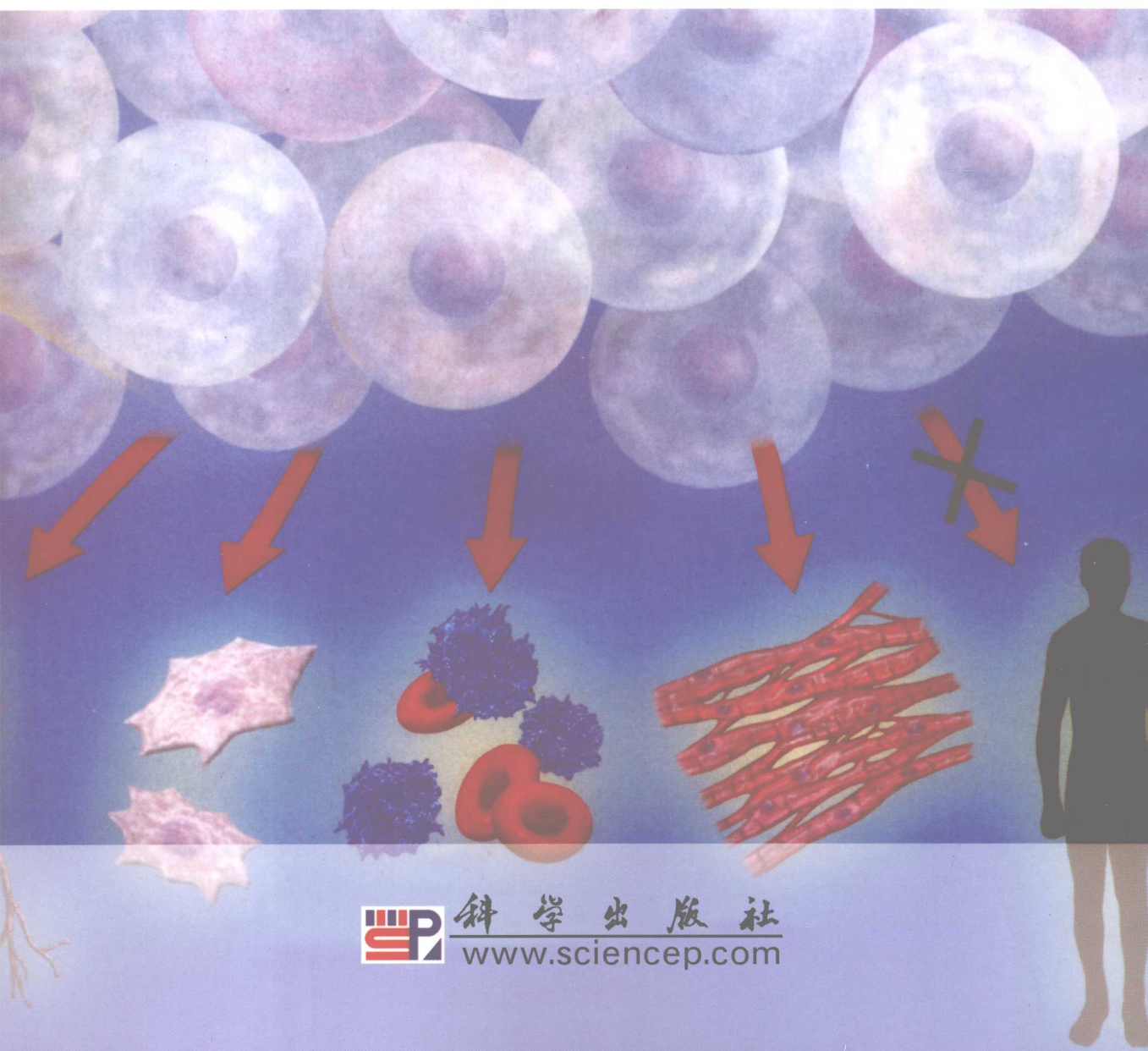


21世纪生物技术丛书

干细胞理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 李力燕 John W. McDonald



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

干细胞理论与技术

(第二版)

主 编 王廷华 李力燕 John W. McDonald

科学出版社

北 京

内 容 简 介

《干细胞理论与技术》是《21 世纪生物技术丛书》的一个分册。该书于 2005 年出版,2006 年进行二次印刷。随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。第二版在第一版基础上,结合当今干细胞的研究进展,补充了干细胞移植、肿瘤干细胞、嗅鞘细胞培养等技术,内容由第一版的 16 章增至第二版的 19 章,从而使该书更全面和更具实用价值。

本书分上、下两篇介绍干细胞的相关理论与培养技术。上篇介绍了胚胎干细胞、视网膜干细胞和其他成体干细胞的研究进展,并对干细胞的组织工程学、人类胚胎干细胞研究及伦理问题进行了介绍。下篇重点介绍了胚胎干细胞、神经干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、视网膜干细胞、皮肤干细胞、肿瘤干细胞等培养技术,并对干细胞移植技术、分化诱导技术和相关的嗅鞘细胞培养技术进行了介绍。

