

人胚胎干细胞建系及其研究进展

徐晨明, 黄荷凤 综述

(浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES)在再生医学、药物筛选和发育生物学等领域具有重要的研究和应用价值。hES细胞系通常生长在小鼠胚胎成纤维细胞上, 动物源性病原生物的污染风险限制了这类hES的临床应用, 因此寻找无血清、无饲养层细胞的成分明确的培养体系进行hES细胞建系及培养, 生产细胞移植临床安全应用标准的hES是近年hES建系的努力方向。

[关键词] 干细胞/细胞学; 胚胎/细胞学; 细胞分化; 细胞培养技术; 细胞, 培养的

[中图分类号] Q 813 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)01-0103-05

Progress in the derivation, culture of human embryonic stem cells

XU Chen-ming, HUANG He-feng (*Department of Reproductive Endocrinology, The Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

[Abstract] Human embryonic stem (hES) cells are considered to be a valuable resource for research in regenerative medicine, drug screening, and developmental studies. However, hES cells are usually established and maintained on mouse embryonic fibroblast feeder layers, and the risk of animal origin contamination from feeder layer generally excludes the clinical use of these hES cells. The main emphasis over the last several years has been in finding defined serum- and feeder layer-free system for derivation and culture of hES cells to enable the clinical use of hES cell for cell transplantation.

[Key words] Stem cells/cytol; Embryo/cytol; Cell differentiation; Cell culture techniques; Cells, cultured

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(1):103-107.]

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES)是一种取自人囊胚内细胞团, 经体外分离、培养获得的一种原始多能(pluripotent)干细胞。它具有体外无限增殖和多向分化潜能两个基本特点, ①在体外能保持稳定的二倍体, 能长期增殖且保持不分化状态; ②在移植或体外适当培养条件下能够自发或被诱导分化为内、中、外三个胚层的多种类型细胞^[1-2]。

人胚胎干细胞系的分离和体外成功培养具

收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-07-17

基金项目: 国家863项目(20060102A1022); 浙江省重大专项基金(No: 2006C13078)。

作者简介: 徐晨明(1968—), 女, 硕士, 从事辅助生育工作。

通讯作者: 黄荷凤(1957—), 教授, 博导, 从事生殖调控和生殖内分泌研究和教学; E-mail: hhf57@zju.edu.cn

有极其重要的研究和临床应用价值。hES细胞可用于体外研究人类胚胎发生发育过程,有助于理解分化发育机理、认识生命和疾病现象;通过对其体外分化和定向分化的研究,识别某些靶基因,为人类新基因的发现及其功能的研究提供新的方法^[2];hES细胞最为深远的潜在用途是通过定向分化诱导产生各种特化的细胞和组织,用于修复或替换丧失功能的组织和器官,为人类疾病的基因治疗开辟广泛的应用前景。而建立理想的人胚胎干细胞培养系统是开展上述研究的首要条件。目前人们研究的热点主要集中于探索hES细胞建系的新方法,开发安全有效的可达到临床应用标准并适合在体外进行大规模扩增的人胚胎干细胞培养体系。

1 hES细胞分离和建系

人受精卵体外培养5~7 d发育形成囊胚,其外周是滋养层细胞,中央是内细胞团(inner cell mass, ICM)。此时可用Tyrodes或链霉菌蛋白酶(pronase)脱去透明带后分离获得ICM,也可将胚胎培养至第8天,待胚胎完全孵出再进行ICM的分离^[3]。囊胚ICM细胞的分离非常重要,分离的成功率取决于囊胚的质量、分离的条件和实验者的经验。分离ICM的方法主要有免疫外科法和机械法两种。目前绝大多数hES细胞系都是采用免疫外科方法,一般用兔血清和豚鼠血清的抗体和补体使囊胚的滋养层细胞发生免疫溶解,从而得到ICM细胞^[4]。但免疫外科法的缺点是ICM细胞会接触到动物源性蛋白。机械法可避免接触动物蛋白,但操作难度较大。

取得ICM细胞后将其置于准备好的饲养层上培养,饲养层一般用丝裂霉素C处理或 γ 射线照射的方法使其失去增殖能力。ICM经过6~10 d的培养、克隆增殖后,分离ICM并接种于新鲜饲养层上,随后以机械法或酶消化法进行反复的传代、扩增,最终建成hES细胞系。

hES建系是一项耗时而精密的工作,hES细胞对培养条件要求很高,非常容易分化,必须密切观察其形态变化,注意及时换液和传代。一般来说,当hES细胞在体外传至15代以上,并保持其基本特性,则建系基本成功^[2,5]。

