

回顾与展望

周琪 中国科学院动物研究所研究员。《生物工程学报》第三、四届编委。主要从事细胞重编程机制、干细胞与再生医学等研究与转化工作。国际首次获得体细胞克隆大鼠、iPSC 小鼠、单倍体胚胎干细胞来源的转基因小鼠和大鼠，发现并明确证实决定哺乳动物干细胞多能性的关键基因决定簇，建立了包括灵长类动物在内的多种人类疾病动物模型，推动建立了国际干细胞临床标准和临床级胚胎干细胞库等。成果曾入选美国《时代周刊》评选的 2009 年度医学十大突破，本人及 3 项成果先后分别入选中国十大科技新闻人物/中国基础研究十大新闻/两院院士评选的十大科技进展/中国科学十大进展；获得第三届 genOway 国际转基因技术奖、2010 年度何梁何利基金科学与技术进步奖、2014 年度国家自然科学二等奖等奖项。



干细胞与再生医学研究进展

王立宾，祝贺，郝捷，周琪

中国科学院动物研究所 计划生育生殖生物学国家重点实验室，北京 100101

王立宾，祝贺，郝捷，等. 干细胞与再生医学研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(6): 871-879.

Wang LB, Zhu H, Hao J, et al. Progress in stem cells and regenerative medicine. Chin J Biotech, 2015, 31(6): 871-879.

摘要：干细胞具有分化成为体内所有类型细胞的能力，因此，其在再生医学治疗、体外疾病模拟、药物筛选等方面具有广阔的应用前景。干细胞技术在近些年取得了突飞猛进的发展，特别是诱导多能性干细胞的出现使干细胞领域经历了一场巨大的变革。我国干细胞研究在这场干细胞技术变革中取得了多项重大成果，逐渐成为了世界干细胞研究领域中的重要力量。本综述着重介绍近几年来，主要是诱导多能性干细胞技术出现之后，我国在干细胞和再生医学领域取得的重要进展，主要涵盖诱导多能性干细胞、转分化、单倍体干细胞以及基因修饰动物模型和基因治疗等方面。

关键词：干细胞，诱导多能性干细胞，转分化，单倍体干细胞，CRISPR/Cas9

Received: January 1, 2015; **Accepted:** January 26, 2015

Supported by: International S&T Cooperation Program of China (ISTCP) (No. 2013DFG30680).

Corresponding author: Qi Zhou. Tel: +86-10-64807858; Fax: +86-10-64807306; E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn

国家国际科技合作专项 (No. 2013DFG30680) 资助。

网络出版时间: 2015-03-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150313.1035.001.html>

Progress in stem cells and regenerative medicine

Libin Wang, He Zhu, Jie Hao, and Qi Zhou

State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Stem cells have the ability to differentiate into all types of cells in the body and therefore have great application potential in regenerative medicine, *in vitro* disease modelling and drug screening. In recent years, stem cell technology has made great progress, and induced pluripotent stem cell technology revolutionizes the whole stem cell field. At the same time, stem cell research in our country has also achieved great progress and becomes an indispensable power in the worldwide stem cell research field. This review mainly focuses on the research progress in stem cells and regenerative medicine in our country since the advent of induced pluripotent stem cell technology, including induced pluripotent stem cells, transdifferentiation, haploid stem cells, and new gene editing tools.

