

RNAs 介导的干细胞诱导技术研究进展

姜永华^{①②} 王艺磊^② 张子平^{②③*} 洪万树^①

① 厦门大学海洋与地球学院 厦门 361005; ② 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021;

③ 福建农林大学动物科学学院 福州 350002

摘要: 诱导性多能干细胞 (iPSCs) 技术可重编程体细胞为胚胎干细胞 (ESCs) 样的多能性细胞, 在药物筛选、再生医学等领域具有巨大的应用潜力。iPSCs 技术自 2006 年首次报道用逆转录病毒转导一组转录因子, 将小鼠 (*Mus musculus*) 成纤维细胞成功重编程为 iPSCs 以来, 便不断改进和完善。近年来, 不引起任何基因组改变的 RNAs 介导的 iPSCs 技术成为新兴的研究热点, 主要包括修饰 mRNAs 法、miRNAs 法、siRNAs 法和 lncRNAs 法等。本文综述了 RNAs 介导的各种 iPSCs 技术的研究进展, 分析了这些技术的优势、存在的不足及改进的方向等, 为 iPSCs 技术的发展与应用提供参考。

关键词: 诱导性多能干细胞; RNAs; 研究进展

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 04-692-15

RNAs-mediated Technologies for Inducing Pluripotent Stem Cells

JIANG Yong-Hua^{①②} WANG Yi-Lei^② ZHANG Zi-Ping^{②③*} HONG Wan-Shu^①

① *College of Ocean & Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005;* ② *Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea,*

Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021; ③ *College of Animal Science,*

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs), which may replace embryonic stem cells (ESCs) and have great application potential in drug screening, regenerative medicine, etc. Since the iPSCs development by retroviral transduction of a defined set of transcription factors into fibroblasts (mF) was first reported in 2006 in mouse (*Mus musculus*), more new strategies have been developed to improve and refine the reprogramming technology. Recent technology of RNAs-mediated iPSCs becomes an emerging research hotspot which provides an optimism for the generation of safe iPSCs without any genomic modification. RNAs-mediated iPSCs technology includes the application of modified mRNAs, microRNAs (miRNAs), siRNAs and lncRNAs. In this paper, the research progress of various RNAs-mediated iPSCs technologies are reviewed, including the advantages, deficiencies and the improvement of these techniques, so as to provide references for the development and application of iPSCs technology.

Key words: Induced pluripotent stem cells; RNAs; Research progress

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 41306174) ;

* 通讯作者, E-mail: zhangziping@hotmail.com;

第一作者介绍 姜永华, 女, 副教授; 研究方向: 分子生物学; E-mail: yhjiang1974@jmu.edu.cn。

收稿日期: 2015-12-16, 修回日期: 2016-03-31 DOI: 10.13859/j.cjz.201604023

诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术自 Takahashi 等 (2006) 首先建立以来, 便为干细胞的基础研究和临床疾病治疗研究拓展了新思路, 解决了免疫排斥和胚胎毁损等伦理学争议, 在干细胞基础研究、新药筛选、药物毒理研究和再生医学等领域具有广阔的研究和应用前景。迄今为止, iPSCs 技术已成功实现多种哺乳动物、多种体细胞的重编程 (Stadtfield et al. 2010, Ruggieri et al. 2014, Tsai et al. 2015), 并成功诱导 iPSCs 分化为特定细胞且应用于临床治疗 (Grskovic et al. 2011, Gao et al. 2013, Ruggieri et al. 2014)。但目前的 iPSCs 技术仍存在着诱导效率较低、速度较慢、产量低、价格昂贵及技术难度大等问题, 严重制约了其在临床上的大规模应用。本文对主要的 iPSCs 诱导方法进行了综述, 重点归纳了新兴的 RNAs 介导 iPSCs 技术的研究进展, 以期为 iPSCs 诱导技术的提升和改进提供参考, 为最终实现 iPSCs 技术的临床应用奠定基础, 也为今后的研究开拓视野和方向提供参考。

1 iPSCs 诱导方法简介

细胞重编程 (reprogramming cells) 是指分化的细胞在特定条件下被逆转后恢复到全能性状态的过程。其中 OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、NANOG、LIN28 (OSKMNL) 等转录因子是诱导体细胞重编程的关键因子, 故被称为重编程因子 (reprogramming factors)。最基本的重编程因子主要有两类: Yamanaka 因子 (OSKM) (Kashyap et al. 2009) 和 Thomson 因子 (OSNL) (Cox et al. 2010)。它们通过激活全能性基因的表达, 同时抑制体细胞中组织特异性基因的表达, 使体细胞重新获得干细胞的特性 (Gurdon et al. 2008)。实际上, 在 iPSCs 诱导中, 重编程因子种类、数量的选择与动物种类和受体细胞类型等密切相关 (申红芬等 2009), 因此很多 iPSCs 技术采用的是这两类因子的多种组合。目前, 体细胞重编程为 iPSCs

的方式主要包括以下几种, 每种方式均有其优缺点 (Lai et al. 2011, Robinton et al. 2012): (1) 最早的经典的 DNA 法: 由 Takahashi 等 (2006) 首创, 用逆转录病毒 (Takahashi et al. 2006, Huangfu et al. 2008)、慢病毒 (Sommer et al. 2009)、转座子 (Woltjen et al. 2009)、腺病毒 (Zhou et al. 2012, Tsai et al. 2015)、质粒 (Si-Tayeb et al. 2010) 等载体将 OSKM 等重编程因子转染鼠成纤维细胞成功获得 iPSCs, 该法虽然诱导效率较高 (0.10% ~ 2.00%) (Robinton et al. 2012), 但其引起插入突变和致癌性风险很高 (Stadtfield et al. 2010, Zhou et al. 2012, Tsai et al. 2015)。(2) 蛋白质法: 将重编程因子在原核 (Nemes et al. 2013) 或真核 (Zhang et al. 2012) 表达载体中表达为重组蛋白后导入体细胞实现重编程, 避免了插入突变, 提高了安全性, 但诱导效率相当低 (0.001%), 技术难度高, 需要大量纯化蛋白, 成本昂贵 (Robinton et al. 2012)。(3) 小分子化合物法: 筛选适当的小分子化合物取代重编程因子, 通过影响细胞的表现遗传学和关键信号通路, 实现体细胞的重编程 (Li Y Q et al. 2011, Federation et al. 2014)。该法也避免了插入突变, 提高了安全性, 但同样存在诱导效率低的难题 (0.01% ~ 0.10%) (Robinton et al. 2012)。(4) 仙台病毒法: 通过仙台病毒将 OSKM 等转录因子导入人 (*Homo sapiens*) 成纤维细胞 (Fusaki et al. 2009) 或血液 T 细胞 (Seki et al. 2010) 中, 成功诱导出 iPSCs。由于仙台病毒具有 RNA 基因组, 只在细胞质中表达, 故避免了基因组整合的风险, 同时提高了诱导效率 (1.00%) (Robinton et al. 2012) 和速度, 但含有病毒复制子的细胞难以清除 (Seki et al. 2010)。Ban 等 (2011) 通过构建热敏感仙台病毒载体不仅成功将人成纤维细胞 (human fibroblasts, hF)、CD34⁺ 脐血细胞重编程, 而且通过温度变化清除了多余的病毒复制子。(5) RNAs 法: 该法具有诱导速度快、效率较高、无基因组整合和插入风险等特点, 成为 iPSCs

诱导方法研究的新热点, 其诱导的 iPSCs 被称为核糖核酸诱导多能干细胞 (RNA induced pluripotent stem cells, RiPSCs)。迄今用于 iPSCs 诱导的 RNAs 主要有 mRNAs 和非编码 RNAs (ncRNAs) 两大类。本文重点对 RNAs 介导的 iPSCs 诱导研究进展进行了综述, 以期为 iPSCs 技术的深入研究提供参考。

