

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.01.014 [http://www.crter.org]

骆玉梅, 范勇, 陈欣洁, 岳磊, 黎青, 余波澜, 何文智, 马晓燕, 孙筱放. 以4种基因诱导产前诊断绒毛细胞建立诱导性多能干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):86-91.

## 以4种基因诱导产前诊断绒毛细胞建立诱导性多能干细胞\*\*\*◆

骆玉梅, 范勇, 陈欣洁, 岳磊, 黎青, 余波澜, 何文智, 马晓燕, 孙筱放

广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省高校生殖与遗传重点实验室, 广州医学院第三附属医院, 广东省广州市 510150

### 文章亮点:

1 四种全能性基因转入绒毛细胞可获得具有多能性的诱导性多能干细胞, 可为胎儿的细胞自体移植治疗提供理想来源, 为产前诊断疾病机制研究提供很好的细胞模型。

2 实验运用反转录病毒介导4个基因 hOct4、hSox2、hc-Myc、hKlf4 重编程产前诊断绒毛细胞, 筛选出具有全能性的诱导性多能干细胞, 建立的产前诊断来源的诱导性多能干细胞可为胎儿的细胞自体移植治疗提供理想来源。

### 关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 诱导性多能干细胞; 绒毛细胞; 产前诊断; 自体移植; 模型; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** 诱导性多能干细胞因具有多能性特征, 可以诱导分化为特定的细胞, 包括神经细胞、造血细胞等。

**目的:** 建立产前诊断绒毛细胞来源的诱导性多能干细胞。

**方法:** 运用反转录病毒介导4种基因 hOct4、hSox2、hc-Myc、hKlf4 诱导产前诊断绒毛细胞, 对建立的诱导性多能干细胞进行多能性、体内外分化能力、核型等鉴定。

**结果与结论:** 建立的诱导性多能干细胞能维持自我更新状态, 在蛋白和 mRNA 水平上高表达全能性的标志基因, 具有体内、外分化潜能; 在体外长期培养能维持正常核型。说明4种全能性基因转入绒毛细胞可获得具有多能性的诱导性多能干细胞, 这为胎儿的细胞自体移植治疗提供理想来源, 为产前诊断疾病机制研究提供很好的细胞模型。

骆玉梅★, 女, 1983年生, 广东省广州市人, 汉族, 2007年广州医学院毕业, 硕士, 初级技师, 主要从事干细胞与组织工程研究。  
mei.2002@163.com

通讯作者: 孙筱放, 硕士, 教授, 硕士生导师, 广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省广州市 510150  
xiaofangsun@hotmail.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2013)01-00086-06

收稿日期: 2012-02-29  
修回日期: 2012-05-28  
(20120229030/D·C)

## Generation of induced pluripotent stem cells from villus cells after induction by four kinds of genes during prenatal diagnosis

Luo Yu-mei, Fan Yong, Chen Xin-jie, Yue Lei, Li Qing, Yu Bo-lan, He Wen-zhi, Ma Xiao-yan, Sun Xiao-fang

Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Hereditary of the Universities in Guangdong Province, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Due to pluripotent characteristics, induced pluripotent stem cells can be induced to differentiate into the specific cells, including nerve cells and hematopoietic cells.

**OBJECTIVE:** To establish the induced pluripotent stem cells generated from villus cells during prenatal diagnosis.

**METHODS:** The prenatal diagnosis villus cells were induced by retroviral vectors encoding hOct4, hSox2, hKlf4 and hc-Myc. The pluripotency, differentiation ability and karyotype of the induced pluripotent stem cells were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The induced pluripotent stem cells maintained the self-renewal ability with high

Luo Yu-mei★, Master, Junior Technician, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Hereditary of the Universities in Guangdong Province, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China  
mei.2002@163.com

Corresponding author: Sun Xiao-fang, Master, Professor, Master's supervisor, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Hereditary of the Universities in Guangdong Province, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China  
xiaofangsun@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 31171229\*; Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2009A030200010\*; Guangdong Key Science and Technology Program, No. 2011A080300002\*

Received: 2012-02-29  
Accepted: 2012-05-28

pluripotent marker gene and protein expression and had *in vivo* and *in vitro* differentiation potential. The induced pluripotent stem cells could maintain normal karyotype *in vitro* after long-term culture. The induced pluripotent stem cells obtained from the prenatal diagnosis villus cells provide an ideal source for autologous cell-replacement therapy in the later life of the fetus, and can be used as a perfect model for the research of mechanism underlying prenatally diagnosed diseases.

