

极小胚胎样干细胞的研究现状和眼科临床意义

肖庆¹, 高玲², 唐罗生², 赵屹女¹, 孙红晶¹

作者单位:¹(310000)中国浙江省杭州市,浙江大学医学院附属第二医院滨江院区 杭州市滨江医院眼科;²(410011)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科

作者简介:肖庆,博士,主治医师,研究方向:视网膜病。

通讯作者:高玲,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:视网膜病. gaoling66@gmail.com

收稿日期:2014-01-23 修回日期:2014-04-10

New trends and clinical significance of very small embryonic-like stem cells in Ophthalmology

Qing Xiao¹, Ling Gao², Luo-Sheng Tang², Yi-Nü Zhao¹, Hong-Jing Sun¹

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital (Binjiang Branch) of School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, Zhejiang Province, China;²Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Ling Gao. Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. gaoling66@gmail.com

Received:2014-01-23 Accepted:2014-04-10

Abstract

• Very small embryonic-like stem cells (VSELs) is a rare population of pluripotent adult stem cells, whose biological nature is similar to that of embryonic stem cells, firstly identified in murine bone marrow (BM) and human cord blood (CB) by Kucia and his group in University of Louisville. They have similar outlook to embryonic stem cells such as cell morphology and markers and similar inner pluripotent characteristics which make them be the most potential seed cells in the cell replacement therapy. In this review, we will focus on research advance about VSELs and clinical significance in the stem cell transplantation treatment of retinal degenerative diseases.

• **KEYWORDS:** very small embryonic-like stem cells; retinal degenerative diseases; stem cell transplantation/treatment

Citation: Xiao Q, Gao L, Tang LS, et al. New trends and clinical significance of very small embryonic-like stem cells in Ophthalmology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(5):842-845

摘要

极小胚胎样干细胞(very small embryonic-like stem cells, VSELs)是美国路易斯维尔大学 Kucia 研究小组从小鼠骨髓和人脐带血中分离出一种具有类似胚胎干细胞生物特性的多潜能成体干细胞。与胚胎干细胞相似的外表——细胞形态及表面标志、以及相似的内在——多分化潜能决定了 VSELs 一出现就被细胞替代疗法视为最有潜力的种子细胞,本文就 VSELs 的研究历程及在眼科干细胞治疗视网膜退行性疾病中的临床意义作一综述。

关键词:极小胚胎样干细胞;视网膜退行性疾病;干细胞移植/治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.15

引用:肖庆,高玲,唐罗生,等.极小胚胎样干细胞的研究现状和眼科临床意义.国际眼科杂志 2014;14(5):842-845

0 引言

近年来研究表明,骨髓中的非造血干细胞中存在数目稀少的特殊多潜能干细胞,如骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)^[1],成体多能祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)^[2],成体骨髓多向诱导细胞,极小胚胎样干细胞^[3];它们也可能均为骨髓中分离出来的同一类细胞,命名不同而已。这些多潜能干细胞在体外能分化为三个胚层;VSELs 在体外培养中能够分化为内中外胚层的细胞^[3],潜在分化能力强,近年已成为原始多潜能干细胞(pluripotent stem cells, PSC)移植研究的热点。在本综述中,我们集中讨论极小胚胎样干细胞(very small embryonic-like stem cells, VSELs)的分离、扩增、起源及其视网膜 VSELs 在眼科干细胞治疗视网膜退行性疾病中的临床应用前景。

1 分离是前提

VSELs 的分离经过了趋化分离、免疫荧光激活细胞分选、磁珠分选、高速流式细胞分选等几个阶段。这几种方法相互结合、各有利弊。

VSELs 最先通过趋化分离和免疫荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)相结合的方法得到^[4]。首先从1月龄大的健康小鼠股骨骨髓中分离得到单个核细胞,用低渗的方法除去混杂的红细胞后添加 SDF-1 进行趋化作用,表达 CXCR4 受体的细胞能够与 SDF-1 反应结合而得到初步分离;然后再利用 FACS 对筛选出的 CXCR4+ 细胞进行 CD45 标志的分选,得到 CXCR4+CD45+ 和 CXCR4+CD45- 两细胞群。通过直接显微镜观察 CXCR4+CD45- 细胞群含有稀少的直径约 2~4 μm 小细胞,这些细胞相对表达较多的 Oct-4, Nanog 等多能干细胞标志,即 VSELs。

