

干细胞临床应用

——基础、伦理和原则

主编 金坤林

The Basis, Ethics
and Principles of
Clinical Applications of
Stem Cells



科学出版社



干细胞临床应用

——基础、原理与策略

王健 王健

The Basics, Principles
and Principles of
Clinical Application of
Stem Cells

王健 王健

干细胞临床应用 ——基础、伦理和原则

**The Basis, Ethics and Principles of Clinical
Applications of Stem Cells**

主 编 金坤林
副主编 徐 运 高维强

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

随着人类胚胎干细胞研究成为 21 世纪再生医学领域的热点,人类胚胎干细胞研究中的伦理问题,以及如何加强这一研究领域的规范和科学管理来防止干细胞技术的滥用显得非常重要。鉴于目前我国尚缺乏具体实施细则,因此,本书介绍了干细胞研究的基本知识和临床应用的最新成果,汇集了各国干细胞应用的管理法规和技术标准,系统讨论了干细胞临床应用伦理和原则,并从不同侧面探讨了干细胞研究临床转化过程中的问题和注意事项。希望本书能够为提高干细胞研究向临床转化过程中的规范化提供指导。本书可供干细胞临床研究相关人员阅读。

图书在版编目(CIP)数据

干细胞临床应用:基础、伦理和原则 / 金坤林主编. —北京:科学出版社, 2011

ISBN 978-7-03-032082-7

I. 干… II. 金… III. 干细胞-临床应用-研究 IV. Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 167096 号

责任编辑:向小峰 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

双青印刷厂 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:17 1/2 插页:2

印数:1—2 000 字数:411 000

定价:88.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

谨以此书献给中国所有残障者

《干细胞临床应用——基础、伦理和原则》编写人员

主 编 金坤林

副主编 徐 运 高维强

编 者 (按姓氏汉语拼音排序)

常蕾蕾	陈 伟	陈燕婷	程一帆
邓桂英	韩丽娟	黄偲元	江文静
金佳丽	李 佳	刘 蓉	马 午
茅肖鸥	牛丰南	潘 洁	钱 来
邵 蓓	孙 芬	汤耀辉	汪 铮
王 虹	王柳清	吴 萍	吴建波
杨国源	叶 兰	张 悦	张梅娟
诸葛启钊			

前 言

干细胞(stem cell)是体内具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞。根据发育阶段,干细胞又可分为胚胎干细胞和成体干细胞。随着干细胞技术的飞速发展,干细胞不仅可以在体外培养、扩增,而且可以通过定向诱导、基因修饰等生物工程技术,使其分化成人类所需要的各种组织细胞。将这些组织特异的干细胞植入体内后,可以代替体内因各种原因造成损伤或功能缺失的组织细胞,使其恢复正常功能,从根本上治愈疾病。

一般来说,许多无法治愈的疾病都是由于人体内某种特定类型的细胞缺失、损伤、死亡或者功能丧失而引起的,包括衰老相关的慢性疾病(如老年痴呆症、帕金森病、糖尿病、心力衰竭、骨关节炎等)以及许多急性疾病。利用干细胞技术,有望从根本上治疗这些顽症。有些科学家相信,通过具有完整功能的细胞来替代受损或者功能缺失的细胞,即用干细胞或干细胞的衍生物进行治疗,可攻克临床上的大多数疾病。因此有科学家预言“20 世纪是药物治疗的时代,21 世纪将是细胞治疗的时代”。以干细胞治疗为主导的再生医学将使传统临床医疗模式产生具有革命性意义的变化。

然而,任何新生事物的出现,任何科学探索与发现,不可避免地要带来一系列的难题与困扰,干细胞研究也不例外。由于相关的法律法规寥寥无几,而现存的法律法规尚有待完善,难免会出现类似韩国胚胎干细胞造假丑闻等事件的发生。鉴于此,许多国家和地区已经颁布了有关干细胞应用的法规。美国食品和药品管理局已经颁布了干细胞全面管理生产过程的指导规范。欧盟、日本和我国台湾省也颁布了相应法规。目前中国干细胞的应用已经逐渐推广,但还缺乏标准法规和统一的技术标准。虽然在 2008 年,中国卫生部出台了几项重要法规,要求任何从事干细胞研究的机构或个人必须具有相关资质以及卫生部签发的资格证明,但尚缺乏具体实施细则。2010 年《自然》杂志刊登社论《中国干细胞法律尚存不足》。文中赞赏了中国政府在干细胞相关法律制定上所作的努力,同时也指出相关法律尚存不足。目前国内许多医院都希望开展干细胞临床应用,但对干细胞治疗缺乏系统了解,对于干细胞治疗中可能出现的问题尚缺乏必要的思想准备。若一哄而上进行干细胞治疗项目,必将严重扰乱干细胞治疗市场,不仅不利于干细胞产业的良性发展,而且会对人民群众的健康造成不利影响。一些未经试验的疗法不仅使患者处于危险之中,还危及所有合法地向临床转化的干细胞研究。因此,迫切需要干细胞治疗行业规范和知识普及,让广大医务工作者、政府和医院的行政领导充分认识对于干细胞研究和治疗的发