**Key Words:** stem cells; stem cell culture and differentiation; induced pluripotent stem cells; villus cells; prenatal diagnosis; autologous transplantation; models; National Natural Science Foundation of China; stem cell photographs-containing paper

Luo YM, Fan Y, Chen XJ, Yue L, Li Q, Yu BL, He WZ, Ma XY, Sun XF. Generation of induced pluripotent stem cells from villus cells after induction by four kinds of genes during prenatal diagnosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(1):86-91.

## 0 引言

2006年日本科学家Yamanaka等<sup>[1]</sup>首先提出了诱导性多能干细胞的科学构想, 2007年Yamanaka等<sup>[2]</sup>和Yu等<sup>[3]</sup>分别用反转录系统SY4基因和慢病毒Oct4、Sox2、Nanog、Lin28(JT4基因)重编程人类成纤维细胞, 得到了人诱导性多能干细胞。

绒毛细胞的检测可准确地反映胎儿的情况, 20世纪70年代初就有学者开始对绒毛进行培养, 将绒毛用于医学的细胞遗传学检测<sup>[4]</sup>。有学者认为绒毛组织细胞比羊水细胞更适用于分子水平和酶学的诊断<sup>[5]</sup>, 因此绒毛组织检查被认为是预防遗传病的一个新的领域。

实验运用反转录病毒介导4个基因hOct4、hSox2、hc-Myc、hKlf4重编程产前诊断绒毛细胞, 筛选具有全能性的诱导性多能干细胞。实验建立的产前诊断来源的诱导性多能干细胞为胎儿细胞自体移植治疗提供理想来源, 且为产前诊断疾病机制、细胞遗传研究提供很好的模型。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞形态学观察。

**时间及地点:** 2011年3至9月于广州医学院第三附属医院广东省产科重大疾病重点实验室与广东省高校生殖与遗传重点实验室完成。

**材料:** 经捐助夫妇知情同意及广州医学院第三附属医院伦理委员会批准, 取广州医学院第三附属医院产前诊断中心绒毛组织用于实验; 293T细胞购于中国科学院广州生物医药和健康研究院。6周龄重症联合免疫缺陷小鼠购于南方医科大学, 许可证号: SCXK(粤): 2010-0015。

**方法:**

**绒毛细胞收集传代:** 无菌条件B超引导下抽取绒毛组织, 用眼科剪将组织尽量剪碎, 胶原酶IV 37 °C消化30 min。消化后, 吸管吹打, 1 000 r/min离心4 min, 去上清, 用AmnioMAX-TM-II(GIBCO)培养基重悬沉淀细胞, 接种于提前用0.1%明胶处理的60 cm培养皿中, 放于37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱培养, 3-9 d可见细胞长出, 细胞汇合度达到70%-80%后, 用0.05%胰酶消化传代, 冷冻。

**绒毛细胞的感染:** 用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)转染试剂盒将pMx-hOct4、hSox2、hKlf4、hc-Myc、绿色荧光蛋白及pCL包装质粒转染至293T细胞, 于48 h和72 h后收集病毒液, 在8 mg/L的polybrene条件下感染绒毛细胞。

**诱导性多能干细胞的原代培养:** 感染后第7天, 用0.05%胰酶消化被感染的细胞并计数, 将2×10<sup>5</sup>个细胞接种到经丝裂霉素C处理的10 cm培养皿的小鼠胚胎成纤维细胞中, 更换为诱导性多能干细胞培养液: knockout-Dulbecco (DMEM, Gibco, USA)添加15%血清替代物(SR, Gibco),

体积分数5%胎牛血清(FBS, Hyclone, USA), 2 mmol/L 谷氨酰胺(Gibco), 0.1 mmol/L β-巯基乙醇(Gibco), 0.1 mmol/L非必需氨基酸(NEAAs, Gibco), 100 U/mL青霉素(Gibco), 100 mg/L链霉素(Gibco), 10 μg/L碱性成纤维细胞生长因子(Invitrogen)。挑选边界清晰、核仁明显集落状生长的细胞接种至新的小鼠胚胎成纤维细胞上。

