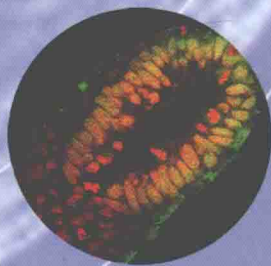
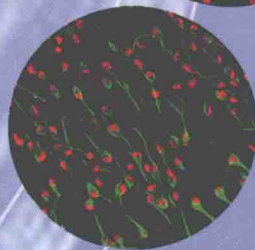
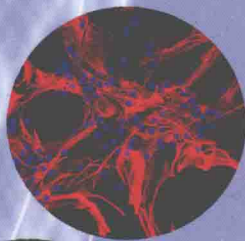
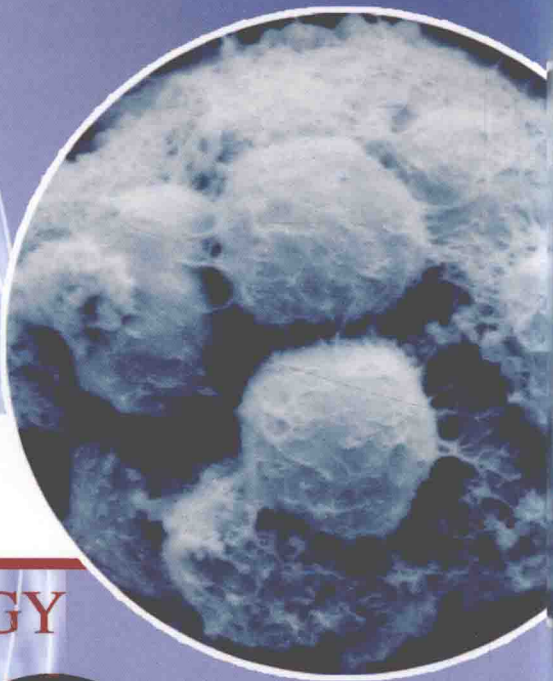


生物学  
实验指南丛书

■ 周琪 主编  
■ 郝捷 王柳 副主编

# 干细胞实验指南

HANDBOOK: STEM CELL BIOLOGY



生物学实验指南丛书

# 干细胞实验指南

周琪 主编

郝捷 王柳 副主编

Q24  
32

中央广播电视大学出版社·北京

## 图书在版编目(CIP)数据

干细胞实验指南 / 周琪主编. — 北京: 中央广播电视大学出版社, 2015. 7

ISBN 978 - 7 - 304 - 07186 - 8

I. ①干… II. ①周… III. ①干细胞—实验—指南  
IV. ①Q24 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 130138 号

版权所有, 翻印必究。

生物学实验指南丛书

干细胞实验指南

GANXIBAO SHIYAN ZHINAN

周琪主编

郝捷 王柳 副主编

---

出版·发行: 中央广播电视大学出版社

电话: 营销中心 010 - 66490011 总编室 010 - 68182524

网址: <http://www.crtvup.com.cn>

地址: 北京市海淀区西四环中路 45 号 邮编: 100039

经销: 新华书店北京发行所

---

策划编辑: 周朋

版式设计: 王容

责任编辑: 秦莹

责任校对: 宋亦芳

责任印制: 赵连生

---

印刷: 北京市大天乐投资管理有限公司 印数: 1-5000

版本: 2015 年 7 月第 1 版

2015 年 7 月第 1 次印刷

开本: 210mm × 285mm

印张: 10.75 字数: 354 千字

---

书号: ISBN 978 - 7 - 304 - 07186 - 8

定价: 60.00 元

---

(如有缺页或倒装, 本社负责退换)

