

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00603

重编程肝癌细胞系 Huh7 为多潜能干细胞样细胞

张 建^{1△}, 高海霞^{2△}, 范 丽³, 金华君², 张敬磊⁴, 李林芳², 刘 韬², 钱其军^{2,3*}

1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院细胞生物学系, 苏州 215123
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室, 上海 200438
3. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018
4. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科, 上海 200438

[摘要] **目的** 重编程肝癌细胞系 Huh7 细胞为多潜能干细胞。**方法** 包装携带有 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 基因的慢病毒, 将包装好的病毒共感染 Huh7 细胞, 诱导多潜能干细胞样克隆细胞。采用碱性磷酸酶染色、免疫荧光、实时定量 RT-PCR 等方法对诱导出的细胞进行鉴定, 并采用畸胎瘤实验鉴定细胞的分化潜能。**结果** Huh7 细胞被重编程为多潜能干细胞样细胞(命名为 iHuh7), 碱性磷酸酶染色呈阳性, 免疫荧光实验证明其表达多潜能因子 Oct4 和 TRA-1-60, 实时定量 RT-PCR 实验证明其高水平表达内源性的多潜能相关基因及干细胞特异的 microRNAs, 体内分化实验结果表明 iHuh7 可以形成畸胎瘤。**结论** 通过携带 4 种多潜能基因 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 的慢病毒介导的重编程, Huh7 细胞可以被诱导为多潜能干细胞样细胞。

[关键词] 肝细胞癌; 诱导多潜能干细胞; 慢病毒; 重编程

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0603-05

Reprogramming hepatocellular carcinoma cell Huh7 into pluripotent stem-like cells

ZHANG Jian^{1△}, GAO Hai-xia^{2△}, FAN Li³, JIN Hua-jun², ZHANG Jing-lei⁴, LI Lin-fang², LIU Tao², QIAN Qi-jun^{2,3*}

1. Department of Cell Biology, School of Biology and Basic Medical Sciences, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China
2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
3. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China
4. Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To reprogram human hepatocellular carcinoma cell Huh7 into pluripotent stem cells. **Methods** Four recombinant lentiviruses individually carrying Oct4, Sox2, Nanog, and Lin28 were constructed and used to co-infect Huh7 cells *in vitro*. Post infection, the obtained pluripotent stem-like cells were identified by Alkaline phosphatase staining, immunofluorescence assay, quantitative-PCR and immunohistochemistry. The differentiation capability of the cells was examined by teratogenicity test. **Results** Pluripotent stem-like cell colonies (iHuh7) were observed in cultured Huh7 cells after lentivirus-based induction. These colonies were positive for alkaline phosphatase staining and immunofluorescence assay showed expression of pluripotent factors; Oct4 and TRA-1-60. Quantitative-PCR indicated that several endogenous pluripotency-associated genes and stem cell-specific microRNAs were highly expressed in these pluripotent stem-like cells. *In vivo* differentiation test showed that iHuh7 cells could lead to teratogenicity. **Conclusion** Huh7 cells can be induced into pluripotent stem-like cells mediated by lentiviruses individually carrying Oct4, Sox2, Nanog, and Lin28.

[Key words] hepatocellular carcinoma; induced pluripotent stem cells; lentivirus; reprogramming

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6):603-607]

[收稿日期] 2012-01-22 **[接受日期]** 2012-04-01

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30925037). Supported by National Natural Science Foundation of China for Distinguished Young Scholars (30925037).

[作者简介] 张 建, 硕士生. E-mail: zhangjian1102@126.com; 高海霞, 硕士. E-mail: gaohaixia0312@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-35030677, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

2006年,日本科学家 Yamanaka 领导的研究小组用逆转录病毒携带4个多潜能因子导入小鼠成纤维细胞中而获得了具有多潜能性的干细胞^[1],即诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。iPS技术的出现极大地拓展了人们对体细胞重编程的认识。iPS细胞来源广泛,易操作,具有与胚胎干细胞相似的属性等特点^[2],且其规避了来自伦理、法律及道德上的问题,所以在临床研究上显示出重要的应用价值。2007年,人的iPS细胞被成功诱导出来^[3-4],随后iPS技术取得了长足的发展。

