

诱导性多能干细胞的发展及前景展望

陈晓瑛^{1,2}, 苗向阳¹, 王建民², 谢之景²

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018

摘要 近年来,通过转入特定基因诱导体细胞重编程成为多能干细胞(iPS细胞)的研究成果引起了生命科学领域新的轰动。将完全分化的细胞重编程,不经过胚胎逆转成为多能干细胞状态,这种方法相对容易操作,比较稳定,在生物学基础研究和临床应用方面都具有潜在的实用价值。与胚胎干细胞(ESC)相似,iPS细胞对于生物制药品种的更新和产生等十分有益。iPS细胞的产生对解决长期以来干细胞研究领域的伦理问题和免疫排斥问题具有十分重要的意义。然而,目前iPS技术仍然存在致癌性、效率低、病毒载体欠安全以及移植后存活率低等一系列问题。本文从iPS细胞的发展、获得、存在的问题以及发展前景4个方面进行了介绍。

关键词 体细胞;重编程;诱导多能干细胞;转录;调控

中图分类号 Q813.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)02-0105-04

Progress and Prospect of Induced Pluripotent Stem Cells

CHEN Xiaoying^{1,2}, MIAO Xiangyang¹, WANG Jianmin², XIE Zhijing²

1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

Abstract In the recent development, through transferring special genes, somatic cells can be induced into pluripotent stem cells (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), which has brought a new revolutionary change in life science. Fully differentiated cells can reverse their gene expression profile to that of pluripotent cells, with combined uses of defined factors and small molecules. This method is more convenient to manipulate or operate and is relatively more stable, which has potential values in both the fundamental study of biology and the clinical applications. iPS cells, with characteristics identical to those of Embryonic Stem cells (ESC), could be very useful in regenerative medicine drug discovery, and in other related fields. The generation of iPSCs may solve some problems in stem cells researches, such as ethical dilemma, immunological rejection. In combination with gene therapy and cellular transplantation therapy, the achievements of iPS have been applied to animal disease model treatments. However, there remain many problems to be solved for iPSCs technology itself, such as carcinogenicity, low efficiency of generation, safety of virus as vectors, low survival rate of tissue derived from iPSCs after transplantation. This paper discusses four aspects of iPSCs: generation, development, existing problems and application prospects.

Keywords somatic cells; reprogramming; induced pluripotent stem cells; transcribe; regulation

1996年克隆羊“多莉”的诞生首次实现了体细胞在卵母细胞中的去分化和重编程。细胞核重编程是指已分化的成熟体细胞由分化状态被逆转到一种原始的未分化状态的过程。核移植与胚胎干细胞(Embryonic Stem Cell, ESC)融合以及

多能细胞提取物共培养均能实现细胞的重编程过程,由此可推断卵母细胞的细胞质和ESC中可能存在诱导体细胞核重编程的某些转录因子。但是通过核移植获得干细胞,涉及到胚胎的破坏,有伦理道德的限制。继而科学家们设想从移植

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2008AA10Z140), 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08008-004B, 2008ZX08008-003), 国家自然科学基金资助项目(30571339), 中国农业科学院创新基金资助项目(2004-院-1)

作者简介: 陈晓瑛, 硕士研究生, 研究方向为微生物与免疫及转基因动物, 电子信箱: cnmiaomi@163.com; 苗向阳(通信作者), 研究员, 研究方向为基因工程与功能基因组学及转基因动物, 电子信箱: mxy32@sohu.com

后无生育能力的胚胎中获取干细胞。Niwa 等^[1]从 *Cdx2* 基因(滋养外胚层特有的基因,能干扰 Oct-4 转录调节)敲除胚胎获得了 ESC。这一做法虽然不存在胚胎的破坏,但在伦理道德上仍存在争议。于是科学家们转而寻求不经过胚胎将成熟体细胞重编程,直接逆转为干细胞的新方法。近年来,通过转入特定基因能诱导体细胞重编程成为多能干细胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS 细胞)的研究成果引起了生命科学领域新的轰动。

