

胚胎干细胞的诱导分化研究

杨印祥 刘大庆 裴雪涛*

(军事医学科学院输血医学研究所, 北京 100850)

摘要 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是指由胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞经体外抑制培养而筛选得到的细胞, 具有发育上的全能性。近两年在 ES 细胞诱导分化方面的研究取得了一些突破性的进展, 其中, ES 细胞向生殖细胞分化(2003 年)以及首次克隆成功人 ES 细胞(2004 年)先后被评为《科学》杂志当年度十大科学进展之一; 另外, 维持 ES 细胞不分化状态的关键基因(*Nanog*)及相关化合物(BIO)的发现, 其自身分化状态调控机理的深入研究, 以及向不同方向诱导分化和应用等的研究成果, 同样受人关注。

关键词 胚胎干细胞 诱导 分化

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是指由胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞经体外抑制培养, 然后筛选得到的具有发育上全能性的细胞。近两年, ES 细胞领域的研究取得了很多重要的进展, 尤其在其分化诱导以及调控方面, 更是屡有引人注目的成果出现, 下面就相关的研究情况做一文献回顾。

1 ES 细胞向不同类型细胞分化

1.1 ES 细胞分化为生殖细胞

2003 年, 《科学》杂志上报道了小鼠ES细胞分化为卵母细胞的现象^[1]。研究人员将在全能干细胞中特异性表达的Oct-4 基因和绿色荧光蛋白GFP基因构建成融合基因, 并将该融合基因转染入小鼠的ES 细胞中, 发现培养小鼠的ES 细胞可以分化成为卵母细

胞; 随后又有实验证实小鼠的ES 细胞同样能在一定的条件诱导下分化成精原细胞^[2]。将在分化的生殖细胞中特异性表达的*Mvh*基因转染入小鼠的ES 细胞中, 并与能持续表达BMP4 因子活性(BMP4 在胚胎正常发育过程中对精子细胞的形成能起到促进作用)的细胞共培养, 结果表明小鼠的ES 细胞来源的原始生殖细胞可分化成为精原细胞。这两项具有里程碑意义的研究成果, 不仅证明了ES 细胞可以向生殖细胞分化, 还将为解决不孕不育、开展生殖医学的基础研究带来新的希望, 并完善治疗性克隆技术和为转基因动物的研究提供理论基础。

1.2 ES 细胞分化为造血细胞

ES 细胞在体外可分化产生红细胞、髓细胞和淋巴细胞等造血系统细胞。Li 等人^[3]用小鼠S17 基质细

2005-03-24 收稿, 2005-08-12 收修改稿

* 联系人, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

胞补充细胞因子的培养系统研究了恒河猴的ES细胞向造血细胞分化的情况,发现可产生造血干细胞样克隆,其结构类似于胚胎干细胞期的血岛;当向培养体系中加入BMP4之后,发现初始造血克隆的数目增加了15倍,具有克隆形成力的可扩增前体造血细胞克隆增加了18倍;免疫荧光分析表明分化后的造血样细胞多数CD34表达阳性,具有未分化细胞的形态特征,这表明BMP4能刺激ES细胞中造血相关基因的表达,同时也能显著提高分化的ES细胞克隆中造血细胞克隆的数量。Nakayama等人^[4]发现VEGF(vascular endothelial growth factor)也具有提高ES细胞体外分化为CD34+细胞比例的能力。

Tian等人^[5]对人ES细胞向造血细胞分化做了研究:不论是用和S17细胞共培养方法还是形成拟胚体(embryonic bodies, EBs)的方法,都能够诱导ES细胞分化为造血细胞;但是,当去掉培养基中的血清时,向造血细胞的分化便停止。他们发现, S17细胞共培养方法诱导ESC分化为造血细胞的过程中,向无血清培养基中添加SCF(stem cell factor), TPO(thrombopoietin)和Flt3L(Flt-3 ligand)能够使ES细胞分化为造血细胞,但是这三种生长因子不能诱导无血清培养体系中EBs向造血细胞分化,只能在添加BMP4和VEGF的情况下才能够促进向造血细胞分化。