**诱导性多能干细胞的传代:** 37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>培养至第四五天后, 用自制的玻璃细针轻轻将细胞切割成两到三块, 转到新鲜制备的小鼠胚胎成纤维细胞上。在开始5代之内用机械切割法传代。第5代以后, 用1 g/L胶原酶IV(Gibco, USA)消化传代, 每天换液, 每隔四五代1次。

**诱导性多能干细胞碱性磷酸酶检测:** 诱导性多能干细胞用40 g/L的多聚甲醛固定20 min, PBS冲洗3次, 加入碱性磷酸酶孵育液(武汉博士德生物工程有限公司), 避光, 室温孵育30 min, PBS冲洗1次, 光镜下观察结果。

**诱导性多能干细胞免疫荧光染色:** 诱导性多能干细胞用PBS洗2次, 每次10 min; 40 g/L的多聚甲醛固定20 min, PBS洗3次; 体积分数0.2% Triton X 100室温作用30 min; 0.3%–0.5%山羊血清封闭30 min; 弃去血清, 一抗(SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81, NANOG, 1:100稀释), 4 °C过夜; PBS洗3次, 每次10 min; 二抗室温孵育一两个小时; PBS洗3次, 每次10 min; 1 g/mL Hoechst33342 复染细胞核, 荧光显微镜下观察拍照。

**引物序列:**

Primer sequence:

基因名称	引物序列(5' to 3')
en-hc-Myc	F:CGA GAG GAC CCG TGG ATG CAG AG R:TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG
en-hOct4	F:GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG R:CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC
en-hSox2	F:GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG R:CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG
en-hKlf4	F:ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C R:TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C
en-hNANOG	F:CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC R:CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C
en-hREX1	F:CAG ATC CTA AAC AGC TCG CAG AAT R:GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA
tgOct4	F:CCC CAG GGC CCC ATT TTG GTA CC R:TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG CTG
tgSox2	F:GGC ACC CCT GGC ATG GCT CTT GGC TC R:TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG CTG
tgKlf4	F:ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C R:TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG CTG
tg-c-Myc	F:CAA CCG AAA ATG CAC CAG CCC CAG R:TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG CTG

F: 正向引物; R: 反向引物; en: 内源性; tg: 外源性

**绒毛细胞及诱导性多能干细胞多能性基因检测:** Trizol

提取细胞总RNA, 反转录成cDNA。20 μL PCR反应体系: 1 μL cDNA样品, 250 nmol/L引物, 200 μmol/L dNTP, 1 U Taq DNA酶; 每个样品以GAPDH为内参。放至ABI PRISM 7500中检测。预变性: 95 °C, 10 s; PCR反应95 °C, 60 °C, 34 s, 反应结束后确认Real time PCR的扩增曲线与熔解曲线。

**诱导性多能干细胞体外分化能力检测:** 1 g/L的胶原酶IV处理细胞吹散后, 离心去上清, 用诱导性多能干细胞拟胚体培养液中没有添加碱性成纤维生长因子)重悬, 接种在Petri培养皿中。培养7 d后, 将胚体转移到0.1%明胶包被的4孔板中继续培养, 一两周后作免疫荧光染色。分别采用内胚层-AFP(alpha fetoprotein)、中胚层-心肌抗原(cardiac troponin)、外胚层(nestin)(1:100稀释)鉴定胚体中三胚层来源细胞。

**诱导性多能干细胞体内分化潜能的检测:** 1 g/L胶原酶IV处理细胞吹散后, 将300–400个小克隆接种到6周龄重症联合免疫缺陷小鼠腹股沟皮下。4周后观察肿瘤生长, 8周后处死小鼠, 摘除肿块, 用体积分数10%甲醛固定4–8 h, 石蜡包埋, 苏木精-伊红染色, 高倍镜下观察组织三胚层分化情况。