展方向、科研成果以及完成动物实验之后用于人体时的管理、医疗以及医务人员资质、伦理学论证、患者知情同意等诸方面进行规范化重要性。

为此,我们编写了《干细胞临床应用——基础、伦理和原则》。本书力求能够反映干细胞研究的基本知识和干细胞治疗临床疾病的最新研究成果,汇总分析各国干细胞治疗的相关准则和法规,以及有关干细胞应用的伦理思考。本书分为九章,第一章、第二章介绍了有关干细胞的基础知识、干细胞临床应用及干细胞治疗可能产生的副作用;第三章和第四章介绍了干细胞研究中的伦理问题和相应的机构审查委员会机制;第五章到第九章从不同侧面描述了干细胞研究临床转化过程中的问题和注意事项。

希望本书能够为提高干细胞研究向临床转化过程中的规范化提供指导,让干细胞临床应用尽早规范化。

金坤林

2011年4月21日

于美国旧金山

目 录

第一章 干细胞基础知识	(1)
1.1 干细胞	(1)
1.2 胚胎干细胞	(2)
1.3 成体干细胞.....	(11)
1.4 神经成体干细胞.....	(14)
1.5 骨髓造血干细胞.....	(18)
1.6 骨髓基质细胞.....	(26)
1.7 内皮前体细胞.....	(27)
1.8 骨骼肌干细胞	(28)
1.9 皮肤和消化系统中的上皮干细胞.....	(29)
1.10 胰腺和肝脏干细胞	(29)
1.11 视网膜干细胞	(30)
1.12 乳腺干细胞	(30)
1.13 睾丸干细胞	(32)
1.14 骨髓源性干细胞	(32)
1.15 诱导性多能干细胞	(33)
1.16 胚胎生殖细胞	(36)
1.17 胚胎癌细胞	(37)
第二章 干细胞临床应用及挑战	(40)
2.1 干细胞移植治疗糖尿病.....	(40)
2.2 干细胞移植治疗心血管疾病	(45)
2.3 利用干细胞修复神经系统.....	(51)
2.4 干细胞移植治疗自身免疫性疾病.....	(58)
2.5 造血干细胞的临床应用.....	(59)
2.6 干细胞和癌症研究.....	(61)
2.7 利用转基因干细胞做实验性基因治疗.....	(66)
2.8 制备多能干细胞的替代方法.....	(71)
2.9 诱导性多能干细胞：重排成体细胞使其成为多能干细胞	(77)
2.10 多能干细胞的其他来源	(79)
2.11 干细胞临床应用潜在问题——肿瘤	(79)
第三章 干细胞临床应用伦理原则	(82)
3.1 医学道德发展简史.....	(82)
3.2 伦理的基本原则.....	(83)
3.3 干细胞来源引发的伦理问题.....	(87)

