

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00262

细胞抽提物诱导的体细胞重编程

范宗兴, 朱化彬, 杜卫华

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 胚胎工程与繁殖技术研究室, 北京 100193

摘要: 体细胞重编程是指在特定条件下将已分化的体细胞去分化逆转回原始多能状态或转分化为其他类型细胞。目前诱导体细胞重编程的方法主要有: 体细胞核移植、细胞融合、特定转录因子转染、细胞抽提物诱导等。近年来抽提物诱导体细胞重编程越来越受到研究者的关注。利用此法, 通过重编程不仅可以获得需要类型的细胞, 而且方便识别与重编程有关的细胞因子, 探求重编程的机制。文章简略概述诱导体细胞重编程的方法, 并重点阐述细胞抽提物诱导体细胞重编程的研究进展。

关键词: 抽提物; 重编程; 体细胞核移植

Somatic cells reprogramming using cell extracts

FAN Zong-Xing, ZHU Hua-Bin, DU Wei-Hua

Embryo Biotechnology and Reproduction Laboratory, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: The process of differentiated somatic cells to a pluripotent state or to another unrelated cell type is referred to as cellular reprogramming. This can be achieved through somatic cell nuclear transfer, cell fusion, specific transcription-factor transduction, and exposure to cell extracts. Cellular reprogramming using cell extracts has gained increasing attention in recent years and has been applied to acquire the target cell types, recognize the functional factors, explore the reprogramming mechanism. In this review, we described different methods of reprogramming somatic cells, which mainly focused on the advances in cellular reprogramming using cell extracts.

Keywords: extracts; reprogramming; somatic cell nuclear transfer

已分化的体细胞在特定条件下被逆转回原始多能状态或转分化为其他类型细胞称为体细胞重编程。诱导体细胞重编程的方法主要有: 体细胞核移植、细胞融合、特定转录因子转染、细胞抽提物诱导等。对于体细胞重编程的研究不仅会阐明细胞分

化、去分化和转分化的分子机制, 为克隆技术的突破提供理论基础; 而且还可以实现不同类型细胞间的相互转化, 为再生医学的研究提供珍贵材料。细胞抽提物诱导是近年来新发展的一种诱导体细胞重编程的方法, 它通过将靶细胞直接孵育在细胞抽提

收稿日期: 2012-08-29; 修回日期: 2012-10-09

基金项目: 科技支撑项目(编号: 2012BAD12B01)和 2013 的基本科研业务费项目(编号: 2013ywf-2d-2)资助

作者简介: 范宗兴, 硕士, 专业方向: 胚胎工程。E-mail: fanzongxing1314@126.com

通讯作者: 杜卫华, 博士, 副研究员, 专业方向: 胚胎工程。E-mail: dwh679@sohu.com

网络出版时间: 2013-1-29 9:22:47

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130129.0922.001.html>

物中,引起细胞基因表达方式改变,实现细胞类型间的转化。应用此法重编程体细胞既可回避胚胎干细胞带来的伦理道德和免疫排斥问题,又能避免细胞插入外源基因而带来的致癌风险,具有较大的应用前景。本文将概括介绍体细胞重编程的方法,并重点阐述细胞抽提物导体细胞重编程的方法、研究现状以及其在体细胞核移植方面的应用。

1 诱导体细胞重编程的经典方法

1.1 体细胞核移植

体细胞核移植是指将供体细胞移入去核卵母细胞中,在卵母细胞质中各种因子作用下,去分化恢复发育全能性,形成胚胎,移入受体后发育成新个体的过程。1997年世界首例成体细胞克隆绵羊Dolly诞生,证实了高度分化的体细胞有恢复全能性并发育成新个体的能力,开启了体细胞核移植研究的热潮^[1]。但目前体细胞核移植的机制仍不明确,供体核存在着重编程不完全、表观遗传修饰异常等现象,克隆效率很低。而且体细胞核移植技术还受到伦理道德和国家法规的干预,严重制约着这项技术的发展。然而,体细胞核移植技术还是为研究体细胞重编程的分子机制提供了广阔的思路。

