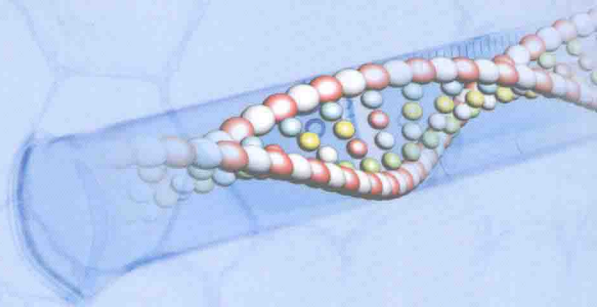




干细胞、克隆与转基因

GANXIBAO KELONG YU ZHUANJIYIN

郑月茂 张雅蓉◎主编



北京科学技术出版社

干细胞、克隆与转基因

GANXIBAO KELONG YU ZHUANJIYIN

郑月茂 张雅蓉◎主编

北京科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

干细胞、克隆与转基因/郑月茂,张雅蓉主编. —北京:
北京科学技术出版社, 2011. 7

ISBN 978-7-5304-5286-8

I. ①干… II. ①郑…②张… III. ①干细胞-研究
②克隆-研究③转基因技术-研究 IV. ①Q24②Q785

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 130250 号

干细胞、克隆与转基因

主 编:郑月茂 张雅蓉

责任编辑:王云飞

封面设计:樊润琴

出 版 人:张敬德

出版发行:北京科学技术出版社

社 址:北京西直门南大街 16 号

邮政编码:100035

电话传真:0086-10-66161951(总编室)

0086-10-66113227(发行部)

0086-10-66161952(发行部传真)

电子邮箱:bjkjpress@163.com

网 址:www.bkjpress.com

经 销:新华书店

印 刷:廊坊市海涛印刷有限公司

开 本:720mm × 1020mm 1/16

字 数:355 千

印 张:17.75

版 次:2011 年 7 月第 1 版

印 次:2011 年 7 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5304-5286-8/Q · 064

定 价:68.00 元



京科版图书,版权所有,侵权必究。

京科版图书,印装差错,负责退换。

编 委 会

主 编	郑月茂	张雅蓉
副主编	党永辉	刘 军
编 委	郑月茂	西北农林科技大学动物医学院
	张雅蓉	陕西杨凌示范区高新小学
	党永辉	西安交通大学医学院
	刘 军	西北农林科技大学转基因动物研究中心
	赵晓娥	西北农林科技大学动物医学院
	安志兴	河南科技学院动物科学学院
	贺小英	内蒙古科技大学数理与生物工程学院
	王永胜	西北农林科技大学转基因动物研究中心
	权富生	西北农林科技大学转基因动物研究中心
	张翊华	西北农林科技大学动物医学院
	徐永平	西北农林科技大学动物医学院
	周宏超	西北农林科技大学动物医学院
	赛务加甫	石河子大学动物科技学院
	何小宁	西安组织工程工程技术研究中心
	郑海燕	西北农林科技大学食品科学与工程学院
	李艳艳	西北农林科技大学动物医学院
	邱 爽	西北农林科技大学动物医学院
	祁英培	西北农林科技大学动物医学院

前言

21 世纪是生命科学的世纪,干细胞研究被当做生命科学研究的热点和前沿课题,干细胞在临床医学、克隆动物、转基因工程、生物学基础研究等领域,都具有重要的理论价值与应用开发价值。用干细胞进行治疗性克隆得到全世界各国政府和公司的大力支持。

转基因克隆技术是转基因动物技术和克隆动物技术的有机结合。日益成熟的转基因技术、克隆技术以及正在加速发展的干细胞组织工程等关键技术,正在推动生物技术产业成为新世纪最重要的产业之一,深刻地改变着人类的医疗卫生、农业、人口和食品状况,为世界各国医疗业、制药业、农业、环保业等行业开辟了广阔的发展前景。

本书的编写出版,旨在传播关于干细胞、克隆与转基因的知识和技术,为我国生命科学的发展作出贡献。

本书主要分为以下两个部分:

