



胡苹, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究员。于北京大学生命科学院获得学士学位, 美国纽约州立大学Stony Brook分校/冷泉港实验室获得博士学位。在加州大学Berkeley分校/HHMI从事博士后研究。长期从事肌肉再生与肌肉稳态维持的研究, 主要研究内容包括肌肉干细胞保持、增殖与分化的微环境, 以及在衰老和病理情况下微环境变化对于干细胞的影响, 为相关肌肉退行性疾病的治疗提供新策略。同时, 致力于肌肉干细胞在多种肌肉退行性疾病治疗及肌肉再生与萎缩过程中的表观遗传调控的研究。胡苹实验室解决了长期困扰成体干细胞领域的“无效扩增”问题, 发现急性炎症和T细胞是肌肉干细胞增殖的重要微环境, 建立了免疫系统与肌肉再生的直接联系, 在世界上率先建立了功能性肌肉干细胞在体外长期扩增的系统, 为肌肉干细胞的临床应用奠定了基础。还发现, 衰老导致的肌肉萎缩的分子标记和药物靶点, 建立了诊断、治疗肌少症的新策略, 阐明了衰老微环境对肌肉干细胞活性和功能的影响。

http://www.sibcb.ac.cn/Hu_Lab/index.asp

细胞替代疗法研究进展

杨雯隽¹ 胡苹^{1,2*}

(¹中国科学院分子细胞卓越创新中心/上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; ²中国科学院干细胞与再生创新研究院, 北京 100101)

摘要 细胞替代疗法是指用有功能的正常细胞替代体内的病变、损伤细胞, 从而实现功能修复的治疗方法。细胞替代疗法中的关键问题包括种子细胞的选择与制备、细胞治疗与基因校正组合、使细胞替代疗法适用于多种遗传疾病的治疗以及在细胞替代疗法中免疫的排斥反应问题等。该文就以上内容研究进展作一简要综述。

关键词 细胞替代治疗; 种子细胞; 基因校正; 遗传疾病

Current Progress on Cell Replacement Therapy

Yang Wenjun¹, Hu Ping^{1,2*}

(¹State Key Laboratory of Cell Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Innovation Center for Cell Signaling Network, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

中国科学院器官重建与制造战略性先导科技专项(批准号: XDA16021400)、科技部重点研发计划(批准号: 2017YFA002700)、国家自然科学基金(批准号: 91649104、31671536)、中国科学院青年科学促进会专项项目(批准号: 2016246)和上海市科学技术委员会NN-CAS基金(批准号: Y753S11802、18ZR1446300)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921254, E-mail: hup@sibcb.ac.cn

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA16021400), the Program of Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2017YFA002700), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91649104, 31671536), the Program of Youth Innovation Promotion Association, Chinese Academy of Sciences (Grant No.2016246) and NN-CAS Fund of Science and Technology of Commission of Shanghai Municipality (Grant No.Y753S11802, 18ZR1446300)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921254, E-mail: hup@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-05-09 17:37:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1737.014.html>

Abstract Cell replacement therapy is a new strategy to treat all kinds of diseases. The malfunction cells in patients are replaced by healthy cells to achieve a full function recovery. The key questions in cell replacement include the preparation and selection of cells for transplantation, the correction of mutations with gene editing, and the potential immune reactions in cell therapy. Here, we briefly summarize the current progress of the above key questions of cell replacement therapy.

Keywords cell replacement therapy; seed cells; gene correction; genetic disorders

细胞是生物体的基本功能和结构单位, 几乎所有的人类疾病都涉及到细胞病变导致的功能紊乱与丧失。因而所有疾病治疗方法的根本原则都是采用各种化学和物理的方法清除不正常细胞, 促进细胞正常功能的恢复。随着细胞生物学的发展, 细胞替代治疗方法(cell replacement therapy)与策略应运而生。细胞替代疗法是指直接将细胞作为一种药物, 通过细胞移植的方法, 用健康的细胞替代病变细胞对各种疾病进行治疗的方法和策略。细胞替代疗法直接针对疾病产生的根源, 理论上能够治疗所有的疾病, 因而给帕金森综合征(Parkinson disease, PD)、肌营养不良症、恶性肿瘤等目前缺乏有效治疗方法的退行性疾病和恶性病变的治疗带来了革命性的突破。

1 细胞替代治疗中的细胞来源

1.1 功能细胞移植

细胞替代治疗最直接的思路是用健康的功能细胞替代相应的病变细胞, 例如用功能正常的肌肉细胞替代病变的肌肉细胞, 治疗各种肌营养不良症; 用功能正常的多巴胺能神经元替代病变坏死的多巴胺能神经元, 治疗帕金森综合征等。输血就是典型的功能细胞移植替代疗法。通过输血可以将红细胞等功能细胞移植入患者体内, 行使其功能, 从而达到挽救生命的目的。这一策略的优点是在逻辑上简单直接, “头痛医头, 脚痛医脚”, 可以极大地简化治疗策略的设计, 减少外在治疗干预对全身各非病变组织器官的干扰, 降低治疗的副作用。缺点是体内的很多功能细胞, 例如肌肉细胞、神经元细胞、红细胞等血液细胞等都是**有丝分裂后细胞(post mitotic cells)**, 不具有自我增殖能力。对于这些细胞而言, 移植的健康细胞一旦死亡, 细胞替代疗法的疗效即丧失, 需要再次进行细胞移植。例如, 输血后获得的红细胞等功能细胞能替代2~4周, 无法长期维持患者机体的需求。

如何获得大量的用于移植的具有完整功能的功能细胞一直是细胞生物学研究领域重要的基本的科学难题, 也是通过直接移植健康功能细胞进行细胞替代治疗的主要技术瓶颈之一。即使是在非有丝分裂后的功能细胞, 在体外的扩增能力也比较弱, 且在体外扩增后还保持良好功能的能力更弱。如何实现功能细胞的扩增与功能保持是细胞替代治疗中亟待解决的主要问题之一。

