



国家科学技术学术著作出版基金资助出版

| 干 | 细 | 胞 | 原理、技术与临床

赵春华 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

| 干 | 细 | 胞 |

原理、技术与临床

赵春华 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

干细胞原理、技术与临床/赵春华主编. —北京: 化学工业出版社, 2006.1

ISBN 7-5025-8155-3

I. 干… II. 赵… III. 干细胞-研究 IV. Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 000301 号

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

干细胞原理、技术与临床

赵春华 主编

责任编辑: 郎红旗 梁静丽

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 49 彩插 4 字数 1176 千字

2006 年 5 月第 1 版 2006 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8155-3

定 价: 145.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《干细胞原理、技术与临床》编写人员名单

主编 赵春华 中国医学科学院基础医学研究所/组织工程研究中心 主任

主要编写人员 (以汉语拼音或英文字母排序)

艾辉胜 中国人民解放军第 307 医院血液科 主任
杜 智 天津市第三中心医院 院长
范 明 军事医学科学院基础医学研究所 所长
冯彦林 广东省佛山市第一人民医院 主任医师
黄晓军 北京大学人民医院血液病研究所 所长
金 岩 第四军医大学 教授
金 颖 中国科学院上海生命科学研究院健康科学中心 研究员
黎介寿 中国人民解放军南京军区总医院 副院长 工程院院士
李 涛 天津市第三中心医院 教授
刘玉琴 中国医学科学院基础医学研究所 教授
孟淑芳 中国药品生物制品检定所 博士
谭家驹 广东省佛山市第一人民医院 院长
唐佩弦 军事医学科学院基础医学研究所 教授
王春梅 中国医学科学院整形外科医院 副院长
解慧琪 四川大学华西医院 副研究员
许增禄 中国医学科学院医学信息研究所 所长
杨志明 四川大学华西医院 教授
章静波 中国协和医科大学基础医学研究所 研究员
赵玉沛 北京协和医院 副院长
郑志竑 福建医科大学 教授
左萍萍 中国医学科学院基础医学研究所 教授
Edward T. H. Yeh 美国得克萨斯大学安德森癌症研究中心临床心血管系 主任
Harald Neumann 欧洲神经科学研究院 主任
Mariusz Ratajczak 美国路易斯维尔大学干细胞研究中心 主任

协助编写人员 (以汉语拼音排序)

曹 莹 陈 磊 陈晓萍 迟占有 董 蕊 韩 钦 何东南
廖联明 刘丽辉 马 杰 孟 艳 仇文颖 史明霞 孙 昭
孙博文 王 惠 温广华 吴 皖 许兰平 原春辉 张 伟
张金卷 曾丽芬 朱雅妹

审校 章静波

中国卓有成就的干细胞学专家赵春华教授主编的《干细胞原理、技术与临床》终于出版了。我由衷地为此庆贺。

远在第二次世界大战之末，在日本爆炸的两颗原子弹导致出现了数以万计的重度和极重度急性辐射损伤的伤员，当时人们束手无策。此后美国和欧洲医学科学家们开展了对急性辐射损伤和放射生物学的研究，在联体动物和局部屏蔽照射的动物实验中发现，输注正常骨髓细胞可以修复重度以上的急性放射病的造血损伤。但是，除了孪生同胞供者外，异体骨髓移植屡屡失败。幸好 20 世纪 60 年代发现了人白细胞抗原（HLA），70 年代开始用 HLA 相合的同胞供者的骨髓进行异基因移植，以治疗白血病，出现 10 年以上无复发的根治白血病的空前奇迹。1992 年，骨髓造血干细胞移植治疗白血病获得有史以来第一个诺贝尔临床医学奖。临床应用的发展大大地促进了干细胞研究的发展。1984 年，Curt Civin 首次发现表达 CD34 抗原的细胞就是移植后重建造血的造血干祖细胞。接着，单克隆抗体技术出现，并获得又一个诺贝尔医学生理学奖，20 世纪 80 年代流式细胞术应运而生，同时 G-CSF 分子克隆获得成功，使细胞因子基因重组技术与分子生物学理论和技术同时切入干细胞研究，于是造血干祖细胞的基础研究更加快速地发展起来。

然而至 21 世纪初，人们对干细胞的认知仍然局限于“造血”功能，认为“骨髓源的干细胞就是造血干细胞”或“骨髓移植就是造血干细胞移植”。1999 年，Dannis 等发现骨髓中还有间充质干细胞（MSC），其实这已经首次揭开了“成体干细胞”的面纱，然而当时并没有引起人们对存在成体干细胞的重视。无独有偶，不久更多的研究者发现从脂肪和肌肉组织细胞中能诱导生成神经元细胞、心肌细胞或造血干细胞等。由于这些研究者们当时对“成体干细胞”还一无所知，他们还以为各类胚胎性干细胞只存在于胚胎之中，而不可能出现于成年或成体组织中。于是，本来有望成为成体干细胞的重大发现的论著，却得出“横向分化”、“去分化”、“重编程”等推断或假说。尽管如此，他们事实上首创地证实了各类“成体干细胞”的存在，这无疑是 20 世纪末划时代的重大发现。

21 世纪将成为干细胞研究发展的“盛世”。干细胞的临床应用价值将远远地超出人们的想像。各类损伤，特别是缺血性坏死性损伤的治疗，可以用成体干细胞治疗而奏效。目前对于糖尿病下肢坏死、心肌梗死、帕金森综合征，骨、软骨、中枢神经或周围神经损伤，消化道以及肝、胰腺病等，都可能用成体干细胞进行治疗，促使组织再生。可以预见，干细胞的临床应用将扩大到许多临床学科。而且，和人胚胎干细胞不同，成体干细胞的应用不存在伦理道德方面的争议。