上部干细胞:介绍各类干细胞的生物学特征、分离培养、鉴定、诱导分化、冻存与复苏及应用。

下部克隆与转基因:介绍克隆动物理论,克隆动物实践,基因工程,转基因动物的应用、生产及安全性检测。

本书编者是来自不同大学和科研院所的科教人员,他们长期从

事干细胞、克隆与转基因研究,具有丰富的理论知识和实践经验。各位编委分别撰写了部分内容(文中已注明)。

本书主编分工如下:郑月茂负责构思、整体编排及最后审核和定稿,并负责出版事宜;张雅蓉负责组稿、文字审核和校对;两人同时负责大部分章节撰写(文中已注明)。

本书作为本科及研究生教学和科研参考用书,可供高等院校生命科学、生物工程、生物制药、生物化工等专业的师生及科研人员使用。期望本书对广大热爱生命科学,对于细胞、克隆与转基因有兴趣的社会各阶层人员及广大科教人员和学生有所启发和帮助。如果书中有疏漏、不妥甚至错误之处,诚请各位批评指正。

编 者

2011 年 6 月 8 日

目 录

上部 干细胞

第一章 干细胞概论	3
第一节 干细胞特性	3
第二节 干细胞分类	5
第三节 干细胞的应用前景	8
第二章 干细胞各论	9
第一节 胚胎干细胞	9
第二节 诱导多能干细胞	11
第三节 造血干细胞	12
第四节 间充质干细胞	14
第五节 羊水来源干细胞	15
第六节 脂肪来源干细胞	15
第七节 生殖干细胞	17
第八节 乳腺干细胞	18
第九节 神经干细胞	19
第十节 皮肤干细胞	21
第十一节 肌肉干细胞	23
第十二节 肝干细胞	26
第十三节 胰腺干细胞	28
第十四节 肠上皮干细胞	30
第十五节 角膜缘干细胞	32
第十六节 视网膜干细胞	34
第十七节 牙髓干细胞	36

第三章 干细胞分离培养	38
第一节 胚胎干细胞分离培养	38
第二节 诱导多能干细胞的制造	43
第三节 造血干细胞分离培养	44
第四节 间充质干细胞分离培养	47
第五节 羊水来源干细胞分离培养	50
第六节 脂肪来源干细胞分离培养	51
第七节 乳腺干细胞分离培养	53
第八节 神经干细胞分离培养	54
第九节 表皮干细胞分离培养	56
第十节 肌肉干细胞分离培养	59
第十一节 角膜缘干细胞分离培养	60
第十二节 视网膜干细胞分离培养	62
第四章 干细胞鉴定	66
第一节 胚胎干细胞鉴定	66
第二节 成体干细胞鉴定	68
第五章 干细胞诱导分化	72
第一节 胚胎干细胞诱导分化	72
第二节 诱导多能干细胞的诱导分化	75
第三节 造血干/祖细胞诱导分化	75
第四节 间充质干细胞诱导分化	76
第五节 神经干细胞诱导分化	78
第六节 羊水来源干细胞诱导分化	79
第七节 视网膜干细胞诱导分化	79
第八节 干细胞诱导分化现状与展望	80
第六章 干细胞冻存与复苏	82
第一节 干细胞冷冻保存	82
第二节 冻存样品的复苏	89
第七章 干细胞的应用	92
第一节 胚胎干细胞的应用	93
第二节 诱导多能干细胞的应用	102
第三节 造血干细胞的应用	102
第四节 间充质干细胞的应用	104

第五节	羊水来源干细胞的应用	106
第六节	脂肪来源干细胞的应用	106
第七节	生殖干细胞的应用	108
第八节	乳腺干细胞的应用	109
第九节	神经干细胞的应用	109
第十节	皮肤干细胞的应用	112
第十一节	肌肉干细胞的应用	116
第十二节	肝干细胞的应用	116
第十三节	胰腺干细胞的应用	117
第十四节	肠上皮干细胞的应用	119
第十五节	角膜缘干细胞的应用	119
第十六节	牙髓干细胞的应用	121

