

文章编号 (Article ID): 1009-2137(2013)02-0263-05

· 专论 ·

间充质干细胞系统：解析机体免疫调控和代谢平衡

赵春华*

北京协和医学院、中国医学科学院基础医学研究所组织工程中心, 协和医院, 北京 100000

摘要 间充质干细胞由于其独特的生物学特性和临床应用潜能,一直是干细胞研究的热点。这里,我首次提出间充质干细胞系统新概念:自胚胎发育早期,经历整个生长发育全过程的不同胚层、多个发育阶段,将亚全能间充质干细胞到不同等级分化潜能间充质干/祖细胞群体统称为 MSC 系统。MSC 系统的确立具有重要意义:(1)赋予了 MSC 三大重要生物学特征,即干细胞自身特性、组织微环境功能及免疫调控功能;(2)平衡机体免疫与组织代谢;(3)提供高效转化为临床安全有效的组织特异性干细胞。总之,该系统很好的解释了间充质干细胞的异质性,同时丰富了我们之前提出的亚全能干细胞理论,为研究人员更好的理解间充质干细胞提供了深厚的理论平台。

关键词 干细胞;间充质干细胞;间充质干细胞系统

中图分类号 R331.2

文献标识码 A

doi:10.7534/j.issn.1009-2137.2013.02.001

Concept of Mesenchymal Stem Cells: Bring More Insights into Functional Research of MSC

ZHAO Chun-Hua

Tissue Engineering Center, Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing, China

* Corresponding Author: ZHAO Chun-Hua, Professor. E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn Tel: (010)65125311

Abstract Mesenchymal stem cells have generated great interest among researchers and physicians due to their unique biological characteristics and potential clinical applications. Here, I propose for the first time the concept of a hierarchical system which is composed of all mesenchymal stem cells from post-embryonic subtotipotent stem cells to MSC progenitors. Post-embryonic subtotipotent stem cells are left-over cells during embryonic development and are on the top of the hierarchy. MSC system is a combination of cells that are derived from different stages of embryonic development, possess different differentiation potential and ultimately give rise to cells that share a similar set of phenotypic markers. The concept of MSC system has important implications: ① it entirely explains the three important biological characteristics of MSC: stem cell properties of MSC, MSC as components of tissue microenvironment and immunomodulatory functions of MSC. ② It balances immune responses and tissue metabolism. ③ It could provide tissue-specific stem cells for clinical application with high efficiency and safety. In a word, this concept constitutes an important part of the biological properties of MSC and will help researchers gain better insight into MSC.

Key words stem cell; mesenchymal stem cell; mesenchymal stem cell system

J Exp Hematol 2013; 21(2):263-267

早在 1968 年 Friedenstein 等^[1]用小鼠骨髓基质细胞移植到肾被膜下,发现小骨形成并有造血,从而确立了骨髓基质细胞(stromal cells)能向成骨细胞分化并支持造血的观念。继 1978 年 Schofield^[2]根据骨髓基质细胞在体外支持造血干/祖细胞生长提出了微环境假说,指出造血干/祖细胞依赖由基质细胞构成的微环境维持自我更新和增殖分化,以保证骨髓造血。1991 年 Caplan 等首先采用间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)命名骨髓中具有成骨、成脂和成软骨等分化潜能特征的基质干细胞。到 1999 年骨髓中的 MSC 就再也不是骨髓中的“二等公民”^[3],MSC 具有成骨、成脂和成软骨分化潜能的间充质干/祖细胞,作为理想种子细胞在组织工程

再生医学基础研究与临床实践中备受关注。近年随着 MSC 研究深入,尤其将从发育学角度更全面认知 MSC,并系统地阐述 MSC 概念及所特有重要生物学功能意义重大。

“间充质干细胞系统”概念

多年来 MSC 通常特指为骨髓来源的间充质干/祖

基金项目:国家重大科学研究计划(973)(编号 2011CB964900);国家 863 项目(编号 2011AA020100)

* 通讯作者:赵春华,教授. E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn 电话:(010)65125311

