

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program)

国家重点基础研究发展计划(973)项目资助

干细胞生物学



Stem Cell Biology

崔红娟 编著



国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

西南师范大学出版社
XINAN SHIFAN DAXUE CHUBANSHE

重庆市出版专项资金资助项目

干细胞生物学



Stem Cell Biology



崔红娟 编著



国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

西南师范大学出版社
XINAN SHIFAN DAXUE CHUBANSHE

图书在版编目(CIP)数据

干细胞生物学 / 崔红娟编著. — 重庆 : 西南师范大学出版社, 2013.12
ISBN 978-7-5621-6537-8

I. ①干… II. ①崔… III. ①干细胞—细胞生物学
IV. ①Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 292319 号

干细胞生物学

GANXIBAO SHENGWUXUE

崔红娟 编著

责任编辑:杜珍辉 伯古娟

装帧设计:王 煤

排 版:重庆大雅数码印刷有限公司

出版发行:西南师范大学出版社

地址:重庆市北碚区天生路 1 号

邮编:400715 市场营销部电话:023-68868624

<http://www.xscbs.com>

印 刷 者:重庆普天印务有限公司

开 本:889mm×1194mm 1/16

印 张:23.75

字 数:563 千

版 次:2014 年 5 月 第 1 版

印 次:2014 年 5 月 第 1 次印刷

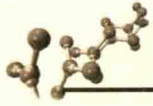
书 号:ISBN 978-7-5621-6537-8

定 价:128.00 元

作者简介



崔红娟,教授,博士生导师,重庆市巴渝学者特聘教授,首批重庆市“百人计划”高层次创新人才,重庆市首批科技创新领军人才获得者,家蚕基因组生物学国家重点实验室干细胞与细胞生物学方向带头人,主要从事肿瘤生物学和干细胞的研究,着重探讨调控干细胞自我维持和多向分化的信号通路,以第一和通讯作者身份在 Nature Cell Biology, Cancer Research, Journal of Biological Chemistry, Oncogene, American Journal of Pathology 等 SCI 重要学术杂志发表论文 30 余篇,SCI 影响因子超过 150 分,被 SCI 论文广泛引用。其研究成果受到国际同行的积极好评,曾多次受邀在国际学术交流会上做学术报告,是多个知名学术杂志的审稿人。



前言

哈佛大学干细胞研究所乔治·戴利教授曾经预言：“20 世纪是药物治疗时代，而 21 世纪是干细胞治疗时代。”

1999 年 *Science* 杂志将干细胞研究列为世界十大科技进展榜首，至今已经过去了 14 年，在人们对干细胞还存在许多争议的时候，干细胞的研究和使用已经逐步成熟。继 2007 年英美科学家因改良干细胞研究技术而获诺贝尔生理学或医学奖后，2012 年同一奖项又颁发给了英、日生物学家以表彰其在干细胞研究领域的杰出贡献，这些都充分说明了干细胞这一新兴学科发展迅猛且热度空前。

温家宝总理不止一次提到：“干细胞研究促进了再生医学的发展，是继药物治疗、手术治疗之后的又一场医疗革命，我们要力争在干细胞研究的更多领域取得领先地位。”实际上我国从干细胞基础研究到临床应用方面都取得了一系列突破，目前一些退化性疾病如血液疾病、恶性肿瘤、心血管疾病、免疫性疾病、组织损伤等都已经可以通过干细胞技术进行治疗。展望未来，干细胞研究发展将会给更多的疾病带来更为有效的治疗。

干细胞作为当今细胞生物学以及整个生命科学最前沿的主攻热点，继人类基因组计划之后，已成为后基因组计划的关键部分之一。为紧跟世界生命科学主流研究思潮，编者所在的家蚕基因组生物学国家重点实验室在家蚕基因组框架图完成的基础上，进一步开展了家蚕干细胞乃至哺乳动物干细胞的相关研究，借此作为家蚕生物学研究的一个新的生长点与推动力。我们不仅依照传统思维建立干细胞分化形成正常器官组织的研究体系，而且开创性地实现非正常病理性器官、组织及细胞的干细胞途径逆向转化复原，并推动生命科学的创新发展，积累新的知识。作为后基因组计划的关键组成部分，显然其他物种的干细胞研究也可以丰富人类干细胞研究的相关理论与技术，从而更有效更安全地为人类服务。

目前在干细胞研究领域最领先的是英国、美国和日本。近年来中国政府或地方政府牵头先后建立了多个干细胞研究机构及干细胞库，很多研究院所和医院也取得了一些不错的研究成果。我国干细胞研究虽然整体水平只处于全球第二梯队，但是在干细胞存储方面的商业模式已经成熟，在临床应用方面也正向商业化突围。同时，国内干细胞产业的发展还获得了政策上的“优惠”：国家“十二五”生物及医药工业规划中均明确指出，要积极开展干细胞等细胞治疗产品的研究，重点研发针对恶性肿瘤、自身免疫性疾病等重大疾病的干细胞和免疫细胞等细胞治疗产品。

