

人诱导性多潜能干细胞(iPS 细胞)系的建立

姚志芳^a, 史俊文^a, 贾俊双^a, 申红芬^a,
林晓琳^a, 肖高芳^a, 张 晟^b, 肖 东^{a, b*}, 姚开泰^{a*}

(南方医科大学 a. 肿瘤研究所; b. 比较医学研究所暨实验动物中心, 中国广东 广州 510515)

摘 要: 掌握建立人 iPS 细胞系(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的技术, 以便为人肿瘤细胞重编程为 iPS 细胞建立技术平台. 在人胚胎干细胞的培养条件下, 通过携带 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 4 个混合因子的慢病毒感染人皮肤成纤维细胞 (CCD-1079SK 细胞), 从而诱导成干细胞样的克隆. 根据人胚胎干细胞的特性进行如下鉴定: 克隆形态、碱性磷酸酶活性、核型和 CCD-1079SK 细胞来源的克隆拟胚体(embryoid bodies, EBs)形成及分化等. 结果显示, 在人胚胎干细胞的培养环境中, 导入 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 4 个因子的 CCD-1079SK 细胞产生了一株 iPSC 克隆, 这株 iPSC 克隆在细胞形态、增殖能力、胚胎细胞特异性表面抗原以及基因表达与人胚胎干细胞相似, 此外, iPSC 克隆在体外悬浮培养中形成拟胚体并分化成 3 个胚层. 人 iPS 细胞系的成功建立为利用 iPS 细胞技术开展肿瘤细胞重编程研究奠定了坚实基础.

关键词: 人诱导性多潜能干细胞; 肿瘤细胞重编程; 肿瘤治疗

中图分类号: R730.5; Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)06-0512-07

Generation of A Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Line

YAO Zhi-fang^a, SHI Jun-wen^a, JIA Jun-shuang^a, SHEN Hong-fen^a,
LIN Xiao-lin^a, XIAO Gao-fang^a, ZHANG Shen^b, XIAO Dong^{a, b*}, YAO Kai-tai^{a*}

(a. Cancer Research Institute; b. Institute of Comparative Medicine and Center of Experimental Animals,
Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

Abstract: To master the technology of reprogramming human somatic cells to iPS cells and set up a technical platform to reprogram human cancer cells into iPS cells. Under human embryonic stem cell (hES cell) culture conditions, human skin fibroblasts (CCD-1079SK) cells infected by lentivirus mixture harboring *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* and *Klf4* genes were induced into hES cell-like colonies, following characterization were done by comparatively analyzing hES cells markers: colony morphology, alkaline phosphatase (AP) activity, the expression profile of ES cell-marker genes, karyotype and embryoid body (EB)-mediated *in vitro* differentiation of CCD-1079SK cell-derived hES cell-like colonies. The results showed that human iPS cell line (iPSC-1) was generated from CCD-1079SK cells by introducing four genes, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* and *Klf4*, under hES cell culture conditions. iPSC was similar to hES cells in morphology, proliferation, hES cell-specific surface

收稿日期: 2011-06-09; 修回日期: 2011-11-04

基金项目: 国家自然科学基金委员会-广东省联合基金重点项目(u0732006); 广东省自然科学基金资助项目(9151063101000015); 广东省科技计划项目(2009B060300008); 南方医科大学优秀中青年科技人才库科研资助项目

作者简介: 姚志芳(1983-), 女, 山东德州人, 硕士, 主要从事肿瘤细胞重编程研究, E-mail: Yaozhifang840107@163.com; 史俊文(1979-), 男, 湖南桂阳人, 博士研究生, 主要从事肿瘤细胞重编程研究, E-mail: shijunwen2007@163.com, 姚志芳与史俊文对本文贡献相等, 并列为第一作者; * 通讯作者: 姚开泰 (1931-), 男, 江苏昆山人, 中国科学院院士, 南方医科大学教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤发病机理研究, Tel: 020-61648225, E-mail: yaokaitai@yahoo.com.cn; 肖东 (1968-), 男, 新疆新和人, 南方医科大学研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事肿瘤细胞的重编程以及干细胞研究, Tel: 020-62789439, E-mail: xiao_d@hotmail.com.

anti-gens and gene expression. Additionally, iPSC could be cultured in suspension to form embryoid bodies (EBs) and differentiate into cell types of the three germ layers *in vitro*, in addition, human iPS cell line is successfully established, which will lay a solid foundation for performing cancer cell reprogramming by using iPS cell technology.