本书可供生物医学专业研究生、本科生以及从事干细胞研究的科研人员阅读和作为实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

干细胞理论与技术/王廷华,李力燕,(美)麦克唐纳德(John W. McDonald)主编. —2 版. —北京:科学出版社,2009

(21 世纪生物技术丛书)

ISBN 978-7-03-023220-5

I. 干… II. ①王… ②李… ③麦… III. 干细胞-研究 IV. Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 162232 号

策划编辑:沈红芬 吴茵杰/责任编辑:农 芳/责任校对:刘小梅

责任印制:刘士平/封面设计:黄 超

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>

骏 杰 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 3 月第 二 版 印张:14 插页:8

2009 年 3 月第三次印刷 字数:322 000

印数:5 001—8 000

定价:44.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴
委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯 华	第三军医大学西南医院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学基础医学院	教授
李成云	云南农业大学植物病理国家重点实验室	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
李建国	上海交通大学医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学医学院	教授
应大君	第三军医大学	教授
沈馨亚	上海交通大学医学院	教授
周 东	四川大学华西医院	教授
赵春华	协和医科大学	教授
胡长林	重庆医科大学	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
姜保国	北京大学医学部	教授
顾晓松	南通大学医学院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
游 潮	四川大学华西医院	教授
蔡文琴	第三军医大学	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授
John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚阿德莱德大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授

《干细胞理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 李力燕 John W. McDonald

副主编 冯忠堂 刘 苏 郝春光

编 委 (按姓氏笔画为序)

王廷华 王鲲鹏 冯忠堂 刘 苏

羊惠君 何 黎 何明生 应大君

李 琴 李力燕 李甫强 李彦林

李海标 杨金伟 杨智勇 周 雪

庞江霞 罗湘颖 赵 楠 郝春光

徐新运 顾 华 梁玉香 黄 冰

黄锦桃 程昊钰 董 俊 撒亚莲

潘兴华 魏 勇 John W. McDonald

第二版总序

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术和需求,科学出版社组织编写了这套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》。本套丛书共有八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。自 2005 年 3 月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于 2009 年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容 20 余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础。感谢国内外一批知名专家教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者所付出的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

2009 年 1 月

第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 月 8 日

目 录

上篇 干细胞研究进展

第一章 胚胎干细胞及其研究进展	(1)
第一节 胚胎干细胞的基本知识	(1)
第二节 胚胎干细胞的生物学特性	(5)
第三节 胚胎干细胞的可塑性	(9)
第四节 胚胎干细胞的应用	(15)
第二章 神经干细胞及其研究进展	(20)
第一节 神经干细胞概论	(20)
第二节 神经干细胞培养的方法学进展	(26)
第三节 体外培养神经干细胞的应用	(28)
第三章 造血干细胞及其研究进展	(35)
第一节 骨髓造血干细胞理论	(35)
第二节 骨髓造血干细胞的移植技术	(44)
第四章 骨髓间充质干细胞及其研究进展	(54)
第一节 概述	(54)
第二节 骨髓间充质干细胞的基本概念	(54)
第三节 骨髓间充质干细胞的研究历史	(54)
第四节 骨髓间充质干细胞的生物学特性	(55)
第五节 骨髓间充质干细胞的多向分化潜能	(55)
第六节 骨髓间充质干细胞的应用	(59)
第五章 视网膜干细胞及其研究进展	(62)
第一节 视网膜干细胞的存在部位	(63)
第二节 视网膜干细胞的特性	(67)
第三节 视网膜干细胞增殖与分化的分子机制	(68)
第四节 不同外源性因子对视网膜干细胞的影响	(69)
第五节 结语	(70)
第六章 其他成体干细胞及其研究进展	(72)
第一节 表皮干细胞	(72)
第二节 肝脏干细胞	(75)
第三节 胰腺干细胞	(77)
第四节 肌肉干细胞	(79)

