

文章编号: 1004-0374 (2009) 05-0734-06

## 干细胞与组织工程

陈冰, 肖志峰, 戴建武\*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100190)

**摘要:** 随着生物材料、生物反应器设计及对机体发育和创伤修复机制的深入理解, 在体外构建用于修复替代人体丧失功能的组织器官这一人类理想, 已发展成一门独立且蓬勃发展的学科——组织工程学 (Tissue Engineering)。组织工程学是一个多学科交叉的新兴领域, 至少涉及生命科学、医学及工程学等三个学科。种子细胞、支架材料和诱导信号是组织工程学的三个基本要素。目前种子细胞是制约组织工程发展的一个主要瓶颈。干细胞生物学的发展使人们看到了打破这个瓶颈的可能。干细胞体外扩增及定向分化的技术发展, 及其增殖和诱导分化机制的深入理解, 使工程化组织可以获得理想的基本功能单位, 使其应用于临床成为可能。

**关键词:** 干细胞; 组织工程; 增殖; 分化

**中图分类号:** Q813; Q819 **文献标识码:** A

## Stem cells and tissue engineering

CHEN Bing, XIAO Zhi-feng, DAI Jian-wu\*

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

**Abstract:** With the development of biomaterials, bioreactor design and the increased understanding on the mechanism of the development and injuring repair of the human body, the ideal of constructing tissues and organs *in vitro* to replace the dysfunctional parts in the body has become an independent and flourishing field—Tissue Engineering. It's an interdisciplinary field that involves life science, medicine and engineering. Cells, scaffolds and signaling factors are three major elements. At present, obtaining appropriate cells is the bottleneck retarding the development of tissue engineering. Stem cell biology provides the possibility of resolving this problem. Increasing understanding of the mechanism on proliferation and differentiation of stem cells has been achieved. More techniques about expanding and direct differentiation of stem cells are being developed. The recent development in stem cell research makes engineering functional tissues closer to the reality.

**Key words:** stem cells; tissue engineering; proliferation; differentiation

组织器官的丧失或功能障碍是人类健康面临的主要危害之一, 直接影响生活质量, 甚至造成死亡。重建受损组织器官及其功能, 是人类不懈追求的理想。随着细胞生物学和分子生物学两大领域的飞跃性发展, 人类对生命本质的认识达到新的高度, 同时也使人们对健康、长寿和生命的质量有了更高要求。人们对生命机体的发育及损伤组织修复机理的理解, 以及材料学、工程学对生物学及医学的渗透, 使组织工程这一学科应运而生。组织工程学为人类勾画了组织器官替代的宏伟蓝图, 但也受

到细胞来源不足等问题的困扰。干细胞的发现使人们看到解决这一问题的希望。

### 1 组织工程 (Tissue Engineering)

组织工程是单独或联合使用支架材料、种子细胞及诱导信号, 应用科学原理在体外设计、构建、

收稿日期: 2009-08-15

基金项目: 国家重大科学研究计划 (2006CB94360)

\*通讯作者 E-mail: jwdai@genetics.ac.cn; Tel: 010-82614426

修饰及培育具有生命力和生理功能的组织, 以维持、重建及替代人体丧失功能的组织<sup>[1-3]</sup>。组织工程是多学科交叉的新兴领域, 至少涉及到生命科学、医学和工程学等学科。最早的报道可追述至1933年, Bisceglie等将肿瘤细胞用多聚物膜包裹移植到猪体内以抵御免疫系统的攻击<sup>[3]</sup>。Langer于20世纪60年代发明了高分子化合物控释系统, 随后又发现了一类新型可降解聚合物材料, 这可视为组织工程学的萌芽。80年代初, Langer和Vacant首次描述了组织工程的简单涵义并开展了初步的研究工作。随后相继有皮肤替代物的出现和临床应用的报道<sup>[4, 5]</sup>, 标志着组织工程时代的到来。1987年, 随着细胞和分子生物学的深入研究以及材料科学和生物技术的飞速发展, 美国国家科学基金会在华盛顿举办的生物工程小组会上正式提出“组织工程”一词。这一学科的应用领域直接与临床医学和人类健康密切相关, 随着近年来组织工程的飞速发展, 其内涵逐渐扩大, 并且成为再生医学(Regenerative Medicine)的重要手段。