# 编委会

主 编：周 琪

副主编：郝 捷 王 柳

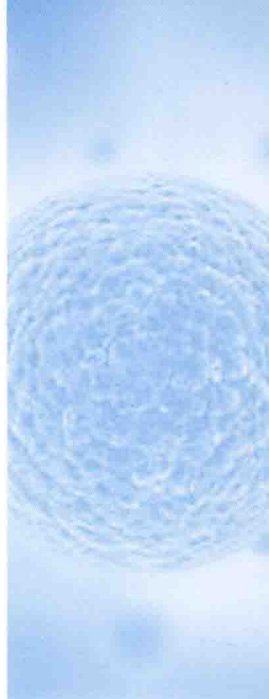
编 委：（按姓氏汉语拼音排序）

白冬琿 董明珠 冯春敬 顾 奇 郭 跃 郝 捷

李 伟 李治琨 刘 蕾 陆阳杰 桑励思 王 娟

王 磊 王立宾 王 柳 王昱凯 夏宝龙 袁 艳

赵小阳 周 琪 朱宛宛



## 序

干细胞研究是当前生命科学研究中最前沿、最热点的领域之一。

很少有研究能像干细胞研究这样，除了受到广大科研人员和医务工作者的关注之外，还受到普通大众的广泛关注。大家的关注，更多的是一种期望，期望这种神奇的细胞，能够使许多饱受疾病折磨而用目前的医疗手段又无法治愈的病人恢复健康。干细胞的神奇之处在于它在维持自我更新（Self-renewal, SR）、无限增殖的同时，能够保持分化形成特定功能细胞的潜能。这一特性使干细胞成为再生医学中进行替代性治疗所需的最佳细胞来源，同时也使干细胞成为研究细胞分化、组织形成和个体发育的极好的体外模型。当前的干细胞研究已是发育生物学、遗传学、细胞生物学、生物信息学等许多学科的交叉点，是细胞命运决定、基因调控网络构建等许多重要基础科学问题的研究平台。我们相信，干细胞研究的推进，将会给生命科学研究带来一系列里程碑式的成果，也会为医疗体系带来革命性的变化。基于此，世界各国都大力支持开展干细胞研究，并将干细胞研究列为基础研究和临床研究的重中之重。夺取干细胞研究的“制高点”，将会提高国民的健康水平，同时也将推动国家生物和医药产业的蓬勃发展。

我们也欣喜地看到我国的干细胞事业在飞速地发展。在过去短短的十多年中，我国从事干细胞研究的实验室已从不到 20 个发展到几百个，研究领域覆盖了基础研究、临床研究和产业化相关的研究，同时更取得了一些达到国际领先水平的研究成果。但是，我国的整体研究



水平与国际最高水平之间还有很大的差距。当前干细胞研究正处于从基础研究向临床转化和向产业化发展的关键阶段，逆水行舟，不进则退，我们必须继续以开放的姿态欢迎更多的研究人员进入这一领域，齐心协力、脚踏实地地做好每一件事，保证干细胞研究与临床应用的顺利开展。基于此，我们组织了众多工作在一线的科研工作者编写了这本《干细胞实验指南》，从实验操作的角度，具体、细致地整理了干细胞研究中广泛使用的实验技术。“工欲善其事，必先利其器。”我们希望这本书能为工作在一线的干细胞研究人员，尤其是刚刚进入这一领域的众多工作人员和青年科技工作者提供便利，帮助他们更好地掌握干细胞相关实验技术，更好地开展干细胞研究工作。

祝愿我国的干细胞事业蓬勃发展！

周琪

2015年5月31日



## 使用说明

本书是进行干细胞研究的实验技术类书籍。干细胞研究日新月异，推出一本既能体现目前干细胞技术的领先水平，又对科研人员的具体实验操作有实际指导作用的图书是我们的初衷。

- 对于实验室新人来说，本书力求使他们能够迅速地了解干细胞实验所涉及的领域，省时省力地学会做实验。
- 对于已有实验室工作经验的人来说，本书力图扩展他们的视野。
- 对于导师来说，本书可部分替代他们对学生基本知识和实验技能的传授。
- 对于生物仪器、试剂公司的业务人员来说，本书可以使他们了解干细胞实验的基本需求，在推广产品时可以更有针对性，表现出个人和公司的专业素养。

### 哪些内容省略了

- 在每个实验的“1. 试剂”中有下划线的试剂配方在正文中省略，请查附录二。
- 在每个实验的“2. 器材”中省略了本书第九章所列出的一个干细胞实验室所必需的仪器。

- 如没有特殊标注，本书中所有细胞培养条件均指 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养条件。
- 如没有特殊标注，本书中所有培养液在使用前均在 37℃ 水浴锅中预热。

## 生物学实验方法专业平台 Everlab-Protocol

本书与生物学实验方法专业平台 Everlab-Protocol 合作，为读者提供了一个扩展阅读和讨论的平台。

- Everlab-Protocol 提供本书中所有实验方法的讨论平台，读者可以互相交流实验心得和技巧。
- 读者可通过每个方法后所附的 DOI 号和二维码，快速定位到相应方法的电子版内容。
- 上述资料会不定期在 Everlab-Protocol 平台更新。

## 其 他

- 所有动物实验的操作都应该符合国际动物保护的条例以及当地动物保护的法律法规。
- 所有细胞培养实验所使用的器材（仪器除外）都是无菌的。
- 所有实验所用到的人的材料均需签署知情同意书并得到伦理委员会的批准。





# 目 录

## 第一章

### 干细胞概述

- 一、干细胞的定义与特性 / 1
- 二、干细胞的分类 / 1
- 三、干细胞的研究历史及热点 / 2

参考文献 / 5

## 第二章

### 干细胞培养技术概述

#### 第一节 概述 / 7

- 一、细胞培养的优势 / 7
- 二、细胞培养的限制 / 7
- 三、细胞培养的应用 / 8
- 四、细胞培养的基本条件 / 8
- 五、细胞培养的无菌原则 / 9
- 六、细胞实验的注意事项 / 10
- 七、细胞培养液的成分及配制 / 11

