

诱导性多能干细胞的表观遗传学调控差异及其与诱导移植排斥的关系

赵 然, 周光纪* (广东医科大学生理学教研室, 广东 东莞 523808)

[摘要] 表观遗传学主要研究 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 等不涉及 DNA 序列改变的可遗传表型变化对细胞生物学行为的调控问题。诱导性多能干细胞(iPS 细胞)是体细胞经过重编程后形成的类似于胚胎干细胞(ESC)的“全能型”细胞, 可以被诱导分化为多种类型的组织、细胞用于细胞治疗或构建人工组织、器官。iPS 细胞可以从自体获得, 有望实现组织、器官的“同基因移植”, 避开移植排斥这个最大的难题。但体细胞经过重编程后, 表观遗传学特性发生了很大变化, iPS 细胞的同基因移植是否就真的能回避移植排斥成为新的研究热点。

[关键词] 干细胞; 表观遗传学; 移植排斥

[中图分类号] R392.11, R392.13, R318.06 **[文献标志码]** A

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)是由成熟细胞经细胞核重编程(reprogramed)形成的、具有自我更新和多向分化能力的多能性干细胞。由于 iPS 细胞可以由自身细胞重编程获得, 因而在理论上不会产生免疫排斥。然而, 最近的研究发现, iPS 细胞与胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)存在表观遗传差异, 在 iPS 细胞基因组的某些位点上观察到不同的甲基化模式, 提示 iPS 细胞可能具有免疫原性。动物实验也证实了 iPS 细胞移植时确实存在着免疫排斥。这些发现为人们将 iPS 细胞作为无免疫原性组织工程种子细胞的设想提出了更多的问题。

1 表观遗传学的基本问题

表观遗传学(epigenetics)是指不涉及 DNA 序列改变的可遗传表型变化的学科, 主要研究基因表达调控问题^[1], 包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 改变等。

DNA 甲基化阻碍了转录因子与 DNA 的结合, 进而影响到基因表达。真核生物的 DNA 甲基化通常只发生于 CpG 双核苷酸(CpG dinucleotide)的胞嘧啶上。甲基化的 CpG 岛能结合一些特定的蛋白到启动子的复合体上来直接抑制转录。因 DNA 甲基化在遗传上具有稳定性和可逆性, 使得表观遗传学与发育生物学、癌症和再生医学紧密联系在一起。

组蛋白修饰是指染色质组蛋白氨基酸残基被共价修饰, 包括甲基化和去甲基化, 磷酸化和去磷酸化, 乙酰化和去乙酰化以及泛素化和去泛素化等。这些修饰会影响到组蛋白与 DNA 双链的亲水性, 使染色质结构发生改变, 进而引发多种分子生物学效应。通常, 组蛋白甲基化导致基因沉默, 乙酰化会使转录激活。到目前为止, 已经发现了上百种的组蛋白修饰类型, 但是单一组蛋白修饰通常不能独立发挥作用, 往往是多个组蛋白修饰协同作用才能产生效应, 不同种类的组

蛋白修饰以多种方式组合作用的现象被称为“组蛋白密码”^[2]。

非编码小 RNA 分子在没有 DNA 序列改变的情况下能够改变基因表达, 甚至可以调节其自身的转录过程^[3]。作为表观遗传学的主要表现形式, 非编码 RNA 在自身免疫性疾病^[4]、肿瘤^[5]等疾病的发生、发展过程中的重要作用被不断发现。

2 表观遗传学改变对免疫原性和诱导移植排斥反应的影响

2.1 表观遗传学与固有免疫应答 近期在对环境污染与肺部疾病研究中发现, 在空气中污染物(如臭氧、可吸入颗粒物)的影响下, 肺部固有免疫屏障中重要的宿主防御分子表面活性蛋白-A(surfactant protein-A, SP-A)会发生表观遗传学的遗传变异, 从而使得机体对肺部疾病的易感性大大增加^[6]。例如在缺氧条件下, SP-A1 与 SP-A2 启动子的 CpG 位点发生甲基化, 连同启动子调节区的组蛋白乙酰化和甲基化共同影响到 SP-A 的基因表达, 从而使得肺表面活性物质表达下降, 引起病理改变^[7]。

