

# 诱导多能干细胞向表皮干细胞分化的研究进展\*

王 晓, 邹立津, 曾元临<sup>△</sup>综述, 张友来 审校

(南昌大学第一附属医院烧伤中心, 南昌 330006)

**【摘要】** 皮肤来源是烧伤及慢性创面皮损修复中亟须解决的一大问题, 近年来组织工程皮肤为烧伤创面的修复提供了新的方法, 但仍未达到完全意义上的功能愈合。诱导性多能干细胞(iPSc)和胚胎干细胞(ESC)在形态及功能上几近相同, 为解决这一难题提供了新的思路和可能手段, 且 iPSc 的诞生克服了 ESC 在临床应用时涉及的移植免疫排斥与伦理道德问题, 因此具有重要的临床应用价值。现就近年来 iPSc 向表皮干细胞转化的研究做一综述。

**【关键词】** 诱导性多能干细胞; 表皮干细胞; 分化

**【中图分类号】** R622+.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-8348(2018)23-3084-04

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSc)是通过基因转染技术将某些转录因子导入已分化体细胞, 使已分化细胞“原始化”并具备干细胞特性。2006 年日本京都大学首次成功创建 iPSc 细胞<sup>[1]</sup>, 该研究利用携带 Oct3/4、Sox2、C-Myc 和 Klf4 转录因子的 4 种逆转录病毒载体感染成纤维细胞后经筛选获得 iPSc。2007 年 TAKAHASHI 等<sup>[2]</sup>研究显示, 利用此技术同样可以诱导人皮肤纤维母细胞成为几乎与胚胎干细胞完全一样的多能干细胞。与此同时, YU 等<sup>[3]</sup>也报道了利用 Oct3/4、Sox2、Nanog 和 Lin28 的基因组合成功使人类新生儿成纤维细胞重编程为 iPSc 细胞。随后国内外多家实验室利用基因导入的方法完成了多种类型成体细胞向 iPSc 细胞的重编程。iPSc 细胞在细胞形态、生长特性、干细胞标志物表达、DNA 甲基化方式、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等方面与胚胎干(ES)细胞几乎完全一致。iPSc 细胞具有多向分化潜能, 在体内可以分化为 3 个胚层来源的所有细胞, 使其成为疾病治疗种子细胞的良好选择。经特定条件诱导 iPSc 细胞向上皮干细胞分化有望解决临床皮肤缺损所面临的皮源不足的问题。本文就 iPSc 细胞向表皮细胞分化及其在皮损修复领域的研究做一综述。

## 1 iPSc 细胞向表皮分化的诱导方法的研究

**1.1 细胞培养基** iPSc 细胞由体细胞经导入外源基因重编程而来, 与 ESCs 在功能和表型上相似, 具有无限扩增和保持正常核型及生成 3 个胚层细胞的能力, 在细胞治疗中具有良好的应用前景。常规细胞培养中多依赖动物血清及滋养层细胞, 限制了干细胞的大规模培养获取, 且血清中含有的多种成分对培养细胞的影响也难以控制, 探索无血清培养体系势在必行。

李向东等<sup>[4]</sup>使用无血清培养基 mTeSR1 培养复苏的 ESCs, 能够在体外进行长期扩增, 同时维持其未分化的干细胞潜能。目前 iPSc 细胞培养基仍然沿用 ESC 等细胞培养基做为基础, 而适宜培养 iPSc 细胞的特定培养基尚需要进一步探索研制。

