

## · 学科进展 ·

## 人胚胎干细胞研究的现状与前景

王常勇 吕双红 李贤仁

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是从早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(primitive germ cells, PGC<sub>2</sub>)分离出来的多潜能细胞系。它具有与早期囊胚 ICM 或 PGC<sub>2</sub> 相似的生物学特性,在体外能够保持正常二倍体核型和未分化状态,并且有多方向分化潜能。在适当条件下,ES 细胞可被诱导分化为多种细胞、组织,也可以与受体胚胎嵌合,形成嵌合体。

1998 年,美国威斯康星大学 Thomson 等<sup>[1]</sup> 率先成功分离、克隆了人胚胎干细胞,并建立了细胞系,这一研究成果立刻在国际上引起轰动,成为世界关注的焦点。由于人 ES 细胞具有其它哺乳动物 ES 细胞的一般特性,能够在适宜条件下分化成构成人体的任何一种组织。因此,人 ES 细胞能够为组织工程研究提供可靠的细胞来源,同时能够在人早期胚胎发生、细胞组织分化以及基因调控等研究领域发挥重要作用。基于此,笔者针对人胚胎干细胞的研究进展及其应用前景做一简要回顾<sup>[1-10]</sup>。

一、哺乳动物 ES 细胞研究为开展人 ES 细胞研究奠定了坚实基础

1981 年,人类首次成功地分离得到小鼠 ES 细胞,自此以后人类对小鼠以及其它哺乳动物 ES 细胞进行了大量研究。在研究中,科研人员逐步摸索并掌握了 ES 细胞分离培养的关键技术,进而为人类成功进行 ES 细胞分离、培养研究奠定了坚实基础。

自 Evans 和 Kaufman 成功分离小鼠 ES 细胞后, Martin(1981)和 Roberston 等(1987)先后建立了 ES 细胞系。Doetschman 等(1988)建立了仓鼠类 ES 细胞系。Iannaccone 等(1994)建立了大鼠的类 ES 细胞系。目前小鼠 ES 细胞系的分离,克隆在某些品系中已基本完善,尤其是 129 品系的小鼠畸胎瘤发生率高,建株较为容易,在研究中被广泛采用。小鼠 ES 细胞目前已经作为研究哺乳动物早期胚胎发生、组织细胞分化以及基因表达调控等研究领域的

为理想的模型系统。

近年来,研究人员不仅针对啮齿类哺乳动物成功开展了 ES 细胞分离培养研究,而且还相继对猪、牛、绵羊、山羊、水貂、兔等其它哺乳动物 ES 细胞进行了深入研究。如 Piedrahita(1990)分离得到了猪类 ES 细胞。Satio 等(1992)分离获得了牛类 ES 细胞。Qraves 等(1993)分离得到了兔 ES 细胞。大量的研究表明,虽然这些动物 ES 细胞具有类似于小鼠 ES 细胞的特性,但至目前为止,尚不能确切证明这些细胞具有形成嵌合体的能力。因此,按传统概念,这些 ES 细胞目前只能称作类 ES 细胞。

长期以来,哺乳动物 ES 细胞,尤其是小鼠 ES 细胞系对研究人类胚胎发生、基因表达调控和组织器官移植等发挥了重要作用。但由于 ES 细胞种属差异较大,使不同种属之间的 ES 细胞在生物学特性上存在明显不同,因此将小鼠等哺乳动物 ES 细胞应用于临床具有相当大的局限性。近年来,组织工程学作为一门新兴学科,为人类再造具有活力的自体组织或器官提供了可能。作为组织工程研究种子细胞来源之一,人 ES 细胞的分离、纯化研究也因此受到专家、学者们的高度重视。科研人员利用已经掌握的干细胞培养技术对人胚胎干细胞分离培养,进行了深入探索和研究,并最终取得了突破。

