

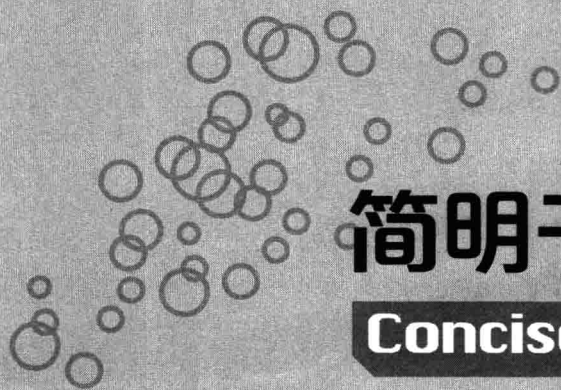
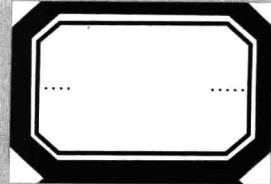
# 简明干细胞生物学

Concise Stem Cell Biology

章静波 刘星霞 编著  
赵春华 主审



化学工业出版社



# 简明干细胞生物学

Concise Stem Cell Biology

章静波 刘星霞 编著  
赵春华 主审



化学工业出版社

· 北京 ·

## 图书在版编目 (CIP) 数据

简明干细胞生物学/章静波, 刘星霞编著. —北京:  
化学工业出版社, 2014.9

ISBN 978-7-122-21470-6

I. ①简… II. ①章…②刘… III. ①干细胞-细胞  
生物学-研究生-教材 IV. ①Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 172039 号



---

责任编辑: 傅四周 孟 嘉  
责任校对: 吴 静

装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 装: 北京云浩印刷有限责任公司  
787mm×1092mm 1/16 印张 14 字数 345 千字 2014 年 11 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899  
网 址: <http://www.cip.com.cn>  
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 59.00 元

版权所有 违者必究



# 前言

## FOREWORD

北京协和医学院基础学院为研究生开设“干细胞”课程已历经数个年头了，我们积累了一定的教学与教材编写的经验。值此期间，我们翻译了数种国外有关的优秀专著，如美国冷泉港实验室出版社出版的、由著名干细胞生物学家 D. R. Marshak, R. L. Gardner 和 D. Gottlieb 主编的“Stem Cell Biology”以及由 Wiley 公司出版的、由著名细胞培养专家英国格拉斯哥大学资深研究员 R. I. Freshney 以及 G. N. Stacy 和 J. M. Auerbach 主编的“Culture of Human Stem Cell”。在此基础上，我们整理与编写了这本简明教材，并十分荣幸地交予化学工业出版社出版。

我们认定，学习《干细胞生物学》的莘莘学子已具备最基本的细胞生物学、生物化学和分子生物学以及解剖学、胚胎学和组织学等学科的知识，因此，本教材不再论述细胞生物学以及相关学科的基本概念及基础理论，而开宗明义，单刀直入，唯以干细胞为中心，介绍它们的生物学性质、操纵以及利用。因此，本书的对象是那些希望学习与掌握有关干细胞知识与技能的生物学与医学的硕士生、博士生、高年级大学生、生物医学工程人员和对实验室科学感兴趣、更想让干细胞转化为临床应用的医生们。为此，本教材具有以下几方面的特点：

① 知识的新颖性。干细胞生物学是当前生命科学中一支发展最为快速的学科。自 1998 年 Thomson 和 Gearhart 分别建立了 2 个人胚胎干细胞系始，至 2006 年 Yamanaka 等创建诱导多能干细胞 (iPS cell) 系，并于 2012 年获诺贝尔医学与生理学奖，人们对干细胞的研究如火如荼，至今方兴未艾。这种态势，在我们的这本教材中，得到一定程度的反映。

② 启发性。既然干细胞生物学是一门新兴学科，因此必然有不少难题未能解决，比如干细胞为什么可保持其不对称的分裂？微环境是怎样调控干细胞增殖与分化的？等等。为此，在我们的教材中不避讳并如实告知学生这些我们尚不全了解的内容。但我们或许会指出可能的研究方向与途径，我们这样做，旨在培养他们的独立思



考能力，鼓励他们在科学道路上“敢登攀”。

③ 实践性。研究生教育很重要的一个方面是培养他们的动手能力，因此，在我们的这本教材中，有几章节专门介绍干细胞培养的技术，如胚胎干细胞的培养、iPS 细胞的建系、干细胞的诱导分化实验，等等。我们认为，一个有作为的科研教学人才，必须手脑并用，缺一不可，缺一难有作为。

最后，我们在前面谈过，国外已有不少优秀专著，也有不少好教材，但国内似乎未见较为普遍适用于大多数院校的干细胞教材，“嚶其鸣矣，求其友声”，我们不揣浅陋，以此内容付梓，诚望得到试用者的评估与指正，旨在力求本教材能纠正错误，补充不足，以求日臻完美，为我国干细胞研究的发展尽绵薄之力。

