

载体介导无遗传物质整合的诱导性 多能干细胞的生成

栗楠[#] 郭红梅[#] 王明玉 令文慧 邱小燕 李跃民 刘旭蕾 邓雅楠 肖雄^{*}

(西南大学动物科技学院, 重庆 400715)

摘要 诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)因其具有类似胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的“自我更新”和分化潜能而成为生物学和医学等领域的研究热点之一。但是, 目前iPSCs的生成主要以逆转录病毒或慢病毒为载体, 而病毒载体和外源性重编程因子在受体细胞基因组中的整合, 使得iPSCs存在致癌性的安全隐患。同时, 采用无载体介导的方法如重组蛋白、小分子物质的重编程效率较低。为此, 目前已成功开发一些载体和方法可以介导无外源性遗传物质整合的iPSCs的生成。该文就整合后可删除的基因表达载体(Cre/loxP重组系统、piggyBac转座子/转座酶系统)和非整合基因表达载体(oriP/EBNA1附加型载体、微环DNA载体)在iPSCs生成上的应用研究作一综述, 以期对iPSCs的临床安全应用提供理论和技术参考。

关键词 诱导性多能干细胞(iPSCs); Cre/loxP重组系统; piggyBac转座系统; oriP/EBNA1附加型载体; 微环DNA载体

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells without Integration of Genetic Materials Mediated with Vector

Li Nan[#], Guo Hongmei[#], Wang Mingyu, Ling Wenhui, Qiu Xiaoyan, Li Yuemin,
Liu Xulei, Deng Yanan, Xiao Xiong^{*}

(College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have become one of the research focuses in medicine, biology, and so on, because they have the characteristics of “self-renewal” and differentiation which are similar to embryonic stem cells (ESCs). But the generation of iPSCs mainly depended on the expression of transcription factors mediated with retrovirus or lentivirus-based vector, these iPSCs bear certain risks, such as tumorigenicity, which resulted from the integration of exogenous genetic materials and viral vector into genome of recipient cells. At the same time, lower efficiency of reprogramming mediated with substance, such as recombinant proteins or small molecules was observed. Therefore, some vectors and methods were successfully developed to generate iPSCs without insertional transgene expression. This paper reviewed the researches about the applications of gene

收稿日期: 2017-04-06 接受日期: 2017-08-02

国家自然科学基金(批准号: 31572488)、重庆市基础科学与前沿技术研究项目(批准号: cstc2017jcyjAX0477)、国家级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 201510635015)、中央高校基本科研业务费项目(批准号: XDJK2014C022)和西南大学博士基金(批准号: SWU113002)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 023-68251196, E-mail: y1982@swu.edu.cn

Received: April 6, 2017 Accepted: August 2, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31572488), the Basic and Advanced Research Projects of Chongqing (Grant No.cstc2017jcyjAX0477), the National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Programs (Grant No.201510635015), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.XDJK2014C022) and the PhD. Programs Foundation of Southwest University (Grant No.SWU113002)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-23-68251196, E-mail: y1982@swu.edu.cn

网络出版时间: 2017-10-25 17:24:06 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1724.008.html>

expression vector systems including Cre/loxP recombination system, piggyBac transposition system, oriP/EBNA1 episomal vector system and minicircle DNA vector system on the generation of iPSCs to provide a theoretical and technological reference for safely clinical applications of iPSCs.

Keywords induced pluripotent stem cells (iPSCs); Cre/loxP recombination system; piggyBac transposition system; oriP/EBNA1 episomal vector; minicircle DNA vector

2006年, Takahashi和Yamanaka^[1]利用逆转录病毒将四种转录因子OSKM即八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)、性别决定区Y框蛋白2(sex determining region Y box protein 2, Sox2)、Kruppel样因子4(kruppel-like factor 4, Klf4)和C-髓细胞组织增生原癌基因(cellular myelocytomatosis oncogene, c-Myc)转入小鼠成纤维细胞, 获得了诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。鉴于iPSCs在生物学特性上与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)极其相似, 而且有效避免了伦理限制和取材困难等问题, 在疾病模型、药物筛选、发育生物学研究和细胞治疗等方面具有广阔的应用前景。Yamanaka也因这一开创性的成果而获得了2012年诺贝尔生理学或医学奖。目前, iPSCs的生成大多依赖于使用逆转录病毒或慢病毒载体, 这些载体在完全重编程的iPSCs中可以发生转录沉默。但是, 部分重编程的iPSCs则无法沉默外源性病毒转基因的表达, 从而增加了致癌性的安全隐患, 极大地限制了其在临床上的应用。此外, 外源基因删除的人iPSCs与ESCs的相似性高于转基因未删除的人iPSCs, 残余转基因的表达将影响iPSCs的分子特征^[2]。因此, 涌现出了一些新型的重编程方法, 通过使用整合后可删除的基因表达载体, 或者是非整合基因表达载体, 生成无外源性遗传物质整合的iPSCs, 以提高其临床应用的安全性。

1 整合后可删除的基因表达载体

1.1 Cre/loxP重组系统

Cre/loxP重组系统源自P1噬菌体, 包含loxP位点(一段长34 bp的DNA序列)和Cre重组酶(由343个氨基酸组成的单体蛋白)。Cre重组酶能够介导两个loxP位点之间的特异性重组, 使loxP位点间的基因序列被删除、插入、反向或交换。由于采用最初的野生型loxP并不总是有利于整合反应, 且其一个反向重复序列或者间隔区发生改变时仍能被Cre重组酶所识别并发生重组, 因此, 现已成功开发不

同的突变型loxPs来改变其重组特征, 包括反应动力学和特异性, 以扩大该体系的应用范围。例如, Kameyama等^[3]采用Cre重组酶和突变型loxPs开发出了一个累积位点特异性基因整合系统(accumulative site-specific gene integration system, AGIS), 该系统能够重复整合多个转基因进入细胞基因组中的预定位点; Inao等^[4]通过采用突变型loxP配对a8/b8和a12/b12提高了该AGIS的整合效率。

针对病毒载体介导的体细胞重编程, 为避免外源转录因子基因在iPSCs中的永久存在, 降低插入性突变和致癌性的潜在危险, 可采用Cre/loxP重组系统。该系统通过引入Cre重组酶以删除loxP间的转基因盒, 其方法包括转染编码Cre重组酶的质粒、使用腺病毒-Cre重组酶结构、传递Cre mRNA和利用Cre重组蛋白等。利用Cre/loxP重组系统生成的iPSCs具有普遍认为的临床级状态, 而且, 转基因去除后能够提高iPSCs的质量和分化潜能^[2,5]。因此, 删除iPSCs中整合的外源性遗传物质是其用于疾病建模和再生治疗等的一个关键步骤。