## 二、人胚胎干细胞研究现状

(一)人胚胎干细胞研究概况:人类可自发性产生睾丸畸胎瘤,而多能干细胞系正是从畸胎瘤中产生的。Andrews 和 Thompson 等(1984)分别报道了从人类的畸胎瘤中得到了克隆细胞系。在此基础上,Prea 等(1989)尝试性地从人畸胎瘤组织中分离 ES 细胞,最终建立了能分化成所有 3 个胚层组织的细胞系。研究表明,这些细胞系的表型虽然与小鼠 ES 细胞不尽相同,但初步揭示了人胚胎干细胞建系的可能性。Thomson 等(1995)从恒河猴的囊胚中分离建立了 ES 细胞系,其具有二倍体核型,能分化形成代表 3 个胚层的组织,这是第一个建株的灵长类动物的胚胎干细胞。Thomson 等(1996)建立狨(common marmoset)的 8 个多能干细胞系,其中 2 个

作者单位:100850 北京,军事医学科学院基础医学研究所(王常勇、吕双红);武警总医院(李贤仁)

细胞系连续培养 1 年多,保持未分化状态,核型未变异。这些 ES 细胞在缺乏成纤维细胞饲养层的条件下,可分化出包括滋养层细胞和内胚层细胞在内的多种细胞。高密度培养可获得与早期附置后胚胎非常相似的一类胚体(EB)。上述针对人类及灵长类 ES 细胞的研究结果表明,科研人员已经逐步掌握了从人的囊胚中分离 ES 细胞的技术和条件。

1998 年 2 月,威斯康星大学的 Thomson 等<sup>[1]</sup>在进行人 ES 细胞体外培养过程中,发现其中某些人的细胞与他早些时候从猕猴胚胎中培养得到的 ES 细胞具有相似的生物学形状。通过进一步研究证实,这些细胞即为人类最早发现的人胚胎干细胞。Thomson 等从处于囊胚期的人胚胎 14 个内细胞团中分离、克隆出 5 个人 ES 细胞系,其应用的方法与 17 年前用来培养小鼠 ES 细胞的方法没有太大的区别。

此后不久,Shamblott 等<sup>[2]</sup>(1998)从受精后 5~9 周胎儿含有 PGC<sub>5</sub> 的生殖嵴和肠系膜中分离克隆出 5 个多潜能干细胞系,其特征类似于小鼠 ES 细胞,对 AKP 以及作为 ES 细胞特征性的 5 种免疫标记抗原表现为阳性,可连续传代且核型稳定。免疫组化分析类胚体的实验结果表明,这些细胞能够分化成包括所有 3 个胚层的组织。

## (二)人 ES 的生物学特征:

1. 人 ES 细胞生物学特性及核型:各种哺乳动物 ES 细胞都具有与早期胚胎细胞相似的形态结构特征,即胞体体积小、核大,有 1 个或多个核仁。Thomson 等分离的人 ES 细胞核显著,核质比高,表明他分离的人 ES 细胞具有一般 ES 细胞相似的形态特征;Shamblott 等由 PGC<sub>5</sub> 分离的 ES 细胞表现为细胞间界限不清,细胞核大,也类似于一般 ES 细胞的形态特征。

在已建立的 ES 细胞系集落中,ES 细胞紧密地聚集在一起,呈克隆状生长,无明显细胞界限,形似鸟巢。ES 细胞具有连续无限制增生的能力。此外,还可以在体外对其进行选择、操作、冻存。冻存的细胞可在需要时随时解冻,继续培养仍保持未分化增殖状态,且来自一个克隆的细胞具有同样的特征。

人 ES 源于早期胚胎细胞,在体外扩增培养中保持稳定的整倍体核型,核型至少在 10 代内能够保持稳定。此外,人 ES 细胞还具有高度表达端粒酶活性,端粒酶的高度表达表明人 ES 细胞复制的寿命长于体细胞复制的寿命。

2. 人 ES 的高度分化潜能:人 ES 细胞在理论上能够分化为构成人体组织或器官的任何一种人体细

胞。给予人 ES 细胞适宜的条件,其即可向某一特定的方向分化,并形成特定细胞分化类型。这样,人 ES 细胞即可用于人体组织或器官的再造研究。人 ES 细胞高分化潜能主要表现在两个方面:体内分化潜能及体外分化潜能。

