

诱导多潜能干细胞治疗脊髓损伤的研究现状与进展

刘威, 张绍昆, 闫明, 刘理迪

(吉林大学第一附属医院脊柱外科, 吉林 长春 130021)

【摘要】 脊髓损伤是困扰医学界的难题。目前临床上的治疗方法效果均不理想。近 20 年来, 干细胞技术飞速发展, 在神经疾病和神经损伤的动物模型中应用胚胎和成体干细胞, 取得了肯定的结果。在细胞水平上为治疗神经损伤提供了新的前景。但是由于技术和伦理方面的问题, 获得可以应用于人类的合适的细胞资源仍有许多困难。最近诱导多功能干细胞的发现, 为自体同源移植治疗脊髓损伤提供了新方法。本文将以此为出发点, 评估诱导多潜能干细胞向神经细胞分化的能力, 以及在这一领域中的最新进展。

【关键词】 多潜能干细胞; 脊髓损伤; 细胞移植; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.07.026

Current situation and progression of induced pluripotent stem cells in treating spinal cord injury LIU Wei, ZHANG Shao-kun, YAN Ming, LIU Li-di. Department of Spinal Surgery, the First Clinical Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

ABSTRACT Spinal cord injury is a difficult medical problem and current therapeutic methods could not obtain satisfactory results. Recent 20 years, stem cell technology developed rapidly, embryonic stem cells and adult stem cells were used for treating neurological disease and nerve injury of animal models and the clinical results were confirmed. It provided a new prospect for the treatment of nerve injury at the cellular level. However, due to technical and ethical problems, it is difficult to obtain the appropriate cells that can be applied to the human being. Recently, induced pluripotent stem cells were developed as a new method for the treatment of spinal cord injuries by the autologous transplantation. Starting from this work, the purpose of this review is to assess the differentiate ability of induced pluripotent stem cells into neurocyte and review the latest developments in this area.

KEYWORDS Pluripotent stem cells; Spinal cord injuries; Cell transplantation; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(7):616-620 www.zggszz.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)多由脊柱骨折、脱位引起, 可导致截瘫, 患者损伤平面以下感觉、运动、反射及尿便功能障碍。高位完全截瘫者病死率高, 可达 49%~68.8%^[1]。SCI 后神经元的再生能力很低, 损伤后继发性的病理变化更是进一步阻碍了神经元的修复, 目前各种外科及药物治疗手段均不能获得满意疗效。

1 SCI 的病理生理机制

临床上完全性脊髓横断很少见, 多数为脊髓挫伤。通过大鼠 SCI 模型, 人们认识到 SCI 后脊髓功能的改变, 取决于脊髓损伤部位残存的神经轴突数量。少量轴突数量改变就可以对脊髓功能产生重大影响^[2]。在中枢神经、神经轴突周围包有髓鞘, 起绝缘、保护和加速传导的作用, 其成分主要是髓磷脂。在创伤后, 损伤部位存活的轴突会出现继发性脱髓鞘改变^[3]。Bunge 等^[4]在 1993 年观察到, SCI 后髓磷脂肿胀、崩解, 随后被巨噬细胞吞噬, 这一过程不断进展, 同时由于少突胶质细胞的凋亡和再生相关基因表达不足, 髓磷脂再生十分有限^[5-6], 经过 3~5 周, 神经轴突脱髓鞘。SCI 后的这一重要的病理生理

改变, 导致有功能的神经元大量减少^[7-8]。

2 干细胞治疗 SCI 的现状

在 SCI 的治疗策略中, 应恢复髓鞘对神经轴突的保护作用, 减少残存神经轴突的损伤, 使其逐渐恢复功能。在这个过程中, 如果可以使凋亡的少突胶质细胞再生, 就可以减少髓磷脂的丢失, 诱导髓鞘再生^[9]。近 10 年来, 人们对胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、神经前体细胞(NPCs)、少突胶质前体细胞(OPCs)、雪旺细胞(schwann cells, SC)、嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)、骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和神经干细胞(neural stem cells, NSCs)等各种细胞进行诱导或移植, 以期评估它们促进髓鞘再生和修复脊髓损伤的能力^[10-12]。通过观察发现, 从胚胎和成体组织分离出的 NPCs, 包括 ESCs 分化而来的 NPCs, 在这方面有巨大潜力。

