

· 综 述 ·

临床毒理学研究的新视角 ——人类胚胎干细胞向造血细胞定向分化的研究及进展

朱明霞, 赵金垣*

(北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100191)

摘要: 对人类胚胎干细胞向造血细胞定向分化的研究动向做了简要的介绍, 从血液系统入手, 弄清各阶段造血细胞对化学物质的敏感性可能是探索化学损伤的具体分子机制的最佳切入点, 不仅为毒理学研究提供了新的探索视角, 更逐渐成为临床毒理学研究的前沿阵地。

关键词: 人类胚胎干细胞; 造血细胞; 临床毒理学

中图分类号: R994.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)04-0271-04

A new prospect of clinical toxicology——hematopoietic cells derived from human embryonic stem cells

ZHU Ming-xia ZHAO Jin-yuan*

(The Occupational Medicine Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191)

Abstract: The research trends that human embryonic stem cells are induced to differentiate into hematopoietic cells were briefly reviewed in this paper. We began with hematological system and understood sensitivities of hematopoietic cells at every stage treated with chemicals. This may be a best breakthrough point about studying molecule mechanism of chemical injury which not only provides a new prospect of toxicology but also gradually becomes a new frontier in clinical toxicology.

Key words: Human embryonic stem cells; Hematopoietic cells; Clinical toxicology

随着环境污染不断加剧和新化学物质不断增加, 化学性损伤已逐渐突显为新世纪人类健康、生存和繁衍的巨大威胁。近四五十年以来, 各种恶性肿瘤、免疫性疾病、新生的不明疾病(如艾滋病、非典型肺炎、禽流感、甲型 H1N1 流感)以及不育、畸胎、早产等疾患不断增加, 血液系统的恶性病变更呈明显的上升趋势。探索化学损伤的具体分子机制, 选择从血液系统入手, 弄清各阶段造血细胞对化学物质的敏感性, 可能是破解此难题的最佳切入点, 它不仅为毒理学提供了新的探索视角, 近年更逐渐成为临床毒理学研究的前沿阵地。本文拟就开展此项研究的关键问题——人类胚胎干细胞向造血细胞定向分化的研究动向作一简述。

1 干细胞概述

干细胞按来源可分为胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和成体干细胞 (adult stem cells, ASCs) 两大类, 均具有自我更新和多向分化的潜能, 因而具有重要的生物学和医学意义。人们利用干细胞这一分化特性, 通过体外扩增和定向诱导, 可以生成大量的造血干/祖细胞用于实验研究, 在临床上还可用作移植供体, 治疗各种恶性疾病, 如白血病等。

造血干细胞是较早研究的成体干细胞之一, 它来源于造血组织, 是生成各种血细胞的原始细胞。在造血发育过程中, 按照分化成熟程度, 血细胞可分为造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs)、造血祖细胞 (hemopoietic progenitor, 造

血前体细胞 (hematopoietic precursor cells) 和功能性血细胞 (functional hemocytes)。造血干细胞在一定的微环境和某些因子调节下, 可以分化产生各类血细胞的造血祖细胞, 是最原始的血细胞; HSC移植也是目前临床应用最广的细胞治疗的手段, 正常人骨髓、外周血和脐带血是移植的主要来源。但由于约 2/3 的患者缺乏合适的相匹配的供体, 故使 HSC移植受到很大限制。此外, 分离方法复杂、体外增殖能力有限等因素也限制了它的临床应用。

1998年, Thomson等建立了人胚胎干细胞系 (human embryonic stem cells, hESCs)^[1], 从此 hESC向 HSC和功能性血细胞分化的研究工作也相继展开, 以 hESCs为启动细胞的造血干细胞工程不仅为临床应用, 如干细胞移植等, 也为研究造血细胞的早期发育分化机制, 探讨化学损伤机制, 包括探索化学物质所致血液系统恶性肿瘤的分子机制提供了最佳工具。

