

文章编号 : 1004-0374(2006)04-0318-05

胚胎干细胞

李凌松^{*}, 王 莉

(北京大学干细胞研究中心 细胞生物学系, 北京 100871)

摘 要: 胚胎干细胞具有自我复制并分化为人体各种功能细胞的潜能。胚胎干细胞具有的独特生物学特性使其被广泛应用于生物学研究的各个领域, 特别是发育学。同时, 它潜在的医学应用也成为世界范围内的研究热点。但是, 由于人胚胎干细胞的来源为植入前的早期胚胎, 人胚胎干细胞自诞生之日起便倍受争议。本文将从胚胎干细胞的来源、特性、鉴定标准、增殖机理、应用前景以及研究本身涉及的伦理学争论给予概述。

关键词: 胚胎干细胞; 自我更新; 分化; 鉴定; 胚胎生殖细胞; 应用

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Embryonic stem cells

LI Ling-Song^{*}, WANG Li

(Department of Cell Biology, Stem Cell Research Center, Peking University, Beijing 100871)

Abstract: Embryonic stem (ES) cells are able to self-renew and differentiate into all kinds of human cells. Due to their unique properties, ES cells are used in diverse fields of biological research, particular in developmental biology. Meanwhile, their potential medical application become a research hot-spot worldwide. Since pre-implantation eggs are sources to generate ES cells, the use of embryonic stem cells is therefore controversial. This review will outline characterization of ES cells, regulation of self-renewal, and the applications of the cell in treating diseases, as well as ethical issues related to human ES cells research.

Key words: embryonic stem cells; self-renewal; differentiation; characterization; embryonic germ cells;

1 什么是胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)

1.1 自我复制和多潜能分化 在胚胎发育的早期, 动物囊胚中存在一群尚未分化的原始细胞, 称为内细胞团, 这些细胞经体外培养就成为 ES 细胞^[1]。与动物各种组织中已经分化的成体细胞(或部分分化的前体细胞)一样, ES 细胞同样可以一分为二地分裂增殖。一般来讲, 干细胞和前体细胞分裂增殖, 它们的子代细胞往往选择性地关闭一些本来在母代细胞表达的基因, 或者开始表达母代细胞没有表达的蛋白分子, 从而表现出和母代细胞不同的特点和特性, 这个现象就是所谓细胞的分化。而 ES 细胞的

分裂增殖有一个非常重要的特点, 就是在一定的条件下, 它们分裂产生的子代细胞和母代细胞不仅表现的性状和功能完全相同, 而且它们的基因表达图谱也完全一致, 这就是 ES 细胞的自我复制。自我复制是 ES 细胞的基本特性之一。正是基于这一特性, 在一定的培养条件下, 胚胎干细胞可以在体外长久和稳定地自我复制, 实现 ES 细胞在体外的“永生”。

胚胎干细胞的另一个基本特性就是分化为动物体内各种组织的功能细胞。这个特性叫做 ES 细胞的多分化潜能, 简单称为 ES 细胞的亚全能性。

收稿日期: 2006-05-25

作者简介: 李凌松(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, * 通讯作者; 王 莉(1974—), 女, 博士, 讲师。

1.2 ES细胞的来源 ES细胞来源于体外授精后发育到囊胚期的内细胞团细胞,此外,还可用体细胞核移植技术制造出具有与供核体细胞基因组完全相同的ES细胞。把已分化体细胞的核注入到一个卵细胞中,重新启动已分化的供体细胞核的原始发育程序,使其发育形成囊胚后,再从中分离ES细胞。这就是常说的治疗性克隆技术,也叫做体细胞核移植技术^[2]。这种用体细胞核移植技术制造的ES细胞与供核的体细胞具有相同的基因组,因此,利用此技术可以建立与宿主遗传背景几乎完全相同的ES细胞。用后者作为移植细胞的来源,就能从根本上克服免疫排斥。目前,已经用体细胞核移植技术克隆了牛、羊、猫、狗和大小鼠等多种哺乳动物^[3-8]。与世界大多数国家一样,我国政府坚决反对克隆人,但积极支持用体细胞核移植技术分离人的ES细胞。世界各国的科学家都在努力,用克隆技术建立灵长类动物,包括人类的ES细胞系,但目前还没有成功。