组织工程不仅融汇了生命科学、医学及工程学的原理和方法, 还涉及力学、材料学、信息学、生物电子及计算机等学科。组织工程的基本要素包括: 种子细胞、支架材料和诱导信号。利用生物工程构建的组织有许多形式, 从简单的细胞集合、细胞薄片到复杂组织的三维结构, 最终到完整的具有功能的器官。目前应用的一般策略是: 将体外分离、培养、扩增的正常组织细胞, 接种于一种生物相容性良好并可被机体吸收的生物材料上, 同时在材料上复合一定具有诱导分化增殖的信号分子, 然后将其在特制的生物反应器中进行培养, 再将这种细胞-生物材料复合物植入机体的病损部分, 细胞在生物材料逐渐被机体降解吸收的过程中形成新的在形态和功能方面与相应组织器官相一致的组织, 从而达到修复创伤和重建受损组织器官功能的目的<sup>[6]</sup>。可以看出, 在体外模拟体内组织器官发生的微环境是其核心问题, 具体涉及到以下几项基本技术: (1) 种子细胞的体外分离和培养, 用以提供组织形成的基本功能单位; (2) 利于细胞增殖和分化的人工支架材料的制备, 用以替代细胞外基质, 对细胞不仅起物理支持作用, 还提供细胞生长、增殖和分化的天然环境<sup>[7]</sup>; (3) 诱导信号的携带方法, 诱导信号是指令细胞如何分化生长的因素, 对细胞的高效增殖和分化, 以及诱导新生血管的生成发挥重

要作用。另外, 尚需考虑机体免疫系统对移植的人工组织的排斥反应。

经过20多年的发展, 组织工程的各项技术都取得很多成就, 但有限的、能够行使生物功能的种子细胞始终是制约其从实验室走入临床以及工业化的瓶颈。工程化组织的成功构建依赖于能够行使特殊生物功能的细胞, 这些细胞具有能以正确的组织形式产生细胞外基质, 分泌细胞因子和其他信号分子, 能够与邻近的组织整合等生理特性。机体成熟的原发细胞(primary cells)当然是在功能上最理想的细胞, 因为它具有最完整的功能性并且无需考虑免疫抵抗问题。但是这些细胞通常是终末分化的细胞, 已经无法进行有丝分裂, 所以其获得和扩增都存在困难, 而且从患者自身获取这些细胞通常也不具有可操作性, 很难应用于临床。而干细胞的发现和分离分化技术的发展为解决这个问题开辟了新的道路。

## 2 干细胞(stem cells)

干细胞是一类具有自我更新能力, 能分化成一种或多种特定细胞表型的细胞。自我更新是干细胞的特性, 并且这种自我更新在增殖的同时仍维持其本身的增殖和分化潜能。干细胞增殖性能的维持、分化及凋亡的抑制是一系列不同信号通路共同作用的结果<sup>[8-10]</sup>。对不同的信号, 干细胞可以产生对称或不对称分裂。这样就能在机体损伤时既维持干细胞的数量, 又可扩增足够的细胞进行分化以完成损伤的修复。干细胞按来源可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs)。ESCs来自于哺乳动物胚胎, 在一定条件下可以分化为人体几乎所有的细胞; ASCs来自于能够再生的组织或器官, 它们位于自身来源组织器官已分化的细胞中一定的内环境里, 能够维持和修复来源组织器官, 也可形成多种细胞类型, 具有分化的多能性。