下部 克隆与转基因

第八章	克隆概论	125
第一节	克隆的概念	125
第二节	克隆技术	126
第三节	动物克隆的研究历程	127
第四节	动物克隆的研究成果	129
第五节	生殖性克隆与治疗性克隆	131
第六节	克隆技术的应用前景及其存在的问题	133
第九章	克隆动物理论	136
第一节	细胞重编程	136
第二节	动物克隆	140
第十章	克隆动物实践	144
第一节	动物核移植技术	144
第二节	动物核移植方法	152
第三节	卵母细胞体外成熟	156
第四节	早期胚胎体外培养	166
第五节	转基因克隆胚胎移植	169
第十一章	动物转基因技术和克隆技术的关系	185
第一节	转基因技术和克隆技术的区别	185

第二节 克隆技术的利与弊	187
第三节 转基因动物技术存在的问题	189
第四节 转基因动物与克隆动物前景展望	190
第十二章 基因与基因工程	192
第一节 基因与基因组	192
第二节 基因工程	204
第三节 动物转基因方法	217
第十三章 转基因动物的应用	224
第一节 转基因动物在农业生产上的应用	224
第二节 转基因动物在生物医学领域的应用	226
第三节 转基因动物组织和器官生物反应器	228
第四节 转基因动物的应用前景	232
第十四章 转基因克隆动物的生产	235
第一节 转基因克隆牛羊目的基因的筛选	235
第二节 转基因克隆山羊的生产	236
第三节 转基因克隆牛的生产	240
第十五章 转基因动物的安全性检测	242
第一节 转基因生物安全性概况	242
第二节 转基因动物安全的潜在风险与评价	245
第三节 转基因动物安全性检测	253

附 录

附录一 婴儿干细胞通过胎盘遗留在母体	257
附录二 克隆大事记	258
附录三 治疗性克隆之争	260
附录四 克隆人——是“他”是“她”还是“它”	263
附录五 克隆食品安全性	266
附录六 人胚胎干细胞研究伦理指导原则	270

第一章

干细胞概论

干细胞是一种同时具有自我更新能力、分化能力和增殖能力的细胞,是无具体功能的非特化细胞。对干细胞的准确定义目前还存在争议。例如,有人认为干细胞应具有无限的或长期的自我更新能力,也有人认为干细胞应具有多向分化能力。一般而言,干细胞的发育阶段越早,这三种能力也越强,而随着越来越接近成熟的功能细胞或结构细胞,这三种能力也逐步降低甚至丧失。对哺乳动物来说,生理状态下最原始和最强大的干细胞是受精卵,随后是胚胎干细胞、胎儿干细胞、成体干细胞等。

除干细胞,人们也用祖细胞来命名某些前体细胞(如髓系祖细胞、内皮细胞祖细胞)。有人认为,尽管祖细胞有一定的分化能力和增殖能力,但缺乏自我更新能力,经过几轮细胞分裂后即变成终末分化细胞,因此不属于干细胞,而是干细胞向成熟细胞分化发育的过渡阶段。另外,有学者报道有些祖细胞(如血管内皮祖细胞)也具有一定的自我更新能力,而有些人将单能干细胞与祖细胞视为等同。总之,祖细胞的定义和使用还比较模糊。在成体干细胞研究中,由于干细胞分离和鉴定比较困难,所得细胞往往为多种细胞的混合物,因此在技术上也难以严格区分祖细胞与干细胞。

第一节 干细胞特性

多向分化潜能和自我更新是干细胞的基本特点。具体来讲,干细胞具有以下一些生物学特点:①属非终末分化细胞,终生保持未分化或低分化特征,缺乏分化标记。②在机体的数目、位置相对恒定。③具有自我更新能力。④能无限地分裂、增殖,干细胞可连续分裂几代,也可在较长时间内处于静止状态。⑤具有多向分化潜能,能分化为各种不同类型的组织细胞;即具有分化发育的可塑性,在特定