成体干细胞的天然来源是各种成体组织。作为治疗用途或移植的干细胞，为提高其治疗质量，还需要高超的分化诱导和分离扩增技术，增添支持植入的辅助细胞，下调 HLA 抗原的表达、减轻移植后免疫排斥和 GVHD，发展组织细胞支架成型技术，发展干细胞基因治疗及药物调控体内目的基因表达的技术等，这就是当前重点发展的生物医学科研项目——干细胞工程或组织工程。

我作为国内第一代造血干细胞工作者，经历了艰辛的年代；目睹当前中国科学发展的大好时光，无比喜悦。干细胞及组织工程的研究是在世界各国科学家的共同努力下，在各种科学技术的发展和参与下，才可能发展起来的。本书正是在博采众家之言的基础上精心编撰而成的，集中展现了本领域迄今已有的理论基础和应用研究，尤其难能可贵的是充分反映了我国干细胞领域的科研现状和开创性成果。可谓广征博引而理论体系浑然天成，学术创新与学术继承并行不悖。我还希望本书随着时代的发展、技术的更新而不断修订和再版，以不断满足广大同行的要求。

唐佩弦

2006 年 1 月

20 世纪末期, 美国科学家首次从早期人类囊胚内细胞团中分离出人胚胎干细胞并在体外成功建立了人胚胎干细胞系; 同一时期, 科学家通过实验也发现: 来自多种组织的成体干细胞具有较强的潜能, 可分化为其他胚层组织细胞, 即成体干细胞的可塑性。细胞生物学领域的这两项里程碑式的突破使干细胞研究受到人类社会的广泛关注, 该领域的研究进入了一个突飞猛进的阶段, 在生命科学的基础研究与临床应用中展示出极为广阔的应用前景。

人体是一个由 200 多种不同组织约 1 千万亿个细胞组成的“细胞国家”, 最早是由具备高度增殖和分化潜能的干细胞分化发育而来的。如何获得人体多组织分化近乎全能性的干细胞, 以应对恶性肿瘤、心脑血管疾病等重大疾病及多组织器官损伤疾病的治疗, 成为干细胞再生医学领域最受关注的热点之一, 也是能否解决干细胞体外制备的关键技术问题。

我们研究发现: 干细胞在特定的体内外微环境条件下, 能够诱导分化成为多种组织细胞, 通过移植给受者参与组织的再生与修复, 为临床医学提供了一个新的充满希望的治疗手段, 可用于治疗修复一些曾被人类认为是不可再生的组织器官, 使得一直困扰人类的医学难题有了新的希望, 如心血管疾病、自身免疫性疾病、糖尿病、骨质疏松、癌症、老年性痴呆、帕金森病、严重烧伤、脊髓损伤和遗传性疾病等。

为了将老一辈科学家多年的研究成果和近年来干细胞研究领域的新进展、新成果, 特别是干细胞从实验室走向产业化的诸多技术环节等系统地介绍给读者, 我们特邀请了部分国内外从事干细胞研究的专家学者参与编写本书。本书不仅综述了国外有关干细胞基础与应用研究的最新成果和最新方法, 而且具体介绍了目前国内一批从事干细胞研究学者的原创性工作和国内干细胞研究的最新进展。

本书的突出特点在于: 首次对干细胞领域从基础研究到产业化开发的整个系统过程进行了实质性的介绍, 并结合国家相关政策法规以及编者在科研成果产业化过程中多年积累的经验, 描述了干细胞产业化的具体环节。本书不仅可以为国内从事干细胞、组织工程、再生医学及生命科学和医学研究的科研工作者、临床工作者和研究生提供一部内容全面、系统的工具书, 而且对企业界在生物技术领域的投资、政府部门完善相关科技政策以及制定标准化程序等方面都是一本具有前瞻性、系统性和实用性的参考用书。

在此, 特别感谢我的老师唐佩弦教授多年来的孜孜教诲, 并为本书作序; 感谢著名细胞生物学家薛社普先生长期对组织工程研究中心的工作给予的悉心指点和支持, 并为本书作跋; 感谢中国医学科学院章静波教授为审阅本书书稿付出了大量心血; 感谢国外干细胞研究领域知名专家学者: 国际实验血液学主席、美国明尼苏达大学干细胞研究所所长 Catherine Verfaillie 教授, 美国印第安纳州 The Methodist Research Institute 干细胞和血管实验室主任、《Stem Cells and Development》杂志主编 Denis English 教授, 美国路易斯维尔大学干细胞研究中心主任 Mariusz Ratajczak 教授, 欧洲神经科学研究院主任 Harald Neumann 教授, 美国得克萨斯大学临床心血管系主任、安德森癌症研究中心

Edward T. H. Yeh 教授等的指导和参与的编写工作。另外，对在本书编撰、整理及出版工作中付出辛勤劳动的所有工作人员一并表示诚挚的谢意。

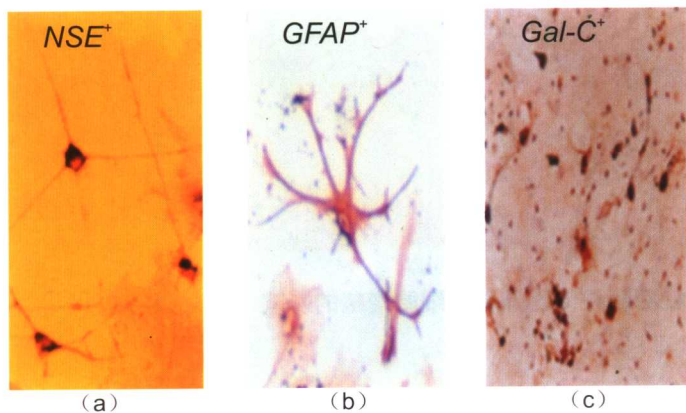
本书的出版得到了教育部“长江学者奖励计划”、国家高技术研究发展计划（“863”计划）“组织器官工程”重大专项（2002AA205061）、国家重点基础研究发展规划（“973”计划）（2001CB509907）、国家杰出青年科学基金（30125018）和国家科学技术学术著作出版基金的大力支持，在此一并表示谢意。