章静波 刘星霞  
于北京协和医学院  
2014年9月

# 目录

# CONTENTS

## 第一章 绪论 / 1

- 第一节 干细胞的研究历史 ..... 2
- 第二节 干细胞的概念及分类 ..... 4
- 第三节 干细胞生物学的研究内容 ..... 7
- 第四节 干细胞研究的意义 ..... 14

## 第二章 胚胎干细胞 / 19

- 第一节 胚胎干细胞的概念及分离建系 ..... 19
- 第二节 胚胎干细胞的生物学特性 ..... 21
- 第三节 胚胎干细胞的自我更新 ..... 25
- 第四节 胚胎干细胞的定向分化 ..... 28
- 第五节 胚胎干细胞的应用前景 ..... 31
- 第六节 胚胎干细胞引起的伦理学的争议 ..... 33

## 第三章 诱导多能干细胞 / 37

- 第一节 诱导多能干干细胞的概念及研究过程 ..... 37
- 第二节 诱导多能干干细胞的制备 ..... 40
- 第三节 诱导多能干干细胞的生物学特征 ..... 45
- 第四节 诱导多能干干细胞的应用前景及展望 ..... 46

## 第四章 成体干细胞 / 50

- 第一节 成体干细胞的概念及研究历史 ..... 50
- 第二节 成体干细胞与胚胎干细胞的比较 ..... 51
- 第三节 成体干细胞的可塑性及机制 ..... 53
- 第四节 成体干细胞的应用 ..... 57

## 第五章 间充质干细胞 / 61

第一节	不同组织来源的间充质干细胞	61
第二节	间充质干细胞的分离及表面标志	63
第三节	间充质干细胞的生物学特性	65
第四节	间充质干细胞的免疫学特性	66
第五节	间充质干细胞的应用	69

## 第六章 造血干细胞 / 75

第一节	造血干细胞的概念与造血发生	75
第二节	造血干细胞的生物学特性	77
第三节	造血干细胞的调控	83
第四节	造血干细胞的归巢和动员	87
第五节	造血干细胞的可塑性	89
第六节	造血干细胞的研究技术	90
第七节	造血干细胞的临床应用	96

## 第七章 神经干细胞 / 101

第一节	神经干细胞的概念及来源	102
第二节	神经干细胞的分离与鉴定	104
第三节	神经干细胞的分化	106
第四节	神经干细胞的研究现状与临床应用	107

## 第八章 表皮干细胞 / 112

第一节	表皮干细胞的特征	113
第二节	表皮干细胞的蛋白质表达	115
第三节	表皮干细胞的分离与鉴定	116
第四节	表皮干细胞的分化调控	118
第五节	表皮干细胞的应用前景	119

## 第九章 肌肉干细胞 / 121

第一节	三类肌肉细胞概述	121
第二节	肌肉干细胞的生物学特性	123
第三节	肌肉干细胞的增殖与分化调控	124
第四节	体外培养的不同类型肌肉细胞的鉴定	125

## 第十章 脂肪干细胞 / 129

- 第一节 脂肪干细胞的生物学特性和多系分化能力 ..... 130
- 第二节 脂肪干细胞的分离、培养与鉴定 ..... 132
- 第三节 脂肪干细胞的应用前景 ..... 134

## 第十一章 肝脏干细胞和胰腺干细胞 / 137

- 第一节 肝脏干细胞 ..... 137
- 第二节 胰腺干细胞 ..... 141

## 第十二章 肠黏膜干细胞 / 150

- 第一节 肠黏膜干细胞的概念 ..... 150
- 第二节 小肠黏膜干细胞的分离与鉴定 ..... 152
- 第三节 小肠黏膜干细胞的分化 ..... 153
- 第四节 肠黏膜干细胞的研究及其应用 ..... 154

## 第十三章 干细胞因子 / 157

- 第一节 干细胞因子的基因、结构及其性质 ..... 157
- 第二节 干细胞因子及其受体介导的细胞内信号转导 ..... 159
- 第三节 干细胞因子的临床应用 ..... 162

## 第十四章 肿瘤干细胞 / 165

- 第一节 肿瘤干细胞的特征 ..... 166
- 第二节 肿瘤干细胞与肿瘤的发生 ..... 168
- 第三节 肿瘤干细胞的信号通路 ..... 170
- 第四节 肿瘤干细胞与肿瘤耐药 ..... 170
- 第五节 肿瘤干细胞的分离培养与鉴定 ..... 171
- 第六节 干细胞与肿瘤干细胞的关系 ..... 174
- 第七节 肿瘤干细胞研究的意义与展望 ..... 176