体内分化潜能表现在将人 ES 细胞给动物皮下注射后,在动物体内能够形成畸胎瘤。Thomson 等将自囊胚分离的 5 个人 ES 细胞系分别注射到裸鼠体内,结果在每个裸鼠体内均产生了包含 3 个胚层组织的畸胎瘤,畸胎瘤中的组织包括胃上皮(内胚层)、软骨、骨髓、平滑肌、横纹肌(中胚层)和多层鳞片状上皮(外胚层)。有的组织还具有发育良好的组织类型(如形成神经节)。目前尚未发现生殖细胞起源的胚胎干细胞在体内形成畸胎瘤的证据。

体内分化潜能表现为在体外缺乏鼠胎儿成纤维细胞饲养层的条件下,不管有无白血病抑制因子存在(LIF),Thomson 等从囊胚分离的人 ES 细胞均会发生分化;在具有成纤维细胞的培养液中,人 ES 细胞生长聚集堆叠于培养皿时也会自发分化。然而,体外分化的证据仅限于表达滋养层和内胚层形成(人类绒毛膜促性腺激素和甲胎蛋白产物)的特异性标记,而产生甲胎蛋白的细胞是代表胎外内胚层还是胚内内胚层,目前还不清楚。Shamblott 等自 PGC<sub>5</sub> 分离的 ES 细胞在 LIF 存在下,一小部分(1%~20%)细胞克隆自发形成类胚体。将体外培养过程中自发形成的类胚体进行组织学切片处理以及免疫化学检查,发现有代表不同细胞类型的特异性表面标记物的表达,而这些细胞类型与代表 3 个胚层的细胞类型一致。

3. 人 ES 细胞表面抗原:Kannagi(1983)和 Solter 等(1987)研究表明,灵长类 ES 细胞具有一系列特异的表面标记。早期胚胎阶段特异性抗原(SSEA)1、3 和 4 是球形的糖脂,能为单克隆抗体所识别。灵长类 ES 细胞表达 SSEA-3 和 SSEA-4,只在分化时表达 SSEA-1。但鼠和人 ES 细胞表达的抗原具有种属差异性,如小鼠 ICM 细胞、ES 细胞表达 SSEA-1,但不表达 SSEA-3 或 SSEA-4。

Thomson 等研究表明人 ES 细胞表达标志包括早期胚胎阶段特异性抗原(SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-81)和碱性磷酸酶 AKP。人 ES 细胞一直呈 SSEA-4 强阳性,而 SSEA-3 为弱阳性;性腺起源的多能干细胞所表达的标记与原始生殖细胞的特性一致。Shamblott 等自人 PGC<sub>5</sub> 分离的 ES 细胞 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 均表现为阳

性,识别 SSEA-3 抗原的抗体染色弱且不稳定。对于处于未分化态的人 ES 细胞和恒河猴 ES 细胞表现 SSEA-1 阴性,而他们自人 PGC<sub>2</sub> 分离的人 ES 却表现 SSEA-1 阳性。人 ES 细胞(20%~90%以上)呈 AKP 阳性,细胞表面抗原呈 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 和 AKP 阳性。人 ES 细胞表面抗原与小鼠和其它哺乳动物 ES 细胞表面抗原存在明显差别,表明在人胚胎发育的早期,在基因表达调控、细胞分化等方面,人与其它哺乳动物存在一定的差异,这为鉴定和分离人 ES 细胞及研究人类胚胎发育、基因表达调控、细胞分化等提供了一条有效的途径。

4. 定向诱导分化:由人胚胎干细胞发育而来的各种细胞可为器官移植、组织损伤修复等临床应用提供可靠的细胞来源。由于在应用组织工程技术构建人体组织的过程中<sup>[7]</sup>,往往需要某一单一类型的细胞或组织,因此,若人 ES 能够应用组织工程研究,必须首先使其定向分化成某一特定的细胞类型。

目前针对小鼠 ES 细胞定向诱导分化成造血细胞、心肌细胞、神经元和胶质细胞等的研究,已经取得成功。目前,尽管科研人员已经成功分离、培养了人 ES 细胞,但由于人 ES 细胞尚未建立稳定的细胞系,细胞扩增较慢。加上实验材料(受精卵)来源较困难,在体外培养人 ES 细胞时常出现自发分化的现象,因此,还不能将其定向诱导分化成特定谱系。但由于人 ES 细胞定向分化是其能否进入临床应用的关键,相信随着研究的深入和各种条件的成熟,人胚胎干细胞定向分化研究一定会取得进展。