Key words: human induced pluripotent stem (iPS) cells; cancer cell reprogramming; cancer therapy
(*Life Science Research*, 2011, 15(6): 512~518)

自日本和美国研究小组先后用 4 种基因将小鼠^[1]和人^[2,3]的体细胞在体外重编程为诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells), 体细胞重编程和去分化等一系列热点问题再次成为生物学等研究的热点和焦点. 目前, iPS 细胞的研究和关注度呈爆炸式增长, 取得了一些突破性进展, 如建立了个体特异的、疾病特异的或患者特异的人 iPS 细胞, 借助转座子介导的转基因方法高效制备了 virus-free iPS 细胞并进而成功地从所获得的 iPS 细胞中移除先前导入的基因; 目前, 在细胞培养液中加入 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 4 种基因对应的 4 种重组蛋白也能将小鼠和人的体细胞在体外重编程为 iPS 细胞, 从而获得了近似“治疗型”的 iPS 细胞, 以上这些成果将 iPS 细胞在临床上的实际应用又大大向前推进了一步^[4].

iPS 细胞本身和制备 iPS 细胞的技术为人肿瘤基础研究和临床治疗开启了如下思路: 1) iPS 细胞技术为研究人肿瘤细胞重编程提供理想而强大的体外研究体系, 此类研究有助于揭示肿瘤发生机制及肿瘤细胞重编程机制等; 2) 体细胞和肿瘤细胞在体外被重编程为 iPS 细胞或其它类型正常细胞为临床肿瘤治疗开启了新思路, 即是否可以将肿瘤细胞逆转为正常细胞(包括干细胞), 并进一步利用这些细胞修补因肿瘤发生而受损的组织, 最终达到治疗肿瘤的目的. 为构筑人肿瘤细胞重编程为 iPS 细胞的技术平台, 首先必须掌握将人正常体细胞重编程为 iPS 细胞的技术, 为此我们开展了这方面的研究工作, 相关结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 载体和细胞

携带有 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 的慢病毒载体及包装质粒 pVSVG 和 $\Delta 8.91$ 由中科院上海生化所生物化学与细胞生物学研究所肖磊研究员惠赠^[5]. 人胚肾上皮细胞株 293T 细胞和人皮肤成纤维 (CCD-1079SK) 细胞由肖磊研究员惠赠, 人胚胎干

细胞系 H9 由中科院广州生物医药与健康研究院裴端卿研究员惠赠.

1.1.2 主要试剂

高糖 DMEM、DMEM/F12、血清替代物(knock-out serum replacement, KSR)、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、2-巯基乙醇、青霉素-链霉素、胰蛋白酶、胶原酶、Opti-MEM Medium 等购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自 PAA 公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 购自 PeproTech 公司. 转染用 FuGENE HD 购自 Roche 公司; Reverse Transcription System 试剂盒、dNTP、Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司.

碱性磷酸酶(AP)染色试剂盒购自 Milipore 公司; anti-*Oct4* 抗体购自 Abcam, anti-SSAE-1、anti-SSAE-4、anti-TRA-1-60、anti-TRA-1-81 抗体购自 Invitrogen 公司, 二抗 Alexa FluorR 555[®] goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor[®] 555 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor[®] 555 goat anti-mouse IgM 购自 Invitrogen 公司. 其余试剂为国产或进口化学纯或分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 制备携带 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 基因的慢病毒及其病毒滴度测定

采用脂质体 FuGENE HD 介导的瞬时转染以生产慢病毒, 慢病毒包装详细步骤参见文献[5, 6]和 Roche 公司操作手册. 慢病毒滴度测定: 用 5 μ L 病毒上清感染 15×10^4 293T 细胞, 48 h 后 4% 多聚甲醛固定, DAPI 染色, 荧光显微镜下计数 EGFP 阳性细胞和总细胞数, 将其代入公式: 病毒滴度 (U/mL) = ((EGFP 阳性细胞数/总细胞数) $\times 1.5 \times 10^5 \times 10^3$) / 5.