Keywords: stem cells, induced pluripotent stem cells, transdifferentiation, haploid stem cells, CRISPR/Cas9

干细胞是一类具有自我更新和多向分化能力的细胞,包括从体内胚胎分离获得的胚胎干细胞和体外诱导获得的多能性干细胞,以及成体干细胞。干细胞是进行细胞多能性维持机理研究、体细胞重编程机制研究和疾病发病机制研究等基础研究的重要研究对象。同时,干细胞也作为遗传性疾病治疗药物筛选、体外器官构建的“种子”细胞,在疾病治疗和再生医学治疗中具有重要价值。近些年,我国科学家在干细胞领域的很多方面都取得了很大的进展,特别是在诱导多能性干细胞与重编程、转分化、单倍体干细胞、成体干细胞与生物材料的结合、基因修饰动物模型及基因治疗等方面尤其突出。我国科学家做出的这些有世界影响力的工作极大地推进了国际干细胞的研究,也为我国在干细胞研究中赢得了话语权,使我国向干细胞研究强国迈进。

1 诱导多能性干细胞

2006年,山中伸弥研究组首先发现用4个

转录因子 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc* 即可将体细胞重编程为多能性干细胞,即诱导多能性干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1]。诱导多能性干细胞有效地解决了胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs) 所面临的伦理争议和免疫排斥的问题,为干细胞研究打开了一扇新的门。但是 iPSCs 出现以后一直无法像胚胎干细胞那样通过四倍体补偿得到发育的个体,因此 iPSCs 能否通过多能性的金标准,发育为体内所有类型的细胞成为领域内极具挑战性的问题。为了回答这一问题,我国科学家通过建立新的诱导培养体系,成功通过四倍体补偿技术获得了 iPSC 小鼠及其后代^[2-3]。这项工作充分证明了 iPSCs 的发育全能性,为 iPSCs 的临床和基础研究铺平了道路。但是,并不是所有的 iPSCs 都具有完全的发育潜能,只有一小部分可以通过四倍体补偿获得 iPSC 小鼠,那么不同发育潜能的 iPSCs 是不是存在一些差异呢?我国科学家通过在分子水平上比较不同发育潜能的 iPSCs,在世界上首次发现发育能力较低的

iPSCs 的 *Dlk1-Dio3* 印记基因表达异常, 而具有四倍体发育能力的细胞 *Dlk1-Dio3* 印记区的状态是正常的^[4]。这项工作第一次发现了区分不同发育潜能的 iPSCs 的标志, 对于我们研究人的多能性干细胞的发育潜能具有极其重要的参考价值, 成为了国际干细胞领域普遍认可的一个标准。iPSCs 的诱导效率低下一直是限制 iPSCs 应用的一个重要因素, 我国科学家发现维生素 C 可以显著提高 iPS 诱导效率, 并通过一系列工作揭示了它是如何通过修饰表观遗传状态来影响重编程^[5-7]。在我国科学家工作的基础上, 有研究组发现维生素 C 的作用不只限于提高重编程的效率, 对于重编程获得的 iPSCs 质量也有很大的影响, 添加维生素 C 可以有效地提高 iPSCs 的发育能力, 维持 iPSCs 印记的稳定^[8], 因此, 维生素 C 对于重编程中的效率和质量都是极其重要的。除了维生素 C 之外还有很多提高重编程效率的小分子相继被发现, 很多小分子可以在一定程度上替代某些重编程的转录因子, 用小分子来减少或者完全替代转录因子的使用不但可以提高 iPSCs 的安全性, 而且对于未来 iPSCs 的标准化应用都是具有极大价值的。虽然很多小分子可以有效提高重编程效率并可以替代某些转录因子, 但是直到 2013 年, 我国科学家才通过 7 个小分子的组合完全替代了转录因子将小鼠的体细胞诱导成了多能性干细胞, 并且形成的多能性干细胞具有较高的发育能力^[9]。同时, 该研究组在重编程机制研究中发现分化相关的转录因子可以替代多能性转录因子来诱导体细胞重编程, 并提出了成体细胞向多能性干细胞转化的分子调控模型^[10]。我国科学家以诱导多能性干细胞为工具发现了很多重编程的