1.2 细胞融合

细胞融合是指在自发或人工诱导下,两个或多个细胞合并成一个双核或多核细胞的过程。实验证明在大多数杂交细胞中,分化程度较低的细胞往往占据主导地位。1976年,Miller和Ruddle^[2]首次证实细胞融合可以使体细胞重编程恢复多能性。他们将小鼠(*Mus musculus*)胸腺细胞与胚胎癌细胞(Embryonic carcinoma cells, EC)杂交,产生的四倍体表达多潜能性细胞标志,将杂交细胞注入裸鼠中可以形成包含3个胚层组织的畸胎瘤。近年来体细胞与胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells, EG)、胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)进行的杂合也获得了相似的结果^[3,4]。虽然细胞融合技术避免了卵母细胞来源困难、基因操作复杂等问题。但是多倍体的存在致使杂合体基因组不稳定,具有潜在风险性;并且四倍体状态阻滞其进一步发育,因此细胞融合后需移除来源于ES、EC、EG细胞的染色体,但目前尚未找到有效去除多余染色体的方法,细胞融合技术在体细

胞重编程中的应用有很大的局限性。

1.3 特定转录因子转染

2006年,Yamanaka和Takahashi^[5]将小鼠成纤维细胞诱导为类胚胎干细胞性质的诱导多潜能性干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS),这一里程碑式的发现,开启了细胞重编程研究的新篇章。他们对24个与维持细胞多能性相关的基因进行组合,通过筛选最终发现4个对细胞重编程至关重要的因子—*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*。当受体细胞导入这4种转录因子后发生重编程,获得强大的更新能力和分化潜能,表现出类胚胎干细胞性质。随后他们又以相同的4种因子将人皮肤成纤维细胞成功诱导为iPS细胞^[6]。iPS技术自诞生以来发展迅速,目前已在小鼠、大鼠、猪、猴、人等动物上成功建立iPS细胞系^[7]。2009年,我国科学家周琪和曾凡一的研究团队^[8]利用iPS细胞通过四倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠,首次证实了iPS细胞的全能性。2012年10月8日,iPS细胞创始人Yamanaka获得诺贝尔生理学或医学奖,必将使iPS的研究工作推向新的高潮。

借鉴iPS技术,还有研究绕过去分化步骤,直接通过转录因子将细胞转分化,称为谱系重编程技术。Vierbuchen等^[9]在19个候选基因中筛选出3个基因*Ascl1*、*Brn2*、*Myt1l*,成功将小鼠成纤维细胞诱导为功能性神经元。Marro等^[10]将终末分化的肝细胞诱导为有功能的神经细胞,证实了起源于不同胚层的细胞可以相互转化。但在转分化后的细胞中还可以检测到少量原细胞类型的表观遗传记忆,需进一步研究。

特定转录因子诱导体细胞重编程,实现了细胞命运的直接转变,摒弃了干细胞和卵母细胞带来的伦理道德问题,在细胞治疗和再生医学方面有广阔的应用前景。但目前细胞诱导效率低,且面临诱发癌症的威胁,严重制约着它的应用。进一步探究重编程机制,建立高效、稳定、安全的体系是目前科学界亟待解决的问题。

2 细胞抽提物诱导

细胞抽提物诱导是近年来新发展的一种使体细胞重编程的方法,其利用卵母细胞、干细胞或不同

类型细胞的提取物诱导细胞使其发生重编程恢复部分全能性或表现其他细胞类型的典型特征。与其他方法相比,抽提物诱导重编程操作简便、效果直观;利用此法,不仅可以获得所需类型的细胞,而且抽提物作为脱离细胞的独立成分更方便识别与重编程有关的细胞因子,探求重编程的机制。

2.1 抽提物诱导重编程的方法

抽提物诱导体细胞重编程的步骤包括:收集待提取细胞,加入细胞裂解液,通过脉冲匀浆或离心获得细胞内容物;应用链球菌溶血素 O (Streptolysin O, SLO) 或洋地黄皂苷 (Digitonin) 等细胞膜透化剂处理受体细胞,使受体细胞膜出现可逆性开放通道;然后受体细胞与添加了能量系统的抽提物共孵育;一定时间后用含 Ca^{2+} 的培养液封闭受体细胞;进而将细胞接种于培养皿中继续培养,并观察重编程特征。

