

# 干细胞工程学研究现状和发展前景<sup>\*</sup>

施渭康

(上海生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

**摘要** 阐述了干细胞研究现状、发展趋势和应用前景,对如何推进我国干细胞工程学的发展提出了建议。

**关键词** 干细胞工程学, 现状, 前景



1999 年末, 美国《科学》杂志把干细胞研究成果列为当年十大科学进展之首, 预示着 21 世纪生命科学时代提前到来。2001 年末,《科学》又把干细胞研究列为 2002 年六大热门科技领域榜首, 可见干细胞在生命科学

中的显要地位。

## 1 胚胎干细胞和成体干细胞

包括人类在内的哺乳动物个体发育不同阶段, 都存在着发育潜能不同的干细胞。胚胎发育早期阶段的每个卵裂球几乎都具有发育的全能性, 可分化为各种类型的体细胞, 甚至可独立地产生完整的机体; 胚胎发育至囊胚期, 一些未分化的胚胎细胞虽难以产生完整的个体, 但仍能分化为成体中所有类型的体细胞, 发育潜能属多能性。因此, 从哺乳动物早期胚胎分离培养出来的、具有全能或多能性的胚胎细胞称为胚胎干细胞, 或 ES 细胞(embryonic stem cells)。这类细胞能稳定地在体外自我更新、维持正常核型和分化为各种类型体细胞, 甚至参与个体发育, 故又有人称为‘万能’细胞, 成为新崛起的

细胞工程的重要材料<sup>[1]</sup>。另一类干细胞存在于成年各种组织中, 称为成体干细胞或组织干细胞。过去曾认为人体除了血液、皮肤、消化道上皮和肝脏等组织的干细胞具有一定的再生能力外, 其它组织基本上没有再生能力。同时, 也认为成体干细胞是限能或少能的。例如, 造血干细胞只能分化为血液系统的各种细胞; 小肠和皮肤的干细胞也分别只具有分化、补充与更新小肠和皮肤组织的能力。但近几年的研究发现, 这类组织专一性干细胞的发育潜能已超越了胚层或组织的界限<sup>[2]</sup>, 例如, 造血干细胞和骨髓间质干细胞分别在脑组织环境中能分化出神经细胞; 骨髓间质干细胞在特定培养系统中, 有可能分化出造血细胞、骨、软骨、肌肉、脂肪、肝细胞和脑组织的星形细胞等。显然, 这些成年组织干细胞在一定的微环境仍具有很强的可塑性, 可分化为该组织谱系外其它类型细胞。

## 2 国内外研究现状和发展趋势

ES 细胞研究主要经历了三个发展阶段:

1960—1980 年为第一阶段, 用小鼠早期胚胎或 12 天龄胚胎生殖嵴异位移植至同系小鼠体内, 可发展为畸胎瘤, 发现从其中分离出来被称作胚胎癌细胞的干细胞具有发育多能性, 可分化为神经细胞、肌肉细胞、软骨细胞和上皮细胞等包括三个胚层在内的各种类型细胞, 甚至能参与正常胚胎发育, 获

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2002 年 1 月 25 日

得嵌合体<sup>[3]</sup>。这种胚胎癌细胞曾被用作研究哺乳类发育、遗传和细胞分化问题,特别是通过各种基因标志证明了其与胚胎细胞几乎具有同等的发育潜能,但由于这种胚胎癌细胞具有包括核型异常等某些恶性肿瘤特性,分化细胞的类型也有限,特别是参与嵌合体发育的成功率很低,作为研究发育和正常细胞分化的模型不理想。

