

胚胎干细胞的研究进展

陈展睿

(香港理工大学 中国 香港)

摘要 胚胎干细胞是来源于早期胚胎内细胞团的、具有多向分化潜能的细胞,已经广泛用于生命科学的许多领域,它在医学方面的应用成为医学领域的研究热点。本文对胚胎干细胞在诱导分化、基础研究和临床应用上的研究进展进行了综述,对今后的研究方向进行了展望。

关键词 胚胎干细胞;诱导分化;应用

中图分类号 R132.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012) 26-5186-03

Research Progress on Embryonic Stem Cell

CHEN Zhan-rui

(Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

ABSTRACT: Embryonic stem cells (ESC) are cells derived from the inner cell mass of an early stage embryo known as blastocyst, which are pluripotent and able to differentiate into all derivatives of the three primary germ layers named ectoderm, endoderm, and mesoderm. ESC have been widely used in many areas of life science. Its application in medicine field has become a hot spot in medicine research. This article made an overview of the progress on induced differentiation, fundamental researches and clinical application of ESC, and prospects on ESC future research directions.

Key words: Embryonic Stem Cell; Induced Differentiation; Application

Chinese Library Classification(CLC): R132.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 26-5186-03

前言

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺(primordial germ cells, PGC)中分离出来的一类干细胞,具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性,具有广泛的应用前景^[1-2]。无论在体外还是体内环境,ES 细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。ES 细胞可用于治疗各种疾病,修复受损伤的组织和器官。20 世纪末开始,ES 细胞的研究就一直是生物医学领域的热点。美国《科学》杂志评出的上个世纪十大科学突破中,“干细胞研究与应用”名列榜首。ES 细胞的研究还处于起步阶段,目前人们已经能够分离培养干细胞,但诱导 ES 细胞定向分化还面临许多困难。

1 胚胎干细胞的生物学特性

1.1 胚胎干细胞的形态学特征

ES 细胞具有与早期胚胎细胞相似的形态结构,细胞核大,有一个或几个核仁。体外培养的 ES 细胞排列紧密,呈集落状生长,无明显细胞界限。用碱性磷酸酶染色,ES 细胞呈棕红色,而周围的成纤维细胞呈淡黄色。小鼠 ES 细胞的直径为 7 μm~18 μm,猪、牛、羊 ES 细胞的颜色较深,直径为 12 μm~18 μm。

1.2 胚胎干细胞的生物学特性

ES 细胞显著区别于其他细胞:(1) ES 细胞具有全能性,体外培养可诱导分化成机体的任何组织细胞类型。细胞全能性的

标志是细胞表面有胚胎抗原和 Oct4 蛋白^[3];(2) ES 细胞具有无限增殖性,体外培养能在未分化状态下无限增值;(3) ES 细胞具有种系传递功能;(4) ES 细胞易于进行基因改造操作;(5) ES 细胞保留了正常二倍体的性质且核型正常;(6) ES 细胞能参与胚胎各组织器官的生长发育,获得包括生殖系在内的后代;(7) ES 细胞多数处在细胞周期的 S 期,缺少 G1 期检测点;(8) 在雌性哺乳动物的每个体细胞内,2 个 X 染色体中的一个会永久失活,X 失活不发生于未分化的 ES 细胞^[4,5]。

2 胚胎干细胞的建系培养

2.1 胚胎干细胞的建系

ES 细胞建系,首先要获得 ES 细胞。可以从发育良好的囊胚中分离内细胞群细胞;也可以从 5~9 周的胚胎生殖腺中分离 ES 细胞;或者用克隆技术将体细胞核移植到去核卵母细胞中,使之发育成囊胚,再分离其内细胞群细胞。

1981 年,Evans 等^[6]首先建立了小鼠的 ES 细胞系,在此之后近 20 年里,人们相继自早期胚胎建立了仓鼠、猪、兔、水貂、大鼠、鱼类、鸟类、牛、灵长类动物(恒河猴、狨)和人^[4]的类 ES 细胞系。从 PGCs 分离克隆到小鼠 EG 细胞系后,人们分别自 PGCs 分离克隆到人^[6]、山羊、鸡等类 ES 细胞。

