

郑月茂  
张翊华 张雅蓉 编著

# 干细胞及其分化细胞 彩色图谱



科学出版社

# 干细胞及其分化细胞彩色图谱

郑月茂  
张翊华 张雅蓉 编著

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本图谱主要展示了编著者多年来科研积累的 252 幅干细胞及其分化细胞彩色图片,同时展示了其他科研人员有关胚胎干细胞、诱导型多能干细胞、造血干细胞和神经干细胞及其分化细胞的图片 6 幅。本书介绍了各类干细胞的特性、分离培养和诱导分化。

本书可供从事干细胞研究的学者作为教学和科研参考用书。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

---

干细胞及其分化细胞彩色图谱/郑月茂,张翊华,张雅蓉编著. —北京:科学出版社, 2011. 8

ISBN 978-7-03-031971-5

I. ①干… II. ①郑… ②张… ③张… III. ①干细胞—图谱 IV. ①Q24-64

中国版本图书馆CIP数据核字 (2011) 第162138号

---

责任编辑:李悦 岳漫宇/责任校对:何晨琛  
责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

**科学出版社** 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京天时捷彩色印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2011年8月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2011年8月第一次印刷 印张: 12

印数: 1—1500 字数: 276 000

**定价: 88.00 元**

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

# 前 言

21 世纪是生命科学的世纪，干细胞研究成为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。本书的出版发行，旨在加强同行间的学术交流，传播关于干细胞研究的相关知识和技术，为我国的干细胞事业作出贡献。

本书编著者郑月茂十余年来致力于家畜神经干细胞、羊水来源干细胞和乳腺干细胞等的分离培养、定向分化及调控机理研究工作；编著者张翊华多年来从事人和哺乳动物干细胞工程技术和组织工程学研究。经过十多年的科研工作，编著者们积累了大量有关干细胞及其分化细胞的精美图片。

本书共展示了 258 幅关于干细胞及其分化细胞的彩色图片，其中第四章至第八章展示的 252 幅图片是编著者关于骨髓间充质干细胞、生殖干细胞、乳腺干细胞、羊水来源干细胞和神经干细胞及其分化细胞的图片，这些图片是编著者多年科研积累的实验图片，拥有版权。本书第一章“胚胎干细胞及其分化细胞图谱”、第二章“诱导多能干细胞及其分化细胞图谱”和第三章“造血干细胞及其分化细胞图谱”展示的 5 幅图片，以及第八章“神经干细胞及其分化细胞图谱”展示的 1 幅图片（图 8.120），是引用其他科研人员的图片（文中已注明出处），在此对他们表示衷心的感谢！

本书编著者分工如下：郑月茂负责本书构思、图片整理和筛选、全文撰写、整体编排及最后审核和定稿，并负责出版事宜和最终校稿；张翊华负责第四章“骨髓间充质干细胞及其分化细胞图谱”的图片处理和图版说明撰写；张雅蓉负责第五章“生殖干细胞及其分化细胞图谱”、第六章“乳腺干细胞及其分化细胞图谱”、第七章“羊水来源干细胞及其分化细胞图谱”和第八章“神经干细胞及其分化细胞图谱”图片处理及全书图片的排版。

另外，本书介绍了各类干细胞的特性、分离培养和诱导分化，集教科书和彩色图谱于一体，理论密切联系实际，图片精美，力争做到科学与艺术的完美结合。作为干细胞研究领域教学和科研的图文教程，期望本书对从事干细胞研究的学者有所启发和帮助。

诚恳期望同行专家能提出宝贵意见和建议。如果书中有疏漏、不妥甚至错误之处，诚请各位批评指正。

编著者

2011 年 5 月 15 日

**前言****导论 干细胞概述****第一章 胚胎干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 胚胎干细胞的特性和应用前景 .....16
- 第二节 胚胎干细胞的分离培养 .....18
- 第三节 胚胎干细胞及其分化细胞图谱 .....23

**第二章 诱导多能干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 诱导多能干细胞的特性和应用前景 .....25
- 第二节 诱导多能干细胞及其分化细胞图谱 .....28

**第三章 造血干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 造血干细胞的特性和研究意义 .....31
- 第二节 造血干细胞的分离培养 .....32
- 第三节 造血干细胞及其分化细胞图谱 .....35