1.2 胚胎干细胞与诱导多能干细胞移植

干细胞具有自我更新能力, 且能够分化为多种功能细胞, 是进行细胞移植的重要供体细胞来源。根据分化能力及存在时间的不同, 干细胞可以分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和成体干细胞(adult stem cell)两种类型。顾名思义, 胚胎干细胞是指从早期胚胎中分离出来的一类细胞, 仅存在于胚胎发育早期^[1-3]。这类细胞具有在体外无限增殖、自我更新的能力, 能够分化为人体几乎所有的细胞类型^[4]。ESC的发现为细胞治疗的广泛应用奠定了基础。理论上, 经过适当的诱导, ES细胞可以分化为细胞替代疗法所需的几乎所有细胞类型, 因而能够解决细胞替代疗法中的细胞来源问题。同时, ESC能够在体外无限增殖, 提供足量的细胞用于获取功能细胞。从ESC中, 我们已经成功分化出了神经元细胞^[5]、心肌细胞^[6]、骨骼肌细胞^[7]、肝细胞^[8]、胰岛细胞^[9]等多种细胞类型。但是, 目前ESC向很多细胞类型的分化效率还有待提高, 分化细胞的功能也有待进一步完善。这也是目前干细胞研究的一个重要方向。ESC虽然有很强的应用潜能, 但是ESC在移植后具有致瘤性。如何降低ESC的致瘤性及提高ESC安全性是干细胞研究中的另一个关键问题。

ESC的获取涉及到胚胎操作, 会产生一定的伦理争议。日本科学家中山伸弥(Shinya Yamanaka)团队^[10]在2007年首次通过过表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc四个转录因子将人成纤维细胞诱导为多能干细胞, 实现体细胞重编程, 获得诱导多能干细胞(in-

duced pluripotent stem cells, iPSCs)。随后, 科学家们在血细胞^[11]、角质细胞^[12]、神经细胞^[13]、胰岛 β 细胞^[14]、肝细胞和胃上皮细胞^[15]等多数体细胞类型中过表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc四个转录因子都获得了iPSCs。进一步的研究表明, 上述四个转录因子并非诱导体细胞重编程的唯一组合, 其他转录因子、小分子也可以诱导iPSCs的产生^[16-23](表1)。通过小分子诱导得到的iPSCs避免了过表达外源基因造成的安全性隐患, 为iPSCs在细胞替代治疗中的应用奠定了基础。但是, 致瘤性、分化效率低等问题依然存在, 需要通过进一步的研究加以解决。

1.3 成体干细胞

成体干细胞是指存在于成年个体体内的一类干细胞。成体干细胞分布于多种已经分化的组织类型中。目前, 已经在肌肉^[48]、血液^[49]、神经^[50]、皮肤^[51]、脂肪^[52]、骨髓^[53]、肝^[54]、小肠^[55]、乳腺^[56]、牙齿^[57]等组织器官中鉴定到成体干细胞的存在。这类干细胞在成体组织中数量很少, 通常处于静息状态, 在组织生长与损伤修复中被激活, 通过扩增与分化, 在组织再生中发挥决定性作用。这类细胞具有自我更新能力, 能够分化为所处组织器官中的一种或几种细胞类型。例如肌肉干细胞能够分化为肌肉细胞^[58], 血液干细胞能够分化为红细胞、血小板、淋巴细胞等存在于血液中的功能细胞^[59], 神经干细胞能够分化为神经元细胞^[60]等。成体干细胞没有致瘤性, 源于患者自身, 移植时没有组织相容性问题, 能够大大降低免疫排斥反应。成体干细胞不涉及到胚胎操作问题, 伦理争议较少。由于成体干细胞具有上述优点, 因而当前在临床上具有比ESCs和iPSCs更广泛的应用。

然而, 成体干细胞的应用目前还存在一些瓶颈问题。首先, 多数成体干细胞在体外扩增困难。例如造血干细胞和肌肉干细胞都在体外难以扩增, 每次移植均需要供体提供大量组织进行干细胞的分离与富集, 因而对供体造成伤害。因此, 建立成体干细胞体外规模扩增技术是成体干细胞用于细胞替代疗法的重要技术基础。通过模拟体内微环境, 我们研究组^[61]将肌肉干细胞在体外扩增 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 倍, 为肌肉干细胞用于细胞替代疗法奠定了基础。对各种成体干细胞微环境的研究与模拟有望推动多种成体干细胞体外扩增系统的建立。其次, 成体干细胞在病理和衰老条件下会发生多种性质变化。例如, 衰

老的肌肉干细胞增殖能力显著降低, 移植后是否能够在受体中有效行使功能目前还不是很清楚。第三, 由于移植的细胞不是直接行使功能, 患者体内病理条件下的微环境可能会导致移植的干细胞功能降低甚至丧失。例如, 病变肌肉会产生多种因子, 阻碍肌肉干细胞的增殖、分化和存活。如何改善受体微环境, 以提高移植细胞在受体中的定植能力与功能, 是当前细胞替代疗法亟需解决的重要科学问题。

1.4 转分化来源细胞

细胞具有一定的可塑性。在恰当的诱导条件下, 细胞可以不需要回到ESC阶段, 直接转变为另一类细胞, 实现细胞的转分化^[62]。例如, 早在上世纪80年代, 过表达转录因子MyoD可以使成纤维细胞、脂肪细胞、上皮细胞、神经细胞等多种非肌肉细胞转变为肌肉类似细胞^[63]。随后的研究表明, 过表达不同的转录因子组合, 可以实现成纤维等细胞类型向肝^[26]、神经^[64]、心肌细胞^[65]等多种细胞类型的转分化。这些转分化得到的细胞在体外和体内都具有一定的功能, 成为细胞替代治疗的潜在细胞来源。但是, 由于涉及到一种或多种外源转录因子的过表达, 所以在临床应用中存在安全性风险。

为了解决这一问题, 近年来小分子诱导的转分化系统取得了很大的发展。用小分子取代外源转录因子的过表达, 诱导转分化的发生, 避免了引入外源因子, 提高了所获得的细胞的安全性。通过各种小分子组合, 已经实现了从成纤维细胞向肝细胞^[66]、心肌细胞^[67]、神经细胞^[68-69]等细胞类型的转分化(表1)。获得的细胞在体外、体内均具有一定的功能。

转分化所得的细胞具有取材容易的优点, 但是转分化所得细胞的功能还需要进一步完善。探索优化转分化条件, 建立更高效、功能更优的转分化系统是干细胞研究的一项重要内容。

