



科爱传播
KE'AI COMMUNICATIONS
生命科学

中文版

国际干细胞研究经典权威参考书

精编干细胞生物学

Essentials of Stem Cell Biology

〔美〕罗伯特·兰扎 等 编
刘清华 等 译
赵春华 审



科学出版社

www.sciencep.com



原版引进

Essentials of Stem Cell Biology

精编干细胞生物学

[美] 罗伯特·兰扎等 编

刘清华等 译

赵春华 审

科学出版社

北京

图字：01-2007-0881 号

This is a translation version of
Essentials of Stem Cell Biology
Robert Lanza

Copyright © 2006, Elsevier Inc.

ISBN-13: 978-0-12-088442-1

ISBN-10: 0-12-088442-9

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

精编干细胞生物学=Essentials of Stem Cell Biology/[美] 罗伯特·兰扎等编; 刘清华等译. —北京: 科学出版社, 2009

书名原文: Essentials of Stem Cell Biology

ISBN 978-7-03-021907-7

I. 精… II. ①兰…②刘… III. 干细胞—生物学 IV. Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 065441 号

责任编辑: 孙红梅 贾明月 席慧 谢灵玲/责任校对: 张怡君

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>

北京佳信达艺术印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张: 47 1/4 插页: 12

印数: 1—2 500 字数: 1 050 000

定价: 128.00 元

如有印装质量问题, 我社负责调换

序

这个精编本试图将原来两卷《干细胞手册》中所有的精华主题合并为一个单卷。精编本将原书内容进行了重新组织，使之更容易被学生以及对干细胞最新进展感兴趣的普通读者所理解。尽管删减了部分篇幅和章节，但精编本依然体现着原书对这个令人振奋的生物学领域的理解。

精编本的组织结构保持不变，涵盖了对成体和胚胎干细胞的整体理解，研究和特征描述干细胞和祖细胞群所需要的工具、方法和实验方案等必备知识，以及当今著名的世界级专家对各自擅长的器官、系统相关知识和发展现状的介绍。干细胞领域的所有主题无一遗漏地被收录其中，包括基础生物学/机制，发育早期的外胚层、中胚层和内胚层，方法学（例如怎样衍化和维持培养动物和人的胚胎干细胞的具体描述），针对特定人类疾病的干细胞的应用、法规与伦理以及患者的观点。

为了帮助理解那些冷僻的素材和科学术语，《精编干细胞生物学》编制了术语汇编和章后的深入阅读文献，还增加了 150 幅示意图，使得专业的参考文献有了通俗易懂的版本。精编本体现了 8 位编辑和 200 多位学者、科学家的共同努力，正是他们开拓性的工作才使我们建立了对干细胞的理解。谨望本书所勾勒的新知识和新成果能够对癌症、心脏病、糖尿病以及诸多疾病的新型疗法有所贡献。

罗伯特·兰扎, M. D.
马塞诸塞州, 波士顿市
(刘清华 译)

前 言

在这样一本汇集了世界级专家权威性论著、遍述干细胞领域中所有能想见主题的新书中，关于干细胞，我还能说些什么才有新意呢？在下面的论述中，我将试图从科学的广义概念，特别是现代细胞生物学和发育生物学的层面来回答这个问题。

我在本书中阐述的科学观，源自一位在大学里研究细胞基础活动的分子过程达 30 年之久的学者。光阴荏苒，我们对细胞了解的速度之快，甚至连那些最接近层出不穷新发现的科学家们都始料不及。这种知识的积累是级联反应式的——我们对细胞的了解深化一步，就会开发出新型的研究手段，而这又会帮助我们更深入地了解细胞，如此不断深入……这方面的例子见第 4 章和第 51 章所描述的，可以使研究者同时检测成千上万种基因表达的 DNA 芯片技术。从 1961 年 (Marmur and Doty, 1961) DNA 杂交的惊人发现到这个新技术之间需要经过上百个步骤，要想在发现之初就预料到以后的新技术，显然是一件困难的事情。

正如美国国家科学院 (National Academy of Sciences) 出版的系列文章《超越探索》中所反复强调的那样，科学本身的发展就是这样。那些为了向普通民众解释科学成果而设计的 8 页文书，每一份都记录着为人类谋取重大福利的突破性进展，如全球定位系统 (global positioning system, GPS)、儿童白血病疗法等；而每一项进展，其最终发现都来自大量科学家和工程人员数十年努力所获得的知识。当每一个零星的、独立看起来似乎无用的知识，以料想不到的方式与其他知识结合的时候，就会产生出强大到不可思议的成果。

那些单纯地由人类对世界的好奇心而引发的浩大的科学事业，如试图解释夜空中星体运动的科学试验，已经从根本上改变了我们的世界。新知识是在旧知识的基础之上产生的，旧知识的积累增多，新知识的产生加快。因此，我们可以希冀的是，21 世纪中出现的有益于人类的发明将会戏剧性地超越 20 世纪，我们同样可以肯定的是，任何预先猜测这些发明的尝试都将是徒劳无功的。