1.3 ES细胞分化为神经细胞

诱导ES细胞分化为神经细胞的方法主要有胚体分化、细胞因子诱导和基质细胞共培养等。Dinsmore等人^[6]发现RA(retinoic acid)对诱导ES细胞分化为神经细胞有很高的效率。不论体内还是体外, RA单独作用可诱导ES细胞分化为神经细胞,经RA诱导得到的神经细胞移植入吡啶-2,3-二羧酸损伤纹状体的大鼠(一种亨廷顿病的大鼠模型)后使得这些大鼠能够生存到6周。Brustle等人^[7]将小鼠ES细胞置于仅含有FGF-2的培养基中增殖,然后加入EGF,最后在含FGF-2和PDGF的培养基中培养,当撤去生长因子后,这些细胞最终只向着少突神经胶质细胞和星形神经胶质细胞分化。Zhang等人^[8]将人ES细胞培养至EBs后,用神经细胞培养基(常规用于培养神经细胞的培养基)培养,分离出部分分化的拟胚体,在含bFGF的培养

基中继续培养,最终获得了96%表达神经元标志的细胞。植入新生小鼠脑之后,这些细胞能够迁移到部分脑区域并成熟为成熟的神经元以及神经胶质细胞。

1.4 ES细胞分化为肝细胞

美国Geron公司的研究人员发现了使人ES细胞分化为肝细胞的方法^[9]。分化的细胞和早期的肝细胞有相似的形态学特征,70%~80%的细胞表达白蛋白,抗胰蛋白酶α1,细胞角蛋白8和细胞角蛋白18等肝细胞特异标志,重要的是,分化的细胞能够表达在大多数药物代谢中发挥作用的特定阶段1和阶段2药物代谢酶。科学家认为这将有益于人类肝细胞研究和移植。

Shirahashi等人^[10]改进了体外ES细胞分化为肝细胞的培养条件。他们尝试了多种培养基、生长因子以及诱导因子的组合,最后发现用IMEM加上20%的胎牛血清,以及人胰岛素、地塞米松和I型胶原最有利于鼠的ES细胞分化为肝细胞。小鼠ES细胞用上述培养基处理后,前白蛋白基因表达量为20%,白蛋白合成率为7%,和小鼠肝内表达情况相似。这种培养条件对人ES细胞也有同样的诱导效果。

此外,Vittet等人^[11]发现EBs发育过程中会自发向内皮细胞分化。RT-PCR和免疫荧光分析都表明ES来源的EBs中有内皮细胞特异分子标志的表达,包括血小板内皮细胞黏附分子(PECAM), Flk-1, tie-1, tie-2,血管内皮钙黏蛋白和MECA-32等,而且免疫荧光分析表明这些特异性分子是在内皮细胞分化的不同阶段表达。

2 ES细胞诱导分化的调控研究

自我更新和全能的分化能力是ES细胞最重要的生物学特征,且受精密复杂的信号传导机制的调控。对这方面的深入研究是ES细胞研究领域取得突破性进展的必由之路。近年来,学者们在这方面投入了大量的精力进行研究,Nanog基因的研究则是其中代表性的成果^[12,13]。将Nanog基因植入小鼠ES细胞,后者能够保持未分化状态;而且Nanog基因只在ES细胞中发挥作用,在其他干细胞中则处于休眠状态。这提示一旦能够找出某种方法激活该基因,成体干细胞也

许就能再次成为ES细胞。相关的研究还有：科学家从海螺体内提取了一种名为BIO的化合物，该化合物能有效地维持人ES细胞的未分化状态。研究人员认为BIO可能是激活了ES细胞中Wnt介导的信号传导通道，而这种信号则已经被证实参与了细胞的发育过程^[14]。这一研究发现有助于科学家控制ES细胞的分化时机，为ES细胞的临床应用提供了理论依据。

另有两项研究结果引起了人们的极大兴趣：一是研究表明ES细胞能够分泌出特殊的“拯救因子”来逆转小鼠的致死性的先天缺陷^[15]。在这项研究中，研究人员将ES细胞直接注射到基因敲除的怀孕小鼠的囊胚中。已知这些胚胎必定会出现严重的心脏缺陷，并可使小鼠在子宫中死亡，但出乎意料的是有一半的新生小鼠有一个健康的心脏。尽管很少有干细胞真正长成健康的心脏组织，但研究人员发现干细胞能够分泌出特殊的分子，这些分子能发出信号给临近的心脏细胞从而修复先天缺陷器官的功能。另一个研究成果表明人类ES细胞具有独特的免疫“豁免”特权^[16]。实验证实在小鼠活体内移植的未分化人类ES细胞不会引起移植排斥的特定免疫反应，这项研究对人类ES细胞移植治疗具有重要意义。