功能细胞、ESC/iPSC、成体干细胞、分化和转分化来源的细胞作为细胞替代疗法的细胞来源各有优势, 同时也各自面临一些瓶颈问题, 需要通过进一步的研究工作解决(图1)。本文将总结应用上述来源细胞对来源于内、中、外三个胚层的不同组织器官的病变、损伤进行细胞替代治疗的进展(图2)。

2 细胞替代疗法治疗疾病

2.1 细胞替代疗法在肝脏疾病治疗中的应用

长期以来, 针对终末期的肝脏疾病, 急性肝损

表1 转分化相关的各类诱导因子

Table 1 Various inducing factors related to reprogramming

转分化类型 Type of reprogramming	来源细胞 Initial cell population	转化细胞 Target cell type	参考文献 Reference	
Transcription factors induced reprogramming	B lymphocyte	Macrophage	[24]	
	Fibroblast	Pluripotent stem cell	[25]	
		Hepatocyte	[26-29]	
		Melanocyte	[30]	
		Myoblast	[31]	
		Macrophage	[32]	
		Myelinogenic oligodendrocyte	[33]	
		Neuronal cell	[34]	
		Cardiomyocyte	[34]	
		Thymus	[35]	
		Hematopoietic progenitor cell	[36]	
		Hepatic progenitor cell	Neo-islet	[37]
		Cardiac fibroblast	Cardiomyocyte	[38]
Epigenetic reprogramming	Pancreatic exocrine cell	β cell	[39]	
	Pancreas	Liver	[40]	
	Mesoderm	Heart	[41]	
	microRNA induced reprogramming	Fibroblast	Pluripotent stem cell	[42]
			Neuron	[43]
Small molecules induced reprogramming	Embryonic fibroblast	Cardiomyocyte	[44]	
		Myocyte	[45]	
	Fibroblast	Pluripotent stem cell	[21]	
		Neuron	[46]	
	Cardiomyocyte	[47]		

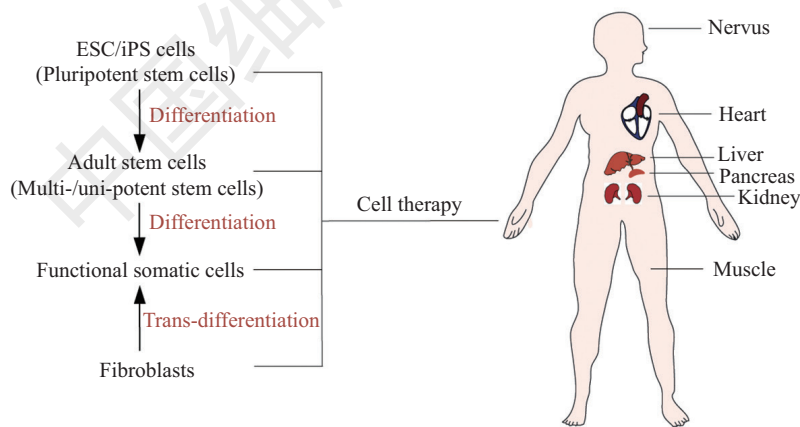


图1 细胞替代疗法的主要细胞来源

Fig.1 The major cell sources of cell replacement therapy

伤, 肝脏移植都是唯一的治疗方法^[26]。但由于供体肝源获得困难, 供体和受体之间存在排异的问题, 使这一方法的应用受到限制。细胞替代疗法可以有效地替代现有的肝移植, 起到治疗多种肝脏疾病的作用。

最早的细胞替代治疗是肝细胞转输。早在1976

年, Matas等^[70]就以Gunn(先天UDPGT酶缺失)为模型, 通过肝细胞回输的方式有效地改善了该小鼠UDPGT酶的产生, 并降低了小鼠血液中的血浆胆红素的浓度。

基于肝细胞回输的肝脏疾病治疗, 目前通用的方法是将肝实质细胞通过肝脏门静脉或者其他途径

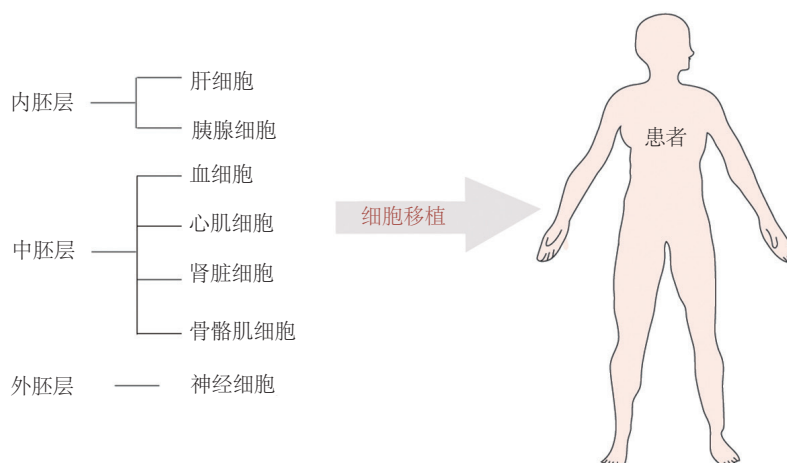


图2 三胚层来源的功能细胞移植到患者体内替代病变细胞进行治疗

Fig.2 Cell replacement therapy by transplantation of triploblast derived functional cells

回输到肝脏中,再通过补充外源性具备功能的肝细胞,达到维持肝脏功能的目的^[71]。肝细胞回输,虽然已在小鼠等模式生物上有了较好的研究成果,但在临床上,肝实质细胞来源稀缺,分离困难,且体外培养难度大,对细胞冻存的过程又十分敏感,使用肝实质细胞进行细胞回输治疗仍然有很多问题需要解决。

ESCs和iPSCs诱导分化为肝细胞是肝脏疾病细胞替代治疗的一个选择^[72]。利用成纤维细胞诱导成为肝实质细胞是肝脏疾病细胞替代治疗的另一个选择。惠利健团队^[26]通过过表达转录因子,将人和小鼠成纤维细胞转分化为功能性肝实质细胞,并在临床上应用于生物人工肝。丁胜团队^[29]亦成功地利用成纤维细胞诱导出了肝实质细胞。邓宏魁团队^[73]则通过小分子同时诱导HNF1A、HNF4A、HNF6、ATF5、PROX1和CEBPA的表达,成功地将成纤维细胞诱导称为肝实质细胞。这些诱导方法的建立为肝脏疾病的细胞替代治疗奠定了基础。