第五节 肠黏膜干细胞	(81)
第六节 肿瘤干细胞	(83)
第七章 干细胞的组织工程学	(86)
第一节 组织工程学的基本概念	(86)
第二节 组织工程学的研究范围	(87)
第三节 组织工程学的种子细胞	(88)
第四节 干细胞在组织工程学相关领域中的应用	(89)
第五节 干细胞在组织工程学中的应用前景及问题	(96)
第八章 人类胚胎干细胞研究及伦理问题	(98)
第一节 人类胚胎干细胞	(98)
第二节 人类胚胎干细胞研究的潜在价值及主要技术难题	(100)
第三节 人类胚胎干细胞研究中引起的伦理争议	(103)
第四节 人类胚胎干细胞研究的伦理建议	(110)
下篇 干细胞培养技术	
第九章 胚胎干细胞培养技术与方法	(116)
第一节 小鼠胚胎干细胞分离培养	(116)
第二节 人类胚胎干细胞的分离培养	(125)
第十章 海马源性神经干细胞的培养、分化及鉴定	(133)
第一节 实验原理	(133)
第二节 材料与方法	(134)
第三节 结果	(138)
第四节 结果分析与讨论	(139)
第十一章 海马源性神经干细胞的培养、分化及其向胆碱能神经元定向诱导分化	(142)
第一节 实验设备、试剂及其配制	(143)
第二节 实验方法	(145)
第三节 结果	(147)
第四节 结果分析与讨论	(148)
第十二章 造血干细胞培养技术	(152)
第一节 骨髓造血干细胞的培养原理	(152)
第二节 骨髓造血干细胞的培养方法	(152)
第三节 结果观察	(159)
第四节 注意事项	(162)
第十三章 骨髓间充质干细胞培养技术及分化诱导研究	(165)
第一节 骨髓间充质干细胞培养	(165)
第二节 丹参注射液诱导骨髓基质细胞分化为神经元的研究	(168)
第三节 脑提取液诱导骨髓基质细胞向神经元分化的研究	(170)

第四节	中药三七总皂苷定向诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞	(172)
第五节	中药川芎嗪定向诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞	(173)
第十四章	GFP 转基因小鼠骨髓间充质干细胞培养纯化及其鉴定	(177)
第一节	材料与方法	(177)
第二节	结果	(180)
第三节	结果分析与讨论	(182)
第十五章	视网膜干细胞的分离培养技术	(185)
第一节	视网膜干细胞的分离	(185)
第二节	视网膜干细胞的体外培养特点	(187)
第三节	视网膜干细胞的检测	(187)
第四节	其他可能存在视网膜干细胞的部位	(188)
第五节	培养过程中有丝分裂原的选择	(189)
第十六章	人表皮干细胞的体外分离、培养及鉴定	(191)
第一节	实验原理	(191)
第二节	该技术的发展及研究历史	(191)
第三节	实验方法	(192)
第四节	结果	(194)
第五节	结果分析和讨论	(195)
第六节	经验及体会	(195)
第十七章	人脑胶质瘤中肿瘤干细胞的分离、培养及初步鉴定	(197)
第一节	实验原理	(197)
第二节	实验所需仪器、试剂及其配制	(197)
第三节	实验步骤	(200)
第四节	结果	(201)
第五节	结果分析	(202)
第十八章	GFP 转基因小鼠神经干细胞脊髓内移植技术	(204)
第一节	实验原理	(204)
第二节	实验所需仪器、试剂及其配制	(204)
第三节	实验步骤	(206)
第四节	实验结果	(207)
第五节	结果分析与实验体会	(208)
第十九章	嗅鞘细胞培养	(209)
第一节	实验原理	(209)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(209)
第三节	实验方法	(211)
第四节	实验结果	(212)
第五节	经验体会及注意事项	(212)

上 篇 干细胞研究进展

第一章 胚胎干细胞及其研究进展

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)的研究是最近几年生命科学研究领域发展最快和最受重视的前沿生物技术之一。干细胞的研究成果被《Science》杂志评为 1999、2000 和 2003 年度世界“十大”重大科技进展之一,是世纪之交最为引人注目的科技成果之一。干细胞的研究之所以受到广泛关注,其原因是它对生命科学研究具有深远的影响,并且有可能用于疾病治疗,从而有益于人类健康。目前,干细胞的研究几乎涉及生命科学和生物医药的所有领域,不仅在细胞治疗、基因治疗中显示出重要价值,还在基因功能分析、发育生物学研究、新药筛选等方面发挥重要作用。

第一节 胚胎干细胞的基本知识

一、胚胎干细胞的概念

干细胞(stem cells, SC)的“干”,是英文单词“stem”的意译,意为“起源”、“茎干”。到目前为止,对干细胞的概念并没有一个明确的定义,但广大学者普遍认为它具有以下的生物特性:即具有无限的自我更新能力,能够分化为一种以上高度分化的子细胞的能力。它实际上包括了从胚胎发育到成人生长发育过程中各种未分化成熟的细胞。为此,干细胞的概念可以理解为包括生命的起源细胞、组织器官发育的原始细胞和成体组织细胞更新换代、损伤修复的种子细胞。从这个意义上讲,在从受精卵到胚胎发育、生命诞生和发育,直至最终衰老死亡的整个生命过程中都贯穿有干细胞的存在、自我更新和发育分化。