所有这些，对干细胞来说意味着什么呢？就个人而言，每当听到描述干细胞研究所带来的明确的益处的宣传时，特别是那些将益处与时间表关联起来的宣传，我都会感觉不安。科学发展的历史告诉我们，源自干细胞研究的知识终将为人类的健康带来巨大的益处，但这种益处是不可预知的。我们最终一定能够利用精准的生物学知识培育出可安全地用于患者移植的新器官，而有关干细胞的研究工作无疑将会为此做出重要贡献。这本书所呈现的研究工作同样会为癌症以及大量不那么出名的疾病——那些病因不明，但极度困扰人类的疾病做出贡献。曾经提交了《干细胞与再生医学远景》报告的国家科学委员会 (National Academies Committee) 主席 Bert Vogelstein 提醒我们：“有关干细胞的争论导致科学家和民众共同思考更深层次的问题。例如，我们是谁，以及谁创造了人类等问题” (National Research Council, 2002)。另外，这些争论也使人们明确了现代社会的成功依赖于重视向民众传达科学理念的教育体系。

为了达到向民众宣传科学理念的目标，科学家们需要审视他们在大学中的教授职责，以及在支持 5~18 岁学生的科普教育中所起的重要作用，从而产生新的认识 (National Research Council, 1996)。我们面对的现实是，即使在最好的境况下，过渡到我们国家所需要的以科学为中心的教育体制仍需要数十年的时间。那时的科学家们应该改变他们的生活，因为作为一个科学家，意味着承担更多的责任，以至于他们中的大多数都需要改变对时间的分配。在某种意义上，科学家们应该将有关干细胞研究的争论看作是有益的提示——它们预示着在新的世纪里，干细胞研究领域中将来越多令人激动的新发现将成为新闻的主角。

Bruce Alberts, PhD

(刘清华 译)

注 释

- Marmur, J., and Doty, P. (1961). Thermal renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* **3**, 585-594.
- National Academy of Sciences. "Beyond Discovery" series. Available at: [http://www. Beyond Discovery.org](http://www.BeyondDiscovery.org).
- National Research Council. (2002). "Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine." National Academies Press, Washington, DC. Available for purchase at: <http://www.nap.edu/catalog/10195.html>.
- National Research Council. (1996). "National Science Education Standards." National Academies Press, Washington, DC. Available for purchase or download at: <http://www.nap.edu/catalog/4962.html>.

胚胎干细胞的展望

为了探询一个单细胞的受精卵如何成长为一个复杂生物体的秘密，生物学家们研究了从蠕虫到人类所有生物类别的胚胎发育过程。我们今天已经知晓了很多参与调节不同种属发育的基因，发现了不少在进化过程中保守的基因通路，也很好地理解了发育的逻辑，即胚胎如何重复使用同样的策略来完成细胞特化、组织图式和器官发生的过程。胚胎发育一个常见的发育策略，就是利用干细胞来产生或维持给定的组织或器官。所谓干细胞是指这样一个细胞，当它分裂的时候，能够产生一个自身拷贝和一个分化细胞后代；而成体干细胞如造血干细胞和精原干细胞，它们的自我复制能力正是使机体组织持续更新的基础。干细胞的概念来自 Till 和 McCulloch 在造血干细胞、Leblond 在精子发生和小肠隐窝方面所做的开拓性工作。即使在脑组织这种成体阶段不发生细胞快速更新的组织，也存在着长期静止、在修复损伤时重新活化的干细胞。

目前的许多研究致力于从成体中鉴定、特征描述和分离干细胞，希望利用外源性干细胞或激活内源性的干细胞进行成体组织的治疗性修复。但根据已有的资料，大多数成体干细胞的潜能是有限的，还不能在体外常规培养条件下无限地增殖和扩增。胚胎发生中，最初的细胞是具有增殖能力的亚全能性细胞，但随着发育逐渐走向分化的命运。多年来，人们对胚胎中是否存在亚全能性干细胞一直保持着浓厚的兴趣。直到 20 世纪六七十年代，人们才了解到哺乳动物如小鼠的早期胚胎，只要在晚期原肠胚之前进行异位移植，如移植到肾被膜下，都能产生一种被称作畸胎瘤的肿瘤。这种肿瘤除了含有包括肌肉、神经和皮肤在内的多种分化细胞成分以外，还包括一种未分化的细胞成分，即胚胎瘤 (EC) 细胞。EC 细胞能在体外培养中以未分化状态增殖。更为重要的是，Pierce 在 1964 年发现，单个的 EC 细胞能够再次长出包含 EC 细胞和分化后裔的肿瘤组织 (Kleinsmith and Pierce, 1964)，因此，EC 细胞被证实为肿瘤干细胞。