简而言之,肝脏的细胞代替治疗能有效地解决目前供体肝脏稀缺的问题。针对包括急性肝损伤在内的疾病,肝脏细胞回输都能起到很好的治疗效果。

2.2 细胞替代疗法在胰腺疾病治疗中的应用

近年来,糖尿病呈现高发趋势。中国是糖尿病患者人数最多的国家,2017年患病人数达到1.14亿。虽然胰岛素注射可以极大地帮助糖尿病患者控制血糖,但是依然存在很多问题。通过胰腺器官移植或胰岛移植的方法理论上可以达到不使用胰岛素而使病情获得良好控制的目的,并解决胰岛素注射中存在的血糖浓度难以动态调控等问题。胰腺移植已经

在临床上应用于I型糖尿病的治疗,并取得了一定的疗效。但是,由于胰腺的供体非常少,阻碍了这一技术的广泛应用。细胞替代疗法可以帮助解决供体不足的问题。

目前主要通过人源ESCs/iPSCs分化产生功能性 β 细胞,并通过优化培养条件来重现胰岛中复杂三维结构及其构成要素^[74]。由iPSCs分化得到的胰岛素分泌细胞(类 β 细胞)能够在体外产生胰岛素,并在动物模型中改善高血糖症(hyperglycemia)^[75]。从ESCs/iPSCs分化得到类 α -、 β -、 δ -等多种激素分泌细胞类型,其与内皮细胞共同形成类器官(organoid)后移植入动物体内,在动物模型中具有葡萄糖响应功能^[76]。通过3D培养、类器官形成等方法,应用多种细胞类型模拟体内胰岛的结构和功能是当前研究的重要方向。移植细胞在体内的定植是另一个需要解决的问题。采用组织工程的方法把移植的细胞或类器官包裹在特殊材料的微型胶囊装置里,一方面可以提供激素分泌功能,另一方面可以限制免疫细胞的攻击,提高移植细胞的定植能力。这一方法目前已有一些临床试验的报道^[77]。

2.3 细胞替代疗法在血液系统疾病和肿瘤治疗中的应用

输血是最早出现的细胞替代疗法。早在19世纪,欧洲的医生们就开始通过输血尝试治疗各种严重失血。到20世纪初,现代输血技术基本建立。直到今天,以输血为代表的功能细胞替代疗法依然是严重失血患者的主要治疗方式。

由于血液谱系细胞获取相对比较容易,结合长

期输血实践获得的大量临床经验, 细胞移植等技术相对成熟, 因而以血液谱系相关细胞移植为代表的细胞替代疗法在血液疾病的治疗中占据重要地位。红细胞、白细胞和血小板是功能细胞替代疗法的主要细胞类型。

ESCs/iPSCs可以在体外诱导为红细胞、T细胞、血小板等功能细胞^[78-80]。但是, 人源血液干/祖细胞向T细胞分化时, 分化效率还较低、分化效果不稳定, 重复性需要进一步提高。目前应用更多的是向从脐带血中分离出的血液干/祖细胞添加多种细胞因子, 使其向T细胞诱导分化。这一分化系统中分化出的T细胞已经在多个临床试验中用于替代患者体内的T细胞, 以治疗多种白血病^[81]。目前已经建立了用于向T细胞分化的统一的临床级iPS细胞系, 为其临床应用奠定了基础。从iPSCs分化为T细胞的方法在进行基因编辑时有较大的优势。由于在iPSCs中进行基因编辑较为方便, 并且编辑过的iPSCs能够在体外大量扩增, 因而是制备CAR-T细胞的最佳选择。

从脐带血中分离纯化的血小板, 通过血小板输注, 在临床上已经用于治疗大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa)、Gaucher氏症^[82-83]。

除了进行终末分化的功能细胞的替代之外, 也可用健康的HSCs替代患者体内病变的HSCs, 或者由移植的健康HSCs在患者体内产生健康的血液谱系的所有细胞, 替代病变的下级细胞。这种方法已经被广泛用于白血病的治疗。用于移植的HSCs主要来源于捐献骨髓的供体, 少量HSCs可以从脐带血中分离而获取。HSCs细胞替代疗法在免疫缺陷疾病和肿瘤中也开始有一些初步的尝试。像多数成体干细胞一样, HSCs在体外无法扩增。通过添加维生素A、视黄酸等因子, 结合微载体与3D培养, HSCs可以得到部分扩增^[84]。提高HSCs在体外的扩增能力是HSCs细胞替代疗法的重要研究方向。

HSCs可以通过由ESCs/iPSCs分化而来^[85]; 还可以通过转分化以获得^[86]。这些通过不同方式获得的HSCs在体内的功能完整性及安全性等方面尚需通过进一步的研究加以证实。

2.4 细胞替代疗法在心脏疾病治疗中的应用

人ESCs/iPSCs可以在体外诱导分化为心肌前体细胞以及起搏细胞(pacemaker cells)、心室细胞(ventricular cells)、心房细胞(atrial cells)等终末分化的细胞类型^[87]。应用这些体外分化得到的细胞在动

物模型, 以及猪和非人灵长类大动物心梗模型中取得了比较好的疗效^[88-89]。在非人灵长类心梗模型[短尾猴(macaque monkeys)心梗模型]中, 从人ESCs分化来的心肌细胞在移植后能够存活, 定植3个月后, 可显著提高左心室功能^[88]。人ESCs分化得到的临床级心血管前体细胞在初期临床试验中取得了一定的疗效^[90]。

心肌细胞也可以通过体内和体外转分化获得, 并能够在心梗动物模型中缓解症状^[91]。心血管疾病的细胞替代治疗中还存在很多有较大争议的领域和待解决的问题^[92], 更深入的研究会对这些问题的解决提供帮助。

2.5 细胞替代疗法在骨骼肌疾病治疗中的应用

各种肌营养不良、肌无力等肌肉退行性疾病及严重损伤造成的骨骼肌缺损目前均缺乏有效的治疗方法。细胞替代疗法为这类疾病的治疗带来了新的希望。

与其他功能细胞类似, 骨骼肌细胞可以从ESCs/iPSCs诱导获得。目前已经建立了来源于杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、假肥大型肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD)、肢带型肌营养不良(limb-girdle muscular dystrophy, LGMD)、面肩肱型肌营养不良症(facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD)、强直性肌萎缩1(myotonic dystrophy 1, DM1)等肌肉退行性疾病患者的iPSCs^[93]。这些iPSCs的建立为进一步的基因校正奠定了基础。

