

特约综述



本实验室聚焦于干细胞研究,包括干细胞多能性维持的分子调控网络、诱导多能干细胞技术及重编程机制、功能性细胞获得的关键技术等。近年来,以小鼠和人类细胞为研究对象,重点研究了干细胞转录因子(Nanog、Oct4、Sox2、FoxD3、Esrrb)的作用机制;发展了非抗性筛选、无血清且成分确定的、高效iPS技术体系;建立了包括多种疾病背景的人类iPS细胞库;发现维生素C能够极大促进重编程;阐明了Vc、组蛋白去甲基化酶Jhdm1b、miR-302-367簇三者为促进重编程作用中的调控机理;发现间充质—上皮转变在重编程起始阶段的重要作用;定位了iPS诱导过程中极为重要的障碍H3K9;从人尿液细胞中诱导获得iPS细胞和神经干细胞。我们将整合已有的研究基础,再接再厉深入探索,全力推动干细胞与再生医学的研究和应用。

http://sourcdb.gibh.cas.cn/zw/zjrc/200907/t20090711_2065033.html

见微知著——微核糖核酸对细胞命运的显著调控

廖宝剑 薛燕婷 潘光锦 裴端卿*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院华南华南干细胞与再生医学研究所,
中国科学院再生生物学重点实验室,广州 510530)

摘要 重编程和分化、转分化在再生医学的应用中有巨大的潜能。在这些细胞命运转变中,微核糖核酸(microRNA, miRNA)或者微核糖核酸簇通过基因转录后调控发挥了重要作用。该文将从细胞miRNA表达谱与细胞谱系决定,miRNA与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)多能性调控,miRNA与重编程、分化、转分化等方面综述领域内的最新进展,并结合该实验室在miR-302-367簇与重编程及神经干细胞转分化方面的研究工作展开对miRNA参与细胞命运调控的讨论。

关键词 重编程;转分化;诱导多能干细胞;微核糖核酸;微核糖核酸簇;多能性维持;miR-302-367簇

MicroRNAs, Micro but with Macro Roles in Cell Fate Determining

Liao Baojian, Xue Yanting, Pan Guangjin, Pei Duanqing*

(Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Regenerative Biology, South China Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDA01020202、XDA01020401)国家重大科学研究计划(批准号: 2012CB966503、2012CB966802)和国家自然科学基金(批准号: 31200970)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 020-32015236, E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

This work was supported by “the Strategic Priority Research Program” of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA01020202, XDA01020401), the National Basic Research Program of China(973 Program, Grant No.2012CB966503, 2012CB966802) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31200970)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-32015236, E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

Abstract Reprogramming, differentiation and trans-differentiation hold great potential in regenerative medicine. In these cell fate transitions, miRNAs or miRNA clusters play vital roles by targeting related mRNAs to direct the post-transcriptional regulation. Herein, this review outlines the latest breakthroughs in following topics: miRNA profiling and cell lineage determining, miRNAs in regulating the pluripotency of embryonic stem cells, miRNAs in regulating reprogramming, differentiation and trans-differentiation. In addition, we highlight the dramatic progresses of miR-302-367 cluster in cell fate regulation, based on our studies of reprogramming and trans-differentiation to neural progenitor stem cells using this cluster.

Key words reprogramming; trans-differentiation; induced pluripotent stem cells; microRNA; microRNA cluster; pluripotency maintaining; miR-302-367 cluster

再生医学在遗传疾病、器官衰竭、衰老与退行性疾病等各方面的治疗中有着巨大的前景,其中胚胎干细胞由于具有分化为其他各种功能性细胞的能力而备受关注。但是其来源存在伦理问题以及技术困难,并且异体干细胞移植存在免疫排斥等障碍。2006年,日本京都大学山中伸弥教授(Shinya Yamanaka)等成功用转录因子先后将小鼠和人类的体细胞转变为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1-3],使得获取病人自体来源的多能干细胞成为可能。作为重编程技术的替代或者补充,不同类型细胞之间的转分化手段也逐步被各国科学家发现,比如: MyoD可将纤维细胞、脂肪细胞、肝脏细胞等非肌肉细胞表达肌肉特异基因^[4]; B细胞、纤维原细胞可以被C/EBP α 等转变为巨噬细胞^[5-6]; PAX6可将胶质细胞变成神经元^[7]; 胰腺细胞转分化为肝脏细胞^[8]; 胰腺外分泌细胞在体内转变为胰腺 β 细胞^[9]; 终末分化的肝脏细胞转化为神经细胞^[10]; 纤维细胞被转变为心肌细胞^[11-12], 肝脏细胞^[13]、血液前体细胞^[14]、神经干细胞^[15-17]、神经元^[18-21]等。

在重编程、分化以及转分化等各种细胞命运转变中,特异性的转录因子起了主导作用,但微核糖核酸也显示出了重要的作用,比如miR-302-367簇促进体细胞重编程、甚至能够直接重编程^[22-23]。用“见微知著”这个成语为文题,该词本意为“见到事情的苗头,就能知道它的实质和发展趋势”,现字面解释为,当细胞得到外来导入的微核糖核酸,可能发生显著的命运转变;或者理解为我们可以通过检测细胞内的微核糖核酸,推测其谱系来源和可能具有的重要功能,这类检测也可用于癌症的早期诊断及个性化医疗。