环境下,能被诱导分化成在发育上无关的细胞类型,其分化受其所处周围微环境[干细胞壁龛(niche)]的影响。⑥分裂的慢周期性,绝大多数干细胞处于 G_0 期。⑦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方式,非对称分裂中一个子细胞保持亲代的特征,仍作为干细胞保留下来,另外一个子细胞不可逆的走向分化的终端,成为功能专一的分化细胞。

一、干细胞自我更新

干细胞的自我更新是指干细胞分裂后子代干细胞能保持与自己相同的基因型与表型,维持未分化状态并具有相同的分化潜能。自我更新能力是干细胞得以体外建系的基础,使干细胞既能长期培养增殖,又不会发生染色体的异二倍体化,从而可作为生命科学研究和医学研究的良好工具。自我更新同时受到细胞生长环境和内源性调节因子的控制,在体外培养时往往需要添加抑制分化的物质或者以人或动物来源的滋养层细胞作为培养环境,才能使干细胞增殖时不发生分化。自我更新机制的研究不仅是目前干细胞研究的热点,也是干细胞临床应用的重要基础。

二、干细胞分化

干细胞分化是指干细胞分裂后转变为形态上、机能上、化学构成上与自己相异的子代细胞。研究表明,干细胞的分化是转录因子、生长因子、膜蛋白及外在接触环境等多方面因素共同调控、相互协调,导致基因按照一定的时间、空间顺序表达的结果。2007年,日本科学家山中伸弥等将4种转录因子导入人皮肤成纤维细胞,使后者获得了多向分化能力,证明了细胞分化是可逆的,也为通过基因操作调节细胞分化状态开辟了道路。目前,阐明细胞分化与细胞自我更新的开关基因及其调控机制以及如何实现干细胞在体外培养条件下的定向分化是研究的热点。

三、干细胞增殖

干细胞增殖是指通过细胞有丝分裂实现细胞数量的扩增。干细胞的自我更新和分化都是以细胞增殖为基础的。有两种分裂方式——对称分裂和不对称分裂,成熟细胞都是采用对称分裂方式。以前认为,干细胞是通过不对称方式进行分裂的,即新复制产生的染色体都用于构建子代细胞,而原来的染色体继续作为干细胞保持不变(即自我更新),稳定地作为正确的模板,从而保证干细胞“永远正确”,这种理论也就是所谓的“不朽链假说”,但新发现的一些证据

不支持这一假说,如造血干细胞即采用对称方式进行分裂(赵春华 2006)。

第二节 干细胞分类

一、依据分化潜能分类

(一)全能干细胞(totipotent stem cell)

全能干细胞是指在自然条件或生理条件下能发育成完整个体的干细胞。受精卵及胚胎发育至四细胞期之前的每个细胞均是全能干细胞,其自我更新能力、分化能力和增殖潜能是最强的。

(二)亚全能干细胞(pluripotent stem cell)

亚全能干细胞或称万能干细胞、三胚层多能干细胞,是全能干细胞分化而来的子代干细胞,不能形成完整个体,可以形成内、中、外三个胚层来源的所有细胞类型。大多数胚胎干细胞、核移植胚胎干细胞及人工诱导多能干细胞(iPS细胞)属于此类。

(三)多能干细胞(multipotent stem cell)

多能干细胞或称单胚层多能干细胞,是由亚全能干细胞分化而来的,分化潜能有所下降,不能形成完整个体,只能分化出部分种类的组织细胞。例如,神经干细胞可以分化成各类神经细胞;造血干细胞可以分化为红细胞、白细胞、血小板等;间充质干细胞可以分化为成骨细胞、成软骨细胞等。

(四)单能干细胞(unipotent stem cell)

单能干细胞也称专能干细胞、祖细胞,由多能干细胞分化而来,只能分化成一种或者密切相关的两种组织类型的细胞,如上皮干细胞、卫星细胞等(赵春华 2006)。

二、根据组织来源分类

(一)胚胎干细胞(embryonic stem cell)