由于iPSCs具有致瘤性, 因此难以作为细胞替代疗法的种子细胞进行直接移植。应用iPSCs进行各种肌肉退行性疾病的细胞替代治疗需要首先把iPSCs诱导分化为肌肉谱系的细胞, 然后进行移植。通过模拟体内骨骼肌的发育过程, ESCs/iPSCs可以分化为肌肉细胞^[94]。基因校正后的iPSCs在体外进一步分化为肌肉前体细胞后, 移植入DMD小鼠模型中, 使肌肉功能得到部分恢复^[95]。目前使用这一策略获得肌肉细胞的主要问题是分化效率不高、分化系统不稳定、批次之间差异较大。分化所得的肌肉谱系的细胞功能不完整、不稳定, 因此需要有进一步的研究工作, 以提高分化效率和分化系统的稳定性, 加强分化细胞的功能。

肌肉干细胞(肌卫星细胞)是具有肌肉分化潜能的一类成体干细胞。肌肉干细胞位于肌膜与基

底膜之间, 通常处于静息状态。在肌肉生长和损伤修复的时候, 肌肉干细胞被激活。激活的肌肉干细胞能够进行扩增, 并分化为具有功能的肌肉细胞^[96]。由于肌肉干细胞完全不具有致瘤性, 能够高效分化为有功能的肌肉细胞, 并在体内具有较高的整合效率, 是进行各种肌肉相关疾病细胞替代疗法的理想的种子细胞。肌肉干细胞在体外扩增困难, 在体外培养超过24小时后, 丧失几乎全部的干性, 移植入体内后无法定植分化为肌肉细胞。通过模拟体内微环境, 我们研究组建立了肌肉干细胞在体外长期高效扩增的系统^[61]。这一系统的建立, 为肌肉干细胞于肌肉相关疾病的细胞替代治疗方面的应用奠定了基础。

除了肌肉干细胞之外, 还有一些细胞在体外具有肌向分化潜能。例如, 肌肉间质细胞、FAPs(fibrocyteladipocyte progenitors)、side population cells、血管内皮细胞(pericytes)都在体外表现出一定的肌肉分化潜能。针对这些细胞进行肌肉相关疾病的细胞替代治疗, 我们也开展了一些临床试验。这些细胞在体内是否具有肌向分化潜能, 体内分化细胞的功能如何, 还有待进一步研究。

2.6 细胞替代疗法在肾脏疾病治疗中的应用

慢性肾病严重危害人类健康, 目前针对肾病最有效的治疗方案是肾脏移植, 但是移植器官的供应远远落后于需求。

细胞替代疗法可以通过补充肾脏细胞, 进而重建肾脏功能。ESCs/iPSCs均具有肾细胞分化能力, 体外诱导分化形成肾前体细胞(nephron progenitor cells)和肾小管细胞^[97]。应用三维培养技术, ESCs/iPSCs可以在体外形成肾类器官^[98]。肾脏中是否存在干细胞目前还有很大的争议^[99]。我们也可以通过转分化的方法获得肾细胞^[100]。目前用于细胞替代疗法实验的主要还是由ESCs/iPSCs分化来的肾细胞。生物人工肾(bioartificial kidney, BAK)或称肾小管辅助装置(bioartificial renal tubule assist device, RAD)是指在高流量的、具有血液过滤装置的、空心纤维管道的内面加入一层纤维膜, 经过人工合成的细胞外基质蛋白预处理, 种植哺乳类(如猪)肾小管上皮细胞, 这些细胞逐渐同单层细胞融合并生长, 起到肾脏的作用^[101]。在狗尿毒症实验中证实, RAD具有肾脏的转运、重吸收、代谢和内分泌功能^[102-103]。但这一细胞治疗方案的安全

性还有待评估。

2.7 细胞替代疗法在神经系统疾病治疗中的应用

细胞替代疗法为阿尔兹海默病和帕金森综合征等神经系统疾病的治疗带来了新的思路。ESCs/iPSCs可以在体外诱导分化为神经干细胞、神经元/小胶质细胞和神经滋养细胞, 用于细胞替代治疗^[104]。从iPSCs诱导分化而来的神经星形胶质细胞(astrocytes)已经在I/IIa期临床试验中用于治疗ALS, 通过向脊髓注射这些诱导分化而来的神经星形胶质细胞, 来替代ALS患者体内病变的星形胶质细胞, 达到治疗目的^[105]。从iPSCs分化而来的神经小胶质细胞(microglial)也在临床试验中用于治疗ALS^[106]。

从iPSCs诱导分化而来的多巴能神经元、运动神经元、astrocytes、microglia和oligodendrocytes在大动物和临床试验中用于治疗多发性硬化症(multiple sclerosis)、阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森综合征脊髓损伤等神经损伤和神经退行性疾病^[107]。从iPSCs诱导分化而来的视锥和视杆细胞在细胞替代疗法中作为种子细胞治疗黄斑性病变, 患者视力得到明显提高, 表现出良好的疗效^[108]。

最近的一系列研究表明, 细胞替代疗法不仅能够AD、PD等神经退行性疾病中替代病变的神经元, 帮助患者恢复正常的神经元功能, 而且能够应用于疯牛病等prion疾病的治疗中。由iPSCs分化而来的神经干细胞(neuronal stem cells, NSCs)、神经祖细胞(neuronal progenitor cells, NPCs)移植入prion疾病动物模型中, 神经元的寿命和功能都得到了显著的改善^[109], 提示细胞替代疗法可以成为prion疾病治疗的新方向。

3 细胞替代疗法与基因编辑

对于很多遗传疾病来说, 自体干细胞携带基因突变, 无法作为细胞替代疗法的种子细胞。在理论上, 基因编辑技术对遗传疾病中突变的基因进行校正可以彻底治愈所有的遗传疾病。基因校正有两种途径。一种是体内途径, 即将基因编辑相关病毒或质粒直接注射入患者体内。这种策略的优点是简便易行、成本较低。早期的基因治疗多数采用这种策略。这一策略的最大隐患是可能存在安全性问题。由于相关病毒或质粒进入人体后的行为完全无法控制, 可能进入错误的组织器官, 可能发生错误的修改。这些副作用无法被预判, 且目前也难以被控制,