1 iPS 细胞的发展

2006 年 Takahashi 和 Yamanaka^[2]首次建立了 iPS 细胞系。他们通过逆转录病毒载体将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种与多能性有关的转录因子导入小鼠的成纤维细胞,并利用 Fbx15(一种多能性标志分子)的表达对转染后的细胞进行筛选,得到了一些具有胚胎干细胞某些特性的多能性干细胞——“诱导产生的多能性干细胞”。这些细胞表达 ESC 的特异性标志基因,在免疫缺陷型小鼠皮下注射可以发生源自 3 个胚层的组织畸胎瘤,注射到小鼠囊胚中可以形成嵌合体,但没有获得成活的嵌合体小鼠。不久,另外 3 家实验室也分别用 Nanog 或 Oct4 的内源性表达作为筛选标志诱导出 iPS 细胞,并提高了在形态学、基因表达情况和表观遗传修饰等方面与 ESC 的相似性,且产生了嵌合体小鼠^[3-5],这些 iPS 细胞可以嵌合到小鼠的生殖细胞中。后来两项研究陆续报道了利用形态学作为标准来筛选鉴定 iPS 细胞的方法,证明形态学筛选在建立人类 iPS 细胞的研究中具有潜在的优势^[6-7],并建立了人类的 iPS 细胞系。

自 2008 年开始,小鼠和人的 iPS 细胞研究取得了极大的发展,并在体细胞的选择、转录因子的组合和数量、病毒载体、筛选条件、小分子化合物等方面进行了完善,还逐步向疾病的治疗方面深入。Jaenisch 研究组^[8]用 iPS 细胞来源的造血前体细胞成功治疗镰状红细胞贫血,从理论和实践上为人类单基因遗传病治疗奠定基础。Nagy 研究组和 Kaji 研究组采用转座子法取代病毒介导的基因投递方法高效率制备了 virus-free 鼠 iPS 细胞,获得 iPS 细胞后,又成功将先前导入的转录因子基因从 iPS 细胞中移除^[9-10]。除了小鼠和人的 iPS 细胞,猴、大鼠和猪的 iPS 细胞也成功建立。猴、大鼠和猪 iPS 细胞的建立在人类疾病研究上有重大应用价值,既可构建人类疾病的动物模型,又能进行细胞移植实验,为将来的实施细胞替代治疗奠定基础。猪 iPS 细胞在农业生产中有着重要的应用前景,如构建基因打靶和转基因动物。猴、大鼠和猪 iPS 细胞的建立还证明了不同种类动物之间都存在高度同源和保守的维持发育多潜能性的机制。

中国也紧跟世界潮流,迅速开展 iPS 技术的相关研究工作。2007 年中国科学院广州生物医药与健康研究院华南干细胞与再生医学研究所采用反转录病毒载体导入 4 种基因 *Oct4*、*Sox2*、*Myc* 和 *KLF4*,可将未经遗传修改的小鼠成纤维细胞改造成 iPS 细胞^[11]——相隔一年科研人员就掌握了 iPS 相

关技术。2008 年 10 月,该所将小鼠脑膜(meningeal)细胞诱导为 iPS 细胞^[12]。由 DNA 甲基化分析得知,由脑膜细胞形成的 iPS 克隆不需要经过筛选就能够发生完全的重编程,而且这些克隆能够 100% 产生嵌合小鼠。同年 11 月,发现 p53 siRNA 和 UTF1 这两种因子可提高 iPS 转化率^[13]。同年 12 月,用反转录病毒载体从成熟恒河猴成纤维细胞中获得 iPS 细胞^[14]。2009 年 1 月肖磊研究组^[15]用病毒表达转录因子将大鼠成体细胞成功地重编程到多能干细胞状态,从数百个形态类似胚胎干细胞的细胞克隆中,建立了 22 个类似胚胎干细胞的细胞系。经过进一步筛选、鉴定,最终获得两株符合多能干细胞标准的大鼠 iPS 细胞系。