机制, 同时也在以往工作的基础上进一步发展了这项技术, 推进了这项技术尽快走向临床。

2 转分化

在多能性转录因子的诱导下体细胞可以重编程为多能性干细胞, 而在某些组织特异性的转录因子的作用下, 一种类型的体细胞可以被直接重编程成为另一种类型的体细胞或者成体干细胞, 这种技术被称为转分化。转分化可以不经过多能性干细胞阶段而将一种相对丰富易得的细胞转变成为一种相对缺少却具有重要功能的细胞, 这样就减少了肿瘤发生的可能性, 同时转分化的时间较短, 对于急需细胞移植的病人来说可能是一种新的选择。转分化最早的研究源于 2002 年, 科学家利用 *MyoD* 将成纤维细胞转化成为成肌细胞^[11]。虽然转分化研究出现较早, 但是在诱导多能性干细胞出现之前这项技术发展缓慢, 在 iPSCs 出现之后, 转分化研究才重新成为了大家关注的重点, 各种类型的转分化研究如雨后春笋一般出现, 其中就有很多我国科学家的贡献。我国科学家首先建立了神经干细胞转分化的技术体系, 成功将中胚层的睾丸支持细胞转分化为神经干细胞, 并且这种神经干细胞在体内和体外可以分化为多种类型的神经细胞^[12], 神经干细胞相对于神经元来说具有增殖能力和多向分化潜能, 因此在临床应用中可能具有更重要的价值。我国科学家在世界上率先将小鼠的成纤维细胞诱导成为了肝细胞, 更加重要的是这种肝细胞移植到肝病小鼠体内之后可以挽救肝病小鼠的生命^[13], 这说明转分化获得的肝细胞在移植之后可以发挥正常肝细胞的部分或者全部功能, 这为未来转

分化的临床应用提供了重要的参考。同样是肝细胞转分化,我国科学家在后续的研究中成功通过转分化获得了肝前体细胞,以及人的肝样细胞^[14-16]。但是,转分化与诱导多能性干细胞一样,需要借助于外源的转录因子实现细胞的命运转换,而外源基因的导入也给转分化获得细胞的安全性带来了潜在威胁,为了解决这一问题,我国科学家通过3个小分子化合物的组合结合低氧条件成功将小鼠以及人的体细胞转分化成为神经前体细胞^[17],这就有效地提高了转分化获得细胞的安全性,为提高转分化研究的安全性提供了重要参考。我国科学家在转分化方面的贡献对于整个转分化领域的前进起到了不可替代的推进作用,为转分化的临床前研究提供了重要参考。

3 成体干细胞与生物材料

成体干细胞是指在已经分化的组织中存在的具有自我更新和多能性的一类细胞,与胚胎干细胞相比具有来源广泛、免疫排斥反应弱、致癌风险低、伦理学争议较少等优势,给再生医学带来了巨大的希望。在细胞治疗领域,成体干细胞有着良好的应用前景,目前应用较成熟的成体干细胞包括造血干细胞和间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)等,由于造血干细胞体外扩增的局限性,近年来MSCs在基础研究和临床应用中得到更多的关注。MSCs存在于多种组织中,并且在组织的损伤修复中起重要作用^[18]。虽然MSCs没有胚胎干细胞分化潜能高,但MSCs具有其独特的优势。第一, MSCs没有伦理因素的限制,可进行自体或异体的移植;第二, MSCs来源广泛,几乎所