2.1 神经前体细胞 我们可以从发育中的胚胎和成体组织得到 NPCs^[13-14]。虽然 NPCs 的自我更新能力较 ESCs 有限, 最终的分化也受到限制, 但是它仍具有多能性^[15]。研究表明^[5], NPCs 被植入啮齿动物的 SCI 模型后, 大多数分化为胶质细胞系, 其余的可分化成为神经元细胞、星形细胞。在这项研究中,

NPCs 分化而成的少突胶质细胞生成了新的髓磷脂,形成髓鞘包绕损伤的神经轴突。损伤动物的运动功能得到改善。虽然 NPCs 通过令人信服的证据,展示了其治疗 SCI 的能力,但是由于受到来源限制,这种治疗方法应用于临床很困难。

2.2 胚胎干细胞 20 世纪 90 年代 ESCs 点亮了再生医学的前景。它在体外可被诱导成 3 个胚层的衍生细胞^[16]。人 ESCs 被植入多种神经系统损伤的动物模型中,都起到了治疗作用。比如将人 ESCs 植入 Parkinson's 病的大鼠模型,可以观察到 ESCs 转化成多巴胺能神经元,大鼠有明显的功能改善^[17]。将由 ESCs 培育成的 OPCs,分化成为 NPCs 植入啮齿动物的 SCI 模型中^[4],2 个月后观察到髓鞘再生和运动功能的恢复。

我们知道,细胞表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)能引起强而迅速的排斥反应。由于宿主的排斥反应,应用免疫抑制剂是治疗过程中相当重要的一环。以前曾经认为 ESCs 移植不存在免疫排斥,原因是该细胞的白细胞 I 类抗原表达非常低,且没有 II 类抗原的表达^[18-20]。但是越来越多的证据表明,当 ESCs 定向分化为某个细胞系时,这种特性也将丧失。特别是当分化成为 NPCs 之后,高表达的 MHC I 将引起自然杀伤(natural killer, NK)细胞的攻击^[21]。这项研究同时发现,类似环孢霉素 A 和地塞米松这样的普通免疫抑制剂不能阻止这一过程。正是由于 ESCs 可能招致的排斥反应,难以回避的伦理问题,且存在致癌风险,使其在临床上的应用难以实现。

干细胞培育效率:要实现干细胞移植治疗 SCI 向临床过渡,需要获得足够的可供移植的干细胞。这意味着首先必须解决干细胞培育效率低的问题。这样才能在短时间内获得大量干细胞用于 SCI 患者。相对于体外培育技术,利用生物反应器更能提高培育效率。在生物反应器中,应用悬浮液搅拌技术,可以更高效的获得 ESCs^[22]。而早些时候,在生物反应器中,由计算机操控,将一定比例的氧气注入反应器中,通过调节压力来促进细胞的体外增殖,可更高效获得哺乳动物的 NPCs^[23]。需要注意的是,在这项技术应用于临床之前,必须保证大规模培育出的移植细胞与实验室提纯的小规模细胞特性一致。

干细胞移植促进损伤轴突髓鞘再生,符合 SCI 的病理生理学基础。但干细胞来源受限、伦理问题,存在致癌风险等因素,制约了这项技术的临床应用。直到诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的发现,使解决上述问题变得不再遥不可及。笔者认为,应用 iPSCs 分化而成的 NPCs 治疗 SCI,将满足临床治疗的各方面要求。