胚胎干细胞的提出源于对小鼠畸胎瘤的研究。19世纪五六十年代, Pierce和Stevens等相继发现取自小鼠畸胎瘤的细胞可以分化为多种细胞类型, 他们把这种具有多能性的细胞称为EC(embryonal carcinoma)细胞<sup>[11, 12]</sup>。之后EC细胞的分离培养方法建立, 为发育生物学家体外研究细胞的分化提供了很好的模型<sup>[13]</sup>。1981年, 首次报道鼠胚胎干细胞的分离<sup>[14, 15]</sup>, 随后多种动物的ESCs系相继成功建立。1995年, Thomson等<sup>[16]</sup>从恒河猴的囊胚中分

离建立了世界上第 1 株灵长类动物的 ESCs。1998 年, Thomson 等<sup>[17]</sup>和 Shambloott 等<sup>[18]</sup>分别从人的胚胎组织或原始生殖嵴中, 成功分离培养了 ESCs 和 EG。截至 2008 年 4 月 18 日, 在美国国立卫生研究院 (NIH) 网站上登记的人 ESCs 系一共有 78 株, 其中 21 株正常。

胚胎干细胞的自我更新和分化作用与其全能性密切相关, 是干细胞执行其特殊功能相辅相成的两个方面。“自我更新”可以保持全能性, 复制出与自身完全一致的子细胞, “分化”使全能性丧失, 但继续形成了有功能的细胞进而构成功能化组织器官, 体现了干细胞全能性的具体过程。目前研究认为调控这两个方向是通过以 OCT4、Nanog、FoxD3 和 Sox2 为核心的分子调控网络实现的<sup>[19-23]</sup>, 并且涉及 Activin/Nodal/transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>[24]</sup>、bone morphogenetic protein (BMP)<sup>[25]</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>[26]</sup> 等多个重要信号通路。在体外如何不断使 ESCs 扩增, 如何定向诱导 ESCs 向特定的细胞系分化是我们面临的挑战, 也是干细胞应用于组织工程必须解决的问题。不仅需要基础理论方面的探索, 而且要有在理论指导下对好的建系方法的探索, 及不断发明新的培养模式。将克隆技术引入 ESCs 的研究<sup>[27]</sup>及诱导型多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS) 的建立<sup>[28-30]</sup>是干细胞研究领域的重要突破, 这有可能对干细胞的应用研究产生深远的影响。2006 年, Takahashi 和 Yamanaka<sup>[29]</sup>将 *Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 基因转染胎儿期和成年期小鼠尾部成纤维细胞, 获得具有类似 ESC 的诱导型多能干细胞。2007 年, Takahashi 等<sup>[28]</sup>又将这 4 个基因转入成年妇女皮肤成纤维细胞, Yu 等<sup>[30]</sup>用 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 对胎儿皮肤和男婴包皮细胞进行转染, 均得到 iPS 细胞。这些细胞具有正常的核型和端粒酶活性, 能表达人 ESCs 特征的细胞表面标志和基因, 并可分化为所有三个原始胚层的组织和细胞。尽管 iPS 技术目前还存在很多安全性的担心, 但在组织工程领域仍有很好的应用前景, 这些人诱导型多能细胞系有望成为新的种子细胞来源。

成体干细胞存在于成体的各种组织中, 具有多向分化潜能, 可以分化为某一组织的多种细胞。人体拥有不同种类的成体干细胞, 如造血干细胞、心肌干细胞、骨骼肌干细胞、表皮干细胞等。它们在体内可以随个体终生自我更新并产生它们所处的

组织需要的细胞。将成体干细胞应用于组织工程不存在伦理上的争议, 可以实现个体化治疗, 无免疫排斥问题, 致癌风险小。成体干细胞的研究目前也是一个热点, 而且已有很多成功应用于组织修复的例子。但是在体内成体干细胞非常稀少, 因此难于分离, 而在培养条件下又易于分化, 所以其多能性的维持也比较困难。因而克服这些困难是成体干细胞成功应用需要解决的问题。