在各种干细胞的研究与应用中,胚胎干细胞最引人注目。胚胎干细胞是指由胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)经体外抑制培养而筛选出的细胞。胚胎干细胞具有发育全能性,在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞;胚胎干细胞具有在体外无限扩增并保持未分化状态的能力,因此,它可以在体外大量扩增、筛选、冻存和复苏而不

会丧失其原有的特性。

(二)核移植胚胎干细胞(embryonic stem cells via nuclear transfer)

核移植胚胎干细胞,又称治疗性胚胎干细胞,是利用核移植技术将成体细胞的胞核植入去核的卵母细胞中,经体外培养后获得的干细胞克隆,其分化潜能类似胚胎干细胞。世界上第一只成体细胞克隆羊“多莉”的基因组就来自于羊的乳腺上皮细胞。核移植干细胞由于基因组来自供者,在细胞移植或再生医学中可以避免免疫排斥的发生,同时引起的伦理学争议也相对较小。

(三)诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPS 细胞)

诱导多能干细胞首先由日本科学家山中伸弥于 2006 年研究成功。把 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 这 4 种转录因子利用基因表达载体转入成熟细胞,成熟细胞可以转变成未分化状态,具有类似于胚胎干细胞的分化潜能,称为诱导多能干细胞。2009 年,我国科学家周琪等利用 iPS 细胞培育出成活小鼠,首次证明 iPS 细胞有分化全能性。iPS 细胞的研究成功,避免了胚胎干细胞和核移植干细胞研究及应用中面临的伦理学问题、异体移植时的免疫排斥难题,为干细胞的应用开辟了崭新的道路和美好的未来。

(四)成体干细胞(somatic stem cell)

成体干细胞存在于成熟个体的各种组织中,为专能或多能干细胞,如造血干细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)、神经干细胞(neural stem cell, NSC)、肝脏干细胞、肌源性干细胞、表皮干细胞、肠上皮干细胞等。不仅细胞更新活跃的组织 and 器官(如骨髓、小肠上皮、表皮)存在干细胞,在一些原来认为更新极为缓慢甚至不更新的组织(如神经)中也存在干细胞。

成年个体组织中的成体干细胞在正常情况下大多处于休眠状态,在病理状态或在外因诱导下可以表现出不同程度的再生和更新能力。现在已证明在脑、骨髓、外周血液、血管、骨骼肌、皮肤、脂肪、牙髓、乳腺和肝脏中都存在干细胞。

在多数情况下,成体干细胞分化为与其组织来源一致的细胞,但是在某些情况下,成体干细胞的分化并不遵循该规律,表现出很强的跨系或跨胚层分化潜能。例如,骨髓(bone marrow)间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)不仅可以分化为造血基质细胞,还可以向多种造血以外的组织迁移、定位并分化成相应的组织细胞。骨髓间充质干细胞在体外培养时也表现出多向分化潜能,在不同的诱导条件下可以向成骨、成软骨、成肌肉和成脂肪细胞及中胚层以外的细胞,如神经元等分化。而且分化方向已定的细胞,在一定的条件下依然具有分化方向上的“可塑性”(plasticity)。研究表明,神经干细胞在生长因子、激素和微环境因素的作用下,除了可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质

细胞外,还可以分化为骨骼肌细胞和造血细胞。“可塑性”使得成体干细胞分化潜能较弱的传统观念受到挑战,更重要的是,表明其在修复、取代受损的细胞、组织甚至是器官方面将发挥重要作用。