1.1.1 Cre重组酶质粒 通过构建质粒在iPSCs中表达Cre重组酶, 有望删除loxP间的转基因盒。Soldner等^[2]采用表达Cre重组酶和嘌呤霉素抗性蛋白或增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的质粒转染人iPSCs, 分别通过嘌呤霉素处理或流式细胞术筛选Cre重组酶阳性细胞。Southern blot的结果表明, 180个转染iPSCs克隆中仅有16个发生了重编程因子基因的删除, 这也许与质粒的短暂转染限制了细胞内Cre重组酶的活性有关。Somers等^[5]通过慢病毒载体hSTEMCCA-loxP介导OSKM的表达, 生成肺特异性疾病患者细胞来源的人iPSCs。采用Hela Monster试剂将pHAGE2-Cre-IRES-PuroR质粒DNA短暂转染进入iPSCs克隆中, PCR和Southern blot证实, 50个亚克隆100%实现了hSTEMCCA载体的删除。但是, 在hSTEMCCA删除后仍然有约200 bp的未活化病毒长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)留在宿主的基因组中, 理

论上仍存在插入性突变的危险。Karow等^[6]针对小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEFs)或脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ASCs)来源的iPSCs, 脂质体转染表达Cre重组酶的质粒, 结果显示, 超过50%的细胞克隆表现出重编程质粒的删除。因此, 通过转染Cre重组酶质粒删除外源性转基因的效率和彻底性有待进一步提高。

1.1.2 腺病毒-Cre结构 腺病毒载体因其转基因效率高、可转染细胞类型广、细胞培养物中重组病毒滴度高、进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组、仅瞬间表达和安全性高等特点, 而成为继逆转录病毒载体之后广泛应用的病毒载体。借助该载体在细胞内表达Cre重组酶, 可以实现loxP间外源性转基因的删除。Sommer等^[7]采用表达Cre重组酶的缺陷型腺病毒(Adeno-Cre)感染iPSCs, 结果表明, 没有Adeno-Cre载体基因整合进入iPSCs的基因组, Cre重组酶表达后, 重编程转录因子基因的删除效率接近100%, 且这些iPSCs分化成为中胚层细胞或神经外胚层细胞的能力显著增强, 表明外源性遗传物质的去除能够显著改善iPSCs的发育和分化能力。但是, Awe等^[8]采用Cre重组酶-嘌呤霉素的缺陷型腺病毒载体(Adeno-Cre puroR)介导iPSCs多顺反子“干细胞盒”(STEMCCA)的删除, 结果表明, 在6个iPSCs克隆中仅有1个iPSCs克隆实现了外源性重编程因子结构的删除。因此, Adeno-Cre结构删除外源性基因的效率存在不稳定性, 有待进一步优化。腺病毒载体感染iPSCs和后续阳性iPSCs(外源性基因删除)的筛选均涉及相对复杂的步骤, 重编程细胞也许会对这些操作程序产生应激反应, 从而降低目标iPSCs的质量和生成效率。此外, 还存在编码Cre重组酶的病毒结构整合进入iPSCs基因组的可能性, 增加iPSCs临床应用的安全隐患。

1.1.3 Cre mRNA Loh等^[9]采用Cre mRNA转染iPSCs, 生成的Cre重组酶能够作用于多顺反子重编程因子盒旁边的loxP位点, 删除重编程因子盒, 从而获得更类似于人ESC的无外源性转基因的iPSCs。但是, 在iPSCs的转基因删除过程中, 需要每天转染Cre mRNA 4 h, 持续进行7 d, 同时, 还需要额外1~2个月进行无转基因iPSCs的筛选、扩增、特征研究和冷冻保存。因此, 该方案的整体效率相对低下, 转染和筛选程序繁杂, 从而限制了利用Cre mRNA生成

无转基因iPSCs方法的推广应用。

1.1.4 Cre重组蛋白 Nolden等^[10]采用转录激活蛋白(transcriptional activator protein, TAT)-Cre蛋白(融合了Cre蛋白、协助穿膜的TAT肽和核定位序列)介导人ESC中染色体整合loxP-修饰等位基因的重组, 获得了几乎100%的重组效率。因此, TAT-Cre重组蛋白提供了一种稳健的用于iPSCs中外源基因删除的方法。Kadari等^[11]通过转染hSTEMCCA-Cre-可删除组成型多顺反子(OKSM)慢病毒载体重编程人成纤维细胞, 并利用TAT-Cre蛋白介导转基因的删除, 生成了无外源性转基因的iPSCs。由于TAT-Cre重组蛋白的高重组效率, 仅需作用5 h即可删除转基因, 加速了获得无转基因iPSCs的进程。微阵列分析表明, 无转基因iPSCs的基因表达谱更类似于人的ESC。经Cre重组蛋白处理所得iPSCs表现出分化潜能的改善, 其心肌细胞系的分化能力优于Cre转导前的iPSCs。因此, 利用Cre重组蛋白有望形成一种简单、快速和稳健的方案用于临床级iPSCs的生成, 所得无外源性遗传物质整合的iPSCs更适合用于疾病模型构建、药物和毒性筛选、组织工程和细胞替代治疗等。

因此, Cre重组酶删除系统的主要应用障碍包括外源性转基因删除的高效性、彻底性和可靠性以及后续无转基因克隆的筛选等。虽然, Cre重组酶介导的载体删除可以去除所有携带的转基因, 但是, 单个loxP仍然残留在每个整合位点, 这存在重新开启的可能性, 邻近的基因也可能受到干扰, 通过整合位点两边的序列和特征分析能够降低这一安全隐患发生的概率。

1.2 piggyBac(PB)转座子/转座酶系统

PB转座子是一种源自飞蛾的DNA转座子, 为可移动的DNA元件, 具有物种特异性小、转基因载荷能力大、便于传递2A肽连接的多种基因至靶细胞以及细胞转染方法简单等优点, 而成为一种病毒载体无法比拟的、简单安全的基因传递和诱变载体。在体细胞重编程期间PB转座子能够稳定整合进入基因组, iPSCs生成后, 借助转基因两侧的末端反向重复序列, 通过转座酶的重新表达能够将宿主基因组中整合的转座子结构(包括重编程因子)删除。与大多数其他的DNA转座子不同, PB转座子在删除后不会留下“印记”突变。例如, *Sleeping Beauty*转座子使用TA二核苷酸作为整合位点, 在删除后被