#### 第二节 干细胞常用培养方法 / 13

- 一、细胞培养方式 / 13
- 二、原代取材 / 14
- 三、传代培养 / 16

#### 第三节 干细胞的冻存与复苏 / 17

- 一、细胞的冻存 / 17
- 二、细胞复苏的过程 / 19

#### 第四节 细胞污染的检测与鉴定 / 19

- 一、细胞污染 / 19
- 二、细胞污染的预防 / 22

#### 第五节 干细胞鉴定方法 / 23

- 一、细胞形态观察 / 23
- 二、核型分析 / 24
- 三、免疫组织化学 / 荧光染色 / 25
- 四、分子水平分析 / 27
- 五、流式细胞分析 / 31
- 六、细胞亚群分析 / 32
- 七、绘制细胞增殖曲线 / 33
- 八、细胞凋亡检测 / 34

## 第六节 细胞的保存与运输 / 35

- 一、细胞保存原则 / 36
- 二、细胞运输原则 / 36

### 参考文献 / 36



## 第三章 胚胎干细胞

### 第一节 概述 / 37

### 第二节 小鼠胚胎干细胞 / 38

- 一、小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养及饲养层细胞的制备 / 38
- 二、小鼠胚胎干细胞建系 / 40
- 三、小鼠胚胎干细胞传代、冻存及复苏 / 42
- 四、小鼠胚胎干细胞的鉴定 / 44

### 第三节 人胚胎干细胞 / 50

- 一、人胚胎干细胞的分离及建系 / 50
- 二、人胚胎干细胞传代、冻存及复苏 / 52
- 三、人胚胎干细胞的鉴定 / 53

### 第四节 非人灵长类胚胎干细胞分离及建系方法 / 54

- 一、引言 / 54
- 二、饲养层细胞的制备 / 55
- 三、猴胚胎干细胞的分离及建系 / 55
- 四、猴胚胎干细胞传代、冻存及复苏 / 57
- 五、猴胚胎干细胞的鉴定 / 59

### 参考文献 / 59



## 第四章 诱导性多能干细胞

### 第一节 概述 / 60

## 第二节 小鼠诱导性多能干细胞 / 61

- 一、小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养及饲养层的制备 / 61
- 二、反转录病毒的制备及感染 / 61
- 三、小鼠诱导性多能干细胞诱导及建系 / 63
- 四、小鼠诱导性多能干细胞的传代、冻存和复苏 / 64
- 五、小鼠诱导性多能干细胞的鉴定 / 65

## 第三节 人诱导性多能干细胞系 / 65

- 一、引言 / 65
- 二、反转录病毒制备 / 65
- 三、供体细胞的取材 / 66
- 四、人诱导性多能干细胞诱导 / 67
- 五、人诱导性多能干细胞传代、冻存及复苏 / 69
- 六、人诱导性多能干细胞的鉴定 / 69

### 参考文献 / 70



## 第五章 神经干细胞

### 第一节 概述 / 71

- 一、神经干细胞的来源和特性 / 71
- 二、神经干细胞的应用 / 72

### 第二节 神经干细胞的分离、纯化及建系培养 / 72

- 一、分离室管膜下区 / 72
- 二、神经干细胞的分离和纯化 / 74
- 三、流式染色 / 75
- 四、流式分析及收集 / 75
- 五、神经干细胞建系培养 / 76