因而这种策略有比较大的安全隐患。此外,直接转入体内的病毒或质粒等只能瞬时表达,持续时间较短,患者可能需要进行多次注射,这更进一步增加了安全隐患。引入人体的基因校正相关外源蛋白及病毒载体上存在的外源蛋白可能会在受体中引起强烈的免疫反应,造成严重的副作用^[108]。

离体基因校正(*ex vivo gene therapy*)技术可以有效地解决体内基因治疗所存在的上述问题。离体基因校正是指首先从患者体内分离细胞,在细胞中进行基因校正,鉴定正确之后,再将基因与功能均正常的细胞移植入患者体内。由于干细胞具有自我更新和扩增能力,因此是进行离体基因校正的最佳选择。离体基因校正是在干细胞和基因编辑技术的基础上形成的交叉融合治疗方法,其本质是利用基因校正后的健康功能干细胞进行细胞替代治疗。

由于导入体内的是细胞,细胞在体外可以进行充分的质控与质检,在体内的行为也更容易被追踪与控制,因而大大地提高了安全性。干细胞及其分化产生的下级细胞可以整合入体内,因此基因编辑后的干细胞及其衍生细胞能够在体内长期存在,理论上采用经过基因校正后的细胞进行细胞替代治疗可以永久治愈遗传疾病。此外,由于离体基因校正法中引入人体的是自体细胞,不涉及外源基因的表达,因而能够大大减轻免疫排斥反应。虽然结合基因校正的细胞替代疗法具有多种优越性,但是也有成本高、耗时长缺点。另外,这一方法的最大技术瓶颈在于很多成体干细胞在体外难以扩增和转染/感染,因此建立干细胞的规模化培养、扩增和转染/感染系统将极大地促进离体基因校正法在临床的应用。

目前,在杜氏肌营养不良患者的iPSCs中进行基因校正后,将其移植入动物模型中表现出一定的疗效^[95]。经过基因校正的HSCs已经在临床试验中用于白血病^[111]、镰形细胞贫血^[112]、地中海贫血^[113]等疾病的治疗,并表现出显著的疗效。

CAR-T疗法是另一个基因修饰后进行细胞替代治疗的例子。经过基因修饰后的T细胞移植入肿瘤病人体内,替代患者体内丧失功能的T细胞,达到杀伤肿瘤细胞的目的。基因治疗与干细胞技术相结合,将进一步促进细胞替代疗法的发展,为人类疾病的治疗提供更多的路径和方法。

4 细胞替代治疗与免疫反应

细胞替代治疗的种子细胞移植入患者体内可能会引起受体的免疫排斥反应。特别是为了降低成本,多数治疗策略倾向于使用统一来源的“标准”细胞系制备用于细胞替代治疗的种子细胞,在移植后这些异体细胞会导致免疫排斥反应。有时移植导致的免疫反应非常强烈,甚至会危及患者生命。因而在多数细胞替代治疗中需要给患者使用免疫抑制剂^[114]。长期使用免疫抑制剂,会产生一系列副作用。因此,制备低免疫原性的种子细胞是细胞替代治疗研究中的重要方向。用自体细胞作为细胞替代疗法的种子细胞是解决这一问题的另一个策略。但是,由于自体细胞高度个性化,因此如何降低成本是需要考虑的重要问题。

除了受体的免疫排斥之外,很多疾病都会导致体内产生异常炎症微环境,从而阻碍细胞替代疗法中移植入的细胞在体内的增殖和定植。例如,DMD患者体内即存在异常的高炎症因子,如IFN γ 、IL6等炎症因子的表达水平都很高。移植入的肌肉干细胞在这些异常高水平的炎症因子作用下,产生增殖和分化障碍^[114]。因此,改善患者体内的微环境,增加细胞替代疗法所移植的种子细胞在体内的存活率,提高移植细胞的增殖、分化和定植能力,是细胞替代疗法发展过程中所必须解决的问题。

5 结语

综上所述,细胞替代疗法是在细胞生物学和干细胞生物学研究成果基础上发展起来的一种新的医疗方式。虽然目前多数细胞替代疗法还处在临床前和临床研究阶段,但是现有结果清楚地表明,这一治疗方法的发展、成熟将为现有技术带来革命性的变化。更多的深入研究和临床试验结果将帮助我们开发和鉴定更好的种子细胞,提高功能和安全性。与基因编辑等新技术的结合,将使我们获得功能更完善、抗逆能力更强的细胞,以用于细胞替代治疗。

参考文献 (References)

- 1 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 2 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5395): 1145-7.

