

真性红细胞增多症诱导性多能干细胞株的建立

汪文君 邢文白 洁 刘淑平 许静 纪光臻 袁卫平 张孝兵
程涛 周圆* 杨逢春

(中国医学科学院北京协和医学院, 血液学研究所血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 干细胞医学中心, 天津 300020)

摘要 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)技术在疾病研究和临床应用上具有广阔的前景。 $JAK2^{V617F}$ 是骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN), 如真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)患者携带的一种重要突变。该研究采用非整合型质粒重编程携带 $JAK2^{V617F}$ 突变的PV患者外周血来源的单个核细胞, 诱导生成携带 $JAK2^{V617F}$ 突变的iPSC。结果表明, 通过这种途径形成的iPSC系可稳定传代, 多能性基因表达水平与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)类似, 可稳定地在体内分化形成三胚层结构并携带不同负荷的 $JAK2^{V617F}$ 突变。这为研究 $JAK2^{V617F}$ 在PV中的发病机制、药物筛选开发及基因靶向治疗提供了一个重要的实验模型。

关键词 诱导多能干细胞; 重编程; 真性红细胞增多症; $JAK2^{V617F}$

Establishment of iPSC Lines from A Polycythemia Vera Patient

Wang Wenjun, Xing Wen, Bai Jie, Liu Shuping, Xu Jing, Ji Guangzhen, Yuan Weiping, Zhang Xiaobing, Cheng Tao, Zhou Yuan*, Yang Fengchun

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Center for Stem Cell Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Induced pluripotent stem cell technology provides great advantages in basic medical research and clinical application. $JAK2^{V617F}$ is the predominant mutation in myeloproliferative neoplasms (MPN), such as polycythemia vera (PV). In this study, we used episomal vectors to generate induced pluripotent stem cell (iPSC) from a PV patient carrying the $JAK2^{V617F}$ mutation. The result showed that the iPSC lines we established were stable and could be passaged repeatedly. The expression levels of pluripotent genes were similar to those of ES cells. In addition, these iPSCs carried different allele burdens of $JAK2^{V617F}$ mutation and were able to form teratomas *in vivo*. Modeling PV with these iPSC lines will provide a new approach to study the pathogenesis as well as to screen of the compounds targeting $JAK2^{V617F}$ for clinical therapy.

Keywords induced pluripotent stem cell (iPSC); reprogramming; polycythemia vera (PV); $JAK2^{V617F}$

真性红细胞增多症(polycythemia vera, PV)是一种造血干细胞的克隆性疾病, 为骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)的一种类型, 主

要以红细胞增殖异常为特点, 常伴白细胞和血小板增加。因其血容量增加和血黏度增高, 故临床上常表现为高血压、肝脾肿大、皮肤紫红等症状^[1]。PV

收稿日期: 2015-01-18 接受日期: 2015-03-19

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2013CB966902、2015CB964902)、国家自然科学基金(批准号: 81370610、81170512、81328003)和天津市应用基础研究重点项目(批准号: 13JCZDJC31200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909194, E-mail: yuanzhou@ihcams.ac.cn

Received: January 18, 2015 Accepted: March 19, 2015

This work was supported by the the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2013CB966902, 2015CB964902), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81370610, 81170512, 81328003) and the Key Basic Research Foundation of Tianjin (Grant No.13JCZDJC31200)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909194, E-mail: yuanzhou@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2015-04-23 15:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150423.1540.007.html>

进展期可向骨髓纤维化或急性白血病转化。2005年,首次发现*JAK2*酪氨酸激酶突变(*JAK2*^{V617F})与红系异常增殖有关^[2],并证实JAK/STAT这一信号通路在BCR-ABL阴性的骨髓增殖性疾病(包括红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性骨髓纤维化)中发挥重要作用^[3-5]。有研究表明,作为MPN的典型疾病之一,超过90%的PV患者存在*JAK2*^{V617F}突变^[6-7]。

2006年,诱导性多功能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)技术的出现打破了全能性细胞临床应用的细胞来源和伦理限制性,为疾病的发生和发展机制的探索提供了新视角,同时也为新药筛选及自体移植细胞治疗带来了新的希望^[8-9]。

