5a2*分别可以替代*Oct4*进行iPS细胞的诱导, 其机制是激活内源*Oct4*的表达^[109]。*Oct4*也可以被上皮细胞的主要调节因子钙黏蛋白*E-cadherin*替代, 过表达*E-cadherin*会影响*β-catenin*的核定位, 进而促进多能性基因的表达^[110]。在人的iPS细胞诱导中, 多能性相关因子TCL-1A可以替代*Oct4*仅和OM两因子完成人成纤维细胞的重编程, 所得到的iPS细胞在形态和转录组上都与人的ES细胞相似, 并且具有分化为三胚层的能力^[111]。转录因子*Bm4*因具有同源POU结构域也可以替代*Oct4*^[112]。北京大学邓宏魁教授课题组^[107]在研究iPS细胞重编程的机制时创新性的提出了“跷跷板”平衡模型, 该模型认为iPS细胞重编程是一个各分化谱系相互拮抗、相互竞争最终达到平衡而获得多能性的过程。他们研究发现, *GATA6*、*Sox7*、*PAX1*、*GATA4*、*CEBPa*、*HNF4a*和*GRB2*等促进细胞向中内胚层(mesendodermal, ME)分化的特化基因可以通过拮抗*Sox2*引起的外胚层

(ectodermal, ECT)细胞谱系特化基因, 从而取代*Oct4*完成重编程; 同样他们也发现, ECT特化基因GMNN可以通过拮抗由*Oct4*引起的ME基因而取代*Sox2*完成重编程; 甚至同时使用ME和ECT细胞谱系特异基因可以完全替代核心诱导因子*Oct4*和*Sox2*通过拮抗平衡完成体细胞重编程, 如四因子*GATA6*、GMNN、Klf4和*c-Myc*组成的诱导体系^[107]。我们课题组^[113]发现, *Tet1*可以通过促进内源*Oct4*去甲基化和再活化从而替代*Oct4*进行体细胞重编程, 并且我们获得的iPS细胞能够高效地形成四倍体囊胚互补小鼠。

后来我们又发现, *Tet1*也可以在体细胞重编程中替代其他转录因子, 仅使用*Oct4*和*Tet1*两个转录因子就可以产生具有高质量的iPS细胞, 四倍体囊胚互补实验得到的iPS小鼠没有发生肿瘤, 并且具有正常的寿命^[114]。*Tet1*能够把5-甲基化胞嘧啶氧化为5-羟甲基化胞嘧啶, 从而使起始体细胞的DNA主动去甲基化, 这也表明, 重编程过程中DNA甲基化和羟甲基化的变化在全基因组景观遗传重塑中起着重要作用。事实上, 单独和*Oct4*组成两因子诱导体系的还有组蛋白去甲基化酶*Jhdm1b*和原癌基因*Bmi1*, *Jhdm1b*可以在重编程过程中抑制细胞衰老并与*Oct4*共同作用激活多能性相关的microRNA302/367的表达^[115], *Bmi1*可以提高*Sox2*和*N-Myc*的表达从而诱导体细胞到达iPS细胞的中间状态^[116]。融合了病毒反式激活结构域VP16的*Oct4*单独即可完成iPS细胞的重编程, 这是由于VP16可以通过招募转录因子和组蛋白乙酰转移酶强烈激活内源多能性基因的表达^[117]。

随着各诱导因子在iPS细胞诱导过程中的作用机制逐渐被阐述, 经典OSKM四因子被完全替代的诱导体系也逐渐出现。研究表明, *Sox2*可以启动多能性基因的表达, 包括*Sall4*、*Esrrb*和*Lin28*等, 其中*Sall4*又可以激活包括*Oct4*在内的其他多能性基因。因此两种完全替代OSKM的诱导体系被报道: *Sall4*、*Esrrb*、*Lin28*和*Dppa2*或*Nanog*组成的四因子可以完成iPS细胞的诱导^[118]。但是这两种体系的诱导效率较低, 裴端卿教授课题组^[119]筛选的完全替代OSKM的六因子诱导体系包括*Glis1*、*Sall4*、*Lrh1*、*Jdp2*、*Jhdm1b*、*Id1*, 可以较为高效地获得iPS细胞。其中的核心因子是*Jdp2*, *Jdp2*是体细胞转录因子*c-Jun*的拮抗因子。

2.3 iPS细胞的化学诱导体系及机制

由于外源重编程因子容易整合在细胞基因组中, 并且多种重编程因子参与了癌症相关信号通路

的调控,因此最大限度地减少诱导体系转录因子的数量是提高iPS细胞生物安全性的第一步。使用小分子化合物代替重编程因子是提高iPS细胞安全性、优化iPS细胞技术的研究方向之一。完全使用化学小分子诱导体系的建立揭示了更多与诱导多能性相关的信号通路和表观遗传机制。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACi)丙戊酸(valproic acid, VPA)能够有效地替代c-Myc完成小鼠成纤维细胞的重编程^[120],甚至可以替代c-Myc和Klf4完成人成纤维细胞的重编程^[121]。维生素C最初被发现可以替代c-Myc提高小鼠和人iPS细胞的诱导效率,主要通过降低基因*p53*和*p21*的表达促进DNA的去甲基化以及MET过程而发挥作用^[122]。维生素C可以和组蛋白去甲基化酶Jhdm1a替代Klf4、c-Myc以及Jhdm1b替代Sox2、Klf4、c-Myc进行重编程^[115]。GSK3-β和CDK的抑制剂KP(kenpaullone)可以替代Klf4进行iPS细胞的诱导^[123],但是这种诱导体系没有被其他GSK3-β和CDK的抑制剂重复,其机制还不明确。抑制TGF-β信号传导能够激活内源性*Nanog*的表达从而替代Sox2和c-Myc^[124-125],由于TGF-β的激活在ME分化过程中发挥着重要作用,抑制TGF-β可以代替Sox2的诱导体系也支持了iPS细胞重编程的“跷跷板”模型^[107]。组蛋白甲基转移酶抑制剂BIX01294和钙通道激动剂BayK8644也可以有效地替代Sox2^[126]。