存在于生命体的不同发育阶段的干细胞,其自我更新和分化潜能有明显差异。胚胎发育始于受精卵,它可以发育为完整个体。因此,受精卵是一种最原始和分化潜能最大的干细胞,但尚未发现有明显更新能力,因此把它称之为全能细胞(totipotent stem cells)。受精卵在从输卵管向子宫移行过程中不断进行分裂,即卵裂。当分裂到 8~16 个细胞形成一个实心球体时称为桑葚胚,此时的卵裂球仍保持分化的全能性,即将任意一个卵裂球放置于子宫中都可以发育为一个完整的个体。桑葚胚进入子宫后,分裂为由 100 多个细胞组成的早期胚泡(blastula),也叫胚泡(blastocyst),此时开始出现腔隙,称为胚泡腔。胚泡腔由一层细胞围成,这层细胞称之为滋养层(trophectoderm),一端为内细胞群(inner cell mass, ICM),这是在整个胚胎发育过程中最早发生的细胞分化(图 1-1,图 1-2,图 1-3)。在卵裂期,所有的细

胞都处于透明带内,每进行一次有丝分裂,细胞的大小就大约减半,因此,尽管细胞数目增多,但总体体积并不比受精卵大。

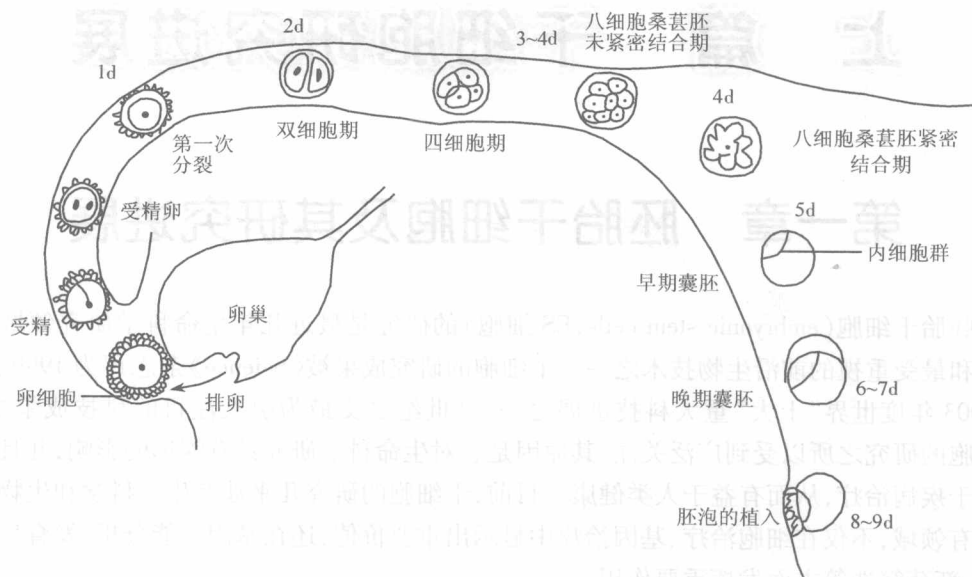


图 1-1 人受精卵着床前胚胎发育过程

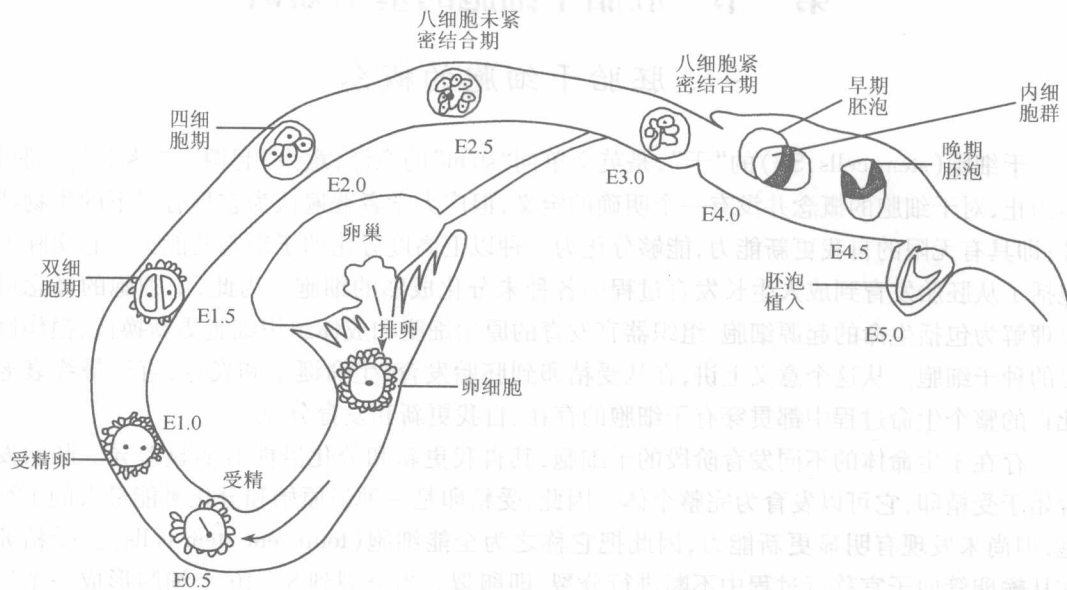


图 1-2 小鼠受精卵着床前胚胎发育过程

胚泡的内细胞群细胞是个体发育的起始细胞,虽然失去了发育成完整个体的能力,但具有发育分化为包括生殖细胞在内的成人三个胚层所有组织细胞类型成熟细胞的能力,这类细胞目前称之为多胚层多能干细胞(pluripotent stem cells)。新近研究证明,极早期的外胚

