

# 诱导多能干细胞在骨外科组织再生修复中：如何尽快实现临床应用？

何瑞轩，赵亮(南方医科大学南方医院关节与骨病外科，广东省广州市 510515)

## 文章亮点：

- 1 此问题的已知信息：干细胞已广泛用于骨缺损修复，但经典的人体干细胞如胚胎干细胞、间充质干细胞，存在如获取困难、伦理限制等局限，而诱导多能干细胞同样有着稳定的多能分化潜力，而且其制备方法摆脱了伦理学限制，一跃成为干细胞领域的研究热点。
- 2 文章增加的新信息：目前研究提示除了传统核移植、病毒载体等诱导方法，还报道了许多通过小分子化合物诱导的方法。小分子化合物诱导可一定程度上减少传统诱导方法带来的感染或免疫反应的概率，使干细胞制备更加安全、便捷。另外近几年的研究逐渐开展至软骨、肌腱等研究上，使得骨外科领域的范围进一步拓展。
- 3 临床应用的意义：诱导多能干细胞在骨外科学方面的突破，可以使组织缺损修复进入一个新的发展阶段，随着替代材料的进一步发展，干细胞复合支架材料有望部分或完全替代目前的缺损修复方法。

## 关键词：

干细胞；诱导；诱导多能干细胞；组织修复再生；骨；软骨；肌腱

## 主题词：

多能干细胞；诱导多功能干细胞；骨和骨组织；再生

## 摘要

**背景：**干细胞结合替代材料修复骨科组织缺损具有良好的应用前景，其中诱导多能干细胞有着比其他干细胞更优的来源及细胞特性，已成为干细胞领域的研究热点。

**目的：**综述诱导多能干细胞的研究历史、制备方法、细胞特性及目前在骨科领域的研究进展。

**方法：**利用计算机检索中国知网、PubMed等数据库1999至2014年间关于诱导多能干细胞及其应用于骨科领域研究的文献，选取具有代表性、创新性的研究成果进行内容论证。

**结果与结论：**研究表明诱导性多能干细胞在骨组织修复工程中表现出了相当有应用前景的优势，诱导性多能干细胞与各种支架材料都有着良好的相容性，在不同的支架中都保持着良好的成骨分化潜能。软骨再生方面的各种检测技术、小分子化合物等已逐步被发现，但如何有效地将诱导性多能干细胞向软骨方向诱导分化并实现临床应用仍需进一步研究。

何瑞轩，赵亮. 诱导多能干细胞在骨外科组织再生修复中：如何尽快实现临床应用？[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(23):3761-3767.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.23.026

## Induced pluripotent stem cells in bone tissue regeneration: how to achieve clinical application in orthopedic surgery as soon as possible?

He Rui-xuan, Zhao Liang (Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Biomaterial combined with stem cells is revealing a bright future in bone tissue regeneration in orthopedic surgery. Induced pluripotent stem cells have better cell sources and characteristic, which have become a hotspot of stem cell field.

**OBJECTIVE:** To review the research history, preparation method, cell characteristics of induced pluripotent stem cells and the research developments in orthopedic surgery so far.

**METHODS:** A computer-based search of CNKI and PubMed was performed for articles about induced pluripotent stem cells and their applications in the field of orthopedic surgery published from 1999 to 2014. Typical and creative research achievements were enrolled in result analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Studies have shown that induced pluripotent stem cells have a potential application prospect in bone tissue regeneration, and they also show a satisfying biocompatibility with various scaffold materials, in which, the induced pluripotent stem cells can maintain a good osteogenetic potential. Detection methods and small-molecule compounds have been discovered gradually for cartilage regeneration. But how to effectively induce the chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells and to realize the clinical applications need further research.

**Subject headings:** Multipotent Stem Cells; Induced Pluripotent Stem Cells; Bone and Bones; Regeneration

何瑞轩，男，1986年生，广东省惠州市人，汉族，硕士，医师，主要从事骨与软骨再生及组织修复材料等研究。

通讯作者：赵亮，博士，副主任医师，副教授，南方医科大学南方医院关节与骨病外科，广东省广州市 510515

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)23-03761-07

稿件接受: 2015-05-04

http://www.crter.org

He Rui-xuan, Master, Physician, Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhao Liang, M.D., Associate chief physician, Associate professor, Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-05-04

He RX, Zhao L. Induced pluripotent stem cells in bone tissue regeneration: how to achieve clinical application in orthopedic surgery as soon as possible? Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(23):3761-3767.