2 hES建系的质量体系

2.1 hES的胚胎来源 目前建立的hES细胞株主要来源于临床进行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)和胞浆内单精子注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)治疗的患者捐赠的多余废弃胚胎。一般认为,高质量的含有一定ICM细胞数量的囊胚才可能得到生长快速的原代克隆并传代,建系机会高,但有研究报道,hES细胞系对囊胚的质量要求没有IVF高,可以利用废弃的胚胎作为获得hES细胞的来源^[6]。

由于传统hES来自囊胚的ICM,ICM分离后囊胚被毁,而这些囊胚是具有发育形成个体的潜在能力,在伦理道德问题上一直存在争议。最近有报道利用小鼠的单个卵裂球分离并培养了5个胚胎干细胞系和7株滋养干细胞系^[7],单个卵裂球的分离等同于植入前遗传学诊断中的胚胎活检过程,由于此时胚胎细胞具有全能分化潜能,单个卵裂球的分离通常不会带来胚胎的毁坏,也不影响胚胎的发育潜能,因此如果将该技术应用于hES的建系,不仅可解决伦理的争议,而且也大大扩充了建系的胚胎来源,并可作为自体干细胞的移植治疗开辟广阔的途径。

2.2 hES细胞的体外培养体系 体外培养hES细胞的基本原则是,在促进hES细胞增殖的同时,维持其未分化的二倍体状态,并保持其多向分化潜能。hES细胞的倍增时间通常在30~40 h之间,约6~7 d传代一次。hES建系初期生长缓慢,之后其增殖速度才逐步加快,生长活性也相应增加。hES的成功建系和维持不仅取决于高质量的囊胚来源,而且也决定于稳定的培养条件和培养体系。

2.2.1 培养环境: hES对培养条件要求很高,需要稳定的培养温度(37℃)和湿度,以及5%的CO₂。hES细胞比较脆弱,当受到外来压力产生应激反应时,细胞常常会发生分化并启动凋亡程序。因此,需定期检测温度、湿度和CO₂浓度,以维持hES稳定的培养环境。

2.2.2 基础培养基: 用于人和其它动物胚胎干细胞分离培养的基础培养基的成分基本相

同, 早先采用高糖 DMEM 或 DMEM/F12 培养液, 补加 15%~20% 的胎牛血清和一些微量成分, 如 β 巯基乙醇、非必需氨基酸、谷氨酰胺等^[1-2]。由于血清中所含的各种生长因子对于 hES 的自我更新具有决定性作用, hES 的培养受血清的质量和批号影响很大, 因此现在一般采用无血清培养。在无血清培养体系中, 一般使用 Knockout DMEM 取代高糖 DMEM。因为 Knockout DMEM 的渗透压更接近正常的胚胎组织, 对 ES 的生长比一般的 DMEM 或 DMEM/F12 好; 同时用成分明确的 Knockout SR (serum replacement) 取代胎牛血清, 不仅避免了胎牛血清带来的种种问题, 而且为诱导分化研究带来了许多便利^[8]。

2.2.3 细胞因子: 在无血清培养体系中需添加细胞因子, 如白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 和人碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 至今没有单独利用血清替代物成功建系的报道。LIF 能抑制鼠胚胎干细胞的分化, 但不足以抑制体外培养的 hES 分化。有研究认为 hES 在没有饲养层的情况下, 无论加或不加 LIF 都会自发分化, 即使有饲养层, LIF 也不能防止 hES 在高密度生长时的分化。此外, 有人报道猴 ES 细胞在有饲养层细胞共同培养的条件下, 不加 LIF 仍保持生长和不分化状态^[9]。这些结果提示 LIF 不能抑制 hES 的分化, 但研究人员在培养 hES 的早期仍使用 LIF, 在其后的传代培养中不加 LIF。hES 在有血清的培养系统中可不加 bFGF 因子, 但在无血清培养系统中若没有 bFGF, 则细胞分化, 且 bFGF 能增加 hES 建系初期阶段的细胞克隆形成率, 维持 hES 的生长和不分化状态。

2.2.4 饲养层细胞: 饲养层细胞是指与 hES 细胞共培养时, 能促进其增殖并抑制其自发分化的细胞。经丝裂霉素 C 或 γ 射线处理的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 是培养 hES 细胞的最早且最常用的饲养层细胞。MEF 细胞取自孕 12.5~13.5 dpc 的胚胎小鼠, 通常在体外培养至第 2 或 3 代。但 MEF 细胞含有丰富的鼠源性唾液酸蛋白-乙醇酰甘露糖胺丙酮酸 (N-glyeolylneuraminic acid, Neu5Gc), 相关研究证实, 目前培养在 MEF 上