iPS技术在肝癌领域的研究也取得了一定的进展,英国的科学家将来自于肝癌患者的皮肤成纤维细胞成功诱导为iPS细胞,推测肝癌患者的体细胞可以被重编程为iPS细胞^[5]。本实验试图通过将人肝癌细胞系 Huh7 细胞诱导为iPS细胞,并藉此建立肝癌特异的iPS细胞模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 限制性内切酶购自 NEB (New England Biolabs)公司。细胞株 HEK-293T 为本实验室保存。质粒 psin-EF2-hOct4-pur、psin-EF2-hSox2-pur、psin-EF2-hNanog-pur、psin-EF2-hLin28-pur、psin-EF2-GFP-pur、pMD. G、pCMVdelta 8.91 购自 Addgene 公司,其中 psin-EF2-GFP-pur 为含绿色荧光基因的报告质粒。人胚胎干细胞株 hES-H9 由美国南加州大学应其龙教授惠赠。饲养层细胞为本实验室自行制备。KO-DMEM 培养液、KOSR、DMEM 均购自 Gibco 公司,polybrene 购自 Sigma 公司。人 iPS 培养液(KOSR 培养液)配制:50 ml 培养液中含 KO-DMEM 40 ml,KOSR 10 ml,L-谷氨酰胺 500 μ l,非必需氨基酸 500 μ l, β -巯基乙醇 10 μ l,bFGF 50 μ l。碱性磷酸酶试剂盒购自碧云天生物技术研究。小鼠源一抗 Oct4、小鼠源一抗 TRA-1-60、PE 标记驴抗山羊 IgG 和 FITC 标记兔抗小鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司。RNA 抽提试剂盒购自 Qiagen 公司。cDNA 第一链合成试剂盒、RT-PCR 试剂盒,miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒购自天根生物科技有限公司。

1.2 慢病毒的包装 将 HEK-293T 细胞以 2.4×10^6 /孔的密度铺于 100 mm 培养皿中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养至 70%~80% 融合时,分别用已经鉴定正确的 psin-EF2-hOct4-pur、psin-EF2-hSox2-pur、psin-EF2-hNanog-pur、psin-EF2-hLin28-pur、psin-EF2-GFP-pur 质粒转染 293T 细胞。转染过程:在一个 10 ml 离心管中依次加入 H_2O (1 ml)、 $CaCl_2$ (100 μ l)、pCMVdelta 8.91 (6 μ g)、pMD. G (12 μ g)、DNA(30 μ g)和 HBS(1 ml),

充分混合均匀后室温静置 30 min,然后逐滴加入到上述 100 mm 培养皿中,6~8 h 后,用新鲜的培养液代替转染培养液。48 h 和 72 h 后分别收集 100 mm 培养皿中的病毒上清液,1790 \times g 离心去除细胞碎片,0.45 μ m 滤膜过滤后,将病毒上清液移入浓缩柱中,离心,浓缩至 500 μ l 左右后将浓缩后的病毒液移入 1.5 ml Eppendorf 管中,-80 $^{\circ}C$ 冰箱中保存或立即使用。荧光显微镜下观察报告质粒包装出的表达绿色荧光蛋白的病毒情况并拍照。

1.3 慢病毒感染 Huh7 细胞和人胚胎干细胞 将生长状态良好的 Huh7 细胞以 2.5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中(第 0 天),置于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中培养。当细胞达到合适的融合度时吸除培养液,将 psin-EF2-hOct4-pur、psin-EF2-hSox2-pur、psin-EF2-hNanog-pur、psin-EF2-hLin28-pur 包装出的 4 种慢病毒液等量混合(各 50 μ l),加入 2.0 μ l polybrene(终浓度 4~8 ng/ml)充分混匀后,加入到生长有 Huh7 细胞的孔板中,将报告质粒包装出的含有绿色荧光蛋白的病毒分别感染一个孔的 Huh7 细胞和 hES-H9 细胞,37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中培养,12 h 后换为正常培养液,正常培养 12 h 后,重复以上步骤进行第 2 次感染,12 h 后再次换为正常培养液继续培养。在 96 h 时荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白病毒感染 Huh7 细胞和 hES-H9 细胞的情况并拍照。3 d 后消化被 4 种病毒感染的 Huh7 细胞,将消化后的细胞按 1:3 的比例接种到前 1 d 铺过饲养层细胞的 24 孔板上,第 2 天改换人 iPS 培养液,每天换液。