2 RNAs 介导的 iPSCs 诱导技术

2.1 mRNAs 介导的 iPSCs 诱导技术

mRNAs 介导的 iPSCs 诱导技术主要通过体外构建重编程因子的 mRNAs 系统, 并对 mRNAs 进行相应的修饰后, 通过脂质体转染体细胞, 实现重编程为 iPSCs (Rosa et al. 2010, Warren et al. 2010, Yakubov et al. 2010, Li M et al. 2011, Sul et al. 2012, Tavernier et al. 2012, Warren et al. 2012, Yoshioka et al. 2013)。mRNAs 介导的 iPSCs 诱导技术原理见图 1。mRNAs 介导的基因传递在人干细胞和祖细胞中具有相当高的效率且安全 (Wiehe et al. 2007, van Nuffel et al. 2010)。修饰 mRNAs 法的构建为体细胞重编程为 iPSCs 和指导细胞分化命运提供了一种更加简便、安全、高效、可控的诱导策略。mRNAs 一进入细胞质即开始翻译, 不需要依靠细胞的转录体系, 这也是其快速表达和高产的原因, 转录效率高达 1.00% ~ 4.40% (Robinton et al. 2012)。

最经典的修饰 mRNAs 法是 2010 年 Warren 等采用的从三个水平诱导人成纤维细胞重编程的修饰 mRNAs 法: (1) 分子水平: 对 T₇ RNA 聚合酶体外转录的 OSKML (+GFP) 等重编程因子的 mRNAs 进行 5'端糖基化和甲基化修饰, 将 5'甲基胞苷完全代替胞嘧啶、假尿嘧啶代替尿嘧啶, 碱性磷酸酶处理改变 mRNAs 磷酸键的结构等, 从而提高体外转录 mRNAs 的活性与稳定性, 提高蛋白产量; (2) 细胞水平: 在培养基中加入干扰素 B18R, 来躲避细胞应答, 去除细胞毒性; (3) 培养条件及转染因子的筛选: 如低氧培养和几个重编程因子的修饰

mRNAs 每日转染等。通过这些改变, 显著提高了多种体细胞的重编程效率和能力。由于此法未改变基因结构, 故它比传统的 OSKM 法诱导的 iPSCs 更像胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)。该法转染成功率高达 70%, 重编程速度比传统 OSKM 诱导法加快一倍, 效率增加 100 倍以上, 达 1.34%, 且无致瘤风险, 适用性更广。与蛋白质法相比, 该法还具有以下优点: ① 通过 mRNAs 表达出来的蛋白比直接转进去的蛋白量多; ② 经过修饰的 mRNAs 半衰期较直接转进去的蛋白长; ③ mRNAs 表达出来的蛋白进行加工及核定位较容易, 而转进去的蛋白存在一些不确定因素, 相对较难发挥功效。类似的 mRNAs 法还见于: Yakubov 等 (2010) 通过 T₇ RNA 聚合酶和线性化质粒 pTMA 体外大量转录 OSKMLN 的 mRNAs, 利用脂质体 (RNAiMAX) 连续 5 次转染人包皮成纤维细胞 (hFFs) 后, 成功获得 iPSCs, 并用干扰素 B18R 抑制细胞毒性; Ahfeldt (2011) 将 OSKM (+SV40) 的 mRNAs 经 T₃ 体外转录, 构建 RN3P 质粒并修饰后, 采用电穿孔法转染人成纤维细胞, 在低氧培养条件下 (5% O₂) 也成功获得 iPSCs, 诱导率高达 2.00% 以上; Tavernier 等 (2012) 通过脂质体 (RNAiMAX) 把 T₇ RNA 聚合酶体外转录的 OSKM (+GFP) 因子的 mRNAs 导入鼠胚胎成纤维细胞 (mEFs) 中, 转染 3 次也获得了 iPSCs; Zou 等 (2013) 通过类似的修饰 mRNAs 法不仅成功将人成纤维细胞重编程为 iPSCs, 还使其重新分化为骨细胞; Mandal 等 (2013) 则着重对编码重编程因子的 mRNAs 修饰所必须的主要参数包括媒介选择、质量控制、步骤优化等进行了详细的研究和描述, 优化了修饰 mRNAs 法的诱导程序和效率。此外, Yoshioka 等 (2013) 通过 SP₆ 或 T₇ 聚合酶体外转录并合成了一个具有自我复制能力、能够高水平表达 OSK (M 或 GLIS1) 四个重编程因子的 VEE-RF RNA 复制子, 采用脂质体 2000 使其转染人成纤维细胞, 成功诱导出 iPSCs, 进一步拓展了 mRNAs 水平的重编程

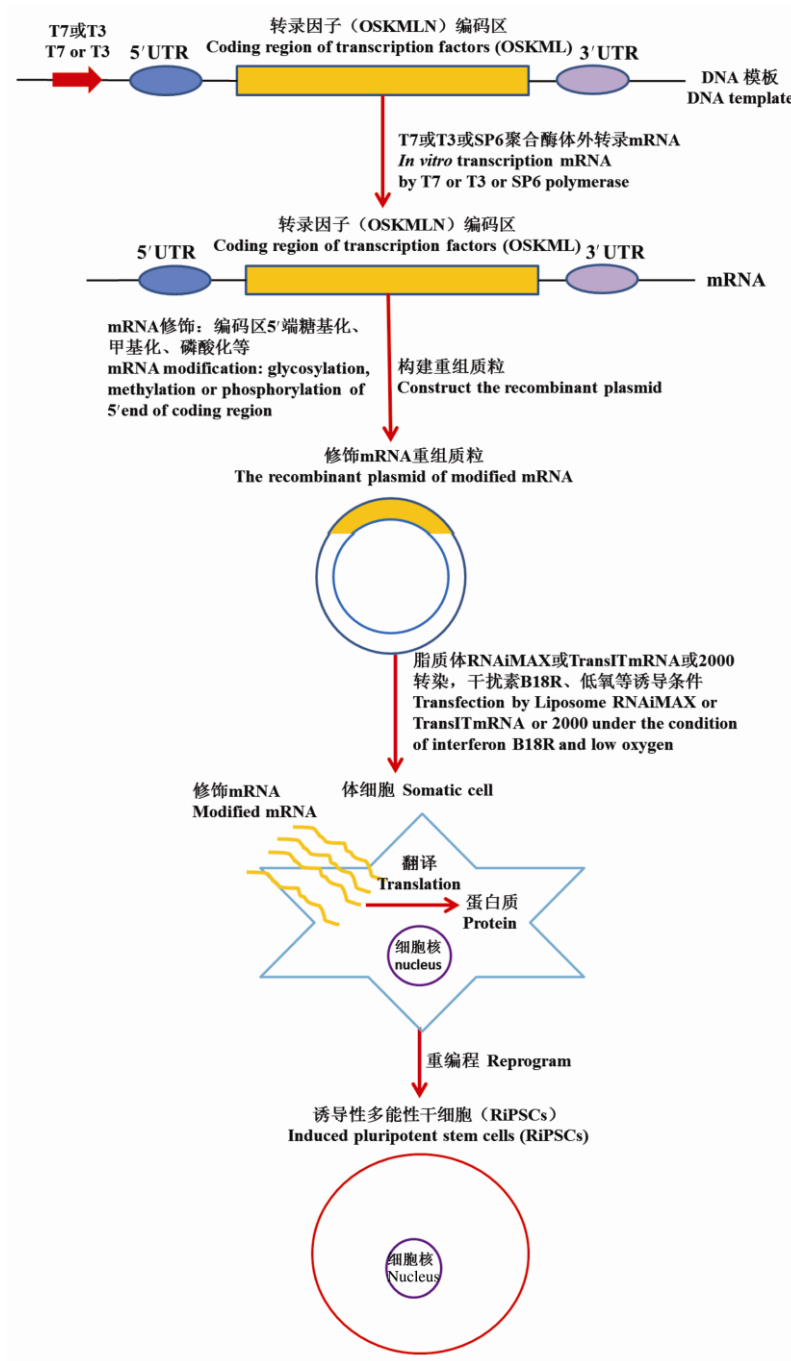


图 1 mRNAs 介导的体细胞重编程为 RiPSCs 原理示意图

Fig. 1 The schematic diagram for RiPSCs production mediated by mRNAs

RiPSCs. RNAs 介导的诱导性多能干细胞; OSKMLN. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG.