**第四章 骨髓间充质干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 骨髓间充质干细胞的特性和研究意义 .....37
- 第二节 骨髓间充质干细胞的分离培养和分化 .....38
- 第三节 骨髓间充质干细胞及其分化细胞图谱 .....42

**第五章 生殖干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 生殖干细胞的研究意义 .....56
- 第二节 生殖干细胞及其分化细胞图谱 .....57

**第六章 乳腺干细胞及其分化细胞图谱**

- 第一节 乳腺干细胞的特性和分离培养 .....63
- 第二节 乳腺干细胞和乳腺上皮细胞图谱 .....66

## 第七章 羊水来源干细胞及其分化细胞图谱

- 第一节 羊水来源干细胞的分离培养和诱导分化·····103
- 第二节 羊水来源干细胞及其分化细胞图谱·····105

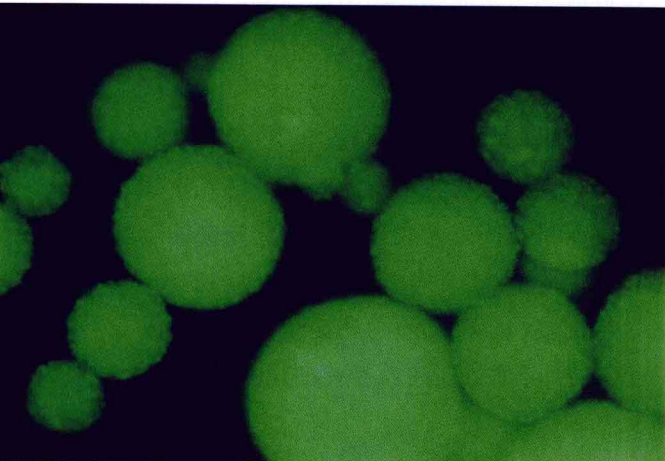
## 第八章 神经干细胞及其分化细胞图谱

- 第一节 神经干细胞的特性和研究意义·····117
- 第二节 神经干细胞的分离培养和诱导分化·····119
- 第三节 神经干细胞及其分化细胞图谱·····122

## 致谢

## 编著者简介





# 导 论 干细胞概述



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3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3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，由于干细胞的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。

## 一、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，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，即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、相互协调的结果，导致基因按照一定的时间和空间顺序表达。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，使后者获得多能分化能力，证明了细胞分化是可逆的，也为通过基因操控调节细胞分化状态开辟了道路。目前，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。

# 二、干细胞的分类

## （一）依据分化潜能分类

### 1. 全能干细胞

全能干细胞 (totipotent stem cell) 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。

### 2. 亚全能干细胞

亚全能干细胞 (pluripotent stem cell) 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3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。

### 3. 多能干细胞

多能干细胞 (multipotent stem cell) 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。

### 4. 单能干细胞

单能干细胞 (unipotent stem cell) 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。

## (二) 根据组织来源分类

### 1. 胚胎干细胞

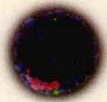
在各种干细胞的研究与应用中, 胚胎干细胞最引人注目。胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 是指由胚胎内细胞团 (inner cell mass, ICM) 或原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 经体外抑制培养而筛选出的细胞。胚胎干细胞具有发育全能性, 在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞; 胚胎干细胞具有在体外无限扩增并保持未分化状态的能力。因此, 它可以在体外大量扩增、筛选、冻存和复苏而不会丧失其原有的特性。

胚胎干细胞主要有以下几个特点: ①具有发育全能性, 在一定的条件下有向 3 个胚层细胞分化的能力, 在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞; ②具有种系传递能力, 能够形成嵌合体动物; ③易于进行基因改造操作, 胚胎干细胞技术和基因打靶技术相结合, 如基因敲除和基因转染已成为研究基因功能的重要手段。胚胎干细胞所具有的这些生物学特性, 使其成为发育生物学中研究细胞分化、组织形成过程的基本体系, 并成为临床细胞替代治疗和移植的新的细胞来源。