有其他几种原始的未分化细胞具有和ES细胞部分相似的特性,比如来源于胚胎畸胎瘤组织的胚胎肿瘤细胞(embryonic carcinoma cells, EC细胞)。它们和正常ES细胞一样,都有在体外无限自我复制的能力,在一定条件下也可以分化为来源于不同胚层的多种细胞。但是,这两种细胞根本的不同点,是ES细胞具有稳定传代的正常的染色体构型,而EC细胞的染色体异常,是肿瘤细胞^[9]。另外,来源于早期胎儿生殖嵴部位的胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG细胞)也同样具有多潜能分化的特性,但EG细胞的自我复制和增殖能力很差,目前尚不能在体外长期增殖,而且具有很强的随机分化的倾向^[10]。ES是最典型的胚胎来源干细胞,我们就以ES细胞为例介绍胚胎来源干细胞,并对ES细胞和EG细胞做简单的比较。

1.3 ES细胞的鉴定标准 小鼠ES细胞的体外培养技术始于20世纪80年代。1981年,科学家从鼠的囊胚中分离出内细胞团,成功地建立了体外培养哺乳类ES细胞的方法^[1]。所获得的小鼠ES细胞具有正常的二倍体核型,可以分化成来自三个不同胚层的细胞和生殖细胞。把ES细胞注入到裸鼠可产生畸胎瘤。小鼠ES细胞的培养和操作技术目前在分子生物学研究中已经得到广泛应用,比如基因敲除等多种基因修饰技术都是利用小鼠ES细胞来进行的。而人的ES细胞建系直到20世纪90年代末才得

以成功。1998年,Thomson等^[11]用患者捐献的受精卵在体外发育成囊胚,分离囊胚内细胞团细胞,利用小鼠成纤维细胞作为培养ES细胞的饲养层,建立了人的ES细胞系。这些细胞具有高水平的端粒酶活性,并表达ES细胞所特有的一系列表面标记物,还可以在体外永久传代,并保持正常核型。如果把它们注射到免疫缺陷鼠的体内,可以形成畸胎瘤。这些畸胎瘤包括了所有三个胚层来源的细胞类型,证明了人ES细胞的亚全能分化特性。

ES细胞来源于囊胚的内细胞团。一株合格的ES细胞系能够在体外进行无限制的对称分裂,进行非分化增殖或永久性自我复制,并维持稳定的二倍体的正常核型。作为ES细胞,必须具有亚全能分化的潜能,即可以分化成不同胚层的各种功能细胞。ES细胞还表达Oct-4、Nanog和Sox2等转录因子^[12-14]。一般认为,这些分子只在ES细胞中表达,它们对于维持ES细胞的自我复制和亚全能型具有重要功能。但近来发现,上述某些分子,比如Sox2和Oct4在成体干细胞中也有表达。此外,ES细胞具有较高的端粒酶活性并表达碱性磷酸酶(ALP)等。

除了分子表型特征,ES细胞鉴定的另一重要方面是证实其亚全能分化潜能。目前确定ES细胞亚全能分化潜能的方法大概有三种。

第一种方法,是形成“嵌合体”胚胎,把这种胚胎移植到雌性假孕鼠的子宫内。如果受试细胞是亚全能的ES细胞,就能和受体的囊胚共同发育成子代动物个体,这样的子代动物叫作嵌合体动物。嵌合体动物是指子代动物的各种组织和器官中都包含了来源于两种不同基因背景细胞,而这样的组织也称作嵌合组织。

第二种方法,是将ES细胞注入到同种或免疫缺陷性小鼠的皮下、睾丸或肾包囊,观察注入的细胞在宿主动物体内是否形成畸胎瘤。显微镜下观察时,形成的畸胎瘤具有从胚胎三个不同胚层来源的各种细胞类型。典型的畸胎瘤含有多种组织细胞核类似的组织结构,如上皮组织、肌肉组织、神经组织、骨和软骨等。

第三种方法,是把受试细胞在体外进行随机自发的分化或诱导它们向不同胚层的细胞分化。一般的方法是去除饲养层细胞后,ES细胞聚集并形成类胚体。如果受试细胞具有亚全能分化的特性,许多情况下,可以观察到它们在培养皿中形成的类胚体类似于畸胎瘤。类胚体是由从胚胎的三个胚层——

内胚层、中胚层和外胚层中分化以及部分分化的细胞无序排列所形成的结构。如果在类胚体的培养液中加入特定的分化诱导因子,就可以定向诱导ES细胞向特定方向分化。

对于以上三种鉴定方法,不同来源干细胞,其表现并不完全一致。

1.4 ES细胞和EG细胞的性状比较 1998年,美国威斯康辛大学的Thomson等^[11]建立了人类ES细胞系。不久,Shamblott等^[10]从流产胎儿的生殖嵴部位分离培养得到EG细胞。EG细胞和ES细胞在许多方面是类似的。比如,它们都表达ES细胞的系列标志。在一定条件下,它们都能自然分化为三个胚层来源的各种细胞。