Toll-样受体(Toll-like receptor, TLR)是模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)中的一类重要分子, 主要表达于树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞表面, 能够识别表达在细菌、病毒和真菌组成物上广谱的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)^[8], 通过激活下游 MyD88 或 TRIF 依赖的信号通路, 启动固有免疫应答。同时, TLRs 也能够诱导抑炎性因子如 IL-10 的产生, 维持固有免疫反应的强度, 调节 T、B 细胞介导的特异性免疫反应, 是连接固有免疫和适应性免疫的桥梁。研究表明, 某

收稿日期: 2013-01-21; 接受日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金(30772769; 81173136)

作者简介: 赵 然(1985-), 男, 北京人, 硕士研究生

Tel: 0769-22896371; E-mail: zhao19851017@163.com

*Corresponding author, 周光纪, E-mail: gilmczhou@126.com

些 miRNA (如 miR-155, miR-21, miR-146) 通过结合靶 mRNA 的 3' 非编码区, 直接抑制 TLR 的表达, 或减弱下游信号转导, 抑制 IL-1 和 TNF- α 等炎性介质的产生, 从而负向调控机体固有免疫应答^[9]。研究发现, TLR 在识别细菌表面特定抗原后, 激活 NF- κ B 信号通路, 上调 miR-146a 的基因表达, 从而抑制 IRAK1 和 TRAF6 蛋白的表达, 防止炎症反应过度^[10]。

2.2 表观遗传学与适应性免疫应答 miRNA 在 T 细胞的不同分化阶段出现动态表达。miR-155 可调控作用于 IL-4 启动子的转录因子 c-maf 的基因表达, 当 miR-155 缺失时 IL-4 增多, 促使 CD4⁺ T 细胞向 Th2 发育, 结果可诱导免疫偏离, 使 Th1 免疫功能减弱。另外, miR-181 可结合并改变 Bcl-6, 甲基 CpG 结合蛋白 2 和 TGF- β 受体 1 等因子的基因, 影响 T 细胞的形成和分化^[11]。

在初始 T 细胞未激活时, IL-2 基因由于启动子区 DNA 甲基化而处于静息状态。当 T 细胞得到激活信号后, DNA 开始去甲基化, 并发生染色质重塑, IL-2 基因激活, 细胞进入分裂周期, 从而诱发一系列的免疫应答反应^[12]。随着研究的不断深入, 人们发现包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰在内的表观遗传学机制广泛存在于免疫应答的过程中。在特定的环境刺激和细胞因子诱导下, 诱导 T 细胞分化为不同功能的细胞亚群。在这个过程中, 表观遗传学通过染色质重塑以及改变多种重要细胞因子如 IFN- γ 、IL-4 和 IL-7 的基因转录和表达调节免疫细胞的分化^[13]。

2.3 表观遗传学与器官移植排斥 器官移植是治疗器官衰竭等终末期疾病的有效方法, 但至今, 有关移植排斥中免疫耐受仍有许多问题有待解决。调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 在调控免疫应答和维持外周免疫耐受中发挥了重要作用。从理论上讲, 只要在器官移植受者体内输注或在体内诱导产生足够数量的供体抗原特异性的 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞, 就能够诱导免疫耐受, 控制受者免疫系统对移植物的排斥反应。转录因子 Foxp3 是调节性 T 细胞发育的一个关键转录因子。在 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 和 DNMT3b 的作用下, foxp3 在 CD4⁺ T 细胞上结合位点的 CpG 岛发生甲基化, 从而抑制 foxp3 的表达。反之, 该位点去甲基化是 foxp3 稳定表达的必要条件^[14]。

3 诱导性多能干细胞的表观遗传学特性

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 具有在体外大量增殖, 并分化为多种细胞的潜能, 可为再生医学的替代疗法提供充足的细胞来源。然而, 由于 ESC 不能来源于自体, 在用于细胞治疗时依然有免疫排斥问题, 因而无法成为广泛的移植材料。iPS 细胞同样具有全能性, 而且可以避免 ESC 所遇到的伦理学问题。更重要的是, iPS 细胞可由自体获得, 这就有可能实现自体移植而避免移植排斥。因而 iPS 细胞迅速成为了生命科学和再生医学领域的研究热点。但随着研究的不断深入, 一些问题开始浮现: iPS 细胞与 ESC 完全一样吗?