1.2.2 携带 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 基因的慢病毒感染 CCD-1079SK 细胞以将其诱导为 iPS 细胞

用携带 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 基因的慢病毒感染 CCD-1079SK 细胞, 同时加入终浓度为 0.01 g/L 的 polybrene 以提高感染效率, 感染 24 h 后消化 CCD-1079SK 细胞并种植于饲养层细胞(MEFs)上, 48 h 后换为 hES 细胞培养基培养, 第 10 d 换

为 hES 细胞条件培养基培养, 第 20 d 左右开始挑取克隆, 将一个克隆平均分入两个 96 孔板中, 其中一个 96 孔板用来做 AP 染色, 选取 AP(+)且具有典型的 hES 细胞克隆形态的克隆进行后续扩大培养, 并对其从如下方面进行鉴定: 克隆形态、生长特性、多潜能标志基因表达、核型和拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 形成及分化等。

1.2.3 人 iPS 细胞系鉴定

1) AP 染色, 步骤详见检测试剂盒操作说明书 (Milipore 公司)。

2) 免疫细胞化学检测人 iPS 细胞上全能性标志基因表达

将源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS 细胞种植于 48 孔板中, 采用标准的细胞免疫荧光步骤检测分析本课题建立的人 iPS 细胞上 hES 细胞标志性基因 (如 *Oct4*、*SSAE-1*、*SSAE-4*、*TRA-1-60*、*TRA-1-81*) 表达情况。

3) RT-PCR 分析源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS 细胞上相关基因表达

提取源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS、hES、CCD-1079SK 细胞总 RNA, 然后采用 RT-PCR 检

测本课题建立的人 iPS 细胞上相关基因表达。RT-PCR 扩增用引物见表 1。

4) 人 iPS 细胞核型分析

取处于对数生长期的 hiPS 细胞进行细胞核型分析, 按细胞核型分析标准步骤进行操作, 实验交由南方医科大学附属南方医院产前诊断与遗传病诊断技术中心完成。

5) 源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS 细胞体外分化能力检测

① EBs 形成

生长旺盛的人 iPS 细胞经胶原酶消化后, 稍做沉淀后, 将沉淀物传代至六孔板上, 用不含 bFGF 的 hES 培养基悬浮培养。培养 7 d 后将形成的 EBs 转入 0.1% 明胶处理的皿内贴壁培养 12 d, 观察其分化现象。

② 借助 RT-PCR 检测所形成的 EBs 是否表达各胚层的标志性基因 (表 2)。

分别收集 5、18 d 的 EBs, 并提取总 RNA, 然后采用 RT-PCR 法检测 EB 中内、中、外 3 个胚层的特异性基因表达。RT-PCR 扩增用引物见表 2。

表 1 RT-PCR 检测基因表达用引物

Table 1 The primer for RT-PCR detection of gene expression

Gene	Primer sequence	Annealing temperature/°C	Product of PCR/bp
<i>Oct4</i> (Total)	P1: AGAAGGATGTGGTCCGAGTGTG P2: CCACCCFTTGTGTTCCCAATTC	55	400
<i>Sox2</i> (Total)	P1: CGCCCCAGCAGACTTCACA P2: CTCCTCTTTTGCACCCCTCCATTT	55	170
<i>Klf4</i> (Total)	P1: GCGGAAGGGAGAAGACA P2: CCGGATCGGATAGGTGAA	55	384
<i>c-Myc</i> (Total)	P1: AGTTTCATCTGCGACCCG P2: CCTCATCTTCTGTCTCCTCT	55	439
<i>Oct4</i> (Endogenous)	P1: GGGAGGAGCTAGGAAAGAAAACCT P2: GAACTTCACCTTCCCTCCAACCACT	55	142
<i>Sox2</i> (Endogenous)	P1: TTAGAGCTAGTCTCCAAGCGACGA P2: CCACAGAGATGGTTCGCCAG	55	289
<i>Klf4</i> (Endogenous)	P1: GCAAAACCTACACAAAGAGT P2: GACCATGATTGTAGTGCTTT	55	346
<i>c-Myc</i> (Endogenous)	P1: GGAACAAGA AGATGAGGAAG P2: TGATTGCTCAGGACATTTT	55	610
<i>Nanog</i>	P1: ATGGAGGCTGGACTATGGTTGG P2: AGGCTGAGGACAGAGAATGG	55	206
<i>Lin28</i>	P1: GGGCATCTGTAAGTGGTT P2: GTAGGGCTGTGGATTTCT	55	483
<i>REX1</i>	P1: CCTAAACAGCTCCGAGAA P2: CAGCCTTGAAAGGGACAC	55	353
<i>Sall4</i>	P1: TGATGGGAGACCAGGAGT P2: GCGGGCTGAGTTATTGTT	55	488
<i>GAPDH</i>	P1: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC P2: TGGTGAAGACGCCAGTGGA	55	138