胚胎干细胞是从着床前囊胚或早期胚胎生殖细胞中分离得到的高度未分化细胞, 能在体外长期培养和增殖, 具有稳定的二倍体核型, 可表达很高的端粒酶活性, 在适合条件下可分化为胎儿或成体内的各种类型的组织细胞。胚胎干细胞由于容易分离和鉴定, 同时分化和增殖能力比成体干细胞强大, 因此是理想的开展细胞治疗或再生医学研究的种子细胞。但由于在操作中涉及囊胚或胚胎的人工操作甚至破坏, 引起严重的伦理学争议, 因此许多国家禁止进行胚胎干细胞克隆的研究。但美国于 2009 年已经允许人类胚胎干细胞用于研究。

### 2. 核移植胚胎干细胞

核移植胚胎干细胞 (embryonic stem cells via nuclear transfer), 又称治疗性胚胎干细胞,



是利用核移植技术将成体细胞的细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反应的发生，同时引起的伦理学争议也相对较小。

### 3. 诱导多能干细胞

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 细胞) 首先由日本科学家山中伸弥 (Takahashi et al., 2006) 于 2006 年研究成功。把 Oct3/4、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 (Zhao et al., 2009) 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。

### 4. 成体干细胞

成体干细胞 (somatic stem cell) 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 (hepatic stem cell)、肌源性干细胞 (muscle-derived stem cell)、表皮干细胞 (epidermal stem cell)、肠上皮干细胞 (intestinal epithelial stem cell) 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。

人们从自体组织中分离出的成体干细胞，在体外定向诱导分化为靶组织细胞并维持其增殖能力，以达到研究和临床应用的目的。造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞等成体干细胞具有一定的跨系，甚至跨胚层分化的特性，人们称其为干细胞的“可塑性” (plasticity)。成体干细胞的“可塑性”和人胚胎干细胞系的建立是迄今为止干细胞生命科学领域的最重要的研究进展，目前关于成体干细胞可塑性的机制尚不清楚。以神经干细胞向造血细胞分化为例来说，科学家们认为有以下几种可能的机制：①神经干细胞向造血干细胞发生转分化 (trans-differentiate) 或者是横向分化；②神经干细胞发生逆分化 (dedifferentiate) 或者去分化，形成全能或者是多能的干细胞，这种全能或者多能的干细胞进一步向造血细胞分化；③神经干细胞可能并不存在真正的可塑性，只是在分离的神经干细胞中含有少量的多能或全能干细胞，造血干细胞正是来源于这些少量存在的多能或者是全能的干细胞。

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。

### 5. 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，称为肿瘤干细胞（cancer stem cell）。肿瘤干细胞决定着肿瘤的发生、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

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（pancreatic stem cell）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。

## 三、干细胞的鉴定

干细胞分离纯化后，进一步培养扩增，在正式用于组织工程种子细胞前还需要进行分

类和鉴定。目前尚没有一种单一、简便的方法可以完成干细胞鉴定,而需要根据干细胞特性进行多方面的综合判断。一般先进行形态观察、碱性磷酸酶(AKP)染色、核型分析,再进行细胞表面抗原和转录因子分析,在干细胞数量较多时可进行分化能力检测。

## (一) 胚胎干细胞鉴定

### 1. 胚胎干细胞来源

胚胎干细胞是来源于特定解剖部位的细胞,相对于成体干细胞而言,分离和鉴定均比较容易。胚胎干细胞包括3种:①胚胎癌性细胞(embryonal carcinoma cell, EC细胞),人类最早认识的胚胎干细胞,是从恶性畸胎瘤组织中分离出来的一种多能干细胞。EC细胞被注入小鼠囊胚中,可形成嵌合体小鼠。但形成嵌合体鼠的比例低。EC细胞核型和染色体结构易发生变异,其特性不稳定,因此限制了应用。②由着床前胚泡的内细胞团(inner cell mass, ICM)分离建系而来的胚胎干细胞,具有全能或亚全能分化潜能。③原始生殖细胞(PGC),由早期胚胎原始生殖嵴细胞分离建系而来,分化潜能可能稍逊于ICM。目前胚胎干细胞一般指ICM细胞和PGC及其细胞系。

### 2. 胚胎干细胞体外培养和建系

自1981年Evans首次建立小鼠胚胎干细胞系以来,人类已经从内细胞团、原始生殖细胞相继建立了多种动物的胚胎干细胞系,技术也相对较为成熟。1998年,人类第一个胚胎干细胞在体外建系成功。