生命的复杂性远远超乎人们想像，要弄清生命发育的全部机理，应用干细胞成功治疗重大疾病还有很长的路要走。没有人能够预言干细胞技术在未来能给人类带来什么。作为生命科学的研究者，我们惟有秉承科学精神脚踏实地刻苦钻研，在公众各界逐渐以更客观理性的态度对待干细胞研究的前提下，才能为其更好的发挥作用提供最理想的环境，也才能使我们对其美好的未来充满期待。

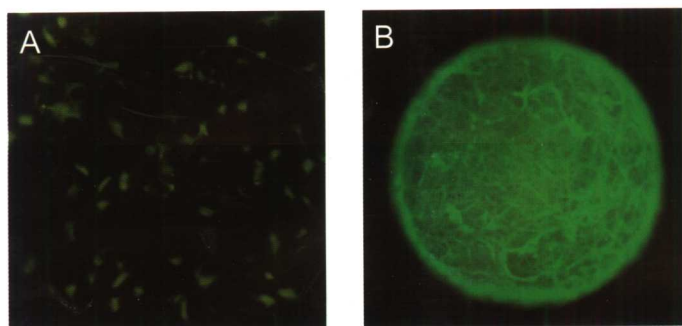
赵春华

2006 年 1 月，北京

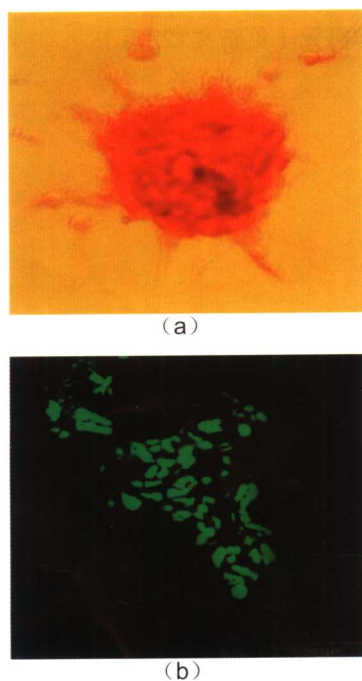
中国医学科学院基础医学研究所/组织工程研究中心



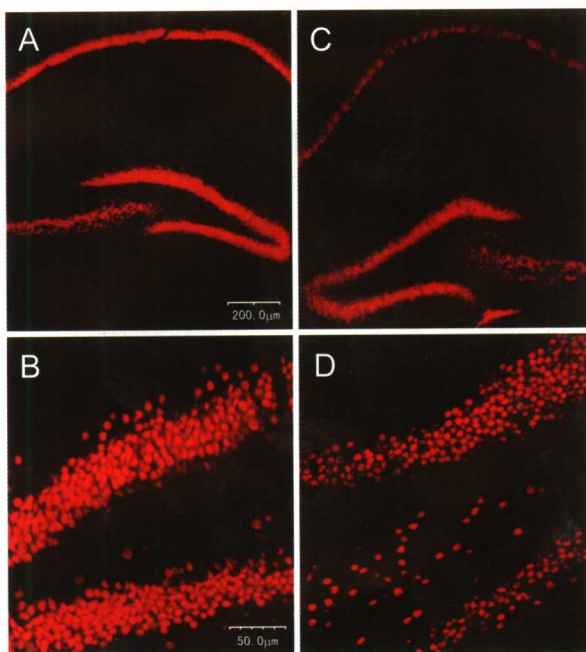
彩图 6-1 体外诱导分化的三种神经细胞 (见正文113页)



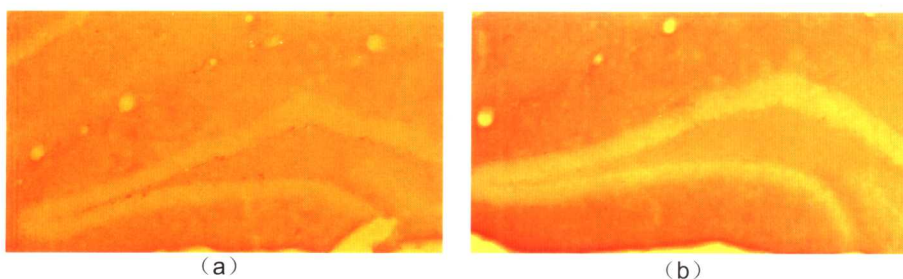
彩图 6-4 神经干细胞的标志——巢蛋白 (nestin) 免疫荧光鉴定 (见正文114页)



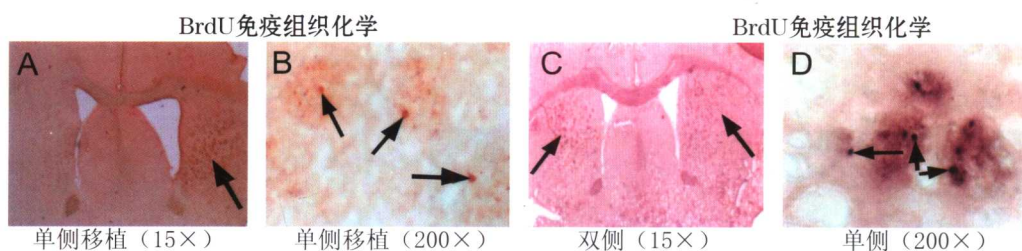
彩图 6-5 神经干细胞体外增殖掺入BrdU实验 (见正文115页)