自 80 年代初,美英科学家率先从小鼠早期胚胎和生殖嵴分别建立了 ES 细胞和 EG 细胞(embryonic germ cells)<sup>[4,5]</sup>,直到 1998 年底,威斯康星大学汤姆森(Thomson J. A.) 研究组成功地建立了人类 ES 细胞<sup>[6]</sup>的近 20 年间,是 ES 细胞研究蓬勃发展的第二阶段。其间,相继建立了各种动物包括牛、羊等家畜 ES 细胞系,也在 ES 细胞生物学特性,特别在分离培养各种动物 ES 细胞条件、小鼠 ES 细胞定向诱导分化和基因操作等方面积累了许多有用的资料。70 年代末,中国科学院上海细胞所姚鑫院士的研究组就开始了小鼠胚胎癌细胞及其诱导分化的研究;1987 年,建立了我国第一株小鼠 ES 细胞系<sup>[7]</sup>,并以生长因子的基因操作途径,成功地定向诱导 ES 细胞分化为血管内皮细胞<sup>[8]</sup>;1999 年,又建立了小鼠 EG 细胞系,开展了猪 ES 细胞建系研究;近几年,新发现了几个与 ES 细胞全能性相关的基因<sup>[9]</sup>,是国内在 ES 细胞基础研究方面有较好积累的工作组。90 年代,北京、上海、广州、陕西、内蒙古、四川、浙江等省市的 10 余个高等农、医学院校和研究所相继开展小鼠 ES 细胞建系和其它动物胚胎学研究。目前,除了上海、北京、广州、陕西和内蒙古等省市的数个研究组已有一定基础外,大多尚处于起步阶段。研究内容主要集中在包括人类在内的 ES 细胞分离培养、定向诱导分化、基因操作、胚胎工程或核移植等,有的项目组初具规模,但未见有较大进展,特别是一些大家畜动物 ES 细胞建系尚未成功。

20 世纪末,克隆羊多利问世、人类 ES 细胞培养建系成功和组织干细胞超越胚层分化潜能的重要发现这三大生命科学成就,开创了“干细胞工程学”研究的新时期。其特点是将“克隆”技术和“干细胞”研究两者融为一体,发展成为一门集遗传、发育、细胞与分子生物学、育种和再生医学等多学科

交叉的前沿学科。我国也紧随世界潮流,将干细胞应用于发育遗传的基础研究,在再生医学、育种和组织工程中的基础研究和动物实验正在或准备启动。总体上说,国内农、医高等院校研究所对于干细胞研究的发展要快于我院研究所。最近,上海第二医科大学所属实验室已将干细胞研究结合组织工程技术,在骨、软骨、肌腱和神经细胞等方面取得高水平的成果。近年已能通过核移植和克隆技术途径获取 ES 细胞,将这种 ES 细胞定向诱导分化成特定类型细胞用于临床治疗,被称为治疗性克隆。两年多前,国外有人将人的成体细胞核移植入去核牛卵母细胞,发育成“人”ES 细胞;不久前有媒体称,国内也有人将人成体细胞核移植入去核兔卵母细胞,也称是“人”ES 细胞,但都未见论文报道。这虽说明我们在克隆技术上不亚于世界潮流,但还需在研究思路和创新性方面做大的努力。

### 3 干细胞应用前景

#### 3.1 哺乳类细胞分化和胚胎发育的研究模型

哺乳动物早期胚胎一般体积很小,又在宫内发育,在体内研究各类细胞分化及其机理几乎不可能。干细胞,特别是 ES 细胞,因其富具独特的发育全能或多能性质,在特定的体外环境下可分化为神经、肌肉、软骨、血细胞、上皮细胞和成纤维细胞等。在这些细胞分化过程中,必然先经过若干前体细胞阶段,因此,ES 细胞不仅是研究特定类型细胞的模型,也是探索某些前体细胞起源和细胞谱系演变的理想实验体系。体外 ES 细胞分化为某种类型细胞的途径和机制可能与在体胚胎的不完全相同,但在分子水平、包括发育的遗传程序仍有共同或相似之处。体外 ES 细胞形成的拟胚体在结构排列、一些类型细胞的分化秩序和方式非常类似于在体的胚胎。因此,ES 细胞是研究哺乳类发育问题的好模型。

#### 3.2 ES 细胞介导的基因转移

通常,用逆转录病毒载体整合至早期胚胎或显微注射 DNA 至受精卵原核等一般转基因途径制备转基因动物。因导入的多拷贝 DNA 存在着随意整合问题,产生转基因动物的效果不理想。利用 ES 细胞介导基因转移的优点是:在产生一种新的经生