1 miRNA表达谱与细胞谱系决定

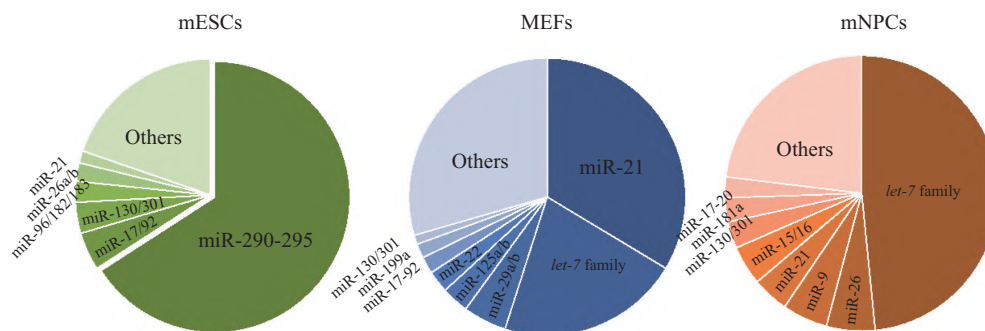
miRNA是细胞内源性的一种非编码核糖核酸,

一般长约22 nt。miRNA的发现,以*lin-4*、*let-7*为代表。Victor Ambros研究小组于1993年在线虫中发现了第一个miRNA,即*lin-4*^[24]。研究者此前已经知道,*lin-4*对于线虫的胚胎发育的时序控制是必需的,并认为其是LIN-14蛋白的负调控因子,但是并不清楚*lin-4*基因的产物是什么。一般的基因产物都推定为蛋白质,但是并没有找到*lin-4*对应的蛋白质。随着线虫发育的进行,*lin-4*失去表达,使得LIN-14蛋白处于高水平的表达。该研究组通过突变*lin-4*转录本可能存在的起始密码子ATG为ACG,发现这样的突变体仍可以拯救*lin-4*缺失导致的发育异常,表明*lin-4*并不是一个编码蛋白的基因;进一步的实验证明*lin-4*编码了两个小RNA,*lin-4L*和*lin-4S*。现在人们知道,这两个小RNA其实就是*lin-4*的前体和成熟体。2000年,科学家又在线虫模型中发现了第二个miRNA,即*let-7*,它同样也对线虫中的时序发育至关重要^[25]。2001年以后,在果蝇、小鼠和人类等物种中,也发现了miRNA的存在^[26-27]。

经过多年研究,科学界逐步清楚了miRNA在细胞内的转录、转运、剪切及成熟过程,以及通过RNA诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)来调控靶标mRNA表达水平的作用机制^[28-29]。对于靶标mRNA的3'非编码区或者编码区的识别,成熟的miRNA的第2-8位的序列是非常关键的,这个序列称为种子区(seed region)。种子区在不同物种中较为保守,也是miRNA家族所共有的。

科学家们发现的miRNA数量在近十年呈指数增长。现在,已有约193个物种的超过两万条的miRNA的信息被搜集在微核糖核酸数据库miRBase上^[30]。其中,包括已发现小鼠的miRNA 842条,已发现人类的miRNA 1589条(2012年8月miRBase 19版本)。

在动物体的不同类型细胞中,各种编码蛋白的



图片数据来自文献[31], 数据见该文补充材料中表格10。

Data from reference [31].

图1 小鼠的不同细胞具有特征miRNA表达谱

Fig.1 miRNA profiling in mES cells, MEFs, and NPCs by small RNA sequencing

基因在表达水平上不一样, 具有不同的表达谱。同样地, 不同类型细胞也具有其miRNA表达谱, 而与mRNA表达谱不同的是, miRNA经常会有少数几个特异地成为细胞内miRNA的主导部分, 绝对表达量可能超过miRNA总量的一半。在小鼠胚胎干细胞中, miR-290家族甚至占到细胞内miRNA总数的60%以上。Marson等^[31]通过芯片和测序两种手段比较了小鼠胚胎干细胞、胚胎成纤维细胞、神经前体细胞的miRNA表达谱, 发现以上三种细胞中占主导的miRNA依次为miR-290家族、miR-21和*let-7*家族、*let-7*家族。

与小鼠不同的是, 人类基因组中不含有miR-290-295簇。在人胚胎干细胞中, 绝对高表达的是miR-302b-367簇和miR-371-373簇的miRNA^[32]。这些miRNA的种子区AAAGUGC和小鼠miR-290的AAGUGC相似。尽管这些miRNA在小鼠和人类等众多物种中的保守性很高^[33], 但在小鼠胚胎干细胞中, miR-302的绝对表达丰度并不高, 纤维原细胞中则检测不到任何miR-302的表达。由于miR-290-295和miR-302-367、miR-371-372家族在胚胎干细胞中丰度上的绝对优势, 其功能也最为科学界所关注, 后文将继续讨论这几个miRNA。