胚胎干细胞的体外培养和建系一般按照以下步骤:①采用免疫法、机械法、胰酶消化法等方法将囊胚或胚胎中ICM细胞或PGC与外层的滋养层细胞及其他细胞分离;②在有滋养层细胞(如小鼠胚胎成纤维细胞)的环境中进行培养,滋养层细胞有促进胚胎干细胞增殖并抑制其分化的作用,有时需加入抑制分化的其他因子(如白血病抑制因子);③去除分化的干细胞,反复传代。

### 3. 胚胎干细胞鉴定

体外培养的胚胎干细胞或细胞系需进行鉴定,鉴定的依据是干细胞特有的一系列生物学特征,包括以下几个方面。

#### (1) 形态学特点

胚胎干细胞形态与早期胚胎细胞相似,体积小,核大而明显,有一个或多个核仁,细胞中多为常染色质,核质比例高。在体外培养时呈集落状生长,细胞排列紧密,集落内细胞间界限不清,集落呈岛状或巢状生长,与滋养层细胞之间界限明显。

#### (2) 碱性磷酸酶(AKP)

AKP活性是鉴定胚胎干细胞分化与否的重要标志,未分化的胚胎干细胞AKP呈阳性,染色后显微镜下呈棕色,已分化的细胞呈弱阳性或阴性,染色后显微镜下颜色浅或不显色。

### (3) 核型

胚胎干细胞具有稳定的二倍体核型，并且在体外长期传代后仍然保持这种正常核型，这一点与肿瘤细胞或其他细胞建系永生生化后核型变为非二倍体核型有根本区别。例如，Thomson 等 (1998) 分离的人类第一个胚胎干细胞系在体外培养 6 个月后，染色体核型依然为正常的二倍体。

### (4) 端粒酶活性

胚胎干细胞高表达端粒酶。端粒是指染色体末端的 TTAGGG 重复序列，它在细胞的每一次分裂后都会变短，但可被端粒酶修复，其长度反映细胞的分裂能力、衰老状况或寿命。正常成体细胞不表达端粒酶或活性较低，细胞经 50 ~ 80 代分裂后即进入衰老状态。著名的世界首例克隆羊“多莉”寿命只有正常羊的一半，其细胞端粒长度检测结果表明比正常的羊短 20%。生长活跃的胚胎细胞和肿瘤细胞高表达端粒酶。胚胎干细胞也高表达端粒酶，且随着细胞传代端粒酶活性不降低，即使分裂 200 ~ 300 代仍表现为高端粒酶活性，使它能保证子代细胞的染色体长度正常，在体外培养时长期保持未分化状态和高增殖活力。

### (5) 细胞表面抗原

胚胎干细胞具有表达早期胚胎细胞或生殖细胞特异性抗原的特性。不同来源的胚胎干细胞表面抗原存在明显的种属差异。小鼠胚胎干细胞表达阶段特异性胚胎抗原-1(SSEA-1)，但并不表达 SSEA-3 和 SSEA-4。灵长类胚胎干细胞则表达 SSEA-3、SSEA-4、高分子糖蛋白(TRA-1-60、TRA-1-81)。人 EG 细胞也表达 SSEA-1，胚胎干细胞分化后 SSEA-1 表达增高。

### (6) 转录因子 Oct4

Oct4 是多分化潜能细胞特有的转录因子之一，对细胞的发育全能性十分重要，仅在卵母细胞、分裂早期胚胎、内细胞团、原始外胚层和原始生殖细胞中表达。胚胎干细胞表达 Oct4 是其保持分化全能性的标志之一，细胞分化后，Oct4 表达迅速下降。

### (7) 分化能力

检测胚胎干细胞分化能力的方法有两种。第一种方法是畸胎瘤试验：将 ES 细胞注射到免疫缺陷小鼠的皮下，可产生畸胎瘤，畸胎瘤中的细胞类型很多，涵盖了 3 个胚层，如肠上皮(内胚层)，骨、软骨、平滑肌细胞(中胚层)，神经上皮、复层鳞状上皮(外胚层)。第二种方法是自分化试验：ES 细胞有很强的自分化能力，在无滋养层细胞或缺乏分化抑制因子的培养条件下，细胞自发分化形成类胚体(embryoid body, EB)，可检测到甲胎蛋白(AFP)和促绒毛膜激素(HCG)等分化细胞的标志物；EB 细胞继续分化可形成 3 个胚层的细胞类型，但其种类没有畸胎瘤内的细胞多。