改变成为TAG(T/A)CTA。然而, PB转座子使用的是TTAA整合位点, 在删除后被修复成为原始序列。因此, PB转座子/转座酶系统可以从宿主基因组中去除转座子而不改变基因组的任何核苷酸序列。PB转座子与*Sleeping Beauty*转座子、逆转录病毒之间的异同点见表1^[12]。借助PB转座子/转座酶系统, Yusa等^[13]生成了源自MEFs的无转基因iPSCs; Ye等^[14]重编程大鼠胚胎成纤维细胞(rat embryonic fibroblasts, REFs)成为iPSCs, 并成功去除了转座子携带基因。

1.2.1 PB载体的初始(1°)重编程系统 PB载体初始(1°)重编程系统是利用Tet调控PB载体介导重编程因子表达逆转化体细胞成为1°piggyBac-iPSCs(PB-iPSCs)的系统。因此, 在质粒转染后, 通过添加强力霉素(doxycycline, Dox)即可启动重编程因子的表达, 实现体细胞的逆转化生成1°PB-iPSCs。1°PB-iPSCs能够从Dox调节中退出, 并通过体内、体外分化或制备嵌合体而生成用于二次(2°)重编程的体细胞, 这些细胞具有转座子的“Primed”态, Dox的诱导能将其重编程成为2°PB-iPSCs, 无需重新进行PB载体的转染。利用PB体系无缝删除的特性, 通过转座酶的短暂表达, 可将由2A序列连接的重编程因子从iPSCs

系中无痕去除。Woltjen等^[15]详细描述了1°PB-iPSCs分离、因子沉默和多能性报告基因活化、PB拷贝数和位置图谱、iPSCs嵌合体的制备、2°MEFs的分离以及通过简单添加Dox诱导2°MEFs重编程成为iPSCs的过程。

Woltjen等^[16]采用携带OSKM、tetO₂四环素/Dox诱导启动子、报告基因βgeo和内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)序列的环状PB-TET-mF_x质粒DNA混合物结合PB转座酶表达质粒转染rtTA-MEFs, 经Dox诱导重编程成为iPSCs。为获得便于连续追踪的Dox-响应细胞, Kim等^[17]生成了PB-TAC转座子, 能够以Dox诱导的方式表达连接有mCherry的Yamanaka因子。对于重编程的Dox诱导调节, 靶细胞必需具有外源性rtTA反式激活因子基因。为了克服这种特异性转基因背景的需要, 研究人员现已开发出了包含完整Dox诱导系统的一体化PB转座子载体。Woltjen等^[15]利用携带OSKM和OK⁺MS盒的PB-TAC重编程载体逆转化MEFs成为1°PB-iPSCs。与2°重编程系统相比, 利用1°重编程系统生成iPSCs的方案可以更为灵活地选择所需遗传背景的体细胞, 更为灵活地调整重编程因子的组合

Table 1 Comparison of the characteristics among PB transposon, <i>Sleeping Beauty</i> transposon and retrovirus			
指标 Criteria	PB转座子 PB transposon	<i>Sleeping Beauty</i> 转座子 <i>Sleeping Beauty</i> transposon	逆转录病毒 Retrovirus
Vector/nucleic acids	Nonviral/dsDNA	Nonviral/dsDNA	Viral/RNA
Cargo size	Less cargo size limitation compared with <i>Sleeping Beauty</i> transposon; has integrated 100 Kb and a bacterial artificial chromosome (BAC)	Increased cargo size decreases efficiency; has integrated a BAC	<8 Kb
Maintenance	Integration	Integration	Integration
Integration mechanism	Cut-and-paste	Cut-and-paste	Reverse transcriptase and integrase dependent (copy-and-paste)
Target site	TTAA	TA	
Overproduction inhibition	Rarely reported	Consistently reported	
Notable mutated variants	HyPBase; Exc ⁻ /Int ⁻	SB100X	
Integration profile	Bias towards transcription units	Random	Bias towards transcription units
Genotoxicity	Insertional mutagenesis possible	Insertional mutagenesis possible, although more random integration pattern	Insertional mutagenesis possible
Enhancer and/or promoter activity	Minimal	Minimal	Strong
Immune response	+/-	+/-	+

和浓度, 无需冗长的克隆特征鉴定以及动物育种等。

1.2.2 源自1°PB-iPSCs克隆的2°重编程系统 Tsukiyama等^[18]通过一次转染编码Tet-诱导多顺反子重编程因子、早期转座子启动子及Oct3/4和Sox2增强子(early transposon promoter and Oct3/4 and Sox2 enhancers, EOS)-EGFP报告基因、组成性激活型巨细胞病毒早期增强子和鸡 β 肌动蛋白启动子(cytomegalovirus early enhancer/chicken β -actin promoter, CAG)-TagRFP报告基因和精子顶体酶(acrosin, Acr)报告基因的多种PB质粒载体, 重编程129和非肥胖糖尿病品系(non-obese diabetic, NOD)小鼠来源MEFs成为iPSCs。制备的嵌合体中广泛存在1°PB-iPSCs来源细胞, Acr-EGFP报告基因显示, 可以分化成为精子, 从而建立了MEFs的2°重编程体系。通过Dox诱导可以有效生成2°-iPSCs, 并研究了大鼠iPSCs和小鼠-大鼠种间嵌合体中大鼠精子的生成, 借助胞质内单精子显微注射成功获得了存活的后代。因此, 采用1°PB-iPSCs制备嵌合体动物, 可以建立一个独特的平台用于研究体内不同类型细胞的重编程, 与依赖于常用转基因整合位点[例如I型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen type I alpha 1, Col1A1)或位于小鼠基因组第6号染色体上的ROSA26]的推断性基因打靶系统不同, 通过随机整合PB载体的1°体细胞的重编程充当了一个位点表型驱动选择性筛选, 具备更高的精度和质量^[16]。此外, 研究人员利用2°PB重编程系统还揭示了骨形态发生蛋白信号在间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)中的关键作用, 确定了重编程的起始、成熟和稳定阶段, 发现了ESCs和分化细胞中选择性的剪接模式, 获得了重编程时相变化的数据, 检测了中间细胞和完全重编程细胞的转录组、蛋白质组、表观基因组和甲基化谱等。此外, 来源于不同组织的2°体细胞有望进行原位重编程(*in situ* reprogramming), 为再生医学开创新思路。