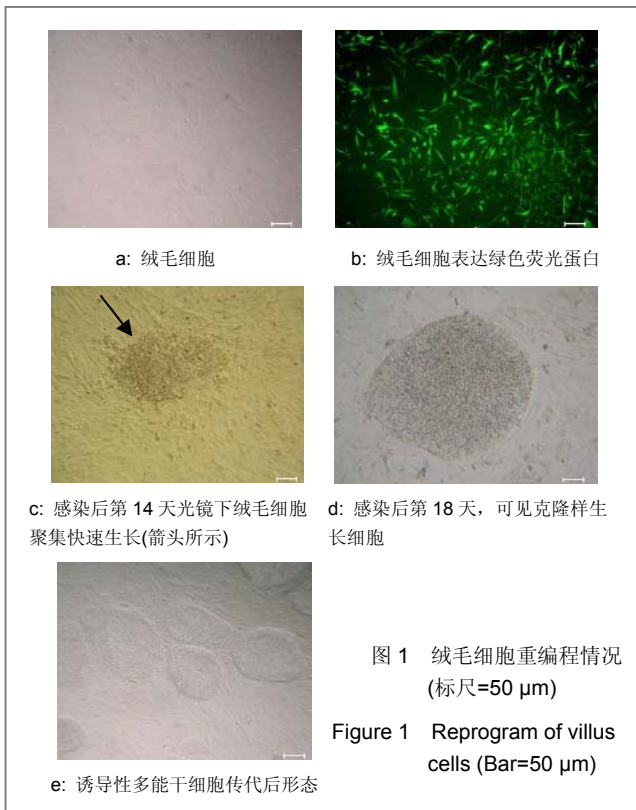
**诱导性多能干细胞核型分析:** 细胞传代后, 生长两三天, 用0.25 mg/L秋水仙素处理3 h, 消化细胞, 1 000–1 500 r/min离心8–10 min, 弃上清收集细胞; 加入0.4%枸橼酸钠与0.4%氯化钠(1:1)的低渗液, 用吸管吹打均匀, 37 °C水浴箱中静置5 min; 然后用固定液(甲醇与冰醋酸为3:1)固定3次; G带显色后, 高倍镜下观察至少20个分裂中期细胞染色体。