近期,肖磊等^[16]通过使用转录因子重编程来自猪耳朵和骨髓的细胞,成功培育出诱导多能干细胞。通过一种病毒将这些重编程因子的混合物引入细胞中,使这些细胞发生变化并在实验室中发育成胚胎样干细胞。进一步的测试证明,它们确实有能力分化成胚胎的 3 层(内胚层、中胚层和外胚层)细胞类型——这是所有胚胎干细胞都具有的能力。这意味着科学家继续培育来自猪或其他有蹄类动物胚胎的 ESC 将变得更加容易。中国科学院动物研究所周琪研究组和上海交通大学医学院曾凡一研究组^[17]利用 iPS 细胞,通过四倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠,在世界上首次证明了 iPS 细胞的全能性。

2 iPS 细胞的获得

iPS 细胞制备大体可分为四步:分离培养宿主细胞;将外源基因导入宿主细胞;加入小分子物质(如 Wnt3a、5-AZA、BIX-01294、VPA、TSA、BayK8644、PD0325901 以及 CHIR99021 等)促进重编程;通过细胞形态、基因表达谱、表观遗传学、畸胎瘤形成和体外分化等方面对 ES 样克隆进行鉴定,即分离、导入、培养及鉴定四步。下面仅阐述主要步骤。

2.1 转录因子的选择

体细胞重编程为 iPS 细胞转录因子组合及数量的确定需要根据体细胞种类及自身转录因子表达水平和加入的小分子化合物三方面综合考虑进行优化。

转录因子一般选用 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 组合或 Oct4、Sox2、Klf4 组合。使用小分子化合物可大幅度提高重编程效率和/或减少转录因子使用个数。增加转录因子使用个数,如使用 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28、c-Myc 和 Klf4,也可显著提高重编程效率。神经干细胞或前体细胞本身高表达 Sox2、c-Myc 和 Klf4,当在培养液中加入小分子化合物 BIX 或 PD0325901 与 CHIR99021,只有 Oct4 和 Klf4 两种基因,甚至只用 Oct4 1 个基因,就可显著提高重编程效率。小鼠成熟 B 细胞需要导入 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 C/EBP 等至少 5 种基因才能诱导成 iPS 细胞,而加入 5-AZA 之后,只用前 4 种因子亦成功诱导为 iPS 细胞。

2.2 基因导入方式

将成熟的体细胞重编程为 iPS 细胞,转录因子的导入主

要通过逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和转座子介导。研究发现,当通过逆转录病毒将转录因子基因导入体细胞之后,内源性转录因子基因被激活且维持很高的表达水平,而外源性基因表达水平很低甚至完全沉默,iPS 细胞多潜能性主要是靠内源性转录因子的表达来维持的。

最近,Stadtfield 等^[18]利用腺病毒作为载体转运转录因子成功获得无病毒整合的 iPS(Adeno-iPS)细胞。用腺病毒作为载体转运转录因子虽然实现了转录因子的短暂性表达,改变了以往永久性整合的模式,但仍不能获得更加安全高效的 iPS 细胞。Okita 等^[19]采用 2 种质粒分别携带 Oct4、Sox2、Klf4 3 种转录因子和 c-myc 转录因子共转染人或小鼠的体细胞并使之诱导成为 iPS 细胞,经过检测并无质粒整合入 iPS 细胞基因组中,获得了在基因组水平无转录因子整合的 iPS 细胞。Frank^[20]等采用带有 loxp-Cre 系统的病毒载体诱导 iPS,此系统可将整合到 iPS 基因组中的 4 种外源转录因子及病毒基因成分完全剔除,因而获得了完全没有病毒基因组的来源于 Parkinson 患者成纤维细胞的 iPS;使用含有转座子系统的病毒载体也成功获得了完全没有病毒基因组的来源于人胚胎成纤维细胞的 iPS。这些无病毒基因组成分的 iPS 诱导成功为其临床应用奠定了基础。