2.2 胚胎干细胞的培养

2.2.1 培养基 由于 ES 细胞来源于分裂增殖的早期胚胎细胞,因此需要特殊的培养基。培养 ES 细胞常用改良伊格尔培养基(MEM) α、达氏修正依氏培养基(DMEM)、组织培养基(TCM) 199、F12 等合成培养基。近来,以色列哈德萨医学中心的科学家用悬浮液培育 ES 细胞取得突破,向大规模培育 ES 细胞用于医学治疗的目标前进了一步。

作者简介 陈展睿, E-mail: 17104417630@qq.com

(收稿日期 2012-04-07 接受日期 2012-04-29)

2.2.2 饲养层 饲养层细胞能向培养液中分泌多种细胞因子,在一定程度上影响并调节细胞的生长。如白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)等细胞分化抑制因子,促进其增殖,抑制其分化。成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子等促有丝分裂因子。培养 ES 细胞常用的饲养层有 STO、SNL (G418R 基因和 LIF 基因转染的 STO)、HBC5637、小鼠胚胎成纤维细胞(primary mouse embryonic fibroblast, PMEF)等。鼠胚胎成纤维细胞(MEF)易于取材、抑分化效果好,最为常用^[7]。

3 胚胎干细胞的定向诱导分化

3.1 胚胎干细胞定向分化成神经细胞

2001 年, Vogel 等^[8]研究出了人 ES 细胞定向分化为神经上皮细胞的有效方法。首先将人 ES 细胞培养至拟胚体,换用神经细胞培养基继续培养,分离已分化的细胞,在含碱性成纤维生长因子(bFGF)的培养基中培养,最终获得了 96% 表达神经元标志的细胞。

3.2 胚胎干细胞定向分化成造血干细胞

ES 细胞定向诱导分化为造血干细胞常用分步诱导。ES 细胞首先向造血方向分化,用一组细胞因子在半固体培养基上把 ES 细胞诱导分化成造血前体细胞。再加入造血相关因子,把造血前体细胞诱导分化成血液细胞。2000 年, Faloan 等^[9]体外试验得到了 BL-CFCs 造血细胞及内皮细胞的共同的前体细胞,即造血母细胞。Faloan 的研究表明,bFGF 可定向诱导 ES 细胞成造血干细胞,其介导的信号对造血母细胞的增殖起关键作用;转录因子 GATA-1 是生成正常红细胞所必需的,GATA-1 的缺失使造血母细胞不能正常分化而凋亡。文献报道通过慢病毒方法获得的 iPSCs 虽然具有向三胚层分化的能力,但在分化过程中仍维持较高水平的全能性基因 Oct4、Nanog 的表达^[10]。

3.3 胚胎干细胞定向分化成内皮细胞

我国姚鑫院士等人证明了诱导 ES 细胞产生血管内皮细胞的可行性。他们用一蛋白基因转染小鼠的 ES 细胞,将高效表达该基因的细胞用反式维甲酸诱导后发现,95% 以上的细胞产生大量内皮细胞的前体细胞,以后迁移分化形成血管样结构。

2002 年, Levenberg 等^[11]将人 ES 细胞培养至拟胚体后,用血小板内皮细胞黏附分子-1 (PECAM-1) 筛选,发现 PE-CAM-1 (+) 细胞表达出的内皮细胞标记类型和人脐静脉内皮细胞相似,且能够分化和形成血管样结构。这些细胞注射入小鼠体内可形成微静脉样结构。2007 年, Masakatsu Sone 等^[12]的研究找到了一条人 ES 细胞分化为血管细胞成分,为血管再生奠定了基础。

4 胚胎干细胞的研究应用

4.1 胚胎干细胞的基础研究

2008 年 1 月 11 日,美国细胞高级技术研究所宣布,他们从分裂成 8 细胞分裂球的人受精卵中提取一个细胞,使其与层粘连蛋白结合,成功诱导成了 ES 细胞。2008 年 1 月 17 日,美国加利福尼亚一家生物技术公司宣布,他们用两名男性的皮肤细胞成功克隆出 5 个人体胚胎。这一突破将使制造患者匹配型干细胞成为可能。2008 年 4 月 1 日,英国纽卡斯尔大学宣布,约翰·伯恩教授领导的研究小组将人类皮肤细胞的细胞核植

