

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.03.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 03-0038-06

综述

人尿源性诱导多能干细胞在遗传病治疗中的应用前景*

袁艳萍¹, 郑志娟¹, 李运伦²

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014)

摘要: 遗传病传统的临床治疗方法只能减轻或矫正患者的临床症状, 不能改变患者携带的致病基因。揭示遗传病的发病机制, 利用基因治疗改变细胞中的遗传物质是根治遗传病的有效途径。干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能特性的细胞, 其中人尿源性诱导多能干细胞具有容易获得、易于培养增殖、重编程率高等优点, 且可被诱导分化为多种细胞和器官。该文总结了近五年来人尿源性诱导多能干细胞的高效重编程方法, 并整理其在心脏、肌营养不良、脊髓型肌萎缩等相关遗传病的疾病模型复制、机制探索及可行性治疗方面的应用, 为遗传病的临床治疗研究提供更多的思路。

关键词: 遗传病; 人尿源性诱导多能干细胞; 尿液细胞重编程; 机制研究; 可行性治疗
中图分类号: R596 **文献标识码:** A

Application prospect of human urine-driven induced pluripotent stem cells in treatment of genetic diseases*

Yan-ping Yuan¹, Zhi-juan Zheng¹, Yun-lun Li²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: The traditional clinical treatments of genetic diseases can only alleviate or correct the clinical symptoms of patients, but not change the pathogenic genes carried by patients. To reveal the pathogenesis of genetic diseases, using gene therapy to change the hereditary substances in cells is an effective way to cure genetic diseases. Stem cells are a kind of cells with self-renewal ability and multi-directional differentiation potential. The human urine-driven induced pluripotent stem cells have the advantages of easy access, easy culture and proliferation, high reprogramming rate, and can be induced to differentiate into a variety of cells and organs. This paper discussed the high efficient reprogramming methods of human urine-derived induced pluripotent stem cells in recent five years, and summarized their applications in the establishment of disease models, mechanism exploration and feasibility treatment of genetic diseases related to heart, muscular dystrophy, spinal muscular atrophy, etc., so as to provide more ideas for the clinical treatments and researches of genetic diseases.

Keywords: genetic diseases, inborn; human urine-driven induced pluripotent stem cells; urine cells reprogramming; mechanism research; feasible treatment

人类遗传病主要是在异源系统或动物模型中进行研究, 其结论从未被直接检验过^[1]。直至今日, 随

着干细胞在再生医学方面应用的推广, 逐渐实现对完全在体外发育的患者源性细胞进行基因测序及生

收稿日期: 2021-07-08

*基金项目: 山东省泰山学者工程专项经费资助(No:ts201712042); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No:2019WS558)

[通信作者] 李运伦, E-mail: li.yunlun@163.com

理测试。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)具有自我更新和多向分化能力,可以根据不同的重编程效率从不同的细胞类型中产生不同的细胞株^[2]。人iPSCs的细胞来源逐渐实现了非侵入性、简单、成本低的突破^[3]。利用尿源性iPSCs衍生的与疾病表征相关的细胞模型可以为个性化医学提供一种新的生物资源,这种新的资源被用于机制探索、测试新发现的化合物、基因编辑及治疗等,促进了遗传病精确化医疗的发展。

1 人尿源性诱导多能干细胞

1.1 人尿源性诱导多能干细胞的特征

干细胞在再生医学、细胞替代治疗及药物筛选等领域有着广泛的研究及应用前景。随着2006年日本京都大学YAMANAKA教授研究的iPSCs的出现^[4], iPSCs在疾病模型复制、再生医学、药物筛选等领域的应用不断创新和扩展。iPSCs重编程比较常见的细胞类型可能是皮肤成纤维细胞、脐带血、外周血、角质细胞,但这仍然需要活检,直接阻碍了研究需求中的自愿捐赠^[5]。理想的方法应是通过非侵入性、简单及低成本的程序^[6],从健康受试者或任何年龄、性别、人种的患者中普遍获得最佳细胞来源。现代医学研究中,人类泌尿系统由一个复杂的小管网组成,在正常的生理条件下,成千上万的细胞从管状系统、输尿管、膀胱和尿道脱落,并散布在尿液中^[7]。尿液细胞是一种身体垃圾,2012年有报道称脱落的肾上皮性尿液细胞能有效地产生iPSCs,而且尿液细胞也具有易获取、成本低、效率高且无伦理学问题等优势^[3]。并有研究证实与人皮肤成纤维细胞或成人脂肪来源间充质干细胞(MSCs)相比,尿源性iPSCs具有更快的重编程动力学^[8],与胚胎干细胞或其他来源的iPSCs相比,尿源性iPSCs表现出相似的表达和多能模式^[9]。