这些肿瘤细胞和正常的发育过程有什么关系呢？20 世纪 70 年代所做的许多研究表明，当把 EC 细胞注射到早期胚胎中时，它们就会显示亚全能性。最好的，即核型最正常的 EC 细胞能够在注射后产生的嵌合体中参与多种细胞类型的生成，其中包括在偶然情况下参与种系的生成。这一结果使人们兴奋不已，认为可以利用它们在小鼠中产生新的基因变体，以及通过促进肿瘤细胞分化而达到使肿瘤转归的目的。但实际情况是，这种嵌合现象通常较弱，而由它们导致的肿瘤却是嵌合体中常见的特征 (Papaioannou and Rossant, 1984)。因此，EC 细胞虽然具有明显的分化性质，但它们依然是肿瘤细胞。1981 年，Martin、Evans 和 Kaufman 发现了直接从囊胚衍化而来，并在体外培养中保持亚全能性的细胞系，即胚胎干 (ES) 细胞。这一发现改变了该研究领域的整个前景。尽管 ES 细胞也能在异位生成畸胎瘤，但对其分化过程的控制却比对 EC 细胞容易得多。更为显著的是，在体外培养条件下生长了许多代的 ES 细胞，当受到四倍体胚外组织的支持时，依然能够发育成完整的小鼠个体 (Nagy *et al.*, 1993)。这种由增殖旺盛的杂交细胞系发育出的小鼠，并未出现肿瘤易感性增强等改变，其他方面的表现也

都是正常的 (Eggan *et al.*, 2001)。所有这些性质都使得小鼠 ES 细胞成为一个强大到不可思议的工具, 它既可以用来改变小鼠的基因组, 又可以用来分析改变的效果 (Rossant and Nagy, 1995)。

那么, ES 细胞是真正的干细胞吗? ES 细胞在体内的对应物尚不明确, 其基因表达图式和嵌合体中的组织参与图式都类似于原始外胚层或外胚层细胞。胚胎中亚全能性细胞赖以形成和生存的转录因子 (如 Oct4 和 Nanog), 对 ES 细胞的生存同样必不可少 (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 1998)。但是, 体内的外胚层只有在所有细胞分化形成三个胚层组织的原肠胚期之前的有限时间段内, 才可能作为干细胞增殖。在原肠胚期被“搁置一旁”的生殖细胞, 会进一步发育为将亚全能性传递给下一代受精卵的配子, 也没有证据表明生殖细胞在可能作为 ES 细胞对应物的外胚层中是一个特殊的干细胞池。更可能的情形是, 在适宜的条件下, 所有的外胚层细胞都有能力形成生殖细胞 (Tam and Zhou, 1996), 因此, 分化成为生殖细胞可能仅仅是外胚层发育的选择之一。

我们已经了解到, ES 细胞能够在体外以未分化状态进行不确定的扩增并保持分化能力。根据这一点判断, 它们肯定具有干细胞性质。然而, 尚无明确的证据表明单个的 ES 细胞能够像 EC 细胞那样, 既能自我复制也能分化。我们已知 ES 细胞具有亚全能性, 因为通过对将单个 ES 细胞注射到囊胚而产生的嵌合体的分析表明, 它参与形成了胎儿所有的细胞类型 (Beddington and Robertson, 1989)。从某些方面来说, ES 细胞显得更像祖细胞, 例如, 当环境中存在合适的生长因子时, 其细胞群扩增; 而移除了支持自我复制的环境后, 其所有细胞走向分化。这一差别在实验操作中也许并不重要, 但如果事实的确如此, 则可能会产生一个错误的外延——将我们已知 ES 细胞如何维持其增殖状态的例子推广到其他干细胞。寻找“干性”基因和蛋白质无助于这个问题的解决, 除非我们就如何定义不同的干细胞达成一致的见解。

人们如此关注将小鼠 ES 细胞作为遗传变异的种系传递工具, 以至于远未发掘出它们在培养中表现的明显的分化特征。从早期人类胚胎衍化得到的细胞系中发现了很多与小鼠 ES 细胞共同的特征 (Shamblott *et al.*; Thomson *et al.*, 1998), 这将人们的注意力再次引向细胞的体外特征。我们在把 ES 细胞从一个有趣的生物学系统转变为一种治疗退行性疾病的手段之前, 还需要解决许多问题。例如, 人和鼠的 ES 细胞相似程度如何? 在一个研究中借鉴另一个研究的数据的可靠程度如何? 如何使 ES 细胞在多次传代之后仍然维持在真正稳定的状态——所有细胞都是干细胞 (或祖细胞), 具有稳定的表观遗传学重编程和最少的基因变异? 如何使 ES 细胞直接分化为给定细胞类型的种群恢复细胞? 如何分离和维持分化的祖细胞? 如何确保 ES 细胞在体内没有致癌性? 等等。

所有关于 ES 细胞的研究, 无论是小鼠的还是人类的, 都将为我们提供胚胎发育的新知识, 以及如何从不同的胚胎和成体组织中分离和特征描述干细胞的新线索。那些探索正常胚胎发育过程是如何调控的研究, 可以反过来为体外干/祖细胞的维持培养和促进分化提供新的线索。在我们了解干细胞发育的基础知识并将其转变为治疗手段的过程中, 发育生物学家和干细胞生物学家的互动将是关键的环节。

Janet Rossant, PhD

(刘清华 译)

参 考 文 献

- Beddington, R. S. P., and Robertson, E. J. (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* **105**, 733–737.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655.
- Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W. M., III, Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**, 6209–6214.
- Evans, M., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–155.
- Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **24**, 1544–1551.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 7634–7638.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 8424–8428.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379–391.
- Papaiounou, V. E., and Rossant, J. (1984). Effects of the embryonic environment on proliferation and differentiation of embryonal carcinoma cells. *Cancer Surv.* **2**, 165–183.
- Rossant, J., and Nagy, A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat. Med.* **1**, 592–594.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and cultured human primordial germ cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 13726–13731.
- Tam, P. P., and Zhou, S. X. (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev. Biol.* **178**, 124–132.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147.