成体干细胞的可塑性使得其像胚胎干细胞一样,有可能在将来的再生医学(regeneration medicine)等应用领域发挥重要的作用。与胚胎干细胞相比,成体干细胞在研究和应用方面具有以下优点:①成体干细胞的自体移植避免了免疫排斥;②成体干细胞在正常情况下处于静止状态,只有在病理情况下才显示出一定的自我更新潜能,不像胚胎干细胞具有无限的自我更新能力,因此成体干细胞导致细胞“永生”甚至癌变的可能性较小;③成体干细胞的分化潜能比较局限,更容易诱导向特定的组织细胞分裂,也可以直接用于体内组织的原位修复;④某种类型的成体干细胞有向同种组织的损伤部位迁移的趋势,这一点在神经干细胞表现尤为明显,这有助于临床应用干细胞来进行疾病替代治疗时的定位;⑤分离和使用成体干细胞不存在伦理学问题。但是成体干细胞的应用还受到以下因素的制约:①目前尚未在人体的所有部位分离出成体干细胞,例如,尚未发现肾干细胞;②在一些遗传性疾病中,遗传错误也会出现在患者的干细胞中,这种干细胞是不适合移植的,而且由于环境因素的影响,成体干细胞有可能有基因突变等 DNA 异常;③成体干细胞没有胚胎干细胞的增殖能力强。所有这些因素使得成体干细胞无法完全取代胚胎干细胞。

(五) 肿瘤干细胞(tumor stem cell)

肿瘤干细胞理论认为肿瘤组织由异质性的细胞群体组成,其中极少部分细胞具有干细胞特性,决定着肿瘤的发生、侵袭、转移、播散,以及对各种治疗是否敏感,而其他大部分肿瘤细胞经过有限的几次增殖后衰亡失去形成肿瘤的能力。肿瘤干细胞由干细胞突变而来,可以分化为多种表型的肿瘤细胞。肿瘤干细胞的存在,被认为是化疗或放疗失败及肿瘤复发、转移的根本原因,因为一般的治疗只对普通肿瘤细胞有效,而不能消灭肿瘤干细胞。

三、根据组织发生部位分类

根据干细胞组织发生的部位进行分类。目前,已经从许多组织或器官中成功地分离出干细胞,如胚胎干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肌肉干细胞(muscle stem cell)、成骨干细胞(osteogenic stem cell)、内胚层干细胞(endodermal stem cell)、视网膜干细胞(retinal stem cell)及胰腺干细胞等。随着干细胞研究的进一步拓展和深入,一些命名的含义将会更加丰富,也将逐渐会有新的干细胞被发现。

第三节 干细胞的应用前景

进入 21 世纪,人类仍然被众多疾病所困扰。因疾病、创伤、衰老和遗传缺陷所导致的组织器官缺损与功能障碍一直是人类难以攻克的医学难题。

干细胞技术、治疗性克隆技术、体细胞重编程技术等迅速发展,正在催生人类历史上的第三次医学革命,那就是继药物治疗、手术治疗之后的再生医学治疗途径。基于干细胞技术的再生医学是一门新型的交叉学科,为重大疾病的治疗、寿命的延长、生活质量的提高开辟了一个新途径。通过干细胞研究,科学家们还可以阐明胚胎发育及组织生长等一系列调节事件的详细过程,为攻克干细胞定向分化为特定组织的细胞并运用于疾病治疗等难题打下基础,为确定人类各种基因的功能开辟一条有效捷径。iPS 技术的出现为细胞核移植研究提供了一个全新的手段和对照,将会加快克隆的发展,更好地解决科学问题。细胞核移植是一个大的学科,不能等同于克隆、治疗性克隆和胚胎干细胞,它从开始就是发育生物学研究的重要组成部分和研究手段。

细胞工程是指在生命科学基本原理的基础上,在工程技术手段的支持下或结合其他基础科学的原理与技术,利用细胞作为原料,对其进行研究、设计、修饰及改造,按照人们的意志和需求获得某种产品用于临床治疗或基础研究。随着干细胞技术的飞速发展,人类有可能在体外培养并大量扩增某些干细胞,定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞供临床之需。以此为目的的干细胞工程几乎涉及人体所有的重要组织和器官,为人类面临的大多数医学难题,如心脏疾患、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、运动器官损伤、老年性痴呆、严重烧伤、脊髓损伤、遗传性缺陷等疾病的治愈带来希望。因此,干细胞工程具有极其重要的理论意义、应用前景和 market 价值。

(郑月茂)

参考文献

- [1] 王佃亮. 干细胞组织工程技术——基础理论与临床应用. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] 裴雪涛. 干细胞生物学. 北京: 科学出版社, 2003.