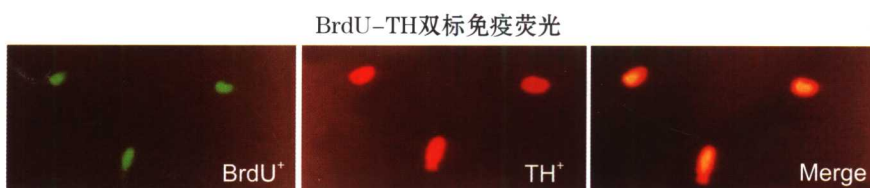
彩图 6-8 A β_{25-35} 对海马齿状回神经元的毒性作用 (见正文120页)



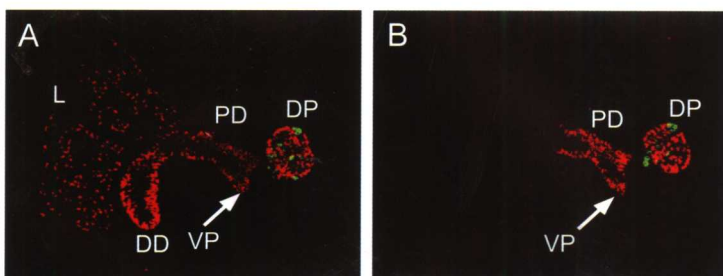
彩图 6-9 D-半乳糖对小鼠海马齿状回颗粒下区神经干细胞增殖的影响 (见正文121页)



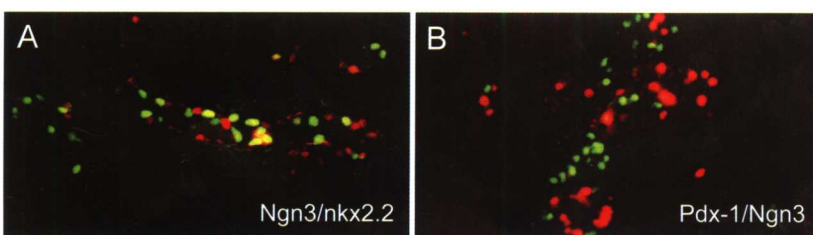
彩图 6-11 移植的神经干细胞在PD小鼠脑纹状体内存活结果 (见正文123页)



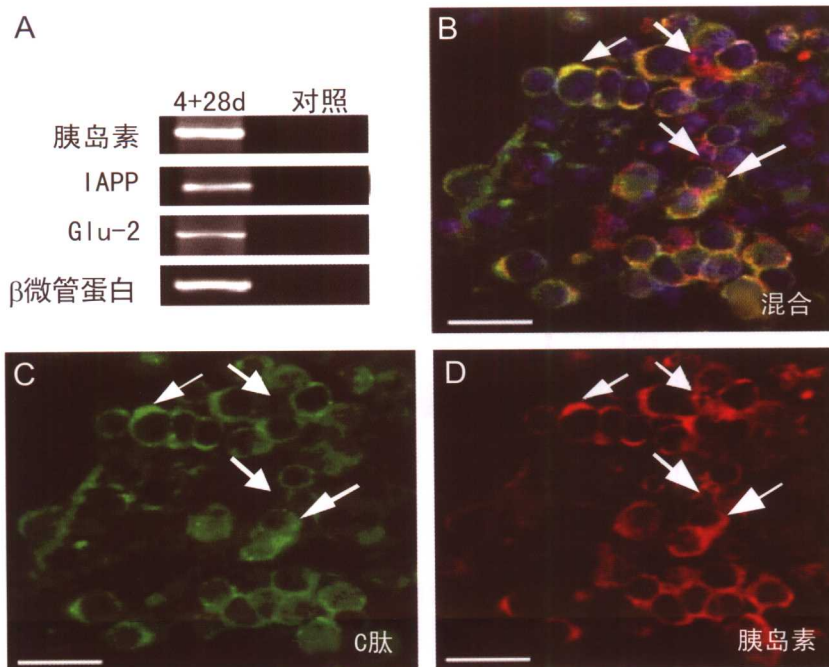
彩图 6-12 移植到PD小鼠纹状体的神经干细胞分化出的TH⁺神经元 (见正文123页)



彩图 12-4 鼠胚胎10.5d胰芽免疫组化 (见正文208页)



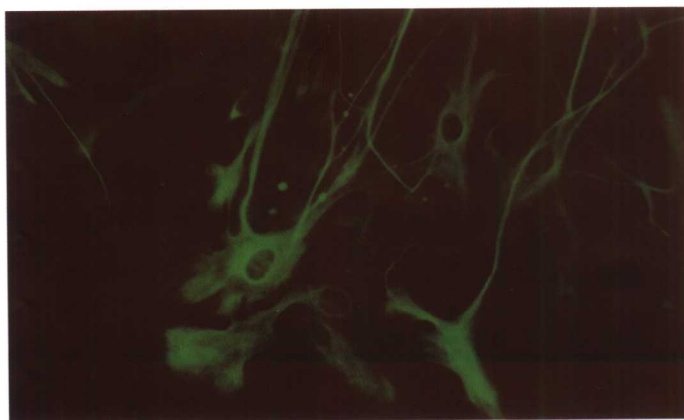
彩图 12-6 小鼠E15.5时免疫组化显示转录因子表达 (见正文211页)



