

DPPA2 基因的研究进展 *

赵 谦 杜 娟[△]

(中南大学生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078)

摘要 :DPPA2 (Developmental pluripotency-associated gene 2)是近年来发现的一种在多能性细胞和某些癌组织中特意表达的基因。它与早期胚胎发育密切相关 ,参与维持胚胎干细胞的多能性及自我更新 ,还在体细胞重编程为多能性诱导干细胞的过程中发挥了作用。此外 ,它还是一种新的肿瘤抗原 ,有望成为某些恶性肿瘤的特异性免疫治疗新靶点。本文就 DPPA2 的结构、功能 ,以及它与胚胎发育、恶性肿瘤、体细胞重编程的关系等方面的研究进展做一综述。

关键词 :DPPA2 胚胎发育 胚胎干细胞 恶性肿瘤

中图分类号 :Q132 ,Q75 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)18-3565-04

Progress on research of DPPA2 gene*

ZHAO Qian, DU Juan[△]

(Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, Central South University, Hunan, Changsha, 410078, China)

ABSTRACT: Dppa2 (Developmental pluripotency-associated gene 2) has been identified recently as a gene that is specially expressed in pluripotent cells and some carcinoma tissues. It is closely related to early embryonic development, involving in the maintenance of pluripotency and self-renewal of embryonic stem cells. In addition, it is a new tumor antigen, promising to be a new target for the specific immunotherapy of some malignant tumors. In this review ,we have discussed the structure and functions of DPPA2 and the relationships between DPPA2 and embryonic development ,malignant tumors ,as well as somatic cell reprogramming.

Key words: DPPA2; Embryonic development; Embryonic stem cells; Malignant tumors

Chinese Library Classification: Q132, Q75 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)18-3565-04

前言

DPPA 家族与机体发育的多能性密切相关 ,有 5 个家族成员构成。各家族成员并非序列相似或具有特定的蛋白结构 ,他们的共同点在于 ,它们在多能性细胞中的表达模式相仿。Boiani 等^[1]研究发现 ,它们的表达与维持胚胎干细胞(embryonic stem cells ,ESCs) 不分化状态和自我更新相关的核心转录因子如 OCT4、SOX2、NANOG 等相似 ,都是随着细胞分化而表达下调。

DPPA2 (人)/Dppa2 (小鼠)(Developmental Pluripotency-Associated gene 2) 是近年来才被发现的在多能性细胞及某些癌组织中特意表达的基因^[2,3]。Du 等^[4]采用抑制消减杂交技术得到了人类未分化 ESCs 和早期分化的 ESCs 中差异表达的基因 ,分离了一个在未分化 ESCs 中特意表达的基因 ,并命名为 HPESCRG1(Homo sapiens pluripotent embryonic stem cell-related gene 1)及其小鼠同源基因 mPESCRG1。后来证明 ,它们就是 DPPA2/Dppa2 基因^[2]。

在干细胞领域的相关研究中 ,由于该基因在 ESCs 等早期胚胎细胞中高表达 ,而在随后的细胞分化过程中逐渐沉默 ,因此常常被视为一种多能性标志基因用于细胞鉴定^[5] ,且被认为在维持 ESCs 不分化和自我更新的过程中发挥作用^[6]。在癌症

领域的相关研究中 ,由于 DPPA2 在某些癌组织中的特异表达 ,而在正常成体组织中不表达或仅微弱表达^[3] ,因此可被视作一种新的肿瘤免疫抗原 ,为某些肿瘤的特异性免疫治疗提供新的靶点。

