

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0015-05

• 实验研究 •

小鼠多潜能干细胞来源的内皮细胞的基因表达及功能特点

孙璇^{1,2}, 卢光琇¹

(1 中南大学生殖与干细胞工程研究所, 国家干细胞研究中心, 湖南省长沙市 410078

2 密歇根大学心血管中心, 安娜堡, 48109 美国)

[关键词] 多潜能干细胞; 内皮细胞; 诱导分化; VE-Cadherin

[摘要] 目的 探讨小鼠成纤维细胞来源的多潜能干细胞向内皮细胞诱导分化的能力。方法 采用单层贴壁诱导及流式细胞术进行 Flk1+ 细胞分化与分选, 进而与 OP9 基质细胞共培养, 并用 VE-cadherin 为标志纯化内皮细胞 (O9-EC); 采用免疫荧光检测分化细胞的内皮细胞特异蛋白表达, 检测分化的内皮细胞体外成血管能力, 吞噬 Dil-Ac 标记的低密度脂蛋白和结合荆豆凝集素的功能; 采用定量实时 PCR 检测分化过程中的基因表达。结果 流式细胞仪分选得到的分化细胞能表达 CD31、VE-cadherin、WF 等表面标志, 吞噬 Dil-Ac-LDL, 结合荆豆凝集素, 并能在 matrigel 上形成血管样结构。分化过程中内皮细胞特异性基因如 CD31、Tie2、eNOS 等表达上调, 而 Oct4、Sox2、Klf4 和 cMyc 这四种诱导多潜能干细胞形成的转录因子的表达显著下调。结论 多潜能干细胞能向内皮细胞诱导分化。

[中图分类号] Q291

[文献标识码] A

Gene Expression and Functional Characteristics of Mouse iPS cell-derived Endothelial Cells

SUN Xuan^{1,2}, and LU Guang-Xiao¹

(1 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University and National Engineering and Research Center of Human Stem Cell, Changsha, 410078 China; 2 Cardiovascular Center, Department of Internal Medicine, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI 48109 USA)

[KEY WORDS] Induced Pluripotent Stem Cells Endothelial Cells Induced Differentiation VE-cadherin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the potential of mouse fibroblast cell-derived embryonic-like induced pluripotent stem cells (iPS cells) to differentiate into endothelial cells. **Methods** O9 iPS cells were induced to differentiate into endothelial cells by monolayer culture; FACS sorting Flk1+ cells followed by OP9 stromal cell co-culture; and purified by FACS sorting VE-cadherin+ cells (O9-EC). The endothelial specific protein expression were examined by immunofluorescence. The functions of angiogenesis in vitro, uptaking Dil-Ac-LDL and binding UEA1 were also tested. Gene expression during differentiation process were tested by real-time PCR. **Results** Mouse O9 iPS cells derived Flk1+ cells could differentiate into endothelial-like cells on OP9 stromal cells. VE-cadherin could be used as a marker to purify O9-EC. O9-EC could express CD31, VE-cadherin and WF, uptake Dil-Ac-LDL, bind UEA1 and form tube-like structures on matrigel. The endothelial specific genes such as CD31, Tie2 and eNOS were up-regulated in the endothelial differentiation process. Four reprogramming factors (Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc) that induce the generation of iPS cells were significantly down-regulated in this process. **Conclusion** This study supports that iPS cells can differentiate into endothelial cells in vitro. This procedure may contribute to clinic application of patient-specific iPS cells derived endothelial cells in vascular degeneration diseases.

近两年来, 诱导多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 的研究引起了极其广泛的关注。最初的 iPSC 是由成纤维细胞转染 Oct4、Sox2、Klf4 和 cMyc 四种因子而得到的^[1]。与胚胎干细胞

一样, iPSC 能无限增殖并具有多向分化潜能。较之胚胎干细胞, iPSC 细胞来源于成体细胞, 避免了伦理问题, 且能建立患者特异性的细胞株, 使从患者自身组织得到患者个体特异性的多能干细胞成为可能, 具有很高的临床应用价值。目前, iPSC 已成功诱导分化成造血细胞^[2]、肝细胞^[3]、脂肪细胞^[4]、心肌细胞^[5]、视网膜细胞^[6]和运动神经元^[7]等组织细胞, 能参与形成成体的嵌合体小鼠^[8,9]。内皮细胞是组成血管的重要细胞成分, 异常的内皮细胞功能可导致动脉粥样硬化, 自身免疫性疾病, 移植排斥