1.4 克隆的获得及传代培养 将感染慢病毒的 Huh7 细胞传到饲养层后每天换液,每次换液后将细胞置于倒置显微镜下观察克隆的形成情况,若出现克隆样的细胞,则将其挑到新的铺有饲养层细胞的 96 孔板上继续培养。操作过程为:将显微镜置于生物安全柜内,紫外线灭菌,在显微镜下用无菌细尖玻璃管挑取克隆,然后将挑取的克隆转移到铺有饲养层细胞的 96 孔板中培养,长到适合的密度时传代培养或进行生物学检测。将所获得的细胞命名为诱导 Huh7 细胞(induced Huh7 cells, iHuh7)。

1.5 碱性磷酸酶检测 iHuh7 细胞的多潜能干细胞特征 分出少量 iHuh7 细胞进行碱性磷酸酶染色,步骤如下:吸出培养液,用 PBS 洗 2 次;室温,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min;吸掉固定液,PBS 洗细胞 3 次,每次 5 min;向 24 孔板的细胞孔中逐滴滴加 1 ml 染色液(染色液的成分及配比:显色缓冲液:150 \times BCIP 溶液:300 \times NBT 溶液=3 ml:10 μ l:20 μ l);将 24 孔板避光保存,室温孵育 30 min;吸出染色液,用 PBS 洗细胞 3 次,每次 5 min,显微镜下观察

克隆细胞的着色情况并拍照。将 24 孔板培养的 Huh7 细胞和 hES-H9 细胞进行碱性磷酸酶染色, 作为阴性对照和阳性对照。

1.6 免疫荧光检测 iHuh7 细胞中 Oct4 和 TRA-1-60 基因的表达 吸去待测克隆细胞的培养液, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 然后用 4% 的多聚甲醛固定细胞, 20 min; 吸掉多聚甲醛, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 0.1% Triton-100(含 0.3% BSA) 穿透细胞 40 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 室温下用稀释过的特异性一抗(1:200 稀释) 孵育 1 h; 吸去一抗, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入稀释的二抗(1:200 稀释), 避光 40 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 终止反应后在荧光显微镜下观察克隆细胞的荧光发光情况并拍照。

1.7 RT-PCR 检测 iHuh7 细胞中内源多潜能基因表达 (1) RNA 抽提: 将在 6 孔板上生长的多潜能干细胞样细胞 iHuh7、对照细胞 hES-H9、未经诱导的 Huh7 细胞生长到合适的融合度时分别提取细胞的 RNA, 采用试剂盒抽提总 RNA, 测试样品的浓度后立即进行第 1 链 cDNA 的合成或 -80℃ 冰箱中暂时保存。(2) 第 1 链 cDNA 合成: 采用 cDNA 第 1 链合成试剂盒将所抽提的 mRNA 反转录为 cDNA。(3) 实时定量 PCR: RT-PCR 引物见表 1, 由 Invitrogen 公司合成, 使用前配制成 10 μmol/L。根据 RT-PCR 试剂盒和 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒说明进行 RT-PCR 反应及结果分析。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab 1 Sequence of RT-PCR primers for pluripotent stem cell markers

| Primer | Sequence (5'-3') |
|--------------|---------------------------------------|
| hOct4-R | GGA GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AG |
| hOct4-F | CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC |
| hSox2-R | GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG |
| hSox2-F | TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG |
| hKlf4-R | ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C |
| hKlf4-F | TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C |
| hNanog-R | GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC |
| hNanog-F | GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA |
| hsa-miR-371 | CTC AAA CTG TGG GGG CAC T |
| hsa-miR-373 | GTG CTT CGA TTT TGG GGT GT |
| hsa-miR-302d | GTG CTT CCA TGT TTG AGT GT |
| GAPDH-R | GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC |
| GAPDH-F | AGG GAT CTC GCT CCT GGA A |