1 DPPA2 的概况及蛋白结构

目前 ,对人和小鼠 DPPA2 基因的研究相对于其它物种来说丰富一些。生物信息学分析发现 ,人 DPPA2 基因位于第 3 号染色体 ,由 9 个外显子和 8 个内含子组成 ,跨越 22.7 kb ,其 cDNA 编码区长度为 1393 kb ,编码一个由 298 个氨基酸残基组成的多肽 ,在其上游 9.6 kb 处存在 DPPA4。小鼠 Dppa2 基因位于第 16 号染色体 ,由 7 个外显子和 6 个内含子组成 ,跨越 9.2 kb ,其 cDNA 编码区长度为 1941bp ,编码的氨基酸残基数为 301aa ,在其上游 16.2 kb 的处存在 Dppa4。

研究发现 ,DPPA2、3、4 蛋白的氨基端都有一个进化上十分保守的 SAP 结构域^[7,8]。SAP 是一个由 35 个氨基酸残基组成的结构域 ,被一个含有保守的甘氨酸的区域分成两部分 ,一部分是由高度保守的疏水氨基酸构成 ,而另一部分由极性氨基酸构成^[7]。将小鼠 Dppa2 氨基端 SAP 结构域剔除后注射入小鼠的受精卵中 ,导致受精卵在体外分裂到二细胞期就停止了^[9]。非洲爪蟾细胞中存在一个与 DPPA2/4 同源的基因 ,称作 XDppa2/4 ,

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30570937) ;中南大学研究生创新基金资助项目(2122-713360010)

作者简介 赵谦(1985-) ,男 ,硕士研究生 ,主要研究方向 :干细胞多能性相关基因的调控机制

[△]通讯作者 杜娟,电话: 0731-82355195, E-mail: tandujuan1@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-05-10 接受日期 2011-05-31)

其蛋白中的 SAP 结构域在原肠形成过程中绝非必需,但剔除该结构将导致胚胎死亡^[10]。可见 SAP 结构域是 DPPA2 不可或缺的功能区域,同时也表明 DPPA2 对早期胚胎发育是必需的。此外,其它相关的研究也让我们对 SAP 结构域有一定了解。例如,Dppa3 蛋白中也有 SAP 结构,它可保护雌体基因组不被去甲基化,且 Dppa3 中 SAP 结构缺陷的雌性老鼠的生育率严重下降^[11,12]。有报道称 SAP 结构域可以介导蛋白与特异的 DNA 相结合,参与染色质重塑、细胞核构建和 RNA 代谢^[11]。因此,Dppa2 可能作为转录因子,直接结合于其靶基因的启动子区调控其转录,或在靶基因的 RNA 水平的发挥作用,它也常被视作染色质重塑因子,推测其可能通过表观遗传调控,参与 ESCs 及早期胚胎的染色体结构的组织构建。

此外,在人、小鼠的 DPPA2 和 DPPA4,以及非洲爪蟾的 XDppa2/4 编码蛋白的 C 端都存在一个进化上十分保守的包含 73 个氨基酸残基的区域,但该区域的功能尚不明确^[8,10]。

2 DPPA2 与胚胎发育

人 DPPA2 的表达模式与 NANOG 相似,均在正常的人胚胎干细胞(hESCs)、异常核型的 hESCs 和胚胎生殖细胞(EGCs)中高表达,这三种细胞的生物学特性相似,均表现出多向分化潜能和自我更新的能力。在 hESCs 分化过程中,DPPA2 的表达变化与 OCT4、NANOG 相似,三者均随着 hESCs 的分化表达下调^[13]。鉴于 OCT4、NANOG 是维持 ESCs 不分化状态及多能性的核心调控因子^[14],提示 DPPA2 可能同 OCT4、NANOG 一样,也参与了 ESCs 不分化状态和多能性的维持。当然,尽管它们的表达相似,但并非完全相同。比如,OCT4 在卵母细胞中高表达,在早期卵裂阶段表达下调,并在囊胚期和原始生殖细胞中重新高表达;而 DPPA2 则从卵母细胞至卵裂后期持续稳定表达,尤其在囊胚期和原始生殖细胞中有较高水平的表达^[15]。

