

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.045

诱导多能干细胞在医学方面的应用*

董明清 邢书娟 梁晓庆 周宝珍 张敏利

(西安外事学院 陕西 西安 710077)

摘要:2006年,首次报道在体外简单的转录因子就可以使体细胞重编程为多能性细胞。自从这项技术诞生以来,人们为改善诱导多能干细胞(iPSCs)技术做出了巨大努力,发展各种方法用于将重编程因子导入体细胞制备诱导多能干细胞(iPSCs)。诱导多能干细胞(iPSCs)技术彻底改变了人类对疾病发病机制的探索和药物开发的进程。本文简述了诱导多能干细胞的来源及诱导策略、近年来 iPSCs 在疾病建模、药物研发、再生医学等方面的应用,同时探讨了该技术当前存在的问题,并对未来进行了展望。

关键词:iPSCs; 疾病建模; 药物研发; 再生医学

中图分类号:R339.37;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)13-2596-05

The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Medicine*

DONG Ming-qing, XING Shu-juan, LIANG Xiao-qing, ZHOU Bao-zhen, ZHANG Min-li

(Xi'an International University, Xi'an, Shaanxi, 710077, China)

ABSTRACT: In 2006, it was first reported that in vitro transcription factors could reprogram somatic cells into pluripotent cells. Great efforts have been made to improve the technology of induced pluripotent stem cells (iPSCs) since then, and various methods developed to transfer reprogramming factors into somatic cells to generate iPSCs. The iPSCs technology completely changed the exploration of the pathogenesis of disease and the process of drug development. In this article, we briefly review the induction strategies of iPSCs, the application of iPSCs in disease modeling, drug discovery and regenerative medicine. The future and problem of iPSC were also discussed.

Key words: iPSCs; Disease modeling; Drug discovery; Regenerative medicine

Chinese Library Classification(CLC): R339.37; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2596-05

前言

20世纪早期的理论认为细胞分化是单向的不可逆转的,直到1962年,Gurdon等研究表明将一只蛙的体细胞核移植到去核的另一只蛙卵细胞,形成与供核蛙相似外形的蛙,这一研究打破了早期人们对细胞分化的认识^[1,2]。20世纪后期,许多研究报道了克隆羊和小鼠等哺乳动物^[3,4]。

2006年,Takahashi和Yamanaka^[5]将几个转录因子导入已分化的小鼠皮肤成纤维细胞,获得了类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的多能性干细胞,称之为“诱导产生的多能性干细胞”(induced pluripotent stem cells, iPSCs),2007年,Takahashi^[6]利用人的成纤维细胞成功获得了人的 iPSCs。同年,Yu和Thomson等人^[7]还报道通过不同的转录因子组合(POU5F1, Sox2, NANOG, 和 Lin28)诱导出人类 iPSCs。2009年,我国科学家^[8]利用 iPSC 培育出具有繁殖能力的小鼠——“小小”,第一次证明了 iPSCs 与 ESCs 具有相似的多能性。以上研究证实已分化的细胞可以通过少数几个外源因子的导入而被重编程至类似 ESCs 多能性的状态,因而受到了整个生命科学领域的广泛关注。这也表明,细胞比以前认为的更具可塑性,为研究者提供了一个宝贵的工具。结合其他成熟的技术,特别是

基因组编辑和三维(3D)的细胞培养系统,iPSCs 技术使在模式生物以外材料中进行的研究成为可能。

1 诱导多能干细胞的来源及诱导策略

1.1 诱导多能干细胞的来源

理论上每一种细胞都可以被诱导为诱导多能干细胞,2017年wu等^[9]采用单顺反子病毒将 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 这4个重编程因子转导至豚鼠胚胎成纤维细胞中,使其成功重编程为豚鼠诱导多能干细胞(GIPS),检测发现这些细胞具有正常的核型、碱性磷酸酶活性和表达多能性标志基因 Oct4、Sox2 和 Nanog 等特点。Takashi^[10]描述了成年小鼠肝细胞和胃上皮细胞产生 iPSC,研究发现:这些 iPSC 细胞在基因表达上与胚胎干细胞相当,能产生生殖细胞嵌合体,遗传谱系图显示肝脏来源的 iPSC 衍生于白蛋白表达细胞,在多个克隆中没有发现常见的逆转录病毒整合位点,这表明,iPSC 是通过受体定向体细胞的直接重新编程而产生的,并且不需要逆转录病毒整合到特定位点。2011年Joo^[11]等通过逆转录病毒将 Sox2、Oct4、Klf4 基因转导至子宫内膜细胞,使其重编程为诱导多能干细胞(iPSC);与新生儿皮肤成纤维细胞重编程相比,子宫内膜细胞其重编程过程中内源性 Nanog 和 Oct4 基因加速表达,形成的 iPSC 在转