表 2 RT-PCR 检测基因表达用引物
Table 2 The primer for RT-PCR detection of gene expression

Germ layer	Gene	Primer sequence	Annealing temperature/°C	Product of PCR/bp
Endoderm	<i>AFP</i>	P1: AGAACCTGTCAAGCTGTG P2: GACAGCAAGCTGAGGATGTC	55	676
	<i>Amylase</i>	P1: P2: GACGACAATCTCTGACCTGAGTAGC	55	492
Mesoderm	<i>cACT</i>	P1: TCTATGAGGGCTACGCTTTG P2: CCTGACTGGAAGGTAGATGG	55	630
	<i>Cardiac-actin</i>	P1: TGACTTCAAGTCGCCTGATGCC P2: TGCCTCCAGCAAAGATTGCCTTGTC	55	490
	<i>NFH</i>	P1: TGAACACAGACGCTATGCGCTCAG P2: CACCTTTATGTGAGTGGACACAGAG	55	398
Ectoderm	<i>Sox1</i>	P1: ATGAAGGACAAAGACCAGGGCAG P2: CGGTTAGCAACTTGCATCCCAG	60	268
	<i>GAPDH</i>	P1: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC P2: TGGTGAAGACGCCAGTGG	55	138

2 结果

2.1 慢病毒生产与滴度测定

携带 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 基因的慢病毒载体与病毒包装质粒共转染 293T 细胞, 48 h 后倒置荧光显微镜下可见绿色荧光, 预示转染成功(结

果未显示); 收集病毒上清进行滴度测定, 病毒滴度值都在 1×10^6 U/mL 以上(结果未显示).