### 3 干细胞在组织工程中的应用

前面提到, 组织工程的发展受到细胞来源的制约, 目前组织工程种子细胞主要有三个来源: 与缺损组织细胞同源的自体原发细胞、胚胎干细胞及成体干细胞。目前认为, 由于不存在免疫抵抗, 自体原发细胞是种子细胞的最佳来源, 但通常这些细胞都是终末分化细胞, 且在离体培养时一些细胞有去分化的倾向, 并有异常表型的表达。所以干细胞成为种子细胞的最佳选择。

理论上干细胞能够为组织工程提供取之不尽的种子细胞, 目前研究集中于干细胞体外扩增的方法, 干细胞的定向分化, 分化后细胞的纯化以确保没有残留的致癌可能性并经移植后可替代或增进受损组织的功能<sup>[31]</sup>。

#### 3.1 ESCs 在组织工程中的应用<sup>[32]</sup>

ESCs 是能够用于组织工程的可塑性最强的细胞<sup>[33]</sup>, 与成体干细胞相比, 它几乎可以一直保持非分化状态<sup>[17]</sup>, 这就使工程组织在构建早期可以获得足够的细胞量。然后大量来自同一克隆的细胞可以在特定条件下定向分化为足够的功能性细胞, 避免了从供体收获和扩增特定细胞系的困难。

**3.1.1 皮肤** 皮肤是人体最大的器官, 主要分为表皮和真皮。角质细胞是表皮中最丰富的细胞, Green 等<sup>[34]</sup>最先报道了 ESCs 向角质细胞的分化, 但随后的研究表明这种分化效率极低, 而且由于存在其他类型的细胞污染使扩增困难。近年 Metallo 等<sup>[35]</sup>通过视黄酸 (retinoic acid, RA) 和 BMP 信号通路由 ESCs 获得了较纯的角质细胞, 能够表达终末分化标志蛋白, 并可形成表皮样的薄层。

**3.1.2 角膜** Ahmad 等<sup>[36]</sup>尝试用含血清的条件培养基模拟角膜上皮干细胞微环境诱导人 ESCs 分化为角膜上皮细胞, 产生了表达 K3/K12 的角膜细胞, 但同时还产生了表达 K10 的可能是皮肤细胞的细胞群。

**3.1.3 神经** 获得成体神经前体细胞非常困难, 因而对 ESCs 进行诱导分化成为神经组织工程的研究重

点。在缺乏BMP信号时,人ESCs很容易分化为神经前体细胞。将这种细胞继续培养在诸如laminin这类的神经基质上就可以产生神经元细胞<sup>[37]</sup>。

**3.1.4 心脏** 添加抗坏血酸的无血清培养技术可增进心肌细胞的有效分化<sup>[38]</sup>,由人ESCs分化而来的心肌细胞移植入完全房室梗阻猪,能够与猪自身的心肌组织整合并与其心脏同步搏动<sup>[39]</sup>。Caspi等<sup>[40]</sup>用含内皮细胞、胚胎成纤维细胞和人ESCs分化的心肌细胞构建了一个血管化的三维心脏组织,能够表达心肌细胞分化的早期和晚期标志蛋白。

**3.1.5 骨和软骨** 骨和软骨都来自于骨髓基质细胞系,人ESCs可被诱导形成骨髓基质前体细胞,并表达表面标志蛋白CD73,这些细胞可以进一步分化为成骨细胞和软骨细胞<sup>[41]</sup>。

**3.1.6 循环系统** 血细胞和内皮组织在胚胎发生时来源于共同的前体细胞,已证明相同的环境刺激能诱导人ESCs分化为造血细胞和上皮细胞<sup>[42, 43]</sup>。

**3.1.7 胰脏**  $\beta$ -胰岛细胞是胰脏执行功能的重要细胞,其功能丧失和死亡是导致糖尿病的重要原因。目前有多项研究定向诱导了人ESCs的分化,并能表达一定胰岛标志蛋白,但是有些缺乏功能,有些发育不全,提示需进一步深入研究以获得全功能的成熟胰岛细胞。