**主要观察指标:** 观察细胞重编程后的多能性, 主要包括指标有碱性磷酸酶、免疫荧光染色、多能性基因、体外分化能力、体内分化潜能、核型。

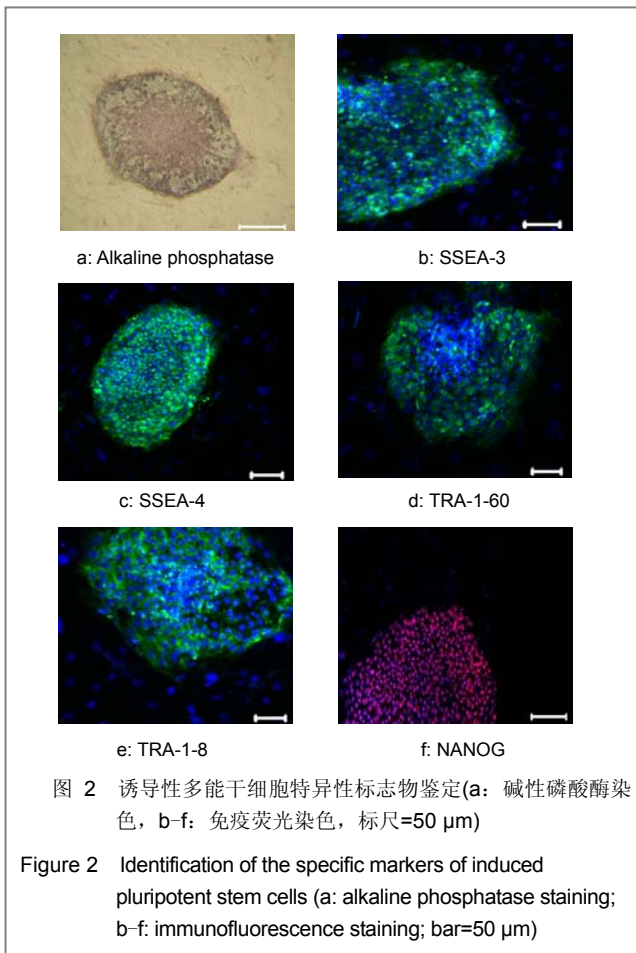
## 2 结果

**2.1 反转录病毒重编程绒毛细胞** 293T细胞转染绿色荧光蛋白质粒后, 可见80%–90%的细胞表达强绿色荧光, 证实质粒转染入293T细胞, 18 h后用包装hOct4、hSox2、hKlf4和hc-Myc 4个基因的反转录病毒感染绒毛细胞, 绿色荧光蛋白显示感染效率80%–90%, 见图1a, b。感染后第7天胰酶消化传代; 感染后第14天可见绒毛细胞形态发生巨大变化, 成颗粒状聚集快速生长, 见图1c; 感染后第18天, 可见克隆样生长细胞, 紧密排列, 边界明显, 见图1d。用自制玻璃细针进行机械法切割, 细胞在传代过程中始终保持较高的核浆比例、明显的核

仁、呈单层紧密排列、边界清晰, 见图1e。



## 2.2 诱导性多能干细胞特异性标志物鉴定 见图2。



未分化诱导性多能干细胞克隆AP检测均呈强阳性。表面抗原SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60以及TRA-1-81免疫荧光反应呈现强阳性; NANOG表达阳性, 显示未分化状态。

2.3 诱导性多能干细胞多能性相关基因检测 诱导性多能干细胞与人胚胎干细胞(FY-HES-1)多能性相关基因Oct4、Sox2、NANOG、REX1, 呈高表达, 远高于未重编程绒毛细胞; 基因Klf4、c-Myc表达含量与未重编程绒毛细胞无明显差异, 见图3; 诱导性多能干细胞外源性转基因tgOct4、tgSox2、tgKlf4、tgc-MYC表达基本沉默, 见图4。

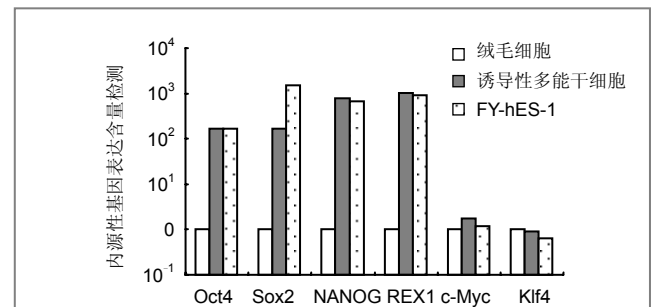


图 3 诱导性多能干细胞与 FY-HES-1 多能性基因 Oct4、Sox2、NANOG、REX1 呈高表达

Figure 3 High expression of pluripotent genes (Oct4, Sox2, NANOG and REX1) in induced pluripotent stem cells and FY-of HES-1

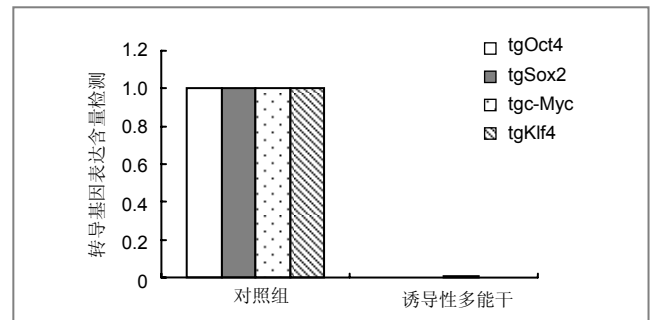


图 4 诱导性多能干细胞转基因 tgOct4、tgSox2、tgKlf4、tgc-Myc 表达基本沉默

Figure 4 Expression of transduced genes (tgOct4, tgSox2, tgKlf4 and tgc-Myc) in induced pluripotent stem cells was almost silent

2.4 诱导性多能干细胞染色体核型检测 诱导性多能干细胞每隔10代进行一次核型分析, 已传至第40代, 在传代过程中能维持正常核型46, XY, 见图5。

## 2.5 诱导性多能干细胞分化能力检测

体外分化潜能: 诱导性多能干细胞在悬浮液中培养第

3天形成拟胚体, 见图6a, 第7天形成囊性拟胚体, 见图6b。贴壁分化后3个胚层特异性标记物表达阳性, 内胚层-AFP(alpha fetoprotein)、中胚层-心肌抗原(cardiac troponin)、外胚层图(nestin), 见图6。