- 3 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- 4 Schlesinger S, Meshorer E. Open chromatin, epigenetic plasticity, and nuclear organization in pluripotency. *Dev Cell* 2019; 48(2): 135-50.
- 5 Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, Ishihara Y, Hattori C, Miwa Y, *et al.* Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mo Brain* 2015; 8(1): 79.
- 6 Zhu WZ, Van Biber B, Laflamme MA. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 2011; 767: 419-31.
- 7 Loh KM, Chen A, Koh PW, Deng TZ, Sinha R, Tsai JM, *et al.* Mapping the pairwise choices leading from pluripotency to human bone, heart, and other mesoderm cell types. *Cell* 2016; 166(2): 451-67.
- 8 Yamashita T, Takayama K, Sakurai F, Mizuguchi H. Billion-scale production of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 496(4): 1269-75.
- 9 Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, *et al.* Generation of functional human pancreatic beta cells *in vitro*. *Cell* 2014; 159(2): 428-39.
- 10 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7): 313-7.
- 11 Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009; 113(22): 5476-9.
- 12 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- 13 Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.
- 14 Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 2008; 18(12): 890-4.
- 15 Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3): 230-40.
- 16 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.
- 17 Xie LQ, Sun HP, Wang T, Tang HL, Wang P, Zhu JH, *et al.* Reprogramming of adult human neural stem cells into induced pluripotent stem cells. *Chin Med J* 2013; 126(6): 1138-43.
- 18 Hu X, Zhang L, Mao SQ, Li Z, Chen J, Zhang RR, *et al.* Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14(4): 512-22.
- 19 Zhao Y, Zhao T, Guan J, Zhang X, Fu Y, Ye J, *et al.* A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical reprogramming. *Cell* 2015; 163(7): 1678-91.
- 20 Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Liu H, *et al.* Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet* 2013; 45(12): 1504-9.
- 21 Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013; 341(6146): 651-4.
- 22 Ye J, Ge J, Zhang X, Cheng L, Zhang Z, He S, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res* 2016; 26(1): 34-45.
- 23 Kang PJ, Moon JH, Yoon BS, Hyeon S, Jun EK, Park G, *et al.* Reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem-like cells using a combination of small molecules. *Biomaterials* 2014; 35(26): 7336-45.
- 24 Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117(5): 663-76.
- 25 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.
- 26 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 27 Huang P, Zhang L, Gao Y, He Z, Yao D, Wu Z, *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 370-84.
- 28 Fang R, Liu K, Zhao Y, Li H, Zhu D, Du Y, *et al.* Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2014; 15(4): 488-97.
- 29 Zhu S, Rezvani M, Harbell J, Mattis AN, Wolfe AR, Benet LZ, *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* 2014; 508(5494): 93-7.
- 30 Yang R, Zheng Y, Li L, Liu S, Burrows M, Wei Z, *et al.* Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat Commun* 2014; 5: 5807.
- 31 Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6): 987-1000.
- 32 Feng R, Desbordes SC, Xie H, Tillio ES, Pixley F, Stanley ER, *et al.* PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(16): 6057-62.
- 33 Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, Wyatt K, Capriarello AV, Factor DC, *et al.* Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2013; 31(5): 426-33.
- 34 Chanda S, Ang CE, Davila J, Pak C, Mall M, Lee QY, *et al.* Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Rep* 2014; 3(2): 282-96.
- 35 Bredenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2014; 16(9): 902-8.
- 36 Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, Lacaud G. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep* 2014; 9(5): 1871-84.
- 37 Yechoor V, Liu V, Espiritu C, Paul A, Oka K, Kojima H, *et al.* Neurogenin 3 is sufficient for transdetermination of hepatic pro-

- genitor cells into neo-islets *in vivo* but not transdifferentiation of hepatocytes. *Dev Cell* 2009; 16(3): 358-73.
- 38 Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, *et al.* *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485(7400): 593-8.
- 39 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
- 40 Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of trans-differentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000; 2(12): 879-87.
- 41 Takeuchi JK, Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459(7247): 708-11.
- 42 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 376-88.
- 43 Yoo AS, Sun AX, Li L, Shehgovitov A, Portmann T, Li Y, *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 2011; 476(7359): 228-31.
- 44 Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, *et al.* MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 2012; 110(11): 1465-73.
- 45 Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17(4): 771-9.
- 46 Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, *et al.* Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 195-203.
- 47 Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 2015; 25(5): 645-6.
- 48 Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat* 1965; 99(Pt3): 435-44.
- 49 Niewisch H, Hajdik I, Sultanian I, Vogel H, Matioli G. Hemopoietic stem cell distribution in tissues of fetal and newborn mice. *J Cell Physiol* 1970; 76(1): 107-15.
- 50 Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96(1): 25-34.
- 51 Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. *J Invest Dermatol* 1983; 81(1): 121s-7s.
- 52 Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(4): 871-7.
- 53 Lajtha LG. Kinetics of bone marrow stem cell population with reference to leukaemia. *Cancer* 1962; 15: 139-44.
- 54 Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10(11): 1249-56.
- 55 Gordon JI, Schmidt GH, Roth KA. Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice. *FASEB J* 1992; 6(12): 3039-50.
- 56 Wang D, Cai C, Dong X, Yu QC, Zhang XO, Yang L, *et al.* Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* 2015; 517(7532): 81-4.
- 57 Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81(8): 531-5.
- 58 Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013; 93(1): 23-67.
- 59 Uher F, Hajdu M, Vas V. Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: a molecular approach (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* 2003; 50(1): 3-21.
- 60 Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, *et al.* Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 14069-74.
- 61 Fu X, Xiao J, Wei YN, Li S, Liu Y, Yin J, *et al.* Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res* 2015; 25(6): 1082-3.
- 62 Reid A, Tursun B. Transdifferentiation: do transition states lie on the path of development? *Curr Opin Syst Biol* 2018; 11: 18-23.
- 63 Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 1988; 242(4877): 405-11.
- 64 Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 465-72.
- 65 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 66 Li X, Liu D, Ma Y, Du X, Jing J, Wang L, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts via a chemically induced XEN-like state. *Cell Stem Cell* 2017; 21(2): 264-73 e7.
- 67 Fu Y, Huang C, Xu X, Gu H, Ye Y, Jiang C, *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 2015; 25(9): 1013-24.
- 68 Zhang M, Lin YH, Sun YJ, Zhu S, Zheng J, Liu K, *et al.* Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell Stem Cell* 2016; 18(5): 653-67.
- 69 Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, *et al.* Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 204-12.
- 70 Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, *et al.* Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976; 192(4242): 892-4.
- 71 Nicolas CT, Hickey RD, Chen HS, Mao SA, Lopera Higuera M, Wang Y, *et al.* Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells* 2017; 35(1): 42-50.
- 72 Lee SY, Kim HJ, Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells* 2015; 8(1): 36-47.
- 73 Du Y, Wang J, Jia J, Song N, Xiang C, Xu J, *et al.* Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014;