在众多有利条件推动下，国内近年来出版了不少与干细胞相关的教材或技术指导手册，弥补了我国

干细胞教学与研究方面的理论性和系统性的不足。但是由于干细胞研究新理论、新技术的不断涌现,其中的不少观点存在争议,出现了部分基础理论与操作方法过时、方向性不明、与干细胞传统理论技术衔接不当等现象,而且很少可以兼顾普通高校干细胞基础课程教育的普及与研究机构课题设置方向的指引。

为此,编者在系统全面地掌握干细胞基础理论与技术体系,分析研究近五年(2008~2012)来国内外干细胞最新科研成果以及相关领域权威专家反复指导修订的基础上,经过原始材料的收集、整理、总结、论证到编纂及修订,结合自身研究成果,将干细胞研究的传统及最新理论进行了最大限度的精练,对干细胞研究技术进行了最全面的优化,把国内外干细胞相关的最新研究成果进行了条理清晰、层次分明的汇总概括,最终完成了此书的撰写。

本书在内容、结构上都突出一个“新”字。编者不仅把干细胞与再生医学转化等方面的最新应用做到前后一致、融合一体,同时在表述安排方面,做到由浅入深、图文并茂、通俗易懂、系统全面、科学精练、实践性强、可操作性好,使读者能较轻松地掌握干细胞生物学的基本内容,特别是借助家蚕基因组生物学国家重点实验室的自身优势,在书中融入了大量以前很少有人涉及的昆虫(家蚕)干细胞相关内容(详见第八章),多角度多层次地分析阐述干细胞研究的最新观点和前沿技术,进一步完善干细胞的理论体系。

值得一提的是,本书是为教学与基础研究使用,为在高等教育本科阶段普及干细胞基础知识,进一步弥补干细胞知识体系的不足,并联系当今世界干细胞研究最新动态和潮流为研究生提供更好的自我提升平台,旨在让本科生与研究生对干细胞相关理念有全面清晰的了解、认知与应用,为国家生物医药事业培养更多的兼具专业知识及学术素养的基础人才。

翻开这部书,你将进行一场不寻常且充满惊喜的体验。因为我们打破了传统编写模式,在大量赏心悦目的图片和丰富色彩的视觉冲击下,一改传统生物专业书籍的单调乏味和晦涩难懂,通过一条极富完整性、条理性乃至趣味性的“故事”主线,娓娓道来干细胞作为生命科学家族的“新”成员是如何一步步成长、发育直至引领整个家族走向更为辉煌的未来的。对于干细胞无论你是略知一二的新手,还是造诣颇深的大家,都可以通过本书,找到一个全新的视角来丰富对干细胞的认识,这一过程是有趣且新鲜的,会不断地满足我们的好奇心。

本书编写得到了向仲怀院士的指导与关怀,对此表示深深的感谢。家蚕基因组生物学国家重点实验室细胞研究室的研究生为本书出版做了大量的具体工作,本书还包含了实验室研究生们的研究成果,所以应当是本实验室科研教学的集体成果,在此对他们的支持和参与表示衷心的感谢。西南师范大学出版社对本书的出版给予了极大的支持和关心,在此一并致谢。

本书还得到国家重点基础研究发展规划(973)项目和国家自然科学基金的资助。

编者

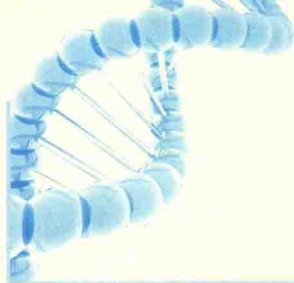
2013年12月



目录

第一章 绪论	001
第一节 干细胞的生物学概念	001
第二节 干细胞研究的发展简史	006
第三节 干细胞研究的前景与展望	008
第二章 胚胎干细胞与应用	018
第一节 胚胎干细胞生物学特性	018
第二节 胚胎干细胞体外培养技术	023
第三节 胚胎干细胞的应用与展望	031
第三章 成体干细胞与应用	052
第一节 成体干细胞概述	052
第二节 成体干细胞的种类和生物学特性	057
第三节 成体干细胞的可塑性	071
第四章 诱导性多能干细胞	087
第一节 iPSCs 的研究进展	087
第二节 iPSCs 的建立机制	092
第三节 iPSCs 制备技术	105
第四节 iPSCs 技术的前景及难题	113
第五章 干细胞增殖分化调控	123
第一节 细胞因子概述	123
第二节 干细胞相关的信号转导通路	130
第三节 干细胞微环境	136
第四节 干细胞的增殖分化与调控	145
第六章 干细胞与疾病	177
第一节 概述	177
第二节 干细胞移植	178

第三节	干细胞与心血管疾病	183
第四节	干细胞与糖尿病	191
第五节	干细胞与帕金森症、阿尔茨海默症及其他神经系统损伤	194
第六节	干细胞与其他相关疾病	205
第七章	肿瘤干细胞	227
第一节	概述	227
第二节	神经母细胞瘤干细胞	234
第三节	乳腺癌干细胞	242
第四节	肺癌干细胞	251
第五节	肝癌干细胞	255
第六节	前列腺癌干细胞	263
第七节	胃癌干细胞	270
第八节	干细胞与白血病	279
第八章	昆虫干细胞研究进展	293
第一节	昆虫干细胞研究概况及展望	293
第二节	昆虫神经干细胞	293
第三节	昆虫中肠干细胞	309
第四节	昆虫造血干细胞	325
第五节	昆虫生殖干细胞	339
第九章	干细胞伦理	368
第一节	成体干细胞研究及其伦理问题	368
第二节	胚胎干细胞研究及其伦理问题	369