RiPSCs. RNAs-mediated induced pluripotent stem cells; OSKML. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG.

技术。Pratico 等 (2015) 还利用 mRNAs 介导的方法把人自身真皮成纤维细胞成功诱导为功

能性的心祖细胞。

另外, DNA 甲基化引起的表观遗传修饰能

通过重编程因子的过表达而实现体细胞向 iPSCs 的转变。DNA 甲基化分为两种类型: DNA 甲基化—引起基因转录沉默, DNA 去甲基化—激活全能性基因的表达, 实现体细胞重编程。Lu 等 (2012) 发现鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, mEF) 的 *Oct4* 和 *Nanog* 基因的启动子在 iPSCs 形成过程中发生去甲基化。DNA 甲基化的类型和程度与重编程因子的类型密切相关。Planello 等 (2014) 分别采用 Yamanaka 因子 (OSKM) 和 Thomson 因子 (OSNL) 进行体外转录构建 pMXs 载体, 脂质体 (RNAiMAX) 和干扰素 B18R 转染, 最终诱导人成纤维细胞转变为 iPSCs, 并发现重编程中 Yamanaka 因子主要引起 CpGs 不脱甲基, Thomson 因子则主要引起 CpGs 不甲基化, 从而使获得的 Y-iPSCs 和 T-iPSCs 中的 DNA 甲基化异常在位置、类型和程度上存在显著差异。

值得注意的是, 修饰 mRNAs 法虽然方便、高效、安全, 但存在两个主要障碍限制了其应用: 一是 mRNAs 的半衰期短, 稳定性较差 (Plews et al. 2010); 二是必须多次转染才能保持其重编程活性, 但会引起细胞毒性大增。修饰 mRNAs 法的操作要点包括: (1) 所有的试剂必须严格保持不变、避免不必要的中间步骤、在无 RNA 酶的条件下操作; (2) 每次修饰转录因子的 mRNA 均需包含一个报告基因 (如绿色荧光蛋白 GFP) 的修饰 mRNA, 用来监测体外转录过程, 报告基因还必须通过转染到细胞内、检测其表达来确认其具有高转染效率; (3) 转录因子的修饰 mRNA 需要确认其具有高蛋白表达水平方可用于转染实验。(4) 建议修饰 mRNAs 介导的重编程实验均采用 Pluriton 培养基; (5) 通过培养不同密度的细胞确保重编程成功率; (6) 转染时不能使用抗生素, 故应保持无菌环境; (7) 转染实验还应包含两个重要的对照: 一个已知的可成功重编程的样本 (如 Bj 成纤维细胞) 作为阳性对照来确认所有试剂、重编程培养基、mRNA 复合物均能正常发挥作用, 一个仅与修饰 mRNA 共转染的报告基

因 (GFP) 作为阴性对照来监测重编程过程中修饰 mRNA 或转染试剂的毒性和显著的形态学变化。(8) 转染应在每天同一时间进行, 以保持转染的时间间隔恒定。

此外, Howden 等 (2015) 报道了一种最新的修饰 mRNAs 法——靶向诱导 iPSCs 的方法, 也称为“一步法”, 即基因修饰和靶向诱导同时进行, 靶向诱导人成纤维细胞为 iPSCs 的效率高达 8.00%。与其他修饰 mRNAs 法不同的技术要点包括: (1) 电穿孔方式诱导; (2) 采用 OSKMNL 和 SV40 7 种重编程因子, 体外构建特异性重组载体 pEP4EO2SEN2L、pEP4EO2SET2K、pEP4EO2SEM2K; (3) miRNA302/367 族介导, 其表达可提高 iPSCs 产量 100 倍以上; (4) Cas9/CRISPR 系统, 使靶向诱导的脱靶效应降至最低; (5) DNMT3B 作为打靶基因; (6) 加强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 和 OCT4 作为 iPSCs 标记, 因其对细胞的多能性最敏感。该法仅需要单一地进行克隆即可在 2 周内获得大量 iPSCs, 不需药物筛选, 操作相对更加简便、快捷、高效, 是又一极有潜力的 iPSCs 技术。Cody 等 (2016) 还对 Cas9/CRISPR 系统在人 iPSCs 中的功能进行了研究。

总之, 修饰 mRNAs 法加快了细胞重编程机制的研究, 但对该技术获得细胞的安全性仍需保持警惕, 特别要确保重复转染和长时间抑制干扰素信号不会引起细胞的任何持久改变或对细胞先天性免疫应答缺失造成选择压力。更重要的是, 目前所有方法获得的 iPSCs 在积累和筛选肿瘤抑制基因、致癌基因、细胞周期调控重要基因的突变时没有特异性 (Gore et al. 2011, Laurent et al. 2011)。因此不仅要注重现有重编程方法的发展, 还要注重探索重编程过程中限制有害突变积累的新方法。

目前, 本项目组正在进行修饰 mRNA 法介导的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) iPSCs 技术的研究, 拟通过对 OSKM 4 个重编程因子的 mRNA 进行修饰后, 转染大黄鱼体细胞

以获得 iPSCs, 进而建立一种安全、高效、快速的大黄鱼 iPSCs 诱导方法, 以期为解决大黄鱼养殖过程中出现的各种问题提供新的思路, 也可为其他动物的 iPSCs 诱导提供参考(Chen et al. 2015, Jiang et al. 2015)。目前我们已经克隆了大黄鱼 *Oct4* (GenBank: KJ588781)、*Sox2* (GenBank: KJ588783)、*c-Myc* (GenBank: KJ588782) 3 个重要重编程因子的全长 cDNA 序列, 从 NCBI 获得了大黄鱼 *Klf4* 的全长 cDNA 序列, 并已对这 4 个 Y-因子进行了时空表达分析, 建立了它们的时空表达谱, 为进一步开展 iPSCs 诱导奠定了坚实的基础。

2.2 ncRNAs 介导的 iPSCs 诱导技术

表观遗传调控对 iPSCs 的产生具有至关重要的作用, 除了 DNA 甲基化 (Planello et al. 2014) 以外, ncRNAs 也是表观遗传调控的重要方式之一, 在调控基因的表达中发挥重要作用 (Armstrong et al. 2006)。参与重编程的 ncRNAs 主要包括 microRNAs (miRNAs, < 200 bp)、

小干扰 RNAs (siRNAs, < 200 bp) 和长非编码 RNAs (lncRNAs, > 200 bp) 等 (Kawaji et al. 2008)。

2.2.1 miRNAs 法

miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编码单链 RNAs, 长约 21 ~ 25 nt, 几乎参与调节所有的细胞过程, 如细胞分裂、分化、增殖、凋亡等, 是基因调控网络 (gene regulatory networks, GRNs) 不可或缺的部分 (Bartel 2009)。miRNAs 能通过与靶基因 mRNA 3'非翻译区 (3'UTR) 的互补程度降解靶 mRNA 或阻遏其翻译, 在转录后水平调控靶基因的表达 (Song et al. 2006, Barroso-delJesus et al. 2008, Judson et al. 2009)。miRNAs 法介导的 iPSCs 诱导技术原理如图 2 所示。

研究表明, miRNAs 对干细胞的自我更新、多能性维持和定向分化具有重要的调控功能 (范力星等 2006, 张璇等 2010, 蒋豆蔻等 2015)。Houbaviy 等 (2003) 发现 miR-290 ~ 295 簇在鼠的胚胎干细胞中表达, 其同系物 miR-371 ~ 373 簇在人胚胎干细胞中表达 (Suh