有组织内都有间充质干细胞,并且取材时对机体损伤小,研究人员已经从多个物种的多种组织中分离得到MSCs^[19];第三, MSCs具有强大的自分泌和旁分泌功能,可以分泌大量生物活性物质,在组织修复中起到营养支持和免疫调节作用^[20]。MSCs具有的这些优势为其临床应用奠定了基础。因此,对MSCs开展全面深入的基础研究和临床前的疾病动物模型研究十分必要。干细胞临床治疗是否会引起免疫排斥反应是最为重要的问题,我国科学家对间充质干细胞与免疫系统的相互作用进行了系统的研究工作,阐明了间充质干细胞对免疫系统的调节机制,为间充质干细胞的临床应用铺平了道路^[21-22]。在此之后, MSCs在临床应用上已经取得了一些成绩,我国科学家已经开展利用间充质干细胞治疗移植物抗宿主病(GVHD)、再生障碍性贫血(AA)、关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫疾病的研究^[23-24]。除自身免疫疾病之外,也有研究发现, MSCs可以跨胚层分化,具有向内胚层和外胚层分化的能力。我国科学家利用间充质干细胞治疗上皮损伤、肺纤维化、脑瘫、老年痴呆、糖尿病、心血管疾病、肝脏疾病、烧伤和神经损伤等疾病^[25](<http://clinicaltrials.gov/>)。其中已经有一些MSC的临床实验在进行中,如用MSCs治疗I型糖尿病已进入I期、II期临床试验(www.ClinicalTrials.gov (NCT00690066、NCT01068951))。

单独的细胞移植存在组织内细胞活性降低、流失、扩散等问题,较难达到预期的治疗效果。随着生物材料的发展,起初我国科学家用小分子(如bFGF、VEGF)与生物材料结合在动物疾病模型中,取得了很好的治疗效果^[26-27],

之后人们开始将干细胞与生物材料相结合,我国科学家发现将间充质干细胞或小鼠胚胎干细胞与生物材料结合进行 3D 培养时干细胞的多能性优于 2D 环境中的细胞^[28-29],之后我国科学家又尝试了许多干细胞与生物材料相结合的实验。例如,中国科学院遗传与发育研究所将 MSCs 与胶原材料结合移植入脑损伤模型的大鼠中,发现结合材料后细胞能更长久地在组织中发挥更好的修复作用^[30]。但是,当细胞与材料结合时,细胞将面临一种新的环境,而材料本身的性质对细胞有着各种的影响,如 pH、导电性、压力和一些其他的刺激作用^[31]。因此,找寻一种与生理环境最接近、最安全的生物材料,是目前生物材料界所共同努力的方向。总之,我国科学家在再生医学领域占据了举足轻重的地位,推动了间充质干细胞在临床上的应用,相信在不久的将来,我们的科学家定能更加成熟地运用成体干细胞治疗各种疾病。

4 单倍体干细胞

单倍体细胞只有一套染色体,没有等位基因的存在,因此它们在遗传筛选、基因功能研究中具有重要的价值。单倍体在低等生物细菌和真菌中普遍存在,但是在哺乳动物中单倍体只存在于雌雄配子中,而雌雄配子不能在体外长期培养因而限制了它们在遗传筛选方面的应用。在小鼠胚胎干细胞成功建系之后,科学家一直在尝试建立小鼠或者其他物种的单倍体干细胞,但是一直没有取得成功。直到 2011 年,英国科学家通过持续流式分选的方式才获得了可以稳定传代的小鼠单倍体干细胞,并且这些单倍体细胞具有多能性,体内体外可以分化为

各个胚层的组织^[32]。但是这些工作中建立的单倍体干细胞都是孤雌单倍体干细胞,那么小鼠孤雄单倍体是否可以用类似的方式建立起来呢?我国科学家通过显微操作的方式移除了卵细胞的细胞核而将精子注射到卵细胞之后成功建系获得了孤雄来源的小鼠单倍体干细胞,并且非常有意思的是这些单倍体干细胞可以替代精子而使卵细胞受精并发育成为到期存活的小鼠^[33-34],因此这些孤雄单倍体干细胞不光在遗传筛选上有明显的优势,而且可以替代精子迅速得到转基因动物。我国科学家在掌握了单倍体建系和培养的技术之后,迅速将这项技术应用到了其他物种上,相继建立了食蟹猴孤雌单倍体干细胞、大鼠孤雌和孤雄单倍体干细胞,并且证明这些单倍体在进行遗传筛选方面确实有巨大的优势^[35-36],这些工作大大拓展了单倍体干细胞的应用范围,推动了这个领域的快速前进。单倍体干细胞作为一个新兴的领域还存在大量未被解决的问题,我国科学家肯定会在这一领域中作出更多更大的贡献。