2.2 CCD-1079SK 细胞在体外诱导为 iPS 细胞及其鉴定

图 1A 展示了 CCD-1079SK 细胞在体外重编程为 iPS 细胞的过程示意图, 而 CCD-1079SK 细

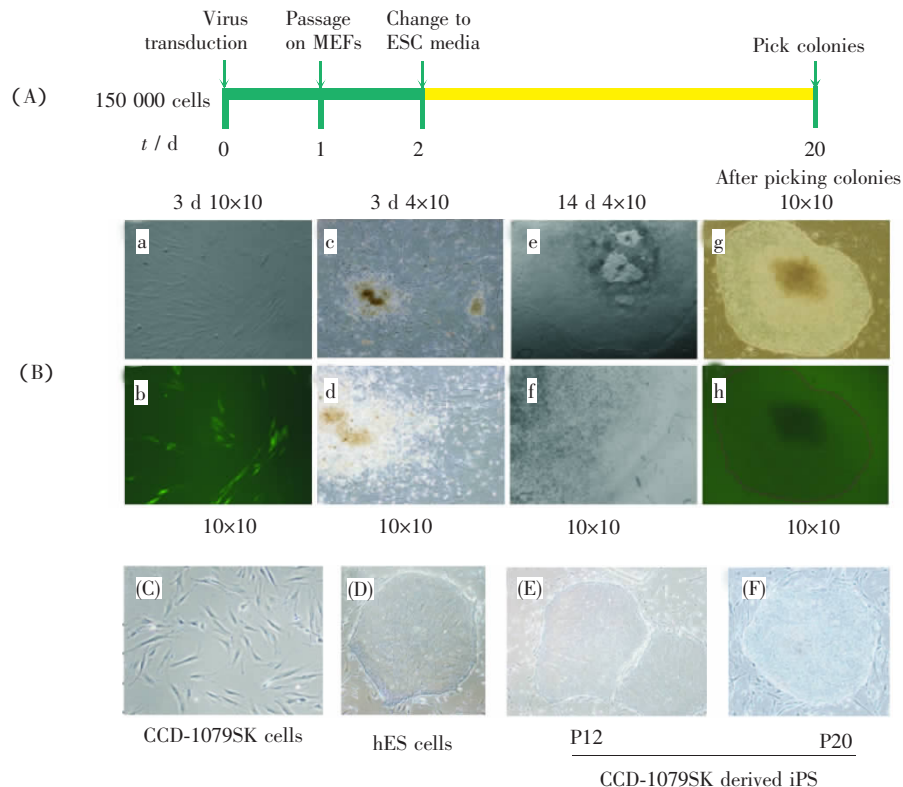


图 1 人皮肤成纤维(CCD-1079SK)细胞重编程过程

(A) CCD-1079SK 细胞重编程示意图; (B) CCD-1079SK 细胞形态转变为 hES 细胞克隆形态的历程; (C)、(D) CCD-1079SK、hES 细胞克隆形态; (E)、(F) 不同代数的 CCD-1079SK 细胞衍生的 iPS 细胞(第 12、20 代).

Fig.1 The reprogramming procedure of human skin fibroblasts (CCD-1079SK) cells

(A) The schematic diagram of human skin fibroblasts (CCD-1079SK) cells reprogramming procedure; (B) The procedure of human skin fibroblasts (CCD-1079SK) cells transform into hES cell-like colonies; (C), (D) The morphology both human skin fibroblasts (CCD-1079SK) cells and hES cell-like colonies; (E), (F) The different generation iPS cells derived from CCD-1079SK cells (12 generations and 20 generations).

胞形态逐渐转变为 ES 细胞克隆形态的历程图见图 1B. 用携带 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 基因的慢病毒感染 CCD-1079SK 细胞, 病毒感染第 7~8 d 可见到 CCD-1079SK 细胞形态由长梭形变为圆形并聚集 (图 1B-c、d), 病毒感染第 14 d 可见 ES 细胞样克隆出现 (图 1B-e、f). 第 20 d 左右挑取的克隆中, 有两株具有典型的 hES 细胞克隆形态; 挑取的 ES 细胞样克隆经传代培养后发现, 只有一株可保持未分化状态 (图 1B-g、h), 该克隆经 AP 染色确认为 AP 染色阳性, 呈紫红色, 饲养层细胞不着色, 表明其具有较高的碱性磷酸酶活性 (图 2A), 其命名为 iPSC-1. iPSC-1 在体外可长期传代培养, 图 1E、F 显示了 iPSC-1 传至第 12 代和第 20 代的克隆照片, 展示了典型的 hES 细胞克隆形态.

此外, 慢病毒感染 CCD-1079SK 细胞后, 其

上可见绿色荧光 (图 1B-b), 而当 CCD-1079SK 细胞在体外重编程为 ES 细胞样克隆后, 克隆上绿色荧光减弱 (图 1B-h), 预示当 CCD-1079SK 细胞重编程为 iPS 细胞后, 有部分 EGFP 基因沉默了.

免疫细胞化学检测显示, iPSC-1 表达 hES 细胞特有的全能性的标志基因 (即 *Oct4*、*SSAE-4*、*TRA-1-60*、*TRA-1-81*), 而不表达 *SSAE-1* (图 2B); RT-PCR 检测显示, iPSC-1 表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*、*Lin28*、*Sall4*、*Rex1* (图 3). 此外, iPSC-1 核型与 CCD-1079SK 细胞核型一致 (图 4).

iPSC-1 具有在体外分化形成囊性 EBs 的能力 (图 5A、B), EBs 贴壁培养后发生分化 (图 5C), 且能表达内、中、外 3 个胚层的标志性基因 (如 *AFP*、*Amylase*、*Cardiac actin*、*Enolase*、*NFH*、*Sox1*) (图 5D).