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81571822,81570054,81372129);西安外事学院博士科研启动基金项目(XAIU2018070106)

作者简介:董明清(1970-),博士,教授,主要研究方向:细胞治疗和再生医学,电话:13572138291,E-mail: dongmingqing@xaiu.edu.cn

(收稿日期:2018-12-10 接受日期:2018-12-31)

导后 12 d 可稳定传代,而通常报道的其他类型细胞重编程的 iPSC 需要 3-4 周才可稳定传代,此研究表明,人类子宫内膜表达了多能性因子,与传统的体细胞相比,它能更有效、更快地产生诱导多能干细胞。目前,已被证实的可被重编程的细胞类型有成纤维细胞^[12]、肝细胞和胃上皮细胞^[10]、小鼠 B 淋巴细胞^[13]、小鼠胰岛 b 细胞^[14]、血细胞^[15]、神经干细胞和内皮细胞^[16]、骨髓细胞^[17]、前列腺和尿道细胞^[18]、人角质细胞^[19]及子宫内膜干细胞等^[11]。

1.2 诱导策略

自从 iPSC 技术诞生以来,人们为改善此技术做出了巨大努力,发展了各种方法用于携带重编程转录因子进入细胞产生诱导多能干细胞。

根据载体的不同,目前诱导重编程的方法大致可分为整合型和非整合型。整合型重编程常利用逆转录病毒、慢病毒载体等实现基因导入、整合,实现重编程。非整合型重编程减少对染色体结构的改变,一定程度上降低了基因突变和癌变的可能。如腺病毒^[20]、仙台病毒^[21,22]、逆转录病毒^[12]、转座子^[23,24]、质粒^[25]、微小环 DNA^[26]、重组蛋白^[27,28]、小分子化合物^[29]、RNAs^[30]等方式均可产生诱导多能干细胞。尤其,仙台病毒、游离质粒、非整合重编程因子等方法使用广泛。

Matthias^[20]等人利用非整合的腺病毒瞬时表达 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 基因,将小鼠成纤维细胞和肝细胞重编程为诱导多能干细胞(iPSC),研究发现这些细胞具有 DNA 去甲基化、内源多能基因表达、可形成畸胎瘤等特点。Keisuke^[12]等研究获得了没有病毒载体介导的小鼠 iPSC,他们利用小鼠胚胎成纤维细胞重复转染两种表达质粒(一种是含有 Oct3 / 4、SOX2、KLF4 因子的 cDNA,另一种含有 c-myc 因子的 cDNA),产生没有质粒整合的 iPSC,发现此 iPSCs 诱导的畸胎瘤在移植到小鼠体内后形成嵌合体。近些年来,为了提高 iPSC 的安全性,许多实验室采用了降低外源基因随机整合的方法。2014 年 Norikatsu 等^[30]用成熟双链 RNA (miRNAs) miR-200c 结合 mir-369 和 miR-302 家族将小鼠和人类细胞重编程为诱导多能干细胞,这种重新编程方法不需要基于载体的基因转移,因此它在生物医学研究和再生医学中具有巨大的潜力。此外,hou^[29]等人经过筛选了 10000 个小分子化合物,筛选出 FSK2-Me-5HT 和 D4476 可以作为重编程因子 Oct4 的替代物,使用 VC6TFZ、VPA、E616452、CHIR、D4476 FSK、2-Me-5HT 七个小分子化合物的组合使从小鼠体细胞重编程为多能性干细胞的效率高达 0.2%,化学诱导的多潜能干细胞(cipscs)与胚胎干细胞(ESC)的基因表达谱、表观遗传状态、潜在的分化能力和种系传递等方面类似,这说明小分子化合物也可以用来将体细胞重编程至多能性状态。

2 应用现状及前景

2.1 人诱导多能干细胞疾病建模

iPSCs 广泛应用于疾病建模、药物发现和再生医学^[30,31]。iPSCs 可用于多种疾病模型构建,除了单基因病之外,也可用于遗传复杂的、散发的,甚至传染病等。Ebert 等基于诱导多能干细胞(iPSCs)构建了第一个 SMN1 基因功能缺失的脊髓性肌萎缩的模型,发现病人来源的 iPSCs 分化形成运动神经元的速度