在心肌细胞、肝脏细胞、血液细胞、脂肪细胞中, miRNA也与其特化的功能密切相关。miRNA参与造血干细胞向各个谱系分化的调控, 比如, miR-181、miR-223各自在造血干细胞向淋巴系和髓系分化中起到作用, 其他的miRNA, 如miR-150、miR-155、miR-16、miR-24等调控了进一步的造血分化^[34-35]。而miR-17-92簇的缺失, 将导致新生小鼠死于B细胞发育不全^[36]。

异常的癌症细胞和正常的体细胞有着不同的基因和miRNA表达谱。在不同类型的癌症细胞中, miRNA表达谱同样有着显著的差别。Lu等^[37]在2005年研究了334个癌症样品中217个miRNA的表达水平, 发现miRNA表达谱信息可以比mRNA表达谱更好地区分这些细胞的来源和分化程度, 这提示miRNA可能作为癌症诊断甚至治疗的重要靶标。在某些肺癌细胞中可以检测到miR-99a的下降, 其他癌症如Burkit淋巴瘤中则可以检测到miR-155的上升^[38]。

各种研究均表明, miRNA谱与细胞的命运、分化谱系、疾病与癌症发生有着密切的联系, miRNA虽微小, 其通过基因调控进而影响细胞命运的作用却是显著的。通过解析这些生理或者病理过程的机制, 有望通过miRNA来精确调控这些过程。

2 miRNA与干细胞多能性调控

胚胎干细胞来源于植入前或者植入早期的囊胚内细胞团, 具有自我更新以及可分化为三胚层的能力, 并可在体外特定培养条件下长期维持这些特性。经过近三十年的研究, 科学家已经知道不同物种(小鼠、大鼠、猴、人类等)、甚至小鼠的不同品系的胚胎干细胞建系难易程度不一^[39]; 不同胚胎干细胞培养所需要的外源因子也不同^[40-41]; 同一物种囊胚不同阶段建系得到的干细胞, 比如来自于形成受精卵3.5天后囊胚的经典的小鼠的胚胎干细胞^[40]和5.5天后囊胚的上胚叶干细胞^[42]在形态、维持条件、基因表达谱上有明显差别: miRNA表达的不同可能是这些差异的原因或者结果。

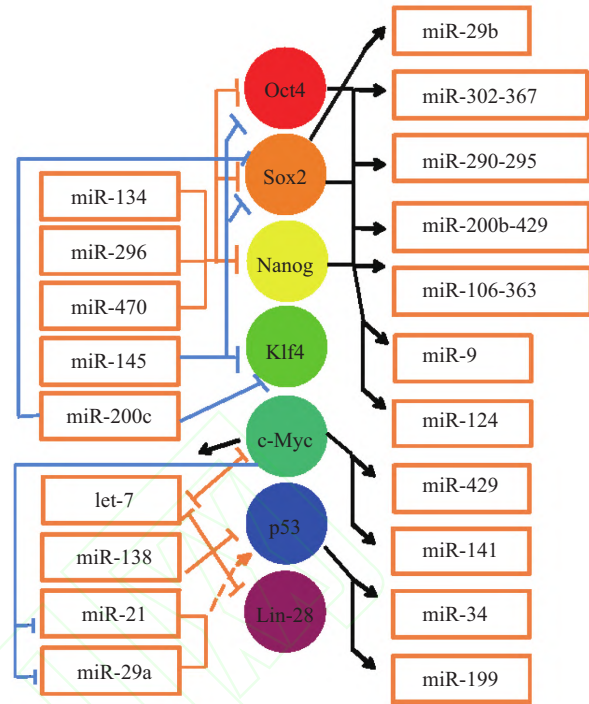
科学界自1981年得到小鼠的胚胎干细胞以

来,就很好奇其多能性如何维持,其内在机制是什么?多能性最初的研究集中在细胞因子、信号转导和转录因子领域,先后阐明了LIF、bFGF等分别在小鼠和人的胚胎干细胞维持中的作用^[43-44];2i抑制剂(MEK抑制剂PD0325901和GSK3 β 抑制剂CHIR99021)对于干细胞基态的维持作用^[45];发现Oct4、Sox2、Nanog等是多能性维持的核心转录因子,调控了数以千计的下游基因,并构成了对自身稳定表达的反馈回路^[46]。这种回路有助于理解Yamanaka后来发现的重编程的内在机制。近年来,人们开始关注miRNA在干细胞中的多能性调控和分化功能研究。

Blelloch研究组在小鼠胚胎干细胞中敲除了*Dgcr8*基因,由于*Dgcr8*对于miRNA成熟是必需的,因此*Dgcr8*^{-/-}的细胞内将丧失所有的成熟体的miRNA,他们发现,这种细胞即使在RA强诱导分化时仍呈克隆状生长,表达干细胞多能性基因,*Dgcr8*^{-/-}的ES细胞的细胞周期将变长,并有G₁/S期阻滞^[47]。上述结果说明细胞内存在的miRNA对于干细胞的分化以及维持干细胞特异的细胞周期是必需的。以此细胞为模型,该小组筛选到了一些可以挽救这种细胞表型的miRNA,他们称之为胚胎干细胞细胞周期相关miRNAs(ES cell specific cell cycle regulating miRNAs, ESCC miRNAs)。主要包括miR-291a-3p、miR-291b-3p、miR-294、miR-295等miR-290家族中的4个miRNA和miR-302b、miR-302c、miR-302d、miR-106a、miR-20a、miR-20b、miR-93,以及miR-19a、miR-33、miR-93、miR-223。其中,前11个miRNA的种子区是相同或相似的^[48],也即是本文第一部分中提到的占据小鼠ESCs内绝对丰度的miRNA。该小组进一步的实验证据表明,ESCC miRNAs和*let-7*家族共同调控了小鼠胚胎干细胞的自我更新^[49]。在*Dgcr8*^{-/-}的ES细胞中导入*let-7*,细胞将明显分化,而miR-290可以拯救这一过程。