1.2 尿液细胞重编程为iPSCs

iPSCs重编程的原理指利用体细胞核移植(SCNT)、细胞融合、OSKM转录因子及小分子转导等技术将维持干细胞特性的关键转录因子转移至成熟的体细胞内,将人成熟的体细胞重编程为人iPSCs,通过转录因子基因的异位表达从而具有干细胞特性^[10]。

目前常用的重编程方法有通过慢病毒或逆转录病毒转导将重编程因子整合到基因组中^[11]。这种方法可以实现高效的基因转移和长期表达,但由于外

源基因永久和随机整合所产生的细胞有一定的致癌潜力,因此不适用于治疗。为避免使用整合病毒,目前逐渐出现不同类型的非整合重编程方法,如质粒转染^[12]、游离载体^[13]、仙台病毒^[14]、mRNA^[15]等的介导,与此同时能够模拟或替代重编程因子的小分子逐渐被发现^[16],如Valproic acid、CHIR99021、Vitamin C等小分子。由于不同的细胞系的基因表达谱有差异,理想的重编程因子组合和诱导条件与细胞类型有很大的关联^[17]。通过对文献的搜集整理,下面总结几种针对尿液细胞高效、低风险的重编程方法。

1.2.1 质粒转染和化合物干预相结合的方法 外源基因表达方法使用的基本方法是质粒载体,因为与线性DNA相比,质粒载体不容易受到外核酶的影响。质粒转染的重编程效率与病毒载体相比虽然效率偏低,但因其可控成本及安全性,非染色体质粒携带的重编程因子获得非整合iPSCs的方法逐渐被广泛使用。在此基础上,进一步发现使用小分子化合物不仅可以降低致癌风险,而且可以提高其重编程效率。

CHENG等^[18]用含OCT4、SOX2、KLF4、SV40LT、c-MYC及LIN28基因的pEP4-E02S-ET2K和pEP4-M2L质粒电穿孔尿液细胞,进一步用含4种小分子化合物的N2B27培养基进行培养,结果在10d左右就成功培养出iPSCs,其重编程效率可达每孔80个克隆。WANG等^[19]通过筛选多种重组质粒组合和多种化合物,最终确定低风险因子和小分子化合物,建立了一个高效的外泌体系统,即6F/BM1-4C系统,该系统因缺乏人类尿源性细胞重编程的致癌因子,从而可降低致癌风险,证实6F/BM1-4C系统在细胞遗传学水平上较为稳定,具有潜在的临床应用价值。LI等^[20]进一步研究如何提高尿液细胞的重编程效率,在质粒电转染的基础上,加入6种小分子化合物,同时发现用自体喂养替代基质胶可以克服重编程过程中出现的大量细胞死亡所导致的重编程失败,此方法进一步提高尿液细胞的重编程效率,为成功培养iPSCs提供便利。

1.2.2 仙台病毒载体转染 由于转基因随机地整合到宿主基因组中,并导致转基因重新激活或突变,因此存在一定的风险性。仙台病毒的重要特征在于其能够在细胞质中完全复制,且无法进入受感染细胞的细胞核^[21],因此消除了通过表观遗传修饰改变宿主基因组和基因沉默的风险^[22]。仙台病毒能够以非整合形式感染多种细胞类型,且在转导后24h内具有高的转导效率和快速的表达能力^[23-24],因此常