第一章 绪论

著名生物学家 E.B Wilson 曾经说过：“所有生物学的答案最终都要到细胞中去寻找，因为所有生物体都是或曾经是一个细胞。”

人体由 400 万亿~600 万亿个细胞组成，共 230 多种，从功能上分为两大类：功能细胞和干细胞。当细胞凋亡和外界因素所导致的细胞坏死使人体损失大量的功能细胞时，干细胞将通过增殖分化产生新的功能细胞来进行补充。随着年龄的增长，人体内干细胞的数量和质量也在逐渐下降，无法产生健康的细胞替换组织中衰老病变的细胞，最终引起人的衰老和疾病。所以恢复体内活跃干细胞的数量，是抑制衰老、预防治疗各种疾病的关键。

20 世纪末，克隆羊的成功、人胚胎干细胞的培养建系、成体干细胞跨胚层和谱系分化的发现，被认为是生命科学的三大成就，开创了干细胞科学的新时代，如今无论在基础理论研究方面还是在临床医学应用乃至商业服务方面，干细胞都是当之无愧最热门的关键词。因此，干细胞的研究是科学家们的一个重要研究课题，也是 21 世纪生命科学延续的热点。

第一节 干细胞的生物学概念

近年来干细胞在生物学方面获得了比其他研究方向更广泛更深入的关注，其中一个重要原因就是干细胞研究可以让我们更深层次地了解细胞的生物学本质并且为多种退化性疾病提供可行的治疗方案。虽然干细胞的科学研究的发展十分迅速，但是也存在一些混乱与争议。在关于干细胞的定义还有许多局限性的情况下，各个研究团队间的相互交流和实验操作规范必将起到至关重要的作用。在接下来的章节中，笔者将结合自己的研究经验和其他研究团队干细胞研究的最新进展，总结与概述干细胞的定义及相关识别、分离与定性的标准操作规范。

一、干细胞的概念

“干细胞(Stem cell)”一词最早出现于 19 世纪的生物学文献中，然后一直沿用至今，随着研究的深入和时代的进步又被赋予了新的内涵。干细胞的“干”译自英文单词“Stem”，原意为起源、茎干，说明干细胞是在生命的生长发育过程中起着“主干”作用的原始细胞，其神奇之处就是这些原始细胞具有自我更新、无限增殖扩容及多向分化的潜能。一般情况下，干细胞在功能上定义为一种具有自我更新能力且可以产生分化细胞的一类细胞。更为明确地说，干细胞是指具有无限或长期的自我更新能力，至少可产生一种与亲本完全相同的且可以进行单向或多向分化从而形成子代细胞的原始细胞。这个广义上的简单定义或许只适用于胚胎或者胎儿阶段的干细胞，而对于个体中的部分成体干细胞并不完全适用。因为这项定义不能区分自我更新能力较弱的成体祖细胞和成体干细胞。因此完善相关定义对区分成体干细胞与个体生命中不断更新的细胞将是很重要的，而对于干细胞更为完整的陈述要涉及其复制能力、克隆性、分化能力、可塑性及分子生物学特征。

二、干细胞的特征

1. 自我更新特征

自我更新是指细胞分裂增殖的过程,产生的子代细胞仍维持亲代细胞的原始特性。干细胞的自我更新能力则指通过细胞分裂形式获得的子代细胞保持增殖、多分化潜能并表达标志性干细胞特异蛋白的能力。干细胞具有两种不同的分裂方式,一种是对称分裂,另一种是不对称分裂。它可以根据周围环境的变化分裂为两个相同的分裂末期的功能细胞或者两个相同的干细胞,还可以分裂为一个干细胞及一个末期的功能细胞,这是干细胞有别于肿瘤细胞的最大特点。所以说干细胞既可以长时间处于休眠状态,也可以快速地进行增殖。比如,肝移植供者切除 3/4 的肝脏,可以在两周内完全恢复成原样,但是恢复后就不再继续生长,这就是干细胞的功能。

2. 克隆能力

干细胞另一项重要的特征就是克隆源性,即单个细胞具有创造更多相同细胞的能力。这项特征是干细胞必不可少的,是其具有建系能力的关键。最基本的细胞系建立技术包括细胞的体外增殖培养、冻存、解冻及后续培养等,更高层次的要求则是细胞在克隆过程中必须保持相同的特性,这也是在细胞克隆过程中最为困难的一步,因为在干细胞培养建系的过程中经常有其他组织的干细胞或者干细胞与支持细胞的衍生细胞混入而造成污染。

3. 高度分化潜能

干细胞的分化具有多潜能性,但不同干细胞的分化潜能是不同的。研究人员认为多能干细胞可以产生多种分化细胞,且具有相同的形态学特征和基因表达模式。同时,有些人也表示一些只能产生单一分化方向细胞的自我更新细胞也是干细胞,这些在之后的章节会有详细介绍与解释。