**3.1.8 肝脏** 在FGF-4和肝细胞生长因子的共同作用下,人ESCs可分化为有功能的肝细胞<sup>[44]</sup>。而且三维的胶原支架能够在空间上模拟人ESCs向肝细胞分化的体内微环境<sup>[45]</sup>。

以上介绍了ESCs向不同细胞分化的情况,经定向诱导分化后,不同的细胞类型可以依其表达的标志蛋白予以有效地分选纯化。当这些细胞与组织工程技术相结合,就可以在体外构建工程化的组织。近些年已有不少这方面成功的报道。虽然胚胎干细胞系的体外鉴别、分离纯化、扩增和培养技术相对较为成熟,在组织工程中有着广泛的应用前景,但也应看到,其大规模应用尚存在一些问题。ESCs存在伦理问题,有潜在的致瘤性;分化细胞的移植面临免疫抵抗作用;在技术上,现在对ESCs的诱导分化效率仍然比较低,不能满足临床应用的需求,而且有些分化细胞缺乏特定的标志蛋白,给分选纯化带来困难;另外工程化组织血管网的构建也是一个难点。

### 3.2 ASCs在组织工程中的应用

动物体内许多组织都存在成体干细胞,包括骨

髓、脑、肝、皮肤及循环系统等。它们的主要功能是维持及修复自身存在的组织。成体干细胞的发现使人们提出这样的设想:从患者体内分离成体干细胞,经过扩增诱导分化得到的工程组织回植于患者体内,这样就可以避免免疫抑制手段的使用。在临床需求的推动下,近年来成体干细胞的研究也得到了快速发展。下面就几类成体干细胞的应用做一简述。

**3.2.1 骨髓基质干细胞<sup>[46]</sup>** 是目前研究较深入的一种成体干细胞,在不同的诱导条件下可分化为骨、软骨、肌腱、肌肉、脂肪、神经元等多种细胞。

**3.2.2 皮肤干细胞** 包括由皮肤表皮基底层分离的表皮干细胞和位于表皮下毛囊隆突处的毛囊干细胞,利用这些干细胞可培养出神经细胞、脂肪细胞及平滑肌细胞等。

**3.2.3 神经干细胞** 在治疗神经系统退行性病变及修复中枢神经损伤方面具有优势。可定向分化为神经元、神经角质细胞,并分泌神经营养因子。最近发现中枢鞘蛋白抑制因子除具有已知的抑制神经元轴突再生的功能,在调节神经干细胞分化过程中发挥重要作用外,还具有很强的胶质细胞诱导作用<sup>[47]</sup>。

**3.2.4 脂肪干细胞** 来源比较广泛,在不同的诱导条件下可分化为不同的功能细胞,如脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌细胞及神经组织细胞等。

**3.2.5 造血干细胞** 造血干细胞在临床已有大量应用,用以治疗血液及缺血性疾病。它们易于移植,并能产生所有类型的血细胞。但是外周血、骨髓或脐带来源的造血干细胞仍存在纯度不够,有其他生物杂质污染的危险。

**3.2.6 角膜缘干细胞** 角膜缘干细胞是角膜表皮再生的功能细胞。当创伤或疾病造成这群细胞的丢失,移植角膜可以避免由于疤痕组织造成的视力损伤<sup>[32]</sup>。

同样成体干细胞来源的各类分化细胞结合组织工程手段可以获得工程化组织。成体干细胞来源比较广泛,不存在伦理问题,在组织工程领域具有广泛的应用前景。如果能够解决它的分离培养问题,将是种子细胞非常方便的选择。