5 基因修饰动物模型与基因治疗

新的基因工具的开发对于基因功能的研究以及疾病的再生医学治疗来说都具有重要的意义。近些年,新发展起来的基因编辑技术包括锌指酶、TALENs 和 CRISPR/Cas,其中 CRISPR/Cas 技术因其高效、设计简单、易于操作等优点已经开始替代其他的基因编辑工具,成为现在基因操作的新宠儿^[37]。CRISPR/Cas 本身是一种防御系统,能够保护细菌和古生菌免受病毒的侵害。将 CRISPR/Cas 应用于非细菌细胞中需要满足两个条件,一个是 Cas 酶负责切

割基因组的特定位置,另一个是导向 RNA (gRNA) 负责识别基因组中的特定位置。2013 年,科学家将这一系统应用于哺乳动物的基因组中,成功实现了 CRISPR/Cas 在哺乳动物中的应用^[38-39]。我国科学家在世界上率先通过原核注射的 mRNA 到大鼠受精卵中,成功实现了大鼠中的多基因敲除^[40]。我国科学家还将这项技术成功应用到了白内障小鼠的治疗,在受精卵的时候注射 CRISPR/Cas9 修复了小鼠白内障相关基因 *Crygc* 的突变,让小鼠成功获得了正常的视力^[41]。2014 年,我国科学家利用 CRISPR/Cas9 技术获得了转基因猴子和猪模型的工作又发表在 *Cell* 等刊物^[42-43],这是世界上首次利用 CRISPR/Cas9 技术获得的灵长类动物和大型经济动物基因修饰的模型,在国际同行中引起较大轰动。CRISPR/Cas9 可以在细胞上实现高效的基因打靶,因此,未来结合 CRISPR/Cas9 来修复病人 iPSCs 再进行细胞的分化和移植必将推动 iPSCs 的再生医学应用。

除了在以上这些方面如 DNA 去甲基化的机制研究,将成体干细胞与生物材料结合应用治疗不孕症等等。总之,我国干细胞研究已经成为国际干细胞研究中一股无可替代的力量,并且必将发挥越来越重要的作用。

6 未来展望

干细胞技术经过几十年的发展,其在技术体系上不断出现突破和创新,特别是近些年诱导多能性干细胞技术的出现更为干细胞的基础研究和临床疾病治疗插上了翅膀。来自于多种遗传性疾病(如早衰,镰刀形细胞贫血症和精神分裂症等)的病人的 iPSCs 在体外分化后

可以很好地模拟这些疾病的发生过程^[44-46],使科学家可以在体外观察到这些疾病发生的完整过程,这就为深入了解这些疾病的发病机制,开发相应的治疗性药物提供了很好的参考。这方面的工作现在受到大家越来越多的关注,还有很多未知原因的复杂疾病可以通过疾病特异的 iPSCs 去探究其病因和治疗方案,因此,利用疾病特异的 iPSCs 去研究疾病的机制将持续受到大家的关注。iPSCs 技术之所以受到如此关注的一个重要原因是大家希望有一天可以利用这项技术去治疗人类的疾病,iPSCs 可以作为一种种子细胞被应用到再生医学治疗。