## 1.2 细胞分化影响因子

**1.2.1 传统细胞分化影响因子** 生长因子的种类及数量常影响干细胞分化效率。研究常用的有 EGF、bFGF、TGF- $\beta$  等, 这些因子都可一定程度上促进 iPSc 细胞分化。近年在 iPSc 细胞向表皮干细胞分化的研究中, 李勇铁等<sup>[5]</sup>将 iPSc 细胞置于人羊膜上培养后部分细胞出现整合素  $\beta 1$  和 CK19 的表达, 表明人 iPSc 细胞可在羊膜诱导下定向分化为表皮样干细胞, 但其机制尚不清楚。ITO 等<sup>[6]</sup>通过调整培养基成分, 在诱导 iPSc 细胞分化为拟胚体后, 经调整后的培养基(去除 bFGF, 添加抗坏血酸、TGF- $\beta 2$  及 ITS-A)培养 10 d 后得到成纤维细胞及表皮样干细胞。有研究表明 CDX2 和 LGR5 的表达经 FGF2 作用明显上调, 当细胞在含 EGF 和低浓度的 FBS 培养基中培养, 肠上皮细胞的特定标记物的 mRNA 均得以表达, 同时也检测到蔗糖酶异麦芽糖酶蛋白的表达及  $\beta$ -Ala-Lys-Amca 的吸收<sup>[7]</sup>, 这为 iPSc 细胞向类肠上皮细胞分化提供一简单直接的方法。有研究通过细胞中脂质沉积以及 C3 补体蛋白的高表达从而证实 iPSc 细胞具有分化为 II 型肺泡上皮细胞的潜能, 他们在诱导上皮间质转化时发现细胞暴露在博来霉素或 TGF $\beta 1$ /EGF 混合物中时会经历表型改变包括获得间质/成纤维细胞形态、间充质标记物上调及表面蛋白和钙黏蛋白的下调<sup>[8]</sup>。KODAMA 等<sup>[9]</sup>也证实了促分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)、DNA 甲基化酶(DNMT)及 TGF- $\beta$  抑

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760343); 国家自然科学基金地区基金资助项目(81660364); 江西省自然科学基金项目(2016BAB205239); 江西省自然科学基金青年项目(20122BAB2015013)。 作者简介: 王晓(1989-), 在读硕士, 主要从事烧伤及慢性创面治疗。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zengyuanlin777@126.com。

制剂可促进 iPS 细胞向肠上皮分化。由此可以看出, iPS 细胞分化中各种因子均会影响分化过程及效率, 而在特定分化中何种因子起作用及其权重至今仍是未知。

**1.2.2 维甲酸与骨形成蛋白 4** 维甲酸(RA)是与胚胎外胚层发育相关的诱导因素, 近年来发现在皮肤组织中大量表达一种 RA 特定受体, 表明 RA 也可能参与皮肤的分化过程。骨形成蛋白 4(BMP4)和 RA 均可促进外胚层向神经分化, 并已有研究证实了 BMP4 在皮肤修复中具有促愈合作用。近年的此类研究中 SALIMI 等<sup>[10]</sup>对比 3 个转化诱导媒介(bFGF+EGF、RA 和毛猴素+IBMX)促进 iPS 细胞神经分化的潜力, 经免疫荧光染色及定量实时 PCR(qPCR)分析表明, 毛猴素+IBMX 处理的已分化 hiPS 细胞的神经基因的表达明显高于未分化细胞及其他处理组, 证明经毛猴素+IBMX 处理的 hiPS 细胞转化为神经系细胞的效率更高。另外在眼科研究中, LI 等<sup>[11]</sup>通过 4 种特定因子(Noggin、BMP4/7、BFGF、EGF)的组合, 分 3 步影响 iPS 细胞分化, 高效地生成晶状体上皮细胞 LECs, 从而为解决 LECs 传代不能保持原代特性的问题提供新途径。虽然较多研究证实 RA 和 BMP4 可促进 iPS 细胞的分化, 但其具体机制尚需进一步研究。