## 第十五章 干细胞与再生医学 / 179

- 第一节 再生医学的概念与研究概况 ..... 180
- 第二节 干细胞与再生医学的发展动向 ..... 181



## 第十六章 干细胞研究的相关实验技术 / 188

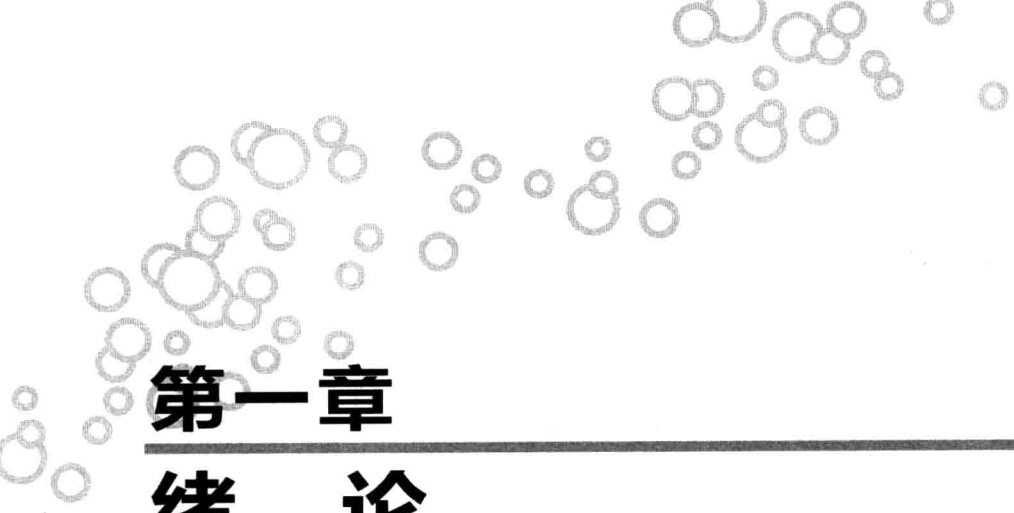
- 第一节 干细胞培养的基本技术与方法 ..... 188
- 第二节 各类干细胞的分离、培养与鉴定 ..... 189

## 第十七章 干细胞研究的前景及面临的问题 / 195

- 第一节 干细胞研究的现状 ..... 195
- 第二节 干细胞研究的前景 ..... 202
- 第三节 干细胞研究面临的问题 ..... 205

## 附录 / 208

- 一、常用培养基及基本特性 ..... 208
- 二、常用网站一览 ..... 209
- 三、中英文专业名词对译表 ..... 210



# 第一章

---

# 绪论

干细胞 (stem cell, SC) 的“干”, 译自英文 “stem: the central part of a plant above the ground, from which the leaves grow, or the smaller part which supports leaves or flowers.”, 意思为“树”、“干”和“起源”。类似于一棵树的树干, 可以长出许多树枝、树叶, 可以开花和结果。与此类似, 干细胞是机体内具有自我更新能力 (self-renewal) 的一类多潜能细胞。在一定条件下, 干细胞可以自发或被诱导分化成机体的多种功能细胞, 所以, 它们具有再生机体各种细胞、组织或器官的潜在功能, 是机体各种细胞、组织和器官的起源细胞。在形态学上, 各类干细胞一般具有以下共性: 它们通常呈圆形或椭圆形, 细胞质体积较小, 核相对较大, 具有较高的端粒酶活性。根据所处发育阶段的不同, 干细胞可以分为胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 和成体干细胞 (somatic stem cell or adult stem cell) 两大类。胚胎干细胞和成体干细胞除了来源不同, 它们最大的区别在于各自的增殖能力和分化潜能不同: 胚胎干细胞分化潜力较高, 是全能干细胞 (totipotent stem cell), 理论上讲可以分化成机体各种类型的细胞; 而成体干细胞分化潜力较低, 是多能干细胞或单能干细胞, 理论上讲, 只能分化成机体特定的若干种, 甚至只能是一种特定的细胞。

在胚胎发生和发育过程中, 单细胞的受精卵可以分裂并发育成为多细胞的组织或器官。在成年机体, 正常生理代谢或病理损伤过程也可以引起组织或器官的修复和再生。胚胎的演化和成体组织的再生都是由于干细胞进一步分化的结果。过去, 人们一般认为, 胚胎干细胞属于全能干细胞, 具有分化为几乎全部组织和器官的能力, 而存在于成体组织或器官内的成体干细胞, 一般认为它们具有组织特异性, 只能分化成特定的细胞或组织。然而, 最新的研究表明, 具有组织特异性的成体干细胞, 同样具有分化成其他类型细胞或组织的潜能。成体干细胞所具有的能够分化成为其他类型细胞或组织潜能的特性称为成体干细胞的可塑性。这样的研究成果, 为干细胞的应用前景开创了更广阔的空间, 所以, 成体干细胞的可塑性研究很快成为全世界干细胞研究领域非常重要的研究热点。有关干细胞的各种研究也在短短几年内取得了突飞猛进的进展。