的 hES 细胞, 以及它们分化形成的类胚体都带有鼠源性 Neu5Gc^[10]。在正常人群中, 大多数人血液中都含有抗 Neu5Gc 的抗体。如果将这种含有 Neu5Gc 的细胞注入人体内, 人体所含有的抗 Neu5Gc 抗体就会引起这些外源细胞的死亡。近来发现, 用分离培养的流产人胚胎成纤维细胞、新生儿或成人包皮皮肤细胞、人输卵管上皮细胞、人子宫内膜细胞等经丝裂霉素 C 处理后, 均可作为 hES 细胞的饲养层^[11-13]; 另外, 来源于活检的成人皮肤细胞和骨髓间充质细胞也可作为 hES 细胞的饲养层细胞^[14]。通过比较研究, 发现上述人源性饲养层细胞完全可替代 MEF, hES 传代后仍保持胚胎干细胞的各种生物学特征。而且人胚胎成纤维细胞连续传代 16 代, 包皮皮肤细胞连续培养超过 42 代依然生长旺盛, 经丝裂霉素 C 处理后可存活 3~4 周, 不仅大大降低了饲养层制备的工作量, 而且杜绝了异种病原生物物的污染问题。近期有学者报道用人源细胞饲养层成功建系, 提示人源细胞饲养层不仅可用于 hES 细胞的传代扩增培养, 也可用于 hES 的原代培养和建系^[13,15]。

2.2.5 非饲养层培养体系: 尽管利用饲养层细胞进行 hES 建系和培养最为简便经济, 但其局限性仍不容忽视。一方面, 饲养层细胞存在异源蛋白的污染, 培养的 hES 达不到临床应用的标准; 另一方面饲养层细胞的存在和 hES 之间相互复杂的作用会掩盖外源因子对 hES 的作用, 对其体外增殖和分化发育的生化特性及分子生物学机制变得复杂。去饲养层细胞培养的 hES 细胞与在饲养层上培养的 hES 细胞一样高表达 hES 所有的全能性分子标记, 仍具有正常的核型, 且保持有向三个胚层 hES 分化的能力。

较早的非饲养层培养体系通常使用条件培养液 (CM), 并用基质胶、层粘连蛋白或纤连蛋白等包被 hES 培养皿^[16], 虽然这种体系消除了 hES 细胞与饲养层细胞的直接接触, 但培养的 hES 体系中仍包含动物源性的成分, 同时存在培养成功率低和传代后细胞核型不稳定等现象, 限制了 hES 细胞大规模扩增和临床应用。最近发展的成分明确的 hES 培养体系为临床标准的 hES 细胞生产带来突破, 该培养体系是在无血清的培养液中添加各种能促进 hES 细胞自我

更新的蛋白质和生长因子, Jean 等报道了用成分明确的培养体系可使培养的 hES 细胞保持理想的未分化状态并维持 ES 细胞的各种生物学特征, 该体系的 HESCO 培养液含纯化的人血清白蛋白、胰岛素、胆固醇、增殖诱导配体/B 细胞激活 TNF 因子 (a proliferation-inducing ligand/B cell-activating factor belonging to TNF, April/BAFF)、Wnt3a 蛋白和 bFGF^[17]。Ludwig 等也报道了用成分明确的 TeSR1 培养液成功分离到 hES 细胞并建系^[18]。成分明确的培养体系是目前最为优化的接近临床应用标准的培养体系, 但其不足之处在于添加的各种培养物都是体外纯化的, 价格十分昂贵, 因此 hES 细胞的培养系统仍有待进一步的优化。

3 hES 细胞系的特征及鉴定

目前关于 hES 细胞系的鉴定已有一套公认的标准, 可从形态学、细胞学和分子生物学等方面的特征进行鉴定^[6,8-9]。未分化的 hES 细胞具有以下特点:

3.1 形态学特点 人胚胎干细胞与小鼠胚胎干细胞外观相似。在体外培养时均呈集落状生长, 边界明显, 细胞体积小, 核大而明显, 有一个或多个核仁, 核质比例高。但 hES 与小鼠 ES 相比, 集落较扁平, 集落内部的细胞结构相对松散, 细胞界限隐约可见。

3.2 细胞学特征 hES 细胞具有在体外无限增殖, 并保持未分化状态的自我更新能力和多向分化潜能, 在体外和体内均能分化成三胚层(外、中和内胚层)来源的细胞类型。在体外经过长期培养和重新亚克隆的 hES 细胞系, 也能保持其多方向分化潜能。将 hES 细胞注射到 SCID 小鼠体内产生畸胎瘤是鉴定 hES 体内分化能力的一种方法, 每个畸胎瘤都包括内胚层、中胚层和外胚层三个胚层的不同组织和细胞类型。hES 在无饲养层的条件下悬浮培养形成类胚体 (embryoid bodies, EB), 是体外鉴定 hES 分化能力的另一种方法。EB 中也含有来自三个胚层的细胞, 但其种类没有畸胎瘤内的细胞多。hES 在体外经过长期传代后仍应具有正常的二倍体核型, 这对于将来是否能用于临床非常重要, 因此在培养过程中需经常鉴定 hES 的核型,