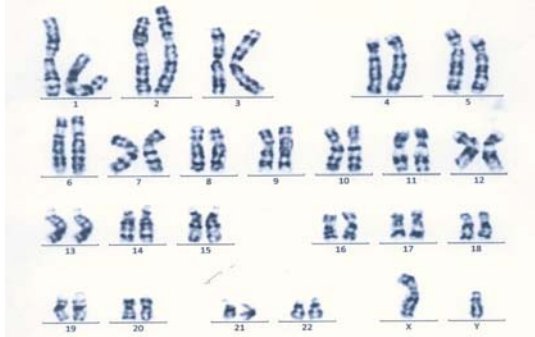
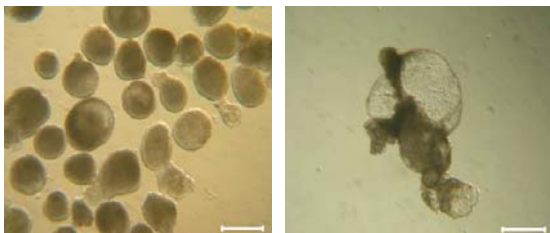
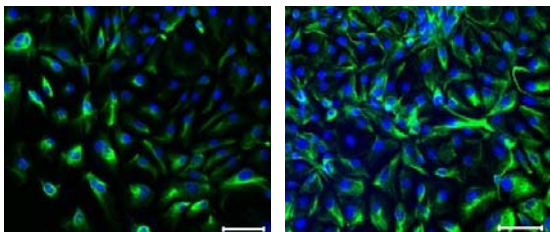


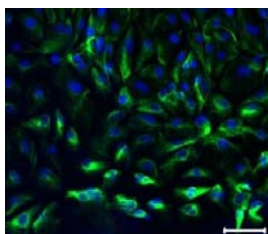
图5 诱导性多能干细胞核型分析, 正常核型 46, XY  
Figure 5 Induced pluripotent stem cells showed normal karyotype 46, XY



a: 第3天形成的EB b: 第7天形成囊性拟胚体(EB)



c: 内胚层-AFP(alpha fetoprotein) d: 中胚层-心肌抗原(cardiac troponin)



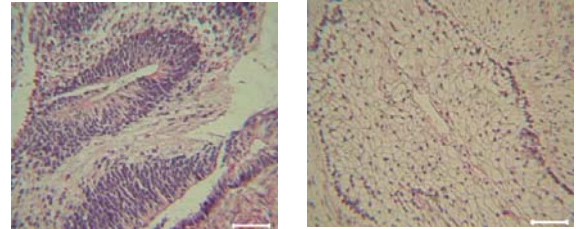
e: 外胚层(nestin)

图6 诱导性多能干细胞的体内外分化检测(免疫荧光染色, 标尺=50 μm)

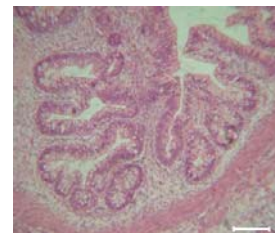
Figure 6 Differentiation of induced pluripotent stem cells *in vitro* and *in vivo* (immunofluorescence staining: scale bar=50 μm)

体内分化潜能: 诱导性多能干细胞接种到联合重症免

疫缺陷小鼠腹股沟皮下6周左右, 出现肿块; 处死小鼠, 摘除肿块, 做病理切片染色分析可见3个胚层的组织, 包括神经管样细胞(外胚层)、脂肪细胞(中胚层)以及肠腺上皮细胞(内胚层), 见图7。



a: 神经管样细胞(外胚层) b: 脂肪细胞(中胚层)



c: 肠腺上皮细胞(内胚层)

图7 诱导性多能干细胞的体内外分化检测(苏木精-伊红染色, 标尺=50 μm)

Figure 7 Differentiation of induced pluripotent stem cells *in vitro* and *in vivo* (hematoxylin-eosin staining; scale bar=50 μm)