2013-02-30 收稿;2013-03-20 接受

细胞可诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞, 鉴定 MSC 的标准采用区别于造血干细胞和内皮干细胞等的 $CD73^+ CD90^+ CD105^+ MHC\text{-class1}^+ CD45^- CD34^- CD31^- CD14^- HLA^- DR^-$ 表型特征。按系统发育学 MSC 起源于胚胎发育早期不同胚层, 胚胎期 MSC 起源外胚层神经脊 (neural crest), 分化为 $Sox1^+$ 神经上皮样细胞群体可诱导转化为 MSC; 中胚层胚胎 (trunk) 来源 MSC 为另一主要原始 MSC 干细胞群体, 可诱导分化为骨骼和结缔组织; 早期中胚层 Flk^+ 前体干细胞具有生成内皮、血液、肌肉和间质组织等多分化潜能; 胚胎干细胞系在 ESC/EB 培养体系中能产生具有造血细胞分化潜能的母细胞集落 BL-CFC 和具有向脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞分化潜能的间充质干细胞集落 MS-CFC, 在生成 MS-CFC 过程中相继表达中内胚层基因 *Brachyura*、*Mixl1* 和 *Eomes*, 侧板中胚层和胚外中胚层基因 *FoxF1*、*Gata 2* 和 *HAND1* 等, 说明 MSC 来自胚胎发育早期并含不同发育阶段的干细胞及其等级分化后代; 我们从人胎儿多种组织中分离获得胚胎发育后储留在成体的 MSC 亚群。体内外实验证实, 人 MSC 具有三胚层分化潜能: 血管内皮分化、肾/心肌分化、脂肪、骨骼肌分化、重建造血系统中胚层再生修复功能; 皮肤损伤、中枢神经细胞损伤外胚层再生修复功能; 肝损伤、肺损伤内胚层再生修复功能。据此提出了“亚全能干细胞学说”概论, 并以全基因组组蛋白图谱解析人 MSC 亚群中三胚层分化关键转录因子组蛋白修饰状态、表达谱与胚胎干细胞相似, 阐明了亚全能 MSC 等级结构性 (hierarchy), 及三胚层分化潜能的表现遗传学分子基础, 以维持生物机体发育和组织细胞代谢平衡^[4-16]。

综上对 MSC 群体发育过程系统的认识, 我们首次提出间充质干细胞系统新概念: 自胚胎发育早期, 经历整个生长发育全过程的不同胚层、多个发育阶段, 将亚全能间充质干细胞到不同等级分化潜能间充质干/祖细胞群体统称为 MSC 系统。MSC 系统发育起源于高度异质性干细胞群体, 保留自我复制和多等级分化潜能, 参与机体多组织细胞生长发育、新陈代谢, 经不同分化阶段生成间充质组织, MSC 前体细胞基本表型为 $CD73^+ CD90^+ CD105^+$ 可诱导特化成脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞。

MSC 系统的确立赋予了 MSC 三大重要生物学特征: 即干细胞自身特性、组织微环境功能及免疫调控功能。MSC 系统涉及: ①干细胞自身生物学特性: 囊括亚全能干细胞至间充质组织多个发育阶段、

不同胚层组织分化潜能异质群体, 是研究干细胞自我分化、发育、复制、增殖、凋亡、衰老等诸多生命现象的理想细胞模型; ②组织微环境功能: 渗透干细胞体内移植全过程, 支持/参与干细胞迁移、归巢、组织再生修复、器官功能重建等, 成为干细胞临床转化医学关键科学问题; ③免疫调控功能研究: 从整体系统生物学角度解析体内外复杂免疫网络调控, 揭示干细胞参与机体免疫调控机理, 为临床用于自身免疫性疾病治疗奠定科学基础 (图 1)。