殖系传递的转基因动物以前,可在体外 ES 细胞系统中研究和筛选外源 DNA 表达质粒的构建、整合和表达,从而可提高产生转基因动物的效率;经遗传操作先将目的基因整合入 ES 细胞,再将这种 ES 细胞与早期胚胎细胞聚集成嵌合胚,移植入母体子宫可发育成基因嵌合体式的转基因动物。这类含目的基因的 ES 细胞可在体外增殖,成为取之不尽的、能产生同样基因型动物的种子细胞。

### 3.3 临床细胞治疗

细胞治疗是指用遗传改造过的人体细胞直接移植或输入病人体内,达到控制和治愈疾病为目的的治疗手段。目前常说的基因治疗技术是使编码正常序列的基因导入突变细胞,使突变基因的功能得到纠正。但导入基因的整合和表达难以精确控制,特别是该基因插入对其它细胞基因产生的效应尚无法预知,目前许多被用作基因操作的靶细胞在体外不易被基因转染和增殖传代。而 ES 细胞经基因操作后一般可稳定地在体外增殖传代,克服了目前基因治疗中所需大量靶细胞来源不足的主要问题。

为克服异体移植的免疫排斥反应,将 ES 细胞进行 MHC(major histocompatibility complex) 基因的遗传操作,建立可供移植对象配对选择用的各种 MHC 组合的 ES 细胞库。在此基础上,根据不同的移植对象要求,或直接定向诱导分化为功能性细胞(如神经细胞、软骨细胞等);或定向诱导分化为组织干细胞(如造血干细胞、神经干细胞等)。这类组织干细胞也可直接取材于成体组织或器官,通过进一步遗传操作,改造和修正 ES 细胞基因组,再定向诱导分化为组织谱系干细胞或特定的分化细胞,最终移植输入患者<sup>[10]</sup>。用临床患者成体细胞核移植入去核卵母细胞发育而来的 ES 细胞,经定向诱导分化后输入该患者,可直接避免免疫排斥反应。根据小鼠 ES 细胞研究资料,许多人最看好人 ES 细胞定向诱导分化的神经细胞,被应用在临床神经系统疾病的细胞治疗,包括 Parkinson's 病、Alzheimer's 病和 Huntington's 病以及中风等<sup>[11]</sup>。用小鼠 ES 分化细胞对脑损害动物模型的细胞治疗的实验中已取得实效,症状有所改善。另外,骨和软骨病、血液病、肝病等的干细胞治疗也是研究的热点。

### 3.4 组织工程的种子细胞

目前,缺损组织和器官的修复,不论自体或异体移植都受到客观条件的限制,特别是种子细胞的来源不足。人体干细胞工程学的诞生和发展,有望解决上述问题,主要有三点依据:(1)小鼠研究的资料表明,ES 细胞能分化为特殊类型的细胞,可作为体外组织或器官构建和生长的重要的种子细胞来源;(2)近来动物实验进一步证明,从某一种组织的活体碎片有可能产生完好的供移植器官;(3)人 ES 细胞诱导定向分化为某特定组织的细胞可行性。这些都是组织和器官移植研究的背景及基础。最近,已见有小鼠 ES 细胞在特殊条件下分化为骨母细胞,结合组织工程技术,形成有可能被用于骨修复的骨组织<sup>[12]</sup>。由于 ES 细胞定向分化、增殖和构成组织、器官中的细胞类型的复杂性等诸多问题尚待解决,目前较多的工作着重于从成年或幼年器官或组织碎片分离、培养和扩增某一类型的组织干细胞<sup>[13]</sup>。例如,利用组织工程方法,从狗膀胱活检一小片组织,分离尿上皮和肌肉组织细胞在生物活性材料制成的模型或支架上培养和增殖,可长成供移植用的膀胱。毕竟人体器官形成是一个非常复杂的三维过程,至少应包括血管、结缔组织、肌肉和上皮细胞等功能性细胞有序排布,因此,“克隆器官”的一些基础性问题研究尚需时日。新近,美、英科学家通过基因剔除或添加基因的遗传操作途径获得转基因猪,为人类异种器官移植提供了无排斥反应的器官来源。干细胞作为组织工程种子细胞的设想都还处于实验阶段,真正应用临床至少还需 10 余年时间。