表 1 利用质粒电穿孔转染结合化合物干预将尿液细胞重编程为 iPSCs

参考文献 第一作者	载体	重编程因子	促进重编程的小分子化合物	iPSCs 克隆形成 所需时间
CHENG ^[18]	pEP4-EO2S-ET2K、 pEP4-M2L	<i>OCT4</i> 、 <i>SOX2</i> 、 <i>KLF4</i> 、 <i>SV40LT</i> 、 <i>c-MY</i> 、 <i>LIN28</i>	A83-01、PD0325901、Thiazovivin、CHIR99021	10 d
WANG ^[19]	pE3.1-OG--KS、pE3.1-L- Myc-hmiR-302 cluster	<i>OCT4</i> 、 <i>GLIS1</i> 、 <i>KLF4</i> 、 <i>SOX2</i> 、 <i>L-MYC</i>	inhibitor of lysine-demethylase1、methyl ethyl ketone、 glycogen synthase kinase 3 beta、histone deacetylase	18 d
Li ^[20]	pEP4EO2SET2K、pCEP4- miR-302-367 cluster	<i>OCT4</i> 、 <i>SOX2</i> 、 <i>SV40LT</i> 、 <i>KLF4</i>	cyclic pififithrin-a、A-83-01、CHIR99021、 thiazovivin、NaB、PD0325901	14 d

被用于细胞的有效重编程。

AFZAL 等^[25]在将肌营养不良患者尿液细胞重编程为 iPSCs 的过程中，提出一种非整合仙台病毒载体的重编程方式，将 OSKM 转录因子导入患者的尿液细胞中。该方案在 2~3 周内生成完全重编程的克隆。后来，随着技术的进步，研制出了 iPSCs 仙台重编程试剂盒，LIN 等^[26]用该试剂盒也成功地将尿液细胞诱导成 iPSCs。SAUER 等^[27]在将人尿上皮细胞重编程为 iPSCs 并分化为肝细胞的研究中，分别采用了仙台病毒转染和质粒转染两种方法，前者是用表达重组因子 *hOCT3/4*、*hSSOX2*、*hKLF4* 及 *hcMYC* 的重组仙台病毒感染第 2 代尿路上皮细胞，后者是用 1 组 3 个 oriP/ebna Epposal 质粒转染尿路上皮细胞，通过核转染其表达重组因子 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*L-MYC*、*LIN28* 及抗 *p53* 的 shRNA，两种方法都可提供令人满意的重编程效率。然而，当比较来自同一供体的尿细胞时，基于仙台病毒的方法获得的菌落和重编程效率均高于基于质粒转染的方法。由此推断来自同一供体的尿液细胞，基于仙台病毒的重编程方法更有效。

1.2.3 mRNA 重编程 在克服 iPSCs 重编程风险和低效率的障碍中，mRNA 重编程技术因其矢量清晰的暂态特性，对重编程因子给药、化学计量和时间的灵活控制，以及其衍生 iPSCs 生成的速度和效率的优越性，可能成为产生多能干细胞的最有希望的方法之一^[15]。

GAIGNERIE 等^[28]在寻求将 mRNA 重编程应用于最易获得、可选择的细胞类型的研究中，采用含 38% *OCT4*，11.4% *SOX2*，12.7% *KLF4*，10.1% *LIN28*，12.7% *MYC*，10.1% *Nanog*，5.1% *nGFP* 的 mRNA 重编程方案对成纤维细胞、骨髓细胞、尿液细胞进行重编程，11 d 后观察以上 3 种细胞分别出现 21 个、140 个、4 个 hiPSCs 克隆，但尿液细胞来源 iPSCs 是

最早出现。尿液细胞是一个异质的群体，从多个尿源性细胞系中分离得到 iPSCs 克隆证实没有出现基因组异常，表明这种重编程的稳定性。后期通过重复和优化证实了 mRNA 重编程可以用于包括尿液细胞在内的多种易获得的细胞类型，并且在 4 个不同的患者细胞系上是可重复的。

2 人尿源性 iPSCs 在遗传病细胞模型中的应用

遗传病患者自身来源的 iPSCs 可以提供包含遗传背景在内的特定细胞模型，发挥通过比较遗传背景中的表型来检测病理表型中的突变的特异性作用，拓展个性化药物筛选，同时也逐渐实现了基因的原位转化，促进了精确化治疗的发展。

2.1 在心脏相关遗传病中的应用

之前由于人心肌细胞的来源极其有限，人类遗传性心脏疾病主要在独立于患者的“遗传背景”的异源系统或动物模型中进行了研究。自从尿源性 iPSCs 的出现，人们一直致力于利用 iPSCs 细胞进行心脏相关遗传病的疾病机制研究和心脏修复，目前逐渐探索尿源性 iPSCs 衍生的心肌细胞携带的遗传物质及基因突变特征与患者病理特征的关系，以及利用诱导而来的心肌细胞的自发收缩功能进行药物的高通量筛选。