胚胎干细胞与成体干细胞：一些看似简单问题的探讨

正如本书的作者们所言，我们对干细胞的研究已经取得了巨大的进展。但是，有几个看似简单却极难作答的问题犹在眼前。

你如何定义干细胞？

教科书上的定义是：一个干细胞能够分裂产生一个子代干细胞，以及另一个能够产生分化后代的子代细胞。当我们回顾发育过程的时候，发现这个定义显然适用于受精后刚刚开始分裂的卵细胞。全能性的胚胎干（ES）细胞能够从胚胎的内细胞团或生殖嵴中获取，但获取的时间窗口很狭窄，仅为4~6天小鼠胚胎的内细胞团以及稍晚的生殖嵴。当这个时间段过去之后，那些永生化的干细胞后代细胞哪里去了呢？一个可能的答案是，我们被ES细胞能在适当培养条件下无限繁殖的现象误导了，而实际上它们在体内的寿命是有限的，会随着胚胎的发育逐渐消失；另一个可能的答案简单且诱人，即它们可能变成了造血系统中的干细胞，或者是变成了新近发现的存在于成体脊椎动物几乎所有非造血系统中的干细胞样细胞。

成体组织中的干细胞样细胞和ES细胞有区别吗？

一个区别是ES细胞可以分化成为所有的细胞类型，而大多数从骨髓基质、脂肪、肌肉和神经组织中分离得到的成体干细胞只具有有限的分化潜能。不仅如此，多数成体干细胞在体外培养中的存活时间要比ES细胞短暂。但是，要搞清二者所有的区别，只有在那些从事成体干细胞研究的科学家们设计完成了所有测试分化潜能和扩增潜能的实验之后才有可能。问题是，我们有那么聪明吗？把任意一个完全分化的细胞核转移到去核细胞中，分化细胞核即发生重编程，从而产生一个ES细胞的核移植实验说明了什么？尽管许多核移植实验都失败了，但那些成功者表明，只要我们聪明到能够将正确的信号从细胞质发送给细胞核，任何细胞都可以变成干细胞。因此，受精卵→ES细胞→成体干细胞→分化细胞的进程，可能是一个连续的统一体，其中几乎没有可逆的步骤。如果这个概念正确的话，ES细胞、成体干细胞和终末分化细胞之间的差异就可以归结为细胞逆转需要有多少个步骤，以及分化细胞逆转再生成全能性和永生化干细胞的难度有多大这样两个问题。

是ES细胞还是成体干细胞更适用于医学治疗或组织工程？

一些杰出的科学家已经给出了简单的答案，那就是：ES细胞适用于一些项目，成体干细胞适用于另一些项目。随着时间的推移，似乎需要我们做更多的研究来明确这个

问题。异体使用 ES 细胞，有致瘤和发生免疫反应的危險；成体干细胞没有显示明确的恶变倾向，有些种类的成体干细胞还可以获取足够的数量以应用于自体治疗。然而，没有一种干细胞可以非常理想地满足所有实际应用的需求。例如，通过采用巧妙地解决了伦理和技术难题的新方案，ES 细胞可能被证实是器官再生的理想选择；而对于修复由创伤、疾病和单纯老化造成的组织和器官损伤来说，成体干细胞可能更合适。最近的实验研究不断提供证据，支持成体干细胞是组织自发修复系统组成部分的观点。组织对损伤的最初反应可能就是干细胞样细胞的增殖并朝向该组织的分化；在这些细胞耗竭以后，来源于骨髓的非造血系统干细胞才会被募集到损伤部位。此外，实验结果还显示，归巢到损伤组织的成体干细胞通过二三种机制修复组织损伤：分化为适当的细胞表型，提供能够增强内源性细胞修复功能的细胞因子和其他因子，以及发生可能对于细胞提供一种快速分化机制的细胞融合。

结语

我们对 ES 细胞和成体干细胞的探索正处于一个不同寻常的阶段，接连不断的研究结果正在颠覆充斥于教科书中的生物学信条。在干细胞的潜能及其实际应用方面都存在着制约，但是我们还远未认识这些制约，特别是我们尚不能准确地定义它们的重要特征，并且仍然依赖复杂的生物学系统去检验它们。

Darwin J. Prockop, MD, PhD

“干性”的定义、规范和标准

导言

近来，干细胞在公众和专业人士中引起的兴趣超越了生物学中其他几乎所有的主题。干细胞引起轰动效应的原因之一，是人们认为了解它们的独特性质，不但能为细胞生物学提供更深入的视角，还能开通一条治疗多种退行性疾病的道路。尽管干细胞生物学领域的进展十分迅速，但就干细胞的本质来说，仍然存在很多混淆和争议。产生这种混淆的部分原因来自于用来描述干细胞的特殊术语和定义。尽管定义可能带有局限性，但对于相互沟通和实验的标准化还是必不可少的。鉴于这一点，我在此解释干细胞的定义、规范和标准，另外，强调干细胞生物学中的一个重要问题，即它们的起源；并进一步提出有关干细胞的鉴定、分离和特征描述的规范和标准；最后，对“干性”这个概念进行总结，并阐述它在理解干细胞和干细胞生物学中可能的应用。