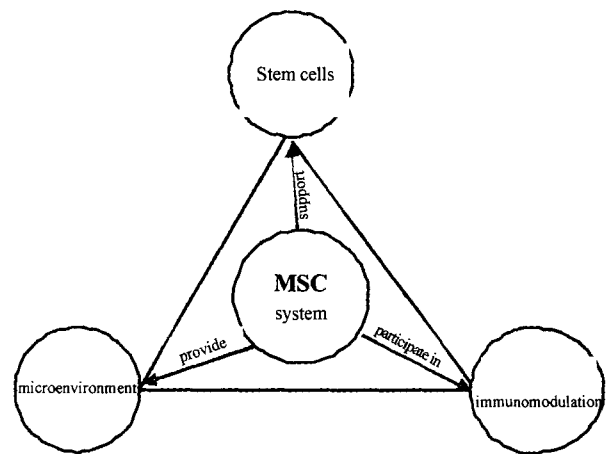


Figure 1. Concept of MSC system entirely explains the three important biological characteristics of MSC.

MSC 系统发挥重要免疫调控作用

MSC 具低免疫原性, 表面表达低中水平 MHC-I 类抗原而不表达 MHC-II 类抗原, 也不表达 Fas 配体和共刺激分子 CD80、CD86、CD40 或 CD40L, MSC 主要通过分泌抑制性因子间接作用或细胞间直接接触调节各类免疫细胞活性而发挥其免疫抑制作用。MSC 分泌转化生长因子- β (TGF- β) 与肝细胞生长因子 (HGF) 等抑制因子介导 T 细胞的增殖抑制; 持续地分泌 PGE2, 生成 NO 等造成一个免疫抑制的微环境, 抑制 T 细胞活化和防止免疫排斥反应。MSC 与免疫细胞接触发挥免疫网络双向调节活性; MSC 具有抑制 Th1 分泌 IFN- γ , 增加 Th2 分泌 IL-4 的能力; MSC 上调 $CD4^+ CD25^+$ Treg 功能, MSC 产生 IDO 从而通过色氨酸途径能抑制 B 细胞的增殖与活化, 发挥抑制自身免疫作用。MSC 可降低 NK 细胞 IFN- γ 的分泌水平参与 NK 细胞的免疫调节。MSC 还表达不同类型 toll-like 受体、抑制或活化各种免疫效应细胞, 并调节抗原递呈细胞的分化成熟,

活化 TLR4 信号促进 MSC 分泌 IL-6, IL-8, TGF- β 等因子并发挥促炎症作用;活化 TLR3 信号促进 MSC 分泌 IDO, PGE-2, IL-4, IL-1RA 并发挥炎症抑制作用。我们证明 MSC 可抑制 DC 细胞分化和成熟;分泌 PGE2 抑制 CD34⁺ 细胞向 cDC 分化、促进 CD34⁺ 细胞向 pDC 分化,抑制 DC 诱导的 Th 细胞生成 Th1 型、促进分泌 Th2 型细胞因子等功能;通过 Jagged-2 关键分子维持 MSC-DC 免疫活性,诱导产生一类新型 regDC 亚群;诱导受者在体内形成稳定嵌合体。系列研究证实了 MSC 在免疫调节中表现出重要双向调控作用^[17-21],为进一步揭示 MSC 体内复杂调控机理,认知与干预免疫性疾病提供实验室依据。

MSC 系统平衡机体免疫与组织代谢

MSC 系统概念丰富了其科学内涵、不仅明确 MSC 系统多胚层来源、具有多系分化潜能,强调间充质组织不同分化发育阶段干细胞自我复制,增殖等特征,更是将 MSC 系统微环境功能研究及免疫调控特性纳入再生医学研究领域并从整体系统生物学角度解析免疫与组织代谢平衡。我们首次提出了 MSC 系统干细胞担当机体重要调节免疫与组织代谢平衡角色,在整体水平系统性发挥免疫网络负调控作用,抑制组织损伤后等机体过度炎症反应,以此转化机体为组织再生修复、功能重建状态,进一步发展了亚全能干细胞学说。在生理尤其病理情况下,我们发现 MSC 可迁移到损伤组织和炎症区域,促进特异性干/祖细胞多功能调控, MSC 在体外不添加任何外源因子的情况下能够诱导造血干祖细胞生成调节型 DC,且在体内外具有较强的免疫抑制作用; MSC 通过分泌 IL-10 激活 JAK-STAT5 信号通路,改变关键转录因子 SOCS3 基因的组蛋白修饰状态、影响其转录活性,激活的细胞因子信号抑制因子 3 的表达、并诱导新型调节性 DC 亚群生成,而调节性 DC 不仅在体外具有较强的免疫抑制作用,而且在体内通过抑制免疫炎症亢进的反应,产生免疫耐受,降低免疫排斥反应等^[22]。促进受体组织干细胞的增殖修复,改善损伤器官功能,成为治疗重大疾病有效手段。