虽然前期报道了很多种化学小分子代替转录因子进行诱导的体系,但是筛选小分子化合物代替Oct4的研究一直没有取得进展。使用TGF-β抑制剂、HDAC抑制剂、MEK抑制剂和磷酸肌醇依赖性激酶PDK1a的小分子组合体系,可以和单个转录因子Oct4实现人的iPS细胞诱导^[127]。北京大学邓宏魁教授课题组^[128]使用VPA、GSK3-β抑制剂CHIR99021(C)、TGF-β抑制剂E-616452(6)和H3K4去甲基化酶抑制剂反苯环丙胺(tranylcypromine, T) 4种小分子组合VC6T能够在单个转录因子Oct4的参与下诱导出小鼠的iPS细胞。随后该课题组使用SKM三因子整合的小鼠成纤维细胞筛选能够替代Oct4的小分子化合物,最后发现cAMP激动剂毛喉素(forskolin, F)可以和VC6T诱导产生克隆样细胞并且诱导MET标志物钙黏蛋白E-cadherin的表达,但是内源*Oct4*和*Nanog*的启动子区依然维持着高甲基化水平,随后他们又筛选到表观遗传调节因子DZNep(Z)可以显著提高

无Oct4因子的VC6TF诱导体系的效率,最终他们的完全化学小分子体系VC6TFZ得到的化学诱导iPS细胞(chemically induced pluripotent stem cell, CiPS细胞)在转录组表达模式与ES细胞以及OSKM转录因子诱导的iPS细胞类似,并且可以较高效率地产生嵌合体小鼠。后来他们发现, C6FZ四个小分子化合物即可获得CiPS细胞,但是效率较低^[129]。C6F三个小分子能够激活*Sall4*和*Sox2*的表达, DZNep能激活*Oct4*的表达从而使体细胞发生重编程。这种完全化学小分子的诱导体系存在着诱导效率低、诱导周期长和CiPS细胞多能性较差等缺点,并且没有获得人的CiPS细胞。

邓宏魁教授团队^[130]通过对CiPS细胞化学诱导过程的进一步研究发现, CiPS细胞克隆几乎全部来自诱导前期产生的上皮样细胞克隆,这些上皮样细胞表达胚外内胚层(extra-embryonic endoderm, XEN)相关基因,使用视黄酸配体激动剂AM580和H3K79甲基转移酶Dold1抑制剂EPZ004777或SGC0946可以显著增加XEN样细胞的产生,从而提高CiPS细胞的诱导效率,缩短诱导周期。最近他们通过单细胞测序技术对整个化学诱导重编程过程进行了详细的分析,发现CiPS诱导过程中的细胞从XEN样状态到二细胞胚胎样状态的转变过程是化学重编程的关键,主要包括早期胚胎多能性相关转录组特征和全基因组DNA去甲基化表观遗传特征的转变。VPA可以激活很多二细胞胚胎相关基因的表达,通过调整化学分子VPA的处理方法可以促进二细胞胚胎样细胞的诱导来加速化学重编程过程,诱导时间缩短一半,新的系统可以在20天内获得稳定的CiPS细胞^[131]。裴端卿教授课题^[132]也对化学诱导体系做出了优化,他们采用化学成分确定的无血清诱导培养基 iCD1,在VC6FZ之外还添加了之前报道过的可以显著促进iPS细胞诱导的化学小分子维生素C、Bmp4、BrdU、AM580和可以促进MET过程的Dold1抑制剂EPZ5676及SGC0946。由这11种小分子化合物组成的化学诱导体系也可以缩短CiPS的诱导周期并获得较高质量的CiPS细胞。他们利用ATAC(assay for transposase-accessible chromatin)测序技术发现, BrdU是此化学诱导体系下正常染色质动态变化的关键因子, BrdU可以促进体细胞相关基因API家族作用染色质区域的关闭以及多能性相关基因染色质区域的开放。

邓宏魁教授课题组^[133]在筛选诱导多能性相关化学小分子的过程中发现, 当使用白介素抑制因子LIF、GSK3- β 抑制剂CHIR99021、G蛋白偶联受体抑制剂DiM和核糖转移酶PARP1的抑制剂MiH四种化学小分子培养小鼠或人的成纤维细胞、ES细胞甚至胚胎时都可以得到一种新的多潜能干细胞称为EPS细胞(extended pluripotent stem cells), 嵌合体实验证明, EPS细胞不仅可以嵌合到胚胎, 还可以嵌合到胚外组织胎盘和卵黄囊中, 四倍体囊胚互补实验证明, 所得到的嵌合体小鼠具有生殖系传递的能力。人的EPS细胞可以嵌合到小鼠胚胎的胚内和胚外组织中, 但是其嵌合能力低于小鼠的EPS细胞。LIF可以激活JAK/STAT信号通路进而维持干细胞的自我更新能力, 抑制GSK3- β 可以降低维持多能性重要蛋白 β -catenin的降解。使用其他G蛋白偶联受体的抑制剂替代DiM以及使用其他PARP1的抑制剂替代MiH均可以得到具有胚内和胚外嵌合能力的小鼠或人的EPS细胞, 这表明抑制上述两个信号通路在维持EPS细胞的类全能性中发挥着重要作用。

香港大学刘澎涛教授课题组^[134]筛选到的小分子化合物组合也可以将小鼠胚胎干细胞、iPS细胞或单个八细胞期胚胎卵裂球诱导为具有嵌合到胚胎和胚外能力的EPS细胞。他们的诱导体系包括白血病抑制因子LIF和六种信号通路小分子抑制剂: MEK抑制剂PD0325901、GSK3- β 抑制剂CHIR99021、JNK抑制剂VIII、p38抑制剂SB203580、Src激酶抑制剂A-419259和Tnks1/2抑制剂XAV939。这表明, MAPK、Src和Wnt等信号通路在EPS细胞的诱导中也至关重要。

虽然上述两个课题组分别报道的诱导体系得到的小鼠EPS细胞都能产生胚胎干细胞系和滋养层干细胞系, 但我们分析两种不同条件下的EPS细胞数据发现其在全基因转录组方面并不相同, 这表明使用不同化学小分子组合诱导重编程获得类全能性EPS细胞具有着不同的潜在机制。