3.4	中国有关人胚胎干细胞的伦理与法规	(92)
3.5	干细胞临床试验总体原则	(93)
3.6	干细胞临床应用条件	(96)
3.7	脆弱人群的干细胞临床试验的理论问题	(97)
3.8	儿童患者的临床试验的理论问题	(98)
3.9	孕妇患者临床试验的理论问题	(100)
3.10	如何判断干细胞临床研究符合伦理要求	(101)
第四章	机构审查委员会	(102)
4.1	机构审查委员会的定义	(103)
4.2	机构审查委员会与临床伦理委员会的区别	(103)
4.3	机构审查委员会的组成	(103)
4.4	机构审查委员会必须解决的两个基本问题	(104)
4.5	临床试验伦理审查的工作程序	(105)
4.6	临床试验伦理审查的具体内容	(108)
4.7	机构审查委员会的决定传达	(109)
4.8	机构审查委员会如何落实知情同意原则	(110)
4.9	豁免型计划	(110)
4.10	机构审查委员会的责任	(111)
4.11	机构审查委员会书面规程指导(美国人类研究保护办公室)	(112)
4.12	机构审查委员会研究方案评审申请表模板	(117)
第五章	干细胞临床应用原则	(120)
5.1	临床试验	(120)
5.2	行医与科研的分界	(120)
5.3	干细胞治疗临床前期研究	(121)
5.4	干细胞临床应用内容	(123)
5.5	临床试验协议	(124)
5.6	干细胞临床试验研究者手册	(125)
5.7	负责临床试验的研究者应具备的条件	(126)
5.8	研究者的职责	(126)
5.9	申办者职责	(127)
5.10	监察员的职责	(128)
5.11	干细胞的提取和加工分析证书	(129)
5.12	干细胞临床试验记录和数据管理	(131)
5.13	干细胞临床试验不良事件报告	(132)
5.14	干细胞临床试验延长/进展报告	(133)
5.15	临床试验完结报告	(134)
5.16	临床试验保存文件	(134)
5.17	临床试验中存在的主要问题	(136)
5.18	干细胞研究知识产权	(136)

第六章 知情同意书	(140)
6.1 正确理解知情同意权的内涵和意义	(140)
6.2 知情同意权代理	(142)
6.3 同意及同意权的行使	(143)
6.4 临床研究人体试验、试验性治疗和教学实习的告知与同意.....	(144)
6.5 紧急情况下免除临床试验获得知情同意的要求	(145)
6.6 脆弱人群的知情同意	(146)
6.7 知情同意的过程中存在的问题	(147)
6.8 干细胞临床研究同意书模板	(148)
第七章 干细胞的采集处理及干细胞库的规范程序	(151)
7.1 干细胞库	(151)
7.2 干细胞库生产质量和安全规范	(152)
7.3 规范化建立用于临床治疗的成体干细胞库	(153)
7.4 用于临床的胚胎和诱导性多能干细胞库的建立与规范化	(159)
7.5 临床使用的干细胞收集标准	(164)
7.6 临床试验的干细胞加工工序	(169)
7.7 干细胞超低温贮存	(171)
7.8 干细胞贮存条件	(171)
7.9 干细胞运输	(173)
7.10 干细胞分发前注意事项.....	(174)
第八章 国际干细胞临床应用指南	(175)
8.1 美国干细胞临床应用指南	(175)
8.2 国际干细胞研究学会《干细胞临床转化指南》	(181)
8.3 印度干细胞临床应用指南	(191)
8.4 日本人干细胞应用临床相关指南	(201)
第九章 患者的权利和常见问题	(215)
9.1 患者的权利和责任	(215)
9.2 知情同意和受试者合理通知常见问题	(218)
9.3 临床研究常见问题	(222)
9.4 从临床试验发展到标准的临床治疗是一个极为复杂、艰苦的过程.....	(225)
9.5 临床试验各阶段的区别	(226)
9.6 参加临床试验常见问题	(229)
9.7 临床试验中的对照试验和随机原则	(235)
9.8 隐私权	(238)
9.9 公平补偿和免费治疗	(238)
9.10 患者手册.....	(238)
附录	(243)
附录1 《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》.....	(243)
附录2 《涉及人的生物医学研究伦理审查办法(试行)》.....	(244)

附录 3 《赫尔辛基宣言》——涉及人体对象医学研究的道德原则	(247)
附录 4 《生物医学研究审查伦理委员会操作指南》	(250)
附录 5 《纽伦堡法典》	(258)
附录 6 《人体生物医学研究国际伦理指南》	(258)
附录 7 药物临床试验质量管理规范	(263)

彩图

第一章 干细胞基础知识

1.1 干细胞

1.1.1 干细胞的定义

干细胞(stem cell)是一类特殊的细胞,其生物学特征既具有自我更新的能力(self-renewal),又具有多向分化的潜能(multilineage differentiation)。干细胞的“干”,译自英文“stem”,意为“主干”和“起源”。如同一棵树干可以长出树杈、树叶,并开花、结果,干细胞也可以在机体生命过程中无限期分裂,并在合适的条件或给予恰当的条件后,能分化产生多种不同的细胞类型。某些干细胞可定向分化,发育成熟为一种特定细胞或限于某种功能的细胞,如心肌细胞、皮肤细胞、神经细胞等。某些干细胞定向性不强,但具有分化成多种类型细胞的潜能。