转录因子介导体细胞重编程为多能干细胞从本质上讲就是一种改写细胞命运的表观遗传学过程^[15]。经过重编程的体细胞, 其表观遗传学特性注定与自然发育形成的 ESC 有所不同。从遗传学上来说, 源自自体细胞的 iPS 细胞的基因型与供者完全一致。但从发育学的角度看, 这些表型和生物学特性完全改变了的细胞是“突变了体细胞”。既然体细胞发生了“突变”, 细胞的表观遗传学改变也就在情理之中了。因此对 ESC 和 iPS 细胞表观遗传学的全面分析是目前多能干细胞研究的重点^[16]。

2009 年, Deng 等^[17] 分别对 3 个人类 ES 细胞系和 4 个 iPS 细胞株靶定区进行了重亚硫酸盐处理后测序, 首次报道了这两类干细胞系存在 DNA 甲基化差异。同年, Doi 等^[18] 利用阵列法甲基化分析 (array-based relative methylation analysis, CHARM) 方法比较重编程 iPS 细胞和 ESC 以及亲代成纤维细胞的甲基化图谱时发现, 相对于亲代成纤维细胞和 ESC, iPS 细胞一些基因序列的 CpG 位点表现为低甲基化。Kim 等^[19] 研究发现, 不同供体细胞来源的 iPS 细胞在表观遗传学上会存在差异。他们从脐带血细胞和新生角质细胞分别诱导生成 iPS 细胞, 发现两种来源的 iPS 细胞尽管基因组型相同, 但是全基因组的 DNA 甲基化和分化潜能不同, 并提出了 iPS 细胞部分保留了供体细胞的表观遗传学记忆, 从而影响到其诱导效率和全能性。另一项研究中发现^[20], 来源于男性和女性的人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPS 细胞), 在表观遗传稳定性和癌基因的表达方面均有较大的差异。Xist (X-inactive specific transcript) 是一个在胎盘哺乳动物 X 染色体上的非编码 RNA 基因, 它在 X 染色体失活过程中发挥主要效应。Xist 表达的缺失与 X-连锁癌基因的表达上调、细胞在体外生长加速以及体内的低分化密切相关。与来源于男性的 hiPS 细胞相比, 女性来源的 hiPS 细胞中 Xist 基因表达明显降低甚至缺失, 使得其表观遗传稳定性降低。越来越多的报道显示 iPS 细胞在重编程过程中表观遗传学特性会发生改变, 进而影响基因的表达 (如抗原基因的高表达) 和生物学特性^[21-23]。通过对 17 株来源于 6 种不同类型体细胞的 hiPS 细胞的表观遗传学的系统研究后发现, hiPS 细胞的表观遗传学特征与体细胞的类型无关, 而与体细胞重编程前的甲基化程度有关, 且重编程效率与细胞的甲基化程度负相关^[24]。因细胞重编程前的甲基化程度不同, 细胞的基因表达谱也不尽相同, 重编程的情况也不同, 最终使 hiPS 细胞产生差异化。尽管不同细胞在重编程前的甲基化程度不同, 但研究人员还从 17 株 iPS 细胞中筛选出 9 个在所有 hiPS 细胞中都发生异常甲基化的基因, 并把这一组基因视为重编程的特异性表观遗传标记。无论细胞的来源和分化程度如何, 用这种标记都可以区分出它是究竟是来源于 hES 细胞还是 hiPS 细胞。

研究发现组蛋白 H3 赖氨酸 9 (histone H3 lysine9, H3K9) 甲基化是决定前体诱导多能干细胞 (pre-iPS 细胞) 状态的一个重要的表观遗传决定因素^[25]。H3K9 去甲基化可导致 iPS

细胞完全重编程。H3K9 甲基转移酶与脱甲基酶共同调控 H3K9 甲基化, 从而影响细胞的重编程。高通量基因组研究工具(high-throughput genomic tools)测序技术的不断发展极大地促进了多能干细胞表观遗传领域的研究。研究人员利用此方法发现一些表观遗传途径, 比如 DNA, 组蛋白和核小体的修饰均存在广泛的串扰(cross talk)现象^[26], 即不同层级的表观遗传信号通路会相互作用以精确调控基因表达。新型绘图工具染色质免疫沉淀-核酸外切酶(chromatin immunoprecipitation-exonuclease, ChIP-exo)技术可以利用核酸外切酶来切除未被基因调控蛋白结合的 DNA 序列, 从而能确定具体的编码核苷酸序列。它能在数以亿计的调控蛋白结合位点的核苷酸中精确定位目的核苷酸。提高检测效率, 提供更加完整的图谱^[27]。无论目的蛋白是否正确地调控整个基因组, 人们都可以利用该技术精确定位调控蛋白与染色体的结合位置, 从而为一种特定蛋白调控哪些基因以及调节蛋白在整个基因组上的结构组装提供一幅更加完整的图谱。在表观遗传学研究领域中, 人们利用这种技术分析了染色质重塑在基因表达调控中发挥的重要作用。比较表观基因组学(comparative epigenomics)通过对 DNA 和组蛋白修饰进行种间对比, 可以对起调节作用的基因组序列进行标注。美国伊利诺伊大学的研究人员通过对人类、小鼠和猪来源的 iPS 细胞的 9 个表观基因组标记, 为每个物种构建一张表观基因组图谱, 并尝试鉴定出种间表观基因组的保守标记^[28], 进而证实保守的表观遗传标记能够被有效地用来标注基因组和阐明基因组的调节性功能。