比正常人来源的对照 iPSCs 快^[32]。2009 年 Lee 等用 iPSCs 构建了家族性自主神经功能障碍发病机制研究的模型^[33]。自此,iPSCs 在各种不同的疾病机制研究中发挥作用。Moad 等第一次成功使用膀胱、前列腺、输尿管间质成纤维细胞重新编程为 iPSCs,以此进一步研究形成前列腺和尿道细胞调节分化的机制;同时发现,膀胱、前列腺、输尿管间质成纤维细胞重新编程的 iPSCs 与皮肤成纤维细胞诱导的 iPSCs 相比,前者有更好的分化效率,这表明原器官在诱导多能干细胞分化效率方面有重要作用^[18]。

iPSCs 可用于某些缺陷引起的各种疾病研究。Park 等用腺苷脱氨酶缺乏相关的重症联合免疫缺陷、Shwachman-Bodian-Diamond 综合症、戈谢病 III 型病人的 iPSCs 构建疾病模型,发现这些疾病都遵从孟德尔遗传,为常染色体隐性遗传病,均由对正常造血和免疫功能至关重要的基因点突变引起的,他们还研究了 Duchenne(DMD)、Becker 型肌营养不良症和(BMD)、帕金森病(PD)、亨廷顿病(HD)等^[34]。Briggs^[35]等利用 iPSCs 和表型缺陷结合基因芯片和 RNA 测序技术鉴定了唐氏综合征发病机制的分子网络,构建复杂疾病的表型基因型图谱。此外,iPSCs 模型也用于神经退行性疾病研究,帕金森病(PD)是一种常见的神经退行性疾病,iPSCs 模型研究发现在散发和家族性 PD 患者 LRRK2 (富亮氨酸重复激酶)基因 G2019S 位点发生突变,表明 LRRK2 基因对神经元的存活有重要作用,它的破坏会导致 PD 的发生^[36]。

2015 年, Lee 等用来自李法美尼症候群(Li-Fraumeni syndrome, LFS)家族病人诱导型多能干细胞建立的家族性肿瘤模型,探讨突变型 p53 在骨肉瘤发生发展中的作用^[37]。

2.2 人类 iPSCs 用于药物研发

诱导性多潜能干细胞(iPSC)技术是革命性的医学科学,为研究疾病发病机制和探索新的分子治疗靶点、药物发现和开发提供平台。

Choi 使用 α -1 抗胰蛋白酶(AAT)缺陷患者的诱导多能干细胞建立了高效的新候选药物筛选平台,利用建立的临床化合物库,对 Johns Hopkins 药物库进行筛选,发现五种临床药物可减少不同患者 iPSC 来源的肝细胞样细胞 AAT 的积累,研究结果表明利用 iPSC 疾病模型进行大规模药物筛选的可行性^[38]。还有研究表明 iPSC 细胞也有助于研究药物 ADME(吸收、分布、代谢、排泄),可以加速药物研发^[39]。Carne 等^[40]研究线粒体 DNA 突变引起的神经系统疾病时发现,人类 iPSCs 来源的神经祖细胞(NPCs)保留双亲线粒体 DNA 图谱并表现出向氧化磷酸化的代谢,使用 iPSC 来源的异常高的线粒体膜电位(MMP)突出的 NPCs 对 FDA 批准的药物进行筛选,发现 avanafil 能够部分挽救钙缺乏病人的 NPC 和分化的神经元,研究结果表明,iPSC 来源的 NPCs 是神经线粒体疾病药物发现的有效模式。Garbes 等人利用 iPSCs 疾病模型重现临床研究评估脊髓性肌萎缩患者的丙戊酸反应性^[41]。许多研究已经证明 iPSCs 模型在各种疾病药物筛选中的可行性,包括视网膜疾病(如 AMD^[42]、神经系统疾病^[43](如自闭症谱系障碍^[36]、蒂莫西综合征^[44])和心脏疾病(如儿茶酚胺敏感性多形性心动过速)^[45,46]。

研究报道,人类 iPSCs 来源的心肌细胞可以作为一个敏感的而强大的测试药物致心律失常的模型^[47]。在另一项研究中,

Liang 等人利用遗传性心脏疾病包括遗传性 LQTS, 家族性肥厚型心肌病, 和家族性扩张型心肌病患者体细胞产生人类 iPSCs^[48], 由这些 iPSCs 分化产生的心肌细胞用于模拟疾病表型和评估几个已知的心脏毒性药物的敏感性, 研究结果还表明, iPSCs 适用于目前临床前药物代谢和毒性筛选。