3 iPSCs 的定义和特性

2006 年 8 月,日本 Yamanaka 研究小组通过逆转录病毒介导,将 Oct4, Sox2, Klf4 及 c-Myc 4 个基因转入鼠成纤维母细胞,然后根据 Fbx15 的表达对转染后的细胞进行筛选,首次获得了这种具有高分化潜能的干细胞,并将其命名为 iPSCs^[24]。随后 Okita 等^[25]证实,利用 Nanog 的表达进行筛选得到的 iPSCs,与利用 Fbx15 的表达进行筛选获得的 iPSCs 相比,在形态学、表观遗传学、染色质状态、全基因表达谱以及细胞类型特异的分化潜能方面与 ESCs 更为相近,几乎完全相同。2007 年,美国 Thomson 实验室利用慢病毒为载体,通过转染 Oct4, Sox2, Nanog 及 Lin28 4 个基因,将人成纤维母细胞重编程为 iPSCs^[26]。随后,国内外多家实验室利用转基因方法完成了多种类型成体细胞向 iPSCs 的重编程与 iPSCs 向特定

组织类型细胞的再分化研究。2009 年 7 月 Nature 杂志网络版报道,中科院动物研究所周琪领导的研究组和上海交通大学医学院曾凡一领导的研究组共同完成首次利用 iPSCs,通过 4 倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠,在世界上第 1 次证明了 iPSCs 的全能性。最近美国《细胞-干细胞》杂志网络版报道,日本庆应义塾大学研究小组以仙台病毒为载体,向 T 淋巴细胞植入 4 种基因,获得了 iPSCs。经确认这些细胞与利用皮肤细胞制作的 iPSCs 无差异。该技术只需 0.1 ml 血液,减少了采集培养材料时患者的痛苦。并且利用仙台病毒不损伤细胞的基因组信息,获得的 iPSCs 安全性很高。iPSCs 方便的来源,自体无免疫原性的特点,使其成为细胞治疗以及组织器官再生最有前景的种子细胞。

4 iPSCs 治疗神经系统疾病的进展

对人健康组织细胞进行诱导,得到的 iPSCs 处于一种未分化状态^[27]。免疫组化和电生理方法证实,这些细胞在实验环境下,只需加入维甲酸(RA)和 sonic hedgehog(SHH)激活^[19,28],就可以获得运动神经元的特性。这第 1 次证明了 iPSCs 可以转化成具有电生活性的神经细胞。但是无论是 ESCs 还是 iPSCs,都不能直接应用于 SCI,他们的未分化状态和增殖能力就像癌细胞,有巨大的潜在风险^[29]。要解决这个问题,应先将这些细胞进行诱导,分化为需要的显型。比如在 SCI 的治疗中,我们将 ESCs 诱导为 NPC,限制并使其最终分化为 CNS 细胞。如果有更严格需要,还可以将他们诱导分化为神经胶质前体细胞,或者是 OPCs^[4,30]。事先将多能细胞诱导成何种显型,取决于移植的需要^[31]。虽然 iPSCs 分化而成的细胞还没有用于任何 SCI 的模型,但是研究者们已将这些细胞用于其他神经疾病的实验性治疗当中,并进行了大量的实验。Ebert、Dimos、Wernig 和 Soldner 分别在 2008 年和 2009 年通过对特定患者的体细胞进行试验,包括脊髓肌肉萎缩症^[32](SMA)、脊髓侧索硬化症^[33](ALS)和 Parkinson's 病^[34-35],对 iPSCs 分化成为神经细胞的能力进行了评估。