2 人类胚胎干细胞向造血细胞的定向分化

小鼠 ESC的定向分化研究为 hESC向造血细胞分化奠定了可行性基础^[2~4], 但由于人类和小鼠在干细胞发育的调控方面存在明显的差异, 其成果并不能直接用于指导 hESC的分化研究, 迫使研究者把更多的精力投入到 hESCs的分化研究中。目前将 hESC在体外诱导分化为造血细胞的常用方法主要有两种: 一种是拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 分化诱导法^[5~12]; 另一种是 ESCs与造血基质细胞共培养法^[15~19]。

2.1 拟胚体分化诱导法

这一方法是将未分化的 hESC接种在含甲基纤维素的半固体培养液中, hESC可自发形成 EBs, 加入生长因子骨形态

收稿日期: 2009-05-06

作者简介: 朱明霞 (1977-), 女, 博士, 主要从事化学中毒的分子机制研究。

*、通讯作者, 教授, 博士生导师, Email: zhaojinyuan@sina.com

蛋白 (BMP-4) 和造血细胞因子如干细胞因子 (SCF)、荚菜 3 配基 (Flt3 Ligand)、血小板生成素 (TPO)、白细胞介素 (IL-3、IL-6)、红细胞生成素 (EPO)、粒系集落刺激因子 (G-CSF), 则可定向生成各系造血细胞集落。Chadwick 等首先用此方法将 hESC 诱导分化为红系和粒系细胞, 而且认为诱导的前 10 天是 EB 向造血前体细胞的分化阶段, 第 10~15 天以后才开始向造血各系细胞定向分化^[5]。Zhan 等研究表明, hESC 也可定向分化为淋巴细胞、单核巨噬细胞和自然杀伤细胞, 大约有 25% 的淋巴细胞能表达特异性的 II 型组织相容性抗原; 这种细胞还具有抗原递呈和使同种异基因的 CD4/8 淋巴细胞做出免疫应答的能力, 从而进一步证实了人胚胎干细胞具有诱导分化为各系造血细胞的潜能^[6]。

用 EB 模型诱导 hESC 向造血细胞分化的研究大多需要 BMP4 和其他一些造血生长因子的共同作用, 而 Chadwick 等认为, BMP-4 只是在 ESC 源的造血祖细胞自我更新中发挥作用^[3]; Bonde 等也认为 BMP-4 对 ESC 的造血分化的促进作用是短暂的, 而 HOXB4 (homeobox B4) 的长期表达则能促进 ESC 源造血祖细胞的自我更新^[9]。近年更有研究表明, 人胚胎干细胞分化为造血细胞并不完全依赖于 BMP-4。如 Srivastava 等为了研究早期造血的分子机制, 将 hESC 形成的 EB 分成不同的组别, 并加入不同的细胞因子进行诱导分化, 至诱导分化的第 8 天可观察到, 各组均有明显的造血集落出现, RT-PCR 和 western blot 结果显示有血小板生成素受体 (c-mpl) 和血管内皮生长因子受体的表达^[7]。对 EB 源的造血祖细胞进行免疫组化染色进一步显示, 加入干细胞生长因子 (SCF)、荚菜 3 配基 (Flt3L) 和血小板生成素 (TPO) 以及血管内皮生长因子 (VEGF) 组表达 CD34 细胞阳性数最多。这项研究表明, 可能是 c-mpl 激活了早期造血发生的信号通路, 对造血祖细胞的存活和扩增有积极作用, 而 VEGF 似能协同促进这一机制, 证实了 hESC 向造血系的分化可以不依赖于 BMP4 的假设。最近 Zhang P 等指出, BMP4 对 hESC 向中胚层诱导的作用需要内源性成纤维生长因子 (FGF) 和转化生长因子 (TGF β) /Nodal/activin 信号的激活; 短时的 BMP-4 处理 (24 h) 仅够启动中胚层的诱导, 长期的 BMP-4 处理 (直至分化的第 7 天) 方能诱导滋养层和胚外内胚层的分化^[11]。