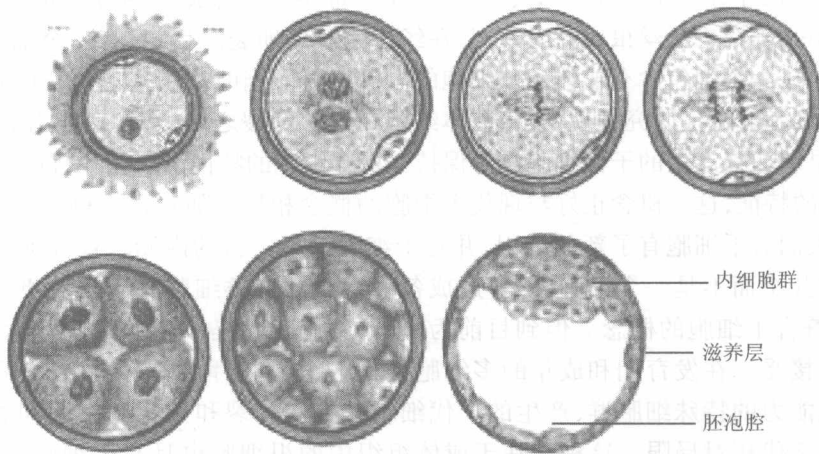


图 1-3 受精、卵裂及胚泡

层是多能干细胞(即 ES 细胞)的发源地。ES 细胞一方面具有几乎无限增殖的潜能,可以像其他细胞系一样培养传代、进行遗传操作;另一方面它类似于胚胎细胞,能分化成几乎所有种类的细胞,一定条件下还可形成包括生殖系在内的嵌合体和含有三个胚层来源的组织瘤。胚胎早期的发育生长具有原始性,某些提早特化的细胞在胚泡晚期通过多染色体方式进行整个基因组反复的核内再复制。然而,一旦组织分化启动后,增殖的细胞开始减少,组织中出现两种细胞群:一群是有丝分裂后细胞,主要负责生理活动;另一种仍处于细胞周期中,负责生长。有机体在接近发育成熟时,上述两种细胞的比例发生变化,生长细胞减少,分裂后细胞增加。至少在小鼠的这些细胞在体外无限增殖后保留了产生所有体细胞和生殖细胞的能力。在胚胎发育成熟后的成体组织中还存在一类具有向多种类型成熟细胞分化潜能的细胞,它们的分化潜能比上述多能干细胞小,主要向相应胚层的成熟细胞分化,如骨髓间充质干细胞通常只能分化为成骨、肌肉、软骨、脂肪及其他结缔组织。当然,最近研究发现,成人组织的干细胞可以跨胚层分化,这类细胞目前称之为单胚层多能干细胞。

实际上,体内组织中可能存在有处于多能干细胞和成熟细胞之间的不同分化层次和多种分化潜能的干细胞,包括前体细胞或祖细胞等,这类细胞具有有限的扩增能力和限制性分化潜能,只能向特定类型的成熟细胞分化,因此称之为单能干细胞。干细胞的主要功能是控制和维持细胞再生,保持组织和器官结构与功能的完整性。

有关干细胞概念的争论持续了近 30 年,目前大家公认的干细胞概念是指能够无限或长期自我更新,并可形成至少一种高度分化的子细胞的未分化细胞。胚胎生殖细胞(EG 细胞)是早期胚胎生殖嵴中原始生殖细胞(PGCs)经体外培养获得的干细胞,具有体外分化多能性、能够形成嵌合体等类似于 ES 细胞的特点。