[收稿日期] 2009-11-20 [修回日期] 2009-01-12

[基金项目] 863 项目 (2006AA02A102); 973 项目 (2007CB947901)

[作者简介] 孙璇, 博士研究生, 主要从事干细胞工程及细胞分子生物学的研究, E-mail 为 hndy@163.com。通讯作者卢光琇, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生殖遗传及干细胞研究, E-mail 为 luguangdirecto@yahoo.com.cn。

等。内皮细胞的体外诱导分化对血管组织工程, 心血管药物筛选, 及血管性疾病的治疗均有重大意义。本研究初步探讨了 iPSC 向内皮细胞的诱导能力及其诱导分化过程中的基因表达变化。

1 材料方法

1.1 材料

OP9细胞株由美国密歇根大学 Yang Liu 教授友情提供, 小鼠 iPSC 细胞 (O9细胞株) 由麻省理工大学的 Jaenisch R. 教授友情提供, 小鼠胚胎干细胞 CMT-1 细胞株和丝裂霉素 C 处理的小鼠成纤维细胞为 Millipore 公司产品。

Q SYBR Green Supermix, β -巯基乙醇、抗坏血酸、明胶、丝裂霉素 C、FITC 标记荆豆凝集素-1 (UEA-1)、人重组 VEGF165、Fibronectin 为 Sigma 公司产品; Superscript[®] first-strand synthesis system、First-Strand cDNA Synthesis Kit AlexaFluor 488 标记羊抗大鼠二抗为 Invitrogen 公司产品; alpha-MEM、DMEM/F12、DMEM、胎牛血清 (FBS)、青霉素/链霉素、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、DPBS、0.05% 胰酶/EDTA 为 Gibco 公司产品; EGM-2 Lonza 小鼠 LIF 为 Chemicon 公司产品; DiI-Ac-LDL 为 Biomedical Technology 公司产品; DAPI 为 PIERCE 公司产品; PE 标记大鼠 IgG 同型对照, PE 标记大鼠抗小鼠 Flk1, 大鼠抗小鼠 VE-cadherin, 大鼠抗小鼠 CD31 为 BD Pharmingen 产品; 兔抗多血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品。

1.2 仪器与设备

实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad iCycler thermal cycler); 荧光显微镜 (Nikon Eclipse TE2000-E Model F-DH); BD Biosciences FACS Calibur[™] system 流式细胞仪。

1.3 细胞培养

OP9 细胞株在含 20% FBS 和 1% 青链霉素的 alpha-MEM 中培养, 待细胞长至 80% ~ 90% 融合时传代, OP9 细胞在作为分选 Flk1⁺ 细胞的饲养层细胞前先长至融合, 用 10 mg/L 丝裂霉素 C 处理 2.5 h 使之停止分裂。O9 iPSCs 培养和分离方法参考文献 [10]。为向内皮细胞诱导分化, 将 O9 iPSC 细胞以 2×10^4 每孔的密度种在铺有 IV 型胶原的 6 孔板中, 每孔加培养基 4 mL, 培养基为 alpha-MEM, 10% FBS, 50 g/L 抗坏血酸, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇。不需传代或者换液, 在 37℃ 含 5% CO₂ 环境中培养

4 天后胰酶消化流式分选或提取 RNA 检测。分选后的 Flk1⁺ 细胞以 10^5 个/孔的密度在 6 孔板中丝裂霉素 C 处理的 OP9 细胞上培养, 培养基为 alpha-MEM, 10% FBS, 50 g/L 抗坏血酸, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇, 50 μ g/L VEGF。分选后的 VE-cadherin⁺ 细胞在 Fibronectin 处理的 6 孔板中培养, 培养基为 EGM-2, 50 μ g/L VEGF。长至 80% 融合时胰酶传代。