4.1 Parkinson's 病 Parkinson's 病是一种由于黑质纹状体缺乏多巴胺能神经元,导致多巴胺产生不足的一种复杂的神经组织退化性疾病。我们可以在大脑中明确定位缺乏这种特殊细胞的位置。由鼠科动物的成纤维细胞重编程得来的 iPSCs 细胞,通过设定的路径转化为 NPCs,最终可以分化出神经元细胞、星形细胞,少突胶质细胞,这些细胞在体外可以被诱导成为多巴胺能神经元。研究者将 NPCs 植入大鼠的 Parkinson's 疾病模型。这些 NPCs 迁移并分化成为神经元细胞和神经胶质细胞,随后观察到体内多巴胺能神经元数量增加,并与宿主良好结合。大鼠得到了良好的功能恢复^[36]。这是 iPSCs 用于神经再生治疗获得成功的第 1 例研究。

4.2 脊髓肌肉萎缩症 SMA 是一种常染色体隐性遗传疾病,由于运动神经元 I 基因(survival motor neuron I, SMN I)突变,导致相关联的运动神经元变性退化^[37]。Ebert 等^[32]在 2009 年通过对 1 例 SMA 患儿的成纤维细胞重编程,获得了 iPSCs。虽然这些 iPSCs 仍保持了 SMA I 基因型,但是培育过程非常顺利,诱导后得到 NPCs。这些 NPCs 可以分化成为神经元细胞和神经胶质细胞。利用体外诱导分化的方法,将 RA 和 SHH 加入到这种特定疾病 iPSCs 培养环境中,获得了运动神经元。这说明,从遗传神经病患者体细胞获得的 iPSCs,也可以转化为 NPCs。之前曾有人通过体外培养的方式,诱导

ESCs 获得多巴胺能神经细胞^[38-40]。Soldner 等^[35]在 2009 年将 Parkinson's 患者的成纤维细胞重编程获得 iPSCs, 利用同样的方法, 培育成多巴胺能神经细胞。经过观察, 这些细胞与 ESCs 体外培育而成的多巴胺能神经细胞没有明显区别。

4.3 高龄脊髓侧索硬化症 之前普遍的观点认为, 高龄患者的体细胞可能对传统重编程方法不敏感, 不能获得 iPSCs。但最近, 人们利用 1 位 82 岁高龄的家族性遗传 ALS 患者的成纤维细胞, 通过转染重编程技术, 成功获得了 iPSCs^[33]。这些 iPSCs 不仅可以自我更新、分化成 3 个胚层的衍生细胞, 而且通过上述的方法, 同样可以得到神经元细胞、神经胶质细胞和特定的脊髓运动神经元。这些研究显示出 iPSCs 与 ESCs 的相似性, 同时表明, 患者年龄并不是这一方法的限制因素。

上述研究通过对各种特定患者体细胞进行诱导得到 iPSCs, 使人们对 iPSCs 增殖分化的特性有了进一步了解, 更增加了 iPSCs 移植应用于治疗 SCI 的希望。

5 iPSCs 技术现状

iPSCs 与 ESCs 都有致癌风险。值得注意的是, 在 iPSCs 应用于临床之前, 还需要克服其他一些障碍。获得 iPSCs 的传统方法, 是以病毒为载体, 使用致癌基因, 且存在基因错误插入, 造成基因突变的可能。同时, 重编程过程缓慢而相对低效。这些提醒我们, 要想更安全、高效的获得 iPSCs, 必须改进重编程的方法^[25, 41-42]。