二、干细胞的研究历史

干细胞一词最早出现于 19 世纪的文献中。1896 年, Wilson 在一篇论述细胞生物学的

文献中首次使用干细胞这一概念,专门用于描述寄生虫(线虫、蠕虫)生殖系的祖细胞。1897年,Boveri等在进行丝虫研究时发现,在经过连续的卵裂之后,只有一个细胞保留了全部的染色体,这一细胞包含有成体生殖细胞的全部成分。当时认为这是一类能够产生子代细胞的原始细胞。近代研究发现,生殖前体细胞在每次卵裂之后,其发育能力有明显改变。因此认为,早期卵裂产生的子代细胞没有保持其前体细胞的特性,故它们的自我更新能力不符合干细胞的特征,这一概念正好与现代干细胞的概念相反。随着现代科学技术和实验手段的进步,人们对干细胞有了新的认识,并对干细胞赋予了新的内涵。脊椎动物的成体组织一般来自几个而不是一个细胞,能够形成各种组织的这类细胞具有自我更新和向前分化的潜能,符合干细胞的概念。但到目前为止,干细胞仍然是一个广义的概念,其定义仍不能被广泛接受。在发育期和成年的多细胞生物组织中,保留了一类具有自我更新和产生子代细胞能力的特殊细胞群,产生的子代细胞在有丝分裂和分化产生不同类型细胞的能力方面比亲代相对局限。这种存在于成体组织中的祖细胞也具有干细胞的特性,由于它来源于成人组织,因此把它称之为成体干细胞。事实上,成体干细胞与ES细胞、生殖系祖细胞有明显差别。因为成体干细胞首先是分化具有局限性,也并非一定要有无限的自我更新能力。1966年,Till和McCulloch研究证实,将骨髓细胞悬液通过静脉注射输入到受致死量放射线照射的小鼠体内,这些细胞可以在脾内形成集落(脾结节)。经细胞学分析认为,这种脾结节是来源于单个细胞的细胞克隆,是一个包含有红细胞和粒细胞的混合体,将其中一些细胞转移到其他受致死量放射线照射的小鼠体内,同样能够形成脾结节,表明这类混合细胞群中仍有干细胞的存在。现代干细胞的概念与早期干细胞概念相比,已经被赋予了新的内涵,认为干细胞的最基本特征是具有自我更新能力和分化为成熟细胞的潜能。

20世纪60年代开始有人对ES细胞进行描述。1962年,Edwards首先观察到兔胚泡ES细胞的分化现象,发现胚泡腔内细胞群细胞具有自动分化能力,可以分化为含有神经、骨、肌肉等多种细胞的能力。随后,人们对ES细胞的分离培养进行了大量工作,但由于ES细胞在体外生长极为困难,细胞建系十分不易。经过近20年的发展,Evans和Kaufman终于在1981年从小鼠胚泡内细胞群中成功分离出ES细胞,当时称之为多能细胞。他们的方法是:把怀孕2.5d的小鼠卵巢切除,以改变孕鼠激素水平,获得延迟着床的胚泡,经体外完整培养后获得内细胞群,然后用胰酶处理后培养,将生长活跃的克隆进行分化抑制培养,通过体外分化抑制培养,首次建立了哺乳动物ES细胞系,经同源动物皮下注射证明具有多向分化潜能。之后,国内外学者们以类似的方法逐渐获得许多不同动物的ES细胞。

近年报道了鼠、兔、猪、牛、猴等多种动物以及人类ES细胞分离培养,进展十分迅速。1995年,Thomson等从恒河猴胚泡获得第一个灵长类的ES细胞系,在取得灵长类ES细胞分离培养和鉴定经验的基础上,Thomson又率先从人胚泡内细胞群分离出5个ES细胞系,并初步阐述了人类ES细胞的生物学特性。几乎在同时,Shamblott等从发育到5~9周的流产胎儿生殖嵴中分离培养获得人类具有与ES细胞相似的原生殖细胞(EG细胞)(图1-4)。人类ES细胞系的建立被誉为生命科学领域的重大技术突破,是生命科学研究史上的重要里程碑。鉴于人类ES细胞具有多向分化潜能,可能给人类健康带来巨大好处。近年来,科学工作者对ES细胞的分离培养进行了深入研究,建立了多种ES细胞体外定向诱导分化技

术和人类疾病的动物模型治疗实验,取得诸多突破性进展。另外,还从人类畸胎瘤组织中也分离获得 ES 样细胞,体内外证实同样具有多向分化潜能。2001 年, Wakayama 等利用体细胞核移植克隆胚泡的方法,成功地制备了 35 个小鼠核移植 ES 细胞系(nES 细胞)。Robert 等正尝试制备 ES 细胞的新方法,即不经胚泡阶段直接从卵裂球获得 ES 细胞。2003 年,韩国和美国科学家联手,利用体细胞克隆技术获得人类克隆胚胎干细胞,这一技术的成功表明可以用任何人的自体细胞培育 ES 细胞,从而使 ES 细胞向临床应用迈进了一大步。2004 年,日本科学家在体外将小鼠的 ES 细胞诱导分化为精子和卵子细胞,结果进一步证实 ES 细胞具有向生殖细胞分化的潜能。最近还有科学家利用孤雌繁殖法(卵细胞体外激活培养)培育出早期胚胎,预示人类的自然生殖面临新的课题。