Takayama^[49]等人研究表明, 人类 iPSCs 来源的肝细胞有可能预测个体药物代谢和药物的反应的差异, 由于细胞色素 P450 基因多态性与个体的药物代谢能力的差异有关, 不同个体生成的人类 iPSCs 其 CYP2D6 基因单核苷酸多态性不同, 与原代肝细胞相比, 来自人类 iPSCs 的那些特异性细胞色素 P450 保留供体的活性水平与药物反应。这些结果表明, 人类 iPSCs 来源的肝细胞不仅对病人识别高风险的肝毒性, 而且可以对药物反应性的患者进行分层。

2.3 再生医学

2014 年, 日本科学家首次利用 iPSCs 来源的视网膜色素上皮细胞对黄斑变性患者进行临床试验^[50], 研究证明 iPSCs 分化的视网膜色素上皮对视网膜色素变性和年龄相关黄斑变性 (AMD) 患者有益^[51]。2015 年广东省产科重大疾病重点实验室, 利用 β -地中海贫血 (b-thal) 病人的诱导产生多能干细胞 (iPSC), 然后利用 CRISPR/Cas9 技术对 iPSCs 的致病突变 / 缺失基因 b-globin 进行同源重组修饰 (HBB), 对其衍生的造血干细胞 (HSC) 进行移植, 发现经改造的 iPSCs 衍生的造血干细胞 (HSC) 为治疗本病的理想治疗方案^[52]。

3 存在的问题

3.1 安全性及基因不稳定性

人类 iPSCs 与 ESCs 相比, 在标记表达、自我更新能力和分化潜能方面高度相似。然而, iPSCs 毕竟不能等同于 ESCs。更精细的全基因组遗传和表观遗传学研究表明, 两者之间也存在着以下差别: 基因不稳定性, 包括表观遗传记忆在人类诱导多能干细胞的持续存在; 不同的 DNA 甲基化特征; 以及不同程度的遗传变异^[53]。通过逆转录病毒载体插入的遗传物质可以随机整合到宿主基因组中, 从而引起遗传失常和畸胎瘤形成^[54]。Zhang 等利用生物信息学工具分析了 11 种不同细胞重编程形成的 iPSCs 细胞系所有可用的数据, 发现 iPSC 中 593 个共有基因, 这 593 个基因中有 209 个在人类肿瘤细胞系和肿瘤组织中表达, 而且 5 个癌基因在这些 iPSCs 中超表达, 这表明 iPSC 中的共有基因的表达有一定的肿瘤和癌症的发生风险^[55]。为了探讨人 iPSCs 的致癌倾向, 科学家对 49 个人类 iPSCs 细胞系和 10 个人的 ESCs 细胞系的基因表达和 DNA 甲基化进行了研究, 发现 7 个 iPSCs 克隆保留大量未分化细胞, 甚至在神经分化培养和移植到小鼠脑内后形成畸胎瘤, 这些有缺陷的分化细胞系中几种基因呈现高水平的基因表达, 这些包括人类内源性逆转录病毒长末端重复序列, 人 iPSC 在神经分化过程中有异常的基因表达和缺陷潜能^[56]。

3.2 诱导效率低及投入成本高

虽然诱导多能干细胞的重编程的技术有所突破, 但是诱导效率太低是目前 iPSCs 应用于临床必须跨越的一大障碍。虽然 iPSC 集落形成的效率随供体的不同而有所不同, 但基础因子的内源性表达与细胞重编程效率呈正相关。有基础内源性因子

表达的供体细胞形成 iPSC 克隆的平均效率为 $0.49 \pm 0.10\%$, 一般转导效率在 0.31-0.66%, 新生儿皮肤成纤维细胞平均转导效率为 $0.03 \pm 0\%$, 形成 iPSC 克隆的平均效率为 $0.02 \sim 0.03\%$ ^[11]。此外, 当多个样本需要重新编程时, iPSCs 衍生的高成本是限制大多数实验室发展的一个主要因素。而且, 在诸多广泛应用的整合方法中, 仙台病毒和 mRNA 的方法需要昂贵的试剂进行重编程, 而 episoma 方法需要大量的起始细胞, 则需要投入高成本劳动力。

重编程效率的提高可以有多种方法, 包括不同诱导因子的特异性组合^[57]、miRNAs^[58]、下调抑制因子^[59]、上调 / 抑制一些与细胞增殖相关的信号通路等^[60]。