5.1 致癌性 研究证明 c-Myc 是一个致癌能力很强的基因, 在诱导多能细胞之后, 能自发的激活, 导致肿瘤的形成^[25]。除此之外, 其余传统的重编程因子也都具有致癌性。最近的研究表明^[43], 在重编程成纤维细胞的过程中, c-Myc 主要影响重编程的速度和效率, 而不是必须的因子。不使用 c-Myc 也可以获得 iPSCs, 只是效率很低。2007 年美国 Thomson 实验室利用 Oct4, Sox2, Nanog 及 Lin28 4 个基因, 将人成纤维母细胞重编程获得 iPSCs^[26], 但是后来发现用来代替 Klf4 与 c-Myc 的 Nanog 和 Lin28 也是不安全的, 因为 Nanog 在造血干细胞中的表达可造成 T 细胞异常^[44]。Lin28 与形成肿瘤无关, 可在获取 iPSCs 的过程中又不是必需的。于是研究者们开始考虑移除某些不需要的因子, 用其他因子、或者其他物质来代替重编程因子的作用。人们发现在诱导过程中, 靶细胞的状态不同, 对重编程因子的需要也不同, 如果靶细胞是初始状态, 那么单独应用 Oct4 就可以从鼠科动物的神经干细胞获得稳定的 iPSCs 系^[45]。化合物也可以替代某些重编程因子, 比如丙戊酸-组胺脱乙酰基酶抑制剂, 利用这种组蛋白甲基转移酶抑制剂, 只需 Oct4 和 Klf4 两种因子就可以重编程大鼠的成纤维细胞, 获得 iPSCs^[46]。

5.2 转染系统 在转染的过程中, 无论怎样减少重编程因子的数量, 都不能完全消除因基因错误插入而引发突变的风险。另外, 出于安全的考虑, 利用病毒传递基因还不能应用于人类。因此, 人们尝试寻找一种既不需要病毒传递基因, 又不会产生突变的方法。最近, 研究者发现了一种不需要病毒的转染系统, 被作为载体用于携带重编程因子, 对人类和大鼠的成纤维细胞进行诱导。用 1 个转位子携带 4 个经典的重编程因子 (Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc) 对细胞进行重编程^[47]。在获得稳定的 iPSCs 之后, 将转位子及其携带的转录因子不留痕迹的切除, 这样就可以消除外来基因的致癌风险和潜在的其他风险^[48]。根据相似的理念, 2009 年 Soldner 和 Sommer 分别利用

慢病毒干细胞盒子系统为载体, 携带 4 种重编程因子, 对特定细胞进行诱导后, 用一种重组酶来切除病毒^[35, 49]。人们现在可以在不使用染色体组插入的情况下, 对人类成纤维细胞进行转染。整个过程中, 用 oriP/EBNA1 连续引导重编程因子, 随后再用药物将他们提取出来^[50]。利用重组蛋白获得 iPSCs 的诱导过程, 也可以满足条件, 研究人员用聚精氨酸蛋白与 Oct4, Sox2, Klf4, 和 c-Myc 蛋白的 C 末端融合后, 携带他们对老鼠的胚胎成纤维细胞进行重编程^[51], 既不使用病毒为载体, 又避免了基因错误插入的可能。

5.3 培育效率 在获得 iPSCs 的效率方面, 通过药物筛查鉴定, 已经确认许多小分子物质可以提高重编程因子的诱导效率。比如, RG108 和 AZA, DNA 转甲基酶抑制剂^[41, 46, 52]。这些小分子物质通常做外在修饰, 而像钙通道兴奋剂 BayK8644^[52], 地塞米松^[47]这类化合物, 主要是改进重编程的过程。应用药物筛查技术, 有希望发现更多的能改进 iPSCs 培育技术的化合物。使我们可能找到完全利用小分子物质进行重编程的方法。最近, 日本的研究人员将 iPSCs 和 ESCs 分别植入实验用老鼠胚胎中, 尝试能否使其发育成健全的身体各组织。结果发现, 植入 ESCs 的胚胎发育成的全身组织一切正常。但是, 植入 iPSCs 的胚胎, 很多都在中途停止发育。这是因为位于 iPSCs 第 12 号染色体特定领域内的基因群没有发挥作用。虽然目前还没有弄清这一基因群的具体功能。但是这提示我们, 如果在人类 iPSCs 第 12 号染色体特定区域内的基因群发挥作用, 也许会取得更理想的效果^[53]。这可能是解决诱导效率低问题的突破口。

