

# 外周血细胞重编程为诱导性多潜能干细胞的研究进展

李施施<sup>1,2</sup> 刘 忠<sup>3</sup> 严庆丰<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学生命科学院, 杭州 310058; <sup>2</sup>浙江大学遗传学研究所, 杭州 310058;

<sup>3</sup>浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

**摘要** 诱导性多潜能干细胞(iPSCs)是指分化细胞中导入特定转录因子后逆转恢复到类似胚胎干细胞的具有自我更新、多向分化等潜能的一类细胞。诱导疾病特异性iPSCs是疾病机理、再生医学等领域的研究热点。目前,人iPSCs供体细胞主要来源于皮肤成纤维细胞,需要组织活检、体外增殖等繁琐过程。利用外周血细胞(peripheral blood cells)成功诱导iPSCs,具有取材方便、诱导快速等优点,将极大地促进iPSCs研究。该文在介绍iPSCs诱导方法的基础上,重点阐述了从小鼠B细胞、T细胞,人脐带血细胞,到人外周血细胞重编程为iPSCs的研究进展,分析了该技术的特点和可能存在的问题,并进行了前景展望。

**关键词** 诱导性多潜能干细胞(iPSCs); 外周血细胞; 成纤维细胞; 重编程; 转录因子

诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是指分化细胞中导入特定转录因子后逆转恢复到类似胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的具有自我更新、多向分化等潜能的一类细胞。2006年, Takahashi等<sup>[1]</sup>率先报道将*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*四个转录因子导入小鼠皮肤成纤维细胞后,实现了体细胞重编程为iPSCs。2007年, iPSCs技术在人体细胞上取得成功, Takahashi等<sup>[2]</sup>和Yu等<sup>[3]</sup>先后将人成纤维细胞重编程为iPSCs。之后iPSCs研究取得了一系列突破性进展。2008年, Marson等<sup>[4]</sup>用*Wnt3a*取代*c-Myc*,清除了外源致癌基因并成功诱导出iPSCs。2009年, Knut等<sup>[5]</sup>和Kaji等<sup>[6]</sup>在提高iPSCs安全性方面又取得了突破,他们不借助病毒载体制备了virus-free小鼠iPSCs,并成功地从所获得的iPSCs中移除了先前导入的转录因子基因。我国科学家在iPSCs研究领域也做出了重要贡献:周琪等<sup>[7]</sup>和高绍荣等<sup>[8]</sup>分别利用逆转录病毒和慢病毒诱导出iPSCs,注入小鼠4倍体囊胚腔中,最终培育出成体小鼠,首次证明iPSCs与胚胎干细胞一样具有全能性。诱导疾病特异性的iPSCs用于疾病机理、再生医学等研究将是iPSCs技术的发展趋势。

目前,人iPSCs供体细胞主要来源于皮肤成纤维细胞。然而从皮肤取样要进行组织活检等步骤,存在感染等潜在风险,并且需要较长时间体外扩增获得足量成纤维细胞才能进行iPSCs诱导,这些不足限制了iPSCs技术更广泛地应用。因此,寻找一种新的供体细胞来实现更快捷、更安全、更有效地诱导

iPSCs成为目前最迫切的问题。2010年,有三个研究团队<sup>[9-11]</sup>同时成功地从人外周血细胞中诱导出iPSCs,该项新技术具有取样方便,病人不必承受皮肤组织活检(biopsy)带来的痛苦与危险等优点,引起了广大研究者的关注。外周血细胞将有望取代皮肤成纤维细胞,成为诱导iPSCs的新供体细胞。本文在介绍iPSCs诱导方法的基础上,将重点阐述从小鼠B细胞、T细胞,人脐带血细胞到人外周血细胞重编程为iPSCs的研究进展,比较分析该技术的特点和可能存在的问题,并进行了前景展望。

## 1 iPSCs诱导方法

### 1.1 转录因子诱导

2006年, Takahashi等<sup>[1]</sup>通过筛选24个候选转录因子,最终确定最少4个转录因子*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*的组合即可将小鼠皮肤成纤维细胞重编程为iPSCs,为利用转录因子诱导iPSCs奠定了基础。Yu等<sup>[3]</sup>利用*Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog*和*Lin28*的转录因子组合也可以将人的成纤维细胞重编程为iPSCs,但目前最常用的还是*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4*组合。由于*c-Myc*具有致癌性, Nakagawa等<sup>[12]</sup>在上述转录因