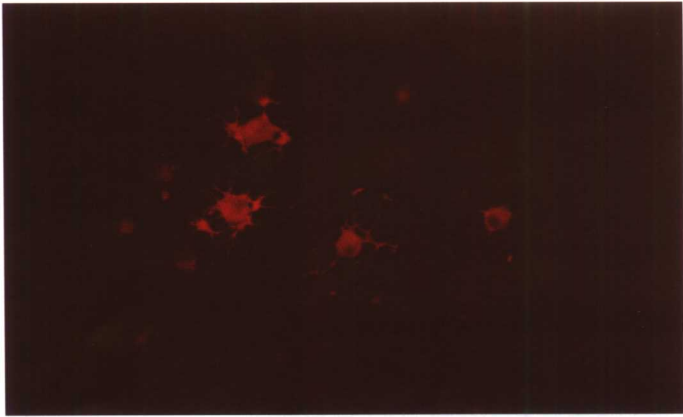
彩图 12-8 检测ES细胞的胰岛素分泌 (见正文217页)



彩图 21-4 神经干细胞经诱导分化为神经元 (400×, 见正文415页)



彩图 21-5 神经干细胞经诱导分化为星形胶质细胞 (400×, 见正文416页)



彩图 21-6 神经干细胞经诱导分化为少突胶质细胞 (400×, 见正文416页)

从未分化小鼠胚胎干细胞诱导分化为分泌胰岛素的胰腺细胞团
阶段1 (2~3d): 胚胎干细胞的扩增
在无滋养细胞、无白细胞抑制因子、凝胶包被的培养基中培养

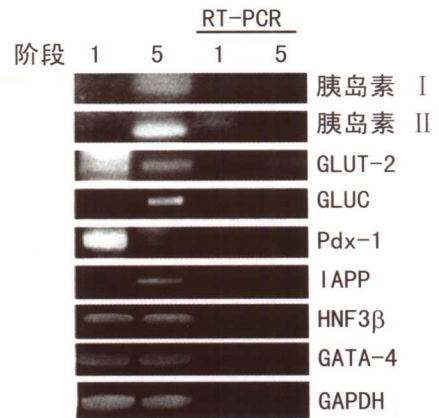
阶段2 (4d): 胚体的形成
无白细胞抑制因子的胚胎干细胞培养基中悬浮培养

阶段3 (6~7d): nestin阳性细胞的分选
ITSFn培养基

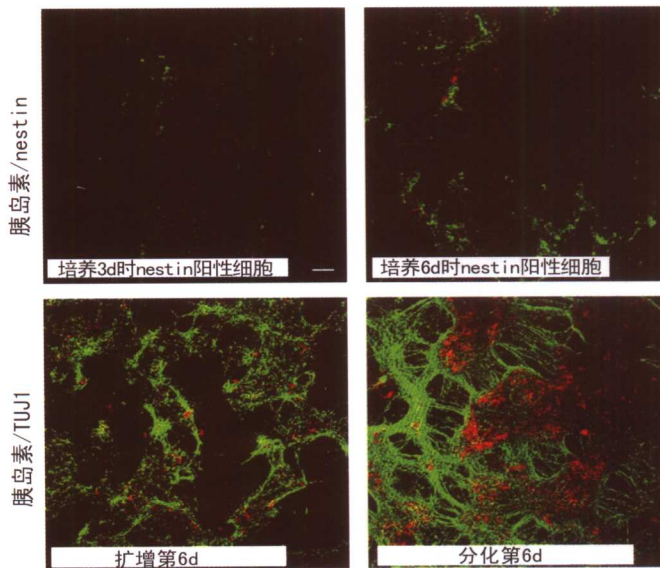
阶段4 (6d): 胰腺内分泌组细胞的扩增
含有B27的N₂培养基, 添加bFGF

阶段5 (6d): 分泌胰岛素的胰岛细胞团的分化诱导
含有B27的N₂培养基, 去除bFGF, 添加尼克酰胺

(a)

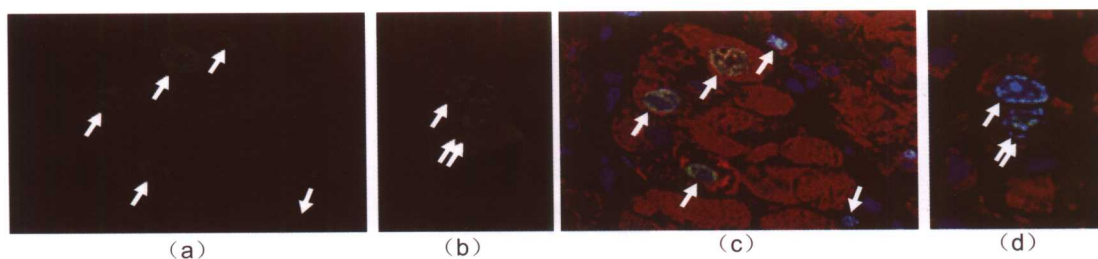


(b)