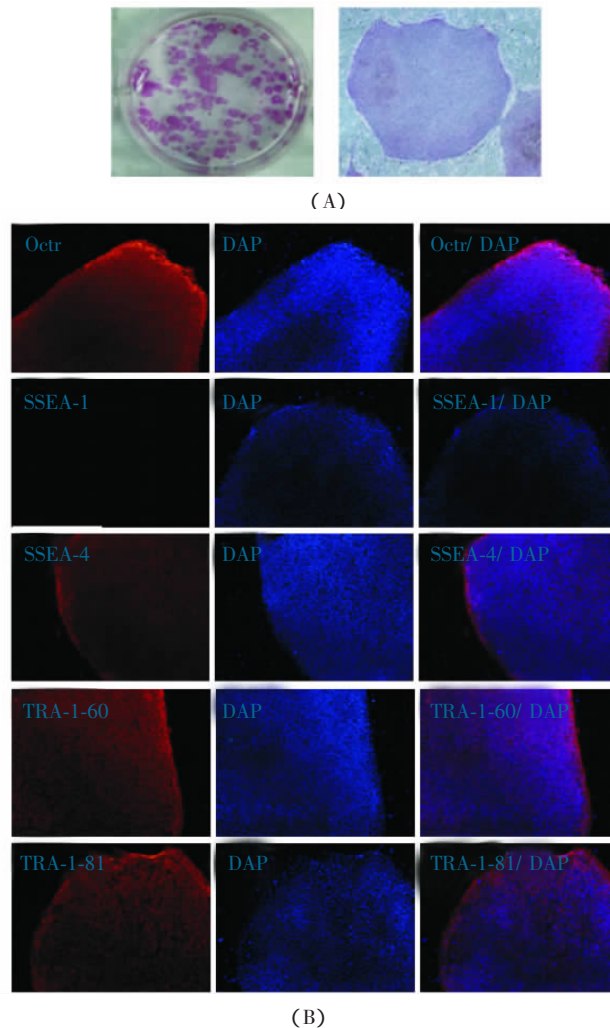


图 2 源于人 CCD-1079SK 细胞的 iPS 细胞在蛋白水平表达了全能性的标志基因 (A) iPS 细胞碱性磷酸酶染色; (B) 免疫细胞化学检测全能性标志基因表达.

Fig.2 CCD-1079SK cell-derived iPS cells expressed typical pluripotency markers (A) iPS cells AKP staining; (B) ICC detection of totipotentiality market gene expression.

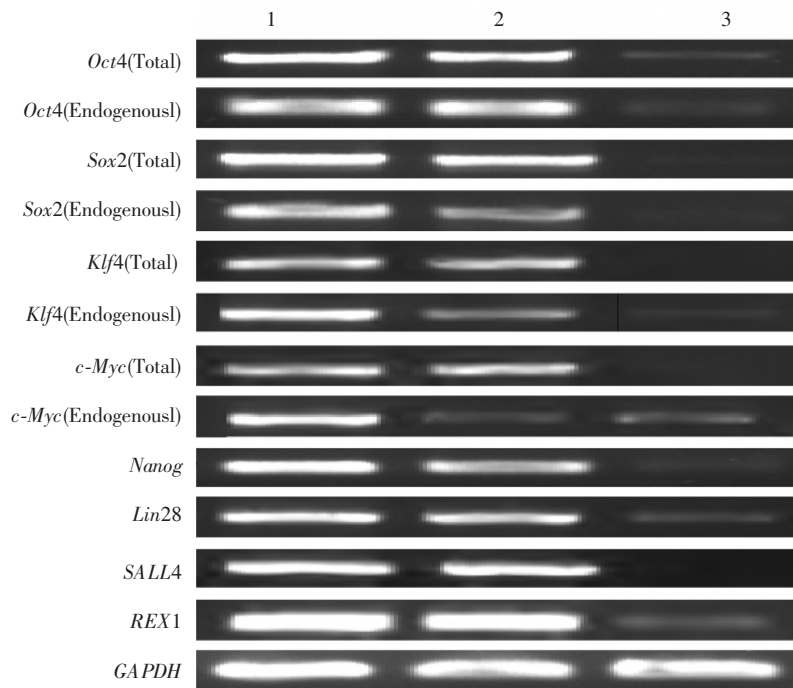


图 3 RT-PCR 分析源于 CCD-1079SK 细胞的 iPS 细胞上相关基因表达
1: CCD-1079SK 衍生的 iPS 细胞; 2: hES 细胞; 3: CCD-1079SK 细胞.