### 第三节 小鼠胚胎干细胞向神经干细胞的定向诱导分化及神经干细胞的定向分化 / 76

- 一、小鼠胚胎干细胞向神经干细胞的定向诱导分化 / 76

二、小鼠神经干细胞的定向分化 / 78

第四节 人胚胎干细胞分化成神经前体细胞  
和多巴胺能神经元 / 79

第五节 神经元的电生理检测过程 / 83

第六节 小鼠成纤维细胞向神经干细胞的定  
向转分化 / 84

参考文献 / 85

## 第六章 造血干细胞

第一节 造血干细胞的概述 / 87

第二节 造血干细胞分离和扩增 / 88

一、引言 / 88

二、重要概念与基本方法 / 89

三、单个核细胞的分离 / 89

四、CD34<sup>+</sup> 细胞分选 / 90

五、CD34<sup>+</sup> 细胞的扩增 / 91

六、造血干细胞冻存和复苏 / 92

第三节 造血干细胞的鉴定 / 92

一、流式细胞仪检测 CD34<sup>+</sup> 细胞比率 / 93

二、集落形成单位鉴定 / 94

三、长期培养检测法 (LTC-IC) / 95

参考文献 / 96

## 第七章 间充质干细胞

第一节 概述 / 98

一、引言 / 98

二、间充质干细胞的来源和鉴定 / 98

三、间充质干细胞的特性 / 99

四、间充质干细胞的研究进展和临床应用  
/ 100

第二节 骨髓间充质干细胞 / 100

一、骨髓间充质干细胞的原代取材 / 100

二、骨髓间充质干细胞的传代、冻存和复  
苏 / 102

第三节 人脐带间充质干细胞 / 103

一、脐带间充质干细胞的原代取材 / 104

二、脐带间充质干细胞的传代、冻存和复  
苏 / 105

第四节 脂肪间充质干细胞 / 105

一、脂肪间充质干细胞的原代取材 / 105

二、脂肪间充质干细胞的传代、冻存和复  
苏 / 106

第五节 间充质干细胞的鉴定 / 106

一、形态观察 / 106

二、CD 分子的检测 / 107

三、体外分化及鉴定 / 108

参考文献 / 112

## 第八章 精原干细胞

第一节 概述 / 114

第二节 小鼠精原干细胞分离培养 / 114

第三节 小鼠精原干细胞的鉴定与移植 / 116

一、小鼠精原干细胞免疫荧光鉴定 / 117

二、小鼠精原干细胞移植 / 117

参考文献 / 120



## 第九章 干细胞实验室的建设

- 一、基础设施建设 / 121
- 二、细胞培养的洁净间 / 121
- 三、仪器设备 / 123
- 四、《药品生产质量管理规范》 / 127

参考文献 / 127



## 附录

附录一 缩略语 / 128

附录二 溶液的配制 / 130

- 一、细胞培养相关溶液的配制 / 130

二、动物实验相关溶液的配制 / 138

三、胚胎操作相关溶液的配制 / 138

四、免疫组织化学染色和流式分选相关溶液的配制 / 140

五、分子生物学实验相关溶液的配制 / 142

六、分离神经干细胞的相关溶液的配制 / 143

附录三 引物 / 145

附录四 试剂 / 147

附录五 耗材 / 153

附录六 仪器 / 155



## 索引



# 第一章 干细胞概述

自 20 世纪开始, 生命科学成为发展最迅猛的学科之一。其中, 干细胞因其具有自我更新能力和多向分化潜能, 已成为生命科学研究中最引人瞩目的研究领域, 干细胞具有重大的科学研究和临床应用价值。干细胞相关理论的日臻完善和干细胞技术的迅猛发展势必在发育生物学、细胞生物学以及生物医药等领域引起划时代的变革。治疗性克隆和诱导性多能干细胞 (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) 的问世更是将干细胞的研究推向自然科学研究领域的巅峰, 2012 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了在体细胞核移植和诱导性多能干细胞方面做出杰出贡献的英国科学家 Gurdon 和日本科学家 Yamanaka, 再一次彰显了这一研究领域的重要性。

## 一、干细胞的定义与特性

干细胞是一类能够自我复制、自我更新, 具有多向分化潜能, 能分化形成多种细胞类型的细胞。干细胞应具有以下两个特征 (Lanza, 2006):

### 1. 自我更新

干细胞通过自我更新维持干细胞的特性。干细胞通过两种方式生长: 一种是对称分裂, 形成两个相同的干细胞。另一种是非对称分裂, 主要是由于细胞质中的调节分化蛋白不均匀分配, 使得一个子细胞不可逆地走向分化的终端而成为功能专一的分化细胞, 另一个子细胞仍维持干细胞特征。

### 2. 多向分化潜能

干细胞能够进行谱系定向分化 (Lineage Commitment Differentiation, LCD), 产生祖细胞、前体细胞和终末分化细胞。

## 二、干细胞的分类

### 1. 根据干细胞的发育阶段和细胞来源分类

根据干细胞的发育阶段和细胞来源, 可以将干细胞分为胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cells, ESCs) 和成体干细胞 (Adult Stem Cells, ASCs) 两类。

(1) 胚胎干细胞。胚胎干细胞来源于囊胚内细胞团 (Inner Cell Mass, ICM)<sup>①</sup>, 是一类高度未分化的原始细胞, 在一定的诱导条件下可以分化成内、中、外三个胚层的各种体细胞和生殖细胞。

(2) 成体干细胞。成体干细胞存在于成年动物的多种组织和器官中, 在特定的条件下可以按一定的程序分化形成功能细胞, 从而使组织和器官保持生长和衰退的动态平衡。

### 2. 根据干细胞的发育潜能分类

根据干细胞的发育潜能, 可以将干细胞分为全能干细胞 (Totipotent Stem Cells, TSCs)、多能干细胞 (Pluripotent Stem Cells, PSCs)、亚多能干细胞 (Multipotent Stem Cells, MuSCs) 和单能干细胞 (Unipotent Stem Cells, USCs) 4 类。