2.3 iPS 细胞的筛选鉴定

细胞的多能性包括两个基本的方面,一是强大的自我更新能力,二是向其他细胞分化的潜能。评价 iPS 细胞是多能性的标准很多,可通过形态学标准及其标志分子的鉴定、生长发育潜能以及表现遗传学特征等。Yamanaka 等^[21]选择 *Fbx15* 作为标志基因,其基本方法是通过同源重组将 β -geo 序列(融合的 β -半乳糖苷酶基因和新霉素抗性基因)插入到小鼠的 *Fbx15* 序列中,当多能性基因成功导入后,*Fbx15* 即被激活时,细胞即能产生 G418 抗性从而筛选出具有 ESC 某些特征的 iPS 细胞。但筛选出来的细胞无法产生嵌合小鼠,在基因表达模式和 DNA 甲基化模式上都与 ESC 有不同之处。分析其原因可能是筛选策略不佳导致细胞的重编程不完全。

基于上述问题,Yamanaka^[21]、Maherali^[22]和 Wernig^[23]等提出,想得到具备更多 ESC 特性的 iPS 细胞系,应选用对多能性更为关键的基因作为报告基因。他们建立了具有抗性受内源性 Nanog 或 Oct-4 表达的调控的小鼠成纤维细胞筛选并建立了稳定的 iPS 细胞系。用这种方法得到的细胞系有与 ESC 极为相似的特性。实验比较发现,利用 Oct4 选出的抗性细胞比利用 Nanog 选出的细胞在数量上虽然少,但 ESC 的特性更多。由于导入报告基因会带来一系列问题,Maherali 等^[22]提出仅依靠形态学筛选建立 iPS 细胞系的方法并通过形态学标准建立了小鼠的 iPS 细胞系。随后 Yamanaka 实验室和 Thomson 实验室也应用形态学标准成功地诱导出了人的 iPS 细胞系。

除了筛选方式,筛选时间对 iPS 细胞的产生也有较大的影响。Yamanaka 研究组^[21]是在导入基因 3d 之后就开始筛选的。为研究不同筛选时间对转录因子表达的影响,研究者选用了不同的时间,发现抗性细胞集落在数量上与筛选时间成

正比。由此推断细胞重编程进而产生多能性是渐变的。多能性基因的激活也与时间有关。Wernig^[23]等实验发现小鼠成纤维细胞的重编程在被转染后的 2~4 周内完成,其标志是碱性磷酸酶、SSEA1 和 Nanog 的表达。对于 iPS 细胞最为严格的检验标准是通过四倍体胚胎互补或 4~8 细胞胚胎注射而形成完全来源于 iPS 细胞成活后代。

3 iPS 细胞存在的问题

实验证明,iPS 细胞功能几乎和 ESC 一样,表达 ESC 的各种表面标记,可分化为各种组织细胞。但还有很多问题有待解决。

c-Myc 和 Klf4 属于致癌因子,用病毒作为载体,可能使致癌因子整合到受体基因组内,引发基因突变产生高致癌性的 iPS 细胞。研究人员尝试推迟筛选时间、使用腺病毒反复转染以及用小分子物质或融合蛋白代替致癌因子等方法来应对这一问题。使用这些方法产生的 iPS 细胞在一定时间内无肿瘤的产生,但其稳定性还需进一步验证。

iPS 细胞产生的效率较低,重组率只有 0.1% 左右。究其原因可能是 Oct-4 在胃或肠内的表达阻止了原始细胞的分化或者其他在维持多能性中起重要作用的多聚蛋白以及染色体组的修饰因子 ISWI 和 Brg1 被插入的逆转录病毒激活。转录因子表达的数量和模式也可能影响到 iPS 细胞的诱导。

基因治疗安全性问题早在 1999 年一位患有鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症的病人因为对腺病毒强烈反应而死亡就引起了人们的关注^[24]。2002 年利用基因疗法首次成功地治疗了与 X 染色体相关的严重联合免疫缺陷症^[25],但是由于逆转录病毒整合到 LMO2 内在基因的位点上导致 10 个接受治疗的病人中有 2 个出现了 T 细胞白血病。另外病毒作为载体也可能导致一些癌基因的激活已及某些重要基因受阻,从而出现安全性问题。