干细胞离体培养条件下自我更新能力的维持及有效的定向分化方法的实现将为组织工程提供充足的种子细胞,真正产生“活”的组织,必将促使组织工程获得根本性的发展。

#### 4 干细胞和组织工程发展面临的挑战

经过二十多年的发展,组织工程领域已取得很多成就,但是组织工程产业想达到人们预期的设想还有很长的路要走。在体外模拟体内组织器官发生的微环境是主要的挑战。如何获得大量的细胞,合适的支架材料,如何避免移植免疫反应,如何实现移植物的细胞化,如何建成组织的血管网,干细胞的定向分化,细胞活力的维持,体内细胞数量的维持等等都是需要逐一解决的。人们也提出了一系列方法试图解决这些问题,如将重组生长因子或定向分化信号等诱导因素与支架材料整合<sup>[48]</sup>、使用基因治疗载体<sup>[49]</sup>、使用基因工程化细胞<sup>[50]</sup>、使用诱导型的多能干细胞等等。鉴于组织工程学的多学科交叉性,尚需细胞生物学、发育生物学、分子生物学、移植免疫学、生物材料学、生物化学、临床医学等多学科研究人员的共同攻关。当然种子细胞仍然是组织工程发展的一个瓶颈,因此干细胞基础理论的重大突破必然会推动组织工程发展产生质的飞跃。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260(5110): 920-6
- [2] Sittering M, Bujia J, Rotter N, et al. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 1996, 17(3): 237-42
- [3] Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann New York Acad Sci*, 2006, 1068: 352-66
- [4] Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, et al. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 1981, 211(4486): 1052-4
- [5] Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Jr, et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 1981, 194(4): 413-28
- [6] Gomes ME, Reis RL. Tissue engineering: key elements and some trends. *Macromol Biosci*, 2004, 4(8): 737-42
- [7] Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5): 551-8
- [8] Li J, Wang GW, Wang CY, et al. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation*, 2007, 75(4): 299-307
- [9] Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 700-7
- [10] Zhang JW, Li LH. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol*, 2005, 284(1): 1-11
- [11] Pierce GB Jr, Beals TF. The ultrastructure of primordial germinal cells of the fetal testes and of embryonal carcinoma cells of mice. *Cancer Res*, 1964, 24: 1553-67
- [12] Alexandre H. A history of mammalian embryological research. *Int J Dev Biol*, 2001, 45(3): 457-67
- [13] Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(4): 1441-5
- [14] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [15] 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
- [16] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7844-8
- [17] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7
- [18] Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726-31
- [19] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122(6): 947-56
- [20] Pan GG, Li J, Zhou YL, et al. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J*, 2006, 20(10): 1730-2
- [21] Pan GG, Pei DQ. The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1401-7
- [22] Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 24731-7
- [23] Wang X, Zhao YN, Xiao ZF, et al. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1265-75
- [24] James D, Levine AJ, Besser D, et al. TGF $\beta$ /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 2005, 132(6): 1273-82
- [25] Xu RH, Peck RM, Li DS, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 185-90
- [26] Dravid G, Ye ZH, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(10): 1489-501
- [27] Lanza RP, Cibelli JB, West MD. Human therapeutic cloning. *Nat Med*, 1999, 5(9): 975-7
- [28] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [29] 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
- [30] Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluri-

- potent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [31] Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 2001, 414(6859): 118-21
- [32] Metallo CM, Azarin SM, Ji L, et al. Engineering tissue from human embryonic stem cells. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(3): 709-29
- [33] Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 635-78
- [34] Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15625-30
- [35] Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, et al. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 372-80
- [36] Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by *in vitro* replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1145-55
- [37] Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, et al. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 30(1): 24-36
- [38] Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, et al. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells*, 2005, 23(6): 772-80
- [39] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(10): 1282-9
- [40] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res*, 2007, 100(2): 263-72
- [41] Barberi T, Willis LM, Socci ND, et al. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med*, 2005, 2(6): e161
- [42] Wang LS, Li L, Shojaei F, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 2004, 21(1): 31-41
- [43] Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 2006, 108(6): 2095-105
- [44] Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, et al. Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2005, 14(6): 643-55
- [45] Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. *Int J Dev Biol*, 2006, 50(7): 645-52
- [46] Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(1): 7-23
- [47] Wang B, Xiao Z, Chen B, et al. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1856
- [48] Dawson E, Bae HW, Burkus JK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 91(7): 1604-13
- [49] Fang J, Zhu YY, Smiley E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 5753-8
- [50] Majewski M, Betz O, Ochsner PE, et al. *Ex vivo* adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model. *Gene Ther*, 2008, 15(16): 1139-46