2.2 抽提物诱导重编程的机制

目前抽提物诱导体细胞重编程的机制尚未明确,普遍认为是抽提物中某些因子进入细胞内,发挥一系列作用,引起细胞染色质重塑、表观遗传修饰改变、基因表达开启与关闭从而使体细胞重编程。2000 年, Kikyo 等^[11]用非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞抽提物处理爪蟾上皮细胞,开创了抽提物诱导体细胞重编程研究的先河。研究发现当与抽提物共孵育后,体细胞的蛋白组成发生变化,以 TATA 盒结合蛋白 (TATA binding protein, TBP) 为代表的一类蛋白从细胞中擦除,以 OCR2 为代表的抽提物特有蛋白整合入体细胞内。更深入的研究发现,抽提物中染色质重塑复合体家族成员 ISWI 是引起体细胞 TBP 擦除的关键物质,揭示了 ISWI 在体细胞重编程中的重要作用。Hansis 等^[12]用非洲爪蟾卵母细胞和不同时期胚胎抽提物处理人 239T 细胞时发现,卵母细胞和早期囊胚抽提物均可使细胞重编程,表达多能性标志基因 *Oct4*, 而晚期囊胚抽提物无重编程能力,推测可能与晚期囊胚基因表达发生变化,重编程因子消失有关。同时他的研究还发现重编程能力随着抽提物中染色质重塑酶 BRG1 的去除而废止,推测 BRG1 也是一种能够使体细胞发生重编程的重要因子。Alberio 等^[13]研究发现当用爪蟾卵母细胞抽提物处理猪胎儿成纤维细胞后,在重编程过程中检测到

体细胞核纤层蛋白 A/C (Lamin A/C) 消失,爪蟾特有的核纤层蛋白 III (Lamin III) 整合入体细胞中,并且这种整合需要预先通透细胞膜,表明细胞膜的通透性可能是抽提物诱导重编程的关键因素。但目前对于抽提物诱导体细胞重编程的机制研究还不够深入,仅能发现个别物质对细胞重编程的作用,如何由点及面广泛的研究重编程调控网络还需继续深入研究。

2.3 抽提物诱导重编程的进展

目前抽提物诱导细胞重编程的研究主要集中在细胞去分化、转分化和干细胞分化 3 方面。

2.3.1 细胞去分化

体细胞核移植实验已证实卵母细胞中有能够使体细胞重编程恢复全能性的全部物质,因此卵母细胞抽提物是研究细胞重编程的重要工具。非洲爪蟾、蝾螈等两栖类动物由于其卵数量多、体积大、来源方便,是最初研究抽提物诱导体细胞重编程的理想材料。Miyamoto 等^[14]用非洲爪蟾卵母细胞抽提物处理猪胎儿成纤维细胞,检测到爪蟾特有的组蛋白 B4 和 Lamin III 整合到体细胞中,组蛋白 H3K9 去乙酰化,抽提细胞培养 4 d 后表达多能性标志基因 *Oct4* 和 *Sox2*, 并形成类胚胎干细胞样的“克隆点”,细胞发生部分重编程。Ganier 等^[15]的研究发现爪蟾卵母细胞抽提物对小鼠胎儿成纤维细胞有强大的重编程能力。当用 M 期抽提物处理受体细胞后,受体细胞短暂增殖,呈克隆样生长,并表达多能性标志基因。研究还发现抽提物处理与诱导 iPS 协同作用,可提高 iPS 诱导效率 45 倍。Bian 等^[16]通过蝾螈 (*salamandrae*) 卵母细胞抽提物诱导体细胞重编程,发现细胞基因组 DNA 甲基化、H3K9 三甲基化水平降低; H3K9 乙酰化水平升高, *Oct4* 基因启动子发生去甲基化,体细胞有去分化恢复多能性的趋势。2011 年, Allegrucci 等^[17]研究发现两栖动物卵母细胞抽提物可诱导乳腺癌细胞重编程,引起肿瘤抑制基因启动子去甲基化,使沉默基因重新表达。这也是首例应用抽提物诱导癌细胞重编程的报道,为癌症的治疗提供了新思路。但该研究发现重编程能力只存在于未成熟卵抽提物中,成熟卵抽提物没有重编程能力;并且在蝾螈和爪蟾卵抽提物重编程能力的比较中发现,前者的重编程能力要显著好于后者,推测可能是不同物种、不同时期的卵母细胞重编程能力有所