6 利用 iPSCs 修复 SCI 的应用前景及需要解决的问题

对 ESCs 来说, 致癌性是阻碍它应用于移植治疗的障碍之一。在对 ESCs 进行诱导, 分化成 NPCs 之后, 需要在未分化的 ESCs 中提纯出 NPCs, 因为即使只有一个具备分化潜能的细胞进入患者体内, 都有产生肿瘤的可能。而 iPSCs 由于在重编程的过程中, 利用了致癌基因, 存在基因突变的可能, 保持甚至超过了 ESCs 的致癌能力。如果能明确重编程获得 iPSCs 的机制, 也许很快就能找到完全没有致癌风险的基因和安全性更高的载体。尽管这些问题目前还没有得到彻底的解决, 但是相对于其他来源的干细胞, 无论是从来源还是特性上看, iPSCs 都具有更大的优势。iPSCs 的来源更广泛, 容易获得; 避开了困扰 ESCs 应用的伦理问题; 由体细胞和 ESCs 分化而来的 NPCs, 存在免疫排斥的问题, 而 iPSCs 获于特定患者, 具有患者特异甚至疾病特异性, 无免疫原性。上述这些特点, 决定了 iPSCs 必然成为在细胞水平上再生医学最有前景的研究目标。

患者发生 SCI 后, 治疗模式应该是从特定的 SCI 患者体细胞获得 iPSCs, 再转化为 NPCs, 通过移植最终整合于 CNS, 以此来促进患者的功能恢复。在这项技术应用于临床之前, 必须先将其用于 SCI 的疾病模型中, 对其安全性及移植效果做进一步的评估。同时, 在细胞获得和培育技术方面, 应充分提高效率, 做到完美无缺, 以保证临床治疗中, 在治疗时间窗内, 高效的对 SCI 患者体细胞进行诱导, 培育出足够可供移植的 iPSCs。最近, FDA 已经批准了将由 ESCs 分化得来的 OPCs 应用于 SCI 治疗的第一阶段临床试验^[54], 虽然这项试验由于志愿者的原因而暂停, 但这是多能细胞迈向临床应用的至关重要的一步。iPSCs 技术的快速发展和它巨大的应用潜力, 已经