收稿日期: 2011-03-14 接受日期: 2011-04-21

国家自然科学基金(No.30971599/C060503)、教育部新世纪优秀人才支持计划(No.NCET-06-0526)、浙江省科技计划项目(No.2008C23028)和浙江省新世纪151人才工程(No.06-2-008)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0571-88206646, E-mail: qfyan@zju.edu.cn

子中删除*c-Myc*, 提高了iPSCs诱导的安全性, 但同时降低了诱导效率。之后, 另有研究小组仅用*Oct3/4*、*Sox2*两个转录因子就成功诱导得到iPSCs<sup>[13]</sup>。Scholler等<sup>[14]</sup>甚至用单个*Oct3/4*就将神经干细胞诱导为iPSCs, 为科学家们最终实现不导入外源基因成功获得iPSCs的目标带来希望。

## 1.2 小分子化合物诱导

在体细胞重编程为iPSCs的过程中加入一些特定的小分子化合物, 可提高重编程效率, 降低对转录因子的依赖。AZA处理小鼠成纤维细胞, 导入*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*可将重编程效率提高4倍<sup>[15]</sup>。组蛋白去乙酰化转移酶抑制剂VPA处理成纤维母细胞后只需导入*Oct3/4*和*Sox2*就重编程成iPSCs, 并且可将其重编程效率提高到1%<sup>[16]</sup>。小分子化合物BIX和BayK可以替代外源*Sox2*的作用<sup>[17]</sup>。与之相似, 在只有*Oct3/4*和*Klf4*的情况下, 加入MEK通路的抑制剂PD0325901和GSK3的抑制剂CHIR99021培养, 可以将神经干细胞重编程为真正全能iPSCs<sup>[18]</sup>。Li等<sup>[19]</sup>利用*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*联合PD0325901和CHIR99021以及TGF- $\beta$ 抑制剂A-83-01成功重编程了人皮肤成纤维细胞。Esteban等<sup>[20]</sup>发现, 通过在培养过程中添加维生素C可使iPSCs诱导效率提高10倍。通过老鼠和人细胞实验发现, 培养时添加维生素C可促进多能性相关基因表达, 推动体细胞进入重编程状态。尽管目前还没有仅利用小分子化合物成功重编程成熟体细胞为iPSCs的报道, 但小鼠<sup>[21-22]</sup>和人<sup>[23-24]</sup>睾丸中的精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)不需要外源基因及其相关替代小分子的介入即可被诱导为多能干细胞。老化的表皮细胞通过热激活与EGF等因子处理可以被重编程为表皮干细胞<sup>[25]</sup>。Li等<sup>[26]</sup>通过*Oct4*联合小分子化合物VPA、反苯环丙胺、CHIR99021和616452可使小鼠成纤维细胞重编程为iPSCs, 并且*Oct4*只在诱导的前8天发挥作用, 不需要持续表达。该项研究还提出一种有效筛选小分子化合物的策略, 这为制备无遗传修饰的iPSCs提供了新思路。

## 2 血细胞重编程为iPSCs

从皮肤取样进行组织活检, 患者可能存在细菌感染的潜在风险。而且生物组织活检有可能会加重进行性骨化纤维发育不良症(FOP)等的恶化<sup>[27]</sup>。经过生物组织活检后至少需要一个月时间来增殖成

纤维细胞用于诱导iPSCs<sup>[2,28]</sup>, 这种较长时间的细胞增殖可能导致体细胞基因突变。另外, 供体皮肤成纤维细胞在日常UV照射下存在染色体畸变的可能。然而, 外周血采集方便、来源丰富、不需要额外的离体扩增, 可大大缩短iPSCs的诱导建成时间。与成纤维细胞和内皮细胞相比, 人外周血单个核细胞和CD34+细胞基因组启动子甲基化水平更接近ESCs/iPSCs<sup>[29]</sup>。Kim等<sup>[30]</sup>的研究指出, 小鼠血细胞重编程的iPSCs与成纤维细胞iPSCs相比具有更类似于ESCs的形态与功能。因此, 利用外周血细胞诱导iPSCs将可能成为更具优势的技术。