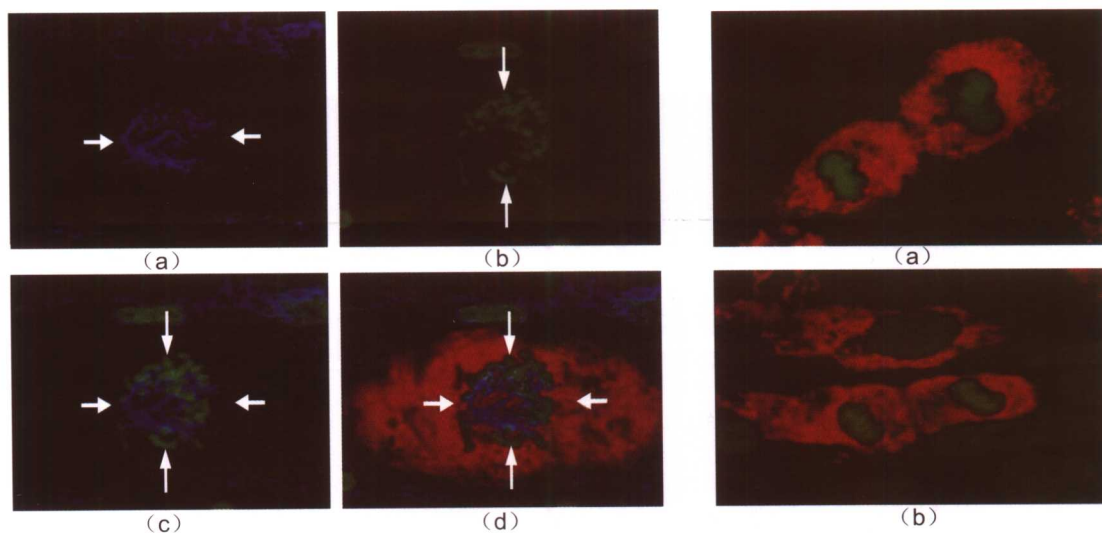


(c)

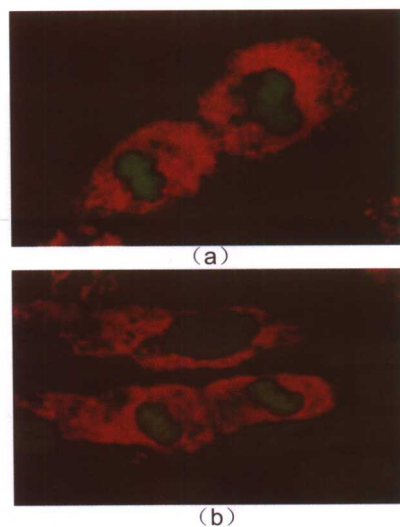
彩图 25-7 胚胎干细胞分化产生与神经元有关联的胰岛素阳性细胞 (见正文481页)



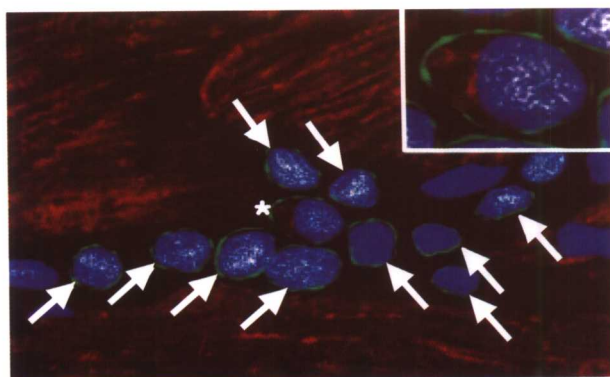
彩图 33-1 心肌细胞的Ki-67染色 (见正文609页)



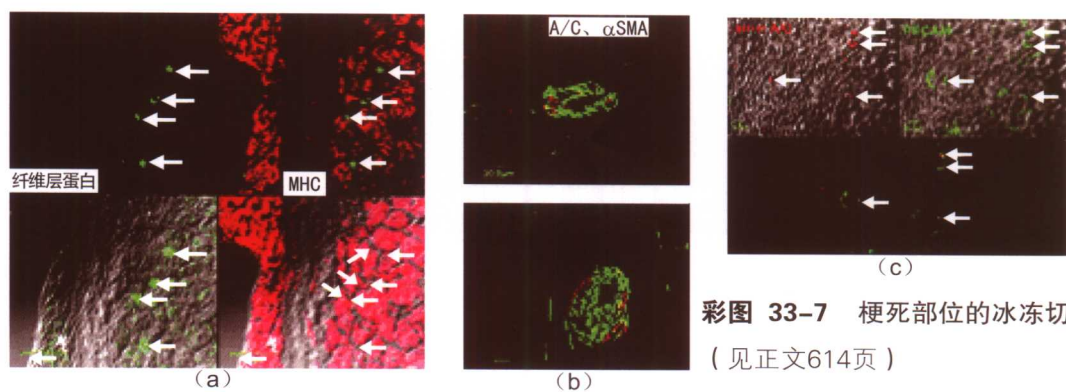
彩图 33-2 分裂中的心肌细胞 (见正文610页)



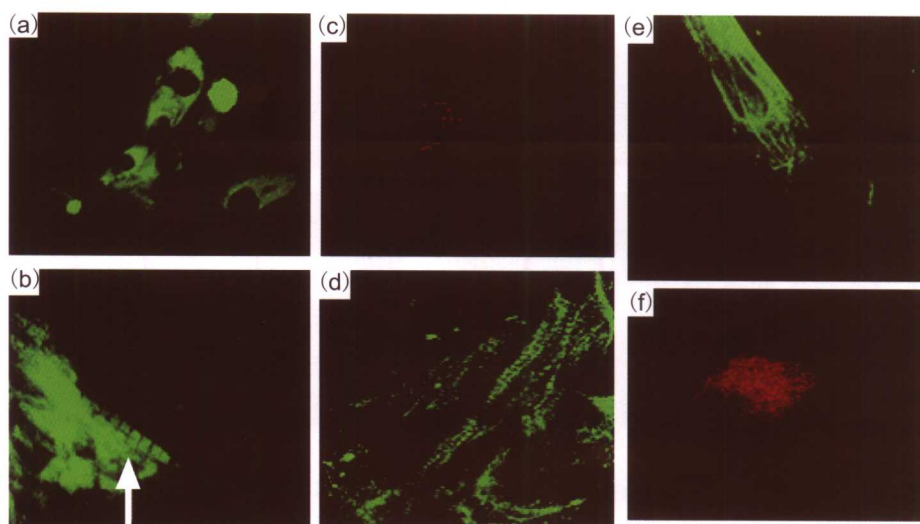
彩图 33-3 分裂中的心肌细胞
(2000 $\times$, 见正文610页)