总而言之,不同干细胞的分化潜能是不同的,例如胚胎干细胞可以分化为包含三个胚层在内的任何一种组织类型的细胞,并能在适当条件下发育为一个完整的生物体;成体干细胞在自然状态下则只能分化为其相应或者邻近组织的细胞。这些干细胞随着其分化的进行,分化方向趋于增多,而分化潜能也逐渐变“窄”,不过正是由于各种干细胞存在不同的分化潜能,才保证了个体发育在时间上的有序性和空间上的正确性。

4. 干细胞具有可塑性

干细胞具有分化为其他类型组织细胞的能力称为干细胞的可塑性,即干细胞产生另一类其他组织细胞的能力。越来越多的实验证据表明,部分成体干细胞在植入受体后,均具有不同程度的可塑性。比如,在特定的实验性条件下,来源于骨髓的成体干细胞能够在脑部的环境中产生本属于脑组织的神经及相关类型的细胞。

5. 干细胞分子生物学特征

干细胞的特性与其自我更新、多向分化的分子机制有关。干细胞微环境(Niche)是干细胞赖以生存的基本条件,干细胞必须接受微环境提供的信号才能维持干细胞自我更新与分化的特性。处于不同微环境的干细胞在生理学上的要求不尽相同,分子机制也多有差异,但是所有的干细胞都或许存在某些共同的遗传性特征。通过转录图谱发现,在许多种类的干细胞中都有相同的因子富集,这些因子极有可能是干细胞的分子标记之一。

干细胞的转录图谱已经表明其拥有多个共同的分子学特征:在多种干细胞中均能检测出大量生长因子及下游相关信号高表达,其中活性较高的几个信号转导通路是 TGF、Notch、Wnt 和 JAK/STAT 家族;多数干细胞表达维持端粒和控制端粒酶活性的因子;干细胞通过 DNA 甲基化酶、组蛋白乙酰化酶及 Groucho 家族蛋白的翻译阻滞来达到调控基因表型的目的;干细胞的共同分子机制还包括通过 RNA 解旋酶调节特异性的转录后机制。

我们现阶段虽然对于干细胞的分子学定义尚未达成共识,但是对于干细胞的分子调控机制大体上有了初步的了解,因此现阶段关于干细胞广为认可的定义就是一类有自我更新、无限增殖扩容建立干细胞系及多向或单向分化潜能的具有稳定的整倍体核型的细胞,并且呈现端粒酶高表达性。不过这个定义并不适用于所有情况,只是现阶段对干细胞特性的功能性描述。

三、干细胞的分类

目前干细胞有两种分类方法,第一种分类方法是根据干细胞的发育潜能分为全能干细胞(Totipotent stem cell, TSC)、多能干细胞(Pluripotent stem cell)和单能干细胞(Unipotent stem cell)三类。

全能干细胞:具有形成完整个体的分化潜能,多由卵子受精后产生,如胚胎干细胞。这些细胞可分化产生任何类型的细胞。

多能干细胞:具有分化出多种细胞组织的潜能,如造血干细胞、神经干细胞,但却失去了发育成完整个体的能力,发育潜能受到一定程度的限制。骨髓多能造血干细胞就是典型的例子,它可分化出至少 12 种血细胞,但不能分化成造血系统以外的其他细胞。

单能干细胞:也称专能或偏能干细胞,这类干细胞只能向一种类型或密切相关的细胞类型分化,如上皮组织基底层干细胞、肌肉中的成肌细胞等。

第二种分类方法是根据干细胞所处的发育阶段分为胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞(Somatic stem cells, SSCs)。

胚胎干细胞的发育等级较高,属于全能性干细胞,能分化出成体动物的所有组织和器官,包括生殖细胞。而成体干细胞的发育等级较低,属于多能或单能干细胞,一般认为具有组织特异性,能分化成特定的细胞或组织。比如表皮和造血系统,具有修复和再生的能力。胚胎的分化形成和成年组织的再生都是干细胞进一步分化的结果。而成体组织或器官内的干细胞最新的研究表明,组织特异性干细胞或成体干细胞同样具有横向分化成其他类型细胞或组织的潜能。在特定条件下,成体干细胞产生新的干细胞,或者分化形成新的功能细胞,从而使组织和器官保持生长与衰退的动态平衡,这为干细胞的应用开创了更广阔的空间。

四、干细胞的来源

干细胞公认的主要来源就是胚胎干细胞,胚胎干细胞的获得多是在三胚层形成之前,这很可能与多能干细胞的发育机制有关。成体干细胞的发育起源相关理论尚不完善,普遍认为其在胚胎早期停滞发育并在特定微环境中进行增殖,并且具有干细胞的相关特性。在本节中,笔者对早期胚胎干细胞的起源进行概述,并解释成体干细胞在个体内的发生过程,重点涉及成体造血干细胞(Hematopoietic stem cells, HSCs)和成体神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)。