**1.2.3 其他影响因素** 很多学者在分化体系中添加其他特殊分子或改变细胞培养环境, 明显改变了干细胞的分化效率及分化结果。KUSUMA 等<sup>[12]</sup>发现低氧分压可促进 iPS 细胞分化为血管内皮细胞: 在 5% O<sub>2</sub> 无饲养层二维分化系统中, iPS 细胞分化的内皮细胞群中带有内皮细胞钙粘蛋白和 CD31 的细胞数增加、动脉内皮细胞标记物及条索状结构形成, 提示氧分压在 iPS 细胞分化为内皮细胞过程中的重要性。OFFEN 等<sup>[13]</sup>利用小鼠 iPS 细胞来源的泛神经祖细胞研究神经营养生长因子促红细胞生成素(EPO)对细胞的生存、增殖和神经分化的影响。在增殖培养中 EPO(0.1~3.0 U/mL)轻度改善细胞生存但减少细胞增殖和神经球的形成, 在分化培养中通过  $\beta$ -III-微管蛋白阳性神经元数量的增加评估 EPO 促进神经分化, 证实 EPO 抑制 iPS 细胞来源的神经祖细胞的自我更新, 促进其向神经分化。

## 2 iPS 细胞向表皮分化的基因研究

iPS 细胞向表皮分化的实质是诱导多能性细胞内表皮基因的表达。有文献<sup>[14]</sup>查询了联合微阵列数据库 487 种生长因子及受体的表达, 表明 hES/iPS 细胞表现出昼夜节律性的抑制、早期分化标记物的非表达及标准多能性基因的的稳定表达, 为 iPS 细胞的多能性提供了理论支持。BORNACHEAD 等<sup>[15]</sup>在研究小鼠表皮肿瘤细胞时发现, TP63 基因编码两个主要类型(TAp63 和  $\delta$ Np63)之一的  $\delta$ Np63 可促进 iPS 细胞重编辑相关因子的表达, 表明它具有可以调节小鼠表皮

肿瘤细胞的特殊干细胞特征。CHEN 等<sup>[16]</sup>在研究 iPS 细胞向血管内皮细胞分化时发现, miR199b 在内皮细胞分化中表达呈渐进性增加, 以 JAG1 作为靶点, 经过 STAT3 途径引起 VEGF 的转录激活和分泌。利用 shRNA-mediated 敲除 JAG1 则其在内皮细胞分化中的调控效应消失, 表明 miR199b 在 iPS 细胞分化为血管细胞过程中, 经过调节临界的血管生成信号的应答, 扮演着一个表型转换调节器的角色。

多能干细胞由已分化细胞重编程而来, 其表观遗传背景可以影响其转录和功能性行为, PETROVA 等<sup>[17]</sup>比较分析 iPS 细胞系 iKCL004 和 iKCL011, 培养后 miRNA 数组大约 7% 的 CpG 位点出现不同的甲基化, 经分析发现在细胞系 iKCL004 克隆中, 与皮肤屏障作用成熟相关的毛透明蛋白(TCHH)保留了一种原始体细胞 DNA 甲基化特点, 而 iKCL011 的 TCHH 甲基化特点与人类胚胎干细胞系 KCL034 相匹配。SHAO 等<sup>[18]</sup>经过比较初始 MSC、ESC-MSC、iPS-MSC 的 DNA 甲基化修饰得出, iPS-MSC 在 DNA 甲基化修饰中保留了供体来源的差异性, 即供体表观遗传差异的组织记忆, iPS-MSC 存在一些 CpG 位点显示显著差异, 证明 iPS-MSC 克隆了较少的个体变化但他们保持供体来源的表观遗传差异。

## 3 病体来源 iPS 细胞上皮分化及在疾病治疗中的研究

iPS 细胞技术的最终目的是应用于临床疾病治疗、疾病模型制作及药物筛选等方面。在未来临床应用中, iPS 细胞的来源也必然是取自于患者自体细胞, 如成纤维细胞、外周血细胞等较为容易获取的细胞。核重编程使患者特异性 iPS 细胞成为可能, 因此诱导病体来源 iPS 细胞分化为上皮细胞的研究尤为重要。目前病体来源 iPS 细胞上皮分化仍处于实验阶段, 此技术应用于临床还为时过早, 但分化获得的上皮细胞为表皮修复提供了良好的前景。