## 0 引言 Introduction

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSc)可来源于人和动物细胞, 是通过向分化的体细胞转入特定的外源性转录因子进行重编程, 从而获得的一类在细胞形态、细胞增殖等方面与胚胎干细胞类似, 具有自我更新能力和多能性的细胞。2006年8月, Takahashi等<sup>[1]</sup>首次通过反转录病毒载体将4个基因(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)转入成年小鼠成纤维细胞中, 使其重编程为具有胚胎干细胞特性的诱导多能干细胞(图1)。2007年, Takahashi等<sup>[2]</sup>再次使用同样的4个基因组合和Yu等<sup>[3]</sup>使用另外4种基因组合(OCT4, SOX2, NANOG, LIN28)都成功地将人成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞。诱导性多能干细胞已被证明具有向3个胚层多种细胞分化的能力, 如心肌细胞<sup>[4-5]</sup>、肺上皮细胞<sup>[6-7]</sup>、神经细胞<sup>[8-9]</sup>、造血细胞<sup>[10-11]</sup>、成骨细胞<sup>[12-13]</sup>、软骨细胞等<sup>[14-15]</sup>, 故具有多学科临床应用的巨大研究潜力。由于此项技术不使用卵细胞和胚胎等物质, 克服了胚胎干细胞所牵涉的伦理问题<sup>[16]</sup>, 成为细胞重编程领域的重大突破, 使得诱导性多能干细胞研究处于干细胞领域的热点研究。

本文就诱导性多能干细胞在骨组织再生修复中的研究进展作出综述。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 第一作者在2014年3至8月期间, 检索中国知网及PubMed数据库, 中文检索词为“诱导多能干细胞, 骨, 软骨, 肌腱”, 英文检索词为“induced pluripotent stem cells, orthopedics, bone defect, cartilage/chondral defect, tendon”, 检索时限1999至2014年, 共获得相关文献300余篇, 经筛选共纳入文献88篇。

### 1.2 资料筛选及评价

**纳入标准:** 有新颖的或独创性的诱导多能干细胞制备方法、检测方法, 与骨外科相关的基础或临床研究。

**排除标准:** 无新颖或独创性结果, 相关基础研究或临床研究非骨外科范畴。

**1.3 资料提取与文献质量评价** 共纳入文献88篇, 其中SCI收录的英文文献88篇, 纳入文献皆提出创新性的观点或方法。

## 2 结果 Results

**2.1 诱导性多能干细胞研究历史** 诱导性多能干细胞在细胞形态、生长特性、干细胞标志物表达等方面与胚胎干细胞非常相似。胚胎干细胞来源于哺乳动物胚泡内细胞团, 保持着细胞的多能性同时能非定向地分化成为3

个胚层的多种细胞<sup>[17]</sup>。胚胎干细胞曾经应用于一些疾病的治疗<sup>[18]</sup>, 如帕金森病<sup>[19]</sup>、心脏病<sup>[20]</sup>、糖尿病等<sup>[21]</sup>, 但由于胚胎干细胞来源于人类胚胎, 临床上的使用伴随着伦理学及异体细胞移植带来的排斥反应等问题, 而避免这些问题的最佳方法就是寻找到一种从患者自身细胞出发的途径。