5. 核移植:检验 ES 细胞全能性的一个重要标准,是能否形成包括生殖系在内的嵌合体,即用 ES 细胞核做供体,进行核移植获得的克隆后代。由于伦理和道德原因的限制,目前世界各国都普遍反对克隆人,不容许用人 ES 细胞进行核移植从而克隆后代。

未来临床“治疗性克隆”将是人胚胎干细胞造福于人类的一种非常重要的途径<sup>[10]</sup>。应用人胚胎干细胞进行“治疗性克隆”研究的技术途径包括以下几个步骤:①首先取病人体细胞核,将其移植到去核的成熟受体卵母细胞中;②在早期胚胎形成后,从中分离获得人 ES 细胞;③对 ES 细胞进行基因修饰和定向分化研究;④将定向分化后的细胞移植给病人。在此过程中,进行核移植的目的并不是用于克隆人,而是希望通过对人 ES 细胞进行分离培养、定向分化等处理后,进一步获得再造的人体组织或器官。由于胚胎干细胞具有巨大的临床应用前景,一些国家

已开始或准备开始放宽对胚胎干细胞研究的限制,如法国一家高级法院建议取消国家对人类胚胎研究的禁令;美国总统科技顾问委员会建议允许国家资金资助干细胞研究。目前 NIH 已经正式宣布,美国国家基金不资助人 ES 细胞研究,但不干涉以自筹资金方式进行相关研究。相信,随着人 ES 细胞研究的不断深入以及逐渐被社会所认可,人 ES 细胞以及“治疗性克隆”研究必将获得稳步发展。

### 三、人胚胎干细胞的应用研究前景

人 ES 细胞对在体外研究人正常胚胎发生、非正常发育及在组织移植、器官置换和基因治疗等研究领域都具有重要的作用,尤其是在组织工程研究领域具有诱人的临床应用前景。美国至少已有两家公司开始研究利用克隆技术培育人胚胎,希望大批量生产用于克隆治疗疾病的 ES 细胞。由于人 ES 细胞对临床医学有着极其巨大的开发价值,国内外研究人员正在加紧开展人 ES 细胞的相关基础与应用研究。

(一)临床医学:人胚胎干细胞是临床多种疾病的克星。假如能控制胚胎干细胞的分裂过程,便可以制造不同的细胞,以代替病人已坏死或有缺陷的细胞。例如取代帕金森病人有缺陷的脑细胞以及糖尿病人不能制造胰岛素的胰脏细胞等。人 ES 细胞也可临床组织器官移植和细胞治疗提供无限的细胞来源,从而为许多由于供体缺乏而难以根治的疾病提供了治愈的机会,如肾衰竭或白血病等的治疗。最近,Brustle 等成功地向神经系统有缺陷的实验鼠体内移植了由胚胎干细胞分化成的神经胶质细胞,结果表明这种人工培育的细胞能真正取代动物自身的细胞。由此可见,胚胎干细胞移植技术和其它先进生物技术的联合应用,在未来的几年内可能引发在移植医学领域的革命性进步。

目前,科学家们设想应用 ES 细胞进行临床组织移植的基本途径是:自胎儿性腺或早期胚胎分离人 ES 细胞,经过体外扩增,进行基因修饰以排除移植排斥,随后在体外定向诱导分化后移植给病人;还可取人体细胞核,将其移植给去核的成熟人或动物的卵母细胞,经核移植得到胚胎,再分离克隆人 ES 细胞。由于 ES 细胞为高度未分化状态,不能直接移植给病人,必须进行体外分化,产生适合移植用的特异性细胞前体。因此,如何控制人 ES 细胞定向分化是 ES 细胞能否应用于临床医学的关键因素。虽然人 ES 细胞可能形成各种细胞类型和简单的组织,但其是否具有形成复杂器官的能力目前尚不清楚。人