## (二) 成体干细胞鉴定

成体干细胞主要有两种来源。第一，从各种成体组织中分离纯化获得，如从骨髓中分

离造血干细胞和骨髓间充质干细胞、从肝脏组织分离肝脏干细胞等。从组织中直接分离的困难在于：干细胞在成体组织中含量极少（如 10 000 ~ 15 000 个骨髓细胞中仅有 1 个是造血干细胞）；分离得到的细胞往往是多种细胞的混合体；许多成体干细胞缺乏特异性标志物。第二，由胚胎干细胞在适宜的诱导条件下（如添加特异性诱导因子、与诱导组织或细胞共培养、转入特殊基因等）定向分化为特定成体干细胞。

与胚胎干细胞鉴定有相对统一的标准不同，成体干细胞鉴定要困难得多。不同成体干细胞的特点和鉴定依据都不同，除了要具有多能或单能分化能力（但不具备全能分化能力）、增殖能力、自我更新能力 3 大基本要素外，形态和生长特性、表面标志物、体内外定向分化能力随成体干细胞种类的不同而有较大的差别。下面以造血干细胞、间充质干细胞和神经干细胞为例进行说明。

### 1. 造血干细胞鉴定

造血干细胞 (HSC) 有几种来源：①直接从骨髓采集、分离；②注射造血细胞因子后从外周血采集、分离；③从新生儿脐带血中采集；④从胎儿肝脏采集、分离；⑤从胚胎干细胞定向分化为造血干细胞。

HSC 的鉴定依据是：①没有明确的形态学特征，其形态、大小与普通淋巴细胞很相似；②绝大多数 HSC 处于静止期 ( $G_0$  期)，对活体染料（如线粒体染料罗丹明 113、DNA 结合染料 Hoechst 33342 等）拒染；③不表达系特异性抗原 (lineage specific antigen, Lin 抗原，包括粒-单系的 CD13、CD14，红系的 CD91，B 淋巴细胞系的 CD19，T 淋巴细胞系的 CD3，NK 细胞的 CD59)、CD33、CD38、HLA-DR 等标志物，但常表达 CD34、CD133、Sca-1 和 ABCG2 等分子；④可进一步增殖分化为各系造血祖细胞、前体细胞和成熟血细胞。

### 2. 间充质干细胞鉴定

间充质干细胞 (MSC) 的来源：①从骨髓、脐带血、脂肪或其他组织中采集、分离，方法有贴壁法、超速离心法、流式细胞仪分选法、磁珠分离法等，其中，脂肪中 MSC 数量远高于骨髓；②从胚胎干细胞定向分化为 MSC。

MSC 的鉴定依据是：①体外培养 MSC 贴壁生长，呈成纤维细胞样生长，细胞密度较高时排列成漩涡状或放射状；②细胞周期分析提示 90% 以上的细胞都处于  $G_0/G_1$  期，这与其他类型的干细胞一致；③不表达造血细胞的表面标记，包括 CD34、CD45、CD31、CD133、GlyA、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表面标记，也不表达或极低表达 MHC-II、MHC-I、FasL、CD40、CD40L 等分子；④表达 CD29、CD44、CD105、CD73、CD166、CD13、SH4、CD49b、CD49e 等分子；⑤在适宜分化条件下，可向成骨、成软骨、成脂肪及其他细胞方向分化。

### 3. 神经干细胞鉴定

神经干细胞来源：①从神经组织（大脑、脊髓）中采集、分离；②从胚胎干细胞诱导分化为神经干细胞。

神经干细胞鉴定的依据是：①体外培养时呈圆形或椭圆形，无或有较短的突起，核浆比大，从形态上无法鉴定；②表达特异性抗原 Nestin、Musashi-1、巢蛋白、Notch1、胶原纤维酸性蛋白 (GFAP)；③有电生理活性，表达电压控制性  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  通道和一系列神经递质的功能受体；④可向多种神经功能细胞分化，如神经元细胞（表达神经元特异性烯醇化酶、神经丝、NeuN、 $\beta$ -tubulin III、微观相关蛋白 II 等）、星形胶质细胞（表达神经胶质纤维酸性蛋白）和少突胶质细胞（表达半乳糖脑苷脂、2, 3- 环核苷酸二酯酶、髓磷脂碱性蛋白等）；⑤用有限稀释法或 BrdU 掺入法，可证实神经干细胞有形成克隆的能力和增殖活性。