4 结语 - 未来展望

随着人类 iPSCs 疾病模型和药物发现的潜在的日益重视, 已经全面建立了人 iPSCs 临床和遗传信息库, 如人诱导性多能干细胞计划、StemBANCC、加利福尼亚再生医学研究所、纽约干细胞基金会等, 是科学家们研究人发育和疾病的强大的资源平台^[61]。预计 2018 年欧盟《通用数据保护条例》的实施将对 iPSCs 生物数据库的生成、存储和用户访问产生一定影响^[62]。

一种新技术在发展之初都存在许多理论和技术上的问题, 需要不断的实验证实与解决。生物治疗是未来疾病治疗的主要策略之一, 相信随着研究的逐步深入, 重编程机理的阐明, iPSC 技术的不断进步, 在不远的将来, iPSC 最终将代替 ES 细胞和治疗性克隆应用于临床疾病的治疗, 造福人类。

参考文献 (References)

- [1] Gurdon J B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1962, 10: 622-640
- [2] Gurdon J B, Elsdale T R, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei [J]. *Nature*, 1958, 182(4627): 64-65
- [3] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374
- [4] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813
- [5] 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
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872
- [7] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920
- [8] Zhao X, Li W, Z L. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *China Basic Science*, 2009, 461
- [9] Wu Y, Li O, He C, et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells from guinea pig fetal fibroblasts [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 3690-3698

- [10] 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
- [11] Park J H, Daheron L, Kantarci S, et al. Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3): 1080-1089
- [12] 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
- [13] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency [J]. *Cell*, 2008, 133(2): 250-264
- [14] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-894
- [15] Li Y, Liu T, Van Halm-Lutterodt N, et al. Reprogramming of blood cells into induced pluripotent stem cells as a new cell source for cartilage repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 31
- [16] Tat P A, Sumer H, Jones K L, et al. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(5): 525-536
- [17] Cheng Z, Ito S, Nishio N, et al. Establishment of induced pluripotent stem cells from aged mice using bone marrow-derived myeloid cells [J]. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3(2): 91-98
- [18] Moad M, Pal D, Hepburn A C, et al. A novel model of urinary tract differentiation, tissue regeneration, and disease: reprogramming human prostate and bladder cells into induced pluripotent stem cells [J]. *Eur Urol*, 2013, 64(5): 753-761
- [19] Aasen T, Raya A, Barrero M J, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1276-1284
- [20] Eggenschwiler R, Cantz T. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. *Hepatology*, 2009, 49(3): 1048-1049
- [21] Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009, 85(8): 348-362
- [22] Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(6): 4760-4771
- [23] Yusa K, Rad R, Takeda J, et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 363-369
- [24] 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
- [25] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences [J]. *Science*, 2009, 324(5928): 797-801
- [26] Jia F, Wilson K D, Sun N, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells[J]. *Nat Methods*, 2010, 7(3): 197-199
- [27] 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
- [28] Kim D, Kim C H, Moon J I, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472-476
- [29] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651-654
- [30] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 633-638
- [31] Singh V K, Kalsan M, Kumar N, et al. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 2
- [32] Ebert A D, Yu J, Rose F F Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-280
- [33] Lee G, Papapetrou E P, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs [J]. *Nature*, 2009, 461(7262): 402-406
- [34] Park I H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886
- [35] Briggs J A, Mason E A, Ovchinnikov D A, et al. Concise review: new paradigms for Down syndrome research using induced pluripotent stem cells: tackling complex human genetic disease [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(3): 175-184
- [36] Nguyen H N, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 267-280
- [37] Lee D F, Su J, Kim H S, et al. Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2015, 161(2): 240-254
- [38] Choi S M, Kim Y, Shim J S, et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells [J]. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2458-2468
- [39] Bahadduri P M, Polli J E, Swaan P W, et al. Targeting drug transporters - combining in silico and in vitro approaches to predict in vivo[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 637: 65-103
- [40] Lorenz C, Lesimple P, Bukowiecki R, et al. Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(5): 659-674 e9
- [41] Garbes L, Heesen L, Holker I, et al. VPA response in SMA is suppressed by the fatty acid translocase CD36 [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(2): 398-407
- [42] Williams E C, Zhong X, Mohamed A, et al. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(11): 2968-2980
- [43] Marchetto M C, Carromeu C, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2010, 143(4): 527-539