不同。

哺乳动物卵母细胞个体小,较难收集足量的抽提物,但对于同种属间的重编程研究,却是比两栖动物卵母细胞更好的实验材料。在体细胞核移植试验中,目前主要采用M期卵母细胞作为核受体,因此认为M期卵母细胞抽提物是研究重编程的理想材料;而不适合作为核受体的GV期卵母细胞是否对体细胞重编程有促进作用也可通过抽提物诱导验证。Bui等^[18]用小鼠GV期卵母细胞抽提物处理体细胞,体细胞核重塑,组蛋白H3K9完全去甲基化,H3K9、H3K14部分去乙酰化,并且重编程后的体细胞有助于后续克隆胚胎的发育,因此认为GV期卵母细胞中也存在对重编程有重要作用的因子。Miyamoto等^[19]分别用猪GV期和M期卵母细胞抽提物评估诱导体细胞重编程的能力,前者诱导激活多能性标志基因表达,细胞呈克隆样生长;后者重编程作用引起基因组H3K9去乙酰化、TBP消失,但没有明显的形态学变化,说明GV期和M期卵母细胞都具有诱导体细胞重编程的能力,但二者可能具有不同的因子发挥不同作用,为重编程机制的研究和克隆胚胎的制备提供了新思路。

除卵母细胞抽提物外,胚胎干细胞、胚胎癌细胞和胚胎生殖细胞等多能性细胞抽提物也可以使体细胞重编程。Taranger等^[20]用未分化的人NCCIT癌细胞抽提物处理293T细胞,结果发现*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*等多能性标志基因表达,细胞形成“克隆点”,并保持超过23代;而且重编程细胞在适当条件下可再次分化为神经元细胞、脂肪细胞、内皮细胞等,表明细胞抽提物诱导可以使已分化的细胞重新具有可塑性。随后应用胚胎干细胞抽提物也得到了相似的结果^[21]。Freberg等^[22]用EC抽提物处理293T细胞,诱导多能性标志基因*Oct4*、*Nanog*表达,其进一步研究了*Oct4*、*Nanog*基因调控区的表观遗传修饰变化,亚硫酸氢盐测序检测到*Oct4*、*Nanog*基因发生去甲基化,并主要集中在近端启动子和远端增强子部位;染色质免疫沉淀分析*Oct4*和*Nanog*基因H3K4、H3K9、H3K27修饰情况显示抽提物处理主要引起H3K9乙酰化和去二甲基化,推测抽提物诱导可能通过改变细胞表观遗传修饰状态,引起基因表达变化。Han等^[23]首次将细胞抽提物与化学制剂联合使用,人胚胎干细胞抽提物处理前应用DNA甲基转移酶抑制剂

5-aza和组蛋白乙酰化酶抑制剂TSA预处理体细胞,形态学分析显示形成“克隆点”的效率显著提高;荧光定量PCR结果显示,与抽提物单独处理相比,联合处理使多能性标志基因表达大幅上调,有效提高重编程效率。

2.3.2 细胞转分化

应用细胞抽提物诱导也可以使一种类型细胞直接转分化为另一种类型细胞,省略细胞去分化步骤,这将会提高细胞转化效率。Håkelién等^[24]用T细胞抽提物处理293T细胞,结果发现受体细胞转录因子富集,染色质重塑复合物激活,引起293T细胞表观遗传修饰改变,表达淋巴细胞特定基因和表面标志。而他的另一项研究发现^[25]INS-1E细胞抽提物可以短暂改变成纤维细胞命运,抽提物处理后受体细胞明显回缩,4周后表达细胞特有的转录因子Pdx-1和insulin,有5%~30%的细胞检测到胰岛素标记。Choi等^[26]报道大鼠胰腺抽提物处理鼠间叶细胞,处理后细胞呈胰岛样生长,表达4种胰岛特异表达激素(胰岛素、胰高血糖素、胰多肽和生长激素抑制素),并对葡萄糖有应答反应,这种转分化得到的类胰岛细胞将为研究糖尿病提供大量材料。但目前对于抽提物诱导体细胞转分化的研究还较少,需进一步研究。