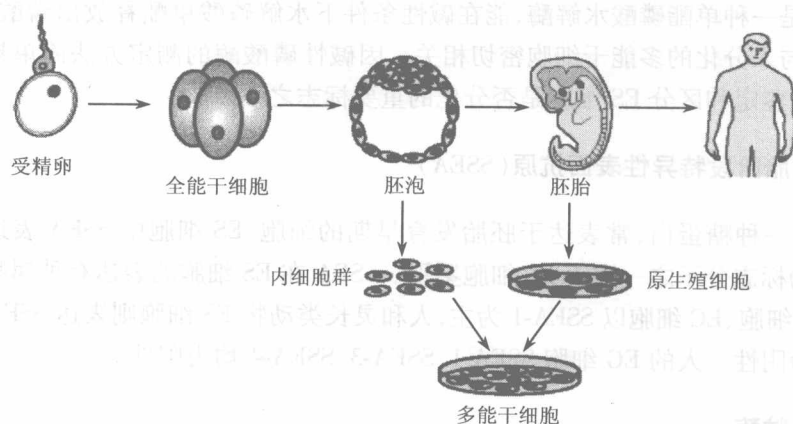


图 1-4 人胚胎干细胞来源

第二节 胚胎干细胞的生物学特性

一、ES 细胞的基本特点

ES 和 EG 细胞具有经培养不定期地分化并产生特化细胞的能力,具有以下特点:①有多向分化潜能和受精卵的某些特性,可以分化为胎儿和成体内各种类型的组织细胞;②可在体外培养条件下建立稳定的细胞系,可长期增殖培养、冻存并保持高度未分化状态和发育潜能性;③将 ES 细胞与 8~16 细胞阶段的胚胎共培养后,植入假孕母体子宫,可发育成嵌合动物,其遗传特性可进入胚系,遗传给下一代。体外 ES 细胞具有培养细胞的特征,最大特点是对它进行遗传改造、核转移和冻存等而不失去潜能性。

二、ES 细胞的形态学特点

ES 细胞的形态结构与早期胚胎细胞具有相似性,细胞相对较小,细胞核明显,核质比较高,染色质比较分散,有一个或多个核仁,胞质内除游离核糖体外,其他细胞器很少;细胞呈多层集落状生长,紧密堆积在一起,无明显的界限,形似鸟巢。不同物种、不同类型的 ES 细

胞的结构特征有所不同。人和灵长类动物的 ES 细胞形成的细胞集落相对扁平、松散,容易被胰蛋白酶消化成单个细胞。而小鼠的 ES 细胞和人的 EG 细胞形成的集落一般呈紧密的球形,不易被常规的消化方法消化为单个细胞。ES 和 EG 细胞都有稳定的二倍体核型,在未分化的 ES 细胞中没有雌性动物体细胞中的 X 染色体失活现象。

三、ES 细胞的分子生物学标志

(一) 碱性磷酸酶

ES 细胞含有丰富的碱性磷酸酶,在已分化的 ES 细胞中碱性磷酸酶呈弱阳性或阴性。碱性磷酸酶是一种单酯磷酸水解酶,能在碱性条件下水解磷酸单酯释放出磷酸。碱性磷酸酶的高表达与未分化的多能干细胞密切相关。因碱性磷酸酶的测定方法简单易行,因此常作为 ES 细胞鉴定和区分 ES 细胞是否分化的重要标志之一。

(二) 胚胎阶段特异性表面抗原 (SSEA)

SSEA 是一种糖蛋白,常表达于胚胎发育早期的细胞,ES 细胞中 SSEA 表达阳性,故作为 ES 细胞的标志分子之一用于 ES 细胞鉴别。SSEA 在 ES 细胞的表达有种属特异性,小鼠 ES 细胞、EG 细胞、EC 细胞以 SSEA-1 为主,人和灵长类动物 ES 细胞则表达 SSEA-3、SSEA-4,而 SSEA-1 为阴性。人的 EG 细胞 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4 均为阳性。

(三) 端粒酶

ES 细胞表现出高水平的端粒酶活性,不同于正常二倍体细胞,可能是其复制生命期限远比体细胞长的原因。细胞每复制 1 次,端粒就要减少 50 ~ 100bp,细胞也随着衰老。因此,认为端粒酶减少是细胞衰老的重要机制之一。Amit 等观察到在培养过程中人 ES 细胞端粒长度有一定改变,但可保持在 8 ~ 12kb 之间。在 ES 细胞、生殖细胞和肿瘤细胞中,端粒酶呈高水平表达,而且端粒酶的活性也很高。这些细胞在每次分裂之后,可保持端粒长度,维持细胞的长期存活。