本研究采用无基因整合的附加体质粒(episomal)诱导重编程的方法^[10-12],重编程携带*JAK2*^{V617F}突变的PV患者外周血来源的单个核细胞,成功地诱导建立携带*JAK2*^{V617F}突变(纯合或杂合)的iPSC系。这一模型的建立为研究*JAK2*^{V617F}在PV中的发病机制、临床药物筛选开发及基因靶向治疗提供了重要的实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

ICR孕鼠、NOD/SCID免疫缺陷小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于SPF级无菌室内,饮水、饲料及垫料均经过高压灭菌。小鼠胚胎发育时间按检查到阴栓的中午为0.5 d起算。

1.2 材料及试剂

PV患者外周血取自中国医学科学院血液病医院,患者签署知情同意书。Ficoll-Paque Premium为美国GE Healthcare Life Sciences公司产品;IMDM(Iscove's Modified Dubecco's Medium)、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、F12K nutrient mixture培养基、KnockOut™ DMEM/F12培养基、Essential 8培养基、胎牛血清(FBS)、Knockout血清替代物(knockout serum replacement, KSR)、胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺添加剂(insulin-transferrin-selenium supplement X, ITS-X)、Chemically defined lipid concentration(CD)、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、2-巯基乙醇、青/链霉素、EDTA、0.25%胰酶-EDTA均为美国Life Technologies公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、抗坏血酸(Vc)、丝裂霉素C、1-硫代甘油(mTG)、地塞米松、丁酸钠(NaB)、转铁蛋白(transferrin)、丝裂霉素C均购自美国Sigma公

司;基质胶(Matrigel™ solution)购自美国BD公司;1%明胶(Gelatin)购自美国Stem Cell公司;SCF、b-FGF、IL-3、TPO、EPO、IGF-1、G-CSF、FLT-3 Ligand购自美国PeproTech公司;Human CD34⁺ Cell Nucleofactor KIT购自美国Lonza公司;Extract-N-Amp™ Blood PCR Kits购自美国Sigma公司;抗人TRA 1-60小鼠IgM抗体购自美国Millipore公司;抗人OCT4的兔IgG多克隆抗体、抗人NANOG的兔IgG多克隆抗体、抗人SSEA-4的小鼠单克隆抗体购自美国Stemgent公司。PCR产物由北京天一辉远公司进行纯化测序。

1.3 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离及培养

用PBS等体积稀释PV患者外周血标本后,用Ficoll-Paque Premium(1.077 g/mL)密度梯度离心,分离得到PBMC。随后采用含50% F12K nutrient mixture、50% IMDM、mTG(200 μmol/mL)、抗坏血酸(100 μg/mL)、BSA(5 mg/mL)、CD(1×)、ITS-X(1×)、L-谷氨酰胺(4 mmol/L)、转铁蛋白(100 ng/mL)、地塞米松(1 μmol/L)、SCF(100 ng/mL)、IGF-1(50 ng/mL)、IL-3(20 ng/mL)、EPO(2 U/mL)的培养基培养14 d。

1.4 滋养层(feeder)细胞制备与培养

取孕期为12.5~13.5 d(E12.5~13.5)的ICR孕鼠,灭菌后分离胚胎,保留躯干,去除头、尾、四肢以及内脏组织。将其剪碎至糊状后充分消化(0.05%胰酶-EDTA, 30 min)。加入feeder培养基(DMEM+10% FBS)终止后离心,收集消化后的细胞培养,记为P0代。待其传至P3代时,用丝裂霉素C(10 μg/mL)处理2.5~3 h。然后加入PBS充分洗涤,完全去除丝裂霉素C后加入新鲜的feeder培养基(DMEM+10% FBS),备用。