**3.1 糖尿病** 糖尿病患者常发皮肤感染导致皮肤受损, 且创面恢复困难, 尤以糖尿病足多见。CHAN 等<sup>[19]</sup>将 1 型糖尿病患者来源的 iPS 细胞诱导形成的内皮细胞系, 具有典型的内皮细胞标记物, 带有结合凝集素、乙酰化低密度脂蛋白摄取、基底膜管腔形成、对 TNF- $\alpha$  应答的能力, 在工程透明质酸或体内缺氧条件下, 可经受形态变化形成 3D 结构, 且能合并至转基因脉管系统中。ORLOVA 等<sup>[20]</sup>也得出了相同结果, 证实体细胞来源 iPS 细胞在体内外能分化成所有类型内皮细胞和周皮细胞且拥有其全部功能。有研究<sup>[21]</sup>以 2 型糖尿病患者的表皮细胞为来源获得多能干细胞, 诱导的 iPS 细胞获得了以延长端粒和抑制衰老相关基因 p15(INK4b)/p16(INK4a)基因表达以及氧化应激信号为特征的重生的状态, 为创面修复提供了良好的种子细胞, 同时以遗传特异性因子逐步引导(包括 IV 和 GLP-1), 再分化 iPS 细胞成为可生产胰

胰岛素的细胞子代,为糖尿病病因治疗提供可能。

**3.2 斑秃** 斑秃被认为是一种具有遗传性质及环境激发因素的自身免疫性疾病,是由炎性细胞介导的器官特异性疾病,与免疫失调相关<sup>[22]</sup>,毛囊再生是斑秃治疗中需解决的首要问题。2013 年 VERAITCH 等<sup>[23]</sup>利用人类 iPS 细胞在实验鼠身上成功再生了部分毛囊,此外实验中还指出,在 201B7 iPS 系、WD39 iPS 系和 WDT2 iPS 系中,201B7 iPS 系能使毛囊角质形成细胞的表面标记(角蛋白 18、角蛋白 14 及人肿瘤蛋白 TP63 等)的表达明显高于其他两系。有学者利用 H9 系人类胚胎干细胞/iPS 细胞生成神经嵴细胞,然后将其诱导为可刺激毛发生成的类毛乳头细胞(类毛乳头细胞可表达有成熟毛乳头的特征性标志),研究人员将这些细胞移植到免疫缺陷的裸鼠中成功诱导了毛囊形成<sup>[24]</sup>,证实人类胚胎干细胞诱导形成的真皮乳头与人类 iPS 细胞诱导形成的真皮乳头两者诱导毛囊形成的能力相当。2014 年, YANG 等<sup>[25]</sup>先将 Oct3/4、Sox-2 和 Klf4 转入人类皮肤成纤维细胞中获得 iPS 细胞,然后将其诱导分化为毛囊隆突部上皮干细胞,继而将诱导分化的上皮干细胞植入免疫功能缺陷的小鼠体内再生出功能性的人类表皮和毛囊,甚至生成了结构可识别的毛干。

**3.3 其他** 在其他病体研究中, ITOH 等<sup>[26]</sup>成功将大疱性表皮松解症患者来源的 iPS 细胞诱导分化为角质形成细胞并制备了 3D 皮肤结构,证实了所获得 iPS 细胞具有高度的多能性并能应用于皮损修复。口腔癌治疗常导致周围组织大量的永久性的丢失, PATEL 等<sup>[27]</sup>探讨了重编程技术在口腔癌后期康复中的应用,他们以口腔癌患者口腔上皮细胞为来源,诱导其重编程为 iPS 细胞,为口腔鳞癌患者组织缺损的再生提供了希望。KAJIWARA 等<sup>[28]</sup>采用来自于唐氏综合征和双胞胎输血综合征个体的羊水细胞重编程为 iPS 细胞并诱导分化为表皮细胞,联合人的 I 型胶原及成纤维细胞建立三维皮肤,于孕期作用于小鼠模型,可在孕期成功覆盖胎儿脊膜膨出症(MMC)缺损部位,为产前治疗 MMC 提供了一种可能。