如今干细胞研究已经进入由基础实验研究向临床治疗转化的关键阶段。2011 年,美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准了 Geron 公司利用少突胶质细胞治疗急性脊髓损伤的 GRNOPC1 I 期临床试验;2012 年,加拿大卫生部 (Health Canada) 批准了 Osiris 生产的干细胞药物的上市销售;目前临床研究已经表明 hESCs 分化来的 RPE 细胞能安全有效地治疗 AMD 患者,并且 18 个移植患者中有 13 个得到了视力改善^[47-48],2013 年,日本厚生劳动省的审查委员会批准了利用 iPSCs 开展视网膜再生的临床研究。但是,目前美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 登记的细胞系绝大部分由于未严格满足临床要求而不能应用于临床^[49]。所以干细胞的使用需要经过严格的检验流程,首先,任何干细胞研究的开展都需要获得伦理委员会的批准,干细胞需来源明确,应用于临床前的整个培养过程中应在临床级别的条件下进行,并定期进行内毒素、支原体和人源和动物源性的病

毒等各项安全性检测, 确保干细胞的高纯度、无污染、无致瘤性, 并通过国家相关部门的复核后才能运用于临床试验。同时, 由于需要修复某些遗传性疾病的相关的基因变异, 发展更加安全高效的基因编辑方式也是急需的, 大力发展有关 iPSCs 安全性和有效性的研究必将对再生医学治疗产生积极的影响。

多能性干细胞治疗并不是再生医学治疗的唯一选择, 很多重要的功能细胞已经通过转分化的方式获得, 并且这些细胞在体内外都能够发挥正常的功能, 因此, 利用转分化得到更多的功能性细胞也是再生医学治疗的一项重要选择。同时体内转分化研究获得的细胞证明比体外获得的细胞具有更好的功能, 同时这种细胞也更容易和体内其他细胞建立联系^[50-52], 但是体内转分化面临效率低下, 实验体系不完善, 并且体内定向导入基因比较困难等问题。因此, 如果可以解决这些问题, 那么转分化研究一定会为很多急于进行细胞移植治疗的病人带来福音。

但是与国际先进水平相比, 我国在干细胞的基础研究方面依然很薄弱, 而这一方面也恰恰是现在国际干细胞领域中竞争最激烈的。像重编程机制的深入探索, 干细胞多能性维持网络的完善以及干细胞多向分化能力的挖掘这些方向将在相当长的时间内持续成为干细胞领域的研究热点, 如果我国能够对干细胞领域持续加大投入, 我国必然会在未来干细胞基础研究方向上取得更大的突破。

综上所述, 干细胞研究是当前国际生命科学竞争的热点, 对我国广大人民的再生医学治疗和提升我国医药产业的竞争力都具有重要意

义。目前国际干细胞研究处于发展的早期阶段, 我国面临着空前的机遇, 并且也已经取得了很多重要的成果。但是面对国际干细胞领域的激烈竞争, 我国也面临着空前的挑战, 需要加快发展的步伐, 使我国在这一领域获得更多的话语权, 同时推动干细胞尽快进入临床。为了使我国干细胞临床应用更具规范性和合理性, 我国政府部门也相继制定了干细胞管理制度(《干细胞临床试验研究管理办法》(试行)、《干细胞临床试验研究基地管理办法》(试行)、《干细胞制剂质量控制和临床前研究指导原则》(试行))征求意见稿。我们相信在不久的将来, 随着具体政策的出台, 我国干细胞的临床应用会走上一个全新的时代, 为人民群众的健康事业作出贡献。

REFERENCES

- [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] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90.
- [3] Kang L, Wang JL, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135-138.
- [4] Liu L, Luo GZ, Yang W, et al. Activation of the imprinted *Dkl1-Dio3* region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19483-19490.
- [5] Esteban MA, Wang T, Qin BM, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 71-79.
- [6] Wang T, Chen KS, Zeng XM, et al. The histone demethylases *Jhdm1a/1b* enhance somatic cell

- reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 575–587.
- [7] Chen JK, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1504–1509.
- [8] Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, et al. Ascorbic acid prevents loss of *Dlk1-Dio3* imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet*, 2012, 44(4): 398–405, S1–S2.
- [9] Hou PP, Li YQ, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341(6146): 651–654.
- [10] Shu J, Wu C, Wu YT, et al. Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell*, 2013, 153(5): 963–975.
- [11] Etzion S, Barbash IM, Feinberg MS, et al. Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD *ex vivo*: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation*, 2002, 106(12 Suppl 1): I125–I130.
- [12] Sheng C, Zheng QY, Wu JY, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res*, 2012, 22(1): 208–218.
- [13] Huang PY, He ZY, Ji SY, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 386–389.
- [14] Yu B, He ZY, You P, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(3): 328–340.
- [15] Huang PY, Zhang LD, Gao YM, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 370–384.
- [16] Du YY, Wang JL, Jia J, et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 394–403.
- [17] Cheng L, Hu WX, Qiu BL, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res*, 2014, 24(6): 665–679.
- [18] Wu L, Cai XX, Zhang S, et al. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol*, 2013, 228(5): 938–944.
- [19] Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 709–716.
- [20] Miller RH, Bai L, Lennon DP, et al. The potential of mesenchymal stem cells for neural repair. *Discov Med*, 2010, 9(46): 236–242.
- [21] Xu GW, Zhang YY, Zhang LY, et al. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 745–750.
- [22] Xu GW, Zhang LY, Ren GW, et al. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res*, 2007, 17(3): 240–248.
- [23] Park D, Yang G, Bae DK, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve cognitive function and physical activity in ageing mice. *J Neurosci Res*, 2013, 91(5): 660–670.
- [24] Sun LY, Akiyama K, Zhang HY, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1421–1432.
- [25] Shen Q, Chen B, Xiao Z, et al. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2831–2837.
- [26] Shi Q, Gao W, Han XL, et al. Collagen scaffolds modified with collagen-binding bFGF promotes the neural regeneration in a rat hemisectioned spinal cord injury model. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(2): 232–240.
- [27] Lin NC, Li XA, Song TR, et al. The effect of collagen-binding vascular endothelial growth factor on the remodeling of scarred rat uterus following full-thickness injury. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1801–1807.
- [28] Han SF, Zhao YN, Xiao ZF, et al. The three-dimensional collagen scaffold improves the stemness of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Genet Genomics*, 2012, 39(12): 633–641.
- [29] Wei JS, Han J, Zhao YN, et al. The importance of

- three-dimensional scaffold structure on stemness maintenance of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 2014, 35(27): 7724–7733.
- [30] Guan J, Zhu ZH, Zhao RC, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats. *Biomaterials*, 2013, 34(24): 5937–5946.
- [31] Higuchi A, Ling QD, Chang Y, et al. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem Rev*, 2013, 113(5): 3297–3328.
- [32] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479(7371): 131–134.
- [33] Yang H, Shi LY, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149(3): 605–617.
- [34] Li W, Shuai L, Wan HF, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490(7420): 407–411.
- [35] Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1187–1200.
- [36] Li W, Li X, Li TD, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 404–414.
- [37] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [38] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [39] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [40] Li W, Teng F, Li TD, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684–686.
- [41] Wu YX, Liang D, Wang YH, et al. Correction of a genetic disease in mouse *via* use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659–662.
- [42] Niu YY, Shen B, Cui YQ, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey *via* Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836–843.
- [43] Hai T, Teng F, Guo RF, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372–375.
- [44] Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, et al. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 2011, 472(7342): 221–225.
- [45] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920–1923.
- [46] Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 473(7346): 221–225.
- [47] Schwartz SD, Hubschman JP, Heiwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, 2012, 379(9817): 713–720.
- [48] Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*, 2015, 385(9967): 509–516.
- [49] Jonlin EC. Differing standards for the NIH Stem Cell Registry and FDA approval render most federally funded hESC lines unsuitable for clinical use. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2): 139–140.
- [50] Rouaux C, Arlotta P. Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons *in vivo*. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(2): 214–221.
- [51] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485(7400): 593–598.
- [52] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 2008, 455(7213): 627–632.

(本文责编 陈宏宇)