4 诱导性多能干细胞的免疫原性

起初, 人们普遍认为来自于自身组织的重编程细胞能够被安全地移植到同一个体内并能避免排斥反应, 但最近一些研究表明, 某些 iPS 细胞依然具有免疫原性。

为了检测 iPS 细胞的免疫原性, Zhao 等将 1×10^6 的近交系小鼠 C57BL/6(B6) 的 ES 细胞和与 B6 小鼠基因型不同的 129/SvJ 小鼠的 ES 细胞分别移植到同一只 B6 小鼠体内的不同部位。结果发现, B6 小鼠 ES 细胞同系移植后在移植部位形成了畸胎瘤, 没有发生任何免疫排斥(未检测到任何 CD4⁺ T 细胞的浸润); 而将 129 小鼠 ES 细胞移植给 B6 小鼠后发生了明显的急性免疫排斥反应(检测到大量的 CD4⁺ T 细胞浸润和组织坏死), 移植部位没有畸胎瘤形成^[29]。说明 ES 细胞异体(异种)移植存在移植排斥。为了证明检测到的 CD4⁺ T 细胞不是由供体 ES 细胞分化而来, 研究人员将以上 2 种 ES 细胞移植到联合免疫缺陷综合征的 SCID 小鼠体内, 结果均可形成畸胎瘤, 也未检测到任何免疫细胞, 从而证实了该实验模型的可行性。

研究人员进一步将使用逆转录病毒重编程自 B6 小鼠胚胎成纤维细胞的 iPS 细胞移植到 B6 小鼠体内, 发现在形成畸胎瘤的过程中发生了免疫排斥反应。为了排除免疫反应是由

逆转录病毒引起的, 研究人员又利用核因子(nucleofactor)转染技术诱导生成 iPS 细胞(不含逆转录病毒载体成分)后移植到 B6 小鼠体内, 仍然观察到了免疫排斥反应。说明 iPS 细胞同系移植引起的移植排斥确系重编程事件引起。即使是与宿主基因型相同的 iPS 细胞仍然受到宿主免疫系统的识别和排斥^[30]。

为了探明 iPS 细胞免疫原性的机制, 研究人员分析了上述实验中 iPS 细胞衍生的畸胎瘤的基因表达图谱, 发现有 9 个基因的表达异常增高, 其中 *hormad1* 可以表达为一种肿瘤抗原, 而 *spt1* 是一种组织特异性抗原的表达基因^[24]。为了进一步证明这些基因的异常表达是否导致了 iPS 细胞的免疫原性, 研究人员选取其中 7 个基因异位表达于 B6 小鼠的 ES 细胞上并将这些细胞移植到 B6 小鼠内。结果发现异位表达了 *cyp3a11*、*hoemad1* 和 *zg16* 基因的 B6 小鼠 ES 细胞在移植后出现了广泛的 T 细胞浸润和组织坏死, 表明这些基因的异常表达导致了免疫排斥。

为了证实上述移植过程中发生的移植免疫排斥是由 T 细胞引导的特异性免疫反应, 研究人员将上述实验中使用的 iPS 细胞以及异位表达了 *hoemad1* 和 *zg16* 基因的 B6 小鼠 ES 细胞移植到缺乏 T 细胞(CD4^{-/-}, CD8^{-/-})的 B6 小鼠体内, 结果表明移植后形成了畸胎瘤并且没有发生任何免疫排斥, 从而证实了 CD4⁺ 辅助性 T 细胞和 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞在 iPS 细胞的免疫排斥反应中起关键作用。