#### 4 展 望

利用 iPS 细胞技术获取表皮干细胞并应用于皮损修复,首先要解决 iPS 细胞的来源问题。iPS 细胞为再生医学提供无限的细胞来源,虽然关于 iPS 细胞技术的研究众多,研究者们通过采取多种措施影响诱导过程,但其诱导效率仍然很低,且向分化体系中加入各类因子均会不同程度的影响分化结果,目前各分化体系中影响因子的种类仍然在继续探索中。其次, iPS 细胞向表皮细胞分化的效率是制约其应用于皮损修复的一大阻碍。SAKURAI 等<sup>[29]</sup>将小鼠 iPS 细胞经 RA 和 BMP4 预培养后铺于 IV 型胶原上,诱导分化成表达 p63 和 K14 的上皮细胞,然而 K14 阳性细胞不到 60%,且并未在体内外证实这种细胞能否形成上

皮组织。有研究将此类细胞与真皮成纤维细胞混合植入裸鼠皮下形成含包囊及皮脂腺的皮肤组织<sup>[30]</sup>,但此种诱导需形成胚胎小体,此过程中会产生大量其他类型的细胞,必须在分化过程中进行细胞的提纯和再次接种,很难产生临床所需的大量皮肤干细胞。另外, iPS 细胞经病毒转染外源基因导入,导入基因多为癌相关基因,理论上获得的细胞仍存在癌性和干性的争议。病体来源细胞的细胞质内核酸在分化过程中积累的变异是否会影响形成的 iPS 细胞的细胞核内外的核酸,并进而影响其分化为表皮干细胞的效率及表观遗传特性,此方面的研究尚未报道,因此如何去除供体细胞基因组外的影响因素将是后续 iPS 细胞技术研究的新方向。

有学者使用单个转录因子 OCT4 暂时性转染人皮肤角化细胞,经功能鉴定证实新分化的间充质细胞胶原凝胶的收缩和真正的肌成纤维细胞一样有效,因此获得特定的细胞可能不需要完全重新编程体细胞成为 iPS 细胞, OCT4 的瞬时表达足以改变人角质细胞的分化途径<sup>[32]</sup>。日本厚生劳动省 2013 年正式批准利用 iPS 细胞开展视网膜再生研究,在全球范围内首获政府批准并用于临床试验。近日来日本数家制药及化工企业首次利用 iPS 细胞量产血小板,这是 iPS 细胞走向临床的重要一步。iPS 细胞技术将不止局限在简单分化,诱导获得上皮细胞并形成皮片组织是否能够具有正常皮肤的功能将是急需解决的一大问题,通过诱导在不久的将来或许可以看到 iPS 细胞来源的含血管的多层皮片组织产品,以用于大面积深度皮瓣缺损的修复。自体 and 同种异体干细胞包括 ESCs 和 iPS 细胞组织工程再生医学具有良好前景,预计不久的将来越来越多的产品将出现在市场上。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 李向东, 王纪文, 魏国峰. 人胚胎干细胞在无血清 mTeSR-1 培养基中维持培养和向内皮细胞的诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(10): 1827-1831.
- [5] 李勇铁, 刘德任, 刘德明, 等. 人诱导性多潜能干细胞向表皮样干细胞分化的实验研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2012, 28(4): 274-277.
- [6] ITOH M, UMEGAKI-ARAO N, GUO Z, et al. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from hu-