2.3.3 诱导干细胞分化

干细胞的多潜能性为再生医学提供了巨大的前景,如何使干细胞高效定向发育,培养出所需类型的细胞,一直是干细胞研究的热点问题。传统诱导干细胞定向发育的方法主要包括生长因子介导、基因修饰、组织与细胞共培养等。随着抽提物诱导细胞重编程研究的不断深入,细胞抽提物诱导成为一种新兴诱导干细胞定向发育的方法。Qin等^[27]用型肺细胞抽提物诱导小鼠胚胎干细胞,处理后的胚胎干细胞在培养过程中自发分化为型肺细胞,且分化速度远快于细胞因子诱导。Liu等^[28]采用胎儿肺脏组织细胞抽提物诱导人胚胎干细胞向造血细胞系定向发育,结果显示抽提物诱导与传统的细胞共培养方式相结合可以大幅提高定向发育能力。唐新杰等^[29]用人表皮细胞抽提物重编程人脂肪干细胞,加入表皮细胞抽提物后受体细胞变为表皮细胞特有的“铺路石”样形态,并表达表皮细胞特有的*K1/10*

及 *K19* 基因及膜蛋白, 脂肪干细胞向表皮细胞定向分化。潘侃达^[30]用血管组织细胞抽提物诱导大鼠骨髓间充质干细胞, 发现细胞基因表达发生变化, 内皮细胞特异性基因 *CD31*、*CD34*、*CD144* 和 *eNOS* 呈高表达。Labovsky 等^[31]用新生大鼠心肌细胞抽提物诱导骨髓间充质干细胞, 受体细胞表达心肌细胞特异基因, 在诱导体系中加入 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-aza 可明显提高转分化效率。与基因修饰、组织共培养等传统方法相比, 抽提物诱导法简单、操作性强, 可作为直接工具或辅助手段诱导胚胎干细胞定向分化。

3 抽提物诱导在动物克隆上的应用

哺乳动物体细胞核移植已有 10 余年的发展历史, 但核移植效率仍然很低。目前研究认为高度分化的体细胞在卵母细胞质中重编程不完全, 存在大量表观遗传修饰异常, 致使胚胎难以正常发育, 是影响克隆效率的主要因素。以往研究表明以分化程度较低的细胞作为核移植供体可有效提高克隆效率。而应用细胞抽提物诱导, 可以使体细胞重编程, 恢复到一个相对低分化状态, 以此作为核供体是否可以提高核移植效率, 是目前研究的主要热点。

Liu 等^[32]以爪蟾卵母细胞抽提物预处理过的猪胎儿成纤维细胞作为核供体制备克隆胚胎。结果发现与对照组相比, 克隆胚胎囊胚率显著提高。在深入研究中, 应用 3 只爪蟾制备的卵母细胞抽提物分别处理供体细胞, 发现形成“克隆点”的数目在不同处理组之间有显著差异, 并且“克隆点”数目与囊胚率显著相关, 因此推测形成“克隆点”的数目可能是抽提物质量高低的标志^[33]。而 Miyamoto 等^[34]的研究得出不同结论, 他的研究表明虽然爪蟾卵母细胞抽提物使供体细胞重编程恢复到较低分化状态, 但并没有提高克隆效率, 只提高了克隆胚胎内细胞团的细胞数目, 因此他认为抽提物处理后只是增加了细胞的增殖能力, 并没有提高细胞的发育能力。Rathbone 等^[35]的研究也发现爪蟾卵母细胞抽提物预处理过的供体细胞没有提高克隆胚胎的囊胚率和妊娠率, 但显著提高了克隆动物的成活率, 这也是首例通过抽提物处理获得克隆大动物的报道。而同样的研究结果也在小鼠上得到了证实^[18]。Tang 等^[36]用未成熟、成熟、孤雌激活的牛卵母细胞抽提物分

