

·综述·

诱导多能干细胞在脊髓与周围神经疾病中的研究进展与前景

王胜群¹ 王 赛² 高忠礼^{1,3}

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)技术是干细胞领域的一门新兴技术,是通过向体细胞中导入特定转录因子,从而诱导体细胞重编程获得未分化的多能细胞的技术,通过这种技术获得的多能细胞有与胚胎干细胞类似的性能和多向分化能力。该技术在2008年被Science杂志评为十大科学突破之首^[1]。

2006年,日本京都大学的Yamanaka^[2]研究小组通过逆转录病毒把Oct4,Sox2,c-myc和Klf4这四种转录因子导入小鼠成纤维细胞内,经过多能性分子Fbx15筛选,得到了与胚胎干细胞极为相似的多能干细胞,并将其命名为iPS细胞。2007年底,美国的Thomson研究小组和日本的Yamanaka研究小组几乎同时发表论文,宣布他们利用人皮肤成纤维细胞培育出了人类iPS细胞。所不同的是,Thomson研究小组应用的技术是利用慢病毒载体引入Oct4,Sox2,Nanog和Lin28这四种转录因子诱导人类皮肤成纤维细胞重编程^[3],而日本Yamanaka研究小组利用的依旧是通过逆转录病毒导入Oct4,Sox2,c-myc和Klf4这四种转录因子^[4]。随后,众多研究小组研究利用不同的方法、不同的体细胞制备iPS细胞的方法,使iPS细胞的获得技术手段日趋成熟,产生效率不断提高,研究成果和技术突破层出不穷。

iPS细胞拥有与胚胎干细胞类似的功能,具有向3胚层不同细胞分化的能力,并且避免了伦理学方面的限制。国内周琪教授与曾凡一教授团队合作利用胚胎四倍体技术证明小鼠iPS细胞可以产生正常小鼠后代,从而证实iPS细胞具有胚胎干细胞几乎一样的全能性^[5]。iPS细胞的获得翻开了干细胞研究的新篇章,在组织工程学、疾病发生机制研究、疾病模型建立、药物研发与评价、再生医学等医学研究领域也拥有重要的应用价值。近年来的研究表明,iPS细胞在血液系统^[6-7]、内分泌系统^[8-10]、心血管系统^[11-12]、神经系统^[13-14]等疾病的治疗方面取得了巨大的进步。本研究将重点介绍在与骨科密切相关的脊髓疾病,以及周围神经疾病方面iPS细胞研究的现状与展望。

1 iPS细胞与脊髓疾病

1.1 脊髓疾病患者来源的iPS细胞建立

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.07.022

1 吉林大学中日联谊医院骨科,吉林长春,130033; 2 温州医学院附属第二医院康复科; 3 通讯作者
作者简介:王胜群,男,医师; 收稿日期:2012-09-11

iPS细胞研究的初衷是达到疾病特异、患者特异的细胞移植治疗的目的。那么疾病患者的体细胞诱导重编程之后会继续表达疾病的相关基因,还是形成正常的iPS细胞呢?为此,国内外学者展开了相关研究。哈佛大学的Kevin Eggan等^[15]将一位患有家族性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的82岁老年女性患者的成纤维细胞诱导重编程成为iPS细胞,即获得了来源于患者细胞的iPS细胞,并且经过证实,这种iPS细胞与人ES细胞相比,在克隆形态、细胞周期、表达特异性表面抗原、表达干细胞标志性基因,以及形成EBs方面基本相同。该实验组进一步将该iPS细胞诱导分化为运动神经元,而运动神经元正是ALS患者脊髓中受到破坏的细胞种类。威斯康辛大学的研究员们从1名患脊髓性肌萎缩的患儿皮肤成纤维细胞也成功获得了iPS细胞,并且能够在体外增殖,能够保持该疾病的基因表型,在体外诱导分化能够形成运动神经元,该神经元与其健康母亲来源的运动神经元相比,在选择性方面存在不足^[16]。这些研究的结果证实,疾病患者的体细胞可以诱导分化产生近乎正常的iPS细胞,但可能在某些方面存在不足,需要进一步进行研究。该类研究可以用于建立疾病特异病理模型,用于研究疾病发生机制,筛查新型药物和研发新疗法。应用来源于患者的细胞制备iPS细胞,为在体外建立疾病特异性、患者特异性和个体特异性的疾病研究系统,以及实现个体化的研究和治疗提供了可能。