1.2.3 利用PB转座子改变iPSCs的特性 (1)纠正iPSCs中引发疾病的突变。从遗传学角度推测, 采用自体iPSCs治疗遗传病时, 需要先纠正引起疾病的突变。当前所采用的技术(例如同源重组)因效率低以及在靶基因组中留下残余序列等问题而受到限制。利用PB转座子系统有望达到这一目的。Yusa等^[19]结合锌指核酸酶和PB转座技术应用于人iPSCs, 获得了 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -antitrypsin, *AIAT*)基因中点突

变(Glu342Lys)的双等位基因的纠正, 其基因打靶效率显著升高, 恢复了A1AT的结构和功能, 而且PB转座子能被切除, 防止了残留非人类序列在宿主基因组中的污染。Xie等^[20]采用CRISPR/Cas9基因编辑技术结合PB转座子, 有效、无缝地纠正了 β -地中海贫血患者来源iPSCs中人血红蛋白 β (human hemoglobin beta, *HBB*)的突变, 而且未留下任何外源性遗传“印记”。经单层培养分化所得的有核红细胞中, *HBB*基因的转录水平比亲代iPSCs来源红细胞增加了16倍, 突变纠正的iPSCs恢复了HBB的表达。该方法还规避了病毒载体引入相关插入性突变的可能性, 有效避免对异体移植的免疫排斥问题, 为干细胞基因治疗单基因遗传病的临床应用奠定了基础。

(2)改变iPSCs的多能性状态。不同于小鼠iPSCs所处的“Naïve”态, 大多数家畜iPSCs被认为是处于“Primed”态, 其生成嵌合体后代的能力非常小。Kawaguchi等^[21]借助PB载体, 通过Dox控制OSKM的表达获得了iPSCs, 培养在添加有敲除血清替代物(knockout™ serum replacement, KSR)、成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和牛白血病抑制因子(bovine leukemia inhibitory factor, bLIF)的培养液中的牛iPSCs呈扁平状, 类似于人iPSCs, 呈“Primed”态。培养在KSR、bLIF、丝裂原活化蛋白激酶激酶/细胞外信号调节激酶(mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinases, MEK/ERK)抑制剂、糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)抑制剂和腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)激活剂中的牛iPSCs具有致密的形态, 类似于小鼠iPSCs, 呈“Naïve”态。通过改变培养条件, 这两种类型的牛iPSCs之间能够轻易地转换, 具有“Naïve”态的牛iPSCs可用于嵌合体的形成。此外, 无外源性遗传物质整合iPSCs的特征是否等同于ESCs仍然存在疑问。Salewski等^[22]通过比较PB转座子介导生成iPSCs来源神经干细胞(neural stem cells, NSCs)与ESCs来源NSCs的特点, 发现前者的多能性和非外胚层细胞系基因的表达水平显著升高, 表明ESCs和iPSCs在获得限定性NSCs命运的能力上具有本质的区别。通过Delta样配体4诱导Notch信号通路, 可以缩小这一差别, 改善NSCs的形成和质量, 增加它们的临床相关性和转化潜力。

因此, PB转座子/转座酶系统的独特优势包括

有效的基因组整合、无限制的载荷能力、稳健的基因表达和无缝外源基因删除等,体现了其在干细胞技术应用上的重要性。但是, PB载体系统仍面临一些问题。例如,有报道称,当采用PB载体系统进行人胚肾293细胞(human embryonic kidney-293 cells, HEK-293细胞)的基因修饰时,有相对较高比例的质粒骨架DNA发生整合^[23]。这种外源性遗传物质在宿主细胞基因组中的残留存在安全隐患,利用标记物[例如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)]的表达识别已经发生质粒骨架DNA整合的细胞,经流式细胞术分选清除这类细胞,有望消除其潜在的安全隐患。此外, PB载体系统的高度特异性和选择性有待进一步证明,其介导重编程因子表达的效率有待进一步提高^[12]。

2 非整合基因表达载体

2.1 oriP/EBNA1附加型载体

相对于长期的异源基因表达,基于BK病毒、牛乳头瘤病毒-1、猿猴病毒40(simian virus 40, SV40)或Epstein-Barr病毒(Epstein-Barr virus, EBV)成分和支架/基质附着区(scaffold/matrix attachment region, S/MAR)元件而建立的附加型载体是外源基因短暂转染和表达的良好选择。其中,基于EBV成分的oriP/EBNA1附加型载体已被广泛用于iPSCs的生成,该附加体携带复制起始点(origin of replication, oriP)和顺式作用EBV核抗原1(EBV nuclear antigen 1, EBNA1)元件。其中,oriP由重复序列家族(family of repeats, FR)和二重对称(dyad symmetry, DS)元件构成,DS区域通过EBNA1蛋白的螺旋-转角-螺旋结构域与之发生结合。oriP/EBNA1附加型载体具有以下优势:(1)结合到oriP上的EBNA1能够拴住附加体DNA并移至细胞染色体,通过贴附在宿主染色质上而与宿主基因组进行同步复制;(2)通过介导高效的细胞核输入和载体DNA停留,仅需单次转染即可获取iPSCs;(3)每个细胞周期复制1次,常以较低拷贝数存在,降低了DNA重排和基因组整合的概率;(4)由于质粒稀释、病毒启动子驱动EBNA1表达的沉默、附加体状态的遗传不稳定性、载体合成和分割缺陷等原因,无需药物筛选,每个细胞分裂周期中就有2%~8%的附加型质粒发生丢失,2~3个月后,细胞中附加型载体即被删除;(5)操作简单,无需病毒包装,适用细胞类型广泛。因此,oriP/EBNA1附加型质

粒是传递重编程因子生成无外源性遗传物质整合的iPSCs的极好载体。

为提高oriP/EBNA1附加型载体介导重编程因子表达生成iPSCs的效率,近年来也对该载体系统进行了改良,呈现出载体大小减小、数量增加、2A裂解肽代替IRES元件、重编程因子改变(例如L-Myc替代c-Myc)、启动子替换[例如CAGGS启动子代替延伸因子1 α 启动子(elongation factor 1 α promoter, EF1 α)]和添加小分子物质等的变化趋势;同时,重编程的细胞也由侵入性采集细胞(例如成纤维细胞、外周血细胞)向非侵入性采集细胞(如毛囊角化细胞、尿路上皮细胞)方向发展,以提高该方法的应用便利性。