### 2.1 小鼠B细胞、T细胞重编程为iPSCs

外周血细胞的重编程工作最初开始于对小鼠的研究。Hanna等<sup>[30]</sup>在加入CCATT/增强子结合蛋白(C/EBPa)或抑制转录因子Pax5的情况下, 利用反转录病毒将*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*与*Klf4*转入成熟的小鼠B细胞, 将其重编程成为iPSCs。该小组利用B细胞分化阶段存在免疫球蛋白基因重排的特征<sup>[32]</sup>, 发现体外终末分化的B细胞也可以被重编程为多能状态。Hong等<sup>[33]</sup>在过表达*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*与*Klf4*的基础上抑制*p53*基因使小鼠终末分化的T细胞重编程成iPSCs。小鼠成熟的外周血淋巴细胞成功地重编程为iPSCs说明终末分化的体细胞也具有被诱导为iPSCs的潜力。

### 2.2 人脐带血细胞重编程为iPSCs

2009年, Loh等<sup>[34]</sup>用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员的CD34+血细胞成功诱导iPSCs。然而该方法只有在供体身体状况良好时才能皮下注射G-CSF, 而且耗时多、成本高、存在副作用, 无法推广到实际应用中。同年, Haase等<sup>[35]</sup>用慢病毒过表达*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*与*Klf4*将人脐带血细胞重编程为iPSCs。而Giorgetti等<sup>[36]</sup>仅用*Oct3/4*和*Sox2*就成功获得人脐带血来源的iPSCs。Ye等<sup>[37]</sup>重编程骨髓和脐带血CD34+细胞获得iPSCs。虽然脐带血细胞积累的基因突变较少, 是iPSCs的良好供体细胞, 但是其来源受限依旧是未能解决的最大问题, 诱导疾病特异性的iPSCs等工作也无法广泛开展。而且脐带血中含有大量的干细胞, 有研究指出从脐带血中分离内皮干细胞的效率是普通外周的10倍以上<sup>[38]</sup>, 诱导所获得的iPSCs可能并不是真正诱导自终末端分化的血细胞。所以, 科学家们最终将研究目标指向了来源更为充裕的外周血细胞。

### 2.3 人外周血细胞重编程为iPSCs

2010年, *Cell Stem Cell*同时报道了三个研究小组<sup>[9-11]</sup>重编程人外周血细胞获得iPSCs的工作, 外周血细胞重编程研究取得重大突破。表1详细比较了人外周血细胞与皮肤成纤维细胞在诱导iPSCs的建成时间、诱导效率、供体细胞数量、载体、转化病毒等方面的差异。

Loh等<sup>[9]</sup>采集350 mL外周血分离得到单个核细胞(PBMCs)和CD34+细胞(PBCD34+), 通过一种强力霉素诱导的慢病毒外源表达*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*四个转录因子获得iPSCs。这种重构的慢病毒只有在强力霉素的刺激下才能高度表达外源转录因子。不存在强力霉素时, 外源转录因子沉默有助于iPSCs后期分化。重编程PBCD34+获得iPSCs的效率为0.002%, 而PBMC iPSCs诱导效率仅为0.0008%~0.001%。

Starek等<sup>[10]</sup>使用强力霉素诱导的慢病毒具有多顺反子表达框携带*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*感染

30 mL外周血, iPSCs诱导的效率仅为0.001%。除此之外, Staerk等<sup>[10]</sup>和Loh等<sup>[9]</sup>的研究还发现外周血中除了成熟的T细胞能被诱导为iPSCs外, 一些非淋巴细胞也具有同样的特性, 但是并未获得诱导自B细胞的iPSCs, 究其原因可能是B细胞的体外生长还需要其他小分子如IL-4/CD40配体、C/EBPa等的存在。Staerk等还指出在含有IL-7的平板中血细胞重编程的效率比含有G-CSF、GM-CSF、IL-3、IL-6等其他细胞因子的高, 这为外周血供体细胞的培养提供一定的借鉴意义。

Seki等<sup>[11]</sup>用一种温度敏感突变的仙台病毒感染1 mL外周血, 得到的iPSCs全部诱导自T细胞, 诱导效率高达0.1%。这种高效率的iPSCs诱导技术有可能要归功于仙台病毒高效地感染T细胞并表达所携带的外源转录因子<sup>[27]</sup>, 并且仙台病毒基因不会整合到供体细胞的基因组中, 减少了基因插入突变的危险。此外, Chou等<sup>[29]</sup>使用无基因整合型的方法利用

表1 人外周血细胞与皮肤成纤维细胞诱导iPSCs的方法比较

Table 1 Comparison between the methods of deriving iPSCs from human peripheral blood cells and fibroblasts