干细胞的生物学特性决定了其广泛的应用价值。一方面,干细胞可以在体外培养环境中无限增殖,经过 10 余年的研究,已建立了一套成熟规范的干细胞体外培养体系;另一方面,干细胞是一种具有多分化潜能的细胞,只要在体外培养环境中给予一定的诱导条件,干细胞便可定向分化为特定类型的细胞,可用来修复器官中退化或者损伤的细胞和组织。干细胞自我更新和分化成各种特定细胞和组织的双重能力给再生医学带来了巨大希望。此外,干细胞可以作为治疗性克隆的研究材料及人类疾病的研究模型,广泛应用于再生医学、细胞替代治疗及药物筛选等研究领域。当今医学界面临的许多疾病,如帕金森病、阿尔茨海默病、心肌梗死、糖尿病和免疫功能障碍等,均涉及细胞、组织乃至器官的坏死。如果科学家能够准确掌握胚胎干细胞向不同组织细胞定向分化的条件和机制,进而在体外进行干细胞培养,或者在体外培育出整个器官,然后移植到患者体内替代受损的细胞、器官等,无疑将是医学史上的重大创举。

1.1.2 干细胞的分类

干细胞可以根据其分化潜能进行分类。就人类干细胞而言,可以分为:

- (1) 全能干细胞:可以分化成为人体任何细胞类型。
- (2) 多能干细胞:可以分化成几种特定类型的人体细胞。
- (3) 专能干细胞:只能分化成一种人体细胞。

目前人干细胞的主要来源或者潜在来源如下:

- (1) 胚泡,可以提供多能干细胞。
- (2) 胎儿组织,可以提供多能或者专能干细胞(也称专能、偏能干细胞)。
- (3) 脐带血,可以提供专能干细胞。
- (4) 成人组织,可以提供专能干细胞。

1.1.3 干细胞分化潜能的基本概念

全能性干细胞(totipotent stem cells)具有与早期胚胎细胞相似的形态特征和很强的分化能力,可以无限增殖并分化成为全身 200 多种细胞类型,进一步形成机体的所有组织、器官。受精卵是全能干细胞,因为它具有分化产生所有组成胚胎及子宫内支持组织或细胞的潜能,能不断地分裂、分化,直至形成一个成熟的机体。包括人类在内的成体哺乳动物体内约含有 200 种细胞类型,如神经细胞(神经元)、肌肉细胞、皮肤细胞(表皮细胞)、血细胞(红细胞、单核细胞、淋巴细胞等)、骨细胞、软骨细胞等。另有一些对胚胎发育至关重要、属于胚胎附属物的细胞,包括胚胎外组织胎盘和脐带等,而所有这些细胞都来自单个全能细胞——受精卵。

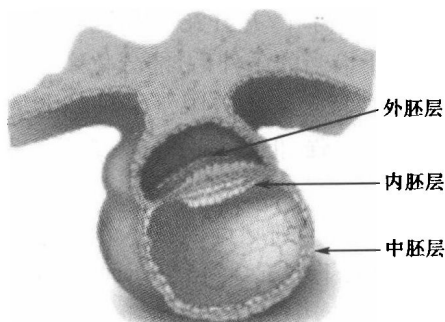


图 1-1 三个胚层组织

多能性干细胞(pluripotent stem cells)是指干细胞分化产生三个胚层的组织和细胞的能力(图 1-1, 书末彩图 1)。外胚层、中胚层和内胚层是体内所有细胞的来源。“pluri”在拉丁文中是“很多”的意思。多能细胞有分化产生任何细胞类型的潜能,这一特性已在胚胎发育的自然过程中和一些实验条件下得到证实。

专能干细胞(unipotent stem cells),常被用于描述成体内的某个细胞,表示该细胞有分化为一个细胞系的潜能。在拉丁文中“uni”是“一个”的意思。同时,在通常情况下因只分化产生一种细胞类型,故专能干细胞也被用来描述许多已分化的、未受损的组织中的成体干细胞,这涉及组织在稳态下的自我更新过程,一旦组织受损,需要更新多种细胞时,专能干细胞就能被激活而修复受损组织。