## 第一节

# 干细胞的研究历史

早在 19 世纪, E. B. Wilson 在他的经典著作 “The Cell in Development and Inheritance” 中就已经提出干细胞的概念, 但关于干细胞的实验研究最早始于 20 世纪 60 年代前后。当时, 关于干细胞的实验研究主要集中于两个方面, 其中之一是关于胚胎干细胞的研究, 另一方面就是关于造血干细胞的研究。1959 年, 美籍华裔科学家张明觉首次建立了体外受精技术, 为全世界的干细胞研究提供了有力的技术支持。后来, Pierce 和 Stevens 等通过对几个近亲种系的小鼠睾丸畸胎瘤的研究, 发现其来源于胚胎生殖细胞 (embryonic germ cell, EG 细胞), 该工作确认了胚胎来源的癌细胞是一种干细胞, 它们可分化为多种类型的细胞; 1975 年, Brinster 将胚胎癌细胞注入小鼠囊胚中, 成功地形成了嵌合体小鼠, 并且发现该胚胎癌细胞几乎可以参与宿主胚胎所有组织的形成, 从而证明了胚胎癌细胞确实是一种干细胞, 于是, 胚胎癌细胞就成为公认的研究小鼠胚胎发育的良好模型。此后, 关于干细胞以及胚胎发育的各方面的研究也越来越多, 领域也越来越广, 各种成果也层出不穷, 例如, 1978 年, 世界上第一个试管婴儿 Louise Brown 成功地在英国诞生; 1981 年, Evan, Kaufman 和 Martin 从小鼠囊胚内细胞团成功地分离出小鼠胚胎干细胞, 同时, 他们也确立了经典的小鼠胚胎干细胞体外培养条件。1984—1988 年, Anderson 等从人睾丸畸胎瘤细胞系 Tera-2 中培育出多能的、克隆化的细胞, 称之为胚胎癌细胞 (embryonic carcinoma cell, EC 细胞), 他们发现, 克隆出的人胚胎癌细胞在视黄酸 (retinoic acid, RA, 又叫维甲酸) 的作用下, 能够分化形成神经元样细胞和其他类型的细胞。1989 年, Pera 等也成功地分离了另一个人胚胎癌细胞细胞系, 发现该细胞系能被诱导生成三个胚层的组织, 但这些胚胎癌细胞中的染色体不是整倍体, 有的细胞中染色体数目多于正常细胞, 有的细胞中染色体数目少于正常细胞, 所以, 它们在体外的分化潜能有限。

1998 年, 美国有两个科研小组几乎同时分别培养出了人胚胎干细胞: Wisconsin 大学的 James A. Thomson 小组成功地从人胚胎组织中培育出了干细胞系。他们将人卵细胞经体外受精后, 把受精卵培育到囊胚阶段, 提取内细胞团 (inner cell mass, ICM), 建立细胞系。通过检测该细胞系的特异性细胞表面标记物 (简称表面标记) 和酶活性, 证实它们就是全能干细胞。采用这种方法, 每个胚胎中可以取得 15~20 个干细胞用于建立细胞系。与此同时, Johns Hopkins 大学的 John D. Gearhart 小组也成功地从受精后 5~9 周人工流产的胚胎中提取原始生殖嵴细胞 (primordial germ cell) 并建立了干细胞系。2000 年, 由 M. F. Pera、A. Trounson 和 A. Bongso 领导的新加坡和澳大利亚科学家也从治疗不育症的夫妇捐赠的囊胚内细胞团中分离得到人胚胎干细胞。上述这些胚胎干细胞体外增殖时, 能保持正常的核型, 并且能自发分化形成来源于三个胚层的体细胞系。如果将这些胚胎干细胞注入免疫缺陷小鼠体内, 则可以产生畸胎瘤。2011 年, Wojakowski 报道, 克隆的小鼠干细胞可以通过形成细小血管和心肌细胞, 促进心衰小鼠的心肌损伤修复。这种克隆的小鼠干细胞与来源于骨髓的成体干细胞比较, 其修复作用更快、更有效, 可以取代 40% 的瘢痕组织并恢复心肌功能。这是国际上克隆干细胞在活体动物体内成功修复受损组织的首次报道。迄今为止, 人们已能够成功地将小鼠胚胎干细胞诱导定向分化为神经细胞、各种

血细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、横纹肌细胞、骨细胞、软骨细胞、肥大细胞、脂肪细胞、甚至胰岛细胞等。

尽管如此，由于胚胎干细胞多取自胚胎或流产胎儿，很多国家迫于伦理及宗教压力，禁止开展这一类研究。相比之下，成体干细胞的研究就没有伦理及宗教上的问题，所以这方面的研究就更容易被重视和接纳。事实上，人类关于干细胞的研究最早就是从成体干细胞研究开始的。早在1961年，Till和McCulloch就开始了造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的研究。他们发现，在脾脏中存在造血干细胞，并能产生多种血细胞。造血干细胞是目前研究得最为清楚、应用最为成熟的成体干细胞，它在移植治疗血液系统及其他系统恶性肿瘤、自身免疫病和遗传性疾病等诸多领域均取得了令人瞩目的进展，极大地促进了这些疾病的治疗，同时也为其他类型成体干细胞的研究和应用奠定了坚实的基础。目前，人们已经发现，很多成体组织，如骨髓、外周血、脊髓、血管、骨骼肌、肝、胰、角膜、视网膜、牙髓、皮肤和胃肠道的上皮及脂肪组织等，都存在成体干细胞。由于成体干细胞具有取材容易，可避免移植后免疫排斥反应，而且不会引起伦理和宗教上的争议等诸多优势，因此，成体干细胞的应用研究已成为再生医学的一个重要组成部分，是很多临床疾病可供选择的治疗手段。同时，该领域又是一个多学科交叉的领域，需要分子和细胞生物学家、胚胎学家、病理学家、临床医生、生物工程师和伦理学家等的共同参与。随着对成体干细胞可塑性研究的不断深入和临床应用研究的不断扩展，成体干细胞最终走向临床应用的希望正在变得越来越大。