别处理牛耳缘成纤维细胞, 发现 3 组均可诱导细胞表达 *Oct4* 基因, 但在克隆实验中只有成熟卵母细胞抽提物处理组显著提高克隆胚胎囊胚率以及胚胎质量, 其余两组并没有明显效果。而最近在牦牛的克隆实验中也得到了类似的结果^[37]。Betthausen 等^[38]将爪蟾卵中纯化得到的核浆素(Nucleoplasmin)以不同剂量分别注入牛卵母细胞和重构胚中, 发现制备的克隆胚胎与体外受精胚相比有超过 200 个基因表达上调, Nucleoplasmin 以 2 500 ng/ μ L 浓度注入重构胚可以显著提高囊胚率, 推测 Nucleoplasmin 可能是提高克隆效率的关键因子。最近还有研究在猪卵母细胞抽提物中发现一种蛋白 DJ-1 也对细胞重编程和胚胎发育有重要作用^[39]。

目前抽提物预处理供体细胞对于克隆效率的影响还存在争议, 不同物种、不同时期的卵母细胞抽提物对于重构胚的发育往往产生不同的实验结果。从目前研究来看, 抽提物诱导重编程后, 供体细胞恢复到一个较低的分化状态并不一定会提高克隆效率, 制备适合的卵母细胞抽提物并从中寻找对克隆胚胎发育起作用的因子, 应是现阶段研究的重点。

4 问题与展望

目前抽提物诱导体细胞重编程的研究还不够深入, 面临着一些亟待解决的问题。首先, 需优化抽提物制备方法, 避免某些因子在抽提物制备过程中丢失或失活, 影响重编程效率。其次, 抽提物诱导重编程能力有待提高, 目前抽提物处理后体细胞仅仅是部分重编程, 需进一步探究重编程机制, 找出调控网络, 从而真正实现细胞类型间的相互转化。再次, 实验表明^[25]抽提物诱导体细胞重编程是一个短暂改变细胞命运的过程, 细胞重编程特征会逐渐消失, 因此如何长久保持分化表型也是需研究的重点。

综上所述, 抽提物诱导体细胞重编程作为一种新兴的研究手段, 不仅可以获得重编程细胞系, 而且是研究重编程分子机制的有效途径。随着研究的深入, 将会对生物学和再生医学产生巨大的价值。

参考文献(References):

- [1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mam-

- malian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810–813. [DOI](#)
- [2] Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 1976, 9(1): 45–55. [DOI](#)
- [3] Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6510–6520. [DOI](#)
- [4] 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): 1553–1558. [DOI](#)
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [DOI](#)
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872. [DOI](#)
- [7] 秦彤, 苗向阳. iPS细胞研究的新进展及应用. *遗传*, 2010, 32(12): 1205–1214. [DOI](#)
- [8] Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng FY, Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86–90. [DOI](#)
- [9] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035–1041. [DOI](#)
- [10] Marro S, Pang ZP, Yang N, Tsai MC, Qu K, Chang HY, Südhof TC, Wernig M. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(4): 374–382. [DOI](#)
- [11] Kikyo N, Wade PA, Guschin D, Ge H, Wolffe AP. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science*, 2000, 289(5488): 2360–2362. [DOI](#)
- [12] Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by *Xenopus* egg extract requires BRG1. *Curr Biol*, 2004, 14(16): 1475–1480. [DOI](#)
- [13] Alberio R, Johnson AD, Stick R, Campbell KHS. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Exp Cell Res*, 2005, 307(1): 131–141. [DOI](#)
- [14] Miyamoto K, Furusawa T, Ohnuki M, Goel S, Tokunaga T, Minami N, Yamada M, Ohsumi K, Imai H. Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(10): 1268–1277. [DOI](#)
- [15] Ganier O, Bocquet S, Peiffer I, Brochard V, Arnaud P, Puy A, Jouneau A, Feil R, Renard JP, Méchali M. Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic *Xenopus* egg extracts and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): 17331–17336. [DOI](#)
- [16] Bian YH, Alberio R, Allegrucci C, Campbell KHS, Johnson AD. Epigenetic marks in somatic chromatin are remodelled to resemble pluripotent nuclei by amphibian oocyte extracts. *Epigenetics*, 2009, 4(3): 194–202. [DOI](#)
- [17] Allegrucci C, Rushton MD, Dixon JE, Sottile V, Shah M, Kumari R, Watson S, Alberio R, Johnson AD. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 7. [DOI](#)
- [18] Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Kim JH, van Thuan N, Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development*, 2008, 135(23): 3935–3945. [DOI](#)
- [19] Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M, Imai H. Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. *Biol Repro*, 2009, 80(5): 935–943. [DOI](#)
- [20] Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic-stem cells. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12): 5719–5735. [DOI](#)
- [21] Neri T, Monti M, Rebuzzini P, Merico V, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Mouse fibroblasts are reprogrammed to *Oct-4* and *Rex-1* gene expression and alkaline phosphatase activity by embryonic stem cell extracts. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(3): 394–406. [DOI](#)
- [22] Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(5): 1543–1553. [DOI](#)
- [23] Han J, Sachdev PS, Sidhu KS. A combined epigenetic and non-genetic approach for reprogramming human somatic cells. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12297. [DOI](#)
- [24] Håkelién AM, Landsverk HB, Robl JM, Skålhegg BS, Collas P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 460–466. [DOI](#)
- [25] Håkelién AM, Gaustad KG, Collas P. Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 834–841. [DOI](#)
- [26] Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. *In vitro* trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(4): 1299–1305. [DOI](#)