- man induced pluripotent stem cells (iPSCs) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77673.
- [7] IWAO T, TOYOTA M, MIYAGAWA Y, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 29(1): 44-51.
- [8] ALIPIO Z A, JONES N, LIAO W, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TGF( $\beta$ 1)/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar type II-like cells [J]. *Differentiation*, 2011, 82(2): 89-98.
- [9] KODAMA N, IWAO T, KABEYA T, et al. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase, DNA methyltransferase, and transforming growth factor-beta promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into enterocytes [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2016, 31(3): 193-200.
- [10] SALIMI A, NADRI S, GHOLLASI M, et al. Comparison of different protocols for neural differentiation of human induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(3): 1713-1721.
- [11] LI D, QIU X, YANG J, et al. Generation of human lens epithelial-like cells from patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(12): 2555-2562.
- [12] KUSUMA S, PEIJNENBURG E, PATEL P, et al. Low oxygen tension enhances endothelial fate of human pluripotent stem cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 913-920.
- [13] OFFEN N, FLEMMING J, KAMAWAL H, et al. Effects of erythropoietin in murine-induced pluripotent cell-derived panneural progenitor cells [J]. *Mol Med*, 2013, 19: 399-408.
- [14] VLISMAS A, BLETSA R, MAVROGIANNI D, et al. Microarray analyses reveal marked differences in growth factor and receptor expression between 8-cell human embryos and pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(2): 160-177.
- [15] BORNACHEA O, LOPEZ-CALDERON FF, DUENAS M, et al. The downregulation of Delta Np63 in p53-deficient mouse epidermal tumors favors metastatic behavior [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 24230-24245.
- [16] CHEN T, MARGARITI A, KELAINI S, et al. MicroRNA-199b modulates vascular cell fate during iPSC cell differentiation by targeting the notch ligand jagged1 and enhancing VEGF signaling [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5): 1405-1418.
- [17] PETROVA A, CAPALBO A, JACQUET L, et al. Induced pluripotent stem cell differentiation and three-dimensional tissue formation attenuate clonal epigenetic differences in trichohyalin [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(18): 1366-1375.
- [18] SHAO K, KOCH C, GUPTA M K, et al. Induced pluripotent mesenchymal stromal cell clones retain donor-derived differences in DNA methylation profiles [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 240-250.
- [19] CHAN X Y, BLACK R, DICKERMAN K, et al. Three-dimensional vascular network assembly from diabetic patient-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(12): 2677-2685.
- [20] ORLOVA V V, DRABSCH Y, FREUND C, et al. Functionality of endothelial cells and pericytes from human pluripotent stem cells demonstrated in cultured vascular plexus and zebrafish xenografts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(1): 177-186.
- [21] OHMINE S, SQUILLACE K A, HARTJES K A, et al. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency [J]. *Aging*, 2012, 4(1): 60-73.
- [22] ISLAM N, LEUNG P S, HUNTLEY A C, et al. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2): 81-89.
- [23] VERAITCH O, KOBAYASHI T, IMAIZUMI Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(6): 1479-1488.
- [24] GNEDEVA K, VOROTELYAK E, CIMADAMORE F, et al. Derivation of hair-inducing cell from human pluripotent stem cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116892.
- [25] YANG R, ZHENG Y, BURROWS M, et al. Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3071.
- [26] ITOH M, KIURU M, CAIRO M S, et al. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(21): 8797-8802.
- [27] PATEL V, IGLESIAS-BARTOLOME R, SIEGELE B, et al. Cellular systems for studying human oral squamous cell carcinomas [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 720: 27-38.
- [28] KAJIWARA K, TANEMOTO T, WADA S, et al. Fetal therapy model of myelomeningocele with three-dimensional skin using amniotic fluid cell-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(6): 1701-1713.
- [29] SAKURAI M, HAYASHI R, KAGEYAMA T, et al. Induction of putative stratified epithelial progenitor cells in vitro from mouse-induced pluripotent stem cells [J]. *J Artif Organs*, 2011, 14(1): 58-66.
- [30] BILOUSOVA G, ROOP D R. Generation of functional multipotent keratinocytes from mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 961: 337-350.
- [31] RACILA D, WINTER M, SAID M, et al. Transient expression of OCT4 is sufficient to allow human keratinocytes to change their differentiation pathway [J]. *Gene Therapy*, 2011, 18(3): 294-303.