Fig.3 RT-PCR analysis of gene expression in CCD-1079SK cell-derived iPS cells
1: CCD-1079SK-iPSs; 2: hES cells; 3: CCD-1079SK cells.

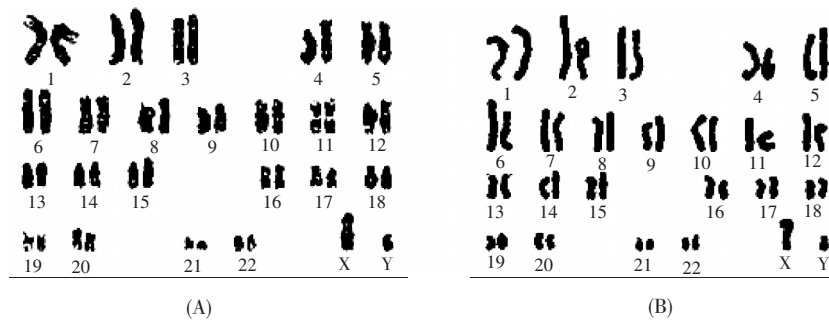


图 4 源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS 细胞核型

(A) CCD-1079SK 细胞的细胞核型; (B) 源于 CCD-1079SK 细胞的人 iPS 细胞核型.

Fig.4 The karyotype of CCD-1079SK cell-derived iPS cells

(A) The karyotype of CCD-1079SK cells; (B) The karyotype of the iPS cells derived from CCD-1079SK cells.

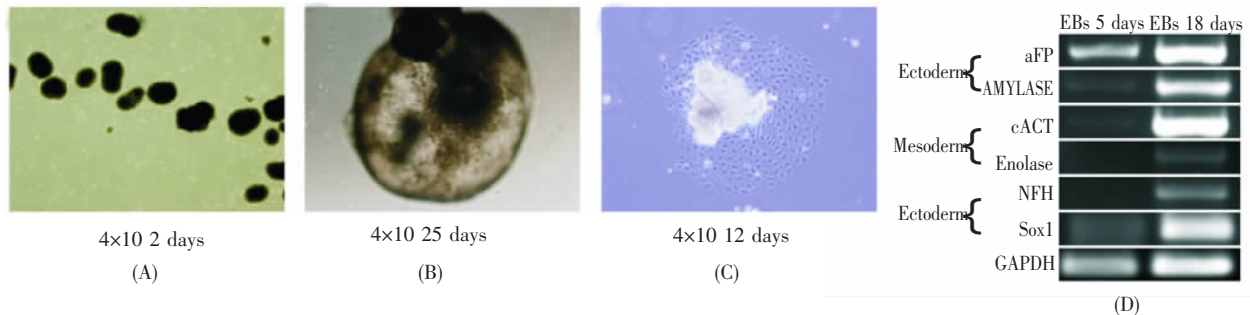


图 5 源于 CCD-1079SK 细胞的 iPS 细胞体外形成拟胚体(EB)和体外分化研究

(A)、(B) iPS 细胞悬浮培养形成 EBs; (C) EBs 贴壁分化; (D) RT-PCR 法检测 EBs 中内、中、外 3 个胚层的特异性的基因表达.

Fig.5 Embryoid body (EB)-mediated differentiation of CCD-1079SK cell-derived iPS cells

(A), (B) iPS cells suspension culture form EBs; (C) EBs adherence differentiation; (D) RT-PCR detect the specific gene expression of the EBs' endoderm, mesoderm, ectoderm.

