



点 评

创世之后: 人类胚胎离体培养的突破

高晖, 李卫*

中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

* 联系人, E-mail: leways@ioz.ac.cn

收稿日期: 2017-02-17; 接受日期: 2017-02-24; 网络版发表日期: 2017-03-12

国家自然科学基金(批准号: 31471277 和 91649202)和国家科技支撑计划(批准号: 2016YFA0500901)资助

自智慧生物被创造出来以后, 他们便不再是创造者手中的玩偶. 千百年来, 人们便在不断思考生命的本质和意义, 而解析和重构生命过程则成为了人们长久以来的终极梦想. 1951 年英国科学家威廉·哈维在其著作《动物的生殖》中第一次系统提出胚胎的结构、功能理论, 这奠定了人们从生命科学的角度探索生命起点的基石. 由于哺乳动物胚胎需要在体内发育, 这一点极大地阻碍了人们对其进行深入研究的进程. 几十年来, 人们不断探索着适于体外胚胎发育研究的培养系统. 1965 年, 研究即发现, 胚胎在玻璃培养皿中进行二维微滴培养时, 滋养外胚层细胞易与培养皿发生黏附引起囊胚整体结构的塌陷从而导致胚胎死亡^[1]. 因此在 1970 年, E.J. Jenkison 尝试使用牛眼晶状体纤维作为载体, 对小鼠胚胎进行体外三维培养, 并观察到了小鼠胚胎内胚层细胞的分化以及胚胎卵圆柱期的发生(相当于体内胚胎的 4.0~5.0 天)^[2]. 1973 年, 通过在培养基中添加胎牛血清以及对培养皿进行胶原包被, Yu-Chih Hsu 成功观察到小鼠体外培养胚胎的内外胚层的分化, 并发现将培养基中的胎牛血清替换为人脐带血清可以促进胚胎的发育^[3].

而人胚胎体外培养系统的进展则更为缓慢. 2003 年, Janet Carver 等人报道使用子宫内膜基质细胞作

为饲养层, 可以在体外维持胚胎存活至第 9 天, 而此前很多研究报道的结果甚至无法超过一周^[4]. 这些结果一方面可能是由于目前对早期胚胎发育所需的各种营养、细胞因子尚知之甚少, 另外一方面近年的研究也发现, 血清很可能对早期胚胎发育过程中的各种表观遗传学修饰产生了干扰, 进而影响了胚胎细胞的发育与分化^[5]. 进一步研究则通过更换培养皿材质, 使用纤连蛋白对培养皿进行包被, 使用成纤维细胞或心肌细胞制备胚胎饲养层, 或尝试添加不同的细胞因子、激素以检测其对体外培养胚胎发育的影响等^[6~8], 这些都在一定程度上改善了胚胎离体培养的条件, 但是这些培养系统无法维持体外胚胎发育至附植后阶段, 同时也无法对体外胚胎发育的情况进行实时观察.

在 2014 年, 来自洛克菲勒大学的 Zernicka-Goetz 团队对小鼠体外胚胎的培养系统进行了双向优化, 一方面在共聚焦级培养皿的底部进行聚丙烯酰胺凝胶铺层, 通过调整聚丙烯酰胺的比例对铺层的硬度进行调节, 之后使用鼠尾胶原蛋白对铺层进行包被以促进胚胎的黏附; 另一方面使用两步法培养基, 首先使用添加人脐带血清的培养基促进胚胎的贴壁, 待胚胎黏附到培养皿后, 去除培养基中的血清, 添加商品化的血清替代物继续进行培养, 最终成功将早

引用格式: 高晖, 李卫. 创世之后: 人类胚胎离体培养的突破. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 341–344, doi: 10.1360/N052017-00046

英文版见: Gao H, Li W. The day after the 7th day of the Creation: Breakthrough of human embryo *in vitro* culture. Sci China Life Sci, 2017, 60, doi: 10.1007/s11427-017-9023-y

期胚胎一直培育到卵圆柱期阶段, 极大地促进了对小鼠胚胎附植前后发育机制的研究^[9]. 而在 2016 年, 他们以及剑桥大学 Shahbazi 等人采用类似方法分别将人类胚胎体外培养至受精后的第 12 及 13 天, 并成功地在体外培养的胚胎内捕捉到了人早期胚层细胞的分化, 类羊膜腔以及卵黄腔的形成等关键事件的发生(图 1), 同时 Deglincerti 等人通过免疫荧光手段首次在哺乳动物早期胚胎中发现卵黄囊滋养外胚层细胞的分化, 并为其和其他胚胎细胞系建立了用于鉴定的分子标记^[10,11]. 两个团队的研究结果均表明, 人类胚胎可以在体外培养环境下自发诱导胚层细胞分化以及胚胎形态结构的变化, 而不需母源信号的参与. 这标志着人们将有望在体外直接观察、探索人类早期胚胎的发育机制, 从而拨开笼罩在人类早期生命发育问题上的种种迷雾, 达成对人类生命蓝图的理解与掌握.