2.4 iPS细胞与信号通路

多种iPS细胞诱导体系共同证明, 一些重要细胞信号通路的激活或抑制可以促进体细胞重编程获得高质量的iPS细胞。

激活Wnt信号通路可以促进iPS细胞的诱导。使用Wnt3a激活Wnt信号通路可以使多能性基因*Oct4*和*Nanog*启动子区域去甲基化^[135], 显著提高

OSK三因子iPS细胞诱导体系的效率^[136]。激活Wnt信号通路可以抑制GSK3- β 蛋白对 β -catenin的磷酸化作用, β -catenin蛋白入核激活多能性相关基因的表达从而促进体细胞重编程^[137]。但在人的EPS细胞诱导过程中, 添加Wnt信号通路的抑制剂IWR-1-endo可以抑制EPS细胞的分化^[133]。

抑制MAPK和GSK3信号通路可以促进iPS细胞的诱导。使用MAPK的激酶MEK的抑制剂PD0325901^[127]或GSK3- β 的抑制剂CHIR99021^[128-129,132]都可以显著促进iPS的诱导。同时使用这两个抑制剂(2i)时, 能够有效提高iPS细胞诱导的同步性, 抑制iPS细胞分化^[138], 并且能促进iPS细胞的增殖以及促进中间诱导产物最终形成iPS细胞^[129-130,132], 因此2i常用于干细胞的体外培养体系^[139], 虽然最近的报道称, 长时间2i条件的培养会使小鼠ES细胞发生不可逆的表观遗传修饰变化, 损害小鼠ES细胞的发育潜能^[140-141]。

抑制TGF- β 信号通路可以促进iPS细胞的诱导。TGF- β 蛋白在细胞分化和细胞凋亡中起着重要的调控作用, TGF- β 的抑制剂可以替代Sox2进行iPS细胞的诱导^[124-125,127-129,132]。使用TGF- β 的抑制剂SB431542和MEK的抑制剂PD032590可以显著提高人iPS细胞的诱导效率^[142]。

抑制p53信号通路可以促进iPS细胞的诱导。原癌基因*c-Myc*在iPS细胞诱导过程中会激活p53信号通路, 从而使细胞发生老化和凋亡。因此降低p53或其靶基因*p21*的表达水平可以提高iPS细胞的诱导效率, 降低p53蛋白水平仅用Oct4和Sox2便可获高质量的iPS细胞^[143]。维生素C提高iPS细胞诱导效率的机制之一便是降低了p53和p21的表达^[122]。

2.5 iPS细胞诱导与表观遗传

使用转录因子进行iPS细胞的诱导效率较低, 如果添加与表观遗传调控相关的因子或化学小分子则可以大大提高重编程的效率。这表明, 体细胞原有的表观遗传修饰模式是重编程获得多能性的障碍。了解iPS细胞诱导过程中的表观遗传调控机制将有助于我们获得更高质量的iPS细胞。

多能性相关基因启动子区域DNA的不完全去甲基化是iPS细胞诱导的障碍之一^[144]。Nanog调控干细胞多能性网络的作用依赖于DNA羟甲基化酶Tet1^[145]。我们课题组^[113]发现敲降Tet1严重影响iPS细胞的诱导, 过表达Tet1可以促进*Oct4*的去甲基化和激活, 进而显著促进iPS细胞的诱导; 同样Tet2也

可以在iPS细胞诱导的早期参与DNA去甲基化, 激活多能性基因的表达^[146]。Tet1、Tet2、Tet3和Tdg基因敲除的小鼠成纤维细胞无法启动MET过程, 这是由于Tet或Tdg的缺失影响了miR-200b、miR-200c、miR-429等microRNA基因家族启动子区的去甲基化, 导致细胞无法发生MET进而阻碍了细胞重编程^[147]。而Dnmt抑制剂5-aza-dC可以在iPS细胞诱导的后期促进重编程^[148]。

使用HDAC抑制剂如VPA不仅能显著提高重编程效率, 而且还可以替代转录因子进行iPS细胞的诱导^[120-121,127-129]。印记基因Dlk1-Dio3(D-D)区域的失活是直接导致iPS细胞不能形成四倍体囊胚互补小鼠的表观缺陷之一, 使用HDAC抑制剂可以有效防止该区域H3K27ac的丢失以提高iPS细胞的质量^[149]。

与SCNT重编程过程一样, H3K9甲基化也是iPS细胞完全重编程的障碍之一^[10], 添加组蛋白甲基转移酶抑制剂可以提高iPS细胞的诱导效率^[126], 组蛋

白去甲基化酶可以替代转录因子进行iPS细胞的诱导^[105,115,119]。在重编程过程中下调H3K9甲基转移酶Suv39h1和H3K79甲基转移酶Dot11的活性可以显著提高iPS细胞的诱导效率, 在重编程早期抑制Dot11可以提高替代诱导因子Nanog和Lin28的表达^[150]。调节重编程过程中的组蛋白甲基化修饰是维生素C提高iPS细胞诱导效率的另一条机制。诱导过程中添加维生素C, 一方面可以保护D-D区域的H3K4me2修饰以及建立H3K4me3新修饰^[151]; 另一方面激活组蛋白去甲基化酶Jhdm1a(Kdm2a)和Jhdm1b(Kdm2b)去除重编程障碍H3K36me2修饰^[115], 以及激活组蛋白去甲基化酶Kdm3和Kdm4去除H3K9me3这一关键的表观遗传障碍, 从而促进不完全重编程的pre-iPS细胞高效地转化为成熟的iPS细胞^[10]。iPS细胞诱导体系简要总结见表1。