1.4 流式分选或分析

贴壁分化 4 天的 O9 iPSC 细胞用 0.05% 胰酶/EDTA 消化成单细胞, 100 μ m 的细胞滤网过滤未消化完全的细胞团, 细胞重悬在含 0.5% BSA 的 PBS 中, 调整细胞密度为 10^{10} 个/L, 每毫升细胞悬液加入 200 μ L PE 标记的大鼠抗小鼠 Flk1 抗体或 PE 大鼠 IgG 同型对照, 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗两次, 每 10^7 细胞重悬于 2 mL alpha-MEM 中, 冰上避光保存至上机分选。在 OP9 饲养层细胞上培养 20~30 天的 Flk1⁺ 细胞再次用 VE-cadherin 作为标记进行分选。方法基本同上。消化成单细胞悬液后, 次序与大鼠抗小鼠 VE-cadherin 一抗和 AlexaFluor 488 羊抗大鼠二抗 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗两次, 上机分选。只孵育二抗的细胞作为对照。分选时设门排除细胞团和细胞碎片, 在加有培养基的离心管里收集阳性细胞。

1.5 细胞免疫荧光染色

纯化的 VE-cadherin 阳性细胞进行免疫细胞化学染色, 检测抗原的表达情况。4% 多聚甲醛固定细胞, vWF 检测孔用 0.1% Triton-X-100 破膜, 用 4% 的山羊血清封闭 1 h, 加稀释一抗 (均为 1:50 稀释), 4℃ 过夜, PBS 洗 4 遍, 依据一抗来源分别加 AlexaFluor 488 标记的羊抗大鼠和羊抗兔二抗 (均为 1:100 稀释), 避光室温孵育 1 h, PBS 洗 4 遍, DAPI (1:10000) 染核 10 min, 荧光显微镜下观察细胞染色情况并照相。小鼠成纤维细胞作为阴性对照。

1.6 RNA 提取及定量实时聚合酶链式反应 (qRT-PCR)

用 RNeasy mini kit 提取 O9 细胞、O9 贴壁分化 4 天的细胞和 VE-cadherin 阳性细胞的总 RNA, 具体步骤参照说明书。每 2 ng RNA 用 Superscript[®] first-strand synthesis system 逆转录合成 20 μ L cDNA 后用 qRT-PCR 扩增, 每体系 15 μ L, 包括 0.5 μ L cDNA, 7.5 μ L SYBR Green Supermix, 6.5 μ L H₂O, 上下游引物各 0.25 μ L。封口膜封住管口, Tm = 60℃, 40 个循环。所用的引物见表 1。用 18S RNA 作为内参比较每次反应的 threshold cycle 以显示 mRNA 表达量。

表 1. 定量实时 PCR 引物表

指标	正义引物	反义引物
VE-cadherin	GAAGAGGCAGACAATGACG	GCCCAAAGACCAGAACCC
Fli1	CTGTGAACGCTTGCCCTAT	CAACATCTTGACGGCTACT
W F	GTGACACCATGTCTGCTTAT	TGTGCATGACAACCTCC
CD34	CTGCCATCTATAATGTITC	AACCTCACITCTCGGATT
CD31	CTCAGCTGCTGCTCTAT	CCATCGCATCGTCTTAT
Tie2	GACCCATCAAATCCAAGA	GAGTCCGATAGACGCTGT
eNOS	ACCCTCACCGCTACAACA	TGGCCTTCTGCTCATTTT
SM A α	GGCATCCACGAAACCACTAT	AGCCACCGATCCAGACAGAGTA
O c t 3/4	AAGCAACTCAGAGGGAACCT	GGTGATCCTCTTCTGCTTCA
Sox2	CATGACCAGCTCGCAGAC	CCTCGGACTTGACCACAG
Klf4	CCTTGATGCTCTTTGCCTTCT	CCTTTAGGACCAAACTCAACCA
cMyc	ACTGTATGTGGAGCGGTTC	GCTGTCGTTGAGCGGGTA
18S	GGAAGGGCACCACGAGACT	TGCAGCCCCGGACATCTAAG