1. 早期胚胎干细胞

小鼠和人类胚胎干细胞均可以直接从着床前的囊胚内细胞团中获得。这些细胞可以正常发育到外胚层阶段并最终形成所有成体组织,这也说明了胚胎干细胞的发育可塑性。事实上,胚胎干细胞在体外均具有发育成全部体细胞并在体内可以形成生殖系嵌合体的能力。但受精卵发育到囊胚阶段,其发育潜力受到一定限制。胚胎外部的细胞开始分化为滋养层细胞,这些特化细胞可以分化为滋养外胚层所有细胞,包括大滋养层细胞。在胚胎发育的卵圆柱期(小鼠中胚龄 6.5 d),外胚层中部分细胞被认定为原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs),这些细胞在后续发育过程中并不受发育的限制。这些 PGCs 迁徙到生殖嵴并增殖产生成熟的生殖细胞和功能性成体配子。在其到达生殖嵴前后可以分离获得 PGCs,置于体外适当条件下培养可以形成胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells,EGCs)。EGCs 拥有许多 ESCs 的特征并且具有分化为生殖细胞的能力。EGCs 和 ESCs 的最大不同在于部分印记基因的表达模式,而且 EGCs 不能产生正常的嵌合个体。

目前的研究表明,原肠胚期后的多能性干细胞多为 PGCs,还包括部分成体祖细胞和畸胎瘤细胞。这或许是由于在原肠胚形成过程中 PGCs 越过外胚层形成阶段并迁移到胚胎内部发育的原因。这种发育模式或许只隶属于 PGCs,不过也为寻找其他干细胞的起源指引了方向。更为明确地说,成体干细胞或许源自 PGCs,但还需要大量实验进行验证。

2. 成体干细胞的个体发生

多数成体干细胞的起源尚不清楚,随着成体干细胞可塑性理论的提出,科学家们认为对成体干细胞个体发育过程的探究将有助于对其不同种系间关系及其可塑性机理的研究,也可推动成体干细胞系建立的分子机制的相关研究,以便完善成体干细胞定向分化的操作方法。为此,我们结合造血和神经系统的相关方面研究对成体干细胞的发育理论进行了概述。

小鼠发育过程中第一个出现的造血区域为胚胎外卵黄囊,之后出现的就是胚胎内的永久造血区域——主动脉-性腺-中肾(AGM)区,首先两个区域都会参与形成成体的造血系统,但在这一过程中,HSCs 起何种作用尚不得知。不过,小鼠体内的胚胎移植试验显示 AGM 是成体造血系统和 HSCs 形成的源头,而且妊娠中期的 AGM 也是 PGCs 迁徙的目的地,并促进后者形成间充质干细胞、血管祖细胞甚至形成成血管细胞。由于缺少 AGM 细胞的无性细胞系相关研究和精确的定位追踪,因此尚无法判断 AGM 是否是成体干细胞的前身,但这种成体干细胞前身的假设或许为解释成体干细胞的可塑性提供了一个新的思路。多数成体干细胞的专一性与其增殖和分化的特异微环境所引导的高保真分化发育方向有关,不过其发育的时机和必要条件仍需进一步研究。

针对造血系统的研究难点在于分化细胞的出现并不能告诉我们与之相关的成体干细胞发生分化的时间与地点。另一项与干细胞定义关系重大的研究方向就是干细胞的识别方法,细胞定向追踪和克隆源性检测则是目前用来判定干细胞来源常用的方法,在之后的内容中会有所涉及。

与之相同的是神经干细胞,其从原肠胚形成后的胚胎外胚层神经组织中发育而来。NSCs 及部分神经祖细胞经特定方式诱导可以出现神经样特征。不过在神经上皮细胞发育过程中干细胞是如何迁移和变化的尚不得知,这需要特异性更强的标记物来解决。其中一个普遍接受的观点就是胚胎中神经上皮细胞可以发育成放射状胶质细胞以及后续的室周星形细胞,而且这些细胞的来源是中枢神经系统的成体 NSCs。不过这些成体干细胞的位置和信号都是不同且暂时的,例如,早期的干细胞通常会发育为神经元细胞,而许多

成熟的干细胞会分化为神经胶质细胞。此外,当把成熟干细胞移植到早期大脑皮层微环境中时并不能维持其干细胞的特性。因此,神经系统的发育遵循一套典型的规律,就是一种共同的祖细胞可以通过某些特定时空改变转化为绝大部分的神经细胞。或许在成体神经系统中还存在少量干细胞,但并不是神经系统发育的主要来源,因为神经细胞的源细胞必须拥有更为强大的可塑性并不受时空限制。

了解干细胞的来源是干细胞生物学研究的重中之重,其研究方向包括个体细胞发育过程的细节、特异性决定细胞分化方向的信号通路以及在限制祖细胞信号表达方面的内在机制。

五、干细胞的鉴定

干细胞生物学中最为关键最为重要的问题就是如何识别、分离与鉴定干细胞,这在本书的相关章节中都会有详细的介绍。笔者只是从胚胎干细胞和成体干细胞两个方面向读者介绍一些较新的干细胞识别、分离与定性方面的理论及热点问题。