1.2 胚胎干细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)是从早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内环境中,胚胎干细胞都能被诱导分化为机体内几乎所有的细胞类型。因此,胚胎干细胞被认为是细胞替代治疗中最有应用潜力的资源之一。

1.2.1 胚胎干细胞来源

胚胎干细胞是在胚胎发育早期——囊胚(受精后 5~7 天)中未分化的细胞。一个囊胚约含有 140 个细胞,外表是一层扁平细胞,称滋养层,可发育成胚胎的支持组织如胎盘等。中心的腔称囊胚腔,腔内一侧的细胞群,称内细胞群(图 1-2, 书末彩图 2),这些未分化的细胞可进一步分裂、分化,并发育成个体。内细胞群在形

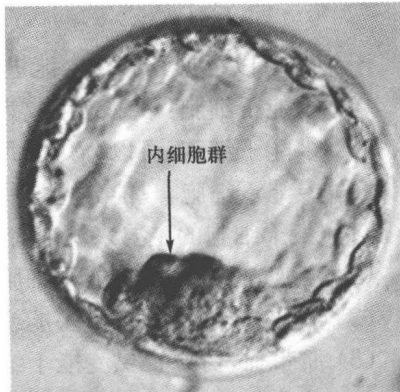


图 1-2 内细胞群

成内、中、外三个胚层时开始分化。每个胚层将分别分化形成人体的各种组织和器官。如外胚层将分化为皮肤、眼睛和神经等组织系统；中胚层将形成骨骼、血液和肌肉等组织系统；内胚层将分化为肝、肺和肠等组织系统。由于内细胞群可以分化发育成完整的个体，因而这些细胞被认为具有全能性。当内细胞群在培养皿中培养时，我们称之为胚胎干细胞。

1.2.2 胚胎干细胞的属性

胚胎干细胞有以下属性：

- (1) 来自内细胞群/囊胚的外胚层。
- (2) 可长时期自我复制——能无限均等繁殖而不分化。
- (3) 表现并保持稳定的、二倍体的、正常的染色体(染色体组型)核型。
- (4) 可分化为外、中、内三个胚层的所有细胞类型。
- (5) 在生长发育过程中，能分化发育为所有的胎儿组织。
- (6) 有生殖细胞的某些特征，能产生卵子或精子细胞。
- (7) 能形成克隆，即单个的胚胎干细胞能产生一组基因上一致的细胞，或者说是克隆，因为这些克隆出来的细胞跟母细胞的属性是一致的。
- (8) 能转录 Oct-4 因子，它能激活或抑制很多靶基因，使胚胎干细胞能持续增殖而不分化。
- (9) 能被诱导性分化或继续增殖。
- (10) 在细胞周期中缺少 G₁ 期检测点，胚胎干细胞在其细胞周期中，大多数处在 S 期，大量合成 DNA。不像其他已分化的体细胞，胚胎干细胞不需要外界的刺激去激发 DNA 复制。
- (11) 不表现 X 染色体失活。在雌性哺乳动物的普通体细胞内，两个 X 染色体中的其中一个会永久失活。X 染色体失活不发生于未分化的胚胎干细胞。

1.2.3 胚胎干细胞多能性

多能性用来表示可分化为内、中、外三个胚层的不同细胞类型的能力，这也是胚胎干细胞的独特之处(图 1-3，书末彩图 3)。那该如何知道这些细胞是多能性呢？检测来自小鼠的胚胎干细胞的多能性的实验标准有三种类型。第一种是以注射的方式把来自一个囊胚内细胞群的胚胎干细胞植入另一个囊胚的囊胚腔内。这个组合胚胎随后被导入一个假孕的雌鼠体内，代孕雌鼠生下的其实是个嵌合体。该嵌合体的组织和器官细胞来自供体的胚胎干细胞和受体的囊胚。