**2.1.1 生物重编程** 克隆技术的发展告诉了人们, 将分化成熟的体细胞核通过核移植技术转移至卵母细胞中, 可以使细胞核重编程为未分化状态<sup>[22]</sup>。Cowan等<sup>[23]</sup>及Tada等<sup>[24]</sup>相继利用细胞融合技术将成年人体细胞与胚胎干细胞融合, 成功将成年人体细胞重编程为具有多能分化能力的干细胞。以上各种成就给科学家们一种启示: 未受精的卵细胞或胚胎干细胞内可能含有某些细胞因子, 可以使分化成熟的细胞重新获得并维持多能分化特性, 因此才有了对于细胞因子的探索及Yamanaka、Thomson等人的重大成功, 从此诱导性多能干细胞的研究迈入了一个蓬勃发展的阶段。随后陆续报道了多种诱导性多能干细胞的获取新方法, 如合成mRNA法<sup>[25-26]</sup>、重组蛋白法<sup>[27]</sup>, 但绝大多数获取都是通过潜在有害性的反转录病毒或慢病毒载体整合的方法, 存在改变内源性基因序列的问题, 为了克服这种安全问题, Stadtfeld等<sup>[28]</sup>科学家提出了非反转录病毒整合性方法, 如腺病毒载体。而进一步的研究指出, 自杀基因的应用是制备诱导性多能干细胞的理想方法<sup>[29]</sup>, Cheng等<sup>[30]</sup>通过插入删减过的单纯疱疹病毒deltaTK基因, 成功地在不影响诱导性多能干细胞多能分化及自我更新能力的情况下, 敲除了其中不稳定的deltaTK基因。Chen等<sup>[31]</sup>团队则发现带有deltaTK及CodA的诱导性多能干细胞, 在EF1- $\alpha$ 及Nanog启动子的控制下, 可以更有效地清除未分化细胞, 这样可显著地减少畸胎瘤形成的风险。但以上各种方法都属于生物合成诱导性多能干细胞方法, 仍未能克服制备效率较低、因制备方法不同而造成的细胞分化潜能欠均一等缺点。

**2.1.2 理化诱导** 早在2006年, Chen等<sup>[32]</sup>已经通过筛选小分子化合物发现一种具有维持小鼠胚胎干细胞全能性的嘧啶类化合物, 并将其命名为“Pluripotin”, 2013年, Li等<sup>[33]</sup>进一步使用高通量筛选, 从上万种小分子化合物中鉴定出一种由7种小分子化合物组成的组合, 此组合能够让小鼠体细胞产生多能性干细胞, 制备效率与基因整合技术相当, 约为0.2%。随后, Hou等<sup>[34]</sup>筛选出另外7种小分子化合物组合同样可以高效地诱导小鼠体细胞产生多能性干细胞, 他们将这种多能性干细胞称作化学诱导多能干细胞。

**2.2 诱导性多能干细胞生物学特性** 各项研究表明, 在特定的基因或蛋白表达形式、倍增时间、染色体甲基化形

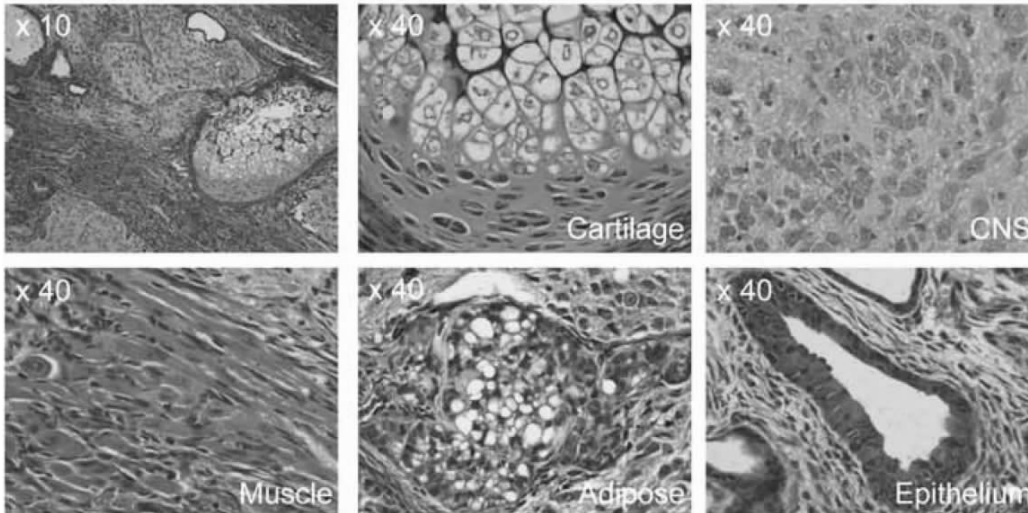


图1 第1代经典的利用卵母细胞核移植方法制备的诱导多能干细胞, 体外实验表现具有多能分化潜能, 图中所示分别为多能干细胞分化为软骨、中枢神经系统、平滑肌、脂肪、上皮等三胚层成分<sup>[1]</sup>