在小鼠中,Dppa2 从卵母细胞至卵裂阶段一直持续表达,到囊胚期其表达逐渐局限于内细胞团,之后开始下调。在原肠胚形成之后,其表达仅限于生殖系,并随着生殖系的细胞逐渐分化进入生卵或生精阶段,Dppa2 的表达发生下调^[8]。鉴于其他的多能性标志基因也有着相似的生殖系表达谱,推测这些多能性标志基因伴随生殖系发育的过程出现表达沉默,是生殖系细胞的分化所必需的过程。对 Dppa2 等多能性标志基因的表达模式及功能的不断研究,将有助于加深对哺乳动物多能性细胞、生殖系细胞的发育调控的理解。

在小鼠胚胎干细胞(mESCs)中,抑制 Dppa2 的表达导致细胞碱性磷酸酶活性下降,多能性标志基因 Oct4、Nanog 表达下调,早期分化标志基因如 Fst、Psx1 等表达上调。可见,抑制 Dppa2 的表达将导致 mESCs 趋于分化。此外,抑制 Dppa2 的表达还会抑制细胞增殖^[6]。这也进一步验证 Dppa2 可能在维持干细胞的未分化状态和自我更新方面发挥作用。

研究发现,Dppa2 的编码蛋白主要定位于细胞核中^[13],因而其正常发挥作用必须依赖与之相关的核转运蛋白的介导。核转运蛋白 KPNA7 对于小鼠繁育后代必不可少,介导从卵母细胞到早期胚胎发育过程中的重要核因子的入核。雌性 Kpna7 敲除小鼠的卵母细胞存在明显缺陷,将该突变小鼠的卵母细胞孤

雌活化后,其细胞周期明显加快,且无法发育到囊胚期。基因敲除 Kpna7 会引起 Dppa2 表达异常下调^[16]。推测,Kpna7 可能通过对 Dppa2 等干细胞相关基因表达产物的转运,从而参与了早期的胚胎发育进程。

ZAR1L 是一个在受精卵等多能性细胞中特异性表达的基因,参与早期胚胎发育过程中的 RNA 水平的调控。其表达抑制导致受精卵分裂至 2 细胞期就停止了,同时伴随着组蛋白甲基化的异常和染色质重塑因子的下调,如 Dppa2 和 Dppa4^[9]。可见,Dppa2 可能作为 ZAR1L 的靶基因参与早期胚胎发育的调控。

ESCs 染色质重塑复合体 esBAF 在多能性干细胞的核心转录调控网络的扮演重要角色,与 ESCs 未分化状态的维持和多能性能密切相关。研究发现,参与构成该复合体的 Brg 和 BAF155 的蛋白产物对包括 Dppa2 多种多能性相关基因都有广泛的结合^[17]。可见,Dppa2 可能通过与染色质重塑复合体 esBAF 相互作用,参与了维持干细胞多能性的表观遗传调控。

DPPA2 不仅在高等脊椎动物中参与早期胚胎发育,在一些低等物种中也可以发现该基因,它在生物进化过程中的结构和功能上均比较保守。Siegel 等^[10]报道了非洲爪蟾中的一个与 DPPA2/4 同源的基因,称作 XDppa2/4,其蛋白也包含了一个 SAP 结构域和保守的 C 末端。过表达 XDPPA2/4 与小鼠过表达 Dppa2 或 4 产生相似表型,即胚孔闭合缺陷。而注射 XDppa2/4 吗啉代导致胚孔不闭合,且无法形成神经褶,胚胎顶多可发育至尾芽期即死亡。外源表达 mDppa2 可挽救上述发育的缺陷,但无法阻止其死亡。异位表达 XDppa2/4 或 mDppa4 均会引起非洲爪蟾在早期发育过程中的细胞凋亡,而异位表达 mDppa2 则不会。可见,尽管 DPPA2 和 DPPA4 在所处位置、结构和序列上具有同源性,但其在进化过程中功能已经出现明显差异。而且在非洲爪蟾的原肠形成和神经胚形成的过程中,用 mDppa2 可以替代 XDppa2/4 的作用。可见,DPPA2 并非是高等脊椎动物特有的基因,它在低等两栖动物中也存在,且同样参与了早期胚胎发育过程。