JOUNI 等^[29]将尿源性诱导多能干细胞分化为心肌细胞 (UhiPS-CMs)，用 UhiPS-CMs 来模拟和表征 2 型长 QT 综合征的分子表型，结果发现 A561P *KCNH2* 突变导致人 CMS 中 HERG 通道的转运缺陷，从而增加了心律失常的易感性。CAO 等^[30]成功地用仙台病毒载体从一位患有心力衰竭的室间隔缺损 (VSD) 患者的尿液样本中获得了非整合型 UiPSCs，该患者的 *RyR2* 基因存在 L2483R 突变。进一步通过小分子调控 Wnt 信号将 UiPSCs 快速有效地分化为功能性心肌细胞，经基因检测证明该来源的心肌细胞

携带遗传基因突变并具有与患者病理有关的特征,从而加快 iPSCs 向高通量筛选应用或再生治疗的转化。MLEE 等^[31]在唐氏综合征的研究中,通过电穿孔获得的尿源性 T21-iPSCs,经荧光原位杂交验证和光谱核型分析后,证明 T21-iPSCs 可以维持其细胞遗传的完整性,促进了对 T21 表型系统特征相关的研究。在此基础上,进一步利用胰岛素剥夺法^[32]成功地将 T21-iPSCs 分化为心肌细胞,这些分化的心肌细胞在功能上表现为自发收缩,对 β 肾上腺素能激动剂异丙肾上腺素敏感,为高通量筛选改善唐氏综合征患者生活质量的潜在药物奠定了基础。

2.2 在肌营养不良相关遗传病中的应用

肌强直性营养不良(myotonic dystrophy, DM)是一种常染色体显性核苷酸重复扩张障碍,伴有骨骼肌强直、无力,以及心律失常、心力衰竭^[33]。根据遗传病疾病特征,利用 iPSCs 衍生出的具有相关疾病表型的心肌细胞,通过观察 RNA 表达情况、心肌细胞的肌纤维收缩张力、 Ca^{2+} 瞬时表达来揭示遗传病的基因调控差异和不同类型的病理特征差异。

KIM 等^[34]在肌强直性营养不良机制的研究中,利用质粒电穿孔的方法从健康对照组、DM1 和 DM2 受试者中诱导出多能干细胞(iPSCs),并将其分化为心肌细胞。利用高分辨率成像证明来自 DM1 而不是 DM2 的 iPSCs 来源的心肌细胞存在已知靶基因和 MBNL 的异常剪接,同时 DM1 和 DM2 iPSCs 衍生心肌细胞的 Ca^{2+} 瞬时表达不同, RNA 序列显示两者的基因表达有明显的失调,也存在差异的异常剪接模式。以上研究结果表明 DM1 和 DM2 尽管有一些共同的临床和分子特征,但有不同的病理特征。PIONER 等^[35]在探索肌营养不良蛋白在心肌细胞发育和 Duchenne 型肌营养不良心肌病早期发展中的作用的研究中,分别从正常健康人和 Duchenne 型肌营养不良患者尿液中获得诱导多能干细胞分化的人心肌细胞(hiPSCCMs),将通过 CRISPR 技术从健康人获得的肌营养不良蛋白缺乏的模型与从患者诱导的 hiPSCCMs 做对比,结果发现缺乏 Dp427 会导致肌纤维收缩张力降低、松弛动力学较慢以及 Ca^{2+} 处理异常,这与 Duchenne 型肌营养不良细胞相似,表明缺乏 Dp427 与心肌细胞结构成熟延迟或改变有关联性,该研究为探索 Dp427 缺陷对心肌细胞发育早期的功能影响提供了新的见解。GUAN 等^[36]通过对 Duchenne 型肌营养不良症患者的尿液细胞重编程,进一步诱导分化成心肌细胞,结果证明 Duchenne