式、胚状体形成、畸胎瘤形成、多能性及分化能力等方面, 诱导性多能干细胞与胚胎干细胞在许多方面有着诸多相似之处<sup>[35-36]</sup>。

**2.2.1 表面标记** 诱导性多能干细胞表达包括SSEA-3、SSEA-4、肿瘤相关抗原(TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E)以及NANOG蛋白在内的胚胎干细胞特异性表面抗原<sup>[2, 37-39]</sup>。荧光定量PCR检测表明诱导性多能干细胞表达多种未分化胚胎干细胞标志基因, 如: OCT3/4, SOX2, NANOG, 生长分化因子3(GDF3), 下调因子1(REX1), 成纤维生长因子4(FGF4), 胚胎细胞特异性基因1(ESG1), 多能相关基因2(DPPA2), 多能相关基因4(DPPA4)等, 相应基因的表达蛋白产物也与胚胎干细胞有着高度的一致性<sup>[1, 40-42]</sup>。

**2.2.2 多分化潜能** 此外, 诱导性多能干细胞表现出很高的端粒酶活性, 由此检测出的倍增时间与既往报道的胚胎干细胞倍增时间相当<sup>[43-44]</sup>。悬浮培养条件下胚状体形成能力是检验诱导性多能干细胞分化能力的重要指标<sup>[45-46]</sup>, 诱导性多能干细胞也表现出了与胚胎干细胞相当的分化水平, 进一步的小鼠畸胎瘤形成实验也证实了诱导性多能干细胞具有向三胚层分化的潜能<sup>[47-50]</sup>。

**2.3 诱导性多能干细胞在骨科组织修复领域研究进展** 骨缺损是目前骨科面临的巨大挑战之一<sup>[51-53]</sup>, 骨组织工程基于种子细胞、支架材料、诱导成骨的细胞因子3大因素, 目前骨组织工程最常用的种子细胞是人骨髓间充质干细胞, 但随着年龄增长、骨质疏松、风湿性关节炎等发生, 其更新及增殖能力会逐渐下降, 由此造成相当大部分患者无法获得自体骨髓间充质干细胞的供给<sup>[54-57]</sup>。诱导性多能干细胞的诸多优点使其具有替代骨髓间充质干细胞成为骨组织工程新型种子细胞

的巨大潜力。

### 2.3.1 诱导性多能干细胞的成骨诱导

**未分化诱导性多能干细胞的培养:** 利用新鲜分离的鼠胚胎成纤维细胞作为滋养层细胞, 未分化的诱导性多能干细胞培养在特定的细胞培养液中, 细胞培养液成分比不尽相同, 主要成分基本包括培养基、体积分数为15%胎牛血清、谷氨酸盐、抗生素、非必需氨基酸、 $\beta$ -巯基乙醇、白细胞抑制因子。培养传3代(约1周)后的诱导性多能干细胞即可收集备用<sup>[35, 58-61]</sup>。

**胚状体的形成:** 将备用细胞转移至胚状体形成培养液中利用悬滴法培养, 此时培养液主要包括培养基、体积分数为20%胎牛血清、1 mmol/L左旋谷酰胺、1%非必需氨基酸、100 mmol  $\beta$ -巯基乙醇, 胚状体形成约需10 d<sup>[62-65]</sup>。同时有研究表明, 体外培养诱导性多能干细胞向成骨诱导可跳过胚状体形成这一步骤, 这一发现说明胚状体形成在诱导性多能干细胞成骨诱导过程中并不是必不可少的, 这将极大地提高诱导性多能干细胞用于骨组织工程的效率<sup>[66-68]</sup>。