项目 Items	人外周血细胞 Human peripheral blood cells			人成纤维细胞 Human fibroblasts		
Research groups	Staerk <i>et al</i> <sup>[10]</sup>	Loh <i>et al</i> <sup>[9]</sup>	Seki <i>et al</i> <sup>[11]</sup>	Takahashi <i>et al</i> <sup>[2]</sup>	Yu <i>et al</i> <sup>[3]</sup>	Park <i>et al</i> <sup>[28]</sup>
iPSCs induction time	25~40 days	21~35 days	25 days	After six and four passages, induced for 30 days	IMR90 cells were induced 20 days	4 weeks after culture, induced for 21~30 days
iPSCs induction efficiency	0.001%	PBMC iPSCs 0.0008%~0.001% PB34 iPSCs 0.002%	0.1%	0.02%	0.022%	0.005%~0.05%
The number of donor cells	30 mL blood PBMCs 3~5×10 <sup>5</sup>	350 mL blood PBMCs 1×10 <sup>5-6</sup> CD34+ cells 1×10 <sup>5-6</sup>	1 mL blood T cells 5×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>5</sup> cells	2-3×10 <sup>5</sup> cells	1×10 <sup>5</sup> cells
Feeder cells	Mitomycin-treated MEF	MEFs	Mitomycin C-inactivated SNL; iMEFs	Mitomycin-treated SNL	iMEFs	iMEFs
Vectors	pHAGE2-tetO miniCMV-hS TEMCCA	FU-TET-O-h <i>OCT3/4</i> , FU-TET-O-h <i>SOX2</i> , FU-TET-O-h <i>KLF4</i> , FU-TET-O-h <i>C-MYC</i>	pSeV18 <sup>+</sup> b+/ΔF- <i>hOCT3/4</i> -GPF, pSeV18 <sup>+</sup> b+/ΔF- <i>hSOX2</i> -GPF, pSeV18 <sup>+</sup> b+/ΔF- <i>hKLF4</i> -GPF, pSeV18 <sup>+</sup> b+/P <sup>SL</sup> ΔF- <i>hC-MYC</i> -GFP	pCR2.1- <i>hOCT3/4</i> , pENTR-D- <i>hSOX2</i> , pENTR-D- <i>hKLF4</i> , pENTR-D- <i>hC-MYC</i>	pSin-EF2- <i>hOCT3/4</i> -Pur, pSin-EF2- <i>hSOX2</i> -Pur, pSin-EF2- <i>hNANOG</i> -Pur, pSin-EF2- <i>hLIN28</i> -Pur	pMIG- <i>hOCT3/4</i> , pMIG- <i>hSOX2</i> , pMIG- <i>hKLF4</i> , pMIG- <i>hC-MYC</i>
Viruses	Doxycycline-inducible lentiviruses	Doxycycline-inducible lentiviruses	Temperature-sensitive Sendai viruses	Retroviruses	Lentiviruses	Retroviruses
Packaging cells	293T cells	293T cells	293T cells	PLAT-E packaging cells	293FT cells	293T cells



一种附加型的载体EBNA1/OriP将人脐带血细胞和外周血细胞重编程为iPSCs, 不仅避免了基因整合的危险, 而且将诱导的时间缩短为14天。

Staerk等<sup>[10]</sup>得出T细胞的诱导效率比骨髓细胞高, 而且T细胞在体外具有高增殖率和长期增殖的潜能。T细胞发育过程中存在TCR基因的重排, 可以鉴定iPSCs的供体来源, 追踪T细胞发育过程, 有助于iPSCs后期分化的研究。Seki等<sup>[11]</sup>从外周血单个核细胞中筛选T细胞用于重编程, 也可能是其高重编程效率的原因之一。可以说T细胞是外周血细胞中用于诱导iPSCs的合适供体细胞。上述外周血诱导iPSCs技术将为后人的研究提供坚实的基础。储存在血库的外周血(包括来自死亡的供体)可以用于建人iPSCs细胞库。建立组织相容性iPSCs细胞系为个体提供细胞治疗资源, 这是其他类型细胞不能实现的。重编程病人的外周血细胞或冻存的血液样本诱导疾病特异性的iPSCs可以用于骨髓和血液疾病分子机理的研究, 且不会受到供体细胞数量的限制, 可以更广泛地应用于再生医学研究。Kunisato等<sup>[40]</sup>从500  $\mu$ L外周血中诱导出iPSCs, 在诱导iPSCs的过程中相继加入ST3FPFLGM和ST3FP6两种细胞因子可将诱导效率提高20~30倍。可以说, 用人外周血细胞诱导iPSCs的成功将会给iPSCs研究领域带来一次新的飞跃。