什么是干细胞？

从功能上说，干细胞被定义为具有自我复制能力和产生分化细胞能力的细胞 (Weissman *et al.*, 2001; Smith, 2001)。更准确地说，干细胞既能产生和其亲代细胞相同的子代细胞（自我复制），又能产生分化潜能有限的子代细胞（分化细胞）。这个简单而又广义的定义仅适用于那些不伴随生物体终生的胚胎干细胞或胎儿干细胞，但不适用于区别那些自我复制能力下降、一过性的成体祖细胞和成体干细胞。因此，在描述成体干细胞时，应明确定义为“在动物一生中都能够自我复制的细胞” (van der Kooy and Weiss, 2000)。描述时需要考虑的另一个参数是分化潜能：干细胞能够产生多种类型的分化细胞（多潜能），还是只能产生一种类型的分化细胞（单潜能）？综合二者，我们就能从复制能力、克隆形成能力即潜能等方面对干细胞下一个较为完整的定义。本章将就这些概念相关的一些理论和应用方面的内容进行讨论。

自我复制

有关干细胞的文献中充斥着诸如“永生的”、“无限的”、“持续的”和“持续的增殖能力”等术语，都是用来描述细胞复制的能力。然而，当我们注意到为测试干细胞“永生性”而设计的实验需要作者和读者用多长的时间来完成的时候，这些相当极端和含糊的术语就没有用了。大多数体细胞培养物在出现复制停止或衰老之前只有有限的群体倍增能力（少于 80 代），与干细胞看起来无限的增殖能力不一样 (Houck *et al.*, 1971; Hayflick, 1973; Hayflick, 1974; Sherr and DePinho, 2000; Shay and Wright, 2000)，使我们有理由认为，当一个细胞的群体倍增数达上述 2 倍（160 代）且未发生癌变时，才可称之为“具有广泛的增殖能力”。有少数细胞符合这个标准，其中最著名

的是源自人或小鼠的胚胎干 (embryonic stem, ES) 细胞和成体的神经干细胞 (neural stem cell, NSC) (Smith, 2001; Morrison *et al.*, 1997)。由于不完全了解成体干细胞在体内维持自我复制所需要的因子, 阻碍了我们在体外建立相似的条件抑制细胞增殖。在某些情况下, 可以将单细胞植入或连续植入适当的宿主作为严格评价某一成体干细胞自我复制能力的方法, 造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 就是一个绝佳的例子 (Allsopp and Weissman, 2002; Iscove and Nawa, 1997)。由于成体干细胞的增殖能力仅限于动物生存期, 所以, 诸如“永生的”、“无限的”等术语, 最好少用甚至不用。

克隆形成能力

第二个参数, 也是最重要的一个, 是单个细胞能够产生更多的干细胞, 即干细胞的克隆形成能力。这一属性涉及干细胞的各个方面, 是其自我复制、分化潜能和谱系等所有特征的基础。后面有几章内容描述了干细胞谱系追踪的方法。尽管人们已经透彻地理解了克隆形成的“金标准”, 但实际应用中仍有一些容易混淆的问题, 例如, 对“一个细胞系是如何组成的”这一问题的理解。它的最低标准包括: 能够在体外培养物中生长、冻存、复苏以及传代的所有细胞群体; 而较高的标准则要求细胞来自一个克隆, 或是具备上述特征、明显同源的细胞群体。然而, 我们必须意识到, 从非单细胞源制备的细胞制品, 可能是干细胞和维持干细胞生长的“支持细胞”的混合细胞群, 因此, 所有涉及干细胞系的问题均应阐明其衍化过程。这方面的例子是, 当细胞制品中含有多个细胞群或混杂了来自其他组织的干细胞时, 如果不解释衍化过程, 会使人误解为是来自该组织的“干细胞”或“干细胞系”。

分化潜能

干细胞的分化潜能可能是干细胞被广为接受的定义中最具争议的部分。多潜能干细胞位于谱系级联的源头, 可以产生多种类型的分化细胞, 而各种细胞都具有独特的形态和基因表达图式。这时, 会产生关于“一个有自我复制能力, 但只能产生单一类型分化后代的细胞是不是干细胞”的争论 (Slack, 2000)。为了避免混淆, 最好将单潜能细胞称作祖细胞。祖细胞是典型的干细胞的后代, 只不过其分化潜能或自我复制能力或二者均更加受限而已。

定义

总之, 我们可以把干细胞定义为具有克隆形成能力、自我复制和多向分化潜能的, 能够产生多种分化细胞类型的细胞。当然, 这个定义可能不适用于所有情况, 但作为一种指南, 可以帮助描述细胞的特征。