<sup>①</sup>受精卵发育为胚胎的过程中, 随着细胞的分裂增殖依次经历卵裂期→桑椹胚期→囊胚期→原肠胚期。细胞的分化则是从囊胚期开始的, 在囊胚期, 一部分个体较大的细胞聚集在胚胎 (球形) 一端, 称为内细胞团, 将来发育为胎儿的各种组织器官。

(1) 全能干细胞。全能干细胞可以分化为机体内的任何一种细胞，直至形成一个复杂的有机体。目前只有受精卵和分裂前期的卵裂球里的细胞才属于真正的全能干细胞。

(2) 多能干细胞。多能干细胞可以分化为动物体内多种类型的细胞，但不能发育成一个完整的个体。通常来讲，胚胎干细胞和诱导性多能干细胞可以分化为三胚层各种类型的细胞和生殖系细胞，被称为多能或亚全能干细胞。

(3) 亚多能干细胞。亚多能干细胞能分化成特定组织或器官的特定族群的细胞。大多数的成体干细胞，如间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)、胰岛干细胞、造血干细胞 (Hepatopoietic Stem Cells, HSCs) 等被普遍认为只能向特定胚层的细胞分化，称为亚多能干细胞。随着干细胞研究的不断深入，一些成体干细胞的分化潜能被不断挖掘，也许对亚多能干细胞的定义还需不断修正。

(4) 单能干细胞。单能干细胞仅能分化为单一类型的细胞，而且自我更新的能力有限，如肌肉中的成肌细胞。

### 三、干细胞的研究历史及热点

在过去的 50 年中，干细胞生物学经历了飞速发展的阶段。一般认为，“干细胞”一词最早出现于 1869 年 Wilson 所著的《发育和遗传中的细胞》(The Cell in Development and Inheritance)，后由血液学专家 Maximow 在 1909 年再次提出。这个概念源于许多发育生物学家中的一个设想：机体内一些看似差异很大的细胞在发育过程中可能来源于一个共同的细胞，这种细胞在机体内存在并对机体的自我更新起重要作用。20 世纪 60 年代，加拿大科学家 McCulloch 和 Till 首先发现并命名了造血干细胞，这一壮举揭开了干细胞研究的序幕。1963 年，他们通过骨髓移植和细胞分析证实骨髓中存在一类能够自我更新和分化的细胞，并利用经典的单细胞克隆形成<sup>①</sup>实验首次证实了干细胞的存在 (Siminovitch et al., 1963)，这一研究为骨髓移植治疗白血病奠定了基础。同时期，科研人员通过对几个近亲种系的小鼠睾丸畸胎瘤的研究发现它们来源于胚胎生殖细胞 (Embryonic Germ Cells, EGCs)，同时此工作也成功地建立了胚胎癌细胞 (Embryonic Carcinoma Cells, ECCs) (Stevens, 1960)。1964 年，Kleinsmith 和 Pierce 的研究发现单个的 ECC 可以产生包括 ECC 和其他类型细胞的肿瘤组织，因此证实 ECCs 为一种干细胞 (Kleinsmith and Pierce, 1964)。后续研究发现人的 ECCs 在体外培养的条件下也可以分化成三胚层的各种组织细胞，通过肾被膜下注射可以形成含有肌肉、神经和皮肤等在内的各种组织细胞的肿瘤 (Kahan and Ephrussi, 1970)。虽然一些关于 ECCs 的种系嵌合<sup>②</sup>实验表明，ECCs 具有亚全能性并能参与种系生成，但其产生的个体容易出现肿瘤，这大大限制了 ECCs 作为一种干细胞资源的使用。

干细胞的种系嵌合能力使人们意识到获得一种合适的干细胞类型将有助于品种改良及对哺乳动物的基因操作。1969 年，卵细胞体外成熟技术的发展为实现体外受精提供了技术保障 (Edwards et al., 1969)。1978 年，通过产科医生 Steptoe 和生理学家 Edwards 的共同努力，第一例体外受精的“试管婴儿”在英国诞生，这不仅引起了全世界科学界的轰动，开创了人类辅助生殖技术，为治疗不孕不育开辟了新的途径，同时也为具有种系嵌合能力的干细胞——ESCs 的分离提供了保障。1981 年，第一株小鼠胚胎干细胞 (mouse Embryonic Stem Cells, mESCs) 系建立，并被证实能在体内、体外具有三胚层分化能力 (Evans and Kaufman, 1981)，而且比 ECCs 具有更高的种系嵌合能力，不容易引起自身癌变 (Beddington and Robertson, 1989)；1993 年，Nagy 等通过四倍体补偿的方法第一次证实由囊胚内细胞团建立的 ESC 系具有发育成完整个体的能力 (Nagy et al., 1993)。至此，人们对干细胞有了较为明确的认识，即干细胞是一类既具有自我更新能力，又能保持分化潜能的细胞，同时也为干细胞的基础研究及其在基因敲除等基因操作和基因功能研究中的广泛应用奠定了基础。