## 4 建议

### 4.1 人 ES 细胞研究与伦理道德设想

英国科学家维尔穆特(Ian Wilmut)将成年体细胞核移植至同种去核卵细胞,克隆了绵羊多利,标志着高等哺乳动物无性繁殖的开始。根据同样的原理和技术路线,在理论上无疑有可能克隆出遗传等同的人类。这一重大成果曾惊动了一些国家的政坛和新闻界,引发了伦理道德大讨论<sup>[14]</sup>。许多政府纷纷立法禁止克隆人的研究。我国卫生部和国家科技部也明确表态,禁止克隆人的实验。人 ES



细胞取自人的胚胎,容易与克隆人联系在一起。根据人 ES 细胞全能或多能性的特点,我们更应自觉地注意避免克隆人或基因嵌合人类的研究。实际上,根据遗传和进化的基本法则,比较“无性”和“有性”两种繁殖方式,由于体细胞中的基因突变不会遗传给子代,用体细胞核克隆动物在遗传和进化上不仅毫无优势可言,而且还会产生一些新的问题。众所周知,近亲婚配产生的子代,遗传缺陷的发生率明显增加,而且体质和精神素质也比较低劣。动物实验也证明,成体细胞核移植所产生的个体发育往往有缺陷。因此,美国前不久报道的克隆人胚胎只发育至 6 细胞阶段、未见进一步发育也就不难理解了。另一方面,在移核技术中,应充分注意核质的相互影响。特别是体细胞核移入去核卵细胞时,核受后者的细胞质影响,致使 DNA 和 RNA 合成的布局改变。因此,异种间通过核移植克隆动物应慎之又慎,集中在推进人类社会、为人类造福进行干细胞工程学的创新研究。随着干细胞工程技术和广泛应用,我们应当把干细胞工程学的研究方向集中在有利于推进人类社会、为人类造福这一崇高目标,制订具体法规和条例来规范人们的研究无疑是必要的。

## 4.2 加强干细胞基础和应用研究

小鼠研究资料已证明,ES 细胞是探讨分子、细胞、组织及个体不同水平的生命现象的好模型。就 ES 细胞本身的生物学特性而言,也存在着不少基础性问题有待解决。例如,ES 细胞全能性本质和分化为各种特定细胞的分子信号等。临床细胞治疗前景是非常美好的,但实际应用中问题很多。例如,选择特定细胞哪一分化阶段的细胞最适合于转输后在体内生长和发挥生理功能作用;转输后细胞克服免疫排斥和永生化问题等等。这就需要加强干细胞、特别是 ES 细胞生物学的基础研究,即使是小鼠 ES 细胞也有待于扶持和加强。国内有关人的 ES 细胞研究在个别实验室刚起步。首先,应与有条件的体外受精(in vitro fertilization, IVF)实验室建立合作关系,从剩余的受精卵培育分离人 ES 细胞系,建立不同组织配型的 ES 细胞库。在这个基础上,开展人 ES 细胞基础研究。我国在干细胞研究的知识积累和研究骨干队伍方面已有一定的基础,制订研