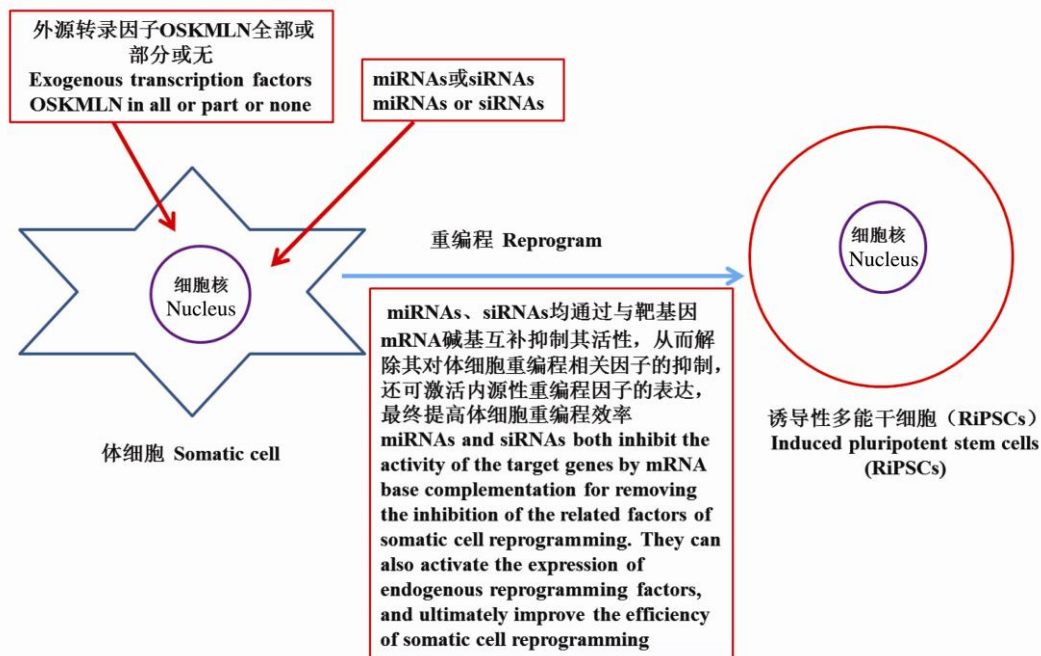


图 2 miRNAs、siRNAs 介导的体细胞重编程为 RiPSCs 原理示意图

Fig. 2 The schematic diagram for RiPSCs production mediated by miRNAs, siRNAs

RiPSCs. RNAs 介导的诱导性多能干细胞; OSKMLN. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG。

RiPSCs. RNAs-mediated induced pluripotent stem cells; OSKMLN. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG.

et al. 2004), 且胚胎干细胞缺乏成熟 miRNAs 将会导致其增殖和分化能力的丧失 (Kanellopoulou et al. 2005, Murchison et al. 2005)。破坏 miRNAs 会导致胚胎干细胞分化异常以及精原干细胞在体内的缺失 (Lüningschröer et al. 2013)。还有研究指出, 体细胞重编程过程中与多能性相关的 miRNAs (例如 miR-17 家族、miR-290 ~ 295 簇、miR-302 ~ 367 簇) 表达上调 (Li Z et al. 2011, Liao et al. 2011, Polo et al. 2012, Judson et al. 2013), 与分化相关的 miRNAs (例如 miR-34 家族) 表达则下调 (Choi et al. 2011, Polo et al. 2012)。此外, miRNAs 还与 OSN 和 TCF3 等多能性因子密切相关 (Barroso-delJesus et al. 2008, Marson et al. 2008)。这些证据均表明, miRNAs 在 iPSCs 的诱导和维持中发挥重要作用, 这也是其介导 iPSCs 的基础。

Judson 等 (2009) 首次报道了 miRNAs 对体细胞重编程的影响。miR-290 ~ 295 簇 (miR-291-3p、miR-294 和 miR-295) 伴随着 OSK 因子的表达, 在靶因子 GFbRII、Lats2、Akt1、Cdkn1a、Pten、Zfp148、Hivep2、Ddhd1、Dpysl2、Cfl2 等的作用下可成功将鼠胚胎成纤维细胞重编程为 iPSCs, 其中 miR-294 的影响最大并将诱导效率提高至 0.40% ~ 0.70%, 且能增强 OSK 的重编程效力。而且 miR-290 簇能够完全取代 c-MYC 的作用, 降低了致瘤性的风险。随后 miRNAs 诱导 iPSCs 技术取得了长足的发展 (Sun et al. 2010, Leonardo et al. 2012), 越来越多的 miRNAs 被应用于 iPSCs 生产。Subramanyam 等 (2011) 发现, miR-370 ~ 373 簇 (miR-371, miR-372, miR-373) 可通过抑制靶因子 MBDII、MeCP1-p66、MeCP2、AOF1、AOF2、RHOC、TGFbRII 的活性, 解除其对间充质细胞转换及核染色质开放的阻碍, 伴随着 OSKM 因子的表达, 进而启动人体细胞重编程, 特别是 miR-372 对重编程有显著的促进作用。miRNAs 介导的 iPSCs 技术可不需要其他重编程因子即可实现 iPSCs 重编程, 已成为一个强

有力的重编程工具, 有望为再生医学提供高效、安全的细胞来源 (Herranz et al. 2010, Mallanna et al. 2010, Moradi et al. 2014)。

miRNAs 在体细胞重编程中发挥重要作用, 敲除一簇 miRNAs (例如 miR-302 ~ 367 簇) 会引起重编程的完全废止, 特异的 miRNAs 能单独或与其他转录因子一起高效促进 iPSCs 的生成和分化转移等 (Miyoshi et al. 2011, Hu et al. 2013)。Anokye-Danso 等 (2011) 通过 miR-302 ~ 367 簇的表达, 无需外源转录因子即可快速、高效地将人和鼠的体细胞重编程为 iPSCs, 且重编程效率比传统的 OSKM 法高两个数量级以上。主要的诱导流程包括: (1) 慢病毒载体构建: 先从 DNA 中 PCR 扩增 miR-302 ~ 367 簇或 miR-302a ~ 302d 簇, 再克隆到 pENTR1A 载体的 Acc65I 和 XhoI 限制性内切酶位点, 最后将其克隆到 pLOVE 载体的 BsrGI 位点获得 pLOVE-miR-302 ~ 367 载体。(2) 细胞培养: 鼠成纤维细胞取自鼠 *Oct4-GFP*、*Rosa26-LacZ* 和 *Hdac2^{lox/lox}* 胚胎, 培养于胚胎培养基中; 人皮肤成纤维细胞培养于含有 15% 牛血清白蛋白 (FBS)、青霉素/链霉素、L-谷氨酸的 DMEM/F12 培养基中; (3) 组蛋白脱乙酰基酶 (*Hdac2*) 的去除: 通过腺病毒转染 *Hdac2^{lox/lox}* 鼠胚胎成纤维细胞以去除 *Hdac2*; (4) 病毒颗粒形成: 用编码 miR-302 ~ 367、OSK 的 pLOVE 载体转染培养的人 293T 细胞, 每 24 h 或 48 h 收集转染细胞的上清液, 即为病毒颗粒; (5) 多能性干细胞的诱导: 每 1.0 ml 病毒颗粒与 0.5 ml 聚凝胺 (10 g/L) 混合后转染成纤维细胞, 转染后的人 (鼠) 成纤维细胞分别培养在人 (鼠) 胚胎培养基中。该法的诱导效率高达 10.00%, 且无需 OSKM 因子参与, 但 miR-367 的表达和 *Hdac2* 的抑制是诱导成功所必须的, miR-367 的表达能激活细胞自身的多能性因子 OCT4 的表达, miR-302 的启动子区相当保守, 且由多能性因子 OCT4 驱动 (Marson et al. 2008), 故而能启动重编程。miRNAs 和 *Hdac* 介导的通路意味着一条强大的重编程方式的存在。类似地,