1. 胚胎干细胞

胚胎干细胞的基本特点就是在体内和体外都可以进行自我更新、多向分化,拥有正常染色体核型,在明确的培养体系下体外培养可以形成集落并且广泛增殖,还可以进行冻存与解冻。严格意义上,胚胎干细胞甚至应具有在动物活体内分化为所有类型细胞和生殖系嵌合体的能力。不过这些标准在伦理道德层面不适用于人类胚胎干细胞,因此在人体中,胚胎干细胞的标准应该是可以形成胚胎以及包含三个胚层的畸胎瘤。此外,由于在人体内胚胎干细胞的多能性无法检测,因此研究更多的持续表达且不断富集的公认多能性分子标记将十分重要。虽然在人体上不可以做嵌合体实验,但是可以通过移植人体胚胎干细胞到非人类的个体或者胚胎中以观察其是否能够发育为特定组织来代替嵌合体实验,不过此类实验在某种程度上也涉及伦理问题。还有一个值得思考的问题就是胚胎干细胞的传代。虽然胚胎干细胞广泛增殖的能力很重要,但是如何在体外条件下防止胚胎干细胞早期培养过程中发生诱导分化也同样重要。

2. 成体干细胞

成体干细胞的基本特点就是单个细胞可以进行自我更新与定向分化。更为严格的定义应该是成体干细胞可以通过细胞表面分子标记进行富集,并可以在移植至个体后仍然可以进行自我更新并分化为特定的组织、器官甚至系统。众所周知,许多成体干细胞在个体内的重建实验并不成功。因此,明确地制订或规范成体干细胞的体外发育潜力的判定标准是识别成体干细胞的基础。其中,成体干细胞的克隆试验是判定的标准方法之一,还可以最大化地纯化干细胞。

关于成体干细胞的发育潜力,有两个研究观点目前是较热的。第一个就是可塑性,即成体干细胞的发育历程并不是一成不变的,其中存在许多变数与可逆性。最为典型的例子就是通过核移植或克隆可以将某种分化方向已经固定的体细胞逆转化形成动物个体发育的最初状态。因此,成体干细胞通过特定的分化条件和方法就可以获得更为广泛的发育潜力。与之相关的另一个观点就是分化转化。分化转化就是一种类型的分化细胞转变成另一种类型的分化细胞并且可以形成相关的组织、器官和系统的现象。这个观点成立的关键在于分化转化的细胞是否具有克隆源性以及相关机制的研究,而这些将对干细胞相关特性的研究起到重要的指导作用。

第二节 干细胞研究的发展简史

一、干细胞研究的萌芽时期

1896年, E.B. Wilson 在论述细胞生物学的文献中第一次使用了“Stem cell”这一名词。而干细胞研究与临床应用最早起步于 21 世纪 60 年代, 主要是造血干细胞的研究。

1957年, 美国华盛顿大学 E. Donnall Thomas 发现将正常的骨髓细胞注射到造血功能障碍病人体内, 可以达到一定的治疗效果。

1959年, E. Donnall Thomas 完成了世界上第一例骨髓移植, 是干细胞治疗方法的雏形。

1961年, 加拿大科学家 Till 和 McCulloch 通过“脾集落形成试验”发现骨髓中存在造血干细胞, 并率先描述了造血干细胞的相关特性。

1964年, 美国的 Pierce 等发现取自小鼠睾丸畸胎瘤组织的细胞具有多能性, 可分化为多种类型细胞, 并命名这些多能性细胞为胚胎癌细胞(Embryonal carcinoma cells, ECCs)。

1968年, Edwards 和 Bavister 在体外获得了第一个人类卵子。

1975年, Brinster 将 ECCs 注入小鼠囊胚中, 最终形成了嵌合体小鼠, 这表明 ECCs 具有一定程度的干细胞特性。

二、干细胞研究的探索时期

1978年, 第一个试管婴儿 Louise Brown 在英国诞生。

1981年, 英国剑桥大学的 Evan、Kaufman 和 Martin 从小鼠胚泡内细胞群分离出小鼠 ESCs, 并建立了小鼠 ESCs 体外培养体系。由这些细胞产生的细胞系具有正常的二倍型, 像原生殖细胞一样可以产生三个胚层的衍生物, 并且将 ESCs 注入小鼠体内, 能诱导形成畸胎瘤。

1984~1988年, Anderews 等从人睾丸畸胎瘤细胞系 Tera-2 中获得了多能性细胞, 称为胚胎癌细胞。人 ECCs 在视黄酸的作用下可以分化形成神经元样细胞和其他类型的细胞。

1986年, E.B. Wilson 在论述寄生虫(如蠕虫、线虫、蛔虫等)生殖系的祖细胞时, 首次提出“干细胞”的概念。

1989年, Pera 等分离得到了一个人 EC 细胞系, 并从中分离出 ESCs, 此细胞系能产生出三个胚层的组织。这些细胞是非整倍体的(比正常细胞染色体多或者少), 它们在体外的分化潜能是有限的, 初步证明了人 ESCs 建立的可能性。

1994年, Pera、Trounson 和 Bongso 发现通过体外授精获得的胚泡内细胞群在培养过程中, 中央分布 ESCs 样细胞, 周边则有滋养层细胞聚集。