- 14(3): 394-403.
- 74 Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(7): 2334-9.
- 75 Teo AK, Windmueller R, Johansson BB, Dirice E, Njolstad PR, Tjora E, *et al.* Derivation of human induced pluripotent stem cells from patients with maturity onset diabetes of the young. *J Biol Chem* 2013; 288(8): 5353-6.
- 76 Rezanejad H, Lock JH, Sullivan BA, Bonner-Weir S. Generation of pancreatic ductal organoids and whole-mount immunostaining of intact organoids. *Curr Protoc Cell Biol* 2018: doi: 10.1002/cpcb.82.
- 77 Orive G, Emerich D, Khademhosseini A, Matsumoto S, Hernandez RM, Pedraz JL, *et al.* Engineering a clinically translatable bioartificial pancreas to treat type I diabetes. *Trends Biotechnol* 2018; 36: 445-56.
- 78 Xavier-Ferrucio J, Krause DS. Concise review: bipotent megakaryocytic-erythroid progenitors: concepts and controversies. *Stem Cells* 2018; 36(8): 1138-45.
- 79 Nishikii H, Kurita N, Chiba S. The road map for mega-karyopoietic lineage from hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(8): 1661-5.
- 80 Li Y, Jin C, Bai H, Gao Y, Sun S, Chen L, *et al.* Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2018; 131(2): 191-201.
- 81 Lund TC, Boitano AE, Delaney CS, Shpall EJ, Wagner JE. Advances in umbilical cord blood manipulation-from niche to bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(3): 163-74.
- 82 Kim EA, Lim YT, Hah JO, Sohn YB, Kim YK, Choi JH, *et al.* Neuronopathic gaucher disease presenting with microcytic hypochromic anemia. *Int J Hematol* 2018; 109(3): 361-5.
- 83 Gelmetti A, Greppi N, Guez S, Grassi F, Rebulla P, Tadini G. Cord blood platelet gel for the treatment of inherited epidermolysis bullosa. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(3): 370-3.
- 84 Patterson AM, Pelus LM. Spotlight on glycolysis: a new target for cord blood expansion. *Cell Stem Cell* 2018; 22(6): 792-3.
- 85 Klump H, Teichweyde N, Meyer C, Horn PA. Development of patient-specific hematopoietic stem and progenitor cell grafts from pluripotent stem cells, *in vitro*. *Curr Mol Med* 2013; 13(5): 815-20.
- 86 Sugimura R, Jha DK, Han A, Soria-Valles C, da Rocha EL, Lu YF, *et al.* Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature* 2017; 545(7655): 432-8.
- 87 Foo KS, Lehtinen ML, Leung CY, Lian X, Xu J, Keung W, *et al.* Human ISL1⁺ ventricular progenitors self-assemble into an *in vivo* functional heart patch and preserve cardiac function post infarction. *Mol Ther* 2018; 26(7): 1644-59.
- 88 Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 2018; 36(7): 597-605.
- 89 Ishigami M, Masumoto H, Ikuno T, Aoki T, Kawatou M, Minakata K, *et al.* Human iPSC cell-derived cardiac tissue sheets for functional restoration of infarcted porcine hearts. *PLoS One* 2018; 13(8): e0201650.
- 90 Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(4): 429-38.
- 91 Klose K, Gossen M, Stamm C. Turning fibroblasts into cardiomyocytes: technological review of cardiac trans-differentiation strategies. *FASEB J* 2019; 33(1): 49-70.
- 92 Chien KR, Frisen J, Fritsche-Danielson R, Melton DA, Murry CE, Weissman IL. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. *Nat Biotechnol* 2019; 37(3): 232-7.
- 93 Maffioletti SM, Sarcas S, Henderson ABH, Mannhardt I, Pinton L, Moyle LA, *et al.* Three-dimensional human iPSC-derived artificial skeletal muscles model muscular dystrophies and enable multilineage tissue engineering. *Cell Rep* 2018; 23(3): 899-908.
- 94 Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* 2017; 144(12): 2104-22.
- 95 van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, *et al.* Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; 357(26): 2677-86.
- 96 Fu X, Wang H, Hu P. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(9): 1663-77.
- 97 Morizane R, Bonventre JV. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2017; 12(1): 195-207.
- 98 Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, *et al.* Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015; 6: 8715.
- 99 Kumar S, Liu J, Pang P, Krautzberger AM, Reginensi A, Akiyama H, *et al.* Sox9 activation highlights a cellular pathway of renal repair in the acutely injured mammalian kidney. *Cell Rep* 2015; 12(8): 1325-38.
- 100 Takasato M, Vanslambrouck JM, Little MH. Reprogramming somatic cells to a kidney fate. *Semin Nephrol* 2014; 34(4): 462-80.
- 101 Fissell WH, Lou L, Abrishami S, Buffington DA, Humes HD. Bioartificial kidney ameliorates gram-negative bacteria-induced septic shock in uremic animals. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(2): 454-61.
- 102 Humes HD, Funke AJ, Buffington DA. Cell therapy in kidney failure. *Cytotechnology* 1998; 28(1/2/3): 1-8.
- 103 Humes HD, MacKay SM, Funke AJ, Buffington DA. Tissue engineering of a bioartificial renal tubule assist device: *in vitro* transport and metabolic characteristics. *Kidney Int* 1999; 55(6): 2502-14.
- 104 Morizane A, Takahashi J, Shinoyama M, Ideguchi M, Takagi Y, Fukuda H, *et al.* Generation of graftable dopaminergic neuron progenitors from mouse ES cells by a combination of coculture and neurosphere methods. *J Neurosci Res* 2006; 83(6): 1015-27.
- 105 Zheng W, Li Q, Zhao C, Da Y, Zhang HL, Chen Z. Differentiation of glial cells from hiPSCs: potential applications in neurological diseases and cell replacement therapy. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 239.
- 106 Popescu IR, Nicaise C, Liu S, Bisch G, Knippenberg S, Daubie V, *et al.* Neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells survive and differentiate upon transplantation into a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*

- 2013; 2(3): 167-74.
- 107 Lee CT, Bendriem RM, Wu WW, Shen RF. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci* 2017; 24(1): 59.
- 108 Liu Y, Xu HW, Wang L, Li SY, Zhao CJ, Hao J, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration. *Cell Discov* 2018; 4: 50.
- 109 Krejciova Z, Alibhai J, Zhao C, Krencik R, Rzechorzek NM, Ullian EM, *et al.* Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med* 2017; 214(12): 3481-95.
- 110 Evans CH, Huard J. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11(4): 234-42.
- 111 Ferrua F, Aiuti A. Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from bubble babies to an approved drug. *Hum Gene Ther* 2017; 28(11): 972-81.
- 112 Ferrari G, Cavazzana M, Mavilio F. Gene therapy approaches to hemoglobinopathies. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; 31(5): 835-52.
- 113 Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, *et al.* Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2018; 378(16): 1479-93.
- 114 Tremblay JP, Skuk D. Another new “super muscle stem cell” leaves unaddressed the real problems of cell therapy for duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2008; 16(12): 1907-9.

中国细胞生物学学报