1.8 iHuh7 细胞的畸胎瘤实验 诱导出的 iHuh7 细胞经酶消化后制成细胞悬液, 将其注射到裸鼠的背部皮下, 约 1 个月后, 小鼠的背部成瘤明显, 处死小鼠, 取出肿瘤, 制成组织切片, H-E 染色, 光镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 慢病毒包装及感染 Huh7 细胞和 hES-H9 细胞结果 以含绿色荧光蛋白的报告质粒所表达的强度和亮度来判断病毒的包装情况和感染能力, 结果显示包装出的含绿色荧光蛋白的慢病毒在荧光显微镜下清晰可见, 表达绿色荧光的细胞达到 80% 以上(图 1A), 这表明含绿色荧光基因的慢病毒质粒在包装细胞中可以高效地包装出慢病毒, 在一定程度上可判断出其余 4 种慢病毒质粒亦可在此包装系统下得到高效表达; 将包装好的慢病毒分别感染 Huh7 细胞和 hES-H9 细胞, 96 h 后, 报告质粒包装出的病毒表现出很强的感染能力, 80% 以上的 Huh7 细胞被病毒液感染且在荧光显微镜下显示绿色荧光(图 1B), hES-H9 细胞亦被感染成功(图 1C), 由此可以相对判断出其余 4 种质粒包装出的慢病毒液混合后亦具有较强的感染 Huh7 细胞的能力。

2.2 iHuh7 细胞的获得及碱性磷酸酶染色结果 Huh7 细胞被连续感染两次 4 种慢病毒混合液后转到预先铺有饲养层细胞的 6 孔板中继续培养, 每天换新鲜的人 iPS 培养液并观察细胞的形态变化情况, 10 d 左右时可在显微镜下观察到近似圆形的克隆出现, 其内的细胞(即 iHuh7 细胞)明显不同于克隆周围的细胞, 并且与正常生长的 Huh7 细胞有很大不同(图 2A、2B)。碱性磷酸酶染色结果表明, 未诱导的 Huh7 细胞碱性磷酸酶染色为阴性(图 2C), 而 iHuh7 细胞以及 hES-H9 细胞均呈阳性表达(图 2D、2E), 这表明诱导出的克隆细胞具有多潜能干细胞的特征。

2.3 iHuh7 细胞中 Oct4 和 TRA-1-60 基因的表达 利用免疫荧光技术检测诱导出的 iHuh7 细胞是否表达 hES-H9 细胞特异表达的多潜能基因, 从图 3 中可看到, 多潜能基因 Oct4 和 TRA-1-60 在诱导出的 iHuh7 细胞中均呈阳性表达。

2.4 RT-PCR 检测 iHuh7 细胞的内源多潜能基因表达 从图 4 中可以看出, 诱导出的 iHuh7 细胞传代培养至第 3 代和第 10 代时, 细胞中的内源多潜能基因 Oct4、Sox2、Klf4、Nanog 均呈现高表达状态, 而在 Huh7 细胞中, 这些内源多潜能基因几乎不表达。这表明诱导出的 iHuh7 细胞中内源多潜能基因的表达情况与胚胎干细胞类似。iHuh7 细胞同样高表达干细胞特异的 microRNAs hsa-miR-371 和 hsa-miR-373。

2.5 iHuh7 细胞的体内分化结果 将 iHuh7 细胞悬液注射到裸鼠的背部皮下后, 1 个月左右时即能在裸鼠的注射部位发现小的瘤状突起, 将肿瘤切除并做组织切片, H-E 染色后在镜下观察, 可见具有 3 个

胚层的组织细胞畸胎瘤(图5),表明 iHuh7 细胞可以形成具有3个胚层组织细胞的畸胎瘤。

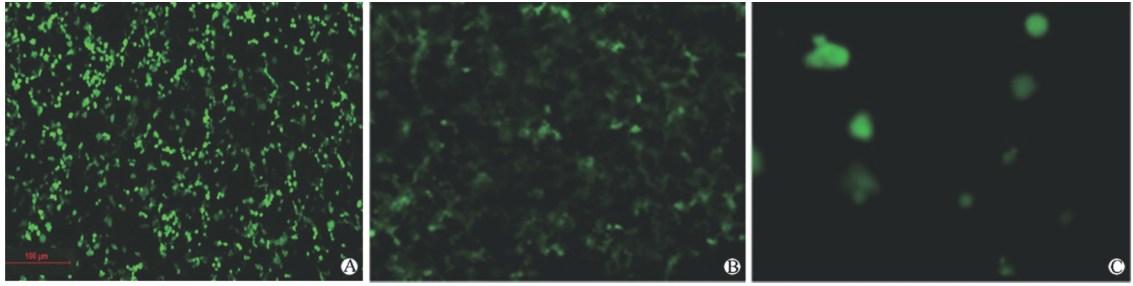


图1 荧光显微镜下观察慢病毒的包装和感染情况

Fig 1 Packaging and infecting of lentivirus under fluorescence microscopy

A: HEK-293T cells transfected with lentivirus packaged by psin-EF2-GFP-pur; B: Huh7 cells infected with lentivirus packaged by psin-EF2-GFP-pur; C: hES-H9 cells infected with lentivirus packaged by psin-EF2-GFP-pur. Original magnification: ×200