三、干细胞研究的黄金时期

干细胞研究的大时代始于 1998 年。

这一年,美国威斯康星大学(University of Wisconsin)科学家 James A. Thomson 带领研究团队首次从正常人胚泡中分离得到内细胞群并形成细胞系。该细胞系经培养可多次传代,保持正常核型,具有高水平的端粒酶活性,并表达人 ESCs 的特征,注入免疫缺陷小鼠体内后可形成畸胎瘤,这些证实其具有干细胞相关特征。这是人类首次从人胚胎组织中提取培养出 ESCs,这标志着一个时代的到来,而 Thomson 也被称作“干细胞研究之父”。

同年,约翰·霍普金斯大学的 Gearhart 教授从生殖嵴中成功建立干细胞系,将其命名为胚胎生殖细胞(Embryonic germ cells, EGCs)。

1999年,美国科学家 Geron 研究发现,小鼠成体干细胞可分化为血液细胞。随后,各国科学家也证实,来自成体动物和人的骨髓、脐带血等组织的成体干细胞具备跨系甚至跨胚层分化的能力,可以分化为骨、软骨、肌肉、神经、肝、脂肪等组织细胞。

2003年,斯坦福大学的 Clarker 博士发现了肿瘤干细胞。

2003年,美国卫生独立研究院(NIH)华裔科学家施松涛等人首次发现牙齿间质细胞中存在干细胞。

2004年,Massachusetts 研究中心报道克隆小鼠的干细胞可以通过形成细小血管的心肌细胞修复小鼠的心肌损伤,这是首次成功应用克隆干细胞在活体动物体内修复受损组织。

2006年,日本科学家 Yamanaka 等成功诱导出小鼠诱导性的功能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs),此项研究成功地将干细胞研究扩展到一个新的领域——重编程。iPSCs 研究好像是回拨的时针一样,巧妙避开了胚胎干细胞研究应用带来的伦理道德问题。此后很大一部分研究干细胞的科学家都将目光聚焦到 iPSCs 的研究上面,干细胞研究也随之繁荣发展起来。

2007年,iPSCs 研究取得巨大进展;Yamanaka 和 Thomson 分别在 *Cell* 及 *Science* 发表论文宣布成功利用人类上皮细胞诱导出 iPSCs。

2008年,美国科学家 Chung 等宣布可以在不伤害胚胎的前提下成功获取胚胎干细胞。

2008年,美国科学家 Richard A. Young 解析了 microRNAs 在干细胞发育及分化中的调控作用,为干细胞日后的研究提供了非常重要的参考资料。

2009年1月,Thomson 小组再次独辟蹊径,利用重症神经疾病患者的皮肤细胞培养出的 iPSCs,重新诱导分化为神经细胞,成功再现了神经细胞因疾病死亡的全过程。

2009年2月,德国科学家 Hans R. Schöler 首次利用单基因调控方法成功诱导出 iPSCs。

2009年3月,美国白头研究所(Whitehead Institute)科学家 Jaenisch 在成功诱导 iPSCs 后,巧妙地将制备 iPSCs 时带入的基因去除,大大降低了细胞癌变的风险。

2009年3月,Thomson 研究小组在 iPSCs 研究方面又迈进一大步,他们利用质粒作为诱导 iPSCs 基因的载体进行 iPSCs 诱导后,随着细胞分裂、质粒丢失,可以得到纯净无外源 DNA 的 iPSCs,又进一步提高了 iPSCs 在应用方面的安全性。

第三节 干细胞研究的前景与展望

一、干细胞研究的应用前景

干细胞的用途非常广泛,涉及多个医学领域。科研工作者已经可以在体外鉴别、分离、纯化、扩增和培养多种干细胞,并以干细胞为“种子”培育出各种组织器官。从科学的角度看,掌握干细胞分化发育的规律,使之能按照人们的需求发育成各种组织器官,解决紧缺的组织和器官移植的来源问题,用以治疗目前还难以治愈的早老性痴呆、帕金森症、糖尿病、白血病等疾病是干细胞治疗未来的主要发展方向,而且干细胞及相关的组织工程研究已成为当前转化医学最前沿的研究领域之一,与干细胞相关的疾病治疗方法也得到了很大的发展。在干细胞临床应用研究、现代基因组学、RNA 组学以及蛋白质组学的发展和带动下,干细胞势必可以为生物学和医学研究创造很多机会并发挥重要作用。

1. 干细胞移植研究——重建机体功能

就目前而言,对于许多缩短生命的疾病,虽然没有十分有效的治疗方法,但是可以通过一些代替自然发育过程的医疗方法予以缓解。例如,在弱化免疫反应的基础上,可以将一个人的器官和组织移植给另一个人,取代患病的器官。尽管移植科学已十分成熟,然而由于捐献器官的短缺与伦理道德的限制,单纯以捐助器官移植来挽救更多生命越发显得不可能。