1.7 内皮细胞功能的鉴定

在细胞培养皿中加入 10 mg/L 的 DiI-Ac-LDL, 37℃ 孵育 4 h, 用培养基洗去未被摄取的 DiI-Ac-LDL, 荧光显微镜下观察。在内皮特异性凝集素结合实验中, VE-cadherin 阳性细胞原位固定, 和 UEA-1-FITC 孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 用荧光显微镜观察结果。在 96 孔板每孔中加 50 μ L matrigel 在 37℃ 使其凝胶化至少 30 min, 再在 matrigel 上加入 100 μ L 细胞悬液, 含 $1 \sim 2 \times 10^4$ VE-cadherin 阳性细胞和 50 μ g/L VEGF, 37℃ 孵育 4~6 h 后观察。

1.8 统计学分析

定量实时 PCR 实验重复 3 次, 结果用差表示, t 检验来确定 P 值, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 O9 多能干细胞的分化

在向内皮分化的体系中, O9 PS 细胞在 N 型胶原处理的六孔板中单层培养 4 天, 增殖迅速, 成大片融合生长, 消化成单细胞后做流式分选 Fli1 阳性细胞。O9 PS 分化细胞中 Fli1+ 细胞的阳性率可达到 $14.85\% \pm 4.21\%$ 。O9-Fli1+ 细胞在丝裂霉素 C 处理的 OP9 细胞株上继续诱导分化, 单个分选的细胞在 10~20 天后形成很大的克隆, 每个克隆中的细胞形态不均一, 由多种细胞群体组成, 其中绝大部分呈一种鹅卵石样的细胞形态, 形似内皮细胞 (图 1)。将混合细胞群消化, 并用 VE-cadherin 再次进行分选, 可以分选得到 $5.62\% \pm 2.31\%$ 的 VE-cadherin 阳性细胞。最后分选得到的 VE-cadherin+ 细胞

(O9-EC) 能在添加了 50 μ g/L VEGF 的 EGM-2 培养基中继续增殖传代。

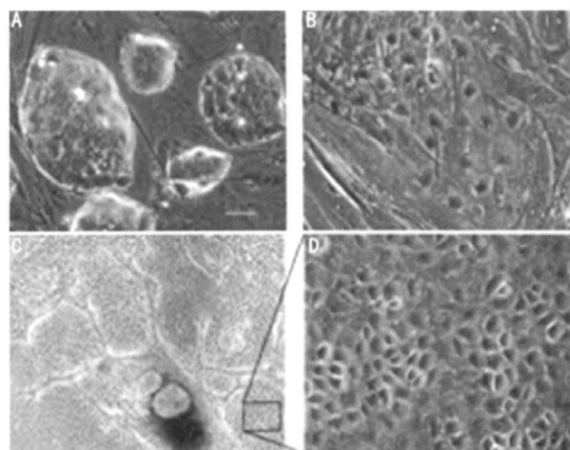


图 1 O9 PS 细胞向内皮细胞的分化 A 为生长在 MEF 上的 O9 PS 细胞克隆, B 为分选的 Fli1+ 细胞在 OP9 基质细胞上生长 5 天后形态, C 为分选的 Fli1+ 细胞在 OP9 基质细胞上生长 20 天后形态, D 为 C 的局部放大, 有许多细胞呈鹅卵石样细胞形态。(A, B, D $\times 200$ C $\times 40$)

2.2 内皮细胞特异性蛋白的表达及功能

O9 PS 在经历了分化和 VE-cadherin 分选后 (O9-EC), 进行内皮细胞特异性标志的免疫荧光检测及功能检测 (图 2)。细胞表达 CD31 和 VE-cadherin 等内皮细胞特异性表面标志和 W F 内皮细胞特异性细胞内标志, 能在 matrigel 上重新排列形成血管样结构, 吞噬 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-Ac-LDL), 并能与荆豆凝集素 UEA-1 结合。