总之,携带 4 种基因的慢病毒感染 CCD-1079SK 细胞后,出现了 hES 细胞样克隆,表明 CCD-1079SK 细胞已被重编程;挑取克隆后,进行 AP 染色和形态学观察,其中只有一株 CCD-1079SK 细胞来源的 hiPS 细胞能够在体外长期传代,同时可维持 hES 细胞的生物学特性,以上结果表明我们成功建立了人 iPS 细胞系,这为构筑人肿瘤细胞重编程为 iPS 细胞的技术平台打下了良好基础。

3 讨论

由于开展人肿瘤细胞重编程研究或逆转为正常细胞的研究有助于揭示肿瘤发生机制,也有助于探索临床肿瘤治疗的新思路和新策略,因而科学家们尝试通过不同途径实现人和小鼠肿瘤细胞重编程以将其逆转为不同类型的正常细胞,这些途径主要包括:1) 肿瘤细胞核移植^[7-9];2) 利用胚胎微环境(Embryonic microenvironments)(包括鸡胚^[10]、斑马鱼胚胎^[10]和小鼠囊胚^[11])实现肿瘤细胞重编程;3) 利用 hES 细胞提供的微环境实现肿瘤细胞重编程^[10];4) 利用 iPS 细胞技术实现肿瘤细胞重编程^[12-15]。运用以上方法均可在体内或体外实现肿瘤细胞重编程而将其逆转为不同类型的正常细胞^[7-15],但前 3 种方法不适合用于肿瘤细胞重编程机制研究,而 iPS 细胞技术为研究肿瘤细胞重编程机制提供了强大的体外研究工具,该方法操作简单易行且可控,特别适合肿瘤细胞重编程机制的阐明,而这有助于将前面提及的思路,即“将肿瘤细胞逆转为正常细胞(包括干细胞),并进一步利用这些细胞修补因肿瘤发生而受损的组织,最终达到治疗肿瘤的目的”,争取早日用于临床肿瘤治疗。迄今,人类对肿瘤细胞逆转为正常细胞的机制仍然知之甚少^[7-15]。为此,本研究建立了将人正常体细胞重编程为 iPS 细胞的技术平台,这将为进一步构筑利用 iPS 细胞技术开展人肿瘤细胞重编程研究的平台奠定坚实基础。

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[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [2] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [3] YU J, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [4] 申红芬,姚志芳,肖高芳,等. 诱导性多潜能干细胞(iPS cells)——现状及前景展望[J]. *生物化学与生物物理进展*(SHEN Hong-fen, YAO Zhi-fang, XIAO Gao-fang, *et al.* Induced pluripotent stem cells (iPS cells): Current status and future prospect[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2009, 36(8): 950-960.
- [5] LIAO J, WU Z, WANG Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors[J]. *Cell Research*, 2008, 18(5): 600-603.
- [7] 贾俊双,孙妍,肖东,等. 慢病毒介导的外源基因体外投递系统的建立[J]. *热带医学杂志*(JIA Jun-shuang, SUN Yan, XIAO Dong, *et al.* Establishment of lentivirus-mediated *in vitro* gene delivery system [J]. *Journal of Tropical Medicine*), 2008, 8(10): 1028-1029, 1037.
- [8] HOCHEDLINGER K, BLELLOCH R, BRENNAN C, *et al.* Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(15): 1875-1885.
- [9] 沈新明. 肿瘤细胞核移植后早期重组胚的基因表达谱[D]. 广州: 第一军医大学病理学系 (SHEN Xin-ming, Gene expression profiling of early embryos reconstructed by nuclear transfer of cancer cells[D]. Guangzhou: Department of Pathology, First Military Medical University), 2003.
- [10] 邓星. 肿瘤细胞核移植的重新编程和核型变化研究[D]. 广州: 第一军医大学(DENG Xing. Effect of reprogramming on donor nucleus of tumor cell nuclear transfer[D]. Guangzhou: First Military Medical University), 2005.
- [11] HENDRIX M J SEFTOR E A, SEFTRO R E, *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(4): 246-255.
- [12] DURR M, HARDER F, MERKEL A, *et al.* Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts[J]. *Oncogene*, 2003, 22(57): 9185-9191.
- [13] LIN S L, CHANG D C, CHANG-LIN S, *et al.* *Mir-302* reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *RNA*, 2008, 14(10): 2115-2124.
- [14] UTIKAL J, MAHERALI N, KULALERT W, *et al.* *Sox2* is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(19): 3502-3510.
- [15] CARETTE J E, PRUSZAK J, VARADARAJAN M, *et al.* Generation of iPSCs from cultured human malignant cells [J]. *Blood*, 2010, 115(20): 4039-4042.
- [16] MIYOSHI N, ISHII H, NAGAI K, *et al.* Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2010, 107(1): 40-45.