1.5 条件培养基(MEF-derived conditional medium, CM)的制备与收集

取6孔板,每孔加0.1% Gelatin 1 mL, 37 °C孵箱中孵育30~45 min后吸出。随后复苏制备好的feeder细胞,MEF培养基重悬后,接种至铺有Gelatin的6孔板中,保持密度(4~5)×10⁴/cm²,放入37 °C、5% CO₂孵箱中培养。隔日吸出MEF细胞培养基, PBS轻柔润洗1次,每孔加入2 mL hESC培养基,继续于37 °C、5% CO₂孵箱中培养。48~36 h后,收集6孔板中的培养基到50 mL离心管中,再加入新鲜的2 mL hESC(human embryonic stem cell)培养基至孔中。随后隔天重复以上步骤,收取条件培养基,直至feeder细胞开始凋亡脱落。

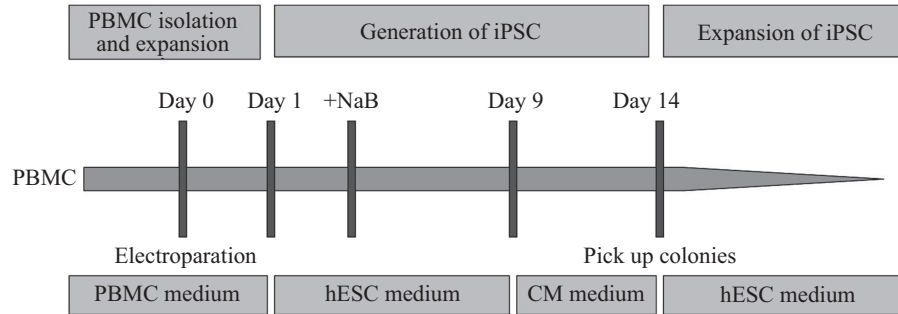


图1 PV患者外周血单个核细胞来源的iPSC的形成过程

Fig.1 The process of iPSC generation from PBMC of a PV patient

收集后的条件培养基经0.22 μm 滤器过滤后,放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。使用前加入bFGF(20 ng/mL),混匀后即使用。

1.6 非整合质粒的细胞核转染

培养第14 d的PBMC,用Human CD34⁺ cell Nucleofector Kit和20 μg episomal质粒按照本实验室已建立的方法进行转染^[13]。电转时细胞数约为 8×10^5 ,电转程序为T-016,转染后的细胞铺到12孔板。次日收集细胞,离心后加入含80% KnockOutTM DMEM/F12培养基、20% KSR、bFGF(10 ng/mL)、L-谷氨酰胺(4 $\mu\text{mol/mL}$)、非必需氨基酸(1 \times)、2-巯基乙醇(50 $\mu\text{mol/mL}$)的hESC培养基重悬细胞。随后将其接种到已铺有feeder细胞的6孔板中,封口膜包缠培养板,200 $\times\text{g}$ 离心30 min,然后放入培养箱培养。之后用hESC培养基隔天换液,并在培养基中加入NaB(0.25 $\mu\text{mol/mL}$)提高重编程效率。自电转第9 d起,考虑到feeder支持能力有限,改为MEF条件培养基代替hESC培养基进行换液,以促进克隆的形成及生长。电转后培养大约14 d,镜下可见ES样克隆形成,TRA 1-60染色鉴定多能性的iPSC,机械挑取阳性克隆,随后进行传代扩增(图1)。

1.7 荧光定量PCR检测多能性基因

对成功建立的iPSC系中的*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的mRNA表达水平进行相对定量分析。按照QIAGEN RNeasy Mini Kit说明书进行RNA的提取。使用NANODrop 1000 Spectrophotometer检测RNA浓度,按照Invitrogen M-MLV逆转录试剂盒说明书进行逆转录得到cDNA。取制备好的iPSC、H1细胞(人ES细胞系,阳性对照)、PV患者单个核细胞(阴性对照)的cDNA进行Real-time PCR,鉴定内源性基因*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的表达量,以*GAPDH*作为内参对照。每个样品设3个复孔,结果取平均值。