进一步的深入研究则显示：具有重要抑癌作用的p53蛋白能用于维持ES细胞的遗传稳定性^[17]。研究发现，小鼠ES细胞中的由于DNA损伤而活化的p53蛋白直接抑制了*Nanog*基因的表达，而后者的抑制促使ES细胞分化成其他类型的细胞，这样ES细胞就不会传递DNA损伤给子代ES细胞；P53还有助于已经分化成特定细胞类型的ES细胞中DNA损伤的消除，从而避免了细胞的癌变。这些发现为研究有关人类ES细胞如何维持遗传稳定性奠定了理论基础。

3 ES细胞诱导分化及临床应用

目前在人ES细胞体外培养过程中，常常采用小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层。人ES细胞通过直接或间接与小鼠细胞接触，可能感染小鼠细胞中存在的病原体，造成鼠源性感染，这将是人类ES细胞临床应用中的一大障碍。这样的猜测也被最新的研究成果证实^[18]。研究人员发现，目前所有的人类ES细胞系都被一种人体内不存在的分子N-羟乙酰神经氨酸

(Neu5Gc)所污染。Neu5Gc通常存在于其他动物细胞的表面，人类自身是不能合成的。研究显示人类具有Neu5Gc的抗体，被Neu5Gc污染的干细胞如果在医学上运用，便很容易被人类免疫系统识别和攻击，从而威胁到ES细胞的医学应用前景。其实，在此之前已经有研究发现人类骨髓基质细胞^[19]和人成纤维细胞^[20]也能作为人ES细胞的饲养层细胞。在这样的条件下进行8个月的培养后，人类ES细胞依然保持了原来的表型和功能，这说明人骨髓基质细胞及人成纤维细胞可以完全代替小鼠饲养层细胞来维持人ES细胞的生长。

基因工程的原理和实验技术与ES细胞的分化诱导相结合，也是该领域的研究方向之一。有报道，可以利用同源重组的方法对人ES细胞进行改造^[21]。研究人员利用基因敲除的方法将一段同源的DNA替换了人ES细胞中的一个与Lesch-Nyhan综合症有关的基因，从而纠正了由于该基因缺陷导致的人体自伤行为的发生。为有效控制由于ES细胞过度增殖而导致的严重问题(如恶性肿瘤)的发生，有学者将HSV-tk“自杀基因”系统导入人ES细胞中，使其表达HSV-tk蛋白活性，并获得了对细胞毒药物更昔洛韦的敏感性^[22]。这样，HSV-tk阳性的ES细胞既维持了其自身的分化能力，又能在更昔洛韦的作用下，使其致瘤性受到抑制，从而提高了ES细胞应用的安全性。将ES细胞的基础研究成果付诸于应用，是ES细胞研究的最终目的，ES细胞发育上的全能性决定了它巨大的应用前景。理论上讲，ES细胞具有分化成机体所有类型组织细胞的潜能，人们可以利用不同的培养条件将ES细胞定向诱导分化成不同类型的细胞以作为细胞移植、组织替代，甚至器官克隆的细胞供体，为将来治疗人类诸多难治性疾病提供细胞来源。已经有很多的研究证实，ES细胞在一定的诱导条件下可以向软骨细胞^[23]、皮肤细胞^[24]、成骨细胞^[25]和造血细胞^[26]等方向分化。在临床前期的研究中，研究人员用ES细胞分化成生成神经细胞，然后把神经细胞植入患有帕金森氏症的鼠^[27]及猴子^[28]大脑内，从而明显消除了实验动物的帕金森症的症状。研究人员认为，利用人类ES细胞生成神经细胞之后，治疗帕金森氏症患者应该可以收到同样的效果。另外，ES细胞在脊

髓炎、肌萎缩侧索硬化症等脊髓损伤^[29]以及糖尿病^[30]和心血管疾病^[31,32]等方面治疗研究中，也同样显示了极为诱人的应用前景。

ES细胞的研究任何时候都是一个充满挑战和倍受争议的课题，尤其是关于人类ES细胞的研究，由于受到伦理和法律方面的制约，以美国为代表的科技水平发达国家一直持反对态度。即便如此，世界各国已经逐渐认识到ES细胞研究的重大意义，并采取积极稳妥和切实可行的措施。相信不久的将来，在揭示生命现象的奥秘及疾病的防治方面，包括人类ES细胞在内的相关研究势必会取得巨大的进展，并最终造福于人类健康事业。