以确定 hES 是否发生了染色体畸变。

3.3 分子生物学特征 hES 细胞表达以下所有分子标志物: ①碱性磷酸酶 (AKP): AKP 活性常被用来鉴定 hES 细胞分化与否的重要标志, 未分化的人胚胎干细胞 AKP 呈阳性, 已分化的细胞呈弱阳性或阴性。②胚胎干细胞表面标志物: 阶段特异性胚胎表面抗原在胚胎发育早期受到严密的调节^[19], 胚胎干细胞表面标志物是鉴定 hES 的重要工具。未分化的 hES 表达干细胞表面标志物 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81, 当细胞分化时这些抗原的表达量显著下降。未分化的 hES 不表达 SSEA-1, 分化时 SSEA-1 表达量略有提高。③端粒酶: 体外培养的 hES 高表达端粒酶。端粒酶是一种逆转录酶, 在维持染色体长度及决定细胞寿命方面有重要作用。hES 中高表达端粒酶提示这种细胞比体细胞的寿命长, 具有保持体外未分化状态培养的永久性。④转录因子 OCT-4: OCT-4 属于 POU 家族转录因子, 对全能细胞的发育很重要, 仅在卵母细胞、分裂早期胚胎、内细胞团、原始外胚层和原始生殖细胞中表达, OCT-4 阳性表达也是 hES 细胞保持其全能性的标志之一。

3.4 其它特征 hES 细胞与已分化体细胞不同的其它特征主要有: ①缺乏细胞周期中 G1 期的限制点, 即 hES 细胞不需任何外界刺激来启动 DNA 的复制, 大部分时间都处于细胞周期的 S 期, 在此期进行 DNA 的合成; ②不存在 X 染色体的失活; ③具有克隆能力, 即一个单一的 hES 细胞能产生一群具有相同遗传特性的克隆。

由于 hES 在体外生长较慢, 应在维持细胞稳定扩增的同时选择适当的次序对干细胞进行逐步鉴定, 一般先检查碱性磷酸酶和核型, 然后鉴定干细胞的表面标志物, 当 hES 细胞达到一定数量后再鉴定干细胞的体外体内发育全能性, 每种鉴定都要重复多次。

质量低下的胚胎尤其是单个卵裂球的成功建系, 不仅缓解了伦理的争议, 同时开阔了干细胞建系的材料来源; hES 细胞培养条件的优化, 使人胚胎干细胞的建系效率有所提高; 人源饲养层细胞的应用和无饲养层培养体系的建立, 为生产临床应用安全标准的 hES 细胞奠定了基

础。但是在不明确人早期胚胎发生的机理,相关基因的开放、表达、调控及信号传导路径的情况下,建立hES细胞系仍有很大的偶然性。只有对干细胞基础研究不断深入,真正解决建系过程中的关键问题,才能为将来大规模建立并生产符合临床应用标准的hES细胞系打开希望之门。

References:

- [1] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.
- [2] HEINS N, ENGLUND M C, SJOBOM C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 367-376.
- [3] STOJKOVIC M, LAKO M, STOJKOVIC P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 790-797.
- [4] BONGSO A, FONG C Y, NG S C, et al. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9: 2110-2117.
- [5] BGIVANLOU A H, GAGE F H, JAENISCH R, et al. Stem cells setting standards for human embryonic stem cells [J]. *Science*, 2003, 300: 913-916.
- [6] MITALIPOVA M, CALHOUN J, SHIN S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos [J]. *Stem Cells*, 2003, 21: 1521-1526.
- [7] BECKER S, CHUNG Y. Embryonic stem cells from single blastomeres [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 418: 108-116.
- [8] REUBINOFF B E, PERA M F, FONG C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro* [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 399-404.
- [9] THOMSON J A, KALISHMAN J, GOLOS T G, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7844-7848.
- [10] MARTIN M J, MUOTRI A, GAGE F, et al. Human embryonic stem cells express all immunogenic nonhuman sialic acid [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 228-232.
- [11] HOWATTAO, MIKKOLA M, GERTOW K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18: 404-409.
- [12] AMIT M, MARGULETS V, SEGEV H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 2150-2156.
- [13] JUNG B L, JEOUNG E L, JONG H P, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72: 42-49.
- [14] CHENG L, HAMMOND H, YE Z, et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture [J]. *Stem Cells*, 2003, 21: 131-142.
- [15] STOJKOVIC P, LAKO M, STEWART R, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 306-314.
- [16] XU C H, INOKUMA M S, DENHAZN J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 971-974.
- [17] LU J, HOU R H, CARMEN J B, et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(15): 5688-5693.
- [18] LUDWIG T E, LEVENSTEIN M E, JONES J M, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 185-187.
- [19] HENDERSON J K, DRAPER J S, BAILLIE H S, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens [J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 329-337.