该实验被扩展到观察研究体外培养的胚胎干细胞是否能代替小鼠囊胚的内细胞群并形成正常胚胎。事实证明培养的

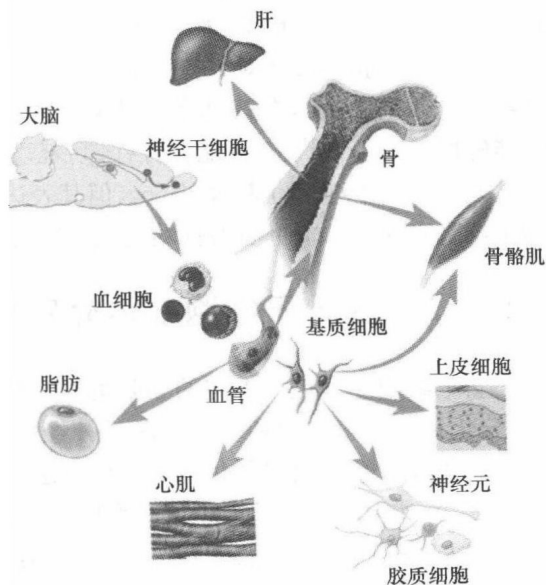


图 1-3 胚胎干细胞多能性

胚胎干细胞也可以,但不及前述方法有效。显然,胚胎干细胞形成完整胚胎的能力依赖于它们在体外的传代能力。传代是指把一个培养皿中的细胞移入另一个新鲜的培养皿进行培养。传代次数是否影响人类胚胎干细胞的分化能力尚有待确定。

第二种测定小鼠胚胎干细胞多能性的方法是把细胞注入成鼠体内(皮下或肾小囊),这些成鼠或者与植入细胞基因统一,或者有免疫缺陷,以确保植入细胞不被鼠体排斥。在宿主动物体内,植入的胚胎干细胞能分化发育为一种称为畸胎瘤的良性肿瘤。在显微镜下观察,畸胎瘤中同时含有来自原始三胚层的细胞类型。典型的畸胎瘤含有如上皮、平滑肌、骨骼肌、心肌、神经组织、骨、软骨等结构,有时甚至能看到头发。如此,在体外保存很长时间的胚胎干细胞便能在体内表现其多能性。它们可以通过在体内分化为任何细胞类型而参与正常的胚胎形成,也可以在动物成体内分化为各种细胞类型。但在正常情况下,小鼠胚胎干细胞并不能以这种方式在体内产生滋养层。

第三种方法是让体外培养的小鼠胚胎干细胞自发分化,或通过特殊培养条件诱导其分化。前者是去掉培养皿中的饲养层,加入白血病抑制因子(LIF),改变培养环境几天后,胚胎干细胞数量增加,并产生拟胚体(EBs)。拟胚体由不规则的分化或部分分化的细胞组成,这些细胞类型同样是来自三个原始胚层的。培养皿中的拟胚体在很多方面都跟实验动物体内观察到的畸胎瘤相似。

1.2.4 胚胎干细胞如何保持未分化状态

胚胎干细胞具备分化为体内所有细胞类型的能力,是让科学家多年着迷的原因,但令人费解的是:究竟是什么因子导致一个细胞既具有多能性又能同时限制其他细胞的分化能力?时至今日,在这两个主要研究领域已找到些许线索。一为观察分泌因子效用的实验,另一为涉及转化因子的研究领域,如 Oct-4。转录因子 Oct-4 曾被当作胚胎干细胞、多能干细胞的关键标志物,并且 Oct-4 的表达能力能保持在一定水平,从而维持胚胎干细胞处于未分化状态。但仅仅依靠 Oct-4 并不足以维持胚胎干细胞的未分化状态。最近,两个研究小组发现了另一种转录因子——Nanog, Nanog 对维持小鼠胚胎干细胞的未分化状态具有重要作用。随着小鼠胚胎干细胞不断分化, Nanog 的表达水平迅速下降,而如果维持 Nanog 表达水平时,小鼠胚胎干细胞仍能够保持未分化状态,并能在含有骨形态发生蛋白(BMPs)或 LIF 的无血清培养基中持续增殖。人类胚胎干细胞也表达 Nanog,但其表达水平相对于 Oct-4 来说要低得多。另外,人类胚胎干细胞中的 Nanog 究竟有何功能还有待研究。

1.2.5 胚胎干细胞在体外定向分化

胚胎干细胞能分化为不同的细胞类型。例如,胚胎干细胞就能在体外定向分化为血管结构,分化为分泌多巴胺和 5-羟色胺的神经元,或分化为能分泌胰岛素的胰岛细胞等。

目前诱导干细胞定向分化的最常用方法是通过某种特殊方式改变胚胎干细胞的生长条件,如向培养基中加入生长因子或改变胚胎干细胞生长的表层化学成分。例如,通常用来培养小鼠或人的胚胎干细胞的塑料培养皿,经很多物质处理后,能使细胞在培养皿中贴壁生长或悬浮生长。总之,黏着物质可阻止细胞间相互作用,从而阻止细胞分化。相反,另一些非黏着物质可以使胚胎干细胞增殖并相互作用。而细胞间的相互作用对胚胎的正常发育是极