### （三）肿瘤干细胞鉴定

肿瘤干细胞鉴定依据主要有以下几个方面。

#### 1. 细胞形态

培养的肿瘤干细胞多呈多角形，大小异质性明显，核浆比例倒置，有丰富的三极或多极有丝分裂，核仁清晰、多个，微丝、微管排列紊乱。

#### 2. 细胞生长特性

体外培养的肿瘤干细胞呈悬浮球状生长，并且可连续传代；在传代的后期更易形成悬浮球状生长，生长速度更快。通过有限稀释实验和亚克隆培养分析发现所有亲本肿瘤球制成的细胞悬液都再次形成肿瘤球，且与亲本肿瘤球完全相同，提示肿瘤干细胞具有自我更新和增殖能力。肿瘤干细胞转移至含血清的培养基中培养 7 d 左右，便不再或极少表达 Nestin 和 CD133，而这两种标记物现在普遍被认为是在干细胞或是祖细胞中表达的，表明肿瘤干细胞具有多向分化潜能。

#### 3. 核型分析

肿瘤干细胞染色体数和结构异常，大多为异倍体，并可出现异常的标记染色体。

#### 4. 细胞表面标志鉴定

根据已知的肿瘤干细胞表面标志进行鉴定最为方便。常用方法有流式细胞术、激光共聚焦免疫荧光、组织化学等。常用的标志物有 CD133、CD117、CD34、Nestin、Nanog、Oct4 等，随肿瘤干细胞的种类不同而选用相应的标志物组合。目前仍有许多肿瘤干细胞因未找到相对特异的标志物而未能分离和鉴定。



### 5. 体内致癌试验

将肿瘤干细胞接种于 NOD/SCID 小鼠，可以产生新的肿瘤；分离出的肿瘤干细胞再打入动物体内仍可产生具有异质性癌细胞的肿瘤，并可多次重复，得到的肿瘤块表型与原代移植物一样。所以利用 NOD/SCID 小鼠移植试验可对分离得到的肿瘤干细胞是否具有自我更新和致瘤性的能力进行全面的鉴定。

## 四、干细胞增殖和分化的调控

### (一) 内源性调控

干细胞自身有许多调控因子可对外界信号起反应，从而调节其增殖和分化，包括调节细胞不对称分裂的蛋白质、控制基因表达的核因子等。另外，干细胞在终末分化之前所进行的分裂次数也受到细胞内调控因子的制约。

#### 1. 细胞内蛋白质对干细胞分裂的调控

干细胞分裂可能产生新的干细胞或分化的功能细胞。这种分化的不对称是由于细胞本身成分的不均等分配和周围环境的作用造成的。细胞的结构蛋白，特别是细胞骨架成分对细胞的发育非常重要。如在果蝇卵巢中，调控干细胞不对称分裂的是一种称为收缩体的细胞器，包含有许多调节蛋白，如膜收缩蛋白和细胞周期素 A。收缩体与纺锤体的结合决定了干细胞分裂的部位，从而把维持干细胞性状所必需的成分保留在子代干细胞中。

#### 2. 转录因子的调控

在脊椎动物中，转录因子对干细胞分化的调节非常重要。比如在胚胎干细胞的发生中，转录因子 Oct4 是必需的。Oct4 是一种哺乳动物早期胚胎细胞表达的转录因子，它诱导表达的靶基因产物是 FGF-4 等生长因子，能够通过生长因子的旁分泌作用调节干细胞以及周围滋养层的进一步分化。Oct4 缺失突变的胚胎只能发育到囊胚期，其内部细胞不能发育成内层细胞团。另外白血病抑制因子 (LIF) 对培养的小鼠 ES 细胞的自我更新有促进作用，而对人的成体干细胞无作用，说明不同种属间的转录调控是不完全一致的。又如 Tcf/Lef 转录因子家族对上皮干细胞的分化非常重要。Tcf/Lef 是 Wnt 信号通路的中间介质，当与  $\beta$ -Catenin 形成转录复合物后，促使角质细胞转化为多能状态并分化为毛囊。

### (二) 外源性调控

干细胞的分化还可受到其周围组织及细胞外基质等外源性因素的影响。