尽管 DPPA 基因家族的成员都参与了早期胚胎发育的调控,且 DPPA2、3、4 蛋白结构中都包含 SAP 结构域,都可能借助表观遗传调控发挥作用,但它们在各自的表达和功能上仍存在不同之处。例如,Dppa2 和 Dppa4 在小鼠植入前胚胎和生殖系细胞中的表达模式相仿但并非完全一致^[2]。过表达 DPPA4 会抑制 ESCs 向中胚层的分化,而且导致细胞死亡,而过表达 DPPA2 似乎不会产生什么效果。下调 Dppa4 会导致 FGF5 表达上调,似乎可以使 ESCs 向原始外胚层分化^[18],而下调 Dppa2 不仅使 ESCs 趋于分化还抑制其增殖^[6]。而 Dppa3 与 NANOG、FOXJ2、GDF3 在基因组上位于共同的区域,该区域是染色体结构变化的热点区域,而这些变化又与畸胎瘤的形成密切相关^[19]。

3 DPPA2 与恶性肿瘤

从受精卵开始,直到囊胚期的内细胞团和原始生殖细胞阶段,这些细胞都是多能性细胞,可以在体外自我更新,或分化为三胚层中的任何一种细胞,也可在体内形成畸胎瘤^[20]。在这个阶段的多能性细胞与癌细胞有相似的基因表达谱,尤其是一些

与多能性相关的基因在植入前胚胎和癌症中都有表达,而它们在正常的成体组织中不表达或低表达。不仅如此,癌细胞与 ESCs 等多能性细胞有诸多相似之处,比如分化程度很低,可以在体外适当的环境下无限增值,且具有自我更新和转移的能力。

由于 DPPA2 在某些肿瘤中有表达,且最早是在移植前胚胎中被分离鉴定出来,因此它最开始被称为胚胎-癌序列 A (Embryo-cancer sequence A, ESCA)^[3]。有研究发现 DPPA2 基因在多种成体组织中不表达,仅在正常的睾丸、胎盘、骨髓、胸腺和肾脏中低表达,然而该基因却在多种癌细胞中高表达,如非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、淋巴瘤、黑色素瘤等^[3,21]。当然,并非所有的癌细胞中都可检测到 DPPA2 的表达^[13]。除 DPPA2 外,其它一些在 ESCs 中特异表达的基因虽然在分化过程中出现沉默,但也在某些癌组织中高表达,比如 OCT4 既在 ESCs 中表达,也在膀胱癌细胞中表达^[22]。

由于 DPPA2 既在早期胚胎中表达,又在一些癌组织中表达,因此有研究者将 DPPA2 归类为一种胚胎-癌抗原(embryonic-cancer antigen, ECA),发现其在某些癌组织中与癌-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)共表达^[15],并有希望成为多种癌症的抗原特异性免疫治疗的靶点^[23-24]。CTA 最初是指仅在正常睾丸及多种癌细胞中表达的一类抗原。后来,研究发现有些 CTA 并非严格限制表达于正常睾丸组织和癌组织,在其它生殖细胞如卵子、胎盘的滋养层细胞,甚至一些正常的成体组织中也有表达^[25]。随着研究的深入,人们发现像 MAGE、NYESO 和 SSX 等 CTA 同时也是干细胞的多能性标志基因^[26]。因此,推测 ESCs 和癌细胞之所以有相似的生物学特性,很可能与它们共同表达的基因有关。