MSC 系统参与重要多组织代谢平衡,探索 MSC 在机体向不同组织分化及谱系特化内在调控机理,对指导防治代谢失调性疾病具重要临床意义。在干细胞分化过程中一种谱系分化通常抑制另一谱系的分化, MSCs 向成骨细胞分化过程中, Runx2 在上调成骨分化特异基因表达的同时,也能抑制

PPAR γ 2 的表达;骨形态蛋白信号分子(BMP),特别是 BMP2 在骨髓基质细胞向成骨细胞或脂肪细胞的谱系决定过程中具有重要作用,通过作用于 TAZ、Msx2 和 ID 蛋白等多个靶基因操纵细胞的命运。作为成脂分化的主要启动因子之一的 C/EBP α ,以及负责激活成脂分化特异性基因表达的关键转录因子 PPAR γ 2 均被证明能够通过抑制 Runx2 的转录阻碍 MSC 成骨细胞分化。众多信号通路参与了干细胞向成脂及成骨分化的调控,每一条信号通路中又由众多上下游分子的级联反应组成,而且各通路间又存在着极其广泛的交叉与对话。最近对成脂及成骨分化中差异基因表达的分析发现,在 MSC 向成脂或成骨分化谱系定型前大部分分化相关基因的表达呈抑制状态,生物信息学的计算与分析提示,miRNA 可能参与了 MSC 谱系定型前基因抑制状态的维持,基于其具有靶基因调控上的广泛性和功能的多效性,miRNA 最有可能成为调控细胞命运决定的关键因素。发现了一些在 MSC 向成脂和成骨谱系分化有重要调控作用的 miRNA。miR-100 能够通过靶向下调 BMP2 抑制 MSC 的成骨分化。miR-22 对 MSC 的成脂分化和成骨分化具有反向的调控作用,即 miR-22 在 MSC 过表达后可通过靶向 HDAC6,抑制 MSC 向成脂分化的同时促进其向成骨分化。而 miR-17-5p 和 miR-106a 则通过直接靶向谱系特化关键转录因子 BMP2,继而下调成骨性转录因子 TAZ、MSX2 和 Runx2 的表达,解除对成脂性关键转录因子 C/EBP α 和 PPAR γ 的抑制作用,从而发挥其调控 MSC 向脂肪生成和骨生成的命运决定作用。上述研究初步揭示了 miRNA 通过调控 BMP/TGF β 通路、Wnt 通路或影响成脂成骨关键转录因子的表观遗传修饰,在 MSC 向成脂和成骨分化的命运决定中发挥复极其重要双重调控效应^[23-27]。总之, MSC 系统决定所谓干细胞组织分化谱系命运:骨脂新陈代谢通常由 MSC 在转录水平互相排斥制约的关键转录分子控制,这些转录因子和信号途径相互交织,形成杂的调控网络,有效的维持着体内脂肪和成骨生成及代谢的自稳态(图 2)。

MSC 系统高效转化为临床安全有效组织特异性干细胞

MSC 系统在再生医学中具有广阔应用前景:韩国与加拿大相继批准自体与异体 MSC 干细胞新药产品

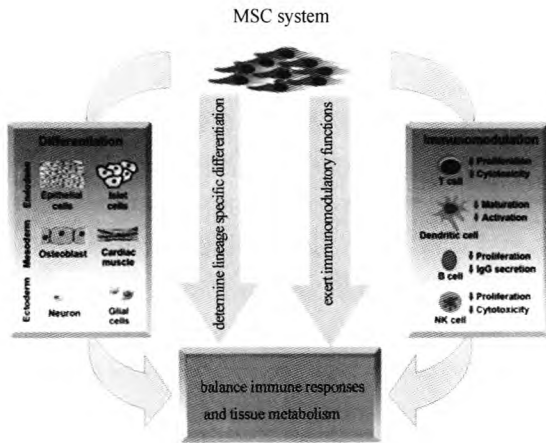


Figure 2. MSC system balances immune responses and tissue metabolism.