1.2 iPS细胞向神经干/组细胞的分化

关于iPS细胞的研究,很多都是依据于ES细胞的一系列研究结果。在体外诱导ES细胞常用的方法是悬浮培养和维甲酸(retinoic acid, RA)相结合进行诱导,可以将其诱导成为神经元样细胞和星形胶质细胞等^[17-18],而在应用RA同时应用阿糖胞苷(Ara-C),可以定向诱导ES分化为神经元样细胞^[19]。目前国内有学者研究了利用RA和无血清培养基诱导的方法,将人iPS细胞诱导分化为神经干细胞(NCSs),应用倒置显微镜观察细胞形态、RT-PCR检测标志物(NANOG、OCT4、SOX2)表达、免疫组化检测Nestin、SOX2、 β -Tubulin和GFAP表达的方法证实诱导分化成功^[20]。该研究组还应用实时荧光定量PCR法研究了iPS向NCSs分化过程中相关

mircoRNA 的表达变化,发现分化过程中, mir-34a、mir-9、mir-200b 均明显升高,证实这几种 mircoRNA 在 iPS 向 NCSs 分化过程中其重要作用^[21]。盛国庆等^[22]通过运用单层贴壁无血清培养系统(一种用于诱导胚胎干细胞细胞进行神经分化的实验系统),将小鼠脑膜来源的 iPS 细胞 C5 在体外诱导分化成为神经前体细胞,并且进一步分化出三类中枢神经系统细胞,包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。因此,诱导 iPS 细胞分化为神经干/祖细胞的技术已经存在并日趋成熟,为今后进一步研究 iPS 细胞治疗 SCI 提供了便利。

1.3 应用 iPS 治疗 SCI 的发展现状

目前,iPS 细胞尚处于实验研究阶段,未应用于临床。实验研究中,绝大多数应用的实验动物是小鼠。Osahiko 等^[23-24]应用 RA 诱导将 iPS 细胞分化形成的细胞球,然后将其移植入 NOD/SCID 小鼠脑内,观察是否形成畸胎瘤来筛选安全的 iPS 细胞。之后将安全的 iPS 细胞分化的细胞球移植入脊髓损伤小鼠的脊髓,观察到能够形成有电生理功能的神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞。并且,将安全的 iPS 细胞分化的细胞球移植后 9 天,观察到其分化为完整的 3 个神经细胞系统,而且没有形成畸胎瘤或者其他肿瘤。它们还参加了髓鞘再生和诱导宿主 5HT+纤维的神经轴突再生,促进脊髓功能的恢复。该研究证实,iPS 细胞诱导的神经干/祖细胞对于干细胞移植治疗 SCI 有很大的意义。研究 iPS 细胞治疗 SCI 的研究远远少于 iPS 细胞应用于脑部疾病的研究,但后者的研究方案可以参考、借鉴。