Miyoshi 等 (2011) 将成熟 miR-200c 与 miR-302s、miR-369s 组成复合体, 无需载体和转录因子, 直接转染人 (鼠) 的体细胞, 即可引起重编程, 转染率高达 75.10%, 但诱导率很低, 其中鼠的诱导率为 5 个 GFP (绿色荧光蛋白) 阳性克隆/(5×10^4) 体细胞, 人的诱导率为 2 个 GFP 阳性克隆/(1×10^5) 体细胞。此外, miR-200 在 BMP、ZEB2 等辅助因子及 OS 转录因子的协同作用下, 还能成功诱导间叶细胞向上皮样细胞转换及 iPSCs 的产生 (Samavarchi-Tehrani et al. 2010, Wang G et al. 2013)。

miRNAs 还参与 DNA 的甲基化调控 (Lin et al. 2011)。人 miR-302 只存在于胚胎干细胞和多能性细胞中 (Suh et al. 2004, Wilson et al. 2009), 是胚胎干细胞更新和多能性维持的关键因子 (Rosa et al. 2011)。Lin 等 (2011) 通过诱导 miR-302 表达, 无需转录因子即可将人毛囊 (human hair follicle, hHF) 细胞成功重编程为 iPSCs, 参与的靶因子包括 AOF1、AOF2、MECP1-p66、MECP2, 其中 miR-302 的表达依赖于 AOF2-DNMT1 的抑制作用, 表明基因组的甲基化模式对人毛囊细胞的高效重编程是必须的。此外, miR-302 还可取代 OS 等转录因子将人和鼠的体细胞重编程为 iPSCs (Lin et al. 2008, 2011, Subramanyam et al. 2011), 其作用机制为 miR-302 通过抑制胞质基因和多个关键表观遗传调控子的表达, 对 DNA 进行去甲基化, 从而引起体细胞重编程 (Hu et al. 2013, Lu et al. 2014), 因为 miR-302 能抑制与 DNA 甲基化相关的胺氧化酶 1 基因 (*Aof1*) 的表达 (Gregory et al. 2008, Ciccone et al. 2009)。

miRNAs 还通过抑制 p53 通路参与重编程。抑癌基因 p53 对 DNA 的损伤应答、细胞周期终止、衰老和凋亡等起着重要的促进作用, 而对重编程具有阻碍作用, 故抑制 p53 的表达对产生安全、高质量的 iPSCs 至关重要, 可以提高重编程的效率 (Kanellopoulou et al. 2005)。miR-145 是 P53 (鼠 Trp53, 人 TP53) 的直接

靶 miRNA, 属于 p53 调控网络的成员, 能显著抑制 OCT4 的功能 (Suzuki et al. 2009), 增强 miR-145 的表达会抑制 OSK 等多能性因子的表达, 进而破坏胚胎干细胞的自我更新能力 (Cordes et al. 2009)。而 P53 能促进 miR-145 的成熟, 抑制 p53 通路则会引起 miR-145 的表达下调, 进而促进重编程内源基因的表达, 实现体细胞的重编程 (Suzuki et al. 2009)。此外, miR-138、miR-17、miR-199 等家族成员也通过抑制 p53 通路来增加 iPSCs 形成 (Choi et al. 2011, Li Z et al. 2011, Lu et al. 2012, Wang et al. 2012, Ye et al. 2012)。这些结果均表明, miRNAs 是细胞重编程的有力推动者, 在 iPSCs 技术领域具有广泛的应用前景。目前 miRNAs 介导的重编程技术还不成熟, 一些关键问题亟待解决, 如重编程中 miRNAs 的表达模式、miRNAs 的靶目标、体细胞重编程为不同组织干细胞所对应的 miRNAs、miRNAs 与重编程因子的合作模式等。解决这些问题将有助于丰富 miRNAs 介导的重编程技术, 加快 miRNAs 在 iPSCs 生产上的应用。

2.2.2 siRNAs 法 siRNAs 是外源性的具有沉默效应的非编码双链小 RNAs, 与 miRNAs 类似, 长约 21 ~ 25 nt, 通过降解靶基因的 mRNA 或影响 mRNA 的稳定性, 在转录后水平和翻译水平抑制靶基因活性 (Lipardi et al. 2001)。利用 siRNAs 的抑制效应, siRNAs 也被应用于体细胞重编程研究, 能显著提高 iPSCs 的诱导效率。siRNAs 法介导的 iPSCs 诱导技术原理见图 2。

目前, siRNAs 主要通过干扰 p53 通路参与体细胞重编程。P53 在提高重编程效率中起负反馈调节作用, 降低 P53 水平可以显著促进重编程效率, 可以通过表达 P53 负调节蛋白的突变体、减少对 P53 的信号输入、删去或敲除 p53 或其靶基因、加入 P21 (即 *Cdkn1a*) 或抑制重编程诱导的细胞凋亡等途径降低 P53 水平, 以实现体细胞重编程 (Kawamura et al. 2009)。Kawamura 等 (2009) 还指出, 采用 P53-shRNAs

(short hairpin RNAs) 复合体降低 P53 蛋白水平时, 仅用 OS 两个重编程因子就可显著提升鼠成纤维细胞重编程为 iPSCs 的效率。主要的实验流程包括: (1) 从自野生型、p53 缺失或 *Mdmx* 突变的 13.5 d 的鼠胚胎中获取 mEFs; (2) P53-shRNAs 复合体构建; (3) 用 HEK293 细胞生产含有重编程因子和 siRNAs 的逆转录病毒和慢病毒载体用于转染 mEFs; (4) 转染 12 ~ 14 d 后, 用免疫荧光法检测 mEFs 产生的 iPSCs 克隆。Zhao Y 等 (2008) 也有类似的报道, 在 OSKM 四个转录因子的基础上加入 UTF1 和可抑制 P53 的 siRNAs, 能将人成纤维细胞诱导为 iPSCs 的效率提高 100 倍以上。P53-siRNAs 对重编程过程的促进作用主要体现在: ① P53-siRNAs 能抑制细胞衰老, 从而维持 iPSCs 的永生性 (Qin et al. 2007, Mali et al. 2008, Zhao R et al. 2008); ② P53-siRNAs 能抑制细胞凋亡, 故有助于细胞重编程。c-MYC 在诱导人成纤维细胞重编程为 iPSCs 时, 会引起显著的细胞凋亡和损失 (Yamanaka 2007, Zhao R et al. 2008), 而 P53-siRNAs 则可显著抑制这一效应, 这也是 P53-siRNAs 能显著提高 iPSCs 重编程效率的重要原因。此外, P53 沉默也能显著提高人体细胞重编程的效率, 但 P53 缺失的 iPSCs 可能会增加癌变和基因组不稳定的风险, 从而限制了其应用 (Kawamura et al. 2009)。为了消除 OSK 和 UTF1 mRNA 长时间转染人成纤维细胞引发的先天性免疫应答, Angel 等 (2010) 构建了 siRNAs 与干扰素 β (*Ifnb1*)、*Eif2ak2* 和 *Stat2* 的复合体, 解除了诱导过程中对细胞的生长抑制, 避免了炎性因子的产生, 提高了重编程效率。

总之, 虽然关于 siRNAs 介导的 iPSCs 技术研究还较少, 但其为 iPSCs 的产生提供了一个新的策略模式, 具有无限的发展潜力, 值得深入研究。

2.2.3 lncRNAs 法 lncRNAs 来源于内含子、外显子、启动子区、3'、5'UTR 区及增强子序列等 (Jia et al. 2013), 是含量丰富的转座因子

(*Tes*), 在哺乳动物中已发现上千种, 通过不同的机制能在多水平激活或抑制基因表达 (Wang et al. 2011), 例如在 RNA 水平, lncRNAs 通过转录后调控基因的表达, 并有助于 mRNA 的翻译和降解 (Gong et al. 2011, Guttman et al. 2012, Yoon et al. 2012)。图 3 显示了 lncRNAs 法介导的 iPSCs 诱导技术原理。