2.1.1 成纤维细胞 皮肤成纤维细胞是生成iPSCs最常用的细胞类型。Yu等^[24]采用oriP/EBNA1附加型载体介导OSKM、Nanog、Lin28和猿猴病毒40大T抗原(simian virus 40 large T-antigen, SV40LT)的表达,将人包皮成纤维细胞重编程为无载体和转基因序列整合的iPSCs,表明重编程体细胞无需外源性重编程因子的连续存在和表达。Okita等^[25]以pCXLE或pCEP4为附加型载体,将三个人真皮成纤维细胞系和两个骨髓细胞系的细胞逆转化成为iPSCs即“pla-iPSCs”,第11~20代的7个iPSCs克隆中有5个克隆没有EBNA1 DNA,另外两个克隆分别包含约0.001个拷贝和2个拷贝,表明附加型载体在大多数pla-iPSCs克隆中会自发丢失。iPSCs的理想状态除了无外源性遗传物质整合外,采用无饲养层、培养液成份明确的体系进行体外培养也能提高其应用安全性,小分子物质的添加将极大地改善oriP/EBNA1附加型载体介导的重编程过程。Yu等^[26]将附加型载体转染人成纤维细胞来源的iPSCs培养在化学成分明确的人ESC培养液mTeSR1中,能够维持其多能性特征,PD0325901、CHIR99021、A-83-01、HA-100和人白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的添加极大地提高了iPSCs的生成效率。Matz等^[27]采用三种oriP/EBNA1附加型载体介导转录因子OSKM、Nanog和Lin28的表达,结合PD0325901、SB431245和CHIR99021的处理,重编程人胎儿包皮成纤维细胞成为iPSCs系epiHFF1-B1。Son等^[28]利用编码OSKM、Lin28和shRNA p53的oriP/EBNA1附加型载体,转染源自自体免疫疾病(autoimmune disease, AID)患者的真皮成纤维细胞获得了iPSCs,

添加1 mmol/L烟酰胺能够显著增强其重编程效率。

2.1.2 血细胞 与同龄成纤维细胞相比,脐带血细胞和外周血单核细胞(mononuclear cells, MNCs)因具有容易分离、低外科侵入性、便于冻存建库、体外扩增所需培养时间少、基因突变少、更容易被逆转化和减缓所得iPSCs分化能力降低等优点,成为生成iPSCs的优秀细胞资源。oriP/EBNA1附加型载体也可用于外周血MNCs的重编程, Dowey等^[29]采用密度梯度离心法获取源自成年外周血和脐带血中的MNCs,借助编码OSKM和Lin28的附加型质粒pEB-C5转染MNCs, 2×10^6 个脐带血MNCs中形成了200~800个TRA-1-60⁺类iPSCs克隆,成年外周血MNCs重编程的效率低于脐带血MNCs约50倍。Okita等^[30]将外周血经密度梯度离心分离得到MNCs, 1×10^6 个MNCs分别在T细胞刺激培养液和非T细胞培养液重编程体系中形成的iPSCs克隆数为 42.2 ± 8.4 个和 2.5 ± 1.0 个。通过再转染一个额外的质粒pCXWB-EBNA1来表达EBNA1,能够极大地增加iPSCs诱导的效率。Meraviglia等^[31]采用四个附加型载体将源自冷冻血沉棕黄色层的人外周血MNCs重编程成为iPSCs。未经密度梯度离心收集的冷冻血沉棕黄色层代表了大规模生物样品库中贮存的常见血液样品,因此,很容易从资源库中获得,从而无需进一步的样品采集。

CD34⁺细胞是表达CD34分子(造血干/祖细胞的表面标志分子)的细胞,因拥有容易鉴定、易于重编程和基因重排特征少等优势而成为理想的供体细胞。然而,CD34⁺细胞的数量少于外周血MNCs群体数量的0.1%。为此, Loh等^[32]通过给供体注射粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)来扩增外周循环血液中CD34⁺细胞的数量,并最终生成iPSCs。Mack等^[33]体外培养外周血和脐带血6 d后获得 $48\% \pm 19\%$ 的CD34⁺细胞,纯化CD34⁺细胞的iPSCs生成效率是外周血MNCs的2~8倍。这可能与后者群体中含有大量淋巴细胞有关,淋巴细胞因倾向于固有的DNA重排而更难进行重编程。Epstein Barr病毒永生B淋巴母细胞系(epstein-Barr virus immortalized lymphoblastoid B-cell lines, LCLs)是体外获得无限量B淋巴细胞的有效手段^[34]。Rajesh等^[35]发现, oriP/EBNA1附加型载体介导LCLs来源iPSCs的生成效率高于病毒载体介导小鼠B淋巴细胞的平均效率。LCLs来源的iPSCs能够分化成为造血、心脏、肝脏和神经细胞样细胞系^[35]。

此外,不同来源CD34⁺细胞在重编程成为iPSCs的效率方面存在差异。Chou等^[36]采用pCEP4附加型载体介导体细胞逆转化的结果表明,源自新生脐带血、成年外周血和成年骨髓的CD34⁺细胞重编程成为iPSCs的效率高于成纤维细胞,成年CD34⁺细胞的重编程效率低于脐带血CD34⁺细胞约50倍。大多数CD34⁺来源iPSCs在传至第10~12代时oriP/EBNA1附加型载体DNA能够自发逐渐丢失,究其原因可能与iPSCs中DNA甲基化和其他表观遗传调节机制不同于体细胞、导致EBNA1基因的表达沉默和/或oriP DNA功能丢失有关。

2.1.3 单能干细胞 重编程的所需时间和转录因子与体细胞的类型和状态密切相关,体细胞重编程的容易程度依赖于其转录谱与ESCs的相似性,因此,单能干细胞比完全分化的体细胞似乎更容易被重编程。小鼠NSCs高表达内源性多能基因(例如Sox2和c-Myc)以及一些中间的重编程标志物,因此,仅需一个(Oct4)或两个因子(Oct4和Klf4)即可将其重编程。Marchetto等^[37]采用电穿孔的方法转染pCEP-Oct4和pCEP-Nanog重编程人胎儿NSCs, iPSCs的生成效率为0.1%~1.0%,高于逆转录病毒介导成纤维细胞重编程的效率,NSCs中c-Myc和Sox2的高水平表达有利于其被逆转化,PCR DNA指纹识别证明, iPSCs来源于NSCs。只转染Oct4单独一个转录因子也能够重编程人NSCs成为iPSCs,表明Oct4可能是细胞重编程的上游因子, Nanog也许与稳定多能性的功能相关,而不是多能性阶段所必需的因子。