4 DPPA2 与体细胞重编程

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),是由体细胞诱导而成的干细胞,具有与 ESCs 相似的发育多能性。2006 年 7 月,日本科学家首次将小鼠皮肤细胞成功转化为多能性干细胞,并将其命名为 iPSCs^[27]。随后,美、日两国的科学家分别将人体细胞成功诱导为 iPSCs^[5,28]。iPSCs 在生物和医学领域拥有广阔的应用前景,为再生医学和干细胞治疗提供了新思路。目前,与 iPSCs 相关的研究已经逐渐成为干细胞领域的热点。

由于 DPPA2 是干细胞多能性相关基因,其经常被用作一种多能性标志基因来对 iPSCs 细胞进行鉴定。例如, Aoki T 等^[29]向人类脂肪来源的干细胞转入 OCT4、SOX2 和 KLF4 可将其重编程为 iPSCs,而 Dppa2 作为一个多能性标志基因,用于对重编程的 iPSCs 进行鉴定。

尽管在体细胞重编程的过程中, DPPA2 基因由从沉默状态下被激活,但关于该基因在体细胞诱导为 iPSCs 的过程中所发挥的作用鲜有报道。目前有研究表明,其在体细胞重编程过程中,作为效应基因之一发生表达上调,且在一定程度上促进了重编程的效率。丁酸是一种天然的脂肪酸,使用丁酸处理可大大提高将成纤维细胞重编程为 iPSCs 的效率。在无 KLF4 或 MYC 的情况下,丁酸仍能促进重编程效率 100-200 倍。表观遗传

分析发现,丁酸处理能促进组蛋白 H3 乙酰化,促进多能性相关基因启动子 DNA 去甲基化,从而促进多种基因表达上调,包括 DPPA2。经实验证实, Dppa2 是丁酸处理的直接效应基因之一,丁酸处理后 Dppa2 的上调在一定程度上提高了重编程的效率^[30]。由于表观遗传的信息可以决定细胞的特性,因而体细胞重编程的过程中必然经历了表观遗传信息的改变,使成体细胞重新回到多能性干细胞的状态。推测 DPPA2 作为一个染色质重塑因子,很可能参与到了这一表观遗传动态调控中来,从而对体细胞重编程的效率起到了一定的推动作用。

其实,无论是体细胞诱导为 iPSCs 还是成体干细胞的横向分化,都经历了表观遗传信息重编程的过程。作为染色质重塑因子的 DPPA2 很可能参与了这一过程。染色质修饰剂曲古菌素 A(TSA)和 5-氮胞苷(AzaC)能分别影响组蛋白乙酰化和 DNA 甲基化,可以通过表观遗传调控染色质的结构和基因表达。用 TSA/AzaC 处理神经球细胞可使其横向分化出造血能力,而且这种变化是持续的、可移植的。研究发现,在这一横向分化的过程中激活了包括 Dppa2 在内的多种干细胞多能性相关基因^[31]。推测正是由于这些基因的激活,才扩大了前体细胞的分化潜能,使其横向分化出造血能力。

5 结语

DPPA2 作为一种发育多能性相关基因,可以作为多能性标志基因用于细胞鉴定,且参与了胚胎干细胞不分化状态和自我更新的维持,对早期的胚胎发育有重要作用。在生殖系母细胞分化为配子的过程中, DPPA2 的沉默有可能对生殖细胞的成熟起到不可或缺的作用,其功能失调有可能导致卵子或精子的发育异常。此外, DPPA2 还是一种新的癌症抗原,有望成为某些癌组织免疫治疗的新靶点。

目前,对 DPPA2 的研究尚处于初期阶段。相信随着研究的不断深入,它在胚胎的早期发育、胚胎干细胞多能性的维持以及生殖系细胞的发育成熟中所起的作用将逐渐显露。在临床应用方面,它可能成为某些不明原因不孕不育的候选诊断基因,并有望应用于某些癌症的免疫治疗或基因治疗。

参考文献(References)