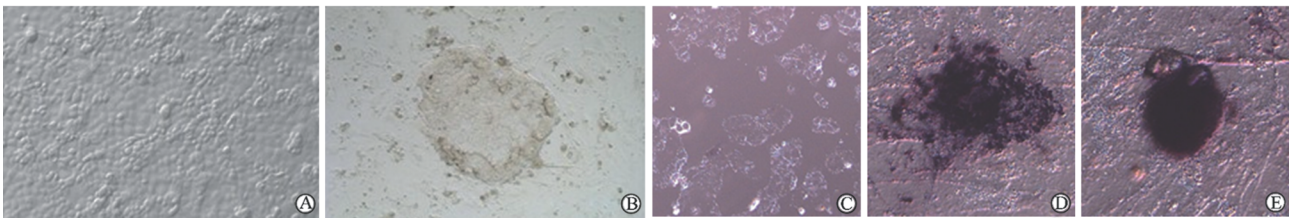


图2 iHuh7 细胞的克隆形态及碱性磷酸酶染色结果

Fig 2 Morphology and AP staining results of iHuh7 cells

A, B: Morphology of normal Huh7 cells(A) and iHuh7 cells(B); C-E: AP staining of Huh7(C), iHuh7(D), and hES(E) cells. Original magnification: ×200(A,B), ×400(C-E)

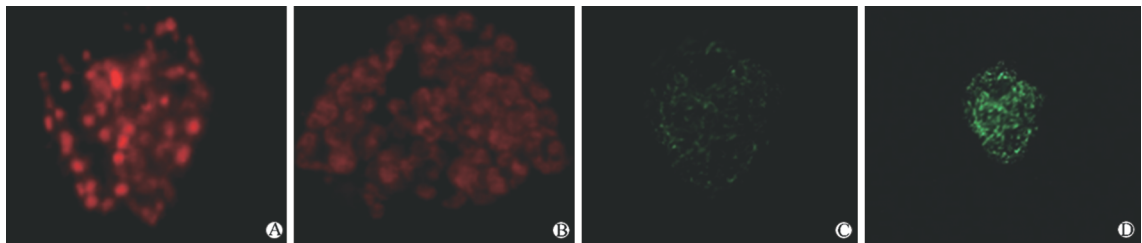


图3 iHuh7 细胞中 Oct4 和 TRA-1-60 的免疫荧光结果

Fig 3 Immunofluorescence results of OCT4 and TRA-1-60 expression in iHuh7 cells

A: OCT4 expression in iHuh7 cells; B: OCT4 expression in hES-H9 cells; C: TRA-1-60 expression in iHuh7 cells; D: TRA-1-60 expression in hES cells. Original magnification: ×200

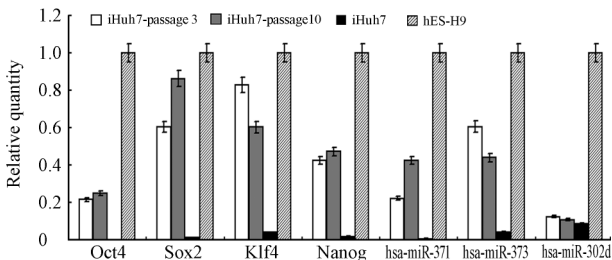


图4 实时定量 RT-PCR 检测 iHuh7 细胞中内源多潜能基因及 microRNAs 的表达

Fig 4 Quantitative-PCR analysis of pluripotency genes and microRNAs in iHuh7 cells

n=3, x±s

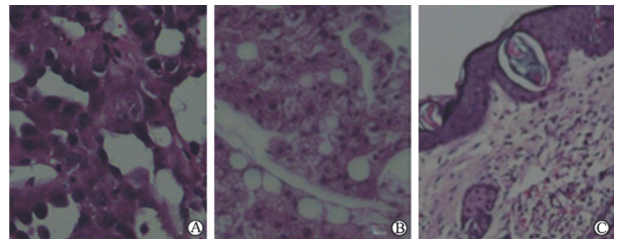


图5 iHuh7 细胞在裸鼠体内形成的畸胎瘤组织形态

Fig 5 Tissues of teratoma differentiated from iHuh7 cells in nude mouse

A: Endoderm (Gland); B: Mesoderm (Fat); C: Ectoderm (Hair follicle). H-E staining. Original magnification: ×400