后来 Kucia 等认为,表达 PSC 标志的小体积 CXCR4+CD45- 细胞也可以通过用 FACS 分选 Sca-1+ 细胞而得

到, Sca-1 可以代替 CXCR4 成为 FACS 分选的标志。因此 VSEL-SCs 可以通过 FACS 方法, 利用高速流式细胞分选仪从小鼠骨髓单核细胞悬浮液中直接分选标志为 Sca-1⁺/Lin⁻/CD45⁻, 直径在 2~10 μ m 的细胞。

相继, Kucia 等^[5]采用与鼠 VSELs 分选相同的方法, 利用 FACS 在人的新鲜脐带血中也分离到了与鼠 VSEL-SCs 相类似的细胞群, 即 CXCR4⁺/CD133⁺/CD45⁻细胞。近来 Halasa 等^[6]也报道用两步分离法从人脐带血中分离出 VSEL-SCs。

针对细胞体积标记的磁珠筛选方法从小鼠骨髓中分离 VSELs 这种方法是将整个筛选体系的筛孔大小设定在 2~10 μ m, 该区域中大部分是细胞碎片、红细胞和血小板, 但是还有少量的有核细胞存在。其中就包括了 VSELs。然后再用流式细胞术分选 Sea-1+Lin-CD45- 标志的细胞即可得到。分析可知, VSELs 约占小鼠骨髓有核细胞的 0.03%^[7], 其中的 95% 直径在 2~6 μ m。因此, 通过将流式细胞术和体积标记的磁珠二者结合的方法, 研究者成功地从小鼠骨髓中分离了体积极小的 VSELs。

2008 年 Liu 等^[8]使用方法从新生小鼠视网膜中分离出视网膜 VSELs, 并证实其体外培养时具有向三个胚层分化能力, 为 VSELs 在眼科细胞移植治疗视网膜变性类疾病提出了新的思路。

我们用免疫磁珠的方法从新生 C57 小鼠视网膜组织中分离出 SCAL-1+LIN-CD45-, 也就是 VSELs, 该方法对细胞活性和功能干预少, 但是效率低。Danova-Alt 等^[9]从人脐血中分离出一种介于胚胎干细胞和成体干细胞中的异形沉寂的非整倍体核型细胞, 这类 VSELs 缺乏干细胞特性。因此, 对于 VSELs 的分离技术日渐成熟, 但其更多亚型的发现也给该细胞群的定义带来挑战。

2 扩增是瓶颈

VSELs 的体外扩增是进行定向诱导分化从而应用于临床的前提。具有高度自我更新能力是胚胎干细胞显著的特征之一, 体外维持胚胎性干细胞自我更新的主要方法是促进细胞增殖和抑制其分化, 常用方法包括饲养层细胞, 条件培养基。

目前 VSEL-SCs 的扩增经历了几个阶段。Ratajczak 等^[10]以 C2C12 鼠成肌细胞为饲养层, 将 5%~10% 的纯化 GFP+鼠骨髓来源 VSELs 平铺培养, 形成了细胞球结构。球状体细胞核大, 含常染色质, 细胞标志为 CXCR4+SSEA-1+Oct-4+, 表达胚胎碱性磷酸酶。因 VSELs 来自 GFP+鼠, 可排除球状体来自饲养层细胞系或 VSELs 和 C2C12 细胞融合的可能。球状体细胞若再置于饲养层培养, 经 5~7 代后可以形成新的球状体。若将其再分散为单个细胞, 再铺于定向诱导分化介质中, 可以分化为包括心肌细胞的三胚层细胞系, 表明扩增后的 VSELs 仍能保持多分化潜能^[4]。Murry 等^[11]把高度纯化的 VSELs 在体外单独培养仅能存活数周, 而且不能增殖和分化, 但是把来源于 GFP+小鼠骨髓的 VSELs 和新鲜分离到的 GFP+鼠骨髓单核细胞在心肌、神经、胰腺定向分化介质中培养后表明, VSELs 能够被定向诱导分化为中胚层的心肌细胞, 外胚层的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞以及内胚层的胰岛细胞。

目前 VSELs 的扩增技术还不成熟, 而且体外的扩增可能需要几周的时间, 对于治疗具有 12h 内治疗时间窗的急性心肌梗死等无法获得足够数量的自体 VSELs。因