2 iPS 与周围神经疾病

关于 iPS 细胞治疗周围神经疾病的报道较少,目前大部分研究集中在 ES 细胞等治疗周围神经疾病上^[25-28]。Wang 等^[29]将 iPS 细胞核 ES 细胞诱导分化为神经嵴干细胞(neural crest stem cells, NCSCs),然后应用组织工程技术将其制成纳米纤维管支架,用来做大鼠坐骨神经吻合的支架。电生理检查可见 1 个月后神经加速再生,组织学分析表明有轴突髓鞘形成,并且 NCSCs 分化为施旺细胞并集合成轴突髓鞘;1 年后体内仍无畸胎瘤形成,证明其安全性良好。通过该研究证实 iPS 细胞来源的 NCSCs 可以被直接应用于组织工程学,用做治疗外周神经损伤的支架。有研究证实^[23-30],初级神经球容易向神经分化,而二级神经球容易分化为胶质细胞。以前的研究证实^[31-32],施旺细胞对于外周神经的再生起着至关重要的作用,因此 Uemura 等^[33]将 iPS 诱导生成的容易分化为施旺细胞的二级神经球,与多聚合物[外层由聚乳酸 PLA 组成的多纤维网,内层由 50% 聚乳酸(poly lactic acid, PLA)和 50% 聚己内酯组成海绵状]管结合,构造组织工程学细胞移植支架治疗大鼠坐骨神经缺损,证实其功能恢复、轴突再生并且施旺细胞大量生成。这些实验都证实 iPS 细胞经过诱

导后可以应用组织工程技术治疗神经缺损,为周围神经的支架治疗开辟了新的有前景的道路。

3 iPS 细胞应用于治疗的安全性及效率

3.1 安全性

3.1.1 成瘤性问题:许多学者的研究表明,最初诱导体细胞重编程的因子中,c-myc 具有一定的致癌性,能导致肿瘤形成^[34]。因此,学者们致力于通过减少或者改变因子寻求解决成瘤性的问题,并取得了一定的成果。Nakagawa 等^[35]和 Wernig 等^[36]研究只用 Oct4、Sox2 和 Klf4 三种因子诱导体细胞重编程,并且获得了成功,在一定程度上减少了成瘤性的问题。之后,越来越多的研究发现,在应用某些化合物的情况下,可以进一步减少外源性细胞因子,仍然可以成功的将体细胞诱导重编程为 iPS 细胞,例如 Sridharan 等^[37]研究发现,在重编程过程中如果使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂(VPA)时,可以只应用 Oct4 和 Sox2 两种因子来达到重编程的目的。Shi 等^[38]的研究也证实,在应用一种组蛋白甲基转移酶抑制剂(BIX-01294)的情况下,可以只用 Oct4 和 Klf4 两种因子完成重编程。在本文综述的研究中,大部分研究考虑了 iPS 细胞的成瘤性问题并给予了研究和解决^[23-24,30,39]。进一步研究证实,细胞因子应用的类型与细胞来源类型有关,在将神经干细胞诱导为 iPS 细胞时,可以只应用一种细胞因子 OCT3/4 也能够获得成功^[40]。但是,即使只有一种转录因子,在细胞分化过程中也存在潜在的诱导突变的可能性。因此,研究人员竭力研究无需诱变、无需病毒的 iPS 细胞培养方法。例如,一种叫做 piggyBac 的无需病毒的转染系统已经投入应用^[41-42]。在该系统中,一个转座子上包含四种经典的重组因子(Oct4, Sox2, c-myc 和 Klf4),生成稳定的 iPS 细胞系之后,该转座子可以被切除,消除任何可能的转基因复苏可能性。Zhou 等^[43]将重组蛋白应用到 iPS 细胞的诱导方面,使之完全无病毒、无插入。即将聚精氨酸蛋白转导域融合到 Oct4, Sox2, Klf4, 和 c-Myc 的蛋白 c 末端,用来重组小鼠胚胎成纤维细胞。随着减少成瘤性的研究的进一步深入,将来诱导 iPS 细胞形成时成瘤性的问题将得到解决。但在这一问题完全解决之前,研究中都要考虑到如何减少成瘤性,提高安全性的问题。

3.1.2 组织来源与安全性:iPS 细胞能够保留起源组织一定的表观遗传记忆^[44],因此临床应用上可能需要考虑细胞来源问题,患者的体细胞重编程形成的 iPS 细胞是否安全需要试验验证。Miura 等^[24]的研究证实,应用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)、尾部尖端细胞和肝细胞来源的 3 种不同 iPS 细胞,都可以在体外和体内形成 3 类中枢神经系统细胞,包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。但是在 3 种来源的细胞中,MEF 来源的 iPS 细胞形成的次级神经球中 Nanog-EGFP 阳性的细胞数量最少,在体内形