3 讨论

自1981年Evans和Kaufman^[6]在体外成功培养胚胎干细胞以来,胚胎干细胞以其本身具有的发育的全能性等种种特性,展现出了良好的应用前景,成为细胞领域乃至整个生命科学领域的研究焦点。人们期待能够利用胚胎干细胞的特性在器官移植、疾病机制研究等方面取得突破。但是胚胎干细胞却面临着伦理上^[7]、法律及道德上的种种限制而无法真正应用于临床。人们开始寻找替代胚胎干细胞但具有其多潜能属性的细胞来源。细胞核移植^[8]、细胞提取物诱导等种种技术手段都有这种潜力,但却都有各自的局限性。iPS技术的出现克服了人们对胚胎干细胞应用于临床的种种限制,使得干细胞从理论向实际应用迈进了一大步。

iPS技术在疾病模型上有着良好的应用前景。对于一种疾病来说,细胞模型的建立在新药的耐药性和药效评价、疾病的致病机制与分子机制研究等方面具有十分重要的意义。本研究试图建立基于肝癌细胞系Huh7的iPS细胞,为肝癌发病机制的研究及抗癌药物的研发提供细胞模型。鉴于iPS诱导技术本身存在着重编程效率低、重编程不完全^[9]等问题,本实验采取了以下措施:(1)采用慢病毒做载体。与传统的反转录病毒相比,慢病毒不仅感染分裂期的细胞,而且还可以感染静止期的细胞,这样会大大提高细胞被感染的效率及被成功诱导为iPS细胞的概率。(2)采用Yu等^[4]报道已成功诱导人成纤维细胞为iPS细胞的4个多潜能基因Oct4、Sox2、Nanog、Lin28来重编程Huh7细胞,用携带上述4种多潜能基因的质粒包装出慢病毒,然后用包装出的病毒共同感染肝癌细胞系Huh7细胞,以确保重编程的成功率。

本研究发现,iHuh7细胞诱导成功后,经过传代可稳定生长,在饲养层上培养后可进行检测。在显微镜下可观察到iHuh7细胞在外形上与正常的单层生长的Huh7细胞明显不同,其克隆形态与胚胎干细胞相似;iHuh7细胞的碱性磷酸酶染色为阳性,表明iHuh7细胞具有多潜能性。进一步检测培养的克隆细胞中多潜能基因的表达情况,免疫荧光实验显示Oct4和TRA-1-60基因均呈阳性表达;实时定量PCR结果显示Oct4、Sox2、Klf4、Nanog基因在iHuh7细胞中均呈较高水平的表达,并且一些在干细胞中特异表达的人源性microRNAs^[10-12]如hsa-

miR-371和hsa-miR-373在iHuh7中也得到较高的表达。裸鼠体内分化结果显示,iHuh7细胞可以形成具有3个胚层组织细胞的畸胎瘤。上述结果表明诱导出的iHuh7细胞已经与Huh7细胞不同,而类似于胚胎干细胞,已具备了多潜能性特征。iHuh7细胞的诱导成功对研究肝癌细胞系甚至是肿瘤细胞的重编程机制具有一定探索意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[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: 663-676.
- [2] Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *Nature*, 2007, 448: 318-324.
- [3] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [4] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J L, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.
- [5] Rashid S T, Corbinau S, Hannan N, Marciniak S J, Miranda E, Alexander G, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 3127-3136.
- [6] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292: 154-156.
- [7] Jaenisch R. Human cloning — the science and ethics of nuclear transplantation[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351: 2787-2791.
- [8] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349: 275-286.
- [9] Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. *Nature*, 2008, 454: 49-55.
- [10] Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific microRNAs[J]. *Dev Cell*, 2003, 5: 351-358.
- [11] Houbaviy H B, Dennis L, Jaenisch R, Sharp P A. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene[J]. *RNA*, 2005, 11: 1245-1257.
- [12] Chen C, Ridzon D, Lee C T, Blake J, Sun Y, Strauss W M. Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets[J]. *Mamm Genome*, 2007, 18: 316-327.

[本文编辑] 孙 岩