**成骨诱导:** 胚状体制成细胞悬液后转移至明胶镀膜预处理后的培养板中, 利用成骨培养液继续培养, 成骨培养液主要成分为维生素C、地塞米松、1, 25-二羟维生素D3及 $\beta$ -甘油磷酸酯等, 整个成骨诱导需要三四周<sup>[69-71]</sup>。2010年, Kao等<sup>[72]</sup>发现白藜芦醇能通过增加钙沉积, 上调成骨标记物如Runx2、骨调素(OPN)、骨唾液蛋白(BSP)及减小弹性系数等作用促进诱导性多能干细胞的成骨分化, 且白藜芦醇还能起到一定的对抗地塞米松诱导细胞凋亡的效果。后续的裸鼠动物实验还证明了白藜芦醇促进成骨分化的同时还能抑制畸胎瘤形成, 这是首个阐明活体内诱导性多能干细胞成骨分化潜能的研究。

### 2.3.2 诱导性多能干细胞在骨、软骨、肌腱组织修复中的研究进展

**骨组织修复:** Ye等<sup>[59]</sup>研究团队把SATB2诱导的诱导性多能干细胞种植到一种直径约4 mm, 厚度为2 mm的盘状亲水性的丝心蛋白支架中, 在体外培养条件下获得良好的多向分化潜能, 用于修复成年小鼠标准颅骨缺损, 5周后检测新生骨形成区域, SATB2诱导的诱导性多能干细胞移植组为(59.58±7.00)%, 而单纯支架组仅为(3.43±1.12)%。Ardeshty等<sup>[69]</sup>则利用血浆预处理的静电纺丝制作支架, 种植诱导性多能干细胞用以修复大鼠颅骨标准骨缺损(8 mm), 其在体外实验中, 碱性磷酸酶活性、钙盐沉积等指标均高于对照组, 而在体内动物实验中, 通过组织学、影像学等检查同样得出了具有统计学差异的结果, 在新生骨及矿化骨面积上, 实验组均优于其余对照组, 且实验过程中动物未发生明显并发症或致死情况。Hynes等<sup>[73]</sup>则使用溴脱氧尿嘧啶示踪的人包皮来源诱导性多能干细胞, 并将其诱导为间充质干细胞, 用以修复无胸腺小鼠的牙槽下颌骨标准骨缺损(约为2 mm×3 mm), 诱导性多能干细胞-间充质干细胞移植前未进行其他特定分化诱导, 也未使用特定的材料支架, 仅用凝血因子预处理, 2周后处死实验动物后, 免疫染色提示诱导性多能干细胞出现在新生的纤维组织、矿化组织及牙周膜样组织, 实验组骨缺损全长填充了大量新生矿化组织, 相比之下, 对照组只获得了少量新生组织, 并且仅仅局限在缺损的边缘。经测定实验组新生骨组织/总缺损面积大于对照组, 差异有显著性意义。Tang等<sup>[35]</sup>及Liu等<sup>[74]</sup>团队则利用成人骨髓CD34<sup>+</sup>细胞来源的诱导性多能干细胞及新型生物功能化磷酸钙骨水泥支架构建骨组织修复材料, 体外实验中各项成骨检测都表现出了极富研究前景的结果。

更多相关研究不再赘述, 以上研究表明诱导性多能干细胞在骨组织修复工程中表现出了相当有应用前景的优势, 诱导性多能干细胞与各种支架材料都有着良好的相容性, 在不同的支架中都保持着良好的成骨分化的潜能。

**软骨组织修复:** 目前诱导性多能干细胞在组织工程中骨组织修复方面报道居多, 软骨组织修复方面相对较少, 但是现有的研究表明诱导性多能干细胞在软骨组织修复领域也有着可深入挖掘的潜力<sup>[75-77]</sup>。Saito等<sup>[78]</sup>从Col2a1-EGFP转基因小鼠体内提取胚胎成纤维细胞, 用经典反转录病毒载体方法重编程为诱导性多能干细胞, 利用免疫荧光技术实现了实时监测软骨形成分化, 并确认TD-198946, insulin, 骨形态发生蛋白2(BMP-2)及转化生长因子β1(TGF-β1)为有效的促软骨形成因子。Johnson等<sup>[79]</sup>对间充质干细胞进行了一个化学筛选并发现一个叫做kartogenin的小分子, 它可诱使间充质干细