干细胞源自何处

有关于干细胞的起源或者谱系问题, 对 ES 细胞研究得比较清楚, 而对成体干细胞则不那么清楚甚至颇有争议。从 ES 细胞的起源早于胚层定向这个有趣的可能性来推测,

也许这就是包括一些成体干细胞在内的多潜能干细胞的发育机制。由于成体干细胞发育起源的信息匮乏，使人们猜想它们也是在早期胚胎时期避开谱系限制定居于特定的小生境，而这个生境对于维持发育和限制谱系分化潜能都非常重要。另一种未经证实但被广为认可的起源模型认为，成体干细胞源自体细胞谱系特化之后，产生了多能干细胞-祖细胞并克隆了各自的小生境。在这部分，我将简要总结早期胚胎中的干细胞起源，解释已知的成体干细胞，特别是造血干细胞和神经干细胞的发生。

早期胚胎的干细胞

小鼠和人的 ES 细胞都是直接从植入前囊胚的内细胞团衍化而来 (Papaioannou, 2001)。内细胞团的细胞在正常情况下产生外胚层并最终形成所有的成体组织，这或许有助于解释 ES 细胞所表现的可塑性。由于 ES 细胞具有参与形成所有体细胞谱系的能力，在小鼠中还能形成种系嵌合体，因此，它们实际上等同于外胚层。

当受精卵发育到囊胚阶段时，部分细胞的发育潜能就已经受限了。胚胎的外层细胞分化形成滋养外胚层，从中可以衍化生成小鼠的胚胎滋养层干细胞 (Tanaka *et al.*, 1998)，它们能够生成滋养外胚层谱系中包括滋养层巨细胞在内的所有细胞类型。在胚胎发育的卵圆柱阶段 (6.5 天的小鼠胚胎)，外胚层附近的细胞团 (图 1) 被确认为是逃脱了体细胞特化和限制的原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) (Saitou *et al.*, 2002)，它们随后迁移到生殖嵴并在那里克隆，产生成熟的生殖细胞，最后形成有功能的成体配子。PGC 在到达生殖嵴之前、之后都可以分离出来，在体外添加适宜因子的培养条件下生成胚胎生殖 (embryonic germ, EG) 细胞 (Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992)。在分化潜能和参与形成嵌合鼠的种系方面，EG 细胞具备许多 ES 细胞的特征 (Labosky *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994)。它们与 ES 细胞最大的区别在于能够显示大量的特定基因印记 (取决于衍化时它们所处的发育阶段) (Surani, 1998; Surani, 2001; Howell *et al.*, 2001)。正因为如此，某些 EG 细胞系不能产生正常的嵌合鼠。

值得一提的是，人们并没有从早期胚胎中分离得到全能干细胞。ES 和 EG 细胞能够产生所有的体细胞谱系以及生殖细胞，但极少参与滋养外胚层、胚外内胚层或胚外中胚层的形成；分离的滋养外胚层干 (trophectoderm stem, TS) 细胞也只能产生滋养外胚层谱系的细胞。可见，能否从全能的胚胎阶段分离得到并且维持全能性细胞仍然是有待于解决的问题。尽管我们对于早期胚胎发育阶段的细胞命运尚未完全了解，但目前看来，在原肠胚阶段之后，PGC 是胚胎中仅有的亚全能干细胞 [可能的例外是多能成体祖细胞 (Jiang *et al.*, 2002) 和畸胎瘤]。原肠胚阶段的 PGC 可能借助于靠近外胚层而逃脱胚层定向的监视，并随后迁移到胚体内部的适当位置。这种发育策略可能不是 PGC 所特有的，其他的干细胞或许也有类似的发育起源。例如，成体干细胞可能起源于 PGC。在这里需要强调的是，尽管这个假设很吸引人，但尚未获得实验证据的支持。