然而,EG细胞和ES细胞不仅组织来源不同,它们在体外的增殖特性和体内的行为也不尽相同。例如,人的ES细胞在体外可以无限制生长而保持非分化状态,而人的EG细胞目前只能在培养10至20代。另外,如果注射到免疫缺陷鼠的体内,人的EG细胞不能像ES细胞那样产生畸胎瘤。目前为止,世界范围内,已有多个实验室建立了人的ES细胞系,但人的EG细胞的建系尚未成功。这表明,对于EG细胞还缺乏深入的认识。

2 ES细胞自我复制和多潜能分化的调控

为什么ES细胞可以在体外无限制地非分化增殖,而成熟的体细胞却不能呢?这是一个非常复杂,还没有确定答案的问题,也是当今干细胞研究的重要问题之一。

比较ES细胞和体细胞的差异表达基因,发现ES细胞表达一种蛋白质叫做端粒酶,而体细胞端粒酶的表达量非常低。因为端粒酶决定细胞内染色体末梢端粒的长度,后者在细胞增殖分裂时对染色体的稳定性有重要作用。大多数增殖旺盛的细胞,比如肿瘤细胞的端粒酶活性都比较高,因此,端粒酶的活性对ES细胞的自我复制起到非常重要的作用,但并非唯一的因素^[11]。

ES细胞还表达一些干细胞特异的转录因子,比如Oct4和Nanog等。敲除这两个转录因子,就无法得到ES细胞。因此,这些因子对ES细胞的自我复制和多潜能分化具有重要的调控作用,另外,某些生长因子对ES细胞具有重要的调控作用。比如碱性成纤维生长因子bFGF和白血病抑制因子LIF等。体外培养人类ES细胞,培养基中必须添加bFGF,而培养鼠源ES细胞,LIF则是必需的^[15-16]。

此外,TGF β 家族的BMP信号和FGF和LIF协同作用,共同调控ES细胞的行为^[17-18]。可见,ES细胞自我复制和多潜能分化的调控受到多种通路传导信号的调控,从而使细胞处于抑制分化,避免凋亡和促进增殖的相对稳定状态。除了以上谈到的促进因子,ES细胞的自我复制和多潜能分化可能还受到抑制性调控。一种叫做PTEN的磷酸化酶,通过对PI-3K蛋白激酶的抑制,可能参与抑制ES细胞自我复制的调控^[19]。

系统比较ES细胞和胚胎生殖嵴来源的EG细胞的生理特性和基因表达的差异,对于认识ES细胞的自我复制和亚全能分化的调控很有意义。ES细胞和EG细胞都具有多潜能分化的能力,但ES细胞自我复制旺盛,而EG细胞增殖能力差,容易发生细胞的随机分化。通过比较两种细胞的基因表达差异发现,某些在ES细胞中表达的蛋白在EG细胞中几乎不表达,比如转录因子Nanog以及FGF生长因子的受体等;而某些甲基化分子,比如MBD2却只在EG细胞中表达。弄清这些差异表达蛋白在两种细胞中的差异和作用,将为研究ES细胞自我复制和多潜能分化调控提供新的思路。

3 ES细胞的应用

3.1 ES细胞的应用前景 ES细胞由于其独特的生物学特性,具有多种应用潜能。

ES细胞是发育生物学研究的重要工具。ES细胞技术与基因靶技术的结合,有助于研究特定基因在发育过程中的作用;采用基因芯片等技术,比较ES细胞以及不同发育阶段的干细胞和分化细胞的基因转录和表达,有助于了解胚胎发育及细胞分化的分子机制,发现新的人类基因;ES细胞的体外可操作性,有利于对胚胎发育及组织生长调节事件的研究。

ES细胞还可以用于药物或化学产品的效能和毒性检测。按照国际惯例,大量的怀孕动物被用于药物或者化学产品致畸性的评估。由于ES细胞的体外分化体系可以模拟胚胎发育过程中细胞与组织间复杂的相互作用,因此,它可能成为毒理学研究的有效工具,减少试验动物的使用数量。

ES细胞还是基因治疗的理想靶细胞。目前基因治疗的问题在于:它虽然可以通过引入外源正常基因来纠正突变基因的功能,但是对于导入基因的整合、表达无法精确控制;更大的问题在于经过基因整合位点的随机性可能引起细胞癌变。而人的ES