成畸胎瘤的比例也最小,与胚胎干细胞形成的次级神经球相近。这些结果表明,iPS细胞分化能力与其来源组织密切相关。Aoi等^[39]通过16周的观察,在MEF细胞来源的iPS细胞植入小鼠体内后未发现畸胎瘤的产生,该结果与ES细胞植入效果一致。这些研究证实,分化较少的MEF细胞重编程产生的iPS细胞更接近于ES细胞。但是,就临床应用来说,来源于胚胎组织的细胞是不可能获得的。Polo等^[40]也报道iPS细胞的起源影响其体外分化,但是进一步研究发现尽管早期传代的iPS细胞保留其起源细胞的表现遗传记忆,但是晚期传代(16代之后)的iPS细胞在分化潜能方面已经没有差异。该研究初步证实,应用成体细胞来源的iPS细胞也可以摆脱细胞来源的影响。但是该结论尚需更多的实验验证。

通过对脊髓疾病患者来源的iPS细胞的成功产生和诱导,能够建立起研究脊髓疾病的新方法。目前的研究证实患者来源的iPS细胞仍存在一定的缺陷,与健康成体来源的iPS细胞并不完全相同^[46]。这可能和该细胞的表现遗传记忆相关。至于是否传代至晚期能够纠正,是否需要进一步修正基因,目前尚无相关报道,也是下一步研究的方向之一。

3.1.3 移植排斥: Zhao等^[45]直接将ES细胞与iPS细胞植入C57BL/6小鼠体内研究其免疫反应,结果证实,与ES细胞相比,小鼠iPS细胞中某些基因过量表达,导致移植入小鼠体内后产生T细胞介导的免疫反应,导致急性排斥反应。但是,其他几位学者的研究证实^[23,30],先将ES细胞及iPS细胞体外诱导分化为神经元/祖细胞,再将其植入小鼠体内,小鼠均未表现出急性排斥反应。这可能在一定程度上证明部分分化的细胞比未分化细胞移植更安全。但是,在iPS细胞技术应用于临床治疗之前,仍有必要检测其安全性。

3.2 效率

效率问题包括将成体细胞诱导重编程为iPS细胞时的效率问题和将iPS细胞诱导分化为体细胞时的效率问题。前者的研究已经很深入进行,包括几种重组因子的用法用量以及一系列药物的研究,一系列的小分子能够提高重组效率和完整性,例如RG108和AZA,以及DNA甲基转移酶抑制剂,都显示出提高效率 and 促进重组完整性的作用^[38,46-47]。在诱导iPS细胞分化方面,Stadtfield等^[48]的研究证实,在不同细胞来源的大部分的小鼠iPS细胞中,染色体12qF1上的Dlk1-Dio3基因群处于静默状态,导致iPS细胞不能完全的像ES细胞一样表达其全能性。有学者应用相同的培养基培养ES细胞和iPS细胞,发现二者的生长周期、分化方向及分化为不同细胞的比例并不完全相同,iPS细胞更容易分化,同样培养条件下,细胞数量更早达到最大值,而且能更早分化^[49]。该研究中应用的DRG-CM诱导剂使iPS细胞更容易分化为运动神经元和感觉神经元,而其他学者报道的应用维甲酸更容易使iPS细胞分化为运动神经元^[15]。因此,研究iPS细胞的更优化

的培养与诱导方案对于进一步研究和应用有重要的意义,对于定向诱导有重要的作用。

4 展望

尽管有的学者已经开始怀疑iPS细胞的研究前景^[50],但是iPS细胞的研究成果在干细胞领域和再生医学领域中仍然具有重要的意义。解决成瘤性问题、表观遗传学问题、移植排斥问题及提高效率,是将来研究iPS细胞需要解决的主要问题。随着研究的深入,iPS细胞重编程以及诱导分化的机制研究的进一步深入,在效率、安全性等方面的问题将一一得到解答,iPS技术将逐步应用于临床,将来在干细胞移植治疗、组织工程学等领域的发展将会具有不可估量的前景。