miR-302家族在人胚胎干细胞中发挥着重要的作用:miR-302通过靶向CDK2、CDK4/6降低了人多能干细胞的成瘤性^[50];miR-302-367促进BMP信号,可能的靶点是DAZAP2、SLAIN1、TOB2等BMP抑制物^[51];miR-302作为OCT4、SOX2的下游,直接调控了人ESCs中CYCLIN D1的表达^[52],从而调控细胞周期。

其他miRNA在干细胞中的功能同样不能忽视。



箭头表示促进下游表达水平,虚线表示间接的下游基因,平端线表示抑制。

Arrows indicate facilitating expression levels of downstreams, dashed line indicates indirect target, flat-ended arrows indicate inhibition of downstreams.

图2 胚胎干细胞和重编程中相关转录因子和miRNA的调控网络

Fig.2 Regulatory circuitry of transcription factors and miRNAs in ES cells and reprogramming

有文章报道,在小鼠胚胎干细胞中,miR-134、miR-296和miR-470,可以直接结合到Oct4、Sox2和Nanog的mRNA编码区调控其表达,从而影响干细胞的分化^[53]。miR-200家族则可靶向Klf4和Sox2^[54];miR-145则被证实在人胚胎干细胞的分化过程中,可以抑制OCT4、SOX2、KLF4几个转录因子的表达从而影响多能性^[55],这三个因子正是经典的重编程因子,我们称之为OSK三因子,加上c-MYC称为OSKM四因子。该研究组还证实OCT4可以抑制miR-145的表达,从而使其表达形成了一个负反馈的回路。

胚胎干细胞核心的转录因子Oct4、Sox2、Nanog全局性地调控了下游的miRNA表达。Marson等^[31]通过ChiP-Seq实验发现,在小鼠胚胎干细胞中,Oct4、Sox2、Nanog会结合到至少55个不同的miRNA的启动子上,这些miRNA就包含了与干细胞多能性极度相关的miR-302-367簇、miR-290-295簇、miR-106a-363簇、与神经分化相关的miR-9、miR-124等。最近,有报道Sox2可以直接上调miR-29b^[56]。

在重编程有重要作用的转录因子c-Myc, 同样调控了众多miRNA的表达, 比如上调miR-429、miR-141、miR-200c的表达, 这些miRNA被证实可以抑制小鼠胚胎干细胞的分化^[57]; c-Myc还促进miR-17-92簇和miR-106-363簇的表达, 我们和其他研究者证明, 这些miRNA对于重编程有非常强的促进效果^[22,58]。c-Myc会抑制*let-7*的表达, 而*let-7*对c-Myc也有抑制作用^[59-60]; 另一个和人类体细胞重编程相关的转录因子LIN-28^[3]和*let-7*的调控也是相互抑制的^[61]。

p53参与了细胞周期、代谢、基因组稳定性等各种过程的调控, 同样参与了干细胞中miRNA的表达调控, 它直接上调miR-34的表达, 后者与分化相关。通过分析49个ESCs、iPSCs系的miRNA谱, 可以将人多能细胞区分为两种状态, 而这两类细胞的转录谱差别主要由p53介导^[62]。

在胚胎干细胞的多能性调控中, 特异性转录因子和miRNA形成了互相调控、互相反馈的网络。

3 miRNA与重编程、分化、转分化

鉴于miRNA与转录因子、干细胞的多能性调控的紧密联系, 科学家开始探索miRNA与重编程的联系, 并希望借助于miRNA实现非病毒整合的重编程。

Blelloch小组发现ESCC相关的miRNA, miR-290可以促进小鼠体细胞重编程效率约10倍, 并且可以替换掉具有致癌性的基因c-Myc^[63]。由于miRNA可体外化学合成, 人们因此寄希望于miRNA可以进一步减少重编程所需的转录因子。