此, VSELs 的扩增是限制其应用于临床的瓶颈。

于是, VSELs 的动员和归巢就显得尤为重要。Kucia 等^[12]认为, 在机体状态稳定时, VSELs 以相对低的水平在外周血中循环, 而在脑卒中、心肌梗死等机体应激情况下, VSELs 可以快速动员到外周血中^[13,14]。因此可认为 VSELs 是原始细胞释放的一个机动池, 可以从干细胞微环境中向外周血释放并发生特殊的定向分化。目前对 VSELs 动员和归巢机制的认识尚不清楚, Paczkowska 等^[15]对脑卒中患者的研究和 Wojakowski 等^[16]对心肌梗死患者的研究显示动员到外周血中的 VSELs 数量和血清 SDF-1 水平呈正相关。Abdel-Latif 等^[17]的研究认为 VSELs 的早期动员可能是由于损伤心肌分泌 SDF-1, 通过 CXCR4+SDF-1 轴对 VSEL 进行积极募集。这些研究都提示 SDF-1/CXCR4+轴可能在 VSEL 的动员和归槽过程中发挥主要作用。

3 起源是谜底

关于 VSELs 的生物学起源至今是日渐解开的谜。Ratajczak 等^[18]认为骨髓中的 VSELs 来源于上胚层干细胞(epiblast-derived stem cells, EPSCs)、及少量来源于原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)等。Kucia 的假说认为上胚层干细胞表达 Oct-4 和 c-met 标志, 可分别与基质源性因子和干细胞生长因子/扩散因子发生黏附作用, 因此, 在胚胎形成过程中, 上胚层干细胞可能通过趋化黏附作用定位于外周的组织器官, 随后形成成体中多能性 VSELs。不少学者分别从鼠和人生殖组织中分离培养出 VSELs, 进一步证实了 VSELs 的部分来源途径, 也为其在再生医学中的使用提供了体外扩增的途径^[19,20]。

Liu 等^[8]认为小鼠视网膜中单潜能 VSELs 是骨髓中多潜能 VSELs 细胞库里释放出来的更具有组织特异性的成体干细胞。因为与骨髓中 VSELs 相比, 新生视网膜 VSELs 表达眼部早期发育特异性基因 Pax6, Otx2, 从而说明其已经向眼部组织发生了一定的分化, 在体外培养中能分化为表达三个胚层标记物的组织, 所以 Liu 等^[8]学者认为视网膜组织中的 VSELs 是来源于胚胎多潜能 VSELs 的终末分化的成体干细胞。

当然, 目前关于 VSELs 的真正起源倾向于成体干细胞的说法, 在胚胎形成过程中, 作为循环的 PSCs 的机动库储存于成熟组织中, 并随着年龄的增长而减少。最近 Miyanishi 等^[21]的研究表明成体鼠骨髓中未发现具有多个分化潜能的 VSELs。它们可能是一群沉寂的 PSCs, 在特定条件下能动员至外周血中, 分化为组织特异性的单潜能干细胞, 参与组织器官的再生和修复。越来越多的科学证据将会证实其生物学来源。

4 应用是关键——分化潜能和眼科应用憧憬

VSELs 具有较原始的多向分化潜能, 生物学特性类似胚胎干细胞, 能在个体骨髓中分离获得, 若作为移植疗法和组织工程中的种子细胞, 具有替代胚胎干细胞的潜力, 从而避免伦理道德争议, 前景广阔。郭慧娟等^[22]研究认为粒细胞集落刺激因子对缺血脑组织的保护作用在于它能使缺血边缘带的基质细胞衍生因子-1 表达增加, 并通过 CXCR4/SDF-1 轴的趋化作用, 使募集到梗死区域的 CXCR4+细胞增多, 从而使更多的 VSELs 从骨髓动员到外周血中, 并由此推测, 脑梗死后, 骨髓中动员出来的 VSELs 在特定微环境中能够分化成神经干细胞, 在脑

组织修复中发挥主要作用。

Ratajczak 等^[23]学者也认为中风激发了 VSELs 向外周血移行,也有望能从外周血中分离 VSELs,并进行体外扩增,从而应用于神经组织的损伤修复。Tang 等^[24]认为 VSELs 可以改善心功能和延缓心肌重塑,Dawn 等^[25]认为 VSELs 移植后可以改善左心室收缩功能,而且 Zuba-Surma 等^[26]认为 VSELs 具有延缓机体衰老的作用。