型肌营养不良患者来源的心肌细胞保留了该类患者的肌营养不良蛋白突变,从而促进对该遗传病的机制研究和药物开发。

2.3 在其他遗传病中的应用

随着尿源性 iPSCs 技术的成熟,其定向诱导的细胞种类逐渐增多,在遗传病中的应用范围越来越广,不仅为以个性化方式研究遗传病机制提供了一种有效的工具,同时促进了精确治疗的发展。

2.3.1 脊髓型肌萎缩 脊髓性肌萎缩是一种以脊髓进行性运动神经元丢失为特征的神经肌肉疾病,是由存活运动神经元 1(SMN1)基因的突变引起的,几乎所有脊髓性肌萎缩患者存在一个类似 SMN1 的基因,即存活运动神经元 2(SMN2)^[36-37]。ZHOU 等^[38]在脊髓肌萎缩症的研究中,利用 iPSCs 重组载体从脊髓性肌萎缩患者的尿液细胞中生成无 c-Myc 的、非整合的 iPSCs,利用 CRISPR/Cpf 1 和单链寡核苷酸(ssODN),在 SMA-iPSCs 中实现了 SMN2 基因向 SMN1 基因的原位转化,效率为 4/36。基因转化的 iPSCs 株系不含外源序列,并保留正常的核型。值得注意的是,在基因转换的 iPSCs 及其衍生运动神经元(iMNs)中有 SMN 和基因定位的表达,这是人类细胞中 Cpf 1 同源定向修复(HDR)介导的基因转换的首次报道,为大多数脊髓性肌萎缩患者提供了一种通用的基因治疗方法。

2.3.2 遗传性肝病 肝细胞极性对于胆管的发育和肝内胆汁及废物的安全运输至关重要,在与肝细胞极性相关的遗传性肝病研究中,OVEREEM 等^[39]利用慢病毒载体的方法将 1 例 ATP7B 纯合子突变和一例杂合子突变患者的尿液细胞重编程为 iPSCs,并将其分化为肝细胞样细胞(hiHeps),利用 HiHeps 重述极化蛋白的转运过程,以 Cu^{2+} 诱导的铜转运蛋白 ATP 7B 再分布到胆管结构域为例,结果证明最常见但又令人费解的 Wilson 病导致的 ATP 7B-h1069q 突变本身并不能阻止将 ATP7B 转运到跨高尔基网,相反,其阻止了 Cu^{2+} 诱导的极化再分布到胆管区,不能被药物折叠伴随分子逆转,该研究表明功能细胞极性可在患者多能干细胞来源的 hiHeps 中实现,首次实现了对内源性突变蛋白、患者特异性发病机制和药物反应的研究。

2.3.3 血友病 血友病 A 是由于缺乏凝血因子 VIII(FVIII)而引起的单基因疾病,这种缺乏症可能导致自发性关节出血或危及生命的出血,但无法治愈^[40]。PANG 等^[41]从重度血友病 A 患者中获得尿

源性诱导多能干细胞(iPSCs), 并利用转录激活剂样效应因子镍酶将第Ⅷ因子基因(F8)定位于HA-iPSCs中的多倍核糖体DNA(rDNA)位点, 旨在解决FVIII蛋白短缺的问题, 结果表明外源F8的多个拷贝可整合到rDNA位点上, 同时检测到外源性F8 mRNA和FVIII蛋白在靶向HA-iPSCs中的表达, 而且该来源的iPSCs分化为内皮细胞(ECs)后, 仍可检测到外源性FVIII蛋白。结果表明, 多拷贝rDNA位点可作为iPSCs基因治疗的有效靶点, 这种策略为血友病A和其他单基因疾病提供了一种新的基于iPSCs的治疗方案。

3 总结与展望

尿液细胞与其他iPSCs重编程来源相比具有非侵入性、取材简单、成本低、重编程效率高等优势, iPSCs重编程技术由最初的存在致癌风险的慢病毒、逆转录转导技术, 逐渐优化为质粒、仙台病毒、mRNA等介导的非整合技术, 同时促进重编程效率、降低风险的小分子化合物也逐渐被发现。随着iPSCs重编程技术的成熟, 其被定向分化的细胞种类逐渐在扩展。尿源性iPSCs及其诱导分化而来的特定细胞因具备患者本身的遗传特征, 为遗传病的机制探索、药物筛选、基因治疗提供了很好的研究模型。