表1 *GAPDH*、*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的引物序列

Table 1 Primer sequences of *GAPDH*, *OCT4*, *SOX2* and *NANOG*

基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i>	F: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
	R: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
<i>OCT4</i>	F: ATT CAG CCA AAC GAC CAT CT
	R: GCT TCC TCC ACC CAC TTC T
<i>SOX2</i>	F: CAC ACT GCC CCT CTC ACA CA
	R: CCC TCC CAT TTC CCT CGT TT
<i>NANOG</i>	F: GCC GAA GAA TAG CAA TGG TGT G
	R: GGA AGA GTA GAG GCT GGG GTG

PCR反应体系: cDNA 1 μL , Faststart Universal SYBR Green Master 10 μL , 上下游引物各1 μL , nuclease-free water 7 μL 。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的相对表达量。Real-time PCR引物均由Invitrogen公司合成(表1)。

1.8 iPSC的鉴定、传代与扩增

挑取阳性克隆至24孔板,待克隆长到足够大或出现分化细胞时,在倒置显微镜下用100 μL 枪尖切割至3 000个细胞左右的细胞克隆块,将这些克隆传至预先铺好feeder的6孔板中。待传至第4代,细胞数量足够多且细胞系趋于稳定后,采用EDTA消化(0.5 mmol/L)进行传代扩增,随后将细胞铺到基质胶预处理的6孔板中,使用E8培养基隔天换液。传至9~10代或以上,iPSC系基本稳定。传代比例根据细胞的数量视情况而定。

1.9 iPSC的多能性鉴定

1.9.1 多能性基因免疫荧光染色 将诱导产生的iPSC系传至9~10代,将细胞种到玻璃培养皿中,生长到融合率约为50%。用4%多聚甲醛固定20~30 min, PBS洗3次(anti-TRA 1-60和anti-SSEA-4可省去此步骤),用0.1% Triton X-100透膜3次(anti-TRA 1-60和anti-

SSEA-4透膜2次), PBS洗1次, 封闭液(PBS+5%山羊血清+0.3% BSA)室温孵育1 h, 在4 °C孵育一抗过夜。随后, 弃一抗, 用0.1% Triton X-100洗3次(anti-TRA 1-60和anti-SSEA4用PBS洗), 加入二抗, 37 °C避光孵育1 h, 用0.1% Triton X-100透膜3次, PBS洗1次, DAPI染色5 min, 随后PBS洗3次。抗体应用浓度: 羊抗小鼠IgM抗体(1:500)、anti-TRA-1-60(1:300)、anti-OCT4(1:200)、anti-Nanog(1:100)、anti-SSEA4(1:100), 其他二抗均为1:1 000。共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.9.2 iPSC的畸胎瘤形成 选取第10代或以上代次的iPSC进行畸胎瘤形成实验, 从而验证其分化多能性。100 μ L E8培养基重悬 1×10^7 iPSC后, 再与100 μ L matrigel溶液混均, 随后将其注射至NOD/SCID小鼠皮下(腹股沟处)。10~12周可见小鼠皮下畸胎瘤形成, 将肿瘤完整剥离, 放入10%甲醛溶液固定24 h, 石蜡包埋后组织切片, HE染色后在显微镜下确定肿瘤的组织形态。

1.10 *JAK2*^{V617F}突变检测

待iPSC克隆足够大时挑取部分克隆, 按照Extract-N-Amp™ Blood PCR Kits说明书提取基因组DNA, 应用巢式等位基因特异性PCR检测单个核细胞及iPSC中*JAK2*^{V617F}突变情况^[14]。先对所需检测的*JAK2*基因片段

进行预扩增, 所用引物如下: P1: 5'-GAT CTC CAT ATT CCA GGC TTA CAC A-3'; P1r: 5'-TAT TGT TTG GGC ATT GTA ACC TTC T-3'。再取1 μ L预扩增产物用巢式等位基因特异性PCR进行二次扩增, 引物为: P2: 5'-CCT CAG AAC GTT GAT GGC A-3'; P2r: 5'-ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG A-3'; Pnf(非突变引物, non-mutation-specific primer): 5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATG-3'; Pmr(突变引物, mutation-specific primer): 5'-GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA-3'。PCR条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 25 s, 72 °C 30 s, 40个循环; 72 °C 10 min。