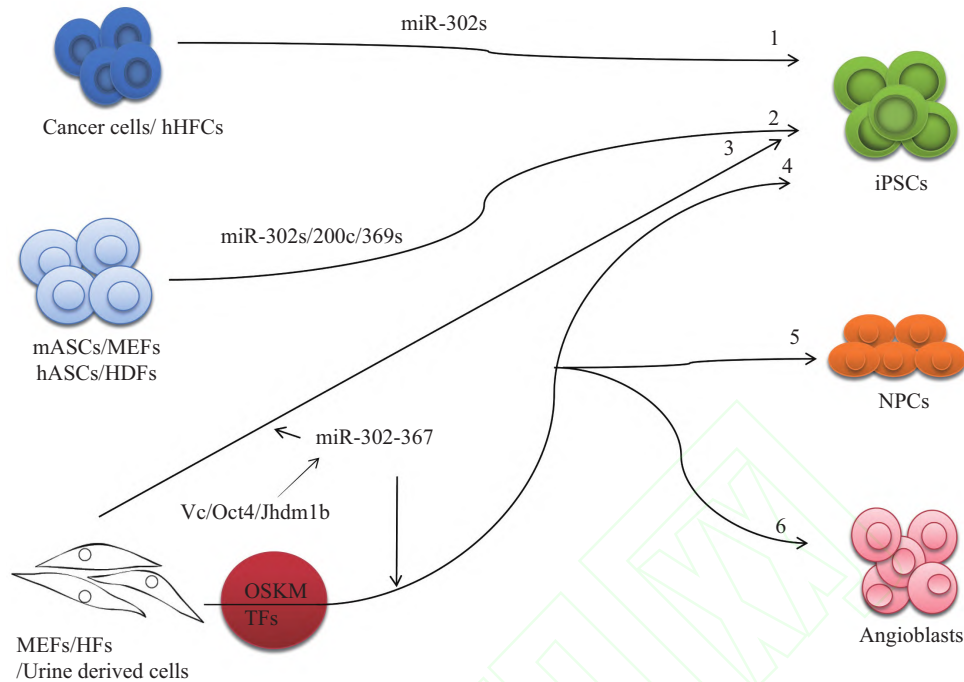
我们对miRNA与重编程的关系进行了研究。首先, 通过比较胚胎干细胞与纤维原细胞在miRNA表达谱的差异, 选择出干细胞相对高表达的miRNA约20个, 在这20个miRNA中, 有miR-290簇、miR-200b-429簇、miR-106-363簇、miR-302-367簇。在小鼠以及人的基因组中, 有一部分具有相同种子区的miRNA成簇出现, 其序列具有物种保守性。由于其成员序列的相似性和表达的一致性, 可将该簇作为一个整体进行功能研究。因此, 我们将后面3个未有报道与重编程相关的miRNA簇克隆到了逆转录病毒载体, 导入到小鼠的重编程体系中。我们发现, miR-106-363簇、miR-302-367簇可以显著促进重编程。miR-302-367簇在人类基因组中位于第四号染色体, 位于*LARP7*基因的内含子中, 但其转录方

向与*LARP7*转录方向相反。该簇的成员(miR-302b、miR-302c、miR-302a、miR-302d、miR-367)在小鼠及人的胚胎干细胞都高表达。我们发现, miR-302b对重编程的促进效果是这些miRNA中最强的, 具有促进效果的miRNA具有类似的种子区序列。

通过比较不同条件(有无维生素C、有无c-Myc)下, miR-302-367簇对于重编程的影响, 我们发现, OSKM四因子条件下, miR-302-367簇提高重编程的倍数比在OSK三因子条件下的提高倍数要少; 添加维生素C条件下, miR-302-367簇提高倍数比不添加时的提高倍数也要少^[22]。这些结果提示, c-Myc和维生素C提高重编程的作用通路可能和这些miRNA有重叠。后续实验证实, c-Myc可以引起部分上述miRNA的表达量上升^[22]。我们实验室后续发表的关于组蛋白H3K36去甲基化酶Jhdm1a/1b促进重编程的文章中, 报道了Oct4、Jhdm1b和Vc可以协同诱导miR-302-367的表达, 进而实现在小鼠细胞中Oct4和Jhdm1b两个因子的重编程。这些工作阐明了小分子化合物Vc、组蛋白去甲基化酶Jhdm1b、miR-302-367簇三者为促进重编程作用中的联系^[64]。

间充质—上皮转变过程(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)是重编程过程中的一个早期事件。在这一变化中, 同样发生了相关miRNA表达水平的变化^[65]。而Samavarchi-Tehrani等^[66]则证明, 与MET相关的miR-200c可以促进小鼠的重编程。

对于miRNA发挥作用具有重要功能的基因*Ago2*, 下调其表达可以抑制重编程的效率, 提示全局性的miRNA表达谱的变化及其功能对于重建多能性是重要的^[58]。该研究还发现, miR-93、miR-106b可以促进小鼠体细胞的重编程, 并且证明是通过miRNA下调p21和Tgf β 2的表达来起作用的^[58]。通过筛选一个含379个miRNA的前体库, Pfaff等^[67]发现了miR-130a/b、miR-148a、miR-152、miR-190、miR-301、miR-301b、miR-669b和miR-721这些可以促进重编程的miRNA。其中, miR-130b、miR-301b和miR-721是具有相同种子区的miRNA, 它们共同下调了一个间充质细胞相关的转录因子Meox2。p53是重编程过程的一个重要的阻碍^[68]。国内外两个研究小组发现, p53正调控的miR-34^[69]、miR-199^[70]可以抑制重编程, 下调这些miRNA可以促进iPSCs的形成。miR-138则可以抑制内源的p53从而促进重编程^[71]。也有研究者发现miR-21、miR-29a阻碍了重编程^[72], 这2个miRNA