- [27] Qin MD, Tai GP, Collas P, Polak JM, Path FRC, Bishop AE. Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(6): 712–718. [DOI](#)
- [28] Liu YX, Ji L, Yue W, Yan ZF, Wang J, Xi JF, Zhang R, Nan X, Bai CX, Chen L, Wang YF, Pei XT. Cell extract from fetal liver promotes the hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11(1): 51–60. [DOI](#)
- [29] 唐新杰, 谢峰, 宋楠, 张群. 人表皮细胞抽提物重编程脂肪干细胞的实验研究. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 7(3): 129–132. [DOI](#)
- [30] 潘侃达. 血管组织细胞抽提物体外调控间质干细胞向内皮细胞分化的研究. *当代医学*, 2010, 16(3): 1–3. [DOI](#)
- [31] Labovsky V, Hofer EL, Feldman L, Fernández Vallone V, García Rivello H, Bayes-Genis A, Hernando Insúa A, Levin MJ, Chasseing NA. Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal cells: Role of cardiac extract from neonatal rat cardiomyocytes. *Differentiation*, 2010, 79(2): 93–101. [DOI](#)
- [32] Liu Y, Østrup O, Li J, Vajta G, Lin L, Kragh PM, Purup S, Hyttel P, Callesen H. Increased blastocyst formation of cloned porcine embryos produced with donor cells pre-treated with *Xenopus* egg extract and/or digitonin. *Zygote*, 2012, 20(1): 61–66. [DOI](#)
- [33] Liu Y, Østrup O, Li J, Vajta G, Kragh PM, Purup S, Callesen H. Cell colony formation induced by *Xenopus* egg extract as a marker for improvement of cloned blastocyst formation in the pig. *Cell Reprogram*, 2011, 13(6): 521–526. [DOI](#)
- [34] Miyamoto K, Ohnuki M, Minami N, Yamada M, Imai H. Nuclear reprogramming of porcine cells and their use as donor cell for nuclear transfer after treatment in *Xenopus* egg extracts. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 19(1): 150. [DOI](#)
- [35] Rathbone AJ, Fisher PA, Lee JH, Craigon J, Campbell KH. Reprogramming of ovine somatic cells with *Xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate. *Cell Reprogram*, 2010, 12(5): 609–616. [DOI](#)
- [36] Tang S, Wang Y, Zhang D, Gao Y, Ma Y, Yin B, Sun J, Liu J, Zhang Y. Reprogramming donor cells with oocyte extracts improves *in vitro* development of nuclear transfer embryos. *Anim Reprod Sci*, 2009, 115(1–4): 1–9. [DOI](#)
- [37] Xiong XR, Wang LJ, Zi XD, Ma L, Xu WB, Wang YS, Li J. Epigenetic reprogramming of Yak iSCNT embryos after donor cell pre-treatment with oocyte extracts. *Anim Reprod Sci*, 2012, 133(3–4): 229–236. [DOI](#)
- [38] Betthausen JM, Pfister-Genskow M, Xu H, Golueke PJ, Lacson JC, Koppang RW, Myers C, Liu B, Hoeschele I, Eilertsen KJ, Leno GH. Nucleoplasmin facilitates reprogramming and *in vivo* development of bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(8): 977–986. [DOI](#)
- [39] Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K, Imai H. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 7040–7045. [DOI](#)