(四) Oct-4/Oct-3

Oct-4/Oct-3 是含 POU 结构域的转录因子家族中的一员,由 Pou5 fl 基因编码,目前被广泛用于未分化状态的 ES 细胞鉴定。Oct-4 最早表达于胚胎 8 细胞期,发育到桑葚胚时,每个卵裂球中都可以检测到 Oct-4 大量表达,在胚泡期主要表达于内细胞群细胞。在胚胎植入后,只有原始外胚层有 Oct-4 的表达,到原肠形成后,只有原始生殖细胞表达 Oct-4。在体外培养的 ES 细胞中,Oct-4 呈强阳性表达。Oct-4 是 ES 细胞是否具有多能性的重要标志分子。

(五) 其他标志

ES 细胞还表达干细胞因子 (stem cell factor)、生殖细胞核因子 (germ cell nuclear fac-

tor)、CD30、GCTM-2、GenesisDG 和高分子量糖蛋白 TRA-1-60、TRA-1-81 等。

四、ES 细胞的培养特性

ES 细胞来源包括桑葚胚、胚泡内细胞群,还有胎儿生殖嵴等。最近,Lanzendorf 等利用体细胞核移植技术培育人类早期胚胎,并成功从中分离出 ES 细胞。利用体细胞核移植技术分离培养 ES 细胞并诱导分化后用于疾病治疗的技术,目前称之为治疗性克隆。该技术有可能成为人类 ES 细胞体外分离培养的主要来源。小鼠的 ES 细胞通常取自受精卵发育 2.5d 的桑葚胚(morula)或 3.5d 的早期胚泡(blastocyst)。桑葚胚中的细胞都具有全能性,因此它的分离培养相对容易,待发育到胚泡阶段时,已经开始了最初的分化,需要用免疫外科技术等将滋养层细胞剥离去除,只取内细胞群的细胞培养。人的 ES 细胞可从桑葚胚、内细胞群和胚胎生殖嵴中获取。

目前建立 ES 细胞系的方法有许多种,常见方法包括 3 个过程(图 1-5)。**①原始 ES 细胞获得:**从受孕动物体内或体外受精卵培养中获得发育至桑葚胚或胚泡阶段的早期胚胎,用机械法分离、胰酶或胶原酶消化桑葚胚或胚泡内细胞群得到原始 ES 细胞悬液。**②ES 细胞传代培养:**将 ES 细胞在改良 Eargle 培养液中培养 2~3d,然后转到经放射线照射或丝裂霉素处理的成纤维细胞饲养层上进行传代培养。培养液含适当浓度的胎牛血清(FBS)、必需氨基酸、 β -巯基乙醇、白血病抑制因子(LIF)、干细胞因子(SCF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和双抗等。细胞培养约 1 周左右,挑取细胞集落,用低浓度胰酶分散后,继续传代培养,约 7~10d 传一次。经反复传代培养,可获得生长旺盛的高纯度 ES 细胞。**③ES 细胞鉴定:**长期培养的 ES 细胞呈巢式或集落式生长,边缘光滑,细胞排列紧密;形态学观察细胞呈圆形或梭形,体积小,核大,胞质少,可见一个或多个细胞核;ES 细胞特异性碱性磷酸酶(AP)染色为阳性,细胞显示正常的核型,显示高水平的端粒酶活性和表达胚胎特异性抗原

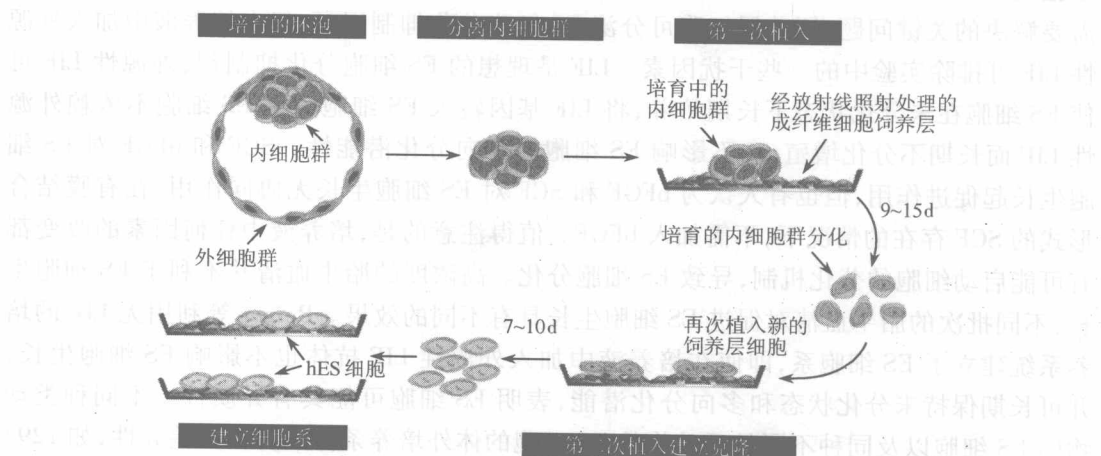


图 1-5 胚胎干细胞的体外诱导分化