3 讨论

SCNT和iPS细胞都可以通过重编程来改变细胞

表1 iPSCs诱导体系
Table 1 iPSCs induction system

重编程因子 Reprogramming factors	机制 Mechanisms	物种 Species	参考文献 References
O, S, K, M	Directly involved in the MET (mesenchymal-to-epithelial transition) transformation process, c-Myc enhances the efficiency of iPSCs generation	Mu, H	Takahashi, <i>et al.</i> , 2006 ^[79] Lowry, <i>et al.</i> , 2008 ^[81]
O, S, K	Directly involved in the MET process	Mu, H	Wernig, <i>et al.</i> , 2008 ^[96] Nakagawa, <i>et al.</i> , 2008 ^[97]
O, S, K1/K2/K5, M	Same as above	Mu, H	Nakagawa, <i>et al.</i> , 2008 ^[97]
O, S1/S3/S15/S18, K, M	Same as above	Mu, H	Nakagawa, <i>et al.</i> , 2008 ^[97]
O, S, K, Glis1	Glis1 promotes multiple pro-reprogramming pathways, including <i>Myc</i> , <i>Nanog</i> , <i>Lin28</i> , <i>Wnt</i> , <i>Esrrb</i> and the MET, thus effectively promotes the direct reprogramming of somatic cells during iPSCs generation	Mu, H	Maekawa, <i>et al.</i> , 2011 ^[101]
O, S, Esrrb	Esrrb mediate reprogramming through the upregulation of ES-cell-specific genes	Mu	Feng, <i>et al.</i> , 2009 ^[102]
O, S, Bmp4	Bmp4 promotes the MET process.	Mu	Chen, <i>et al.</i> , 2011 ^[103]
O, S, Nanog, Lin28	Nanog cooperates with transcription factors such as Oct4 and Sox2 to regulate the pluripotency network. Lin28 can indirectly regulate the expression of <i>c-Myc</i> to complete reprogramming	H	Yu, <i>et al.</i> , 2007 ^[104]
O, Rcor2, K, M	Rcor2 can effectively replace exogenous Sox2 in mouse and human iPSCs induction	Mu, H	Yang, <i>et al.</i> , 2011 ^[105]
O, Obox1, K, M	Obox1 regulates cell cycle-related gene expression, slows over-proliferation of reprogrammed cells, and promotes MET transformation to promote somatic cell reprogramming	Mu	Wu, <i>et al.</i> , 2017 ^[106]
O, Gmnn, K, M	Sox2 can be replaced by lineage specifiers Gmnn which involved in ECT lineage specification	Mu	Shu, <i>et al.</i> , 2013 ^[107]

(续表1)

重编程因子 Reprogramming factors	机制 Mechanisms	物种 Species	参考文献 References
ME, S, K, M	Specialized genes that promote the differentiation of cells into ME can replace Oct4 by antagonizing Sox2-induced ECT cell lineage specialization genes	Mu	Shu, <i>et al.</i> , 2013 ^[107]
ME, ECT, K, M	Simultaneous use of ME and ECT cell lineage-specific genes can completely replace Oct4 and Sox2 to complete somatic cell reprogramming through antagonistic balance	Mu	Shu, <i>et al.</i> , 2013 ^[107]
O, K, TH2A, TH2B	TH2A/TH2B contribute to the reprogramming of somatic cells by inducing transcriptionally active open chromatin	Mu	Shinagawa, <i>et al.</i> , 2014 ^[108]
Nr5a1, S, K, M	Nr5a1 can activate the expression of endogenous <i>Oct4</i>	Mu	Heng, <i>et al.</i> , 2010 ^[109]
Nr5a2, S, K,	Nr5a2 can activate the expression of endogenous <i>Oct4</i>	Mu	Heng, <i>et al.</i> , 2010 ^[109]
E-cadherin, S, K, M	Overexpression of E-cadherin affects the nuclear localization of β -catenin, which in turn promotes the expression of pluripotency genes	Mu	Redmer, <i>et al.</i> , 2011 ^[110]
TCL-1A, S, M	The pluripotency-related factor TCL-1A can replace Oct4 and SM two factors to complete reprogramming of human fibroblasts	H	Picanco-Castro, <i>et al.</i> , 2011 ^[111]
Brn4, S, K, M	Brn4 can also replace Oct4 due to its homologous POU domain	Mu	Bar-Nur, <i>et al.</i> , 2015 ^[112]
Tet1, S, K, M	Tet1 promotes endogenous Oct4 demethylation and reactivation to replace <i>Oct4</i>	Mu	Gao, <i>et al.</i> , 2013 ^[113]
O, Tet1	High quality iPSCs can also be produced using only Oct4 and Tet1 transcription factors	Mu	Chen, <i>et al.</i> , 2014 ^[114]
O, Jhdm1b	Jhdm1b inhibits cellular senescence during reprogramming and interacts with Oct4 to activate pluripotency-associated microRNA302/367	Mu	Wang, <i>et al.</i> , 2011 ^[115]
O, Bmi1	Bmi1 can increase the expression of <i>Sox2</i> and <i>N-Myc</i> to induce the somatic cells to reach the intermediate state of iPSCs	Mu	Moon, <i>et al.</i> , 2011 ^[116]
Oct4-VP16	VP16 can strongly activate the expression of endogenous pluripotency genes by recruiting transcription factors and histone deacetylase	Mu, H	Wang, <i>et al.</i> , 2011 ^[117]
Sall4, Dppa2, Esrrb, Lin28	Sall4 can activate other pluripotency genes including <i>Oct4</i> . Lin28 can indirectly regulate the expression of <i>c-Myc</i> to complete reprogramming	Mu	Buganim, <i>et al.</i> , 2012 ^[118]
Sall4, Dppa2, Nanog, Lin28	Same as above	Mu	Buganim, <i>et al.</i> , 2012 ^[118]
Sall4, Lrh1, Jdp2, Jhdm1b, Id1, Glis1	The core factor Jdp2 is an antagonist of the somatic transcription factor c-Jun	Mu	Liu, <i>et al.</i> , 2015 ^[119]
O, S, K, HDACi	HDACi can effectively replace c-Myc to complete reprogramming of mouse fibroblasts	Mu	Huangfu, <i>et al.</i> , 2008 ^[120]
O, S, HDACi	HDACi can achieve reprogramming of human fibroblasts by replacing c-Myc and Klf4	H	Huangfu, <i>et al.</i> , 2008 ^[121]
O, S, K, Vc	Vc reduces the expression of genes <i>p53</i> and <i>p21</i> , promotes DNA demethylation and MET, thus replacing c-Myc	Mu, H	Esteban, <i>et al.</i> , 2010 ^[122]
O, S, Jhdm1a, Vc	Vc can replace Klf4 and c-Myc with histone demethylase Jhdm1a,	Mu	Wang, <i>et al.</i> , 2011 ^[115]
O, Jhdm1b, Vc	Vc can be used in conjunction with Jhdm1b to reprogram Sox2, Klf4, c-Myc	Mu	Wang, <i>et al.</i> , 2011 ^[115]
O, S, KP, M	KP can replace Klf4 for generation of iPSCs	Mu	Lyssiotis, <i>et al.</i> , 2009 ^[123]
O, TGF- β i, K	Inhibition of TGF- β signaling activates endogenous <i>Nanog</i> expression	Mu	Ichida, <i>et al.</i> , 2009 ^[124] Maherali, <i>et al.</i> , 2009 ^[125]