参考文献

- [1] Vogel G. Breakthrough of the year. Reprogramming Cells[J]. Science, 2008, 322(5909): 1766—1767.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861—872.
- [5] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. Nature, 2009, 461(7260): 86—90.
- [6] Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2009, 460(7251): 53—59.
- [7] Gekas C, Graf T. Induced pluripotent stem cell-derived human platelets: one step closer to the clinic[J]. J Ecp Med, 2010, 207(13): 2781—2784.
- [8] Tateishi K, He J, Taranova O, et al. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2008, 283(46): 31601—31607.
- [9] Maehr R, Chen S, Snitow M, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(37): 15768—15773.
- [10] Zhao Y, Yin X, Qin H, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(5): 475—479.
- [11] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells[J]. Circulation, 2009, 120(5): 408—416.
- [12] Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, et al. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporine-A[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16734.
- [13] Wemig M, Zhao JP, Pruszk 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.

- [14] Soldner F, Hochemeyer 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro[J]. *Dev Biol*, 1995, 168(2):342—357.
- [18] Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons[J]. *Mech Dev*, 1995, (53):275—287.
- [19] Ge J, Guo Y, Wang Z, et al. Preliminary study on in vitro induced differentiation of embryonic stem cells into neurons[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2000, 16(1): 1—6.
- [20] 冯年花, 谢安, 娄远蕾, 等. 人诱导性多能干细胞定向分化为神经干细胞的实验研究[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(12):1263—1267.
- [21] 廖伟, 汪泮, 娄远蕾, 等. 人诱导性多能干细胞向神经干细胞分化过程中相关 miRNA 的表达变化[J]. *实验与检验医学*, 2011, 29(1):3—5.
- [22] 许晶, 王皓, 梁涛, 等. 体外诱导脑膜来源的 iPS 细胞形成神经样的细胞[J]. *中国科学通报*, 2011, 56(8):567—572.
- [23] Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010, 107(28):12704—12709.
- [24] Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27:743—745.
- [25] Sun F, Zhou K, Mi WJ, et al. Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(32):8118—8128.
- [26] Liu G, Cheng Y, Guo S, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28 (4):565—572.
- [27] Lin H, Liu F, Zhang C, et al. Characterization of nerve conduits seeded with neurons and Schwann cells derived from hair follicle neural crest stem cells[J]. *Tissue Eng. Part A*, 2011, 17 (13-14):1691—1698.
- [28] Zheng L, Cui HF. Use of chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells for promoting peripheral nerve regeneration[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21 (5): 1713—1720.
- [29] Wang A, Tang Z, Park IH, et al. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (22):5023—5032.
- [30] Kumagai G, Okada Y, Yamane J, et al. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e7706.
- [31] Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, et al. Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration[J]. *J Neurosci*, 1992, 12 (9): 3310—3320.
- [32] Hadlock T, Sundback C, Hunter D, et al. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration[J]. *Tissue Eng*, 2000, 6 (2):119—127.
- [33] Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, et al. Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(1):130—135.
- [34] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151):313—317.
- [35] 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: 101—106.
- [36] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 10—12.
- [37] Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency[J]. *Cell*, 2009, 136: 364—377.
- [38] 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.
- [39] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. *Science*, 2008, 321: 699—702.
- [40] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4 induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. *Cell*, 2009, 136: 411—419.
- [41] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors[J]. *Nature*, 2009, 458(7293): 771—775.
- [42] Wolftjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239):766—770.
- [43] 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.
- [44] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 848—855.
- [45] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 474(7350):212—215.
- [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] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. *Nature*, 2008, 454(7200):49—55.
- [48] 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.
- [49] Kitazawa A, Shimizu N. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia[J]. *N Biotechnol*, 2011, 28(4):326—333.
- [50] Pera MF. The dark side of induced pluripotency[J]. *Nature*, 2011, 471(7336):46—47.