因此,干细胞及其衍生组织器官在临床上的广泛应用必将引发一次重大的医学革命,产生一种全新的治疗技术,即再造正常的甚至更年轻的组织和器官,使任何人能用上自己的或他人的干细胞衍生的新组织器官,来替代病变或者衰老的组织器官,从而达到治疗的目的。就现阶段而言,使用干细胞替换治疗神经疾患是研究的主要焦点。脊髓损伤、多发硬化症、帕金森症和阿尔茨海默症(AD)的治疗都可在脑或脊髓中用干细胞代替损坏或者无功能细胞的方法。

2. 基础研究应用

干细胞在基础科学和人类健康方面有重要的指示作用,最基本的就是可以帮助我们理解人类发育过程中的复杂事件,可以更为直观地了解生物个体中细胞的分化过程。例如癌症和先天缺陷就是因异常的细胞分化所导致的。如果能更好地了解正常细胞的分化发育过程,就能更深刻地理解其中发育错误的本质,了解这些致死疾病的成因。

不仅如此,通过对干细胞尤其是胚胎干细胞的研究可以帮助我们理解胚胎发育的基本过程,在未来的某一天也许能够解释胎儿畸形的原因并予以预防。另一个与发育生物学和干细胞生物学研究相关的重要研究领域是了解胎儿发育期间起主要作用的基因和营养分子,借此培养实验室条件下的干细胞,诱导其定向发育成为目的细胞。

近年来,世界各国均在干细胞的基础研发及应用领域加大投入,欧美等国制订了干细胞研究和新药研发计划,我国也制订了《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006~2020年)》。根据该纲要,2006~2020年我国将重点研究干细胞增殖、分化和调控,生殖细胞发生、成熟与受精,人体生殖功能的

衰退与退行性病变的机制,辅助生殖与干细胞技术的安全和伦理等。在“十二五”“863 计划指南”中也提出要加快干细胞治疗技术的临床转化与应用。

3. 治疗转移系统

目前的药物治疗都是对症治疗,治标不治本,而以干细胞为主的细胞治疗则能够在根本上治疗疾病,是一种治本的措施。另外,现今干细胞临床研究正处在一个飞速发展的阶段,众多有识之士一致认为在干细胞治疗领域采用转化医学的模式,将临床与科研紧密结合,能更好地促进研究成果的转化。目前全球干细胞临床试验研究已有 3461 项,基础研究相对完备的关于造血干细胞有 3129 项,关于骨髓间充质干细胞有 163 项,甚至连存在伦理问题和致瘤问题的 ESCs 及 iPSCs 都各批准了 11 项(截至 2011 年 8 月 15 日)。美国食品与药品监督管理局(FDA)批准的干细胞临床试验主要以成体干细胞为细胞来源,试验方向主要是急性移植物抗宿主病(GVHD)、自身免疫性疾病以及急性损伤等方面。

4. 药物筛选模型的建立与评价体系建立

干细胞研究使更多类型的细胞实验成为可能,将大大改进药品研制和安全性实验的方法。例如,新的药物治疗方法可以先用人类细胞系进行实验,以确定其安全性再考虑进一步的临床应用。虽然这些实验不可能取代动物和人体实验,但这会使新药研发的过程更为有效,只有当细胞系实验表明药物是安全且有效时,才可以在实验室进行动物和人体实验。因此干细胞提供了新药的药理、药效、毒理及药物代谢等细胞水平的研究手段,大大减少了药物实验所需动物的数量,并且还可以用来研究人类疾病发生的机制和发展过程,以便找到持久有效的治疗方法。

二、干细胞研究面临的问题

随着干细胞治疗的疾病种类不断增加,使众多受死亡威胁的患者得到了新生,并促进了医学事业的进步,但是关于干细胞的研究还有很多基础研究方面、临床应用方面及伦理道德方面的问题尚待解决。

1. 基础研究方面

是什么机制决定了胚胎干细胞(ESCs)和胚胎生殖细胞(EGCs)维持不分化状态?控制干细胞分化的内部机制是什么?干细胞沿着特别的路径定向分化形成一种特化细胞的内部调控机制是什么?这种内部机制如何在微环境的影响下转变?干细胞通常位于什么地方?什么是相对重要的细胞和分子的信号?仅使用成体干细胞就能满足所有治疗需求了吗?有多少种干细胞能在短期内产生并可以用于治疗?高等生物,特别是哺乳动物,它们是从一个受精卵发育成一个完整的个体的。在这个过程中,细胞要经过很多次分裂,并发生分化,形成各种各样的器官和组织。那么,在这个过程中是什么样的机制使得一个小小的细胞能够准确无误地形成这样复杂的个体呢?

2. 临床应用方面

干细胞在再生医学中的作用机制是什么?干细胞治疗是否会增加肿瘤发生的风险?如何掌握各种疾病适应症在临床上的应用?干细胞产品怎样标准化?此外,干细胞的移植时机、移植途径、移植频率等各种问题都必须进行深入研究。规范化的管理是目前我国干细胞临床研究亟待解决的问题,也是干细胞事业在我国健康发展的重要保证,完善我国的干细胞治疗监管和准入体系迫在眉睫。

3. 伦理道德方面

尽管人胚胎干细胞有着巨大的医学应用潜力,但围绕该研究的伦理道德问题也随之出现,人类 ESCs