胞转变成软骨细胞而促进软骨的产生。当给有关节炎样症状的小鼠局部给予kartogenin, 可触发其体内的软骨发育。该分子是通过中断细丝蛋白A和CBF beta这两个蛋白之间的相互作用而起作用的, 而其结果是该分子控制了肌肉骨骼发育中起到关键性作用的一个蛋白家族的表达。此外Yano等<sup>[80]</sup>还发表了针对Runx1的靶向药的相关报道。

虽然软骨再生方面的各种检测技术、小分子化合物等逐步被发现, 然而能有效地将诱导性多能干细胞诱导软骨分化并实现临床应用的方法尚未被建立起来。考虑到诱导性多能干细胞具有与骨髓间充质干细胞相当的多能分化能力, 可替代间充质干细胞成为组织工程理想的种子细胞, 随着社会老龄化的加重, 骨性关节炎发病率的上升, 软骨再生将在组织工程中居于越来越重要的地位。

**肌腱修复:** 在肌腱撕裂、损伤领域, 干细胞研究报道极少且局限于体外及动物实验<sup>[81-82]</sup>, 既往研究表明, 人胚胎干细胞来源的间充质干细胞经过纤维蛋白凝胶预处理后, 可用于修复大鼠腓骨缺损(1 mm×4 mm), 且无论在结构上还是功能上都能显著提高肌腱的修复效率<sup>[83]</sup>。另外许多研究也提供了利用胚胎干细胞修复缺损肌腱组织的可能性<sup>[84-88]</sup>, 但是诱导性多能干细胞是否能替代胚胎干细胞在肌腱修复领域的角色及何时能用于临床应用, 始终是个未知数。

### 3 展望 Prospects

综上所述, 诱导性多能干细胞在组织工程中有巨大的优势, 可以从成人体细胞中重编程得到, 虽在一定程度上克服了临床应用的相关伦理问题及异体细胞移植带来的排斥反应等问题, 但制备效率较低, 如何提高细胞性能均一性, 如何在人体内精确控制其分化增殖, 如何降低其肿瘤形成的风险, 是否能完美替代胚胎干细胞等都是现在阻碍诱导性多能干细胞进一步走向临床应用的几座大山。就目前研究的阶段性成果看来, 小分子化合物的诱导方法克服了第1代核移植制备法的伦理问题, 也克服了第2代病毒载体诱导方法的潜在感染风险, 可成为下一步研究的重点关注方向, 但如何从数量巨大的化合物中筛选出更少数量、更直接高效, 同时提高成骨、成软骨、成肌腱分化效率的组合, 研究之路任重而道远, 而随着3D技术、立体细胞培养技术、相关力学研究方法以及生物材料研究的不断进步, 相信对于个体化材料复合诱导多能干细胞的研究工作将更趋于多样化。

未来的研究当中, 如能找到克服上述阻碍的方法, 将使诱导性多能干细胞拥有更广阔的应用前景, 将组织修复效率和效果提高到另一个全新的高度, 必将带来人体组织损伤修复的巨大革命。