不可否认的是, 人类胚胎的发育是一个复杂而漫长的生物学过程, Deglincerti 等人和 Shahbazi 等人所揭示的还仅仅是这一系列事件中的一小步^[10,11]. 两个研究团队都在体外培养的胚胎中观察到类羊膜腔以及卵黄腔的形成, 但 Deglincerti 等人的研究显

示, 在体外培养末期, 即受精后的第 12 天, 胚胎内形成的类羊膜腔以及卵黄腔已经开始塌陷, 表明胚胎的内部结构已经无法继续维持. 这一点可能是由于二维培养系统的限制, 即随着培养时间的延长, 胚胎的立体结构逐渐被重力拉平. 这也提示在体外发育过程中, 胚胎内形成的腔体结构可能并不完整, 因此胚胎内部信号分子的传递以及细胞间的互作很可能与体内胚胎存在一定差异. 伴随着三维培养体系的发展, 上述问题有望在近期获得解决. 2010 及 2011 年, Woodruff 研究团队通过使用藻酸盐凝胶分别在体外对小鼠以及狒狒的次级卵泡进行包被, 将其一直培养至完成体外卵泡成熟, 且从培养的小鼠卵泡中取出的卵子可以在体外受精并发育至二细胞阶段^[12,13]. 卵泡的成熟过程伴随着卵泡腔体积的增大, 以及卵母细胞、卵母细胞外包裹的卵丘细胞以及卵泡壁层颗粒细胞三者间联系的建立, 其变化与早期胚胎的发育存在一些类似之处. 2014 年, Takebe 等人通过在基质胶中对人诱导性多能干细胞, 脐静脉内皮细胞和间充质干细胞进行共培养, 产生出类似胎儿肝脏样的结构, 将其移植入受体小鼠后可以迅速地

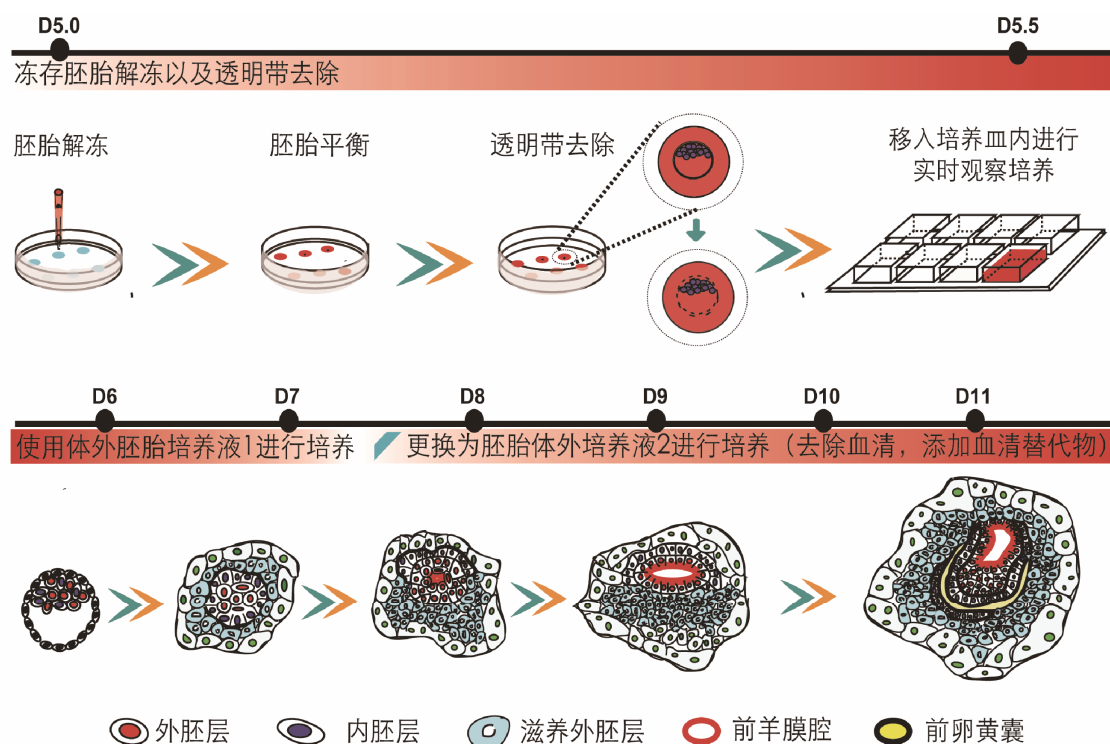


图 1 体外培养人附植前囊胚到附植后阶段(网络版彩图)