- [44] Pasca S P, Portmann T, Voineagu I, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome[J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1657-1662
- [45] Jung C B, Moretti A, Mederos Y, et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3): 180-191
- [46] Suh W. A new era of disease modeling and drug discovery using induced pluripotent stem cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(1): 1-12
- [47] Navarrete E G, Liang P, Lan F, et al. Screening drug-induced arrhythmia [corrected] using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays[J]. *Circulation*, 2013, 128(11 Suppl 1): S3-13
- [48] Liang P, Lan F, Lee A S, et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity [J]. *Circulation*, 2013, 127(16): 1677-1691
- [49] Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, et al. Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(47): 16772-16777
- [50] Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, et al. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa[J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 45
- [51] Li Y, Tsai Y T, Hsu C W, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa[J]. *Mol Med*, 2012, 18: 1312-1319
- [52] Song B, Fan Y, He W, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(9): 1053-1065
- [53] Robinton D A, Daley G Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy[J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 295-305
- [54] Howe S J, Mansour M R, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3143-3150
- [55] Zhang G, Shang B, Yang P, et al. Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(6): 955-964
- [56] Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, et al. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(51): 20569-20574
- [57] Ieda M, Fu J D, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 375-386
- [58] Yu K R, Shin J H, Kim J J, et al. Rapid and Efficient Direct Conversion of Human Adult Somatic Cells into Neural Stem Cells by HMGA2/let-7b[J]. *Cell Rep*, 2015
- [59] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway [J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1132-1135
- [60] Alexandrova E M, Moll U M. Generation of p53-deficient induced pluripotent stem cells from mouse embryo fibroblasts [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 962: 157-164
- [61] Soares F A, Sheldon M, Rao M, et al. International coordination of large-scale human induced pluripotent stem cell initiatives: Wellcome Trust and ISSCR workshops white paper[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(6): 931-939
- [62] Morrison M, Bell J, George C, et al. The European General Data Protection Regulation: challenges and considerations for iPSC researchers and biobanks[J]. *Regen Med*, 2017, 12(6): 693-703

(上接第 2578 页)

- [12] Kato, H. Kamo, A. Kobayashi, S, et al. Imamura. Quantitative evaluation of oral function in acute and recovery phase of idiopathic facial palsy; a preliminary controlled study [J]. *Clinical Otolaryngology*, 2013, 38(3): 231-236
- [13] Ferreira, Santos, Duarte. Idiopathic facial palsy and physical therapy: an intervention proposal following a review of practice [J]. *Physical Therapy Reviews*, 2011, 16(4): 237-243
- [14] Song An-ping, Xu Guo-liang, Ding Xue-hai, et al. Assessment for facial nerve paralysis based on facial asymmetry [J]. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, 2017, 40(4): 851-860
- [15] S.K. Gairing, W.F. Haupt. Time course and prognostic value of neurophysiological examination methods in idiopathic facial palsy (Bell's palsy)[J]. *Clinical Neurophysiology*, 2006, 118(4): e32-e32
- [16] Keishi Fujiwara, Yasushi Furuta, Naoko Yamamoto, et al. Factors affecting the effect of physical rehabilitation therapy for synkinesis as a sequela to facial nerve palsy [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2018, 45(4): 732-739
- [17] Simmons Z, Epstein DL, Borg B, et al. Reproducibility of motor unit number estimation in individual subjects[J]. *Muscle Eleven*, 2001, 24(4): 467-473
- [18] Henderson RD, McClelland R, Dauhe JR. Effect of changing data collection parameters on statistical motor unit number estimates[J]. *Muscle Nerve*, 2003, 27(3): 320-323
- [19] Swoboda KJ. Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy[J]. *Muscle Nerve*, 2002, 25(3): 445-447
- [20] Jillapalli D, Bradshaw DY, Shefner JM. Motor unit number estimation in the evaluation of focal conduction block [J]. *Muscle Nerve*, 2003, 27(6): 676-681
- [21] Artug Tugrul, Oguz-Akarsu Emel, Sirin Nermin G, et al. A novel automatized F-wave MUNE method: A preliminary analysis [J]. *Clinical Neurophysiology*, 2018, 129(5): 179-180
- [22] Christina Shen-Zhuang Nielsen, Michael Vaeggemose, Anna Bystrup, et al. O26 MScanFit MUNE in examining motor unit loss in GBS[J]. *Clinical Neurophysiology*, 2017, 128(9): 188-188
- [23] Hatice Tankisi. Estimating motor unit number from CMAP scans-MS can FIT MUNE[J]. *Clinical Neurophysiology*, 2017, 128(9): 201-201