目前, 尿源性iPSCs在遗传病方面的应用范围逐渐扩大。遗传性心脏病、室间隔缺损等心脏相关性遗传病的研究, 证实了尿源性iPSCs衍生的心肌细胞携带的遗传物质及基因突变特征与患者病理特征的一致性, 并且其表现出自发收缩的心肌功能为药物的高通量筛选提供了可能。在肌强直性营养不良相关遗传病方面, 由尿源性iPSCs衍生的心肌细胞进一步实现了通过观察RNA表达情况、心肌细胞的肌纤维收缩张力、Ca²⁺瞬时表达差异来揭示遗传病的基因调控差异和不同类型间的病理特征。另外, 在脊髓性肌萎缩、遗传性肝病、血友病等相关遗传病中, 由尿源性iPSCs衍生的细胞模型也逐渐实现了基因的原位转化, 促进了精确化治疗的发展。

尿源性iPSCs在遗传病的研究上有很大的优势, 其衍生而来的心肌细胞、肝细胞样细胞或其他细胞为遗传病机制研究、药物筛选、细胞治疗提供了很好的模型。当然, 未来还需在某些地方进一步提高, 例如尿源性iPSCs的重编程效率仍需进一步提高。同时, 经iPSCs诱导分化而来的细胞与自身原系统细胞相比, 由于缺乏整体的机制系统, 不能提供完整

合的视觉, 这是未来需要继续突破的地方。希望以后随着高通量测序、基因编辑技术和小分子筛选技术的突破, 尿源性iPSCs与这些技术相结合, 进一步开发遗传病的治疗干预技术, 为遗传病患者的诊治带来新的希望。

参 考 文 献 :

- [1] QIN X W, WANG Y B, XU S B. Familial arachnoid cysts: a review of 35 families[J]. *Childs Nerv Syst*, 2019, 35(4): 607-612.
- [2] STEICHEN C, SI-TAYEB K, WULKAN F, et al. Human induced pluripotent stem (hiPS) cells from urine samples: a non-integrative and feeder-free reprogramming strategy[J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2017, 92(1): 1-22.
- [3] ZHOU T, BENDA C, DUNZINGER S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(12): 2080-2089.
- [4] TKAHASHI 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.
- [5] JIANG Y F, CHEN M, ZHANG N N, et al. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells generated from urine-derived cells into cardiomyocytes[J]. *Biol Open*, 2018, DOI: 10.1242/bio.029157.
- [6] ZHANG Y Y, MCNEILL E, TIAN H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5): 2226-2233.
- [7] RAHMOUNE H, THOMPSON P W, WARD J M, et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(12): 3427-3434.
- [8] GUAN X, MACK D L, MORENO C M, et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from human urine: new biologic reagents for drug discovery[J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(2): 467-480.
- [9] RAAB S, KLINGENSTEIN M, LIEBAU S. A comparative view on human somatic cell sources for iPSC generation[J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014(6): 367-378.
- [10] SINGH V K, KUMAR N, KALSAN M, et al. Mechanism of Induction: induced pluripotent stem cells (iPSCs) [J]. *J Stem Cells*, 2015, 10(1):43-62.
- [11] HJELM B E, ROSENBERG J B, SZELINGER S, et al. Induction of pluripotent stem cells from autopsy donor-derived somatic cells[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 502(3): 219-224.
- [12] OKITA K, NAKAGAWA M, HYENJONG H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [13] HARIDHASAPAVALAN K K, BORGHAIN M P, DEY C, et al. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells[J]. *Gene*, 2019, 686(18): 146-159.
- [14] BAN H, NISHISHITA N, FUSAKI N, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs)