与胚胎干细胞相比，成体干细胞除了具有不会引起伦理、法律和宗教上的争议，取材容易，可以从患者自身获得，不存在组织相容性抗原不吻合及移植后免疫排斥反应，可以避免长期应用免疫抑制剂对患者的伤害等诸多优势外，成体干细胞还没有致癌性。即便如此，成体干细胞也有其自身的局限性。虽然成体干细胞也具有向多系分化的能力，但这种分化的“效率”尚不理想。虽然通过体外扩增培养能提高分化效率，但是体外的分化是否会成体干细胞遗传特性发生变化还有待证实，而且这种体外的分化是否是成体干细胞多系分化的结果尚无法肯定。所以，成体干细胞虽然具有广阔的应用前景，但是，由于其自身的局限性，它们要真正充分应用于临床还有很长的路要走。

令人振奋的是，近来出现的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC, iPS细胞)几乎是集胚胎干细胞和成体干细胞的优势于一身，同时又几乎避开了胚胎干细胞和成体干细胞的全部的局限性。这项发现，一方面解决了利用胚胎进行干细胞研究的伦理和宗教争议，另一方面，也使得干细胞研究的细胞来源更不受限。由于iPS细胞能培养出机体各种类型的细胞，因此iPS细胞的发明为再生医学开辟了一条崭新的道路。所以，iPS细胞一出现，立即在干细胞研究领域、表观遗传学研究领域以及生物医学研究领域都引起了强烈的反响，此后，全世界关于iPS细胞的各种研究一直如火如荼，至今方兴未艾。

诱导多能干细胞最初是日本京都大学的Shinya Yamanaka于2006年发现。他们利用病毒载体将四个转录因子基因(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*和*c-Myc*)的组合转入分化的体细胞——小鼠成纤维细胞中使其重新编程，发现最终可诱导成纤维细胞发生转化，转化产生的细胞在细胞形态、生长特性、干细胞标志表达、基因表达谱、表观遗传修饰状态(如DNA甲基化方式)、染色质状态、细胞倍增能力、嵌合体动物形成、拟胚体形成和畸胎瘤形成能力、分化能力等各方面都与胚胎干细胞非常相似，所以称之为诱导多能干细胞。iPS细胞具有和ES细胞几乎完全相同的功能，和ES细胞相比，iPS细胞除了不能生成胚



胎以外,几乎可以产生机体所有类型的细胞。这样,人们不需要制造胚胎,就可以从任何组织的细胞,甚至皮肤组织的细胞,制造出具有ES细胞功能的干细胞。2007年11月,Yamanaka实验室和Thompson实验室又几乎同时报道,利用iPS细胞技术同样可以诱导人皮肤成纤维细胞成为几乎与胚胎干细胞完全一样的多能干细胞。所不同的是日本实验室依然采用逆转录病毒引入*Oct-4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*等四种转录因子组合,而Thompson实验室则采用了以慢病毒载体引入*Oct-4*、*Sox2*、*Nanog*和*LIN28*这四种因子组合。这些研究成果被美国“Science”杂志列为2007年十大科技突破中的第二位。到2009年3月,iPS细胞研究又相继迎来了两项重大突破。一是发现了不用借助病毒就可以将普通皮肤细胞转化为iPS细胞的方法;二是可以选择性地将iPS细胞中因转化需要而植入的有害基因移除,并且能够保证由此获得的神经元细胞的基本功能不受影响。这两项成果为iPS细胞应用于临床迈出了重要的一步。

2012年10月8日,瑞典卡罗琳斯卡医学院宣布,将2012年的诺贝尔医学与生理学奖授予培育出了iPS细胞的Shinya Yamanaka和英国发育生物学家、剑桥大学的John Gordon博士,以表彰他们在iPS细胞领域作出的巨大贡献。

当然,iPS细胞要真正应用于临床,仍有很多棘手的困难需要解决。但无论如何,我们仍然可以坚信,随着人们对于iPS细胞各方面研究的不断深入,随着所面临的各种困难的被逐个解决,iPS细胞必将在未来临床移植治疗各种疾病中发挥无与伦比的重要作用。

目前,干细胞和再生医学的研究已成为自然科学研究中最为引人注目的领域。我国在干细胞低温及超低温气相/液相保存技术、定向温度保存技术及超低温干细胞保存抗损伤技术等方面已经处于世界领先水平。我们相信,随着理论研究的日臻完善和实验技术的迅猛发展,干细胞技术必将在临床治疗和生物医药等领域产生划时代的成果,必将导致传统医疗手段和医疗观念的一场重大革命。现有资料表明,采用干细胞进行临床治疗具有很多优势,例如:低毒性或无毒性;即使不完全了解某种疾病发病的确切机理,采用干细胞移植治疗也可达到较好的疗效;利用自身的干细胞进行移植可以有效避免其他细胞移植治疗方法中无法避免且令人棘手的免疫排斥反应;对传统治疗方法疗效较差的疾病如白血病,采用干细胞移植治疗,多有惊人的效果。