细胞即使经过遗传操作仍能稳定地进行自我复制,同时可以在体外筛选表型正常的细胞作为导入外源基因的载体,这样,治疗基因通过它带入体内,既能避免由于外源基因整合带来的癌变危险,又能够持久发挥作用。这为克服目前基因治疗的主要障碍开辟了新途径。

ES细胞最深远的潜在用途在于它可能成为细胞替代治疗和器官移植的新来源。ES细胞的生物学特性解决了替代治疗的两大难题:(1)ES细胞无限的复制能力可以为替代治疗提供充足的移植来源;(2)ES细胞的亚全能分化能力使之可以分化为多种功能细胞,从而用于治疗包括退行性病变、遗传疾病和肿瘤在内的任何丧失了正常细胞功能的疾病。帕金森氏病是由于大脑黑质内的细胞产生多巴胺的功能退化/丧失造成的。如果将ES细胞经体外分化、纯化获得能够产生的多巴胺神经细胞,将这些细胞注入病变部位,就能够治疗帕金森氏病。这种治疗方法就是细胞替代治疗。随着组织工程和材料技术的不断突破,干细胞技术与两者有机结合,就可能在体外培养出多细胞类型的组织,甚至三维的器官,最终用于移植治疗。某些I型糖尿病患者,其胰岛内的所有功能细胞,包括生成胰岛素的 β 细胞,功能都遭到破坏。如果ES细胞能够在体外有效地分化为形成胰岛所有的细胞型,再将通过组织工程技术,使这些细胞生长形成的胰岛移植到患者体内,有可能从根本上治疗这种疾病。这种治疗方法就是组织/器官移植治疗。

3.2 ES细胞临床应用所面临的技术性问题 目前关于ES细胞用于移植治疗的研究还停留在细胞替代阶段,体外组织、器官培养的技术尚不成熟。即使是将ES细胞应用于临床的细胞替代治疗,也还需要解决如下问题:(1)研究ES细胞的体外复制机理,在确保足够细胞数目的同时防止其致瘤性;(2)摸索ES细胞的分化条件,提高定向分化效率;(3)克服ES细胞衍生物移植导致的免疫排斥。

在人们寄希望于将ES细胞应用于成体组织的治疗性修复的时候,科学家面临的挑战之一就是ES细胞的成瘤性。当ES细胞被注入成年裸鼠体内时,会形成畸胎瘤。迄今为止,我们还不知道形成肿瘤所需要的ES细胞的最小数量以及最短时间。因此,在将ES细胞用于治疗之前,研究人员必须确保它们已经全分化,或者把未分化的细胞去除,使移植的细胞不会扩散或形成有害组织;另外一个问题

是由异体ES细胞得到的分化细胞用于移植而引起免疫排斥。

目前克服组织配型不同的方法有如下几种:(1)通过对ES细胞的基因修饰来消除分化细胞与受体组织间的不相容性。然而,由于基因修饰可能对细胞功能造成影响,这种方法可能不适于ES细胞的临床应用。(2)建立大型的ES细胞库,用于配型筛选。(3)来自患者的细胞与ES细胞共培养。如果将患者的体细胞与ES细胞共培养,这些细胞能够在ES细胞的影响下获得多能分化性,就可能成为无排斥反应移植物的来源之一,但由于细胞融合问题的发现,使这一方法的安全性遭到置疑。(4)由孤雌生殖获得的胚胎建立ES细胞系。孤雌生殖(parthenogenesis)是一种无性生殖,指的是卵母细胞不经过受精而发育成胚胎。用孤雌生殖方法获得的灵长类动物的ES细胞系已经显示了多方向的分化能力。这些研究结果提示,对于育龄期的女性患者,用其自身的卵母细胞获得孤雌生殖胚胎,再分离得到ES细胞用于定向分化,也是获得无免疫排斥反应移植物的方法之一。(5)治疗性体细胞核移植。ES细胞与核移植技术的有机结合,使得ES细胞用于细胞替代治疗不再受到性别、遗传缺陷等因素的限制,“治疗性核移植”的概念一时风靡学术界。治疗性核移植是将患者体细胞核移入去核的卵母细胞中形成重构胚,得到核移植ES细胞后,再定向分化获得移植需要的细胞。由于核移植ES细胞带有与患者体细胞同样的遗传物质,因此不会发生排异反应。