来源于多能干细胞的组织在移植后的存活率很低。如 Takagi 等^[26]使用猴子的 ES 细胞治疗 Parkinson 疾病的动物模型中发现,移植后 14 周只有 1% 的细胞存活。多种 ESC 分化的组织细胞如肝实质细胞、心肌细胞和胰腺细胞在移植后存活率都很低。临床应用要求移植后产生的组织存活较长时间,由此 iPS 细胞在临床应用上将面临类似的问题。另外 iPS 细胞的基因表达模式与 ESC 还存在一些不同导致其组织功效也存在某些问题。

4 iPS 细胞的发展前景

ESC 一直是生殖生物学界和医学界研究的热点,但其研究涉及到胚胎、生命权利等一系列伦理、宗教问题,受到很大的制约。iPS 细胞具有与 ESC 相似的生物学特性和应用前景,但 iPS 细胞由分化的体细胞改造而成,由病人自身细胞诱导产生,不涉及伦理问题,不存在的免疫排斥问题,因此具有更加广阔的应用前景。

很多研究小组都在开展诱导 iPS 分化为特定类型细胞的

研究工作。Hanna 等^[27]从人源化的镰刀型贫血病 $h\beta^s/h\beta^s$ 小鼠模型上获取成纤维细胞,诱导建立了 iPS 细胞,然后通过导入正常人的 $h\beta^A$ 基因,得到了具有正常 β^A 基因的 iPS 细胞并诱导分化为具有正常功能的造血前体细胞。这是首次利用 iPS 细胞进行的人类疾病治疗研究,随后 iPS 细胞在动物疾病模型上的应用逐步开展。Dimos 等^[28]利用来自患有肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)的老年病人的皮肤成纤维细胞重编程得到 iPS 细胞,并诱导分化为可以治疗 ALS 的运动神经元。Chamberlain 等^[29]将 iPS 成功分化为神经元细胞,Tateishi 等^[30]成功诱导 iPS 分化为可分泌胰岛素的胰岛样细胞。美国研究者^[31]报导诱导出的 iPS 细胞分化成的神经细胞改善了帕金森小鼠的运动功能。这些研究为某些疾病的细胞替代治疗带来了希望。iPS 细胞在再生医学、临床医学、组织工程和药理学等方面都有极大的应用价值,必将成为生命医学领域的一个重要研究方向。

参考文献 (References)

- [1] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation [J]. *Cell*, 2005, 123(5): 917-929.
- [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] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317.
- [4] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70.
- [5] Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state [J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-324.
- [6] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells [J]. *Nat Bio-technol*, 2007, 25(10): 1177-1181.
- [7] Qin D, Li W, Zhang J, *et al.* Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4 [J]. *Cell Res*, 2007, 17(11): 959-962.
- [8] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-1923.
- [9] 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.
- [10] Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.
- [11] Qin D, Li W, Zhang J, *et al.* Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4[J]. *Cell Res*, 2007, 17: 959-962.
- [12] Wang Z, Pei D. Aromatic residues in the C-terminal domain 2 are required for nanog to mediate LIF-independent self-renewal of mouse embryonic stem cells[J]. *Biol Chem*, 2008, 283: 4480-4489.
- [13] 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.
- [14] Liu H, Zhu J, Yong P, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587-90.
- [15] Liao J, Cui C, Chen S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-15.
- [16] Wu Z, Chen J, Ren J, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2009, 1: 46-54.
- [17] Zhao X Y, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90.
- [18] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 945-949.
- [19] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors [J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [20] 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.
- [21] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317.
- [22] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70.
- [23] Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state [J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-324.
- [24] Raper S E, Chirmule N, Lee F S, *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80(1-2): 148-158.
- [25] Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, *et al.* Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(16): 1185-1193.
- [26] Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, *et al.* Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a parkinson primatamodel[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 102-109.
- [27] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. *Science*, 2007, 318: 1920-1923.
- [28] Dimos J T, Rodolfa K T, Eggan K, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with also can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
- [29] Chamberlain S J, Li X J, Lalande M. Induced Pluripotent Stem (iPS) cells as *in vitro* models of human neurogenetic disorders [J]. *Neurogenetics*, 2008, 9(4): 227-235.
- [30] Tateishi K, He J, Zhang Y, *et al.* Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31601-31607.
- [31] 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): 964-77.

(责任编辑 王芷)