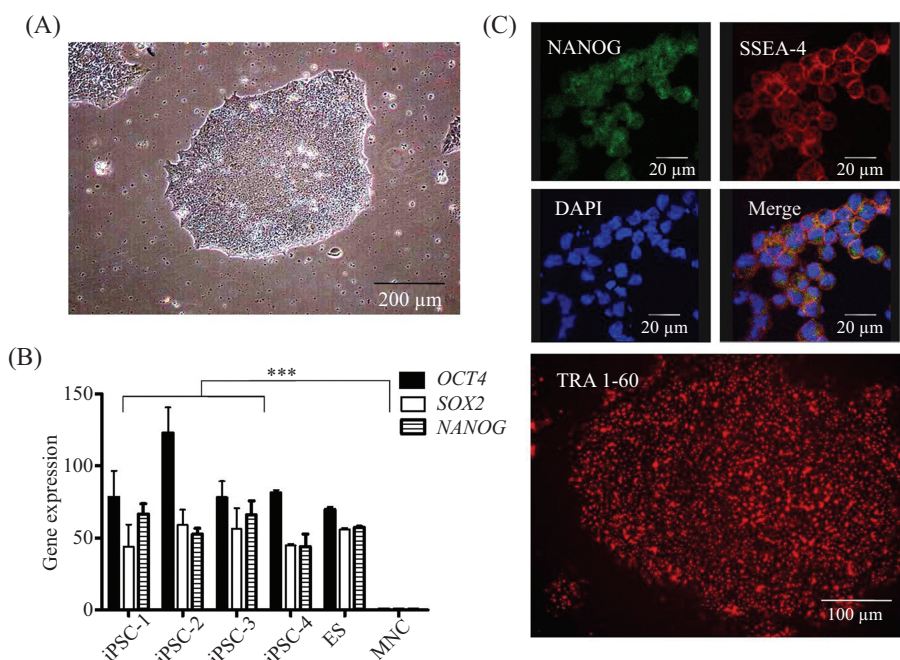
1.11 统计学分析

GraphPad Prism 5软件分析处理数据。结果以mean \pm S.D.表示, ANOVA检验分析数据, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 iPSC多能性基因的表达情况

通过episomal诱导的方法, 我们成功获得了PV患者PBMC来源的iPSC。其可在matrigel液支持的E8培养基中无限传代, 相差显微镜下观察具有ES细



A: PBMC来源的iPSC, 具有ES样形态特征; B: 多能性基因表达水平检测显示, iPSC中*OCT4*、*SOX2*和*NANOG*的表达水平与ES细胞系H1表达量较为接近, 显著高于单个核细胞(MNC), *** $P < 0.001$; C: 经细胞荧光免疫染色显示, iPSC高表达NANOG、TRA 1-60和SSEA-4。

A: iPSC derived from PBMC demonstrated a typical human ES cell-like morphology; B: the expression levels of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* in iPSC were similar to those of ES cells, and significantly higher than those in human mononuclear cells (MNC), *** $P < 0.001$; C: pluripotency markers NANOG, TRA 1-60 and SSEA-4 were highly expressed in iPSC.