随着科学界对干细胞研究的不断深入，越来越多的科研团队加入到干细胞研究的热潮

①当单个细胞在体外增殖 6 代以上，其后代组成的细胞群体称为集落或克隆。单细胞克隆形成率表示细胞的独立生存能力。

②干细胞能够进入生殖腺，具有形成配子的能力，称为种系嵌合。



中,各种突破性进展不断涌现。1998年, Thomson 带领其研究团队由体外受精的人囊胚时期胚胎的内细胞团建立了第一株人类胚胎干细胞系,并通过体内分化实验证实其具有多能干细胞的特征(Thomson et al., 1998);同年, Shambloott 等从人受精后 5~9 周人工流产的胚胎中建立了第一株人胚胎生殖细胞系,并证实了其具有多能干细胞的特征(Shambloott et al., 1998),由此建立了比较完善的干细胞分离培养体系。人胚胎干细胞是具有临床应用价值的“万能细胞”,在再生医学领域有着巨大的应用前景。尽管人胚胎干细胞的分离、建系方法一直涉及伦理争议,一些国家在人胚胎干细胞研究的资助方面处于徘徊状态,甚至有些国家曾经明确禁止人胚胎干细胞的研究,在一定程度上制约了人胚胎干细胞的发展,但是到目前为止,人胚胎干细胞的研究仍然取得了很大进展,许多研究证实从 ESCs 分化获得的多种功能细胞能改善动物模型疾病状况,如将人 ESCs 分化获得的少突胶质细胞移植到脊髓损伤的小鼠模型中,能明显改善其运动能力(Volarevic et al., 2012);将分化获得的多巴胺能神经细胞移植到灵长类帕金森病模型的特定脑区,可以减轻相应的症状(Doi et al., 2012);将分化获得的视网膜祖细胞移植到白化型成年兔的视网膜下腔后,细胞能迁移至损伤部位修复视网膜损伤(Amirpour et al., 2012),这些研究为以人 ESCs 为基础的细胞替代性治疗奠定了基础。以人 ESCs 为基础的细胞替代性治疗也在人的临床研究中取得了一定的效果,如将人 ESCs 分化获得的视网膜色素上皮细胞移植到视网膜黄斑变性病人的眼部,可以明显提高病人的视力(Schwartz et al., 2012)。

1997年,克隆羊多莉的出生(Wilmot et al., 1997)引起了世界范围内对动物体细胞克隆技术的关注,同时也为干细胞的发展迎来了新的篇章,治疗性克隆成为当时干细胞研究的热门领域。2005年,韩国科学家黄禹锡宣称获得了世界上第一株克隆人胚胎干细胞系,攻克了利用患者体细胞进行治疗性克隆的科学难题,然而这一重大研究成果被证实数据不真实,在此后的几年里,世界各国的实验室均未报道获得人体细胞核移植来源的 ESC 系,治疗性克隆的发展也随之进入了瓶颈期。国际权威专家甚至一度认为无法获得灵长类克隆胚胎(Simerly et al., 2003)。我国科学家针对这一科学问题开展研究,建立了高效的猕猴体细胞重编程技术体系,获得了国际上首批正常发育的灵长类动物克隆胚胎,为灵长类的克隆和治疗性克隆研究开辟了道路(Yang et al., 2007)。直到 2013 年 6 月,美国科学家终于成功建立了第一株克隆人 ESC 系(Tachibana et al., 2013),这一成果重燃了人们对治疗性克隆的希望。孤雌胚胎来源的 ESCs<sup>①</sup>具有和体外受精胚胎来源的 ESCs 一样的自我更新和多向分化潜能,并且能避免伦理争议,因此是一种更为理想的可以临床应用的胚胎干细胞类型(Revazova et al., 2007; Mai et al., 2007; Lu et al., 2010)。目前,已有实验室报道建立了无动物源成分培养体系培养的人 ESCs,为临床级人 ESCs 的建系奠定了基础(Miere et al., 2012; Tannenbaum et al., 2012)。2006年 iPSC 技术的出现(Takahashi and Yamanaka, 2006)使人们重新看到了多能干细胞临床应用的希望。iPSCs 可以将成体细胞在外源因子的作用下转变成具有多向分化能力的诱导性多能干细胞,成功地规避了传统伦理的制约,2012年的诺贝尔生理学或医学奖极大地肯定了该技术的价值与意义。人 iPSCs 的成功获得(Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007)预示着针对病人的个性化细胞治疗即将实现,同时也为医药研发提供了新的工具(Park et al., 2008)。iPSCs 技术已经成为当今干细胞基础研究与临床应用的焦点。但是传统的 iPSCs 诱导方法利用的外源基因中包含致癌基因,而且诱导的效率较低,有致癌风险,制约了 iPSCs 的临床应用(Tong et al., 2011)。目前,很多科学家都在致力于改善 iPSCs 的诱导方法,提高其诱导效率和安全性,以期能更好地应用于临床或药物筛选等领域(Silva et al., 2008; Lee et al., 2009; Esteban et al., 2010; Anokye-Danso et al., 2011; Abyzov et al., 2012)。2014年9月日本已经开始对病人特异的 iPSCs 分化来源的视网膜色素上皮细胞进行临床研究。