- by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(34): 14234-14239.
- [15] WARREN L. mRNA-based genetic reprogramming[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 729-734.
- [16] HUANGFU D, MAEHR R, GUO W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795-797.
- [17] ZHU S Y, LI W L, ZHOU H Y, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 651-655.
- [18] CHENG L, LEI Q N, YIN C, et al. Generation of urine cell-derived non-integrative human iPSCs and iNSCs: a step-by-step optimized protocol[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10(18): 348.
- [19] WANG L L, CHEN Y H, GUAN C Y, et al. Using low-risk factors to generate non-integrated human induced pluripotent stem cells from urine-derived cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 245.
- [20] LI D, WANG L L, HOU J D, et al. Optimized approaches for generation of integration-free iPSCs from human urine-derived cells with small molecules and autologous feeder[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(5): 717-728.
- [21] RAO M S. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(10): 3061-3068.
- [22] HU K. All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(12): 1285-1300.
- [23] HOSOYA N, MIURA T, KAWANA-TACHIKAWA A, et al. Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells[J]. *J Med Virol*, 2008, 80(3): 373-382.
- [24] NAKANISHI M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine[J]. *Curr Gene Ther*, 2012, 12(5): 410-416.
- [25] AFZAL M Z. Generation of induced pluripotent stem cells from muscular dystrophy patients: efficient integration-free reprogramming of urine derived cells[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2015, 95(95): 52032.
- [26] LIN Y H, CHEN X M, ZHANG J W, et al. Preclinical study on induction of pluripotent stem cells from urine of dilated cardiomyopathy patients[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(8): 1450-1457.
- [27] SAUER V, TCHAIKOVSKAYA T, WANG X, et al. Human urinary epithelial cells as a source of engraftable hepatocyte-like cells using stem cell technology[J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(12): 2221-2243.
- [28] GAIGNERIE A, LEFORT N, ROUSSELLE M, et al. Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14363.
- [29] JOUNI M, SI-TAYEB K, ES-SALAH-LAMOUREUX Z, et al. Toward personalized medicine: using cardiomyocytes differentiated from urine-Derived Pluripotent stem cells to recapitulate electrophysiological characteristics of type 2 long QT syndrome[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(9): e002159.
- [30] CAO Y Y, XU J, WEN J X, et al. Generation of a urine-derived ips cell line from a patient with a ventricular septal defect and heart failure and the robust differentiation of these cells to cardiomyocytes via small molecules[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(2): 538-551.
- [31] MLEE Y, ZAMPIERI B L, SCOTT-MCKEAN J J, et al. Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from urine-derived cells isolated from individuals with down syndrome[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(6): 1465-1476.
- [32] BHATTACHARYA S, BURRIDGE P W, KROPP E M, et al. High efficiency differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes and characterization by flow cytometry[J]. *J Vis Exp*, 2014, 91(91): 52010.
- [33] MEOLA G. Myotonic dystrophy type 2 and modifier genes: an update on clinical and pathomolecular aspects[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(4): 535-546.
- [34] KIM E Y, BAREFIELD D Y, VO A H, et al. Distinct pathological signatures in human cellular models of myotonic dystrophy subtypes[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(6): 122686.
- [35] PIONER J M, GUAN X, KLAIMAN J M, et al. Absence of full-length dystrophin impairs normal maturation and contraction of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(2): 368-382.
- [36] MERCURI E, FINKEL R, SCOTO M, et al. Development of an academic disease registry for spinal muscular atrophy[J]. *Neuromuscul Disord*, 2019, 29(10): 794-799.
- [37] BOZORG QOMI S, ASGHARI A, SALMANINEJAD A. Spinal muscular atrophy and common therapeutic advances[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2019, 38(3): 226-238.
- [38] ZHOU M J, HU Z Q, QIU L Y, et al. Seamless genetic conversion of SMN2 to SMN1 via CRISPR/Cpf1 and single-stranded oligodeoxynucleotides in spinal muscular atrophy patient-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(11): 1252-1263.
- [39] OVEREEM A W, KLAPPE K, PARISI S, et al. Pluripotent stem cell-derived bile canaliculi-forming hepatocytes to study genetic liver diseases involving hepatocyte polarity[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(2): 344-356.
- [40] DANE K E, STREIFF M B, LINDSLEY J, et al. The development and impact of hemostatic stewardship programs[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2019, 33(5): 887-901.
- [41] PANG J L, WU Y, LI Z, et al. Targeting of the human F8 at the multicopy rDNA locus in Hemophilia a patient-derived iPSCs using TALE Nickases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 144-149.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 袁艳萍,郑志娟,李运伦.人尿源性诱导多能干细胞在遗传病治疗中的应用前景[J].中国现代医学杂志,2022,32(3):38-43.

Cite this article as: YUAN Y P, ZHENG, Z J, LI Y L. Application prospect of human urine-driven induced pluripotent stem cells in treatment of genetic diseases[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(3): 38-43.