### 3 讨论

自2006年诱导性多能干细胞已成为细胞生物学乃至生命科学领域最受关注的研究之一。目前应用于诱导性多能干细胞研究的细胞有皮肤成纤维细胞、神经干细胞、角质细胞、血液细胞、羊水细胞、脐血干细胞等<sup>[6-11]</sup>。不同组织体细胞诱导重编程的水平不同, 形成诱导性多能干细胞的速度与效率也不同, 诱导性多能干细胞克隆出现的时间从15-30 d不等<sup>[13-15]</sup>。诱导性多能干细胞因具有多能性特征, 可以诱导分化为特定的细胞, 包括神经细胞、造血细胞等<sup>[16-17]</sup>。从尿液中提取细胞进行诱导性多能干细胞诱导的成功, 使该项技术得到更广泛的应用<sup>[18]</sup>。各种疾病模型的诱导性多能干细胞的建立, 更为疾病机制的研究提供广阔的空间<sup>[15, 19]</sup>。

反转录病毒主要感染分裂期细胞, 病毒包装的质量和感染时细胞培养的状态对细胞的重编程过程影响很大。实验中应选择汇合度约60%的293T细胞进行转染, 密度太稀, 转染试剂的细胞毒性易导致293T细胞大量死亡; 如果密度太高, 细胞增殖减慢会导致转染率降低。

为保证细胞重编程的成功率, 应选取前3代的处于生长指数期的绒毛细胞用于重编程实验, 绒毛细胞接种的汇合度约为70%。研究指出, 在培养基中添加Vitamin C可以显著提高诱导性多能干细胞的诱导效率<sup>[20]</sup>。本实验建立产前诊断绒毛细胞来源的诱导性多能干细胞, 经鉴定具有与正常人胚胎干细胞相同的多能性特征。

绒毛细胞诱导性多能干细胞的建立, 为产前诊断遗传性疾病机制研究, 诊断及个体化治疗方面提供了良好的工具<sup>[21]</sup>。产前诊断中羊水细胞要到18周才能进行抽取检测培养, 而绒毛细胞在第9周就可以抽取, 比羊水细胞更早更容易获取; 而相对于胎儿皮肤成纤维细胞, 它不用对胎儿产生伤害, 更具有安全性和可取性。用产前诊断绒毛细胞进行诱导, 在时间上可以更早获得, 从而减少了胎儿的细胞自体移植治疗的时间, 因此其在应用前景中有不可替代的优势。诱导性多能干细胞具有分化成各个胚层细胞的能力, 因此将其直接进行诱导分化后进行自体移植, 可以减少移植所存在的排斥反映问题, 为胎儿的细胞自体移植治疗提供理想来源。

**基金资助:** 国家自然科学基金项目(31171229); 广东省科技计划项目(2009A030200010); 广东省重大科技专项(2011A080300002)。

**致谢:** 感谢广州医学院第三附属医院广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省高校生殖与遗传重点实验室的孔舒、郑育红、潘倩莹、刘海波、王鼎、赖炜强、李少英、王晓蔓给予的支持与帮助。

**作者贡献:** 骆玉梅进行实验实施并成文; 范勇进行评估; 第三至第六作者进行资料收集; 第七、八作者进行细胞 STR 位点分析; 孙筱放为通讯作者进行文章审校, 并对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验已取得广州医学院第三附属医院伦理委员会的批注。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

[1] 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.

[2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.

[3] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-1920.

[4] Hahneemann N. Possibility of culturing foetal cells at early stages of pregnancy. *Clin Genet*. 1972;3(4):286-293.

[5] Papp C, Beke A, Mezei G, et al. Chorionic villus sampling: A 15-year experience. *Fetal Diagn Ther*. 2002;17(4):218-227.

[6] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 2008;454(7204):646-650.

[7] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1276-1284.

[8] Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*. 2009;5(4):434-441.

[9] Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009;113(22):5476-5479.

[10] Li C, Zhou J, Shi G, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet*. 2009;18(22):4340-4349.

[11] Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, et al. Amniocytes can serve a dual function as a source of ips cells and feeder layers. *Hum Mol Genet*. 2010;20(5):962-974.

[12] Cai J, Li W, Su H, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11227-11234.

[13] Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(22):8912-8917.

[14] Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific ipscs. *Nature*. 2009; 461(7262): 402-406.

[15] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134(5):877-886.

[16] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15): 5856-5861.

[17] Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Ogawa M. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines. *Int J Hematol*. 2010;91(3):384-391.

[18] Zhou T, Benda C, Duzinger S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(7):1221-1228.

[19] Maysnar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):521-531.

[20] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(1):71-79.