2.3 内皮细胞特异性基因的表达

O9-EC 中内皮细胞特异性基因表达显著上调, 而转染入 O9 PS 的四个基因则表达显著下调。qRT-PCR 结果发现 (图 3) 在 O9 PS 细胞, 分化 4 天的 O9 细胞和 O9-EC 中, VE-cadherin, Fli1, W F 和 CD34 的表达水平逐渐上升, CD31, Tie2 和 eNOS 的表达水平先下调再上调, 平滑肌细胞的特异性基因 SM- α -actin 的表达水平在此分化过程中没有显著变化。O9 PS 细胞来源于转染了 4 种转录因子 O c t 3/4, Klf4, Sox2 和 cMyc 的小鼠成纤维细胞, 相较于未分化的 O9 PS 细胞, 这四种转录因子在分化过程中都有不同程度的下调。但是, 即使在 O9-EC 中, 这四种转录因子仍有不同程度的低表达。cMyc 在 O9 贴壁分化 4 天后先上调, 而在其后的向内皮细胞的分化过程中下调。其他三种转录因子均在分化过程中逐渐显著下调。

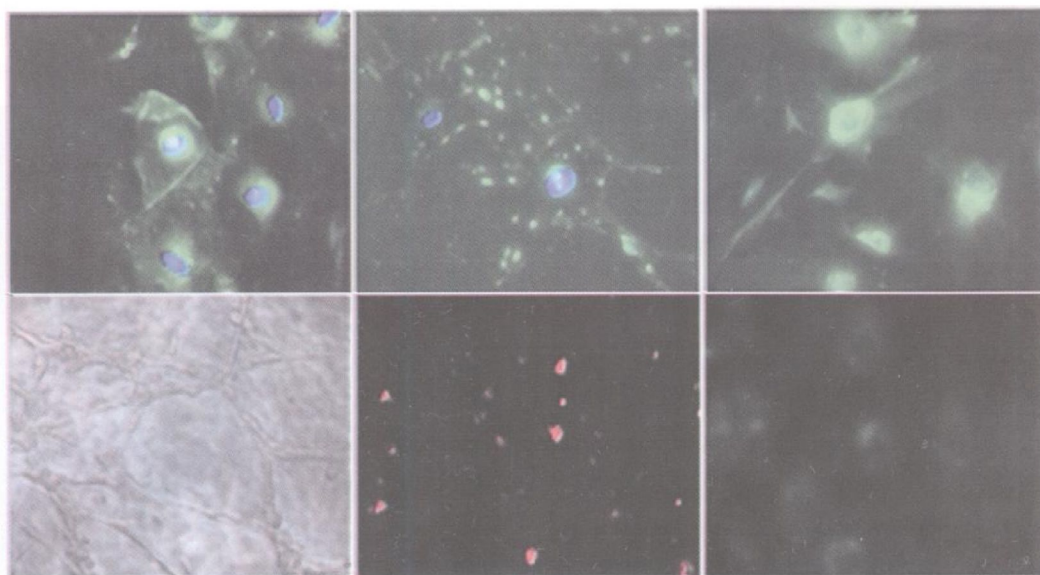


图 2 免疫荧光检测内皮细胞特异性标志及内皮细胞功能试验 O9-EC 表达内皮细胞特异性标志, 上排从左到右为 CD31、VE-cadherin 和 vWF 免疫荧光检测; 下排从左到右为 Matrigel 上形成血管样结构、DiI-AcLDL 吞噬实验和 UEA1 结合试验