(续表1)

重编程因子 Reprogramming factors	机制 Mechanisms	物种 Species	参考文献 References
O, BIX01294, BayK8644, K	BIX01294 and BayK8644 can effectively replace Sox2	Mu	Shi, <i>et al.</i> , 2008 ^[126]
O, TGF- β i, HDACi, MEKi, PDK1a	The small molecule combination system can produce human iPSCs with a single transcription factor OCT4	H	Zhu, <i>et al.</i> , 2010 ^[127]
O, V, C, 6, T	Small molecule combination can produce mouse iPSCs with the participation of a single transcription factor Oct4	Mu	Li, <i>et al.</i> , 2011 ^[128]
F, V, C, 6, T, Z	C6F can activate the expression of <i>Sall4</i> and <i>Sox2</i> , and Z can activate the expression of <i>Oct4</i> to reprogram somatic cells	Mu	Hou, <i>et al.</i> , 2013 ^[129]
F, C, 6, Z	Same as above	Mu	Hou, <i>et al.</i> , 2013 ^[129]
F, V, C, 6, Z, other	Same as above	Mu	Cao, <i>et al.</i> , 2018 ^[132]
O, S, p53 ↓	Decreasing p53 protein levels enables the production of iPSCs using only Oct4 and Sox2	Mu	Kawamura, <i>et al.</i> , 2009 ^[143]
O, S, Dot1l ↓	Inhibition of Dot1l during early reprogramming can increase the expression of alternative induction factors Nanog and Lin28	Mu, H	Onder, <i>et al.</i> , 2012 ^[150]

O: Oct3/4(又称Pou5f1); S: Sox2; K: Klf4; M: c-Myc; Mu: 小鼠; H: 人; K1/K2/K5: Klf1/Klf2/Klf5; S1/S3/S15/S18: Sox1/Sox3/Sox15/Sox18; ME: 促进细胞向中胚层(ME)分化的特殊基因, 例如*GATA6*、*SOX7*、*PAX1*、*GATA4*、*CEBPA*、*HNF4a*、*GRB2*等; ECT: 外胚层(ECT)谱系基因; HDACi: 组蛋白去乙酰化抑制剂; Vc: 维生素C; KP: Kenpaullone, 周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂; BIX01294: 组蛋白甲基转移酶抑制剂; BayK8644: 钙通道激动剂; TGF- β i: TGF- β 抑制剂; MEKi: MEK抑制剂; PDK1a: 磷酸肌醇依赖性激酶; V: VPA丙戊酸; C: CHIR99021, GSK3- β 抑制剂; 6: E-616452, TGF- β 抑制剂; T: 苯环丙胺, H3K4去甲基酶抑制剂; F: 毛喉素, cAMP激动剂; Z: 3-Deazaneplanocin A, 组蛋白甲基转移酶EZH2抑制剂; other: Vc、Bmp4、BrdU、AM580、EPZ5676、SGC0946; ↓: 敲降。

O: Oct3/4 (also called Pou5f1); S: Sox2; K: Klf4; M: c-Myc; Mu: mouse; H: human; K1/K2/K5: Klf1/Klf2/Klf5; S1/S3/S15/S18: Sox1/Sox3/Sox15/Sox18; ME: specialized genes that promote the differentiation of cells into mesendodermal (ME), such as *GATA6*, *SOX7*, *PAX1*, *GATA4*, *CEBPA*, *HNF4a*, *GRB2*, etc; ECT: ectodermal (ECT) cell lineage specialization gene; HDACi: histone deacetylase inhibitor; Vc: vitamin C; KP: Kenpaullone, cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor; BIX01294: histone methyltransferase inhibitor; BayK8644: calcium channel agonist; TGF β i: TGF β inhibitor; MEKi: mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitor; PDK1a: phosphoinositide-dependent kinase; V: valproic acid, VPA; C: CHIR99021, a GSK3- β inhibitor; 6: E-616452, TGF- β inhibitor; T: tranylcypromine, H3K4 demethylase inhibitor; F: forskolin, cAMP agonist; Z: 3-Deazaneplanocin A, histone methyltransferase EZH2 inhibitor; other: Vc, Bmp4, BrdU, AM580, EPZ5676, SGC0946; ↓: knowdown.