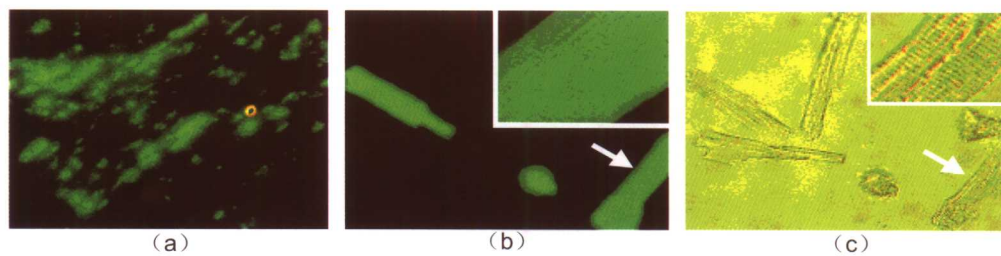
彩图 33-4 c-Kit阳性细胞 (绿色) 和
 α -肌动蛋白 (红色) (见正文611页)



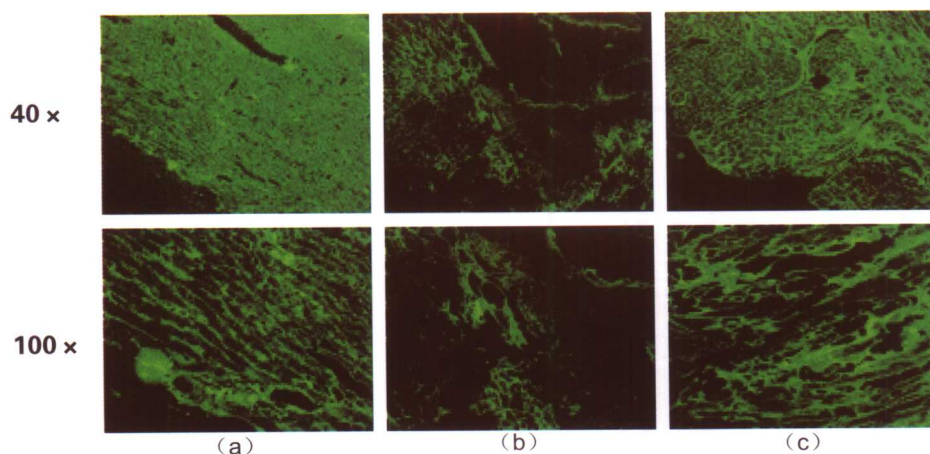
彩图 33-7 梗死部位的冰冻切片
(见正文614页)



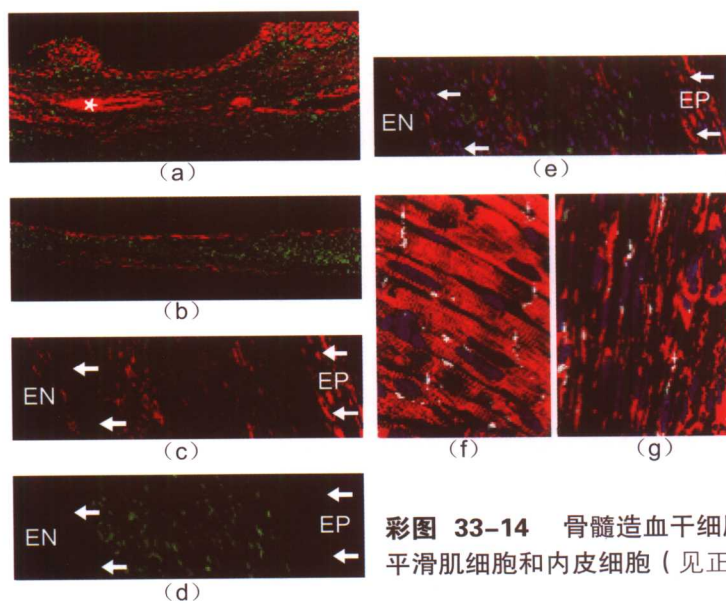
彩图 33-10 人胚胎干细胞来源的心肌细胞的免疫组化染色 (见正文616页)



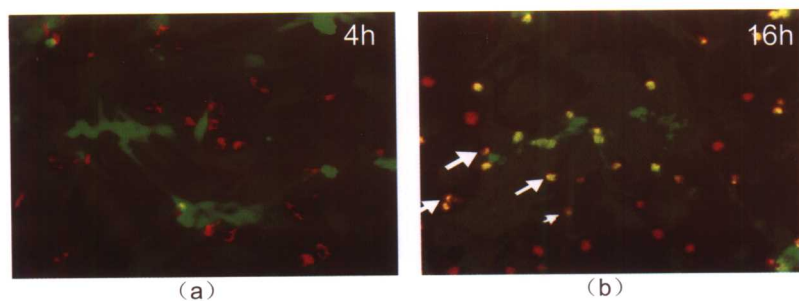
彩图 33-12 人胚胎干细胞向心肌细胞移植 (见正文617页)



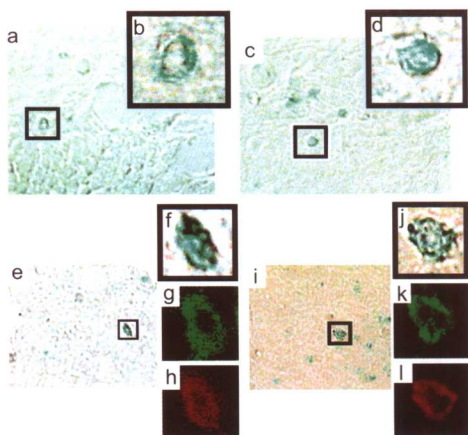
彩图 33-13 人胚胎干细胞来源的心肌细胞的心肌 α -肌凝蛋白重链免疫组化染色（见正文618页）