入几乎剔除了遗传物质的牛卵细胞,成功培育出了人牛混合胚胎,从而探索了帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等疾病的治疗方法。2008 年 5 月 12 日,美国康奈尔大学一个研究小组宣布,他们成功培育出世界上第一个转基因人类胚胎。2008 年的国际干细胞会议上,德国汉斯·舒勒宣布,他领导的研究小组利用实验鼠的睾丸细胞,通过实验室人工培养获得 ES 细胞。这是国际上首次不用遗传细胞的直接介入,而从体细胞中获得 ES 细胞。

2011 年 1 月,美国研究人员实验首次证明,使用人类 ES 细胞研制出的血小板可修复实验鼠的受损组织,人类未来有望源源不断地制造出起作用的血小板,捐血有可能成为历史。

2011 年 6 月,日本研究人员实验证明,用鼠 ES 细胞可人工培育出视网膜的雏形结构视杯,这是迄今人工培育出的最为复杂的生理组织。虽然人工培育的视杯的功能还有待确认,该研究成果已为眼科疾病的研究和治疗开辟了新的方向。日本理化研究所 9 月称已成功诱导小鼠 ES 细胞有选择性地分化成小脑神经细胞,且实现了较高的分化效率。脊髓小脑变性症是小脑神经细胞因逐渐萎缩、死亡而数量减少导致的疾病,这项成果为此类疾病的病理研究和开发新疗法提供了新途径。Martin Leeb 和 Anton Wutz^[13]首次培育出了哺乳动物的单倍体 ES 细胞,这项成果意味着科学家有可能可以准确跟踪某一基因对动物性状的长期作用,这将有力提高基因研究的准确性。Scott Noggle 等^[14]用人类卵细胞培养出了 ES 细胞,这些细胞中存在 3 组染色体,因此还不具备实用性,但已是“黄禹锡造假事件”后最接近培养出正常人类 ES 细胞的成果。

4.2 人类胚胎干细胞的临床应用

人类 ES 细胞的临床应用,既是将人类 ES 细胞进行一定程度的克隆,用于治愈疾患。而治疗性克隆,一直是世界上争议的话题,英国、日本、中国、韩国等支持治疗性克隆,认为这是社会的进步,而美国、德国等一直反对对人类胚胎进行的任何克隆。

2010 年 10 月,美国杰龙生物医药公司培植的 GRNOPC1 人类 ES 细胞已在佐治亚州亚特兰大“牧者中心”医院展开全球首宗人类胚胎干细胞治疗的人体临床试验,以评估 GRNOPC1 人体 ES 细胞用在治疗脊髓损伤方面的安全性与耐受性。2010 年 11 月,美国食品和药物管理局 (FDA) 同意美国先进细胞技术公司可以实施使用闲置的试管婴儿的 ES 细胞治疗遗传性眼病的临床试验。2011 年 7 月,该公司正式进行了首例以人类 ES 细胞医治渐进式失明患者的手术。早期迹象显示,患者在手术过程中适应良好。2011 年 9 月,英国药品监管部门于批准美国马萨诸塞州的先进细胞技术公司开展人类 ES 细胞试验。该公司今后将利用人类 ES 细胞就青少年失明展开临床试验。这是欧洲首次批准人类胚胎干细胞临床试验。

5 展望

由于 ES 细胞在医学应用上存在着免疫排斥以及伦理窘境等壁垒,科学家正在尝试其他途径代替 ES 细胞,试图用细胞重编程的方法让病人的体细胞转化为干细胞,供自身使用。目前此研究主要的几个分支包括:细胞核移植、患者体细胞与供体 ES 细胞的细胞融合、诱导多能干细胞等。综上所述,ES 细胞,

尤其是人类 ES 细胞,在揭示生命、筛选药物、开发新药、移植治疗及研究胚胎发育、疾病发生和遗传性疾病等方面具有极为广阔的前景^[15]。

参考文献(References)