**致谢:**感谢南方医科大学南方医院关节与骨病外科赵亮老师对文章架构及语言方面给予的指导,还感谢南方医科大学南方医院关节与骨病外科全体医护人员对本人科研工作的指导及支持。

**作者贡献:** 文献检索、资料收集、文章撰写为何瑞轩, 题目拟定、草稿修改为赵亮。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 未涉及伦理冲突的内容。

**学术术语:** 诱导性多能干细胞-可来源于人和动物细胞, 是通过向分化的体细胞转入特定的外源性转录因子进行重编程, 从而获得一类在细胞形态、细胞增殖等方面与胚胎干细胞类似, 且具有自我更新能力和多能性的细胞。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
- [3] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-1920.
- [4] van Laake LW, Qian L, Cheng P, et al. Reporter-based isolation of induced pluripotent stem cell- and embryonic stem cell-derived cardiac progenitors reveals limited gene expression variance. *Circ Res*. 2010;107(3):340-347.
- [5] Miao Q, Shim W, Tee N, et al. iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium. *J Cell Mol Med*. 2014;18(8):1644-1654.
- [6] Quan Y, Wang D. Clinical potentials of human pluripotent stem cells in lung diseases. *Clin Transl Med*. 2014;3:15.
- [7] Somers A, Jean JC, Sommer CA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010;28(10):1728-1740.
- [8] Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, et al. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(6):1163-1173.
- [9] Song B, Sun G, Herszfeld D, et al. Neural differentiation of patient specific iPSCs as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res*. 2012; 8(2):259-273.
- [10] Woods NB, Parker AS, Moraghebi R, et al. Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2011;29(7):1158-1164.
- [11] Ye Z, Liu CF, Lanikova L, 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): 269-278.
- [12] Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*. 2009;27(8): 1802-1811.
- [13] Ko JY, Park S, Im GI. Osteogenesis from human induced pluripotent stem cells: an in vitro and in vivo comparison with mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(15):1788-1797.
- [14] Bai HY, Chen GA, Mao GH, et al. Three step derivation of cartilage like tissue from human embryonic stem cells by 2D-3D sequential culture in vitro and further implantation in vivo on alginate/PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94(2):539-546.
- [15] Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(8):1802-1812.
- [16] Young JS, Morshed RA, Kim JW, et al. Advances in stem cells, induced pluripotent stem cells, and engineered cells: delivery vehicles for anti-glioma therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014; 11(11):1733-1746.
- [17] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292 (5819): 154-156.
- [18] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391):1145-1147.
- [19] Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, et al. Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells*. 2008;26(1):55-63.
- [20] Cao F, Wagner RA, Wilson KD, et al. Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*. 2008;3(10):e3474.
- [21] D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2006;24(11):1392-1401.
- [22] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385(6619):810-813.
- [23] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005;309(5739):1369-1373.
- [24] Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001;11(19):1553-1558.
- [25] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-630.
- [26] Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):189-193.
- [27] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(5):381-384.
- [28] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008; 322(5903):945-949.

- [29] Li W, Xiang AP. Safeguarding clinical translation of pluripotent stem cells with suicide genes. *Organogenesis*. 2013;9(1): 34-39.
- [30] Cheng F, Ke Q, Chen F, et al. Protecting against wayward human induced pluripotent stem cells with a suicide gene. *Biomaterials*. 2012;33(11):3195-3204.
- [31] Chen F, Cai B, Gao Y, et al. Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2013;34(6):1701-1711.
- [32] Chen S, Do JT, Zhang Q, et al. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17266-17271.
- [33] Li W, Li K, Wei W, et al. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):270-283.
- [34] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651-654.
- [35] Tang M, Chen W, Liu J, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(7-8):1295-1305.
- [36] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):101-106.
- [37] International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(7):803-816.
- [38] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28(8):848-855.
- [39] Kärner E, Unger C, Cerny R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into osteogenic or hematopoietic lineages: a dose-dependent effect of osterix over-expression. *J Cell Physiol*. 2009;218(2):323-333.
- [40] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*. 2009;5(2):135-138.
- [41] Levi B, Hyun JS, Montoro DT, et al. In vivo directed differentiation of pluripotent stem cells for skeletal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50): 20379-20384.
- [42] Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, et al. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*. 2009;27(8): 1802-1811.
- [43] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000;227(2):271-278.
- [44] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-317.
- [45] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000;6(2):88-95.
- [46] Xie X, Hiona A, Lee AS, et al. Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(1): 127-138.
- [47] Lai WH, Ho JC, Lee YK, et al. ROCK inhibition facilitates the generation of human-induced pluripotent stem cells in a defined, feeder-, and serum-free system. *Cell Reprogram*. 2010;12(6):641-653.
- [48] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 2009;461(7260): 86-90.
- [49] Cao F, Lin S, Xie X, et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 2006;113(7):1005-1014.
- [50] Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, et al. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 6): 1526-1530.
- [51] Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, et al. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 1999;1:19-46.
- [52] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006;3(1):49-57.
- [53] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(371):10-27.
- [54] Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng*. 2002;8(6):911-920.
- [55] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33(6): 919-926.
- [56] Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2000;79(4):557-565.
- [57] Suzuki Y, Kim KJ, Kotake S, et al. Stromal cell activity in bone marrow from the tibia and iliac crest of patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Miner Metab*. 2001;19(1):56-60.
- [58] Sivasubramanian K, Atluri RR, Sarda K, et al. Endotoxin-induced silencing of mesoderm induction and functional differentiation: role of HMGB1 in pluripotency and infection. *Regen Med*. 2008;3(1):23-31.
- [59] Ye JH, Xu YJ, Gao J, et al. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials*. 2011;32(22):5065-5076.
- [60] Dambrot C, Braam SR, Tertoolen LG, et al. Serum supplemented culture medium masks hypertrophic phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2014;18(8):1509-1518.
- [61] Guzzo RM, Scanlon V, Sanjay A, et al. Establishment of human cell type-specific iPS cells with enhanced chondrogenic potential. *Stem Cell Rev*. 2014;10(6):820-829.
- [62] Duan X, Tu Q, Zhang J, et al. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol*. 2011;226(1):150-157.
- [63] Sottile V, Thomson A, McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells*. 2003; 5(2): 149-155.
- [64] Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, et al. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2004; 10(9-10):1518-1525.