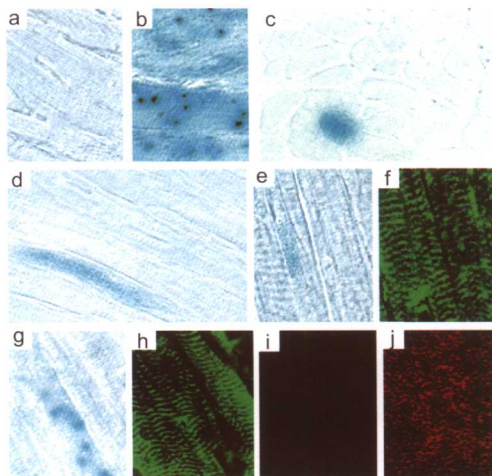
彩图 33-14 骨髓造血干细胞 ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$) 分化为心肌细胞、平滑肌细胞和内皮细胞（见正文619页）



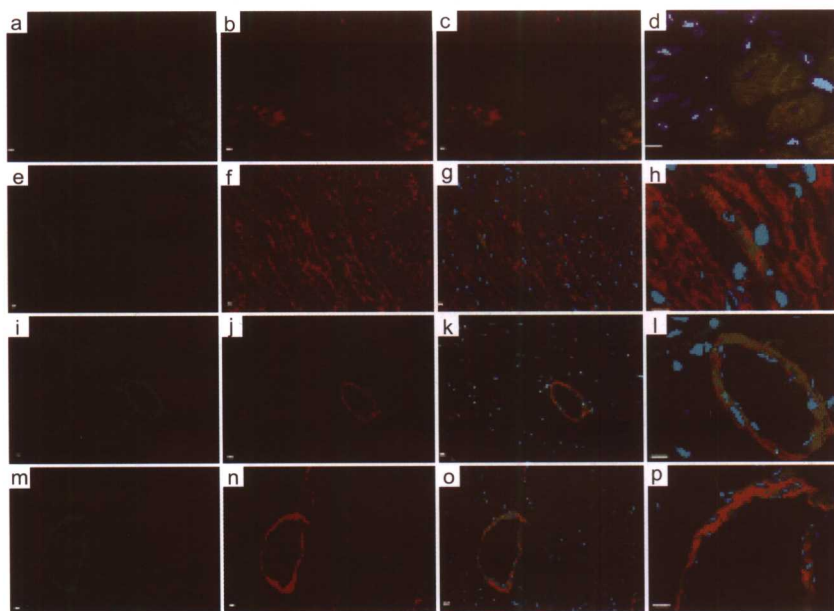
彩图 33-15 人EPC向心肌细胞分化（见正文620页）



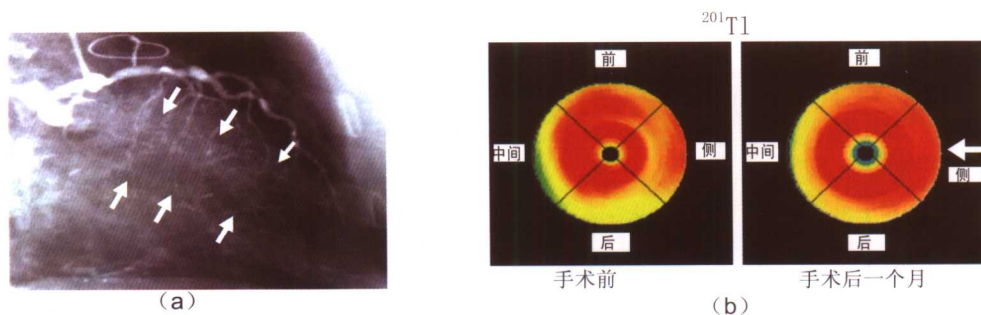
彩图 33-18 SP细胞向内皮细胞分化
(见正文622页)



彩图 33-19 SP 细胞向心肌细胞的分化
(见正文623页)



彩图 33-20 CD34⁺
细胞向心肌细胞分化
(见正文624页)



彩图 33-21 细胞移植一个月后的冠状动脉造影和²⁰¹Tl闪烁图 (见正文625页)

第一篇 干细胞原理

第一章 干细胞生物学特性	3
第一节 干细胞概述	3
一、干细胞的研究历史	4
二、干细胞的研究内容	5
第二节 干细胞的概念	10
一、干细胞的定义	10
二、干细胞的分类	11
三、胚胎干细胞和成体干细胞的区别	14
第三节 干细胞的可塑性	15
一、干细胞的“命运”与可塑性	15
二、成体干细胞的可塑性	15
三、干细胞可塑性机制的研究	16
第四节 干细胞研究的意义	17
一、干细胞是研究早期胚胎发育的良好模型	17
二、干细胞是研究人类疾病的良好模型	17
三、干细胞具有临床应用的前景	17
四、干细胞在其他方面的应用	19
参考文献	20
第二章 胚胎干细胞	22
第一节 胚胎干细胞的概念	22
一、胚胎干细胞	22
二、胚胎干细胞的分离建系	23
第二节 胚胎干细胞的生物学特征	26
一、ES 细胞的形态	26
二、ES 细胞的核型	26
三、ES 细胞的细胞周期特征	27
四、ES 细胞的端粒酶高表达性	27
五、ES 细胞的表面抗原特性	27
六、ES 细胞的高分化潜能	28
第三节 胚胎干细胞的体外增殖与分化	29
一、ES 细胞的体外增殖	29