羊水干细胞(amniotic fluid stem cells, AFSCs)可从孕中期的羊膜穿刺样品中轻易获得和快速分离。AFSCs为胎儿间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的代表,接近多能性,具有高度的增殖潜能。但是, AFSCs增殖和分化能力会随着培养时间的延长而降低,多次传代后其特异性CpG位点中可能出现异常的DNA甲基化模式,亲本等位基因可能表现出特异性印记的丢失^[38],而这些印记的丢失与大量人类肿瘤的发生相关。此外, iPSCs的分化偏向于其来源组织, AFSCs的表观谱比完全分化细胞更为开放和易于重塑,源自AFSCs的iPSCs有望降低iPSCs的分化偏向, AFSCs也比成年体细胞更能快速、有效地被重编程成为iPSCs。Slamecka等^[39]报道了采用pEP4 E02S EN2K(Oct4+Sox2、Nanog+Klf4)、pEP4 E02S ET2K(Oct4+Sox2、SV40LT+Klf4)和

pCEP4-M2L(c-Myc+Lin28)载体重编程AFSCs成为iPSCs的体系, 该体系采用E8多能干细胞支持培养液, 化学成分明确, 无需血清和饲养层的参与, 进一步提高了iPSCs的应用安全性。鉴于iPSCs技术的未来临床应用转化, 非整合重编程和化学限定性培养体系更容易被人们所接受。

2.1.4 非侵入性来源细胞 (1)角化细胞。角化细胞是角蛋白丰富的上皮细胞, 除存在于皮肤、指甲外, 还存在于毛囊的外根鞘中, 可通过采集毛发毛囊而获取。Aasen等^[40]采用携带OSKM因子的逆转录病毒载体转染毛囊角化细胞, 其iPSCs的生成效率比成纤维细胞高100倍, 且转染后10 d即可出现iPSCs克隆, 而成纤维细胞需要3~4周的时间。这可能与角化细胞在细胞之间形态紧密和高水平钙黏蛋白表达等方面表现出与多能细胞相似的特征有关, 而且, 两者均为上皮细胞, 可能具有相似的表现状态, 无需经历成纤维细胞重编程的必要条件——MET。Piao等^[41]采用携带OSK、L-Myc、Lin28和p53 shRNA的附加型载体转染表皮角化细胞, 获得了大约0.14%的重编程效率, 所得人iPSCs表现出无附加型载体的整合; Hung等^[42]提供了该方法的详细方案。

(2)脐静脉内皮细胞。人和动物分娩后, 从胎盘的脐静脉中可以分离得到内皮细胞。Matz和Adjaye^[43]通过核转染pEP4EO2SEN2K、pEP4EO2SET2K和pCEP4-M2L附加型质粒, 介导OSKM、Nanog和Lin28的表达, 结合三种小分子物质即PD0325901、SB431245和CHIR99021的处理, 重编程人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 建立了iPSCs系epiHUVEC。第12代后, PCR结果显示, epiHUVEC完全丢失了附加型载体, 具有正常核型。系统树图表明, epiHUVEC的转录谱和人ESC系H1相似, 皮尔逊相关系数为0.899。

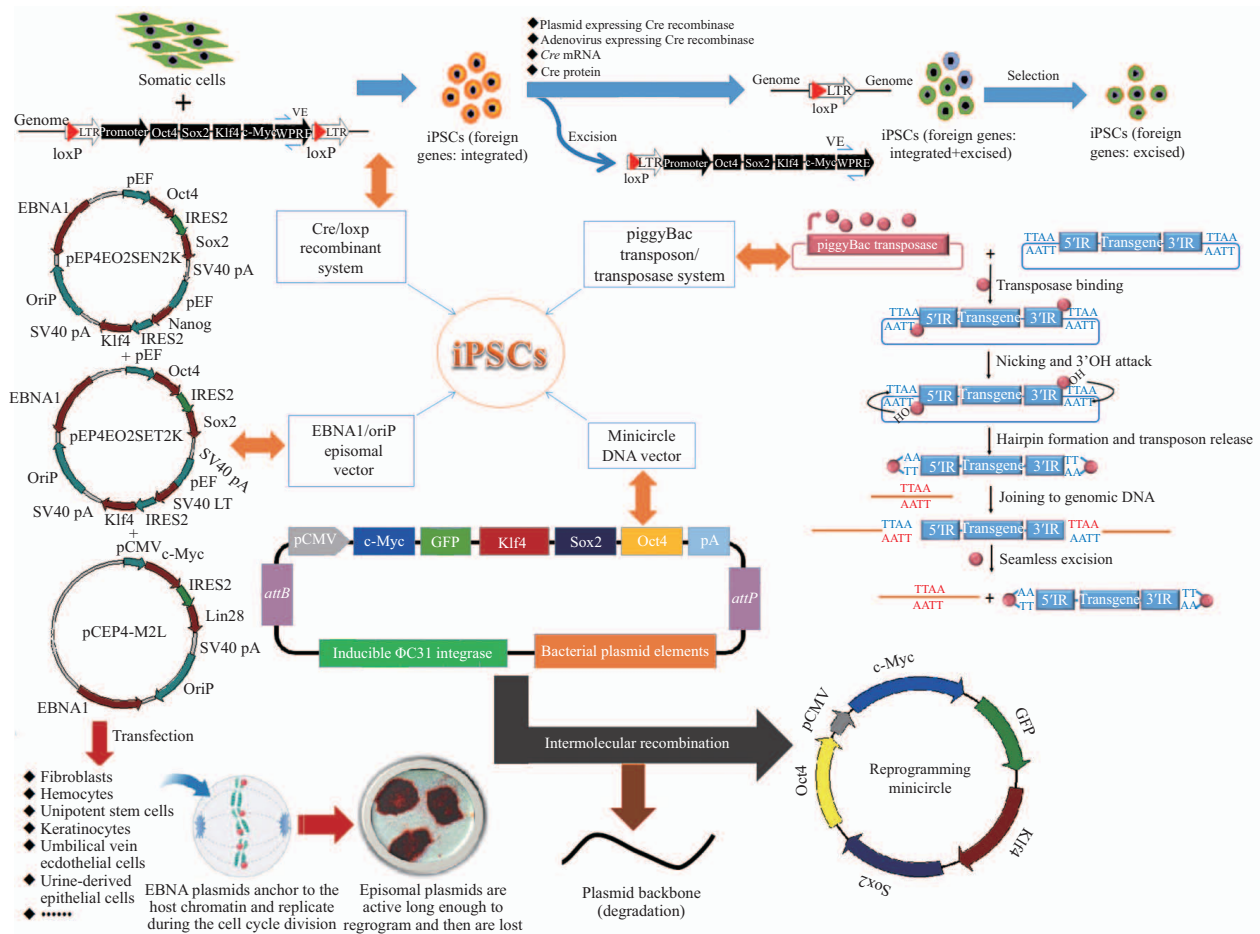
(3)尿路上皮细胞。从尿液中可完全无侵入性地分离到脱落的肾上皮细胞, 以逆转录病毒为载体, 成功获得了高达4%的iPSCs克隆形成率^[44]。Drozd等^[45]采用5个oriP/EBNA1附加型载体转染尿路上皮细胞14 d后形成iPSCs克隆, 而成纤维细胞需要约21 d, 且其重编程效率(约1.5%)显著高于BJ新生成纤维细胞(0.011%)。Sauer等^[46]通过oriP/EBNA1附加型载体介导OSKM的表达建立了人尿路上皮细胞来源的iPSCs系, 并能分化生成肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, iHeps), iHeps的microRNA谱