干细胞移植对心肌梗死后左心室结构和功能改善,既有干细胞直接分化为心肌细胞核血管内皮细胞,又有旁分泌机制的参与,甚至还有干细胞募集内源性 CSC 分化为心肌细胞和血管,究竟何种机制占主导地位尚存在争议^[27]。随着研究的深入,VSELs 有可能成为自体 PSC 移植的最佳细胞类型,为缺血性心脏病的治疗带来革命性的进展。

视网膜 VSELs 给眼科视网膜退行性疾病带来新的曙光。对于视网膜退行性疾病来说,机体自身的修复机制已经不能够代偿视网膜细胞功能的丢失,因此,治疗要点在于补充损失的组织,防止进一步的病理性损害并修复其生理功能。于是干细胞分化为眼部视网膜细胞的潜能及应用于眼科的价值已逐渐被人们认知^[28]。

胚胎干细胞(ESCs)作为全能干细胞可以分化为晶状体细胞、视网膜神经元和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞^[28,29]。动物实验发现 ESCs 可以在体内分化为有功能的光感受器并可恢复动物的光反应^[30]。已有学者用动物黄斑变性的模型研究 ESCs 的长期安全性和功能,结果显示有很大应用前景^[31]。并且来源于成人的成体干细胞可以避免 ESCs 和治疗性克隆等伦理学争论问题,因此有着极大的临床应用潜力。视网膜干细胞(retinal stem cells, RSCs)治疗视网膜退行性疾病的潜能也引起医学界的广泛重视。视网膜干细胞定位于低等脊椎动物和哺乳动物的睫状体平坦部至睫状体边缘区域,有实验证实。在皇家外科学院(royal college surgeons, RCS)视网膜色素变性小鼠模型中发现 RSCs 明显增多,因而他们推测 RSCs 可以使退行的视网膜复性^[32]。

Liu 等^[8]对新生小鼠视网膜组织进行研究,发现 VSELs 定位于视网膜的神经节细胞层。然而与能分化成视网膜各种组织的视网膜祖细胞(retinal progenitor cells, RPCs)不同,这些 VSELs 都是沉寂的。这说明它们对正常视网膜生长分化没有作用。但是当允许它们形成球形体时。他们就会关闭胚胎干细胞的基因而表达 RPCs 的标志基因。这一研究提出了 VSELs 具有可以在特定条件下分化成为视网膜各类细胞的潜能。为干细胞治疗视网膜变性疾病提供了理论基础。

综上所述,当胚胎干细胞作为替代治疗的种子细胞还备受伦理上的争议时,VSEL-SCs 已经成为了种子细胞的“后来者”,且呈“居上”之势。首先,骨髓中 PSCs 的发现致使学者重新考虑成体干细胞的更大可塑性这一特征,VSELs 可能作为 PSCs 一种重要来源更为临床医学中的心内科和神经内科细胞替代疗法开拓了新的研究领域;其次,视网膜 VSELs 是一种终末分化的成体干细胞,与胚胎干细胞相比,在眼科视网膜退行性疾病的治疗中更充满新的希望。

但是 VSELs 应用于临床也存在一些弊端,更需我们大量的研究:(1)本身数量少,且体外扩增是瓶颈;(2)

Shin 等^[33]认为 VSELs 具有异质性,基因分析其可能存在富含种系特异性基因 Stella 和 Prdm14 的亚型。不同的亚型具有不同的分化潜能,就很难去分析是否单细胞水平能同时分化为三个胚层;(3)定位艰难:VSELs 定位于受损区域依赖于定位信号,但是这些定位信号容易受到受损组织中的巨噬细胞和白细胞释放出的细胞因子或蛋白溶解酶的干扰;VSELs 在培养过程中暴露于生长因子等难以保持不被激活的休眠状态^[34];如何保持细胞对细胞分裂生长因子的不响应性是再生医学中有待解决的关键问题^[35];(4)成瘤可能性。