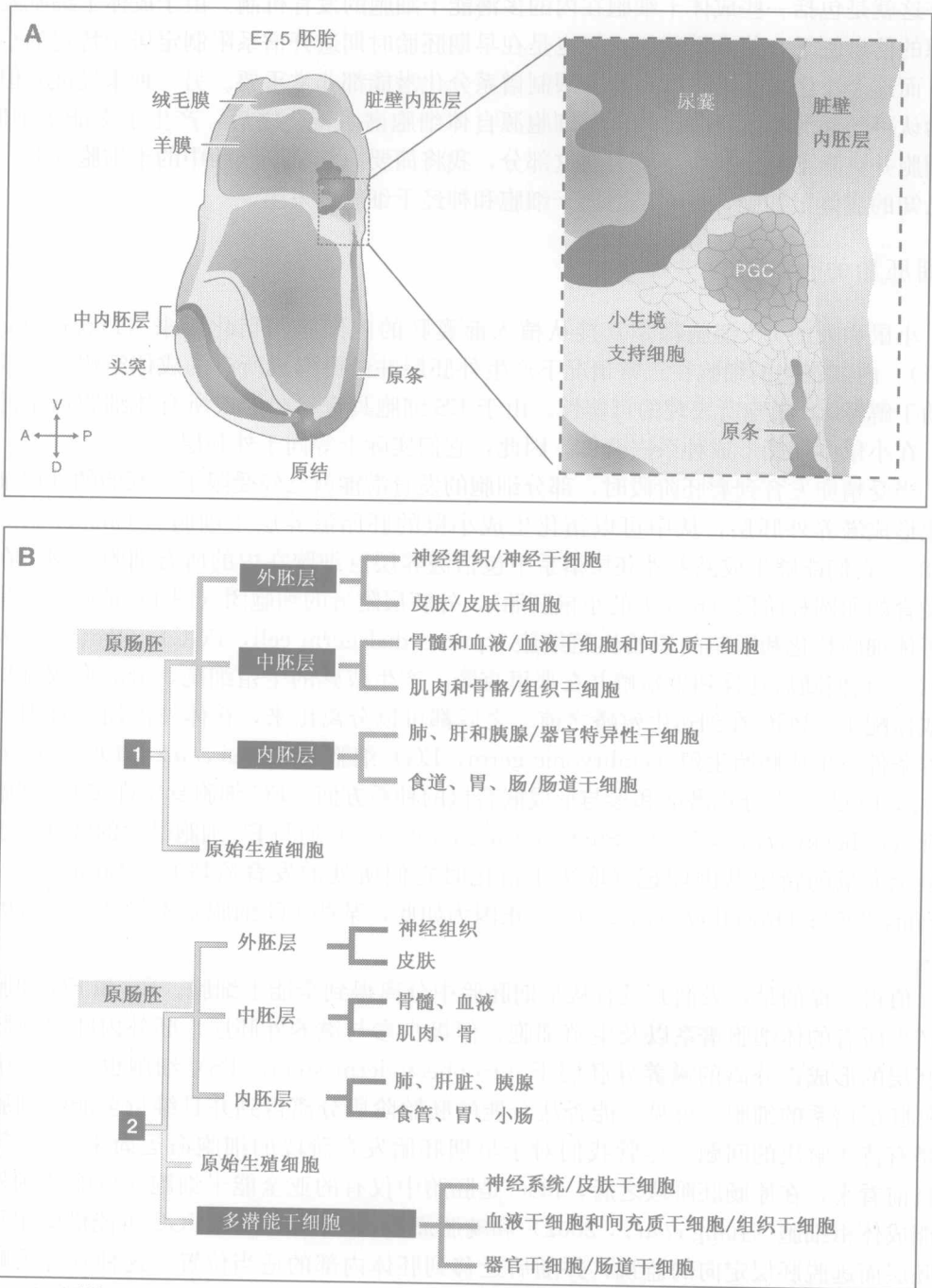


图1 A. 原始生殖细胞的发育: 7.5 天小鼠胚胎示意图, 提示区为外胚层近端正在发育的原始生殖细胞 (PGC); 右侧的扩展视野解释下列观点: 原肠胚形成期的 PGC 由于穿越原条的迁徙而未发生形态生成作用, 因此逃逸了谱系定向/限制; B. 干细胞发生发育假说, 在谱系树 1 中, 胚层形成之后生成干细胞, 因此, 胚层定向限制了干细胞所属的谱系 (例如, 中胚层形成后, 产生了能够变成造血干细胞的祖细胞); 谱系树 2 示意的观点是: 干细胞的发育过程类似于 PGC, 即它们在原肠胚形成期间未发生谱系定向, 并随后迁徙到特定组织和器官的小生境中。

成体干细胞的个体发生

人们对大多数成体干细胞的起源知之甚少。正如本部分所描述的，伴随着成体干细胞可塑性这一前沿课题，那些试图阐明成体干细胞个体发生的研究，有助于揭示其特异性的谱系关系以及明确它们的可塑性和分化潜能的内在机制。成体干细胞的起源信息还可以帮助确定决定谱系的分子程序，而这反过来又可以提供对干细胞分化进行人工操作的方法。最后，我将通过造血系统和神经系统之间的内在联系，总结目前已知的成体干细胞的发育情况。

小鼠造血细胞的发育开始于原肠胚形成之后不久（胚胎 7.5 天），但直到孕中期（胚胎 10.5 天）才能够找到和分离出与成体中活性相同的 HSC（Orkin, 1996; Dzierzak, 2002; Weissman, 2000）。这些发现提示，胚胎的造血系统有着独特的、不是由成体类型的 HSC 建立的谱系层次。因此，胚胎的造血发生似乎表现为多时间点的连续过程，HSC 预先可能并不存在，而是伴随着分化的造血细胞的出现而出现的。