3.3 ES细胞的临床应用所面临的伦理学问题 尽管具有“发育全能性”的胚胎干细胞极具应用潜力,但是由于这项技术涉及早期未着床胚胎的使用,因此,有关此研究道德伦理问题的争论一直没有停止。所涉及到的问题主要有以下几方面:(1)用于分离ES细胞的早期胚胎也是“人”么?反对者认为,即使是只有100多个细胞的早期胚胎也是人,应该得到尊重,并享受人应享受的生命的权利,为了所需要的细胞而制造有生命的胚胎,“收获”那些细胞之后又毁掉或者丢弃这些胚胎,这就等同于杀人;而支持者认为,这些内细胞团细胞并不是受精卵,没有胚外组织,因而不能发育成胚胎,因此,它不是“人”。将小鼠ES细胞移植到子宫中,也决不可能发育成小鼠。科学家和支持者认为,这是迈向新医学的关键一步,解除患者的病痛,挽救他们宝贵的生命才是对人类生命价值的最高尊重。(2)治

疗性克隆还是生殖性克隆？目前，国际上一般把对人类自身的克隆分为“生殖性克隆”(reproductive cloning)和“治疗性克隆”(therapeutic cloning)。前者是指对整个人的复制；后者通常指出于治疗目的而克隆人的胚胎。这个问题归根结底，又回到了第一个问题，就是即便是用于治疗目的，那么用于分离胚胎干细胞的早期胚胎也是人吗？(3)嵌合体的问题。本文对“嵌合体”的定义是拥有两种起源于不同受精卵的、遗传学不同的细胞群的动物。由于治疗性核移植的应用受到人卵母细胞数量的限制，有研究人员尝试应用异种哺乳动物的卵母细胞作为载体，获取核移植 ES 细胞。目前已经由人兔重构胚建立了 ES 细胞系^[20]。这种做法也受到了伦理学的强烈挑战。从而引发出一系列的问题，其中包括本体论问题：什么是人-动物嵌合体的本性？是人还是动物？人-动物嵌合体是否有可能同时是两个不同物种的成员？道德或伦理问题：应如何对待人-动物嵌合体？如果我们相信这种存在是两个不同物种的成员我们应赋予它什么道德地位^[21]？(4)此外，对 ES 细胞的人工操作，如基因操作、核移植等被认为“非自然”，“违反上帝意志”的。

在胚胎干细胞的问题上，各国政府本着严肃谨慎的态度，严禁把克隆技术用于人类，严禁克隆人。中国政府再明确地宣布了“四不”政策：不赞成、不允许、不支持、不接受生殖性克隆人的同时，也宣布允许治疗性克隆研究，表明将在政策上和经费上对治疗性克隆给予支持并且正在制定相关的管理法规。优秀的科研人员、宽松的社会环境和政府的支持将成为中国在胚胎干细胞生物技术领域和其他国家平等竞争的重要优势。

[参 考 文 献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292** (5819): 154~156
- [2] Lanza R P, Cibelli J B, West M D. Human therapeutic cloning. *Nat Med*, 1999, **5**(9): 975~977
- [3] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(3): 990~995
- [4] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380** (6869): 64~66
- [5] Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **415**(6874): 859
- [6] Lee B C, Kim M K, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, **436**(7051): 641
- [7] Zhou Q, Renard J P, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, **302**(5648): 1179
- [8] Wakayama T. Cloned mice and embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Oncol Res*, 2003, **13**(6-10): 309~314
- [9] Lovell-Badge R H, Evans M J. Changes in protein synthesis during differentiation of embryonal carcinoma cells, and a comparison with embryo cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1980, **59**: 187~206
- [10] Shambloott M J, Axelman J, Wang S P, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(23): 13726~13731
- [11] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**(5391): 1145~1147
- [12] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, **95**(3): 379~391
- [13] Cavaleri F, Scholer H R. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*, 2003, **113**(5): 551~552
- [14] Zappone M V, Galli R, Catena R, et al. Sox2 regulatory sequences direct expression of a b-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*, 2000, **127**(11): 2367~2382
- [15] Dvorak P, Hampl A, Jirmanova L, et al. Embryoglycan ectodomains regulate biological activity of FGF-2 to embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 1998, **111**(Pt 19): 2945~2952
- [16] Smith AG, Heath J K, Donaldson D D, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988, **336**(6200): 688~690
- [17] James D, Levine A J, Besser D, et al. TGFβ/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 2005, **132**(6): 1273~1282
- [18] Chadwick K, Wang L S, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 2003, **102**(3): 906~915
- [19] Penninger J M, Woodgett J. Stem cells. PTEN—coupling tumor suppression to stem cells? *Science*, 2001, **294**(5549): 2116~2118
- [20] Stice S L, Strelchenko N S, Keefer C L, et al. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*, 1996, **54**(1): 100~110
- [21] <http://219.224.16.80/news/20060322p2.htm>