### 3 存在的问题

目前, 外周血诱导iPSCs仍存在一些技术难题。第一, 对诱导获得的iPSCs分化能力必须进行科学地评估和研究。从外周血中诱导的iPSCs可能会保留原始供体血细胞的表现记忆, 因此会更倾向于分化成血液细胞。Loh等<sup>[9]</sup>的研究中所获得的iPSCs更倾向于分化成巨噬细胞、粒细胞等, 这将不利于iPSCs诱导分化成其他组织器官用于再生医学研究。第二, T细胞所特有的TCR基因重排是否会影响iPSCs的分化性质仍然是一个疑问, 用于临床治疗的iPSCs应该排除这些不确定因素。第三, 安全问题也是必须亟待解决的。使用病毒诱导仍然存在安全隐患, 用于重编程的*c-Myc*基因具有致癌的危险, 能否用小分子化合物来替代外源转录因子用于重编程外周血细胞并且消除病毒的危险还有待于进一步研究。第四, 重编程诱导的效率还有待提高。第五, 离体培养的外周血淋巴细胞处于悬浮状态, 不能贴壁生长, 诱导操作相对困难。只有解决了上述困难, 重编程人外周血细

胞获得iPSCs的技术才能真正应用到临床医学中。

### 4 前景展望

诱导自人体细胞的iPSCs可以诱导分化成所需的细胞类型用于临床治疗、体外重建某些疾病模型、为新药开发提供理想的实验材料。人iPSCs诱导分化成自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)可以用于HIV/AIDS<sup>[41]</sup>和肿瘤<sup>[42]</sup>的治疗。Takahashi等<sup>[2]</sup>成功将皮肤成纤维细胞来源的iPSCs诱导分化为心肌细胞和神经细胞。Hanna等<sup>[43]</sup>将来自皮肤成纤维细胞的iPSCs分化为造血祖细胞后用于治疗镰刀状细胞贫血病。Raya等<sup>[44]</sup>和Tulpule等<sup>[45]</sup>用不同的方法将先天性骨髓发育不全病人的皮肤成纤维细胞诱导成iPSCs, 建立先天性骨髓发育不全疾病模型。Raya等<sup>[44]</sup>进一步将疾病特异性的iPSCs诱导分化成血液祖细胞用于该病的治疗。然而目前关于外周血iPSCs定向分化研究的报道尚少。因此, 如何实现外周血iPSCs在体外定向分化成具备功能的细胞组织将成为今后研究的重点。再者, 制备无遗传修饰的外周血iPSCs仍将是科学家们努力的方向, 能否用小分子化合物完全替代外源转录因子或直接导入转录因子的蛋白来重编程外周血细胞获得更安全的iPSCs有待探索。另一方面应着重于iPSCs真正多能性的获得, 两方面的结合才会使外周血iPSCs在向应用的转化过程中实现较大的发展。

近来, 有研究直接将人皮肤成纤维细胞转分化成血液祖细胞<sup>[46]</sup>、心肌细胞<sup>[47]</sup>, 省略了诱导iPSCs这一步, 体外操作时间更短、更安全, 比利用人类胚胎干细胞或者iPSCs制造血液细胞的方法更具优势。然而, 能否直接将人外周血细胞转分化为我们所需的细胞类型还没有研究证实, 体细胞间的转分化将有可能成为一个新的发展趋势。

综上所述, 人外周血细胞诱导iPSCs新技术的出现为iPSCs研究开辟了一个新的领域, 为再生医学、药物开发等研究提供了坚实的基础, 将更好地用于造福人类健康。

### 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): 663-76.
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fi-

- broblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
  - 4 Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, *et al.* Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; 3(2): 132-5.
  - 5 Woltjen K, Michae IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Härmäläinen R, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
  - 6 Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-5.
  - 7 Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461(7260): 86-90.
  - 8 Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009; 5(2): 135-8.
  - 9 Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, *et al.* Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 15-9.
  - 10 Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, *et al.* Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 20-4.
  - 11 Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 11-4.
  - 12 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotech* 2008; 26(1): 101-6.
  - 13 Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, *et al.* Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2): 197-203.
  - 14 Kim JB, Sebastiano V, Wu GM, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, *et al.* *Oct4*-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; 136(3): 411-9.
  - 15 Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; 454(7200): 49-55.
  - 16 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nature Biotechnol* 2008; 26(11): 1269-75.
  - 17 Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by *Oct4* and *Klf4* with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 568-74.
  - 18 Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008; 6(10): 2237-47.
  - 19 Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 16-9.
  - 20 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-9.
  - 21 Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
  - 22 Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciani I, Kim J, Chavala S, *et al.* Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 2007; 449(7160): 346-50.
  - 23 Kossack N, Meneses J, Shei S, Nguyen HN, Chavez S, Nicholas C, *et al.* Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 2009; 27(1): 138-49.
  - 24 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-9.
  - 25 Sa C, Xiaobing F, Zhiyong S. Dedifferentiation of human epidermal cells induced without external gene intervention. *Bio Science* 2007; 57(8): 655-62.
  - 26 Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, *et al.* Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, *Oct4*, and small molecules. *Cell Res* 2011; 21(1): 196-204.
  - 27 Yamanaka S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 1-2.
  - 28 Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protocols* 2008; 3(7): 1180-6.
  - 29 Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 2011; 21(3): 518-29.
  - 30 Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467(7313): 285-90.
  - 31 Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; 133(2): 250-64.
  - 32 Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 541-70.
  - 33 Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009; 460(7259): 1132-5.
  - 34 Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009; 113(22): 5476-9.
  - 35 Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009; 5(4): 434-41.
  - 36 Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using *OCT4* and *SOX2*. *Cell Stem Cell* 2009;

- 5(4): 353-7.
- 37 Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowe S, Williams DM, Jang YY, *et al.* Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 2009; 114(27): 5473-80.
- 38 Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, *et al.* Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105(11): 1527-36.
- 39 von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, Butler MO, *et al.* Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: Potential for clinical application. *Blood* 2002; 99(9): 3319-25.
- 40 Kunisato A, Wakatsuki M, Shinba H, Ota T, Ishida I, Nagao K, *et al.* Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood. *Stem Cells Dev* 2011; 20(1): 159-68.
- 41 Ni Z, Knorr DA, Clouser CL, Hexum MK, Southern P, Mansky LM, *et al.* Human pluripotent stem cells produce natural killer cells that mediate anti-HIV-1 activity by utilizing diverse cellular mechanisms. *J Virol*. 2011; 85(1): 43-50.
- 42 Knorr DA, Kaufman DS. Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy. *Transl Res*. 2010; 156(3): 147-54.
- 43 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 44 Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from *Fanconi anaemia* induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460(7251): 53-9.
- 45 Tulpule A, Lensch MW, Miller JD, Austin K, D'Andrea A, Schlaeger TM, *et al.* Knockdown of *Fanconi anemia* genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood* 2010; 115(17): 3453-62.
- 46 Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnercher A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468(7323): 521-6.
- 47 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.

## Advances in Reprogramming of Peripheral Blood Cells to Induced Pluripotent Stem Cells

Li Shishi<sup>1,2</sup>, Liu Zhong<sup>3</sup>, Yan Qingfeng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>2</sup>Institute of Genetics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>3</sup>The First Affiliated Hospital of College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**Abstract** Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a type of embryonic stem cell-like cells which derived from adult cells by ectopic expression of a few defined transcription factors. The establishment of patient-specific iPSCs is very important for regenerative medicine and pathological mechanism study. Until now, the most common donor cells of human iPSCs has been from skin fibroblasts, which requires an invasive skin biopsy and a prolonged period of expansion in cell culture prior to use. These limitations prevent iPSCs technology broadly applicable. While the generation of human iPSCs from peripheral blood cells, which represents a fast, safe and efficient way of reprogramming will accelerate the development of iPSCs research. In this review, based on introducing different reprogramming methods, we focused on recent advances in iPSCs derived from mouse B cells, T cells to human cord blood cells and peripheral blood cells, and analyzed features and limits of this new iPSCs technology. The prospects of iPSCs research are also discussed.

**Key words** induced pluripotent stem cells (iPSCs); peripheral blood cells; fibroblasts; reprogramming; transcription factors

Received: March 14, 2011 Accepted: April 21, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971599/C060503), the Program for New Century Excellent Talents in University (No.NCET-06-0526), the Program of Science and Technology in Zhejiang Province (No.2008C23028) and the Program for New Century 151 Talents in Zhejiang Province (No.06-2-008)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88206646, E-mail: qfyan@zju.edu.cn