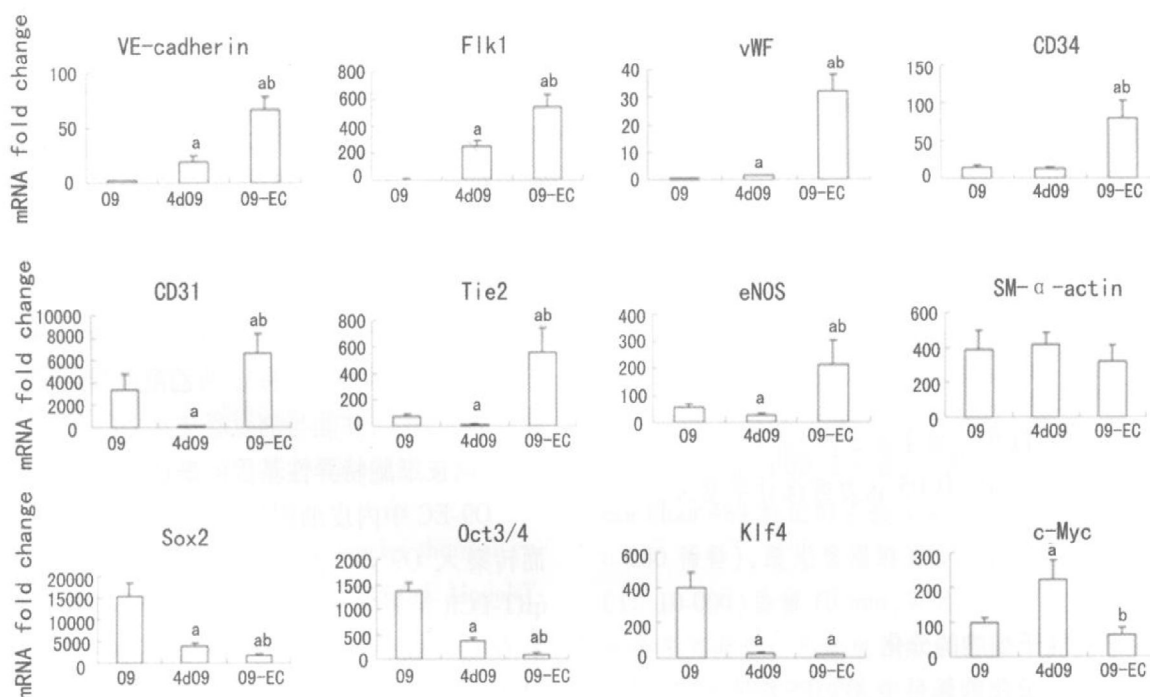


图 3 qRT-PCR 检测 O9 PS 分化过程中各种基因 mRNA 水平的表达 mRNA 水平值用 18S rRNA 水平作为内参来计算。a 为 $P < 0.05$ 与 O9 组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 4dO9 组比较, $n = 3$ 。

3 讨论

O9 PS 细胞株是由 Oct4、c-Myc、Klf4 和 Sox2 四个经典的基因诱导生成的细胞株。在前期实验中, 我们发现 O9 PS 细胞株与普通 CMT1 小鼠胚胎干细胞株形态、生长方式和增殖速度相似, 向 Flk1 阳性细胞的分化效率也与普通的小鼠胚胎干细胞相

似: CMT1 mESC 分化细胞中 Flk1⁺ 细胞的阳性率可达到 $12.32\% \pm 3.98\%$, O9 PS 分化细胞中 Flk1⁺ 细胞的阳性率可达到 $14.85\% \pm 4.21\%$, 两者差异无显著性。这一结果说明 O9 PS 细胞与普通 mES 细胞十分接近。

内皮细胞、平滑肌细胞和心肌细胞都来源于一

个共同的 $Flk1^+$ 心血管祖细胞, $Flk1^+$ 细胞的出现代表了中胚层向心血管系分化的最早期的一个阶段的发生^[11, 12]。现有的 ES 细胞向内皮细胞的分化研究大多从分选 $Flk1^+$ 细胞开始, 再进行进一步诱导分化^[13]。目前小鼠 iPS 细胞向内皮细胞分化的两篇研究也是沿用同一方法。Genta Narazaki^[14]的报道中并未纯化出内皮细胞, 主要在体外检测了分化得到的内皮细胞表面标志的表达。在 Schenke-Layland 等^[15]得到了很高纯度的分化的内皮细胞, 但是我们在实验初期用 O9 iPS 细胞株使用和其相似的诱导分化方法, 发现分选的 $Flk1^+$ 细胞很难在 5 型胶原上增殖, 且在高浓度的 VEGF 环境下, 仍有大部分的细胞分化为非内皮细胞。所以我们使用 OP9 基质细胞支持分选的 $Flk1^+$ 细胞的生长及其向内皮细胞的分化和快速增殖, 且增加了诱导分化后用 VE-cadherin 为标记再次分选以除去 OP9 基质细胞的步骤, 并更加完善了纯化 O9-EC 的基因表达及生物学功能的检测。