## 第二节

# 干细胞的概念及分类

### 一、干细胞的概念

干细胞是指机体内一类具有自我更新和分化潜能的细胞。在胚胎发育的不同阶段以及成体的不同组织中均有干细胞存在,只是随着年龄的增长,各组织中干细胞的数量逐渐减少,分化潜能也逐渐变小。在干细胞的发育过程中,还有一类处于中间状态的细胞,称为祖细胞(progenitor cell),祖细胞具有有限的增殖和分化能力,但与干细胞不同的是,祖细胞没有自我更新能力,在经过几个细胞分裂周期后产生的两个子代细胞均为终末分化细胞,它们之间的关系是:干细胞是祖细胞的来源,祖细胞又是各种下游细胞的来源(图1-1)。例如,造血干细胞是造血祖细胞的来源,造血祖细胞又是各种成熟血细胞如红细胞、淋巴细胞等的来源。造血干细胞在分裂过程中生成一系列祖细胞,如普通淋巴祖细

胞、普通髓系祖细胞等，其下游为成熟度更高的祖细胞，它们所能生成的细胞类型和数量更为局限，并最终生成淋巴细胞、红细胞、血小板、粒细胞和单核细胞等终末分化的各种血细胞，最终完成造血过程。对于干细胞和已分化细胞的区别和鉴定，通常采用检测各种特异性细胞表面标志的方法来实现。

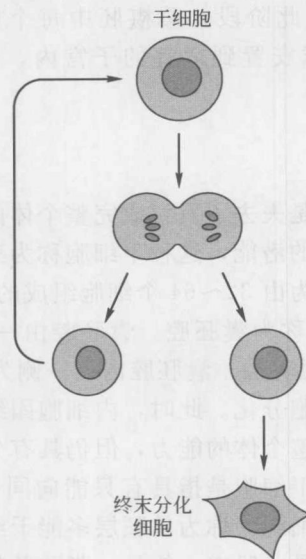


图 1-1 干细胞的自我更新和分化 (Alberts et al, 1994, 略改)

## 二、干细胞的分类

目前常用的干细胞分类方法有两种：一种分类法是根据干细胞分化潜能的宽窄将干细胞分为全能干细胞、多能干细胞 (multipotent stem cell) 和单能干细胞 (monopotent stem cell)；另一种分类法是按所处发育阶段的不同将干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞，胚胎干细胞包括内细胞团来源的 ES 细胞和原始生殖嵴细胞来源的胚胎生殖细胞；成体干细胞包括神经干细胞 (neural stem cell, NSC)、造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC)、骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC)、表皮干细胞 (epidermal stem cell) 等。此外，还可以根据来源不同对干细胞进行分类 (表 1-1)。

表 1-1 干细胞的分类 (赵春华, 2006)

来源	描述	示例
成体器官	器官组织中分化命运部分确定的细胞集合	肝脏、骨、骨髓、肠上皮和精子等的干细胞
胎儿组织	富集于快速生长的器官中的前体细胞；一些分化命运尚未确定的细胞	心肌细胞、脑细胞和用于产生精子和卵的生殖细胞前体
胚泡(囊胚)	通过化学/电刺激未受精的卵产生的孤雌生殖体或用精子和卵子经人工受精产生的胚泡内细胞团细胞	来自孤雌生殖体的干细胞(正在研究)；胚胎干细胞具有形成所有类型细胞的潜能
核移植胚泡	由完全更换了遗传信息的卵细胞经刺激分裂产生的细胞	目前正在研究；与动物克隆相关的过程

### 1. 全能干细胞

这类干细胞具有形成完整个体的分化潜能，最具代表性的是胚胎干细胞 (ES 细

胞)。众所周知，哺乳动物的生命始于受精卵，受精卵具有分化成体内 200 多种不同类型细胞的潜能，并能最终发育成为一个完整个体，胚胎干细胞的这种潜能称为全能性 (totipotency)，相应地，具有这种潜能的干细胞则称为全能干细胞。此外，受精卵在从输卵管向子宫移行过程中不断地进行卵裂，当分裂到 8~16 个细胞时表现为一实心球体，称为桑葚胚 (mornula)，在此阶段，桑葚胚中每个卵裂球都仍然保持着这种全能性，如果将其中任意一个卵裂球安置到适宜的子宫内，都可以最终发育成为一个完整个体。