究规划,加强学术交流,从根本上把“模仿”、“追踪”的战略目标改变为“跨越”和“领先”的方向,把我国 ES 细胞工程学推向世界一流水平是可行的。

## 4.3 创建宽松安定的科研环境

我院在知识创新工程和科研体制改革中,建立了新的管理模式,已取得了较好的成绩,但也难免出现一些新问题。课题负责人最关心的是研究经费。总体上来说,国家下拨的经费和创新基金不算少,但分到课题组却不算多。随着全成本核算和工资分配制度等方案出台,不少课题组实际用于研究的经费已微乎其微。减少单位对课题组的非研究性开支摊派,值得主管部门认真研究。另一个问题是年终考核的评估标准,把发表在 SCI 的论文作为考评的重要指标之一,应该是合理的,但不应是惟一的、关键性指标。通常,基础研究工作者在探索新问题时,一两年不出论文是完全正常的。没有论文,应考评其项目阶段性完成指标和质量。由于年终的考评计分直接与当年奖金和来年的津贴、绩效工资挂钩,甚至涉及经费续拨问题,加之 SCI 论文计分达标的要求定得高,课题组绩效就不明显,科研人员为论文烦恼,压力重,积极性被挫伤,难以专心致志地安心搞研究。用人制度改革和竞争机制的引入以及工资分配不公带来的负面影响,致使一些有真才实学的科研人员浪费和流失。常见中国学者在美、英等国外实验室有突破性成就,除了研究基础和条件外,工作环境可能也是重要因素之一。干细胞工程学研究要发展,就要与其它项目研究一样,需要在管理模式完善的过程中,建立一个宽松安定的研究环境。

## 主要参考文献

- 1 施渭康. 胚胎性干细胞定向诱导分化——新崛起的细胞工程. 细胞生物学杂志, 2000, 22(4): 161–167.
- 2 Bjornson C R R, Rietze R L, Reynolds B A, et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science, 1999, 283: 534–537.
- 3 Sliver L M, Martin G R, Strickland S. Teratocarcinoma stem cell. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1983, 22–36.
- 4 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cell from mouse embryos. Nature, 1981, 292: 154–

- 156.
- 5 Felice M D, McLaren A. In vitro culture of murine primordial germ cells. *Exp Cell Res*, 1983, 144: 417– 427.
- 6 Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1 145– 1 147.
- 7 丛笑倩, 姚鑫. 小鼠胚胎干细胞(ES-8501 细胞) 建系过程的核型及特性分析. *实验生物学报*, 1987, 20: 237– 251.
- 8 丛笑倩, 夏顺汉, 徐露霞等. 外源 TGF- $\beta$  基因在小鼠 ES 细胞中的表达及其对细胞分化的影响. *实验生物学报*, 1995, 28: 173– 183.
- 9 Du Zhongwei, Cong H Q, Yao Zhen. Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Comm*, 2001, 282: 701– 706.
- 10 Watt F M, Hogan B L M. Out of eden: Stem cell and their niches. *Science*, 2000, 287: 1 427– 1 430.
- 11 Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neuroscience*, 2000, 3: 537– 544.
- 12 Buttery L D K, Bourne S, Xynos J D, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering*, 2001, 7: 89– 99.
- 13 Fuchs E, Segre J A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 2000, 100: 143– 155.
- 14 Noelle L. Europe confronts the embryonic stem cell research challenge. *Science*, 2000, 287: 1 425– 1 427.

## The Expectation of Study on Stem Cell Technology in the Future

Shi Weikang

( Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS, 200031 Shanghai)

Embryonic stem (ES) cells derived from blastocyst-stage early mammalian embryos are unique cell populations with the ability to undergo both self-renewal and differentiation into all types of somatic cells. A wide variety of adult tissues harbors stem cells, yet called “adult” stem cells may be capable of developing into a limited number of cell types. Based on this property and combination with clone technique, the stem cell technology could be applied mainly in the following fields: (1) ES cells will provide a useful culture system for cell differentiation to study the mechanism underlying many facets of mammalian development; (2) ES cells represent one of the most important materials in genetic manipulation including the targeted mutation of specific genes; (3) Human ES cell-based transplantation therapy will hold great promise to treat successfully a variety of diseases though many barriers remain in the way of successful clinical trials; (4) Human ES cells and adult stem cells could potentially provide an unlimited supply of tissue for transplantation, as a seed cell source.

**施渭康** 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所研究员。1963年毕业于上海科技大学理化细胞学专业。从事肿瘤生物学、发育生物学的胚胎发生和细胞生长分化研究, 现兼任《细胞生物学杂志》副主编。1982—1984年在英国牛津大学合作研究, 论证了哺乳类早期胚胎的卵黄囊具有替代肝脏合成血清蛋白的功能。国内外发表论文 60 余篇。曾数次获国家级、上海市、中国科学院科技成果奖和自然科学奖。