近年来的研究还证实, 通过 EB 模型可以诱导 hESC 在体外分化为具有成熟功能的血细胞, 为 ESC 源的造血细胞的临床应用开辟了新途径。Lu 等用 EB 诱导分化法证实了源于 hESC 的造血细胞能分化为成熟的红细胞; 对 EB 源的细胞进行 FACS 分析、血红蛋白功能检测和血型鉴定, 结果显示细胞浆中富含血红蛋白, 超过 65% 的细胞表达胎儿血红蛋白 (HbF)。该研究还发现诱导分化的 hESC 源红细胞的氧离曲线与成体红细胞的氧离曲线很相似或仅轻度右移, 在生理条件和 pH 值较高时, hESC 源红细胞显示有 Bohr 效应, 低 pH 值时则变化较小, 2,3-DPG 减少时 hESC 源红细胞的反应也明显低于对照组。虽然这些细胞主要表达胎儿和胚胎球蛋白, 但是它们在体外进一步成熟后也具有表达成体 β 球蛋白的能力。PCR 和球蛋白链特异性免疫荧光检测结果表明, 体外培

养后, hESC 源红细胞表达 β 球蛋白增加、形态逐渐减小、糖蛋白 A 表达增加, 染色质和细胞核也浓缩挤压, 超过 60% 的细胞转变为成熟的红细胞 (直径在 6~8 μ m)。上述结果清楚表明, 将 hESC 大规模分化为成熟的、具有携氧功能的红细胞是可行的^[8]。Saeiki 等则建立了一种全新的造血分化方案, 即不经流式技术分选, 直接贴壁诱导出成熟的中性粒细胞, 它们可表达髓系吞噬细胞的特异性标志物 CD33 和 CD11b 髓过氧化物酶、中性粒细胞碱性磷酸酶染色阳性, 表达中性粒细胞特异性表面标志物 CD66b、CD16b 和 GPI80。这些 hESC 源的中性粒细胞还具有较强的趋化能力、吞噬能力和呼吸爆发能力^[12]。

2.2 人胚胎干细胞与基质细胞共培养法

将 hESC 与造血基质细胞共培养, 可诱导其向造血细胞的分化。一般使用的基质细胞为卵黄囊、胎肝和骨髓来源的贴壁层基质细胞。这些基质成分对胚胎和成体造血至关重要^[13,14], 因这些基质细胞可分泌多种细胞生长因子, 并表达多种与 HSC 相互作用且调控 HSC 分化、发育的分子, 从而可诱导 ESC 分化为 HSC, 并进一步成熟为红细胞、粒系细胞或淋巴细胞等。Kaufman 等首次报道将 hESC 与小鼠骨髓基质细胞系 S17 和卵黄囊内皮细胞系 C166 共培养, 在只加入胎牛血清而无任何外源性细胞因子存在的情况下, 获得了表达 CD34、TAL-1、IMO-2、GATA-2 等转录因子的造血前体细胞; 然后在造血生长因子的作用下, 这些细胞在甲基纤维素半固体培养基中先形成各血细胞系集落, 并按先后顺序依次分化为红系、髓系和巨核系细胞, 与体内造血细胞发育的时序性和阶段性十分一致^[15]。Tan 等人将 hESC 与基质细胞在间接接触的培养体系中诱导, 同样能使 ESC 分化为造血细胞。由此认为, 直接接触培养并非是定向诱导造血细胞所必须, 但是直接接触培养可使造血集落形成的数量明显增多, 提示直接接触培养可能只是有利于造血祖细胞存活^[16]。

不同的基质细胞对造血的诱导作用是有差别的, Vodyanik 等比较了 OP9、S17、MS5 三种基质细胞对 hESC 的造血诱导作用, 结果发现, OP9 的诱导效率远远高于其他两种饲养层。以 OP9 为基质细胞的另一优势是, 富集诱导后的 CD34⁺ 细胞再与支持淋巴发育的基质细胞 MS5 共培养后, 可进一步诱导分化为淋巴细胞^[17]。