上述实验充分证明了 iPS 细胞具有免疫原性, 为 iPS 细胞在再生医学上的应用敲响了警钟。尽管有学者认为 iPS 细胞之所以产生免疫原性是由于诱导方式的差异产生的, 但在任何细胞进行移植前, 其免疫原性是一个不能忽视的问题。联系上面提到的 iPS 细胞的表观遗传学特性, 可以推测重编程过程中的表观遗传学改变也许是造成 iPS 细胞具有免疫原性的原因。尽管具体的机制尚未阐明, 但可以预见, 对 iPS 细胞诱导过程中表观遗传学改变的研究将是攻克这一难题的一把利刃。

5 展望

从 2006 年 Yamanaka 首次报导发现 iPS 细胞至 2012 年 iPS 细胞研究获诺贝尔医学奖仅 5 年多时间, 是医学史上诺贝尔奖获奖最快的项目。这足以说明 iPS 细胞对生物医学领域的巨大影响。可以预见, iPS 细胞在今后依然将是干细胞研究的热点。人们一直对用 iPS 细胞攻克移植排斥这个困扰医学界的难题充满期待。但随着表观遗传学研究的深入, 基于孟德尔遗传规律的“同基因移植不产生免疫排斥”的固有认识被打破。许多急于用 iPS 种子细胞“生产”无免疫排斥组织器官“标准件”的简单想法受到警醒。iPS 细胞“返老还童”的机制(重编程)、iPS 细胞的生物学特性, 特别是免疫学特性(是否真如人们期待的那样无免疫排斥?)将成为今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Dupont C, Armand DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(5): 351-357.
- [2] Rando OJ. Combinatorial complexity in chromatin structure and function; revisiting the histone code [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2012, 22(2): 148-155.
- [3] Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription [J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(4): 144-151.
- [4] Jayaraman S. Epigenetics of autoimmune diabetes [J]. *Epigenomics*, 2011, 3(5): 639-648.
- [5] Setoyama T, Ling H, Natsugoe S, et al. Non-coding RNAs for medical practice in oncology [J]. *Keio J Med*, 2011, 60(4): 106-113.
- [6] Silveyra P, Floros J. Air pollution and epigenetics: effects on SP-A and innate host defence in the lung [J/OA]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13579.
- [7] Benlhabib H, Mendelson CR. Epigenetic regulation of surfactant protein A gene (SP-A) expression in fetal lung reveals a critical role for Suv39h methyltransferases during development and hypoxia [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(10): 1949-1958.
- [8] Kabelitz D. Toll-like receptors: recognition receptors of the innate immune system and target structures for therapeutical intervention [J]. *Med Monatsschr Pharm*, 2012, 35(7): 238-244.
- [9] Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling [J]. *Int Immunol*, 2011, 23(7): 421-425.
- [10] Zhang X, Zhang J, Zhang L, et al. UBE2O negatively regulates TRAF6-mediated NF- κ B activation by inhibiting TRAF6 polyubiquitination [J]. *Cell Res*, 2013, 23(3): 366-377.
- [11] Xu Z, Jiang J, Xu C, et al. MicroRNA-181 regulates CARM1 and histone arginine methylation to promote differentiation of human embryonic stem cells [J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53146.
- [12] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 13-25.
- [13] Lovatell GA, Elsner VR, Bertoldi K, et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2013, 101: 94-102.
- [14] Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development [J]. *Immunity*, 2012, 37(5): 785-799.
- [15] Medvedev SP, Pokushalov EA, Zakian SM. Epigenetics of pluripotent cells [J]. *Acta Naturae*, 2012, 4(4): 28-46.
- [16] Watanabe A, Yamada Y, Yamanaka S. Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier [J/OA]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1609): 20120292.
- [17] Deng J, Shoemaker R, Xie B, et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(4): 353-360.
- [18] Doi A, Park IH, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1350-1353.
- [19] Kim K, Zhao R, Doi A, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12): 1117-1119.
- [20] Anguera MC, Sadreyev R, Zhang Z, et al. Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1): 75-90.
- [21] Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(5): 497-505.
- [22] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 68-73.
- [23] Ohn Y, Qin H, Hong C, et al. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(5): 541-549.
- [24] Ruiz S, Diep D, Gore A, et al. Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(40): 16196-16201.
- [25] Chen J, Liu H, Liu J, et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs [J]. *Nat Genet*, 2012, 45(1): 34-42.
- [26] Li M, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(8): 524-535.
- [27] Rhee HS, Pugh BF. Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution [J]. *Cell*, 2011, 147(6): 1408-1419.
- [28] Xiao S, Xie D, Cao X, et al. Comparative epigenomic annotation of regulatory DNA [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1381-1392.
- [29] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 212-215.
- [30] Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 100-104.