- [1] Boiani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6: 872-884
- [2] Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei[J]. Development, 2003, 130: 1673-1680
- [3] John T, Caballero OL, Svobodova SJ, et al. ESCA/DPPA2 is an embryo-cancer antigen that is coexpressed with cancer-testis antigens in non-small cell lung cancer [J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14: 3291-3298
- [4] Du J, Lin G, Nie ZY, et al. Molecular cloning and characterization analysis of HPESCRG1, a novel gene expressed specifically in human embryonic stem cells [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2004, 6: 542-547
- [5] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131: 1-12
- [6] Du J, Chen T, Zou X, et al. Dppa2 knockdown-induced differentiation

- and repressed proliferation of mouse embryonic stem cells [J]. *Biochem*, 2000, 147: 265-271
- [7] Aravind L, Koonin EV, et al. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 112-114
- [8] Maldonado SJ, van den Bergen J, Krouskos M, et al. Dppa2 and Dppa4 are closely linked SAP motif genes restricted to pluripotent cells and the germ line [J]. *Stem Cells*, 25, 19-28
- [9] Hu J, Wang F, Zhu X, et al. Mouse ZAR1-like (XM_359149) colocalizes with mRNA processing components and its dominant-negative mutant caused two-cell-stage embryonic arrest [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(2):407-424
- [10] Siegel D, Schuff M, Oswald F, et al. Functional dissection of XDPpa2/4 structural domains in *Xenopus* development. *Mech Dev*, 2009, 126(11-12): 974-989
- [11] Payer B, Saitou M, Barton SC, et al. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice [J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 2110-2117
- [12] Nakamura T, Arai Y, Umehara H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 64-71
- [13] Chen TJ, Du J, Du LL, et al. The expression pattern of DPPA2 during differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Life Science Research*, 2010, 14(2): 106-112
- [14] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1124-1128
- [15] Monk M, Hitchens M, Hawes S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA (DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(6): 347-355
- [16] Hu J, Wang F, Yuan Y, et al. Novel importin-alpha family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse [J]. *Biol Chem*, 2010, 285(43): 33113-33122
- [17] Ho L, Ronan JL, Wu J, et al. An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency [J]. *PNAS*, 2009, 106(13): 5181-5186
- [18] Masaki H, Nishida T, Kitajima S, et al. Developmental pluripotency-associated 4 (DPPA4) localized in active chromatin inhibits mouse embryonic stem cell differentiation into a primitive ectoderm lineage [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(45): 33034-33042
- [19] Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, et al. Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(2): 169-179
- [20] Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10): 1129-1155
- [21] Tchabo NE, Mhawech-Fauceglia P, Caballero OL, et al. Expression and serum immunoreactivity of developmentally restricted differentiation antigens in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Immun*, 2009, 26(9): 6-13
- [22] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120 (7): 1598-1602
- [23] 孙燕. 肿瘤治疗的新里程碑 - 靶向药物治疗 [J]. *肿瘤药学*, 2011, 1(1):1-5
Sun Yan. New Milestone in the development of Clinical Oncology-Molecular Targeted Therapy[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2011,1(1):1-5
- [24] Zhou Hong-hao, Liu Jie. Gene targeting tailored therapy for the anti-tumor drugs[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2011,1(1):6-11
- [25] Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, et al. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(4): 953-960
- [26] Cronwright G, Le Blanc K, Götherström C, et al. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2207-2215
- [27] Kazutoshi, Takahashi, Shinya Yamanaka. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors [J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676
- [28] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318: 1917-1920
- [29] Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC [J]. *Tissue Eng Part A*. 2010 16(7): 2197-2206
- [30] Mali P, Chou BK, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes [J]. *Stem Cells*, 2010 28(4): 713-720
- [31] Ruau D, Ensenat R, Dinger TC, et al. Pluripotency associated genes are reactivated by chromatin-modifying agents in neurosphere cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 920-926