参 考 文 献

- 1 Hubner K, Fuhrmann G, Christenson L K, Christenson, Kehler J, Reinbold R, Fuente R D L, Wood J, Strauss III J F, Boiani M, Schöler H R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003, 300(23): 1251~1256 [\[DOI\]](#)
- 2 Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11457~11462 [\[DOI\]](#)
- 3 Li F, Lu S, Vida L, Thomson J A, Honig G R. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells *in vitro*. *Blood*, 2001, 98(2): 335~342 [\[DOI\]](#)
- 4 Nakayama N, Fang I, Elliott G. Natural killer and B-Lymphoid potential in CD34⁺ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presence of vascular endothelial growth factor. *Blood*, 1998, 91(7): 2283~2295
- 5 Tian X H, Morris J K, Linehan J L, Kaufman D S. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*, 2004, 32(10): 1000~1009 [\[DOI\]](#)
- 6 Dinsmore J, Ratliff J, Deacon T, Pakzaban P, Jacoby D, Galpern W, Isacson O. Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant*, 1996, 5(2): 131~143 [\[DOI\]](#)
- 7 Brustle O, Jones K N, Learish R D, Karram K, Choudhary K, Wiestler O D, Duncan I D, McKay R D G. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science*, 1999, 285: 754~756 [\[DOI\]](#)
- 8 Zhang S C, Wernig M, Duncan I D, Brustle O, Thomson J A. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12): 1129~1133 [\[DOI\]](#)
- 9 Rambhatla L, Chiu C P, Kundu P, Peng Y, Carpenter M K. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*, 2003, 12(1): 1~11
- 10 Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern M A. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*, 2004, 13(3): 197~211
- 11 Vittet D, Prandini M H, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate *in vitro* to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*, 1996, 88(9): 3424~3431
- 12 Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113(5): 643~655 [\[DOI\]](#)
- 13 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, 113(5): 631~642 [\[DOI\]](#)
- 14 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou A H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004, 10(1): 55~63 [\[DOI\]](#)
- 15 Fraidenraich D, Stillwell E, Romero E, Wilkes D, Manova K, Basson C T, Benezra R. Rescue of cardiac defects in id knockout embryos by injection of embryonic stem cells. *Science*, 2004, 306(5694): 247~252 [\[DOI\]](#)
- 16 Li L, Baroja M L, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J, Bhatia M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 448~456 [\[DOI\]](#)
- 17 Lin T X, Chao C, Saito S, Mazur S J, Murphy M E, Appella E, Xu Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(2): 165~171 [\[DOI\]](#)
- 18 Martin M J, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 2005, 11(2): 228~232 [\[DOI\]](#)
- 19 Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X C, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*, 2003, 21(2): 131~142 [\[DOI\]](#)
- 20 Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg A M, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M, Ahrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblast as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, 2003, 18(7): 1404~1409 [\[DOI\]](#)
- 21 Zwaka T P, Thomson J A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 319~321 [\[DOI\]](#)
- 22 Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem Cells*, 2003, 21(3): 257~265 [\[DOI\]](#)

- 23 Sui Y, Clarke T, Singh K J. Limb bud progenitor cells induce differentiation of pluripotent embryonic stem cells into chondrogenic lineage. *Differentiation*, 2003, 71(9-10): 578~585 [[DOI](#)]
- 24 Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, Spadafora A, Hinnrasky J, Ortonne J P, Dani C, Aberdam D. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 849~853 [[DOI](#)]
- 25 Sottile V, Thomson A, McWhir J. *In vitro* osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(2): 149~155 [[DOI](#)]
- 26 de Pooter R F, Cho S K, Carlyle J R, Zuniga-Pflucker J C. *In vitro* generation of T lymphocytes from embryonic stem cell-derived prehematopoietic progenitors. *Blood*, 2003, 102(5): 1649~1653 [[DOI](#)]
- 27 Barberi T, Klivenyi P, Calingasan N Y, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier A L, Bruses J, Rubio M E, Topf N, Tabar V, Harrison N L, Beal M F, Moore M A, Studer L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1200~1207 [[DOI](#)]
- 28 Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*, 2005, 115: 102~109 [[DOI](#)]
- 29 Kerr D A, Llado J, Shambrott M J, Maragakis N J, Irani D N, Crawford T O, Krishnan C, Dike S, Gearhart J D, Rothstein J D. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci*, 2003, 23(12): 5131~5140
- 30 Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiya M, Qi M, Nakamura N, Yoshi-kawa T, Sumi S, Inoue K. *In vivo* functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas*, 2003, 27(2): E34~E41 [[DOI](#)]
- 31 Johkura K, Cui L, Suzuki A, Teng R, Kamiyoshi A, Okamura S, Kubota S, Zhao X, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, Tagawa Y, Sasaki K. Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2): 435~443 [[DOI](#)]
- 32 Kaufman D S, Lewis R L, Hanson E T, Auerbach R, Plendl J, Thomson J A. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood*, 2004, 103(4): 1325~1332 [[DOI](#)]