命运; 二者的发现荣膺2012年诺贝尔生理与医学奖, 更加说明了细胞命运可塑性的重要性。

尽管SCNT与iPS细胞都能使细胞到达多能性状态, 但实现多能性所经历的途径是不同的。iPSC技术是利用确定的转录因子或小分子化合物将细胞重编程为类似于ES细胞的多能性细胞, 而SCNT技术则是通过将体细胞转移到去核卵母细胞中, 以达到将供体细胞重编程为类似于受精卵的全能性状态。

SCNT和iPSC技术的重编程速度也有很大差异。染色质可接近性和转录组分析结果证明, SCNT重编程过程发生很快, 数小时内就可以完成^[152-153]; 卵源组蛋白驱动的快速组蛋白替换可能是这种快速重编程的原因。相比之下, iPSC细胞重编程的过程是相对缓慢的, 外源诱导因子的异位表达首先引起细胞形态的逐渐变化, 然后在多能性标志物如碱性

磷酸酶和SSEA-1的表达逐渐升高之前, 体细胞特异性基因的表达下降, 数天乃至数周后, 内源性Oct4和Nanog的稳定表达表明重编程过程的完成^[148,154-155]。

此外, 染色质可接近性、转录组以及甲基化等分析表明, SCNT重编程是比iPS细胞重编程更有效的方法, 并且更好地消除了起始细胞的表现遗传记忆如甲基化记忆残留。和受精后雄原核的直接和快速去甲基化一样, 供体细胞细胞核在去核卵母细胞中迅速去甲基化, 这可能是卵母细胞胞质中含有大量去甲基化酶^[156]。尽管iPS细胞中的甲基化记忆残留可以通过连续传代在一定程度上去除, 但仍然会影响iPS细胞的分化潜能, 这次表现修饰残留使iPS细胞更容易分化为供体细胞所对应的相应胚层细胞。Oct4是诱导产生iPS细胞的核心多能性转录因子, 但它对于SCNT重编程则是可有可无的^[157]。此外, 尽

管H3K9me3是两种重编程过程中的共同障碍^[10-11,94],但这种障碍影响的关键基因是不同的,在iPS细胞中H3K9me3阻止了*Sox2*和*Nanog*的激活,但在SCNT过程中,H3K9me3则是抑制了ZGA的发生。因此,SCNT和iPS细胞技术在重编程机制上是不同的。

综上所述,在过去的几十年间,研究者们针对SCNT和iPS细胞重编程过程中一系列生物学事件展开研究,并在重编程分子机制方面取得了显著的成就。然而,两者重编程过程的很多细节仍不清楚,其内在的表观遗传作用机制仍未探明。随着高通量测序和小分子化合物合成等技术的不断优化和发展,相信在不久的将来,人们将在重编程的机制研究和临床应用领域取得更为重要的突破。

参考文献 (References)

- Lu F, Zhang Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. *Nat Sci Rev* 2015; 2(2): 217-25.
- Hupalowska A, Jedrusik A, Zhu M, Bedford M T, Glover D M, Zernicka-Goetz M. CARM1 and paraspeckles regulate pre-implantation mouse embryo development. *Cell* 2018; 175(7): 1902-16, e13.
- Wang J, Wang L, Feng G, Wang Y, Li Y, Li X, *et al.* Asymmetric expression of LincGET biases cell fate in two-cell mouse embryos. *Cell* 2018; 175(7): 1887-901, e18.
- Tarkowski A K. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 1959; 184: 1286-7.
- Rossant J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 1976; 36(2): 283-90.
- Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182(4627): 64-5.
- Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
- Liu W, Liu X, Wang C, Gao Y, Gao R, Kou X, *et al.* Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov* 2016; 2: 16010.
- Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, *et al.* H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* 2013; 45(1): 34-42.
- Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, *et al.* Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell* 2014; 159(4): 884-95.
- Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, *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.
- Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, *et al.* Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2018; 172(4): 881-7, e7.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282(5396): 2095-8.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394(6691): 369-74.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 1999; 17(5): 456-61.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407(6800): 86-90.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289(5482): 1188-90.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002; 415(6874): 859.
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20(4): 366-9.
- Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 2003; 302(5648): 1179.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005; 436(7051): 641.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane J, Jerry J, Blackwell C, *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280(5367): 1256-8.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, *et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003; 424(6949): 635.
- Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, *et al.* Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol* 2006; 293(2): 439-48.
- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, *et al.* Buffaloes (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod* 2007; 77(2): 285-91.
- Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368(1609): 20110329.
- Loi P, Iuso D, Czernik M, Ogura A. A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol* 2016; 34(10): 791-7.
- Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmot I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1996; 1(1): 40-6.
- Kim JM, Ogura A, Nagata M, Aoki F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod* 2002; 67(3): 760-6.
- 陈大元. 受精生物学——受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社, 2000.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royle J, Blayney LM, *et al.* PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;