- [1] 张艳艳,李林凤,王颖,等.胚胎干细胞体外诱导分化[J].现代生物医学进展, 2008, 8(9):1169-1171
Zhang Yan-yan, Li Lin-feng, Wang Ying, et al. Research Progress on Induced Differentiation of Embryonic Stem Cells in Vitro[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(9):1169-1171
- [2] Sun Yan. New Milestone in the development of Clinical Oncology-Molecular Targeted Therapy[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(1):1-5
- [3] 周作民. 人胚胎干细胞研究进展[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(5):I-III
Zhou Zuo-min. Progress In Human Embryonic Stem Cells[J]. Reproduction & Contraception, 2004, 24(5): I-III
- [4] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Blastocysts embryonic stem cell lines derived from human [J]. Science, 1998, 282(1145): 1145-1151
- [5] Evans MJ, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(5819):154-160
- [6] Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells [J]. Lancet, 2005, 365(9471): 1636-1641
- [7] 梁晶冰, 雷永红, 付小兵等. 胚胎干细胞滋养层的制备[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(9): 1121-1123
Liang Jing-bing, Lei Yong-hong, Fu Xiao-bing, et al. Preparation of murine embryonic fibroblasts as the feeder-cell of embryonic stem cells[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2006, 23(9): 1121-1123
- [8] Vogel G. Developmental biology: The hottest stem cells are also the toughest [J]. Science, 2001, 292(5516): 429
- [9] Faloony P, Arentson E, Kazarov A, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development [J]. Development, 2000, 127(9): 1931-1940
- [10] 杜丽丽,林戈,卢光琇.人诱导多能干细胞与人胚胎干细胞分化过程中 Oct4/Nanog 基因表达的比较[J].现代生物医学进展, 2011,11(1):1-4
Du Li-li, Lin Ge, Lu Guang-xiu. Comparison of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Oct4/Nanog Gene Expression in Human Embryonic Stem Cell Differentiation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(1): 1-4
- [11] Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 4391-4396
- [12] Masakatsu Sone, Himshi Itoh, Kenichi Yamahara, et al. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 2127-2134
- [13] Martin Leeb, Anton Wutz. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos [J]. Nature, 2011, 479: 131-134
- [14] Scott Noggle, Ho-Lim Fung, Athurva Gore, et al. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state [J]. Nature, 2011, 478(7367): 70-75
- [15] 周宏灏,刘洁. 抗肿瘤药物的基因导向性个体化治疗[J].肿瘤药学, 2011, 1(1):6-11
Zhou Hong-hao, Liu Jie. Gene targeting tailored therapy for the anti-tumor drugs[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(1): 6-11
- [15] Goodman FR, Majewski F, Collins AL, et al. A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly[J]. Am J Hum Genet, 2002, 70: 547-555
- [16] 李红艳. 两个中国人手足裂畸形家系致病位点的定位和分析[D]. 湖南:中南大学, 2009
Li Hong-yan. The identification of the disease gene of two chinese families with split-hand/split-foot malformation[D]. Hu Nan: Central South University, 2009
- [17] Faiyazul Haque M, Uhlhaas S, Knapp M, et al. X-chromosomal split-hand/split-foot anomaly maps to Xq26. (Abstract) [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51:189
- [18] Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, et al. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches[J]. Dev Biol, 1997, 185:165-184
- [19] 胡建新. A1 型短指 / 趾症骨骼发育异常的分子基础研究 [D]. 上海:上海交通大学, 2008
Hu Jian-xin. Understanding the molecular basis of skeletal defects in brachydactyly type A1[D]. Shang Hai:Shanghai Jiao Tong University, 2008
- [20] Bell, J. On brachydactyly and symphalangism. In: Penrose, L.S. Treasury of Human Inheritance. London: Cambridge Univ. Press (pub.) 51951. Pp.1-31
- [21] 李勇. 两个单基因疾病家系致病基因的鉴定[D]. 甘肃:兰州大学, 2010
Li Yong. Identification of the mutations in the two single-gene disease families[D]. Gan Su: Lanzhou University, 2010

(上接第 5185 页)