hHFCs: 人头发毛囊细胞; mASCs/hASCs: 小鼠、人脂肪基质细胞; MEFs: 小鼠胚胎成纤维细胞; HDFs: 人皮肤成纤维细胞; HF: 人成纤维细胞; Urine derived cells: 从尿液中分离的细胞; iPSCs: 诱导多能干细胞; NPCs, 神经前体细胞; Angioblasts: 成血管细胞; OSKM TFs: 用于将体细胞重编程的转录因子。1: 人皮肤癌细胞、头发毛囊细胞被miR-302s重编程为类ES细胞^[73-74]; 2: 成熟体的miRNAs将小鼠和人的体细胞重编程为iPS细胞^[77]; 3: miR-302-367簇直接重编程体细胞^[23]; 4: miR-302-367簇促进体细胞重编程及机制^[22,64,75-76]; 5: miR-302-367簇促进尿液分离细胞的神经前体细胞转化^[17]; 6: miR-302-367簇促进体细胞转分化为成血管细胞^[78]。

hHFCs: human hair follicle cells; mASCs/hASCs: mouse/human adipose stromal cells; MEFs: mouse embryonic fibroblasts; HDFs: human dermal fibroblasts; HF: human fibroblasts; iPSCs: induced pluripotent stem cells; NPCs: neural progenitor cells; OSKM TFs: transcription factors used in somatic cell reprogramming. 1: miR-302s reprogram human skin cancer cells and hair follicle cells into a pluripotent ES-cell-like state^[73-74]; 2: mature miRNAs reprogram mouse and human cells to iPS cells^[77]; 3: miR-302-367 reprograms mouse and human somatic cells to pluripotency without transcription factors^[23]; 4: miR-302-367 cluster, which is regulated by vitamin c, Oct4, and Jhdm1b^[22,64,75-76], promotes somatic cell reprogramming; 5: miR-302-367 cluster promotes trans-differentiation of UCs to NPCs^[17]; 6: miR-302-367 cluster promotes trans-differentiation of HF to angioblasts^[78]。

图3 miR-302-367簇与重编程、转分化

Fig.3 miR-302-367 cluster regulates reprogramming and trans-differentiation

是受到c-Myc抑制的, 阻遏这2个miRNA表达会通过影响p85a和CDC42通路使得p53表达下调。也有报道miR-29b则作为Sox2的下游, 通过抑制Dnmt3a、Dnmt3b促进了重编程^[56]。这说明即使是同一家族的miRNA, 在细胞命运调控中的作用也是精细分工的。

更令重编程领域科学家震惊的结果是, Anokye-Danso等发表论文称, 病毒介导的miR-302-367簇可以使得小鼠和人的细胞直接重编程为iPS细胞, 无需OSKM等转录因子^[23], 且效率比传统的OSKM提高了2个数量级以上, 十万个起始细胞中得到了超过一万个iPS克隆。该技术手段简约、直接、高效, 但需要更多实验室的谨慎重复。在此之前, Lin等^[73-74]

发现, 仅由miR-302可以使得人皮肤癌细胞、毛囊中的细胞重编程为类iPS细胞。我们实验室及其他研究组的结果与上述报道不同的是: miR-302-367簇或者miR-302s、miR-372尽管有很好的促进重编程效果, 但不能实现普通体细胞的直接重编程^[22,75-76]。

接着有实验室实现转染miR-200c、miR-302s、miR-369s的成熟体, 可以将小鼠和人的特定类型细胞重编程为iPS细胞, 但重编程效率极低^[77]。

由于miRNA和转录因子作用方式的极大差别, 两种方式介导的重编程的内在机制可能存在着重大区别。转录因子是通过直接影响上千个核心下游因子来实现重编程的^[46], Oct4、Sox2、Nanog等维持干细胞命运的核心调控网络, 具有自动反馈调整并稳

定的基因调控模式;然而miRNA介导的直接重编程,它的机制如何呢?可能是通过抑制一些负调控Oct4、Sox2、Nanog等蛋白的基因的表达来实现。miRNA如何开启细胞内本已沉默的多能性基因?下游重要的靶点是什么?这些疑问都有待阐明。miRNA沉默某些关键的基因,进而改变了体细胞中的染色质、组蛋白修饰、DNA修饰等状态。目前,虽然已经发现一些靶点与miR-302相关,但是联合干扰这些靶点,并不能使得体细胞重编程为诱导多能干细胞。

要将多能性细胞应用于再生医学,仍需要将多能干细胞分化为特定类型的细胞或者前体细胞,如神经细胞、心肌细胞、造血细胞等,并可避免多能干细胞潜在的成畸胎瘤特性。寡能干细胞的分化,体细胞间、不同谱系的寡能干细胞间的直接转化也可以降低这种风险。近年来,有报道纤维细胞可被转录因子Gata4、Mef2c、Tbx5、Hand2等转变为心肌细胞^[11-12]、也可被Gata4、Hnf1a和Foxa3转变为肝脏细胞^[13]、由Oct4转变为血液前体细胞^[14]、被Sox2等转为神经干细胞^[15-17]、被Brn2(或叫Pou3f2)、Ascl1和Myt11转变为神经元^[18-20]等。可以预计,miRNA同样在分化、转分化中发挥重要作用。在造血系统谱系分化中,miR-150、miR-34a促使巨核细胞—红细胞前体向巨核细胞分化^[79-80],miR-155的作用则与miR-150相反;而miR-125a可以通过降低凋亡来促进造血干细胞的数量^[81];在小鼠和人的胚胎干细胞分化中,miR-1和miR-133可以通过抑制内胚层和外胚层的分化,从而促进细胞向中胚层的分化^[82];miR-9和miR-124可以将人纤维细胞转分化为神经细胞^[83];miR-1、miR-133、miR-208、miR-499等可以将纤维细胞转分化为心肌细胞等^[84];miR-143和miR-145在血管平滑肌细胞的命运决定和可塑性中起关键作用^[85]。