成体干细胞是另外一类研究广泛、应用价值巨大的干细胞类型。20世纪70年代初,造血干细胞第一次应用于临床细胞移植治疗,这项壮举荣获了诺贝尔生理学或医学奖,开启了成体干细胞临床应用的大门,并且为其他类型成体干细胞的临床应用提供了极其宝贵的经验。

①指在缺少雄性配子基因组的情况下直接激活 M II 期卵母细胞形成孤雌囊胚,进而分离获得内细胞团,建立孤雌 ESC 系。



间充质干细胞是一种具有广阔应用前景的成体干细胞，目前可以从骨髓、脂肪或脐带等组织中分离获得，在体内或体外特定的诱导条件下可以分化为多种组织细胞类型，在Ⅱ型胶原导致的关节炎、1型糖尿病、阿霉素诱导的肾病、创伤性脑损伤、急性呼吸窘迫综合征、心肌梗死和肺部疾病等各类型疾病的治疗上均表现出巨大的潜力（Chen et al., 2013; Wang et al., 2012; Ren et al., 2012）。并且已经有一些间充质干细胞的临床实验正在进行中，如用间充质干细胞治疗1型糖尿病已进入Ⅰ期、Ⅱ期临床试验（Fiorina et al., 2011），详见网站 [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov)（NCT00690066、NCT01068951）。

神经干细胞（Neural Stem Cells, NSCs）是一类研究开展较早的成体干细胞类型，为多种神经退行性疾病的治疗带来了希望。但是从成年人体内获得神经干细胞的概率较低，从流产胎儿体内获得的神经干细胞虽然有一定的治疗效果，但治疗效果个体差异较大，而且涉及伦理争议（Johansson et al., 1999; Gage, 2000; Kim, 2004）。2012年，有多个研究表明，可以将人成体细胞在外源因子作用下转分化为神经干细胞或特异的神经细胞，这给治疗帕金森症、癫痫或脑卒中等神经系统疾病带来了希望（Caiazzo et al., 2012; Ring et al., 2012; Han et al., 2012; Sheng et al., 2012a; Sheng et al., 2012b）。这种转分化获得的干细胞再一次拓展了人们对干细胞的认识，尤其是体内转分化的实现，不仅可以避免体外培养可能造成的基因突变，而且可以避免大规模培养带来的不必要的经济投入及资源消耗，这将是干细胞技术的一种新的发展趋势。

纵观干细胞研究的发展历程，不但有针对干细胞多能性维持与分化调控机制等方面的基础研究，许多重要的干细胞相关实验技术也在不断地涌现及完善。Till 和 McCulloch 在造血干细胞研究中采用的单细胞克隆形成的实验方法，已成为各种成体干细胞分离鉴定的“黄金标准”。Evans 和 Kaufman 建立的胚胎干细胞分离培养技术，以及在此基础上发展起来的基因打靶技术，更成为整个生命科学研究中的重要工具之一。自20世纪50年代，从体细胞核移植到 iPSCs 技术，再到转分化，一直到今天仍在不断发展的细胞重编程技术，这些不断发展的干细胞技术是干细胞基础研究和应用的最有力保障。对相关技术的熟练掌握和应用，也是从事干细胞研究的基础。