- [65] Yamaguchi T, Tashiro K, Tanaka S, et al. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(5):726-734.
- [66] Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A, et al. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells.* 2006;24(4):835-843.
- [67] Liu Y, Fox V, Lei Y, et al. Synthetic niches for differentiation of human embryonic stem cells bypassing embryoid body formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(5):1101-1112.
- [68] Theka I, Caiazzo M, Dvoretzkova E, et al. Rapid generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells through a single-step procedure using cell lineage transcription factors. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(6):473-479.
- [69] Ardeshiryajimi A, Dinarvand P, Seyedjafari E, et al. Enhanced reconstruction of rat calvarial defects achieved by plasma-treated electrospun scaffolds and induced pluripotent stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):849-860.
- [70] Ochiai-Shino H, Kato H, Sawada T, et al. A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination. *PLoS One.* 2014;9(6):e99534.
- [71] Kuznetsov SA, Cherman N, Robey PG. In vivo bone formation by progeny of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(2):269-287.
- [72] Kao CL, Tai LK, Chiou SH, et al. Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(2):247-258.
- [73] Hynes K, Menicanin D, Han J, et al. Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration. *J Dent Res.* 2013;92(9):833-839.
- [74] Liu J, Chen W, Zhao Z, et al. Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. *Biomaterials.* 2013;34(32):7862-7872.
- [75] Phillips MD, Kuznetsov SA, Cherman N, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells toward bone and cartilage: in vitro versus in vivo assays. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(7):867-878.
- [76] Tsumaki N. Cartilage regeneration using cell reprogramming technologies. *Clin Calcium.* 2013;23(11):1641-1648.
- [77] Guzzo RM, Gibson J, Xu RH, et al. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cell Biochem.* 2013;114(2):480-490.
- [78] Saito T, Yano F, Mori D, et al. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One.* 2013;8(9):e74137.
- [79] Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science.* 2012;336(6082):717-721.
- [80] Yano F, Hojo H, Ohba S, et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):748-753.
- [81] Filomeno P, Dayan V, Touriño C. Stem cell research and clinical development in tendon repair. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2012;2(3):204-211.
- [82] Xu W, Wang Y, Liu E, et al. Human iPSC-derived neural crest stem cells promote tendon repair in a rat patellar tendon window defect model. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(21-22):2439-2451.
- [83] Chen X, Song XH, Yin Z, et al. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors. *Stem Cells.* 2009;27(6):1276-1287.
- [84] Cohen S, Leshansky L, Zussman E, et al. Repair of full-thickness tendon injury using connective tissue progenitors efficiently derived from human embryonic stem cells and fetal tissues. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(10):3119-3137.
- [85] Chen JL, Yin Z, Shen WL, et al. Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles. *Biomaterials.* 2010;31(36):9438-9451.
- [86] Yin Z, Chen X, Chen JL, et al. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(5):689-700.
- [87] Watts AE, Yeager AE, Kopyov OV, et al. Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(1):4.
- [88] Yao J, Korotkova T, Smith RL. Viability and proliferation of pluripotential cells delivered to tendon repair sites using bioactive sutures--an in vitro study. *J Hand Surg Am.* 2011;36(2):252-258.