质胶三维培养系统有利于多细胞组织空间结构的形成与维持^[14]。因此,在目前的人胚胎体外培养体系中,通过与上述藻酸盐、基质胶三维培养系统相结合,可能将有助于维持胚胎的立体结构,并进一步促进人体外胚胎的发育机制的研究。

在人体内,胚胎附植前漂浮于子宫腔内,其发育不仅受到胚胎自身信号的影响,子宫腔内的信号分子浓度,子宫内液体的剪切力同样可能影响胚胎早期发育的调控。胚胎附植时,滋养外胚层细胞与母体子宫内膜细胞间进行互作,并最终分化成胎盘建立母体与胎儿间的连接。而目前的二维体外培养系统并不足以支持这些方面的研究。在 2010 年,哈佛大学的 Dongeun Huh 团队通过在微芯片两侧分别植入肺细胞及毛细血管细胞,通过与微流控设备相结合制备了肺器官芯片,通过调节芯片两侧细胞接触到的空气与液体流动来模拟肺部的呼吸情况,用于进行肺部药物的筛选以及毒理学检测^[15]。而随着近年来组织工程学技术的进展,许多不同器官,如肝、肾、小肠、心脏等均已成功制备出器官芯片用于组织发育、功能研究^[16,17]。那么通过生物与工程技术相结合开发人造子宫,以用于胚胎的进一步离体培养,将有可能模拟出胚胎在体内的发育环境,探索胚胎与子

宫之间的交互对话,从而为阐明人类妊娠建立以及维持的机制提供有力支持。

当今这些体外胚胎培养技术的发展是通向重构生命过程终极目标的重要一步,它不但会推进生殖技术的进步,有利于再生医学以及干细胞技术方面的发展,深化对生命起源机制的理解,也会引导人们对生命的本质这一永恒问题进行思考。终有一日,完整的生命体将从人造子宫当中诞生。伴随着治疗性克隆的解禁,以及三亲婴儿的诞生,《黑客帝国》中的一些场景将不再仅仅是幻想。而当人类所有的器官皆可以被人造之物所代替时,当我们身边存在着拥有与人类一样的外表,睿智、善良,富含创造力,充满人性光明特征的机器人时,人类也就实现了在“被创造”和“创造者”之间的角色转换。那么这时我们又将如何定义人类,如何定义生命?当然,技术的进步总是一把双刃剑,恶意的应用无疑将是人类的梦魇;有规则和有节制地应用则不仅会加深人们对于未知领域的了解,更会给不孕不育患者等群体带来福音。科学技术的发展不应仅仅带来生活的改善,也会引导人类整体认知的改变。而所有这些都将依赖于技术和伦理的协同演化才能最终得以实现。

参考文献

- 1 Carter S B. Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion. *Nature*, 1965, 208: 1183–1187
- 2 Jenkinson E J, Wilson I B. *In vitro* support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse. *Nature*, 1970, 228: 776–778
- 3 Hsu Y C. Differentiation *in vitro* of mouse embryos beyond the implantation stage. *Nature*, 1972, 239: 200–202
- 4 Carver J, Martin K, Spyropoulou I, et al. An *in-vitro* model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod*, 2003, 18: 283–290
- 5 Chen J, Liu H, Liu J, et al. H3k9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into ipscs. *Nat Genet*, 2013, 45: 34–42
- 6 Wu T C, Wan Y J, Damjanov I. Positioning of inner cell mass determines the development of mouse blastocysts *in vitro*. *J Embryol Exp Morphol*, 1981, 65: 105–117
- 7 Carson D D, Tang J P, Gay S. Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: Effects of the arg-gly-asp sequence. *Dev Biol*, 1988, 127: 368–375
- 8 Kauma S W, Matt D W. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (lif) enhance mouse blastocyst development *in vitro*. *J Assist Reprod Gen*, 1995, 12: 153–156
- 9 Bedzhov I, Leung C Y, Bialecka M, et al. *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2732–2739
- 10 Deglincerti A, Croft G F, Pietila L N, et al. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature*, 2016, 533: 251–254
- 11 Shahbazi M N, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 700–708
- 12 Jin S Y, Lei L, Shikanov A, et al. A novel two-step strategy for *in vitro* culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril*, 2010, 93: 2633–2639

- 13 Xu M, Fazleabas A T, Shikanov A, et al. *In vitro* oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. Biol Reprod, 2011, 84: 689–697
- 14 Takebe T, Zhang R R, Koike H, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an ipsc-derived organ bud transplant. Nat Protoc, 2014, 9: 396–409
- 15 Huh D, Matthews B D, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. Science, 2010, 328: 1662–1668
- 16 Zhang B, Montgomery M, Chamberlain M D, et al. Biodegradable scaffold with built-in vasculature for organ-on-a-chip engineering and direct surgical anastomosis. Nat Mater, 2016, 15: 669–678
- 17 Baker M. Tissue models: A living system on a chip. Nature, 2011, 471: 661–665