共培养法也能诱导出功能上较成熟的血细胞, Ma 等人将 hESC 和小鼠胎肝源的基质细胞共培养, 模拟胚胎造血的微环境, 高效地产生了造血祖细胞, 还进一步诱导出表达糖蛋白 (GPA) 的红细胞; 这些 hESC 源的红细胞功能上和胎儿 RBC 相似, 能携带氧, 并具有较强的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性, 为 ESC 源造血细胞的应用奠定了良好的基础^[9]。

由此可见, 两种诱导方法都证实了 hESC 能够在体外分化为造血细胞, 且造血细胞分化的时序性与其在体内的发育相一致。EB 分化诱导法的优点是能模拟体内胚胎发育的过程, 重演卵黄囊造血, 故 ESC/EB 体系是分析早期胚胎造血发育和调节可靠的并且可以重复的模型^[17]。曾有文献报道认为其不支持淋巴细胞的增殖, 主要原因可能是此方法不能提

供淋巴细胞发育的微环境。令人欣喜的是,新近已有用 EBs 分化法将 hESC 诱导为 T 淋巴细胞的报道^[21]。但是用这种方法不易获得造血干细胞,诱导后的细胞大部分是终末细胞,且共培养诱导的方法因需使用动物源性的基质细胞,故也容易造成分化细胞的异源污染,因此,探索新的分化诱导方法至关重要。

今年年初 Li 等首先将 hESC 自发分化形成 EBs,然后对 EBs 加入 BMP-4 处理,最后采用细胞因子法、人胎肝基质细胞法和联合使用人胎肝基质细胞与胎肝细胞提取物法,对 EBs 进行培养。结果表明,3 种不同的诱导方法均能诱导 hESC 向造血细胞分化,但联合使用人胎肝基质细胞与胎肝细胞提取物产生的细胞造血基因的表达量明显高于其他组,接种于半固体培养基中可获得更多的造血集落。作者认为这种在较短的时间内获得较高的分化效率与胎肝微环境含有多种促进造血发育的细胞因子有关,从而建立了一种不需要添加昂贵的细胞因子、无异源性污染的高效的造血诱导体系,该技术具有美好前景,为临床应用打开了崭新的局面^[22]。

3 ESC 源造血细胞的临床应用

许多文献显示,人 ESC 定向分化为造血细胞的具体指标为造血相关基因和表面分化抗原的表达,以及体外集落形成实验。由于将来用于临床治疗的细胞,实际上主要是造血干细胞和造血祖细胞,因此,对于检测从 hESC 细胞诱导而来的造血干/祖细胞最具使用价值的指标,应是体内能否实现造血重建。目前已发展了数种动物模型来评价造血细胞的长期造血重建能力,最可靠的是绵羊子宫内胎羊移植系统。该系统是在胎羊免疫系统发育前,于子宫内将人造血细胞移植入绵羊的胚胎中,在胎羊出生后通过追踪体内人造血细胞以及不同细胞系的分布,来判断移植的人造血细胞是否具有长期重建多系造血的能力。这一系统不仅能进行长期观察(达数年),而且可以进行次级受体的移植研究^[23-24]。另一重要检测模型是由 Dick 等发展的重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠或 NOD/SCID 小鼠移植检测法;同子宫内胎羊移植系统相比,SCID 小鼠移植在操作上要容易得多,但它对于检测人造血干细胞活性尚存在局限性。例如,这些小鼠多在 12 个月内死亡,使得长期观察以及次级移植实验等均有一定难度;另外,在 NOD/SCID 小鼠体内,人造血细胞向淋巴系的分化也受到一定影响。由于这些限制,移植入小鼠体内这种外源性造血细胞应被称为“SCID 小鼠再增殖细胞(SCID repopulating cell SRC)”,而不能完全视同于造血干细胞^[25-26]。Tan 等人使用这一方法,报道了 hESC 与基质细胞 St7 共培养后诱导生成的造血细胞能够重建造血系统,无畸胎瘤形成,且受宿主免疫系统的调节,证实了诱导生成的造血细胞不仅能重现胎儿期造血过程,而且能重建成体造血系统^[27]。