上市、进入临床应用。MSC 系统含有不同组织来源不同分化阶段干祖细胞,作为临床治疗理想种子细胞,具多胚层多组织分化,支持营养组织器官,促进参与组织再生修复、功能重建,并兼重要双向免疫调控作用。半个多世纪干细胞移植实践已证明组织特异性干细胞如造血干细胞能有效用于临床治疗多种重大疾病,然而组织特异性干细胞依然有诸多科学与临床难题,其中间充质干细胞多系组织细胞分化的潜能,及诱导分化为功能细胞效率急需解决。针对间充质干细胞具多胚层分化潜能特点,提出间充质干细胞转决定态的概念:即间充质干细胞经诱导活化组蛋白表观遗传学修饰由静息态转化为激活态模式。特点是干细胞决定分化关键转录因子的组蛋白表观遗传学修饰处于激活态^[28]。依据胚胎发育程序,在特定的细胞因子作用下,将处于转决定态的间充质干细胞诱导分化为特化组织细胞。此概念的提出从理论上丰富了亚全能干细胞学说,建立的高效向三胚层多种组织转分化关键技术,突破了干细胞新药规模化制备的瓶颈,为未来开展成体干细胞的产业化奠定了必备理论技术基础。

在临床实践中胰腺干细胞若依赖组织获取存在困难、且体外扩增十分有限,使用间充质干细胞作为种子细胞在体外诱导分化获得足够临床移植用数量的胰腺干细胞将可能解决以上难题。我们以间充质干细胞作为种子细胞,采用非病毒诱导、使用不同浓度的 Activin A 激活 Nodal/Activin 信号通路并联合其它信号转导通路的激活,依据胚胎发育胰腺是内胚层来源器官,在原肠形成期 epiblast 细胞首先形成原条(primitive streak)、进一步分化成为中内胚层、限定性内胚层(definitive endoderm)、经区域特化可

形成胰腺内胚层、获得胰腺干细胞,我们建立了3阶段诱导体系,第1阶段将人多潜能成体干细胞诱导形成限定性内胚层细胞,第2阶段将限定性内胚层细胞进一步诱导成胰腺干/祖细胞,第3阶段将胰腺干/祖细胞诱导成胰岛素分泌细胞。间充质干细胞在分步诱导过程中依次由原5%提高到80%高效率的诱导获得限定性内胚层细胞,获得效率达90%以上PDX1阳性的胰腺干细胞,并可进一步诱导分化为有功能的胰腺内分泌细胞及外分泌细胞,表达胰腺干/祖细胞及胰岛素分泌细胞的特异标志基因及转录因子,诱导获得的终产物能够分泌胰岛素并对葡萄糖刺激具有良好的反应性^[29]。

随着MSC系统在基础理论与临床实践中深入和广泛研究,相信MSC系统可形成一系列具有临床应用转化优势的特异性干祖细胞,发挥重要的多胚层组织分化再生、免疫调节作用及组织代谢平衡等功能,也必将为临床重大疾病治疗提供更多实用价值安全有效干细胞技术和产品。