与人原代肝细胞大部分相似, 可嵌合进入Scid鼠的肝脏。因此, 尿路上皮细胞也是生成无外源性遗传物质整合iPSCs的一种容易获得的细胞资源。

2.2 微环DNA载体

微环是环状非病毒超螺旋DNA分子, 源自一个亲本质粒, 该质粒通过转化细菌, 例如已被特异性工程化的ZYCY10P3S2T *E. coli*株, 在L-阿拉伯糖诱导下能够表达ΦC31整合酶和Sce I核酸内切酶, 通过ΦC31整合酶介导的分子内(cis-)重组作用, 形成微环DNA载体(例如真核表达盒、报告基因、自我剪切肽2A序列、启动子和SV40 polyA)。包含细菌质粒骨架元件的亲本质粒剩余物则被Sce I内源性核苷酸裂解和降解成线性化, 因此, 通过普通的质粒纯化程序即可分离到微环DNA。通过编码ΦC31整合酶的多重复制, 可以提高微环DNA的产量和纯度。微环DNA载体拥有比普通质粒更高的转染效率, 能够更少地活化外源性沉默机制, 转基因稳定表达的持续时间显著增长; 而且, 该载体不会整合进入宿主基因组或发生分裂, 随着细胞的分裂增殖而被稀释, 最后从细胞内完全消失。因此, 微环介导转基因仅需要一个简单的载体, 无需后续的药物筛选或载体删除过程, 有望成为一个简单、高效和安全的重编程方法用于无外源性遗传物质整合iPSCs的生成。此外, 微环DNA的应用已经得到了美国食品药品监督管理局的批准, 为其在医学、生物学和农业的推广应用奠定了基础。

Jia等^[47]和Narsinh等^[48]通过构建微环DNA载体, 三次转染人脂肪干细胞, 借助Oct4、Sox2、Nanog和Lin28的过表达, 约4周内生成hiPSCs克隆。经过连续培养和传代, 微环DNA载体逐渐丢失, 在亚克隆基因组中未检测到微环转基因的整合。这种无遗传修饰病毒序列、细菌质粒骨架元件和原癌基因(例如c-Myc)参与的重编程途径, 有效缓解了其潜在的安全隐患。Yu等^[49]通过构建包含POU结构域5类转录因子1(POU domain class 5 transcription factor 1, *Pou5f1*)、Sox2、Lin28、Nanog和GFP报告基因的微环DNA载体, 比较了四种试剂转染鸡胚成纤维细胞(chicken embryonic fibroblast cells, CEFs)的效率。结果表明, Lipofectamine和PureFection比GeneJammer和Xfect更适合微环DNA载体介导CEF的重编程。第47代的鸡iPSCs移植进入X阶段胚胎的胚盘下腔, 成功整合进入了三个胚层的组织和性腺。但是, 相



WRPE: 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件; IR: 反向重复序列; pEF: 真核细胞延伸因子1 α 启动子; pCMV: 巨细胞病毒即刻早期启动子; SV40pA: 猴病毒40多聚腺苷酸序列。

WRPE: woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element; IR: inverted repeats; pEF: eukaryotic elongation factor1 α promoter; pCMV: cytomegalovirus immediate-early promoter; SV40pA: simian virus 40 polyadenylation sequence.

图1 不同载体介导无外源性遗传物质的iPSCs的生成(根据参考文献[11-12,24,48]修改)

Fig.1 Generation of induced pluripotent stem cells without integration of genetic materials mediated with different vector (modified from references [11-12,24,48])

对于慢病毒载体而言,微环DNA载体重编程体细胞的效率仍然维持在较低的水平(约0.005%)^[48]。通过添加小分子物质或调控Wnt信号通路等有望进一步提升其重编程的效率。但是,微环DNA载体的制备较为复杂,需要大量初始细胞、荧光活化细胞分选步骤和多重微环转染。

3 结语与展望

针对病毒载体整合进入iPSCs基因组产生的致癌性潜在风险,采用整合后可删除的基因表达载体(Cre/loxP重组系统、piggyBac转座子/转座酶系统)和非整合基因表达载体(oriP/EBNA1附加型载体、微环DNA载体)介导重编程因子表达,可以逆转化体细胞或单能干细胞成为无外源性遗传物质整合的

iPSCs(图1)。但是,目前采用这些载体介导iPSCs的生成还存在效率较低、部分载体经切除后仍有成分残留、存在对受体细胞基因组整合的可能性和iPSCs中残余或整合外源基因检测方法需更为精准等问题,这些问题有待进一步解决,以提高其生成效率和质量,从而为医学、生物学和农学等领域提供更为安全的iPSCs资源。

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 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-77.