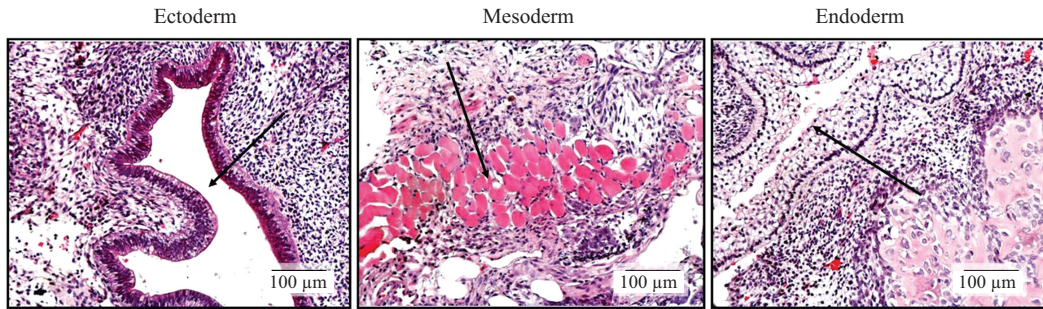
图2 PV患者中PBMC来源的iPSC的特征

Fig.2 Characterization of iPSC derived from PBMC of PV patients

胞样形态特征(图2A)。Real-time PCR结果显示, 长期传代的iPSC中, *OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的表达水平与ES细胞相当, 且其表达水平显著高于单个核细胞($P < 0.001$, 图2B)。多能性基因免疫荧光染色检测显示, iPSC表达ES细胞特有的分子标记TRA 1-60、SSEA-4和NANOG(图2C)。

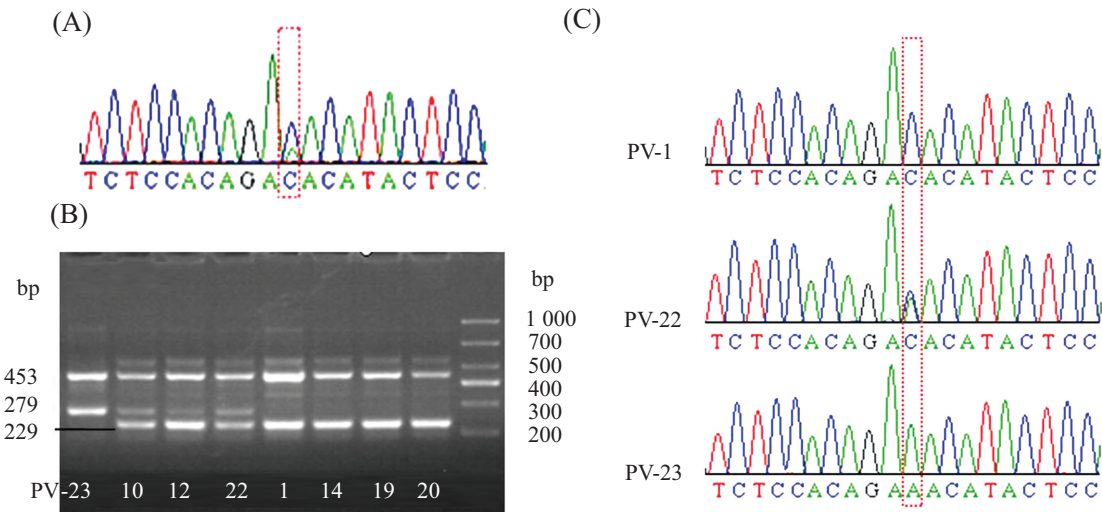
2.2 iPSC的畸胎瘤形成实验

为了验证iPSC的体内多向分化潜能, 我们选择了成功建系的iPSC进行畸胎瘤形成实验。注射2月左右, 可见NOD/SCID小鼠皮下肿瘤形成, 完整剥离肿瘤组织进行病理组织切片及H&E染色, 显示其具有三胚层结构(图3), 从而证明了iPSC的多能性潜能。



iPSC所形成的畸胎瘤, 组织切片后H&E染色可见其有三胚层结构: 黑色箭头所指组织分别为支气管(外胚层)、肌肉组织(中胚层)和腺体(内胚层)。Hematoxylin and eosin (H&E) staining of representative teratoma from iPSC showed derivatives of three embryonic germ layers: tissues that black arrows pointed were bronchus (ectoderm), muscles (mesoderm) and glands (endoderm).

图3 iPSC的畸胎瘤形成实验
Fig.3 Teratoma formation of iPSC



A: PV患者PBMC中*JAK2*^{V617F}的负荷情况。*JAK2*^{V617F}突变阳性为C→A; B: iPSC的*JAK2*^{V617F}突变检测情况; C: iPSC的*JAK2*^{V617F}测序结果。其中PV-1为野生基因型。PV-22为杂合突变。PV-23为纯合突变。

A: *JAK2*^{V617F} burden in PBMC from the patient in our study. *JAK2*^{V617F} positive (C→A); B: electrophoresis of PCR product of iPSC; C: representative result of *JAK2*^{V617F} sequencing result in iPSC. PV-1 had wild type genotype. PV-22 had heterozygous genotype and PV-23 had homozygous genotype.