为关键的,所以使这种在体内天然的相互作用也能在培养皿中发生,是诱导小鼠或人的胚胎干细胞在体外分化的必要步骤。另外,向培养基中加入某些特殊生长因子会引发胚胎干细胞某些基因的激活或失活,这将诱导细胞以定向分化的一系列分子机制。

另一种使胚胎干细胞定向分化的方法是通过转染等方式引入外部基因。如此便能向胚胎干细胞基因组中加入一个激活基因,此基因可引导细胞依某种方式定向分化。这个方法看上去是一个调控胚胎干细胞定向分化的精确方法,但是它只在确认靶基因能激活特定分化阶段后才有意义。而且,该基因必须在适当的时间点被激活,就是说激活过程必须在细胞分化的正确阶段,并且必须要把它整合到宿主基因组的正确位置。还有一种涉及克隆技术的方法。理论上,已分化的体细胞细胞核可能会因注入一个卵母细胞而重新编码。

目前,已经可以通过在体外操纵胚胎干细胞的生长条件而生产出特殊的、已分化的、有功能的细胞类型。但是仍不能解释定向分化是如何发生的。尚不清楚基因表达是在何时改变、如何改变的;不知道基因信号转导系统是如何被激发的;不知道在把未分化的胚胎干细胞转化为祖细胞,再继续转化为那些形态和功能都与体内细胞一样的已分化细胞时,为什么必须有细胞间相互作用参与其中。

1.2.6 胚胎干细胞培养

小鼠胚胎干细胞和人类胚胎干细胞都可以在含有一层小鼠成纤维细胞(称“饲养细胞”)的培养基中生长(图 1-4)。然而,保持这两种细胞增长的因子是不同的。在培养基中加入细胞分裂素、LIF 能使小鼠胚胎干细胞在没有饲养层细胞的情况下增殖。LIF 可通过激活蛋白 STAT3(一种信号转导和转录激活因子)调控小鼠胚胎干细胞的增殖分化过程。在无血清培养中,单单靠 LIF 来防止小鼠胚胎干细胞分化为神经细胞是不够的。最近报告说,骨形态发生蛋白和 LIF 结合起来足以使小鼠胚胎干细胞不断自我更新。骨形态发生蛋白作用于小鼠胚胎干细胞,需引入分化抑制剂蛋白质,同时需抑制细胞外受体激酶和 p38 丝裂原活化蛋白激酶。然而,血清中的 LIF 并不足以促进人类胚胎干细胞的自我更新, LIF/STAT3 信号通路在未分化状态中的人类胚胎干细胞并不活跃。另外,向人类胚胎干细胞中加入骨形态发生蛋白可能加速人类胚胎干细胞分化。

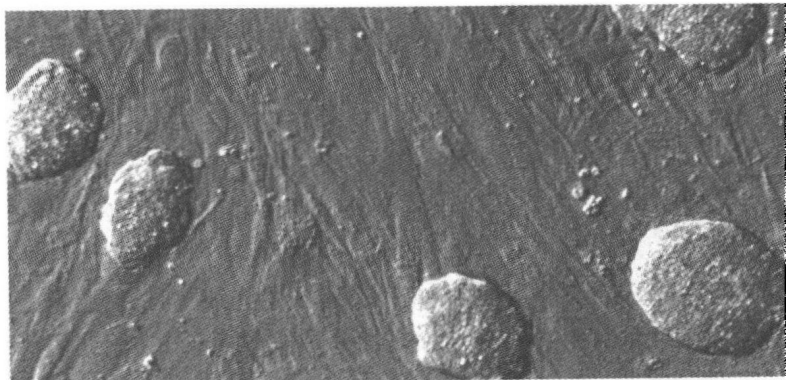


图 1-4 培养的小鼠胚胎干细胞

有几个研究机构曾试图确定维持人类胚胎干细胞特性的生长因子和培养条件,以使人类胚胎干细胞尽量避免与非人类的动物产品的接触。成纤维细胞生长因子-2(fibroblast