特别地,近年来很多研究工作集中在皮肤纤维细胞等与神经细胞、神经干细胞间的相互转变上,这个技术的转化效率较先得到iPSCs再分化要高,并绕过了iPSCs这个中间阶段。从目前的进展来看,Sox2这个转录因子最为核心,可以单因子实现向神经干细胞的转变^[15]。miR-302-367簇同样也促进了体细胞向神经前体细胞、成血管前体细胞的转变^[17,78],提示这个miRNA簇在重编程、转分化中起到了重要的作用。

在各种细胞命运调控中,miRNA的下游大多没

有完全阐明,只是验证了可能有联系的少数下游基因。而miRNA的调控对象众多,且随着不同细胞的mRNA谱变化而变,因此分化、转分化的命运转换中miRNA的作用机制仍待挖掘。细胞命运的变化,同时伴随着转录因子表达谱、miRNA表达谱的建立,转录因子与miRNA本身又是网络状的调节方式,二者或无主次之分,在iPS细胞的产生中发挥了协同作用。在单细胞水平、不同时间点对重编程、转分化进行分析,将发现这些复杂过程中的重要路标及路障,从看似繁杂无序的变化中寻找出其秩序^[86-89]。

4 展望

2012年诺贝尔生理或医学奖被授予了英国的John B. Gurdon和日本京都大学科学家Shinya Yamanaka,因他们发现成熟的体细胞可以通过重编程重新获得多能性。Yamanaka的贡献已在前文提到,Gurdon的贡献在于通过核移植证明了动物的体细胞依然具发育为一个完整个体的全能性^[90]。

从受精卵发育到成体的过程中形成了各种细胞谱系,并进而有机组合形成组织与器官构成了生命体,其中发生的细胞命运决定与miRNA、转录因子极为相关。细胞命运的决定机制、调控手段和转变效率有待更多的研究、更新的技术手段来揭示。随着ChIP-Seq、RIP-Seq、蛋白质组学、单细胞分析技术等的发展,以及ZFN、TALEN等介导的基因敲除技术的发展,研究者将有更多途径深入研究miRNA对于细胞命运调控的机制。本文主要探讨微RNA,科学研究中却不能因小失大、以管窥豹。在细胞命运的调控中,其他更长的非编码RNA同样发挥着重要的功能,和蛋白质构成了调控生命体各项活动的网络。虽然已有报道长非编码RNA影响干细胞的多能性、心血管细胞的生成^[91-92],科学界对长非编码RNA功能的了解依然非常有限。非编码RNA的研究有望从基础研究转化为实际应用。随着非编码RNA和干细胞研究的深入,科学家终将建立高效安全快速的重编程和转分化、转分化等细胞命运调控技术,并应用于疾病模型建立、药物筛选和再生医学中,为人们的健康造福。

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 Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2007; 2(12): 3081-9.
- 3 Yu JY, 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.
- 4 Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, *et al.* Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(14): 5434-8.
- 5 Feng R, Desbordes SC, Xie H, Tillo ES, Pixley F, Stanley ER, *et al.* PU.1 and C/EBP α / β convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(16): 6057-62.
- 6 Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise Reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117(5): 663-76.
- 7 Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, *et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 2002; 5(4): 308-15.
- 8 Shen CN, Slack JMW, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000; 2(12): 879-87.
- 9 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-U30.
- 10 Marro S, Pang ZP, Yang N, Tsai MC, Qu K, Chang HY, *et al.* Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* 2011; 9(4): 374-82.
- 11 Song KH, Nam YJ, Luo X, Qi XX, Tan W, Huang GN, *et al.* Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012; 485(7400): 599-604.
- 12 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 13 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.
- 14 Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468(7323): 521-6.
- 15 Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, *et al.* Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 2012; 11(1): 100-9.
- 16 Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 465-72.
- 17 Wang L, Wang L, Huang W, Su H, Xue Y, Su Z, *et al.* Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods* 2013; 10(1): 84-89.
- 18 Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzskova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011; 476(7359): 224-7.
- 19 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 20 Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, *et al.* Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods* 2012; 9(6): 575-8.
- 21 Liu XJ, Li F, Stubblefield EA, Blanchard B, Richards TL, Larson GA, *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res* 2012; 22(2): 321-32.
- 22 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.
- 23 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 376-88.
- 24 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- 25 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-6.
- 26 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-4.
- 27 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853-8.
- 28 Bartel DP. MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 29 Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- 30 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 39(Database): D152-7.
- 31 Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, *et al.* Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 2008; 134(3): 521-33.
- 32 Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004; 270(2): 488-98.
- 33 Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; 339(2): 327-35.
- 34 Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
- 35 Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: Key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(2): 116-25.
- 36 Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the *miR-17-92* family of miRNA clusters. *Cell* 2008; 132(5): 875-86.
- 37 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
- 38 He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7): 522-31.
- 39 Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-62.