图4 iPSC的*JAK2*^{V617F}突变及测序情况

Fig.4 The mutation of *JAK2*^{V617F} in iPSC verified by sequencing

2.3 iPSC的*JAK2*^{V617F}突变情况

本研究发现, PV患者每 8×10^5 个PBMC中约有40个类似ES细胞特征的克隆出现, 其中23个克隆可以稳定传代并建系。PV患者PBMC中*JAK2*^{V617F}突变负荷如下图(图4A)。随后提取稳定传代的iPSC的DNA, PCR产物用2.5%的琼脂糖凝胶电泳后于紫外线下进行检测分析。产物条带大小分别为: 453 bp、279 bp和229 bp。其中, 分子量为453 bp的产物反映了预扩增的条带, 分子量为279 bp的产物反映了*JAK2*^{V617F}突变型产物的存在, 229 bp的产物反映了野生型产物的存在(图4B)。随后对PV患者iPSC中*JAK2*^{V617F}预扩增产物进行sanger测序, 测序结果应用DNASIS

MAX软件进行分析,对*JAK2*^{V617F}突变的情况进行进一步确认。结果显示,4株克隆iPSC携带*JAK2*^{V617F}突变(其中3株为杂合突变株、1株为纯合突变株),其他19株为野生型(图4C)。

3 讨论

体细胞重编程技术不仅可以获得疾病特异性的iPSC,而且这些iPSC携带不同类型或不同负荷的体细胞突变^[15-18]。这种途径形成的iPSC能够稳定传代,减少了iPSC的致瘤性,且在相应条件下可诱导分化为造血干/祖细胞^[1-2,17]。

目前,国内已报道了镰刀形贫血、Fanconi贫血、地中海贫血等疾病的iPSC系的建立^[17,19-20],而关于血液系统肿瘤的iPSC系的工作较少。血液系统肿瘤多起始于携带致病基因的恶性克隆,重编程技术可以从单克隆水平上研究某些致病基因对疾病发生发展的重要作用。这部分工作已逐渐成为国际上iPSC的研究热点^[21-22],但国内目前报道较少。同时,疾病来源并携带不同致病基因的iPSC系的建立,也为新药开发和筛选提供了重要的实验平台。

*JAK2*作为MPN重要的致病基因早已备受关注,建立来自MPN患者并携带*JAK2*^{V617F}突变的iPSC,通过诱导其向造血过程不同阶段的细胞分化,可为更深入地了解*JAK2*^{V617F}突变在MPN发病中的作用机制提供有力的工具。*JAK2*抑制剂是首个治疗MPN的靶向药物,如INCB018424(Ruxolitinib)、CYT387等^[23-24]。本研究中,我们观察到每 8×10^5 个PBMC中约有40个类似ES细胞特征的克隆出现,其中23个克隆可以稳定传代并建系。随后,通过巢式等位基因特异性PCR方法对稳定传代的iPSC系*JAK2*^{V617F}突变的情况进行检测,其中有1株为*JAK2*^{V617F}纯合突变,3株携带*JAK2*^{V617F}杂合突变,其他19株为野生型。利用本研究建立的iPSC系,我们可以用同一病人来源但携带不同*JAK2*负荷的iPSC进行*JAK2*抑制剂筛选和药理作用研究,从而使其更有针对性地应用于临床。

有研究表明,PBMC诱导iPSC根据其培养条件不同,可以分为诱导前红系培养和诱导前粒系培养体系^[13]。我们发现,在不同疾病的iPSC系的建立过程中,应根据疾病本身的特征来选择诱导前培养体系,以期得到更能反映疾病本身(携带主要致病突变基因)的iPSC。在本实验室的其他相关研究中,如血友病iPSC系的建立中,我们发现诱导前红系培养较