小鼠最初的造血发生部位是胚胎外的卵黄囊，胚内的主动脉-性腺-中肾（aorta-gonad-mesonephros, AGM）区域紧随其后。我们仍不清楚其中哪一个部位产生了成体造血系统以及更重要的，何者产生了 HSC。来自非哺乳动物的胚胎移植实验以及很多在小鼠中的发现都提示，哺乳动物胚胎，特别是 AGM 产生了成体造血系统和 HSC（Kau and Turpen, 1983; Medvinsky *et al.*, 1993; Medvinsky and Dzierzak, 1996）。令人感兴趣的是，孕中期的 AGM 也是 PGC 迁移后的停泊部位，它还能产生间充质干细胞、血管祖细胞，以及成血管细胞群（Molyneaux *et al.*, 2001; Minasi *et al.*, 2002; Alessandri *et al.*, 2001; Hara *et al.*, 1999; Munoz-Chapuli *et al.*, 1999）。尽管还没有针对 AGM 细胞谱系分化潜能评价的研究，也缺乏这一区域精确的命运图，但仍有这样的可能性，即所有类型的成体干细胞起源于 AGM 内一个共同的没有特定限制的前体细胞。这个假设的前体细胞能够帮助解释那些建立在非细胞融合基础上的成体干细胞可塑性的研究结果。大多数成体干细胞的谱系特异性观察结果都认为，高度同质的谱系限制是由于细胞起源或克隆部位的小生境作用的结果。现有的实验证据尚不足以排除这个简单的推断，说明了深入研究成体干细胞发育起源的机会和必要性。

我们从造血系统发育中获得的一个重要知识是，分化细胞的出现并不能告诉我们相应的成体干细胞起源的位置和时间。具有检测成克隆能力的谱系追踪依然不失为一种鉴定干细胞起源的备选方法。这些研究还揭示了另一个潜在的问题，即由干细胞定义而导致的在起源鉴定方面的差异。

NSC 的发育开始于原肠胚形成后胚胎外胚层形成的神经组织，通常认为神经板诱导与 NSC 以及受限祖细胞类型的出现是同步发生的（Temple, 2001）。我们仍不清楚干细胞在发育神经上皮中的准确频率和位置，解决这个问题的关键是找到特异性的标志物。这个领域中逐渐形成的观点是，胚胎神经上皮产生了随后发育为室周星形胶质细胞的放射状胶质细胞，它们成为胚胎和成体中枢神经系统内的 NSC（Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Tramontin, 2003; Doetsch *et al.*, 1999; Gaiano and Fishell, 2002）。发育的和成体的 NSC 似乎同样需要获得位置与时间信息。例如，从不同神经区域分离得

到的干细胞能够产生适应于该区域的后代 (Kalyani *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1997)。一些研究提示, NSC 有时间信息编码, 表现为越早期的干细胞越频繁地产生神经元; 而越成熟的干细胞则倾向于分化为神经胶质 (Temple, 2001; Qian *et al.*, 2000; White *et al.*, 2001)。此外, 将较成熟的 NSC 移植到早期脑皮质中不能产生与年轻阶段相适应的细胞 (Desai and McConnell, 2000)。可见, 神经系统发育似乎遵循着典型的谱系层次, 由一个共有的祖细胞通过位置-空间特异性的方式产生大多数但不是全部的分化细胞类型。神经系统内也许存在极少数非神经起源的干细胞, 它们在产生体细胞类型方面有着更强的可塑性, 并且缺乏时空效应的限制 (Weissman, 2000; Temple, 2001)。在描述 NSC 的发育起源时, 尚有一些需要考虑的问题。首先, 在分散神经上皮以纯化 NSC 时, 可能导致它们所需要的空间图式失调; 第二, 培养在体外非生理条件下的纯化的 NSC 可能发生干细胞重编程。这些问题可以通过体内的谱系追踪或通过分离的 NSC 不经过干涉性培养直接移植到合适的受体动物来考察。精心设计的实验不仅能够回答干细胞生物学问题, 而且能够回答神经发生和发育问题: 比如哪些发育程序的特征对于个体细胞是至关重要的, 哪些分化和图式信号特异地决定细胞命运, 以及细胞内部发育程序的改变如何限制了祖细胞对细胞外部信号的反应等。

如何对干细胞进行鉴定、分离和特征分析

如何对干细胞进行鉴定、分离和特征分析是干细胞生物学的重要方法学问题, 它们的数量如此之多, 以至需要在后面的章节中详细地展开讨论。我在这里先简要地描述对干细胞鉴定、分离和特征分析时使用的标准和规范。

胚胎干细胞

ES 细胞的基本特征包括自我复制、体内外的多谱系分化、克隆形成能力、正常的染色体核型、在体外充分定义的培养条件下的广泛增殖以及冻存和复苏的能力。在动物实验中, 可以通过参与形成所有体细胞谱系和产生种系嵌合对 ES 细胞在体内的分化能力进行严格评价。但是, 这些标准不适用于人 ES 细胞, 它们的标准是能够产生拟胚体和包含所有三个胚层来源细胞的畸胎瘤。此外, 由于在体内不可能严格地评估亚全能性, 因此要求人 ES 细胞必须显示众所周知的亚全能细胞的表面标志, 不仅持续表达, 而且是高表达 (Brivanlou *et al.*, 2003)。如果将人 ES 细胞移植到非人类的成体或胚胎中的任意区域时, 能够在整体动物嵌合体中检测到它们参与特定组织形成的情况。一个互补分析应该包括将人 ES 细胞移植到非人类囊胚并评价它们参与形成不同器官和组织的情况, 但这类实验在某些地方已经引起了伦理学家的关注。最后, 一个有关实际操作的问题是 ES 细胞的传代次数。尽管 ES 细胞广泛的增殖能力很重要, 但同样重要的还有对较低代数的细胞进行实验性评估, 以防体外操作过程中可能发生的任何人工诱导。