引起了科学界的极大关注。既然 iPSCs 在许多方面优于 ESCs, 那么毋庸置疑, 临床上利用 iPSCs 治疗 SCI 将在可预见的未来得以实现。

参考文献

- [1] 王忠诚. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2005:951-958.
Wang ZC. Wangzhongcheng Neurosurgery[M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2005, 951-958. Chinese.
- [2] Fehlings MG, Tator CH, Linden RD. The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow[J]. *Electroen Clin Neuro*, 1989, 74(4):241-259.
- [3] Blight AR. Axonal physiology of chronic spinal cord injury in the cat; intracellular recording in vitro[J]. *Neuroscience*, 1983, 10(4):1471-1486.
- [4] Bunge RP, Puckett WR, Baccera JL, et al. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination[J]. *Adv Neurol*, 1993, 59:75-89.
- [5] Li YQ, Guo YP, Jay V, et al. Time course of radiation - induced apoptosis in the adult rat spinal cord[J]. *Radiother Oncol*, 1996, 39(1):35-42.
- [6] Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(3):1190-1198.
- [7] Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(19):4694-4705.
- [8] Karimi - Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(13):3377-3389.
- [9] Totoiu MO, Keirstead HS. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination[J]. *J Comp Neurol*, 2005, 486(4):373-383.
- [10] Stangel M, Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis[J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 68(5):361-376.
- [11] Eftekharpour E, Karimi-Abdolrezaee S, Fehlings MG. Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury[J]. *Neurosurg Focus*, 2008, 24(3-4):E19.
- [12] 王岩峰, 吕刚, 赵宇, 等. 神经干细胞移植促进脊髓损伤后脑源性神经营养因子的表达[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(11):836-838.
Wang YF, Lü G, Zhao Y, et al. Neural stem cells transplantation promote the expressions of brain derived neurotrophic factor after the spinal cord injury of rats[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2008, 21(11):836-838. Chinese with abstract in English.
- [13] Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells[J]. *Neuron*, 1994, 13(5):1071-1082.
- [14] Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(23):7599-7609.
- [15] van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells[J]. *Science*, 2000, 287(5457):1439-1441.
- [16] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391):1145-1147.
- [17] Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, et al. Human embryonic stem cell - derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in Parkinsonian rats[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1):55-63.
- [18] Drukker M, Katz G, Urbach A, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15):9864-9869.
- [19] Li L, Baroja ML, Majumdar A, et al. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(4):448-456.
- [20] Grinnemo KH, Kumagai - Braesch M, Månsson - Broberg A, et al. Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings[J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(5):712-724.
- [21] Preynat-Seauve O, de Rham C, Tirefort D, et al. Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogeneic T and natural killer cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9B):3556-3569.
- [22] Krawetz R, Taiani JT, Liu S, et al. Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred-suspension bioreactors[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(4):573-582.
- [23] Gilbertson JA, Sen A, Behie LA, et al. Scaled - up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(4):783-792.
- [24] 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.
- [25] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151):313-317.
- [26] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858):1917-1920.
- [27] Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4):806-811.
- [28] Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(2):215-221.
- [29] Pucéat M, Ballis A. Embryonic stem cells: from bench to bedside[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(3):337-339.
- [30] Smukler SR, Runciman SB, Xu S, et al. Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences[J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(1):79-90.
- [31] Wernig M, Benninger F, Schmandt T, et al. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(22):5258-5268.
- [32] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient[J]. *Nature*, 2009, 457(7227):277-280.
- [33] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into

motor neurons[J]. Science, 2008, 321(5893): 1218-1221.

[34] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(1): 10-12.

[35] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors[J]. Cell, 2009, 136(5): 964-977.

[36] 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(15): 5856-5861.

[37] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy - determining gene [J]. Cell, 1995, 80(1): 155-165.

[38] Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(34): 12543-12548.

[39] Roy NS, Cleren C, Singh SK, et al. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes[J]. Nat Med, 2006, 12(11): 1259-1268.

[40] Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, et al. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage[J]. Genes Dev, 2008, 22(2): 152-165.

[41] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. Nature, 2008, 454(7200): 49-55.

[42] Silva J, Smith A. Capturing pluripotency[J]. Cell, 2008, 132(4): 532-536.

[43] 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.

[44] Tanaka Y, Era T, Nishikawa S, et al. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a gamma delta T-cell disorder [J]. Blood, 2007, 110(1): 107-115.

[45] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. Cell, 2009, 136(3): 411-419.

[46] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1269-1275.

[47] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors[J]. Nature, 2009, 458(7239): 771-775.

[48] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggybac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2009, 458(7239): 766-770.

[49] Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette[J]. Stem Cells, 2009, 27(3): 543-549.

[50] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. Science, 2009, 324(5928): 797-801.

[51] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(5): 381-384.

[52] Shi Y, Despons C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(5): 568-574.

[53] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2010, 465(7295): 175-181.

[54] Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3): 213-214.

(收稿日期: 2010-12-24 本文编辑: 王宏)

·读者·作者·编者·

在线浏览《中国骨伤》杂志全文的通知

《中国骨伤》杂志社自 2010 年正式启用稿件远程处理系统以来,读者、作者和编者即可在线 <http://www.zggszz.com> 浏览《中国骨伤》杂志全文。

读者、作者和编者可通过 <http://www.zggszz.com> 注册的 E-mail 和密码登录,在线浏览《中国骨伤》杂志全文。读者需在线充值方可浏览;作者是指自 2011 年第 1 期刊登文章的所有通讯作者可免费在线浏览;编委和特约审稿人可免费在线浏览。

欢迎广大的读者、作者和编者在线浏览《中国骨伤》杂志全文。

《中国骨伤》杂志社