好;而对于髓系恶性肿瘤一类,例如MPN、慢性粒单核细胞白血病、幼年慢性粒单核细胞白血病等,诱导前粒系[加入粒系刺激因子(如G-CSF等)]培养后得到的iPSC更能反映疾病本身的特点(未发表)。

iPSC技术有巨大的潜力,且在短时间内已取得较大突破。其为再生医学提供了新材料,推动了医药领域的发展,也为疾病发生发展机制的进一步明确、新型药物的筛选及某些疾病的治疗方法研究提供了新手段。我们将利用该方法建立的血液系统疾病的iPSC系,对一些特定基因在血液系统疾病的发生发展作进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Thiele KH, Orazi TA, Vera. BGP. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue 4th edition. New York: Springer-Verlag 2008; 31-48.
- 2 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, *et al.* A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037): 1144-8.
- 3 Nussenzveig RH, Swierczek SI, Jelinek J, Gaikwad A, Liu E, Verstovsek S, *et al.* Polycythemia vera is not initiated by *JAK2*^{V617F} mutation. *Exp Hematol* 2007; 35(1): 32-8.
- 4 Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2010; 91(2): 165-73.
- 5 Panani AD. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Lett* 2009; 284(1): 7-14.
- 6 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365(9464): 1054-61.
- 7 Nagao T, Kurosu T, Umezawa Y, Nogami A, Oshikawa G, Tohda S, *et al.* Proliferation and survival signaling from both *JAK2*^{V617F} and Lyn involving GSK3 and mTOR/p70S6K/4EBP1 in PVTL-1 cell line newly established from acute myeloid leukemia transformed from polycythemia vera. *PLoS One* 2014; 9(1): e84746.
- 8 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 9 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 10 Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 2011; 21(3): 518-29.
- 11 Dowey SN, Huang X, Chou BK, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from post-natal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc* 2012; 7(11): 2013-21.

- 12 Hu K, Yu J, Suknuntha K, Tian S, Montgomery K, Choi KD, *et al.* Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 2011; 117(14): e109-19.
- 13 刘淑平, 李彦欣, 许静, 顾海慧, 张鸿雁, 梁昊岳, 等. 非基因整合建立人诱导多能性干细胞方法的优化研究. *中国实验血液学杂志*(Liu Shuping, Li Yanxin, Xu Jing, Gu Haihui, Zhang Hongyan, Liang Haoyue, *et al.* An improved method for generation free human induced pluripotent stem cells. *Journal of Experimental Hematology*) 2014; 22(3): 580-7.
- 14 Takahashi K, Patel KP, Kantarjian H, Luthra R, Pierce S, Cortes J, *et al.* *JAK2* p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2013; 122(23): 3784-6.
- 15 Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, *et al.* Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: Functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 2011; 117(21): 5561-72.
- 16 Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, *et al.* *In situ* genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 2011; 29(11): 1717-26.
- 17 Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460(7251): 53-9.
- 18 Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 2011; 118(17): 4599-608.
- 19 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casasady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 20 Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. *Cell Res* 2009; 19(9): 1120-3.
- 21 Ye Z, Liu CF, Lanikova L, Dowey SN, He C, Huang X, *et al.* Differential sensitivity to JAK inhibitory drugs by isogenic human erythroblasts and hematopoietic progenitors generated from patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2014; 32(1): 269-78.
- 22 Saliba J, Hamidi S, Lenglet G, Langlois T, Yin J, Cabagnols X, *et al.* Heterozygous and homozygous *JAK2*^{V617F} states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients. *PLoS One* 2013; 8(9): e74257.
- 23 Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, *et al.* Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and *JAK2* inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010; 363(12): 1117-27.
- 24 Pardanani A, Lasho T, Smith G, Burns CJ, Fantino E, Tefferi A. CYT387, a selective JAK1/*JAK2* inhibitor: *In vitro* assessment of kinase selectivity and preclinical studies using cell lines and primary cells from polycythemia vera patients. *Leukemia* 2009; 23(8): 1441-5.