- 40 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 41 Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(12): 2033-42.
- 42 Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448(7150): 191-5.
- 43 Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005; 2(3): 185-90.
- 44 Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336(6200): 688-90.
- 45 Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- 46 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947-56.
- 47 Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2007; 39(3): 380-5.
- 48 Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 2008; 40(12): 1478-83.
- 49 Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2010; 463(7281): 621-6.
- 50 Lin SL, Chang DC, Ying SY, Leu D, Wu DT. MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of the CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9473-82.
- 51 Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, Sheridan R, Mihailovic A, Tuschl T, *et al.* Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Gene Dev* 2011; 25(20): 2173-86.
- 52 Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6426-38.
- 53 Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 2008; 455(7216): 1124-8.
- 54 Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009; 11(12): 1487-95.
- 55 Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan GJ, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; 137(4): 647-58.
- 56 Guo XD, Liu QD, Wang GY, Zhu SC, Gao LF, Hong WJ, *et al.* microRNA-29b is a novel mediator of Sox2 function in the regulation of somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2013; 23(1): 142-56.
- 57 Lin CH, Jackson AL, Guo J, Linsley PS, Eisenman RN. Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J* 2009; 28(20): 3157-70.
- 58 Li ZH, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 2011; 30(5): 823-34.
- 59 Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. HuR recruits *let-7*/RISC to repress c-Myc expression. *Gene Dev* 2009; 23(15): 1743-8.
- 60 Chang TC, Zeitels LR, Hwang HW, Chivukula RR, Wentzel EA, Dews M, *et al.* Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated *let-7* repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9): 3384-9.
- 61 Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, *et al.* A feedback loop comprising *lin-28* and *let-7* controls *pre-let-7* maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 987-93.
- 62 Neveu P, Kye MJ, Qi S, Buchholz DE, Clegg DO, Sahin M, *et al.* MicroRNA profiling reveals two distinct p53-related human pluripotent stem cell states. *Cell Stem Cell* 2010; 7(6): 671-81.
- 63 Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotech* 2009; 27(5): 459-61.
- 64 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.
- 65 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.
- 66 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.
- 67 Pfaff N, Fiedler J, Holzmann A, Schambach A, Moritz T, Cantz T, *et al.* miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO Rep* 2011; 12(11): 1153-9.
- 68 Liu Y, Hoya-Arias R, Nimer SD. The role of p53 in limiting somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2009; 19(11): 1227-8.
- 69 Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, *et al.* miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 2011; 13(11): 1353-60.
- 70 Wang J, He Q, Han C, Gu H, Jin L, Li Q, *et al.* p53-facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. *Stem Cells* 2012; 30(7): 1405-13.
- 71 Ye D, Wang G, Liu Y, Huang W, Wu M, Zhu S, *et al.* MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. *Stem Cells* 2012; 30(8): 1645-54.
- 72 Yang CS, Li ZH, Rana TM. microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA* 2011; 17(8): 1451-60.
- 73 Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, Wu DT. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* 2010; 39(3): 1054-65.
- 74 Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008; 14(10): 2115-24.

- 75 Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, *et al.* Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(5): 443-8.
- 76 Hu S, Wilson KD, Ghosh Z, Han L, Wang Y, Lan F, *et al.* MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells* 2013; 31(2): 259-68.
- 77 Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, *et al.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011; 8(6): 633-8.
- 78 Kurian L, Sancho-Martinez I, Nivet E, Aguirre A, Moon K, Pendaries C, *et al.* Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods* 2013; 10(1): 77-83.
- 79 Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, *et al.* MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell* 2008; 14(6): 843-53.
- 80 Edelstein LC, Bray PF. MicroRNA in platelet production and activation. *Blood* 2011; 117(20): 5289-96.
- 81 Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, *et al.* MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14229-34.
- 82 Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, *et al.* MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3): 219-29.
- 83 Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 2011; 476(7359): 228-31.
- 84 Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, *et al.* MicroRNA-mediated *in vitro* and *In vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circul Res* 2012; 110(11): 1465-73.
- 85 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009; 460(7256): 705-10.
- 86 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* 2012; 45(1): 34-42.
- 87 Polo Jose M, Anderssen E, Walsh Ryan M, Schwarz Benjamin A, Nefzger Christian M, Lim Sue M, *et al.* A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 2012; 151(7): 1617-32.
- 88 Buganim Y, Faddah Dina A, Cheng Albert W, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchical phase. *Cell* 2012; 150(6): 1209-22.
- 89 Pan G, Pei D. Order from Chaos: Single cell reprogramming in two phases. *Cell Stem Cell* 2012; 11(4): 445-7.
- 90 Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 1962; 4(2): 256-73.
- 91 Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 2011; 477(7364): 295-300.
- 92 Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, *et al.* *Braveheart*, a Long Noncoding RNA Required for Cardiovascular Lineage Commitment. *Cell* 2013; 152(3): 570-83.