- 3 Kameyama Y, Kawabe Y, Ito A, Kamihiro M. An accumulative site-specific gene integration system using Cre recombinase-mediated cassette exchange. *Biotechnol Bioeng* 2010; 105(6): 1106-14.
- 4 Inao T, Kawabe Y, Yamashiro T, Kameyama Y, Wang X, Ito A, *et al.* Improved transgene integration into the Chinese hamster ovary cell genome using the Cre-loxP system. *J Biosci Bioeng* 2015; 120(1): 99-106.
- 5 Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, *et al.* Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2010; 28(10): 1728-40.
- 6 Karow M, Chavez CL, Farruggio AP, Geisinger JM, Keravala A, Jung WE, *et al.* Site-specific recombinase strategy to create induced pluripotent stem cells efficiently with plasmid DNA. *Stem Cells* 2011; 29(11): 1696-704.
- 7 Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, *et al.* Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 2010; 28(1): 64-74.
- 8 Awe JP, Lee PC, Ramathal C, Vega-Crespo A, Durruthy-Durruthy J, Cooper A, *et al.* Generation and characterization of transgene-free human induced pluripotent stem cells and conversion to putative clinical-grade status. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4(4): 87.
- 9 Loh YH, Yang JC, de Los Angeles A, Guo C, Cherry A, Rossi DJ, *et al.* Excision of a viral reprogramming cassette by delivery of synthetic Cre mRNA. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2012; doi: 10.1002/9780470151808.sc04a05s21.
- 10 Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, Koch P, Wunderlich FT, Siemen H, *et al.* Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods* 2006; 3(6): 461-7.
- 11 Kadari A, Lu M, Li M, Sekaran T, Thummer RP, Guyette N, *et al.* Excision of viral reprogramming cassettes by Cre protein transduction enables rapid, robust and efficient derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(2): 47.
- 12 Woodard LE, Wilson MH. piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol* 2015; 33(9): 525-33.
- 13 Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009; 6(5): 363-9.
- 14 Ye JK, Hong JY, Ye FS. Reprogramming rat embryonic fibroblasts into induced pluripotent stem cells using transposon vectors and their chondrogenic differentiation *in vitro*. *Mol Med Rep* 2015; 11(2): 989-94.
- 15 Woltjen K, Kim SI, Nagy A. The piggyBac transposon as a platform technology for somatic cell reprogramming studies in mouse. *Methods Mol Biol* 2016; 1357: 1-22.
- 16 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
- 17 Kim SI, Oceguera-Yanez F, Hirohata R, Linker S, Okita K, Yamada Y, *et al.* KLF4 N-terminal variance modulates induced reprogramming to pluripotency. *Stem Cell Rep* 2015; 4(4): 727-43.
- 18 Tsukiyama T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, Ohinata Y. A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition. *PLoS One* 2014; 9(3): e92973.
- 19 Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, *et al.* Targeted gene correction of alpha(1)-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 478(7369): 391-4.
- 20 Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang JM, Muench MO, *et al.* Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res* 2014; 24(9): 1526-33.
- 21 Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, *et al.* Generation of naive bovine induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors. *PLoS One* 2015; 10(8): e0135403.
- 22 Salewski RP, Buttigieg J, Mitchell RA, van Der Kooy D, Nagy A, Fehlings MG. The generation of definitive neural stem cells from piggyBac transposon-induced pluripotent stem cells can be enhanced by induction of the NOTCH signaling pathway. *Stem Cells Dev* 2013; 22(3): 383-96.
- 23 Saha S, Woodard LE, Charron EM, Welch RC, Rooney CM, Wilson MH. Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(3): 1770-82.
- 24 Yu JY, Hu KJ, Smuga-Otto K, Tian SL, Stewart R, Slukvin II, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324(5928): 797-801.
- 25 Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; 8(5): 409-12.
- 26 Yu JY, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang JL, Jiang Y. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS One* 2011; 6(3): e17557.
- 27 Matz P, Adjaye J. Episomal-based generation of an iPS cell line from human fetal foreskin fibroblasts. *Stem Cell Res* 2016; 16(1): 67-9.
- 28 Son MY, Lee MO, Jeon H, Seol B, Kim JH, Chang JS, *et al.* Generation and characterization of integration-free induced pluripotent stem cells from patients with autoimmune disease. *Exp Mol Med* 2016; 48(5): e232.
- 29 Dowey SN, Huang XS, Chou BK, Ye ZH, Cheng LZ. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc* 2012; 7(11): 2013-21.
- 30 Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, *et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013; 31(3): 458-66.
- 31 Meraviglia V, Zanon A, Lavdas AA, Schwienbacher C, Silipigni R, Di Segni M, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from frozen buffy coats using non-integrating episomal plasmids. *Jove-J Vis Exp* 2015; 100: e52885.
- 32 Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo HG, Heffner GC, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009; 113(22): 5476-79.

- 33 Mack AA, Kroboth S, Rajesh D, Wang WB. Generation of induced pluripotent stem cells from CD34⁺ cells across blood drawn from multiple donors with non-integrating episomal vectors. *PLoS One* 2011; 6(11): e27956.
- 34 Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WER. EBV immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiol* 2008; 37: 41-5.
- 35 Rajesh D, Dickerson SJ, Yu JY, Brown ME, Thomson JA, Seay NJ. Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood* 2011; 118(7): 1797-800.
- 36 Chou BK, Mali P, Huang XS, Ye ZH, Dowey SN, Resar LMS, *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.
- 37 Marchetto MCN, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2009; 4(9): e7076.
- 38 Phermthai T, Suksompong S, Tirawanchai N, Issaragrisil S, Julavijitphong S, Wichitwiengrat S, *et al.* Epigenetic analysis and suitability of amniotic fluid stem cells for research and therapeutic purposes. *Stem Cells Dev* 2013; 22(9): 1319-28.
- 39 Slamecka J, Salimova L, McClellan S, Van Kelle M, Kehl D, Laurini J, *et al.* Non-integrating episomal plasmid-based reprogramming of human amniotic fluid stem cells into induced pluripotent stem cells in chemically defined conditions. *Cell Cycle* 2016; 15(2): 234-49.
- 40 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- 41 Piao Y, Hung SS, Lim SY, Wong RC, Ko MS. Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(7): 787-91.
- 42 Hung SSC, Pebay A, Wong RCB. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells using hair-derived keratinocytes. *Jove-J Vis Exp* 2015; 102: e53174.
- 43 Matz P, Adjaye J. Generation of iPSC line epiHUVeC from human umbilical vein endothelial cells. *Stem Cell Res* 2015; 15(3): 581-3.
- 44 Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang YH, Ho JC, Yang JY, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 2012; 7(12): 2080-9.
- 45 Drozd AM, Walczak MP, Piaskowski S, Stoczynska-Fidelus E, Rieske P, Grzela DP. Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): 122.
- 46 Sauer V, Tchaikovskaya T, Wang X, Li YF, Zhang W, Tar K, *et al.* Human urinary epithelial cells as a source of engraftable hepatocyte-like cells using stem cell technology. *Cell Transplant* 2016; 25(12): 2221-43.
- 47 Jia FJ, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li ZJ, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010; 7(3): 197-9.
- 48 Narsinh KH, Jia FJ, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* 2011; 6(1): 78-88.
- 49 Yu P, Lu Y, Jordan BJ, Liu Y, Yang JY, Hutcheson JM, *et al.* Nonviral minicircle generation of induced pluripotent stem cells compatible with production of chimeric chickens. *Cell Reprogram* 2014; 16(5): 366-78.