当前的干细胞研究承载着发育生物学、细胞生物学、遗传学和基因组学等许多基础学科的基本科学问题，同时也是医学转化研究和临床应用研究的前沿。干细胞的研究极有可能在生物医药史上掀起一场革命，未来除了传统的依赖化学药物的治疗手段外，使用细胞或组织替代性治疗将成为部分疾病治疗的首选。鉴于此，世界各国都大力支持干细胞研究。我国同样对干细胞研究相当重视，近几年在干细胞研究领域投入很多，发表论文的数目和影响因子逐年攀升，我国的干细胞研究水平和知名度也逐步提高。干细胞研究发展到今天，已经进入了由基础研究向临床转化的关键阶段。2011年，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准了 Geron 公司利用少突胶质细胞治疗急性脊髓损伤的 GRNOPC1 Ⅰ期临床试验；2012年，加拿大卫生部（Health Canada）批准了 Osiris 生产的干细胞药物的上市销售；2013年，日本厚生劳动省的审查委员会批准了利用 iPSCs 开展视网膜再生的临床研究。目前，已有多种干细胞产品进入了临床试验阶段，细胞商品化趋势明显。我国的干细胞研究也已经开始向临床转化迈进。我国国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理局（China Food and Drug Administration, CFDA）也在2013年制定了《干细胞临床试验研究管理办法（试行）》《干细胞临床试验研究基地管理办法（试行）》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》。2015年，我国国家卫生和计划生育委员会与国家食品药品监督管理局颁布了《干细胞临床研究管理办法（试行）》，这将使我国的干细胞临床应用更加规范化、合理化，也意味着干细胞研究将会进入一个新的阶段，研究队伍会再次壮大，许多临床医务工作者和其他领域的研究人员也将加入干细胞的研究中。

因此，在这个快速发展壮大的研究领域，对于许多刚从事干细胞研究的科学工作者来说，这样一本有着详细步骤并且清晰明了的实验技术手册能够更快地带领他们进入干细胞研究的大门。

## 参考文献

- Abyzov A, et al.** Somatic Copy Number Mosaicism in Human Skin Revealed by Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature*, 2012, 492 ( 7429 ) : 438-442.
- Amirpour N, et al.** Differentiation of Human Embryonic Stem Cell-derived Retinal Progenitors into Retinal Cells by Sonic Hedgehog and/or Retinal Pigmented Epithelium and Transplantation into the Sub-retinal Space of Sodium Iodate-injected Rabbits. *Stem Cells Dev*, 2012, 21 ( 1 ) : 42-53.
- Anokye-Danso F, et al.** Highly Efficient miRNA-mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8 ( 4 ) : 376-388.
- Beddington R S, Robertson E J.** An Assessment of the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo. *Development*, 1989, 105 ( 4 ) : 733-737.
- Caiazzo M, et al.** Direct Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Mouse and Human Fibroblasts. *Nature*, 2012, 476 ( 7359 ) : 224-227.
- Chen X, et al.** Chondrogenic Differentiation of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells in Type I Collagenhydrogel for Cartilage Engineering. *Injury*, 2013, 44 ( 4 ) : 540-549.
- Doi D, et al.** Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human ESC-derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells*, 2012, 5 ( 30 ) : 935-945.
- Edwards R G, Bavister B D, Steptoe P C.** Early Stages of Fertilization in vitro of Human Oocytes Matured in Vitro. *Nature*, 1969, 221 ( 5181 ) : 632-635.
- Esteban M A, et al.** Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010, 6 ( 1 ) : 71-79.
- Evans M J, Kaufman M H.** Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature*, 1981, 292 ( 5819 ) : 154-156.
- Fiorina P, Voltarelli J, Zavazava N.** Immunological Applications of Stem Cells in Type 1 Diabetes. *Endocr Rev*, 2011, 32 ( 6 ) : 725-754.
- Gage F H.** Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 2000, 287 ( 5457 ) : 1433-1438.
- Han D W, et al.** Direct Reprogramming of Fibroblasts into Neural Stem Cells by Defined Factors. *Cell Stem Cell*, 2012, 10 ( 4 ) : 465-472.
- Jifeng Yang, et al.** Epigenetic Marks in Cloned Rhesus Monkey Embryos: Comparison with Counterparts Produced In Vitro. *Biology of Reproduction*, 2007, 76: 36-42.
- Johansson C B, et al.** Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell*, 1999, 96 ( 1 ) : 25-34.
- Kahan B W, Ephrussi B.** Developmental Potentialities of Clonal in vitro Cultures of Mouse Testicular Teratoma. *J Natl Cancer Inst*, 1970, 44 ( 5 ) : 1015-1036.
- Kim S U.** Human Neural Stem Cells Genetically Modified for Brain Repair in Neurological Disorders. *Neuropathology*, 2004, 24 ( 3 ) : 159-171.
- Kleinsmith L J, Pierce G B Jr.** Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 1964, 24: 1544-1551.
- Lee G, et al.** Modelling Pathogenesis and Treatment of Familial Dysautonomia Using Patient-specific iPSCs. *Nature*, 2009, 461 ( 7262 ) : 402-406.
- Lu Z, et al.** Derivation and Long-term Culture of Human Parthenogenetic Embryonic Stem Cells Using Human Foreskin Feeders. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27 ( 6 ) : 285-291.