因此,VSELs 能否有效应用于临床,能否克服弊端成功替代胚胎干细胞,都有待大量进一步的科学实验来证实,相信答案就在不久的将来。

参考文献

- 1 Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7841-7845
- 2 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-49
- 3 Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+) SSEA-1(+) Oct-4(+) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20(5): 857-869
- 4 Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, et al. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1): 125-134
- 5 Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+SSEA-4+Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood; preliminary report. *Leukemia* 2007; 21(2): 297-303
- 6 Halasa M, Baskiewicz-Masiuk M, Dabkowska E, et al. An efficient two-step method to purify very small embryonic-like (VSEL) stem cells from umbilical cord blood (UCB). *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46(2): 239-243
- 7 Zuba-Surma EK, Kucia M, Abdel-Latif A, et al. Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (VSELs) by Imagestream system analysis. *J Cell Mol Med* 2008; 12(1): 292-303
- 8 Liu Y, Gao L, Zuba-Surma EK, et al. Identification of small Sca-1(+), Lin(-), CD45(-) multipotential cells in the neonatal murine retina. *Exp Hematol* 2009; 37(9): 1096-1107
- 9 Danova-Alt R, Heider A, Egger D, et al. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *PLoS One* 2012; 7(4): e34899
- 10 Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* 2014; 28(3): 473-484
- 11 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428(6983): 664-668
- 12 Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, et al. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells* 2008; 26(8): 2083-2092
- 13 Zuba-Surma EK, Kucia M, Dawn B, et al. Bone marrow-derived pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) are mobilized after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(5): 865-873
- 14 Kucia M, Zhang YP, Reza R, et al. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; 20

- (1):18–28
- 15 Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, *et al.* Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke* 2009;40(4):1237–1244
- 16 Wojakowski W, Tenders M, Kucia M, *et al.* Mobilization of bone marrow-derived Oct-4 + SSEA-4 + very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(1):1–9
- 17 Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Ziada KM, *et al.* Evidence of mobilization of pluripotent stem cells into peripheral blood of patients with myocardial ischemia. *Exp Hematol* 2010; 38(12):1131–1142
- 18 Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, *et al.* A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007;21(5):860–867
- 19 Mizrak SC, Chikhovskaya JV, Sadri-Ardekani H, *et al.* Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Human Reproduction* 2010;25(1):158–167
- 20 Gong SP, Lee ST, Lee EJ, *et al.* Embryonic stem cell like cells established by culture of adult ovarian cells in mice. *Fertil Steril* 2010; 93(8):2594–2601
- 21 Miyanishi M, Mori Y, Seita J, *et al.* Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Reports* 2013;1(2):198–208
- 22 郭慧娟,王健,张兴秀,等. 粒细胞集落刺激因子对骨髓极小胚胎样干细胞的动员和募集. *中国组织工程研究与临床康复* 2011;15(14):2530–2534
- 23 Ratajczak J, Zuba-Surma E, Paczkowska E, *et al.* Stem cells for neural regeneration—a potential application of very small embryonic-like stem cells. *J Physiol Pharmacol* 2011;62(1):3–12
- 24 Tang XL, Rokosh DG, Guo Y, *et al.* Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ J* 2010;74(3):390–404
- 25 Dawn B, Tiwari S, Kucia MJ, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Stem Cells* 2008; 26(6):1646–1655
- 26 Zuba-Surma EK, Wu W, Ratajczak J, *et al.* Very small embryonic-like stem cells in adult tissues: potential implications for aging. *Mech Ageing Dev* 2009;130(1–2):58–66
- 27 Zuba-Surma EK, Guo Y, Taher H, *et al.* Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2011; 15(6):1319–1328
- 28 Machalifiska A, Baumert B, Kuprjanowicz L, *et al.* Potential application of adult stem cells in retinal repair – challenge for regenerative medicine. *Curr Eye Res* 2009;34(9):748–760
- 29 Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(39):16698–16703
- 30 Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* 2009;4(1):73–79
- 31 Lu B, Maleuit C, Wang S, *et al.* Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009;27(9):2126–2135
- 32 Jian Q, Xu H, Xie H, *et al.* Activation of retinal stem cells in the proliferating marginal region of RCS rats during development of retinitis pigmentosa. *Neurosci Lett* 2009;465(1):41–44
- 33 Shin DM, Liu R, Wu W, *et al.* Global gene expression analysis of very small embryonic-like stem cells reveals that the Ezh2-dependent bivalent domain mechanism contributes to their pluripotent state. *Stem Cells Dev* 2012;21(10):1639–1652
- 34 Kassmer SH, Krause DS. Very small embryonic-like cells: biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Mol Reprod Dev* 2013;80(8):677–690
- 35 Mierzejewska K, Heo J, Kang JW, *et al.* Genome-wide analysis of murine bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells reveals that mitogenic growth factor signaling pathways play a crucial role in the quiescence and ageing of these cells. *Int J Mol Med* 2013;32(2):281–290