- 129(15): 3533-44.
- 33 Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Asynchronous DNA replication and origin licensing in the mouse one-cell embryo. *J Cell Biochem* 2009; 107(2): 214-23.
 - 34 Bouniol C, Nguyen E, Debey P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res* 1995; 218(1): 57-62.
 - 35 Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993; 15(8): 531-8.
 - 36 Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in the pig embryo: nuclear swelling. *J Exp Zool* 1990; 255(3): 355-8.
 - 37 Gao R, Wang C, Gao Y, Xiu W, Chen J, Kou X, *et al.* Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of domestic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell* 2018; 23(3): 426-35.e5.
 - 38 Teperek M, Miyamoto K. Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes. *Reprod Med Biol* 2013; 12: 133-49.
 - 39 Gao S, Chung YG, Williams JW, Riley J, Moley K, Latham KE. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 48-56.
 - 40 Ng RK, Gurdon JB. 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(1): 102-9.
 - 41 Chung YG, Matoba S, Liu Y, Eum JH, Lu F, Jiang W, *et al.* Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2015; 17(6): 758-66.
 - 42 Hormanseder E, Simeone A, Allen GE, Bradshaw CR, Figlmüller M, Gurdon J, *et al.* H3K4 methylation-dependent memory of somatic cell identity inhibits reprogramming and development of nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell* 2017; 21(1): 135-43.e6.
 - 43 Li Y, Zhang Z, Chen J, Liu W, Lai W, Liu B, *et al.* Stella safeguards the oocyte methylome by preventing *de novo* methylation mediated by DNMT1. *Nature* 2018; 564(7734): 136-40.
 - 44 Guo F, Li X, Liang D, Li T, Zhu P, Guo H, *et al.* Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell* 2014; 15(4): 447-59.
 - 45 Shen L, Inoue A, He J, Liu Y, Lu F, Zhang Y. Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell* 2014; 15(4): 459-71.
 - 46 Eckersley-Maslin MA, Alda-Catalinas C, Reik W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(7): 436-50.
 - 47 Peat JR, Reik W. Incomplete methylation reprogramming in SCNT embryos. *Nat Genet* 2012; 44(9): 965-6.
 - 48 Sun L, Wu KL, Zhang D, Wang HY, Wang Y, Xu ZY, *et al.* Increased cleavage rate of human nuclear transfer embryos after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Reprod Biomed Online* 2012; 25(4): 425-33.
 - 49 Huan YJ, Zhu J, Xie BT, Wang JY, Liu SC, Zhou Y, *et al.* Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J Reprod Dev* 2013; 59(5): 442-9.
 - 50 Li C, Terashita Y, Tokoro M, Wakayama S, Wakayama T. 36 effect of DNA methyltransferase inhibitor, RG108, on *in vitro* development and ntES establishment rate in cloned mouse embryos. *Rep Fer Dev* 2011; 24(1): 130.
 - 51 Blleloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. 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.
 - 52 Liu W, Yin J, Kou X, Jiang Y, Gao H, Zhao Y, *et al.* Asymmetric reprogramming capacity of parental pronuclei in mouse zygotes. *Cell Rep* 2014; 6(6): 1008-16.
 - 53 Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, *et al.* The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 2011; 477(7366): 606-10.
 - 54 Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(9): 3642-7.
 - 55 Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 2007; 77(6): 1007-16.
 - 56 Brind'Amour J, Liu S, Hudson M, Chen C, Karimi M M, Lorincz M C. An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat Commun* 2015; 6: 6033.
 - 57 Skene PJ, Henikoff JG, Henikoff S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. *Nat Protoc* 2018; 13(5): 1006-19.
 - 58 Liu X, Wang C, Liu W, Li J, Li C, Kou X, *et al.* Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* 2016; 537(7621): 558-62.
 - 59 Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, *et al.* Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol* 2018; 20(5): 620-31.
 - 60 Liu X, Wang Y, Gao Y, Su J, Zhang J, Xing X, *et al.* H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming. *Development* 2018; 145(4): pii: dev158261.
 - 61 Inoue A, Jiang L, Lu F, Suzuki T, Zhang Y. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature* 2017; 547(7664): 419-24.
 - 62 Matoba S, Wang H, Jiang L, Lu F, Iwabuchi KA, Wu X, *et al.* Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. *Cell Stem Cell* 2018; 23(3): 343-54.e5.
 - 63 Zheng H, Huang B, Zhang B, Xiang Y, Du Z, Xu Q, *et al.* Resetting epigenetic memory by reprogramming of histone modifications in mammals. *Mol Cell* 2016; 63(6): 1066-79.
 - 64 Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet* 2011; 7(10): e1002279.
 - 65 Inoue A, Zhang Y. Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21(7): 609-16.
 - 66 Nashun B, Yukawa M, Liu H, Akiyama T, Aoki F. Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development* 2010; 137(22): 3785-94.
 - 67 Nashun B, Akiyama T, Suzuki MG, Aoki F. Dramatic replace-

- ment of histone variants during genome remodeling in nuclear-transferred embryos. *Epigenetics* 2011; 6(12): 1489-97.
- 68 Chang CC, Gao S, Sung LY, Corry GN, Ma Y, Nagy ZP, *et al.* Rapid elimination of the histone variant MacroH2A from somatic cell heterochromatin after nuclear transfer. *Cell Rep* 2010; 12(1): 43-53.
- 69 Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol* 2004; 266(1): 62-75.
- 70 Wen D, Banaszynski LA, Liu Y, Geng F, Noh KM, Xiang J, *et al.* Histone variant H3.3 is an essential maternal factor for oocyte reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(20): 7325-30.
- 71 Wen D, Banaszynski LA, Rosenwaks Z, Allis CD, Rafii S. H3.3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos. *Nucleus* 2014; 5(5): 369-75.
- 72 Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, *et al.* Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 2010; 330(6003): 496-9.
- 73 Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 2013; 152(6): 1308-23.
- 74 Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* 2002; 298(5595): 1039-43.
- 75 Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 2003; 300(5616): 131-5.
- 76 Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, *et al.* RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20621-6.
- 77 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.
- 78 Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416(6880): 545-8.
- 79 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.
- 80 Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2007; 2(12): 3081-9.
- 81 Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(8): 2883-8.
- 82 Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009; 5(2): 135-8.
- 83 Zhao XY, Li W, Lü Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461(7260): 86-90.
- 84 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- 85 Gorkin DU, Leung D, Ren B. The 3D genome in transcriptional regulation and pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014; 14(6): 762-75.
- 86 Soufi A, Garcia MF, Jaroszewicz A, Osman N, Pellegrini M, Zaret KS. Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* 2015; 161(3): 555-68.
- 87 Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 2009; 136(2): 364-77.
- 88 Chen J, Chen X, Li M, Liu X, Gao Y, Kou X, *et al.* Hierarchical Oct4 binding in concert with primed epigenetic rearrangements during somatic cell reprogramming. *Cell Rep* 2016; 14(6): 1540-54.
- 89 Li D, Liu J, Yang X, Zhou C, Guo J, Wu C, *et al.* Chromatin accessibility dynamics during iPSC reprogramming. *Cell Stem Cell* 2017; 21(6): 819-33.e6.
- 90 Knaupp AS, Buckberry S, Pflueger J, Lim SM, Ford E, Larcombe MR, *et al.* Transient and permanent reconfiguration of chromatin and transcription factor occupancy drive reprogramming. *Cell Stem Cell* 2017; 21(6): 834-45.e6.
- 91 Chronis C, Fiziev P, Papp B, Butz S, Bonora G, Sabri S, *et al.* Cooperative binding of transcription factors orchestrates reprogramming. *Cell* 2017; 168(3): 442-59.e20.
- 92 Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, *et al.* Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008; 133(6): 1106-17.
- 93 Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 2008; 132(6): 1049-61.
- 94 Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151(5): 994-1004.
- 95 Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 2013; 502(7472): 462-71.
- 96 Wernig M, Meissner A, Cassady J, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 2(1): 10-2.
- 97 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- 98 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.
- 99 Ocana OH, Nieto MA. Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell Res* 2010; 20(10): 1086-8.
- 100 Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14152-7.
- 101 Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichisaka T, *et al.* Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 2011; 474(7350): 225-9.