近来许多研究已证实, lncRNAs 在 iPSCs 多能性维持方面发挥重要作用, 是重编程因子的靶因子, 通过转录后水平调控重编程因子的表达, 实现对多能性维持、体细胞重编程及细胞分化的调控 (Ng et al. 2010, Ghosal et al. 2013, Hutchins et al. 2015)。Sheik 等 (2009) 报道 lncRNAs 与重编程因子之间存在反馈环: lncRNAs 受到 OCT4 和 NANOG 等重编程因子的调控, 且为多能性维持所必需, 同时 lncRNAs 受到抑制或错误表达时又会引起 *Oct4* 和 *Nanog* 表达的显著改变。在鼠 ESCs 中也筛选出 4 个 lncRNAs, 它们通过对 OCT4 和 NANOG 重编程因子的转录后调控来参与调节鼠 ESCs 多能性的维持 (Mohamed et al. 2010)。Guttman 等 (2011) 对鼠 ESCs 中 147 个 lncRNAs 进行了功能缺失研究, 筛选出了 26 个与多能性维持相关的 lncRNAs, 去除这 26 个 lncRNAs 会引起 *Oct4* 和 *Nanog* 启动子活性的降低, 表明 lncRNAs 对鼠 ESCs 的分化起抑制作用从而保持多能性。Chakraborty 等 (2012) 采用 RNAi 方法在鼠 ESCs 中也筛选出了 3 个 lncRNAs (*Panct1*, 2, 3), 能通过上调 *Oct4* 启动子的活性来维持多能性。在人 ESCs 中, lncRNAs 与 SOX2 的绑定对多能性的维持非常重要, 因为 lncRNAs 会提高 SOX2 与 OKN 等重编程因子组合的几率, 从而保持 ESCs 的多能性 (Ng et al. 2013)。最近, Durruthy-Durruthy 等 (2016) 通过功能缺失研究筛选出了 3 个新的人 lncRNAs (HPAT2、HPAT3 和 HPAT5), 它们均对胚胎细胞多能性的获得和内细胞团的形成具有重要的调控作用; 通过 CRISPR 系统介导的基因破坏实验和全转录组分析还发现, HPAT5 是多能性调控网

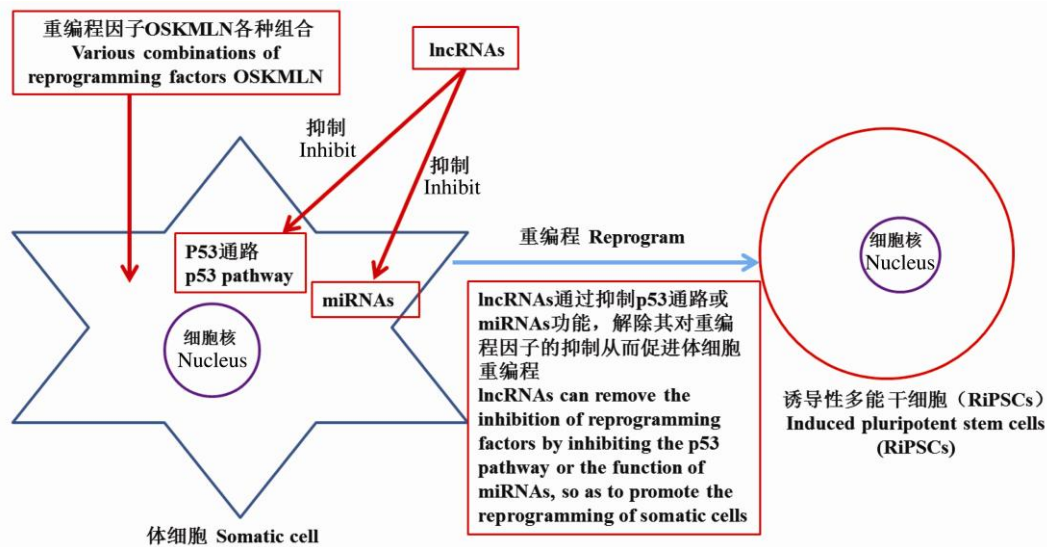


图 3 lncRNAs 介导的体细胞重编程为 RiPSCs 原理示意图

Fig. 3 The schematic diagram for RiPSCs production mediated by lncRNAs

RiPSCs. RNAs 介导的诱导性多能干细胞; OSKMLN. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG.

RiPSCs. RNAs-mediated induced pluripotent stem cells; OSKMLN. OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG

络的关键因子且与 let-7 miRNAs 家族有互作现象。

基于 lncRNAs 在多能性维持方面的调控功能, lncRNAs 开始被应用于体细胞重编程研究。Loewer 等 (2010) 采用 lincRNAs 与重编程因子 OSN 共同作用, 成功诱导出人 iPSCs, 其中 lincRNAs 对重编程具有重要的调节作用, 是重编程因子的直接靶目标, 3 个 lincRNAs (lincRNA-SFMBT2、 lincRNA-VLDLR 和 lincRNA-RoR) 的启动子位点受到 OCT4、SOX2 和 NANOG 的绑定, 敲除 OCT4 会导致 lincRNAs 表达下调, 意味着 lincRNAs 受到关键重编程因子的直接调控(Loewer et al. 2010)。此外, lincRNA-RoR 对 iPSCs 的生成数量和效率具有正调控, 调控机制为: lincRNA-RoR 通过下调 p53 表达来抑制 p53 通路引发的 DNA 损伤、细胞凋亡等效应, 以增加 iPSCs 存活率的方式来实现多能性诱导(Loewer et al. 2010)。Huarte 等 (2010) 发现 lincRNA-RoR 与 p53 通路的连接是通过 P53 先激活 lincRNA-P21, lincRNA-P21 又通过抑制 P53 的靶基因来介导

P53 的活力。至于 lincRNA-RoR 与 p53 通路的相互作用机制目前尚不清楚。

值得注意的是, 有的 lncRNAs 还能抑制 miRNAs 的功能从而间接增强其靶目标的蛋白表达 (Cesana et al. 2011)。lncRNAs 主要通过与 miRNAs 竞争, 抑制 miRNAs 的功能, 解除 miRNAs 的抑制效应。如成肌细胞中的 linc-MD1 可以取代 miR-133 和 miR-135, 阻止其对分化的抑制实现肌细胞的分化 (Ng et al. 2012, Hutchins et al. 2015)。Wang Y 等 (2013) 报道, 重编程调控子 lincRNA-RoR 通过与 miRNAs 共享 OCT4、SOX2、NANOG 的反应元件, 像海绵一样来阻止 miRNAs 介导的对主要重编程因子的抑制作用, 从而促进重编程。由此可见, lncRNAs 和 miRNAs 之间可能存在功能补偿或功能冗余。表观遗传调控子 CBX7 对 ESCs 多能性维持具有重要意义, 其功能的发挥同时受到 lncRNAs (Yap et al. 2010) 和 miRNAs 的调控 (O'Loghlen et al. 2012)。ncRNAs 之间的相互作用为 iPSCs 研究中 ncRNAs 种类的选择提供了更多的组合可能。

综上所述, lncRNAs 作为基因调控的重要元件之一, 已经成为现代分子生物学的新热点。采用高通量测序技术已经获得了大量 lncRNAs 序列, 其中部分已经证实在多能性维持、体细胞重编程及 iPSCs 分化中发挥重要的调节作用, 是一条潜在的 iPSCs 技术新途径。但目前对其在这些细胞过程中的作用机制尚不明确, 故而限制了其在 iPSCs 技术中的应用。

2.3 RNAs 介导的几种 iPSCs 诱导技术的比较

RNAs 介导的几种 iPSCs 诱导技术均可快速、高效、安全地诱导体细胞重编程为 iPSCs, 但每种方法均有其优缺点。mRNAs 法通过将体外转录的重编程因子 mRNA 导入体细胞, 使其在胞质中直接表达, 从而诱导体细胞核重编程。该法直接诱导、原理简单、易于操作, 但步骤较繁琐、诱导效率低、有增大细胞毒性的潜在风险。miRNAs 法和 siRNAs 法均通过降解靶基因 mRNA 或抑制其转录、翻译, 在转录后水平和翻译水平抑制靶基因活性, 从而诱导体细胞核重编程。与 mRNAs 法相比, miRNAs 和 siRNAs 片段短 (均约 22 nt), 更易导入细胞, 且对外源重编程因子的需求较少或无, 操作更加简便、快捷、安全, 诱导效率也较高。但参与重编程的 miRNAs、siRNAs 及其靶基因的筛选是目前该技术的难点, 进而限制了其广泛应用。lncRNAs 法基于 lncRNAs 在多能性维持方面的重要作用, 主要通过抑制 p53 通路或 miRNAs 的功能, 解除它们对重编程的抑制作用, 从而促进 iPSCs 的产生。目前对 lncRNAs 调控体细胞重编程的机制尚不清楚, 限制了其在 iPSCs 技术中的应用。