在分化过程中, 大部分内皮细胞的特异性基因表达逐渐上调, 而 CD31, Tie2 和 eNOS 在未分化 O9 iPS 细胞株中的基础表达量较高, 在分化中经历了先下调再上调的过程。但是诱导成纤维细胞重编程形成 O9 iPS 细胞的 Oct4, cMyc, Klf4 和 Sox2 这几个基因即使在 O9 iPS 经历了体外长期培养及分化的过程后仍有少量表达。这些重编程因子的残留表达会影响 iPS 来源分化细胞的基因表达和生物学特性。比如 cMyc 的存在使小鼠 iPS 细胞产生的嵌合体中成瘤率增高^[16]。目前已有一些研究使用 piggy-Bac 转座子, 慢病毒载体转导并 Cre 切除载体, 质粒瞬时转染等方法避免 iPS 细胞中残留这四种基因表达^[17-20], 但是效率均很低, 甚至只能停留在实验室用于研究而不可能用于临床, 或是仍可能在 iPS 细胞 DNA 中残留部分载体^[21]。如何解决这一问题将是未来几年研究的热点。

另外, ES 细胞或 iPS 细胞分化得到的内皮细胞通常需要在很高浓度的 VEGF 环境下培养才能保持其内皮细胞特性^[14]。这使体外扩增内皮细胞的成本非常高, 且难以保持长期的传代培养。但是成体的脐静脉内皮细胞或脐血骨髓中的内皮祖细胞的培养及维持相对容易 (EGM-2)。这说明分化得到的内皮细胞与成体的内皮细胞有差别。今后的研究中, 如何简化并优化 iPS 细胞向内皮细胞的分化条件, 并将分化的内皮细胞用于各种动物疾病模型和组织工程器官也将是一大努力的方向。

[参考文献]

- [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] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia in mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. *Science* 2007 **318** (5 858): 1 920-923
- [3] Sullivan GJ, Hay DC, Park H, et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells [J]. *Hepatology* 2010 **51** (1): 329-335
- [4] Taura D, Noguchi M, Sone M, et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells [J]. *FEBS Lett* 2009 **583** (6): 1 029-033
- [5] Kuzmenko A, Liang H, Xu G, et al. Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro [J]. *FASEB J* 2009 **23** (12): 4 168-180
- [6] Osakada F, Jin ZR, Hirami Y, et al. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small molecule induction [J]. *J Cell Sci* 2009 **122** (Pt 17): 3 169-179
- [7] Dimos JE, Rodolfa KT, Nikan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons [J]. *Science* 2008 **321** (5 893): 1 218-221
- [8] Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells [J]. *Nature* 2009 **461** (7 260): 91-94
- [9] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature* 2009 **461** (7 260): 86-90
- [10] Xie CQ, Huang H, Wei S, et al. A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev* 2009 **18** (5): 741-748
- [11] Yanashita J, Itoh H, Hirashina M, et al. $Flk1$ -positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors [J]. *Nature* 2000 **408** (6 808): 92-96
- [12] Shalaby F, Ho J, Stanford WL, et al. A requirement for $Flk1$ in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis [J]. *Cell* 1997 **89** (6): 981-990
- [13] Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashina M, et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies $Flk1^+$ VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages [J]. *Development* 1998 **125** (9): 1 747-757
- [14] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation* 2008 **118** (5): 498-506
- [15] Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages [J]. *Stem Cells* 2008 **26** (6): 1 537-546
- [16] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts [J]. *Nat Biotechnol* 2008 **26** (1): 101-106
- [17] Kaji K, Norioka K, Paka A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors [J]. *Nature* 2009 **458** (7 239): 771-775
- [18] Wolffen K, Michael RP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Nature* 2009 **458** (7 239): 766-770
- [19] Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, et al. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells* 2009 **27** (5): 1 042-049
- [20] Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscomia G, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 **106** (22): 8 918-922
- [21] Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease [J]. *Cell Stem Cell* 2009 **5** (6): 584-595

(此文编辑 李小玲)