参 考 文 献

- 1 Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2):230-247.
- 2 Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978; 4(1-2): 7-25.
- 3 Gerson SL. Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nat Med*, 1999; 5(3):262-264.
- 4 Liu KY, Chen YH, Zhao CH, et al. Coinfusion of mesenchymal stromal cells facilitates platelet recovery without increasing leukemia recurrence in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: a randomized, controlled clinical study. *Stem Cells Dev*, 2011; 20(10):1679-1685.
- 5 Lu C, Lu S, Zhao RC, et al. TAp63 α mediates chemotherapeutic agent-induced apoptosis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2011; 20(8):1319-1326.
- 6 Wu Y, Zhao RC, Tredget EE. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells*, 2010; 28(5):905-915.
- 7 Li K, Han Q, Zhao RC, et al. Not a process of simple vicariousness, the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells to renal tubular epithelial cells plays an important role in acute kidney injury repairing. *Stem Cells Dev*, 2010; 19(8):1267-1275.
- 8 Zhu Y, Sun Z, Zhao RC, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*, 2009; 23(5):925-933.
- 9 Qiao L, Xu Z, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res*, 2008; 18(4):500-507.
- 10 Liu Y, Yan X, Zhao RC, et al. Flk-1(+) adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in MDX mice. *Stem Cells Dev*, 2007; 16(5):695-706.

- 11 Li B, Shi M, Zhao RC, *et al.* Elevated tumor necrosis factor- α suppresses TAZ expression and impairs osteogenic potential of Flk-1⁽⁺⁾ mesenchymal stem cells in patients with multiple myeloma. *Stem Cells Dev*, 2007;16(6):921-930.
- 12 Yan X, Liu Y, Zhao RC, *et al.* Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1⁽⁺⁾ mesenchymal stem cell in lung. *Exp Hematol*, 2007;35(9):1466-1475.
- 13 Shi M, Li J, Zhao RC, *et al.* Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 2007;92(7):897-904.
- 14 Ma J, Shi M, Zhao RC, *et al.* Senescence-unrelated impediment of osteogenesis from Flk1⁺ bone marrow mesenchymal stem cells induced by total body irradiation and its contribution to long-term bone and hematopoietic injury. *Haematologica*, 2007;92(7):889-896.
- 15 Liao L, Li L, Zhao RC. Stem cell research in China. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007;362(1482):1107-1112.
- 16 Liu L, Sun Z, Zhao RC, *et al.* Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1⁺ CD31⁻ CD34⁻ mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells Dev*, 2006;15(3):349-357.
- 17 Sun Z, Han Q, Zhao RC, *et al.* NANOG has a role in Mesenchymal stem cells' immunomodulatory effect. *Stem Cells Dev*, 2011;20(9):1521-1528.
- 18 Shi D, Liao L, Zhao RC, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF- κ B signaling. *Exp Hematol*, 2011;39(2):214-224.
- 19 Zhang B, Liu R, Zhao RC, *et al.* Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2 dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, 2009;113(1):46-57.
- 20 Chen L, Zhang W, Zhao RC, *et al.* Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34⁽⁺⁾ cells. *Stem Cells Dev*, 2007;16(5):719-732.
- 21 Ren G, Zhao RC, Shi YF, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2008;2(2):141-150.
- 22 Liu X, Qu X, Zhao RC, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *J Immunol*, 2012;189(3):1182-1192.
- 23 Li H, Li T, Zhao RC, *et al.* miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*, 2012;10(3):313-324.
- 24 Zeng Y, Qu X, Zhao RC, *et al.* MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMPR2. *FEBS Lett*, 2012;586(16):2375-2381.
- 25 Huang S, Wang S, Zhao RC, *et al.* Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem Cells Dev*, 2012;21(13):2531-2540.
- 26 Zhuang Q, Zhao RC, Qiu G, *et al.* Differential proteome analysis of bone marrow mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis patients. *PLoS One*, 2011;6(4):e18834.
- 27 Yang Z, Bian C, Zhao RC, *et al.* MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through EID-1. *Stem Cells Dev*, 2011;20(2):259-267.
- 28 Li H, Chen J, Zhao RC, *et al.* Histone methylation and microRNA-mediated regulation of the multipotential state of Flk1⁺ mesenchymal stem cells. *Science/AAAS*, Washington, DC, 2011, PP.56-58.
- 29 Li J, Zhu L, Zhao RC, *et al.* Stepwise differentiation of human adipose derived mesenchymal stem cells towards definitive endoderm and pancreatic progenitor cells by mimicking pancreatic development in vivo. *Stem Cells Dev*, 2012 Dec 23.