此外, 虽然 miRNAs 和 siRNAs 均为非编码的具有沉默效应的小 RNAs, 参与体细胞重编程的机制也类似, 但仍存在一些差异, 如 miRNAs 为内源性单链小 RNAs, 对靶基因的特异性较低, 碱基互补通常不完全, 通过 miRNAs 途径抑制靶基因活性, 主要作用于靶基因 3'UTR 区 (Lee et al. 1993); 而 siRNAs 为外源性双链小 RNAs, 对靶基因的特异性很高,

要求碱基完全互补, 且一个突变即可引起其沉默效应的改变, 通过 RNAi 途径抑制靶基因活性, 可作用于 mRNA 的任何部位等 (Elbashirs et al. 2001)。这些差异在 miRNAs 和 siRNAs 应用于 iPSCs 诱导的研究和应用中应予以充分考虑。

3 展望

iPSCs 技术是基础干细胞研究、干细胞疗法、药物筛选和再生医学的物质基础, 具有广阔的应用前景。RNAs 介导的几种 iPSCs 技术消除了插入突变的风险, 提高了诱导效率和速度, 为 iPSCs 的获得提供了新的更安全、高效、简便的途径, 有望成为 iPSCs 诱导的标准方法。但目前这些方法仍存在着技术难度大、对试剂敏感、劳动密集型操作过程、诱导效率不够高、费用昂贵等问题, 成为进一步广泛应用的限制瓶颈。完美的重编程策略应是自身不留痕迹的重编程过程或总体上无基因修饰, RNAs 介导的重编程技术还需要从重编程因子的选择、亲本细胞来源、培养条件等多方面继续进行不断的综合优化, 可以预期未来的重编程技术必将是通过高效的基因传递运送最少的致瘤性重编程因子实现 iPSCs 的高产。本综述将为 iPSCs 技术的革新提供有益参考。

参 考 文 献

- Ahfeldt T. 2011. Switching human cell fate: Reprogramming via pluripotency to adipogenesis. Berlin: Dissertation of the Academic Degree Doctor in Department of Biology at the University of Hamburg, 12–28.
- Angel M, Yanik M F. 2010. Innate immune suppression enables frequent transfection with RNA encoding reprogramming proteins. *PLoS One*, 5(7): e11756.
- Anokye-Danso F, Trivedi C M, Juhr D, et al. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8(4): 376–388.
- Armstrong L, Lako M, Dean W, et al. 2006. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 24(4): 805–814.
- Ban H, Nishishita N, Fusaki N, et al. 2011. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by

- temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34): 14234–14239.
- Barroso-delJesus A, Romero-López C, Lucena-Aguilar G, et al. 2008. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: Human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Molecular Cell Biology*, 28(21): 6609–6619.
- Bartel D P. 2009. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233.
- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. 2011. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 147(2): 358–369.
- Chakraborty D, Kappei D, Theis M, et al. 2012. Combined RNAi and localization for functionally dissecting long noncoding RNAs. *Nature Methods*, 9(4): 360–362.
- Chen S H, Pu L L, Xie F J, et al. 2015. Differential expression of three estrogen receptors mRNAs in tissues, growth development, embryogenesis and gametogenesis from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *General and Comparative Endocrinology*, 216: 134–151.
- Choi Y J, Lin C P, Ho J J, et al. 2011. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nature Cell Biology*, 13(11): 1353–1360.
- Ciccone D N, Su H, Hevi S, et al. 2009. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, 461(7262): 415–418.
- Cody K, Mandegar M A, Srivastava D, et al. 2016. Efficient CRISPR/Cas9-based genome engineering in human pluripotent stem cells. *Current Protocols in Human Genetics*, 88: 21401–21423.
- Cordes K R, Sheehy N T, White M P, et al. 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 460(7256): 705–710.
- Cox J L, Rizzino A. 2010. Induced pluripotent stem cells: What lies beyond the paradigm shift. *Experimental Biology and Medicine*, 235(2): 148–158.
- Durruthy-Durruthy J, Sebastiano V, Wossidlo M, et al. 2016. The primate-specific noncoding RNA HPAT5 regulates pluripotency during human preimplantation development and nuclear reprogramming. *Nature Genetics*, 48(1): 44–52.
- Elbashirs M, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2): 188–200.
- Federation A J, Bradner J E, Meissner A. 2014. The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends in Cell Biology*, 24(3): 179–187.
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. 2009. 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. *Proceedings of the Japan Academy*, 85(8): 348–362.
- Gao A J, Peng Y H, Deng Y L, et al. 2013. Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 228: 47–59.
- Ghosal S, Das S, Chakrabarti J. 2013. Long noncoding RNAs: New players in the molecular mechanism for maintenance and differentiation of pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, 22(16): 2240–2253.
- Gong C, Maquat L E. 2011. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3'UTRs via Alu elements. *Nature*, 470(7333): 284–288.
- Gore A, Li Z, Fung H L, et al. 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471(7336): 63–76.
- Gregory P A, Bert A G, Paterson E L, et al. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5): 593–601.
- Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, et al. 2011. Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(12): 915–929.
- Gurdon J B, Melton D A. 2008. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 322 (5909): 1811–1815.
- Guttman M, Donaghey J, Carey B W, et al. 2011. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 477(7364): 295–300.
- Guttman M, Rinn J L. 2012. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 482(7385): 339–346.
- Herranz H, Cohen S M. 2010. MicroRNAs and gene regulatory networks: Managing the impact of noise in biological systems. *Genes & Development*, 24(13): 1339–1344.
- Houbavii H B, Murray M F, Sharp P A. 2003. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Developmental Cell*, 5(2): 351–358.
- Howden S E, Maufort J P, Duffin B M. 2015. Simultaneous reprogramming and gene correction of patient fibroblasts. *Stem Cell Reports*, 5(6): 1109–1118.
- Hu S, Wilson K D, Ghosh Z, et al. 2013. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells*, 31(2): 259–268.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnol*, 26(11): 1269–1275.
- Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. 2010. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142(3): 409–419.
- Hutchins A P, Pei D. 2015. Transposable elements at the center of the

- crossroads between embryogenesis, embryonic stem cells, reprogramming, and long non-coding RNAs. *Chinese Science Bulletin*, 60(20): 1722–1733.
- Jia W W, Chen W, Kang J H. 2013. The functions of microRNAs and long non-coding RNAs in embryonic and induced pluripotent stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 11(5): 275–283.
- Jiang Y H, Han K H, Chen S H, et al. 2015. Molecular cloning, characterization and expression of *Lc-Sox11a* in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Gene*, 574(2): 287–301.
- Judson R L, Babiarz J E, Venere M, et al. 2009. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature Biotechnology*, 27(5): 459–461.
- Judson R L, Greve T S, Parchem R J, et al. 2013. MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(10): 1227–1235.
- Kanellopoulou C, Muljo S A, Kung A L, et al. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & Development*, 19(4): 489–501.
- Kashyap V, Rezende N C, Scotland K B, et al. 2009. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells and Development*, 18(7): 1093–1108.
- Kawaji H, Nakamura M, Takahashi Y, et al. 2008. Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics*, 9: 157–165.
- Kawamura T, Suzuki J, Wang Y V, et al. 2009. Linking the p53 tumor suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259): 1140–1144.
- Lai M I, Wendy-Yeo W Y, Ramasamy R, et al. 2011. Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(4): 291–301.
- Laurent L C, Ulitsky I, Slavin I, et al. 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 8(1): 106–118.
- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854.
- Leonardo T R, Schultheisz H L, Loring J F, et al. 2012. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nature Cell Biology*, 14(11): 1114–1121.
- Li M, Sancho-Martinez I, Belmonte J C I. 2011. Cell fate conversion by mRNA. *Stem Cell Research & Therapy*, 2: 5–7.
- Li Y Q, Zhang Q A, Yin X L, et al. 2011. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Research*, 21(1): 196–204.
- Li Z, Yang C S, Nakashima K, et al. 2011. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *The EMBO Journal*, 30(5): 823–834.
- Liao B, Bao X, Liu L, et al. 2011. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(19): 17359–17364.
- Lin S L, Chang D C, Chang-Lin S, et al. 2008. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*, 14(10): 2115–2124.
- Lin S L, Chang D C, Lin C H, et al. 2011. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Research*, 39(3): 1054–1065.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107(3): 297–307.
- Loewer S, Cabili M N, Guttman M, et al. 2010. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nature Genetics*, 42(12): 1113–1117.
- Lu D, Davis M P, Abreu-Goodger C, et al. 2012. MiR-25 regulates *Wwp2* and *Fbxw7* and promotes reprogramming of mouse fibroblast cells to iPSCs. *PLoS One*, 7(8): e40938.
- Lu J, Dong H Y, Lin L J, et al. 2014. miRNA-302 facilitates reprogramming of human adult hepatocytes into pancreatic islets-like cells in combination with a chemical defined media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(3): 405–410.
- Lüningschröder P, Hauser S, Kaltschmidt B, et al. 2013. MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(8): 1894–1903.
- Mali P, Ye Z, Hommond H H, et al. 2008. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*, 26(8): 1998–2005.
- Mallanna S K, Rizzino A. 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Developmental Biology*, 344(1): 16–25.
- Mandal P K, Rossi D J. 2013. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nature Protocols*, 8(3): 568–582.
- Marson A, Levine S S, Cole M F, et al. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134(3): 521–533.
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 8(6): 633–638.