- 102 Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, *et al.* Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2): 197-203.
- 103 Chen J, Liu J, Yang J, Chen Y, Chen J, Ni S, *et al.* BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell Res* 2011; 21(1): 205-12.
- 104 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.
- 105 Yang P, Wang Y, Chen J, Li H, Kang L, Zhang Y, *et al.* RCOR2 is a subunit of the LSD1 complex that regulates ESC property and substitutes for SOX2 in reprogramming somatic cells to pluripotency. *Stem Cells* 2011; 29(5): 791-801.
- 106 Wu L, Wu Y, Peng B, Hou Z, Dong Y, Chen K, *et al.* Oocyte-specific Homeobox 1, Obox1, facilitates reprogramming by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and mitigating cell hyperproliferation. *Stem Cell Rep* 2017; 9(5): 1692-705.
- 107 Shu J, Wu C, Wu Y, Li Z, Shao S, Zhao W, *et al.* Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell* 2013; 153(5): 963-75.
- 108 Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, *et al.* Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14(2): 217-27.
- 109 Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, *et al.* The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(2): 167-74.
- 110 Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W, Besser D. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* 2011; 12(7): 720-6.
- 111 Picanco-Castro V, Russo-Carbolante E, Reis L C, Fraga AM, de Magalhaes DA, Orellana MD, *et al.* Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells Dev* 2011; 20(1): 169-80.
- 112 Bar-Nur O, Verheul C, Sommer A G, Brumbaugh J, Schwarz BA, Lipchina I, *et al.* Lineage conversion induced by pluripotency factors involves transient passage through an iPSC stage. *Nat Biotechnol* 2015; 33(7): 761-8.
- 113 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.
- 114 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.
- 115 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.
- 116 Moon JH, Heo JS, Kim JS, Jun EK, Lee JH, Kim A, *et al.* Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1. *Cell Res* 2011; 21(9): 1305-15.
- 117 Wang Y, Chen J, Hu JL, Wei XX, Qin D, Gao J, *et al.* Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors. *EMBO Rep* 2011; 12(4): 373-8.
- 118 Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 2012; 150(6): 1209-22.
- 119 Liu J, Han Q, Peng T, Peng M, Wei B, Li D, *et al.* The oncogene c-Jun impedes somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 2015; 17(7): 856-67.
- 120 Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen A E, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- 121 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1269-75.
- 122 Esteban M A, 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.
- 123 Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, *et al.* Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(22): 8912-7.
- 124 Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, *et al.* A small-molecule inhibitor of TGF-beta signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5): 491-503.
- 125 Maherali N, Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 2009; 19(20): 1718-23.
- 126 Shi Y, Despons C, Do J, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. 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.
- 127 Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasadhan R, Lin T, *et al.* Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 2010; 7(6): 651-5.
- 128 Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, *et al.* Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res* 2011; 21(1): 196-204.
- 129 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.
- 130 Zhao Y, Zhao T, Guan J, Zhang X, Fu Y, Ye J, *et al.* A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical reprogramming. *Cell* 2015; 163(7): 1678-91.
- 131 Zhao T, Fu Y, Zhu J, Liu Y, Zhang Q, Yi Z, *et al.* Single-cell RNA-Seq reveals dynamic early embryonic-like programs during chemical reprogramming. *Cell Stem Cell* 2018; 23(1): 31-45, e7.
- 132 Cao S, Yu S, Li D, Ye J, Yang X, Li C, *et al.* Chromatin accessibility dynamics during chemical induction of pluripotency. *Cell Stem Cell* 2018; 22(4): 529-42, e5.
- 133 Yang Y, Liu B, Xu J, Wang J, Wu J, Shi C, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells with *in vivo* embryonic and extraembryonic potency. *Cell* 2017; 169(2): 243-57, e25.
- 134 Yang J, Ryan DJ, Wang W, Tsang JC, Lan G, Masaki H, *et al.*

- Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature* 2017; 550(7676): 393-7.
- 135 Lluís F, Pedone E, Pepe S, Cosma MP. Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 493-507.
- 136 Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, *et al.* Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; 3(2): 132-5.
- 137 Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 2008; 22(17): 2308-41.
- 138 Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, *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.
- 139 Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- 140 Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, *et al.* Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature* 2017; 548(7666): 224-7.
- 141 Choi J, Huebner A J, Clement K, Walsh R M, Savol A, Lin K, *et al.* Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 2017; 548(7666): 219-23.
- 142 Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 2009; 6(11): 805-8.
- 143 Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460(7259): 1140-4.
- 144 Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, *et al.* Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010; 463(7284): 1101-5.
- 145 Costa Y, Ding J, Theunissen TW, Faiola F, Hore TA, Shliaha PV, *et al.* NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* 2013; 495(7441): 370-4.
- 146 Doege CA, Inoue K, Yamashita T, Rhee DB, Travis S, Fujita R, *et al.* Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature* 2012; 488(7413): 652-5.
- 147 Hu X, Zhang L, Mao S Q, 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): 512-22.
- 148 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.
- 149 Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natanson S, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 465(7295): 175-81.
- 150 Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 2012; 483(7391): 598-602.
- 151 Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, Choi J, Walsh RM, Chen T, *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(4): 398-405, s1-2.
- 152 Djekidel MN, Inoue A, Matoba S, Suzuki T, Zhang C, Lu F, *et al.* Reprogramming of chromatin accessibility in somatic cell nuclear transfer is DNA replication independent. *Cell Rep* 2018; 23(7): 1939-47.
- 153 Egli D, Chen AE, Saphier G, Ichida J, Fitzgerald C, Go KJ, *et al.* Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nat Commun* 2011; 2: 488.
- 154 Araki R, Jincho Y, Hoki Y, Nakamura M, Tamura C, Ando S, *et al.* Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(2): 213-20.
- 155 Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 151-9.
- 156 Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002; 241(1): 172-82.
- 157 Wu G, Han D, Gong Y, Sebastiano V, Gentile L, Singhal N, *et al.* Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nat Cell Biol* 2013; 15(9): 1089-97.