## 2. 多能干细胞

多能干细胞分为两类，一类是失去了发育成完整个体的能力，但仍具有向成体内任何一种细胞 (包括生殖细胞) 分化的潜能，这种干细胞称为三胚层多能干细胞。例如，桑葚胚进入子宫着床后不久，分裂成为由 32~64 个细胞组成的早期囊胚 (blastula) 或称胚泡 (blastocyst)，并开始出现腔隙，称为囊胚腔。囊胚腔由一层细胞围成，该层细胞称为滋养外胚 (trophectoderm)，又叫滋养层。囊胚腔内的一侧为内细胞团 (图 1-2)，这是在整个胚胎发育过程中最早发生的细胞分化。此时，内细胞团细胞就属于典型的三胚层多能干细胞，它们虽然失去了发育成完整个体的能力，但仍具有分化成个体中包括生殖细胞在内的各种细胞的潜能。另一类多能干细胞是指具有只能向同一胚层细胞类型分化的干细胞，它们只能分化成几种特定类型的细胞，称为单胚层多能干细胞。例如一般意义上的间充质干细胞，它们通常只能分化形成骨、肌肉、软骨、脂肪及其他结缔组织，却不能分化为其他类型的组织。

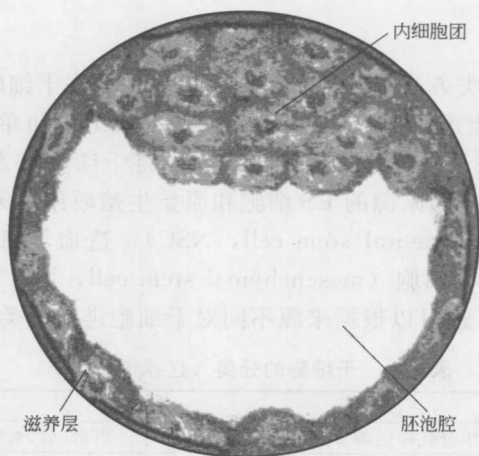


图 1-2 囊胚腔内的内细胞团 (赵春华, 2006)

## 3. 单能干细胞

单能干细胞是指只能向一种或两种密切相关的细胞类型分化的干细胞，如上皮组织基底的干细胞，肌肉中的成肌细胞等。

## 4. 胚胎干细胞

胚胎干细胞是一种高度未分化细胞，它们具有发育的全能性，因此，研究和利用胚胎

干细胞是当前生物工程领域的核心问题之一。相信在未来几年,胚胎干细胞移植技术和其他先进生物技术的联合应用很可能会在移植医学领域引发革命性进步。

## 5. 成体干细胞

在胎儿、婴幼儿、儿童和成人各种组织中存在的多能干细胞统称“成体干细胞”,成体干细胞属于组织或器官特异性干细胞,它们在一生中始终保持分裂的能力,并可分化产生特定类型的细胞,主要用于维持细胞功能的稳态。众所周知,成年个体的许多组织和器官,例如表皮和造血系统,都具有自我修复和再生的能力。事实上,成体干细胞在这些组织的修复和再生过程中,都发挥了关键的作用。在特定条件下,成体干细胞或者产生新的下游干细胞,或者按一定的程序分化,形成新的功能细胞,从而使组织和器官保持生长和衰退的动态平衡。随着研究的逐步深入,有关成体干细胞的报道越来越多,发现的存在成体干细胞的组织类型也越来越广泛,这些组织包括:骨髓、外周血、脑、脊髓、血管、骨骼肌、肝、胰、角膜、视网膜、牙髓、皮肤和胃肠道的上皮及脂肪,等等。成体干细胞的确切来源尚未有定论。目前有两种说法比较流行,一种说法是:成体干细胞是在个体发育过程中残留下来的胚胎干细胞,另一种说法认为成体干细胞是成体细胞在某些情况下(如外伤等)经过重新编程(reprogramming)后形成,甚至可能是细胞间自发融合所形成。此外,令人振奋的是,近几年研究表明,成体干细胞的分化能力远远超过传统观点的认识,例如,人们发现,骨髓成体干细胞在合适的体内外环境中不但可以长期生长,也可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞及多种血管内皮细胞,甚至还可分化成一种肝脏前体细胞(肝卵圆细胞)、神经胶质细胞和心肌细胞;高度纯化的造血干细胞也可分化形成肝细胞、内皮细胞和心肌细胞;骨骼肌干细胞也能分化出造血细胞;中枢神经系统干细胞还可形成血液细胞、肌肉和许多其他类型体细胞。

## 第三节

### 干细胞生物学的研究内容

目前,干细胞生物学的研究内容,大多集中在以下几方面。

#### 一、干细胞的分离与鉴定

胚胎干细胞的来源主要是囊胚内细胞团或生殖嵴中的原始生殖细胞,从这些部位分离得到的细胞基本上都具有多能性,也比较容易进行分离。目前,胚胎干细胞的分离方法主要有以下四种。①免疫学方法:胚胎干细胞表面都有许多特殊的标记物,称为表面标记或表面标志,利用这些表面标志,可以利用荧光细胞分离器从单细胞悬液中将胚胎干细胞分离纯化。②免疫外科学方法:该方法基本原理是:利用囊胚腔对抗体的不透性,通过抗体、补体结合对细胞的毒性杀伤作用,选择性地去除滋养层细胞,同时保留内细胞团进行培养。③组织培养:将怀孕4~6天的胚胎取出并进行培养,滋养层细胞在培养皿底部平铺生长,而内细胞团则在滋养层细胞上生长并形成卵圆柱状结构,利用显微操作技术挑出这种卵圆柱状结构并消化传代。④显微外科学方法:利用显微镜直接将内细胞团从囊胚中吸出并进行培养。对于胚胎干细胞的鉴定,一般多从细胞形态、细胞表面标志、分化潜能