- Mohamed J S, Gaughwin P M, Lim B, et al. 2010. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA*, 16(2): 324–337.
- Moradi S, Asgari S, Baharvand H. 2014. Concise Review: Harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. *Stem Cells*, 32(1): 3–15.
- Murchison E P, Partridge J F, Tam O H, et al. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34): 12135–12140.
- Nemes C, Varga E, Polgar Z, et al. 2013. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by protein transduction. *Tissue Engineering Part C Methods*, 78(43): 345–351.
- Ng J H, Ng H H. 2010. LincRNAs join the pluripotency alliance. *Nature Genetics*, 42(12): 1035–1036.
- Ng S Y, Johnson R, Stanton L W. 2012. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *The EMBO Journal*, 31(3): 522–533.
- Ng S Y, Stanton L W. 2013. Long non-coding RNAs in stem cell pluripotency. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 4(1): 121–128.
- O'Loghlin A, Munoz-Cabello A M, Gaspar-Maia A, et al. 2012. MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation. *Cell Stem Cell*, 10(1): 33–46.
- Planello A C, Ji J, Sharma V, et al. 2014. Aberrant DNA methylation reprogramming during induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors. *Cell Regeneration*, 3(1): 4–18.
- Plews J R, Li J, Jones M, et al. 2010. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One*, 5(12): e14397.
- Polo J M, Anderssen E, Walsh R M, et al. 2012. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*, 151(7): 1617–1632.
- Pratico E D, Feger B J, Watson M J, et al. 2015. RNA-mediated reprogramming of primary adult human dermal fibroblasts into c-kit(+) cardiac progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 24(22): 2622–2633.
- Qin H, Yu T, Qing T, et al. 2007. Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8): 5842–5852.
- Robinton D A, Daley G O. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381): 295–305.
- Rosa A, Brivanlou A H. 2011. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *The EMBO Journal*, 30(2): 237–248.
- Rosa A, Brivanlou A H. 2010. Synthetic mRNAs: Powerful tools for reprogramming and differentiation of human cells. *Cell Stem Cell*, 7(5): 549–550.
- Ruggieri M, Riboldi G, Brajkovic S, et al. 2014. Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications. *Progress in Neurobiology*, 114: 15–24.
- Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, et al. 2010. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 7(1): 64–77.
- Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 7(1): 11–14.
- Sheik M J, Gaughwin P M, Lim B, et al. 2009. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA*, 16(2): 324–337.
- Si-Tayeb K, Noto F K, Sepac A, et al. 2010. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Developmental Biology*, 10(81): 1–10.
- Sommer C A, Stadtfeld M, Murphy G J, et al. 2009. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 27(3): 543–549.
- Song L, Tuan R S. 2006. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Research Part C Embryo Today Reviews*, 78(2): 140–149.
- Stadtfeld M, Hochedlinger K. 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development*, 24(20): 2239–2263.
- Subramanyam D, Lamouille S, Judson R L, et al. 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(5): 443–448.
- Suh M R, Lee Y, Kim J Y, et al. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology*, 270(2): 488–498.
- Sul J Y, Kim T K, Lee J H, et al. 2012. Perspectives on cell reprogramming with RNA. *Trends in Biotechnology*, 30(5): 243–249.
- Sun X Y, Fua X B, Han W D, et al. 2010. Can controlled cellular reprogramming be achieved using microRNAs? *Ageing Research Reviews*, 9(4): 475–483.
- Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, et al. 2009. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254): 529–533.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells

- from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663–676.
- Tavernier G, Wolfrum K, Demeester J, et al. 2012. Activation of pluripotency-associated genes in mouse embryonic fibroblasts by non-viral transfection with in vitro-derived mRNAs encoding Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc. *Biomaterials*, 33(2): 412–417.
- Tsai Y, Cutts J, Kimura A, et al. 2015. A chemically defined substrate for the expansion and neuronal differentiation of human pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells. *Stem Cell Research*, 15(1): 75–87.
- van Nuffel A M T, Corthals J, Neyns B, et al. 2010. Immunotherapy of cancer with dendritic cells loaded with tumor antigens and activated through mRNA electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 629: 405–452.
- Wang G, Guo X, Hong W, et al. 2013. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8): 2858–2863.
- Wang J, He Q, Han C, et al. 2012. p53-facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. *Stem Cells*, 30(7): 1405–1413.
- Wang K C, Chang H Y. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular Cell*, 43(6): 904–914.
- Wang Y, Xu Z, Jiang J, et al. 2013. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Developmental Cell*, 25(1): 69–80.
- Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, et al. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5): 618–630.
- Warren L, Ni Y, Wang J, et al. 2012. Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Scientific Reports*, 2: 657–673.
- Wiehe J M, Ponsaerts P, Rojewski M T, et al. 2007. mRNA-mediated gene delivery into human progenitor cells promotes highly efficient protein expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(3): 521–530.
- Wilson K D, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, et al. 2009. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(5): 749–758.
- Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, et al. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239): 766–770.
- Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, et al. 2010. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(1): 189–193.
- Yamanaka S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 1(1): 39–49.
- Yap K L, Li S, Munoz-Cabello A M, et al. 2010. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular Cell*, 38(5): 662–674.
- Ye D, Wang G, Liu Y, et al. 2012. MiR-138 promotes induced pluripotent stem cell generation through the regulation of the p53 signaling. *Stem Cells*, 30(8): 1645–1654.
- Yoo A S, Sun A X, Li L, et al. 2011. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 476(7359): 228–231.
- Yoon J H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. 2012. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular Cell*, 47(4): 648–655.
- Yoshioka N, Gros E, Li H R, et al. 2013. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell*, 13(2): 246–254.
- Zhang H, Ma Y, Gu J J, et al. 2012. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials*, 33(20): 5047–5055.
- Zhao R, Daley G Q. 2008. From fibroblasts to iPS cells: Induced pluripotency by defined factors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(4): 949–955.
- Zhao Y, Yin X, Qin H, et al. 2008. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3(5): 475–479.
- Zhou T, Benda C, Dünzinger S, et al. 2012. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols*, 7(12): 2080–2089.
- Zou L J, Luo Y L, Chen M W, et al. 2013. A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D Scaffolds. *Scientific Reports*, 3: 2243–2252.
- 范力星, 冀凯宏, 刘厚奇. 2006. 干细胞研究的新途径: miRNAs. *生命科学*, 18(4): 351–354.
- 蒋豆蔻, 李富荣. 2015. MicroRNAs 调控干细胞的诱导与分化. *生命科学*, 27(10): 1255–1260.
- 申红芬, 姚志芳, 肖高芳, 等. 2009. 诱导性多潜能干细胞 (iPS cells) —— 现状及前景展望. *生物化学与生物物理学进展*, 36(8): 950–960.
- 张璇, 金由辛, 李劲松. 2010. microRNAs 和体细胞重编程. *生命科学*, 22(7): 675–681.