ES 也有可能象小鼠 ES 细胞一样,在体内形成胚胎瘤。为了避免人 ES 细胞向肿瘤方向发展,人们必须应用自杀基因等对细胞在体内的生长分化过程进行有效控制。

(二)发育研究:全能性胚胎干细胞系为通过基因打靶的方式分析在发育中基因的功能提供了一种有效手段。与此同时,通过评估 ES 细胞本身的体外分化能力,还可以直接探查基因功能。ES 细胞除了能够提供决定谱系的直接信息外(这些信息在早期胚胎复杂的三维环境中很难得到),ES 在人为控制下向特定谱系的分化还可为基因治疗提供细胞来源。

借助于人 ES 细胞体系,可以破译人体中重要的基因功能。ES 细胞系建立后,可从最根本上提示人及动物发育过程中的决定基因。ES 细胞系的体外可操作性,使胚胎发育及组织生长等一系列调节事件有了详细阐明的机会,这主要指倾向于分离鉴定新的前体细胞和有重要医学价值的基因。目前,功能基因组研究在世界范围内已经启动,如何对获得的众多基因进行功能验证是目前功能基因组研究的重点之一。通过人 ES 细胞研究,有望为确定人类各种未知基因的功能开辟一条捷径。

(三)药物测试:ES 细胞可作为评价新药及化学产品毒性及效能的检测系统。ES 细胞具有组织、细胞的广谱性,它发展为胚体后的生物系统,可模拟体

内细胞与组织间复杂的相互作用,这在药物和农用化学品工业上有广泛的用途,可减少动物检测,降低成本,因此具有重要的商业价值。

#### 参 考 文 献

- 1 Thomson JA, Joseph IE, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282:1 145-1 147.
- 2 Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:13 726-13 731.
- 3 Soler D, Cearhart J. Putting stem cells to work. *Science*, 1999, 283: 1 468-1 470.
- 4 Vogel G. Harnessing the power of stem cells. *Science*, 1999, 283:1 432-1 434.
- 5 Pedersen RA. Embryonic stem cells for medicine. *Scientific American*, 1999, 4:69-73.
- 6 Brower V. Human ES cells: can you build a business around them? *Nature Biotechnology*, 1999, 17:139-142.
- 7 Langer R. Tissue Engineering. *Science*, 1993, 260:920.
- 8 Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, 1996, 98:216-224.
- 9 Tsai M, Wedemeyer J, Ganiatsas S, et al. In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:9 186-9 190.
- 10 Colman A, Kind A. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends Biotechnol*, 2000, 18:192-196.

(收稿日期:2000-12-19)

## · 工作研究 ·

### 1995 ~ 1999 年住院新病种的构成分析

邓开蓉

住院病种的逐年增加是医学科学发展的必然结果。现对我院 1995 ~ 1999 年出院病种数进行分类统计,并与 1985 ~ 1989 年出院病种数比较,了解各类疾病新病种增加的幅度及构成比,分析其增加原因,为提高医院住院新病种分类统计质量和学科发展提供依据。

1995 ~ 1999 年与 1985 ~ 1989 年出院病种数对比显示,新增加住院病种数 283 个。按第十次国际疾病分类法系统分类,各类疾病新增加住院病种数和构成比分别为肿瘤 72 个(25.4%),损伤与中毒 39 个(13.8%),泌尿与生殖系病 34 个(12%),消化系统病 22 个(7.8%),神经系病 22 个(7.8%),五官系病 20 个(7.1%),循环系病 18 个(6.4%),传染病 14 个(4.9%),内分泌代谢营养疾病 14 个(4.9%),呼吸系病 11 个

(3.9%),其他 17 个(6%)。从新增加住院病种的分类表明,主要是由于医学影像技术的发展,细胞病理学的普及和实验室生化检测手段的提高,使能确定病因的定性诊断病名和能确定解剖部位的定位诊断病名大幅度增加,致病种数量逐年增加。其次是由于临床医学的发展,疾病的病因和发病机制的研究更加深入,疾病的诊断标准和分类更加明晰,使过去笼统模糊的诊断病名派生出许多肯定的诊断病名,新病种也相应增多。另外肿瘤的发病率增加、交通事故的增多和性病的流行,使这 3 类疾病的新病种增加幅度位居各类疾病的前三位,占新增加病种的 50%。因此,加强医学新知识的学习和掌握医学发展的动态,是提高新病种编码、归类、统计质量的关键。

(收稿日期:2000-06-05)

作者单位:400010 重庆医科大学附属第二医院