等诸多方面进行鉴定。目前, 胚胎干细胞的鉴定方法主要有以下几个方面。①形态学检测: 胚胎干细胞体积小、核大、核质比高, 有一个或多个突起的核仁, 常染色质较分散, 胞质少、结构简单。②体外培养: 胚胎干细胞排列紧密, 呈集落状生长, 经碱性磷酸酶染色后, 胚胎干细胞呈棕红色, 而周围的成纤维细胞呈现淡黄色, 胚胎干细胞克隆与周围的成纤维细胞界限明显, 克隆间界限则不清且形态多样, 多数呈岛状或巢状。③碱性磷酸酶活性的检测: 经碱性磷酸酶染色后, 胚胎干细胞呈深蓝紫色。④体内分化实验: 将胚胎干细胞移植到 NOD/SCID 小鼠皮下, 可生长并形成畸胎瘤; 若将胚胎干细胞转移到假孕母鼠子宫内, 会进一步生长发育成嵌合体动物等。⑤体外分化实验: 形成类胚体, 常见多种类型细胞混杂在一起。⑥核型分析法: 胚胎干细胞表现为二倍体正常核型。⑦OCT 活性检测多能性基因标志。通过 OCT 抗血清和间接免疫荧光法检测 OCT 基因表达产物。

与胚胎干细胞相比, 成体干细胞的分离、纯化更为困难, 主要有以下两方面的原因: 第一, 成体干细胞在组织中的分布非常分散。例如, 在神经系统中, 迄今为止, 人们在脑室区、脑室下区、海马回等处都发现了神经干细胞, 但是, 神经干细胞的数量极为稀少, 大约每 10 万个细胞中才有 1 个神经干细胞。第二, 除了造血干细胞等少数几种成体干细胞外, 大多数成体干细胞尚缺乏特异性的表面标志分子, 因此, 对于它们的分离、纯化较为困难。今后, 人们尚需寻找分离、纯化各种成体干细胞的适宜方法, 以期能得到较纯的成体干细胞。

## 二、干细胞的自我更新及机制研究

干细胞的自我更新 (self-renewal, 又称干性维持或自我维持 self-maintenance), 是指干细胞通过增殖, 使自己的数量维持相对的稳定, 同时不会分化成其他类型的细胞。所以, 干细胞的自我更新其实就是非分化性增殖。关于干细胞自我更新的机制, 目前尚未彻底阐明。Kiger 和 Tulina 等人的报道揭示: 果蝇睾丸中的某些细胞能作为微环境作用, 激活 JAK-STAT 途径, 从而抑制成精干细胞的分化及成熟。在雄性果蝇体内, 成精干细胞位于睾丸的顶部, 被一簇细胞包围, 称为一个微中心 (hub)。当成精干细胞分裂时, 与 hub 接触的子代细胞继续维持成精干细胞的本质, 而释放出来的不再与 hub 接触的成精干细胞则会最终发育成精子。是什么机制主导每个成精干细胞的命运? 目前仍不清楚。Kiger 和 Tulina 等认为, hub 内可能存在某些信号决定着成精干细胞的命运。他们两个研究小组都集中在果蝇和哺乳类动物都具有的一条信号途径 JAK-STAT 上。他们首先在干细胞内将 JAK-STAT 途径阻断, 发现凡是 JAK-STAT 途径被阻断的成精干细胞都不能再进行自我更新, 而会进行分化。相反, 异位表达 JAK-STAT 途径活性蛋白, 将能增多成精干细胞数目。但是, JAK-STAT 途径是怎样被激活的呢? 两个研究小组都发现并认为, hub 能作为一个微环境, 表达一种极具活性的名为 unpaired (Upd) 的局部信号分子, 进而通过该信号分子激活相邻细胞的 JAK-STAT 途径。由此看来, 是 hub 营造了一个干细胞维持更新的微环境, 保持着成精干细胞不断更新, 但不会分化。在果蝇的睾丸组织中, 随着果蝇年龄的增长, Upd 的表达量会逐步减少, Upd 的减少导致成精干细胞自我更新能力下降, 成精干细胞的数量最终也逐步减少。胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 信使 RNA 结合蛋白 (IGF-II messenger RNA binding protein, Imp) 能够中和内源性小 RNA 对 Upd RNA 的降解作用, 从而使 Upd RNA 更稳定。另有研究也证实, 在老年的雄性果蝇体内, 跟 Upd 一样, Imp 的表达量明显减少。当 miRNA let-7 靶向 Imp 导致 Imp 表达量减少后, Upd mRNA 由于失去保护而变得更加容易被降解。类似地, 也有研究表明,