尽管在造血生长因子的刺激及基质细胞存在的情况下,ESC 可以向造血细胞分化,但是离临床应用仍然还有相当的距离。令人鼓舞的是,最近已有多篇报道证实 ESC 源的造血细胞在体外能分化为成熟的血细胞,如红细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等,从而为镰状细胞贫血病、白血病等严重血液

疾病的治疗展示了新的希望。

4 存在问题和应用前景

尽管目前已建立了多种不同的诱导体系,但人 ESC 向造血诱导分化体系的研究仍处于起步阶段,以下问题可能是今后需要尽快攻克的重点。(1) ESC 定向诱导分化为造血细胞的效率尚需进一步提高;(2)由 ESC 分化来的造血干/祖细胞在体内重建造血系统后,能否进一步分化成为具有功能的粒细胞、红细胞、淋巴细胞等成熟血细胞仍需进一步探索。

这两大问题的关键是尽可能模拟出体内造血生成的环境。在造血发育过程中,造血组织经过卵黄囊、胎肝及骨髓等不同的造血发育阶段,同时造血干细胞本身也经过了分化、迁移和成熟的过程,提示模拟过程具有相当难度。卵黄囊和胎肝作为造血发育形成过程的最重要阶段,从卵黄囊、胎肝中分离的基质细胞可分泌多种造血生长因子并具有支持造血干细胞增殖分化的特性,因此,建立和培养上述造血组织的基质细胞,模拟接近体内造血系统发育微环境的人工体系,完善 ESC 向造血细胞分化的技术平台,将是未来重要的工作方向。

此外,胚胎干细胞还涉及到宗教伦理学问题,故一直是公众争议的热点。近年来,日本和美国的研究者对此领域的发展作出了巨大努力,他们分别利用小鼠和人的成体细胞,将之成功地诱导为多潜能的类胚胎干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC),不仅解决了伦理问题,而且为干细胞的研究提供了几乎无限的细胞来源^[28-31]。这一事件无疑是干细胞研究领域的划时代里程碑。最近,又有研究表明,用镰状细胞贫血患者皮肤成纤维细胞重组获得的 iPSC 能分化为造血祖细胞;再移植至放射线照射过的镰状细胞贫血受体动物,可使其产生高水平的人血红蛋白,该种疾病的病理过程亦得到纠正^[32]。这一研究为镰状细胞贫血和其他血液病的基因替代疗法奠定了重要的理论基础。

尽管在基础和临床其他领域,干细胞的应用研究已经逐渐展开,并开始崭露头角,但对临床毒理学而言,干细胞的研究平台还刚刚开始搭建,研究工作刚刚起步,尤其是直接使用人胚胎干细胞开展临床毒理学研究,更是一种学术上的跨越,因为 hESC 诱导分化的研究至今仍是一个充满挑战的领域,体系分化的细致调控机制仍亟待澄清。相信随着研究的不断深入,这些问题将会逐步得到解决,胚胎干细胞终将成为探索临床各类疾病,包括化学性损伤发病机制和根本治疗的一个最佳平台,从而又一次带给临床医学以革命性的推动。

参考文献:

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282 (5391): 1145-1147.
- [2] Lieber JG, Webb S, Stratt B T, et al. The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells [J]. Blood, 2004, 103 (3): 852-859.
- [3] Schmitt TM, de Boer RF, Gronski MA, et al. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic

- stem cells differentiated in vitro [J]. *Nat Immunol* 2004 5 (4): 410-417.
- [4] Carotta S, Pilat S, Maihofer A et al. Directed differentiation and mass cultivation of pure erythroid progenitors from mouse embryonic stem cells [J]. *Blood* 2004 104 (6): 1873-1880.
- [5] Chadwick K, Wang L, Li L et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cell [J]. *Blood* 2003 102 (3): 906-915.
- [6] Zhan X, Dravid G, Ye Z et al. Functional antigen-presenting leukocytes derived from human embryonic stem cells in vitro [J]. *Lancet* 2004 364 (9429): 163-171.
- [7] Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells [J]. *Blood* 2004 103 (7): 2504-2512.
- [8] Lu S J, Feng Q, Park J S et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells [J]. *Blood* 2008 112 (12): 4475-4484.
- [9] Bonde S, Dowden A M, Chan K M et al. HOXB4 but not BMP4 confers self-renewal properties to ES-derived hematopoietic progenitor cells [J]. *Transplantation* 2008 86 (12): 1803-1809.
- [10] Srivastava A S, Nedelcu E, Esmaili-Azad B et al. Thrombopoietin enhances generation of CD34+ cells from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells* 2007 25 (6): 1456-1461.
- [11] Zhang P, Li J, Tan Z et al. BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells [J]. *Blood* 2008 111 (4): 1933-1941.
- [12] Sakai K, Sakai K, Nakahara M et al. A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells* 2009 27 (1): 59-67.
- [13] Allen T D. Hemopoietic microenvironments in vitro: ultrastructural aspects [J]. *Ciba Found Symp* 1981 84: 38-67.
- [14] Rafii S, Mohle R, Shapiro F et al. Regulation of hemapoiesis by microvascular endothelium [J]. *Leuk Lymphoma* 1997 27 (5-6): 375-386.
- [15] Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 98 (19): 10716-10721.
- [16] Tian X, Morris J K, Lindehan J L et al. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hemapoiesis from human embryonic stem cells [J]. *Exp Hematol* 2004 32 (10): 1000-1009.
- [17] Vodyanik M A, Bork J A, Thomson J A et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential [J]. *Blood* 2005 105 (2): 617-626.
- [18] Vodyanik M A, Thomson J A, Slukvin I I. Leukosia in (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures [J]. *Blood* 2006 108 (6): 2095-2105.
- [19] Ma F, Ebihara Y, Umeda K et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hemapoiesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 105 (35): 13087-13092.
- [20] Dahl L, Richter K, Heggund A C et al. Lhx2 expression promotes self-renewal of a distinct multipotential hematopoietic progenitor cell in embryonic stem cell-derived embryoid bodies [J]. *PLoS one* 2008 3 (4): e2025.
- [21] Gajic Z, Kitchen S G, Subramanian A et al. Generation of T lineage cells from human embryonic stem cells in a feeder-free system [J]. *Stem Cells* 2009 27 (1): 100-107.
- [22] Liu Y X, Ji L, Yue W et al. Cells extract from fetal liver promotes the hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Cloning Stem Cells* 2009 Feb 16 [Epub ahead of Print].
- [23] Zanjani E D, Almeida-Porada G, Flake A W. The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hemapoiesis [J]. *Int J Hematol* 1996 63 (3): 179-192.
- [24] Nan Yan A D, Chase J L, Lewis R L et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients [J]. *Blood* 2005 107 (5): 2180-2183.
- [25] Dick J E. Normal and leukemic human stem cells assayed SCID mice [J]. *Sem in Immunol* 1996 8 (4): 197-206.
- [26] Cashman J D, Lapidot T, Wang J C et al. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hemapoiesis from immunodeficient mice [J]. *Blood* 1997 89 (12): 4307-4316.
- [27] Tian X, Woll P S, Morris J K et al. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity [J]. *Stem Cells* 2006 24 (5): 1370-1380.
- [28] Takahashi K, Yamanaka S. Induced of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell* 2006 126: 663-676.
- [29] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cells from human somatic cells [J]. *Science* 2007 318 (5858): 1917-1920.
- [30] Aoi T, Yae K, Nakagawa M et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells [J]. *Science* 2008 321 (5889): 699-702.
- [31] 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.
- [32] Townes T M. Gene replacement therapy for sickle cell disease and other blood disorders [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 193-196.

作者须知

论文分类号: 为从期刊文献的学科属性实现族性检索, 并为文章的分类统计创造条件, 凡具有文献标识码的文章均应标识分类号。

论文分类号应按最新版《中国图书馆分类法》标注。一篇文章如果涉及多学科, 在主分类号之后还可以标注 1~3 个相关学科的分类号, 多个分类号之间以分号分隔。分类号前应以“中图分类号”作为标识。