

干细胞及其应用*

李朝霞

(盐城工学院 海洋工程系,江苏 盐城 224003)

摘 要:干细胞是当今细胞生物学乃至整个生命科学的主要热点之一,从干细胞的概念、生物学特性、分类等方面对干细胞进行了阐述,同时也对干细胞在移植治疗、克隆技术及转基因技术等方面的应用作了综述。

关键词:干细胞;全能干细胞;多能干细胞;应用

中图分类号:Q254

文献标识码:A

文章编号:1671-532X(2003)01-0057-05

大多数的生物学家和医学家认为,干细胞(stem cell, SC)是一种具有多种分化潜能,自我更新和高度增殖能力的细胞,能产生出与自己完全相同的子细胞,同时还能分化成为祖细胞。通俗地说,干细胞是一种具有多分化潜能和自我复制功能的早期未分化细胞^[1-3],它能在人体内分化成任何细胞类型。干细胞的研究是 20 世纪 90 年代以来医学和生物学领域中最引人注目的热点之一。在美国《Science》杂志评选出的 1999 年度 10 大科学进展中,干细胞排名第一。SC 作为一类既有自我更新能力、又有多分化潜能的细胞,具有非常重要的理论研究意义和临床应用价值^[4]。这些成果一方面揭示了许多有关细胞生长和发育的基础理论难题;另一方面,可望将其用于创伤修复、神经再生和抗衰老等临床医学研究。另外,利用 SC 再造组织和器官,治疗神经系统疾病,可使应用生物学进入一个崭新的领域^[5]。

1 干细胞的生物学特性

1.1 多能性或全能性

干细胞具有分化为多种细胞类型的潜能,但是不同干细胞的分化潜能有所不同。如胚胎干细胞系细胞(embryonic stem cells, ES)具有全能性(totipotent),即可分化发育成构成机体任何一部分组织器官的能力^[6]。成体干细胞具有多能性(multipotent),即到了个体发育的一定阶段甚至成

体,仍有一部分细胞分化,负责组织的更新和修复。神经干细胞的研究不但说明了成年干细胞具有多能性,而且说明其多向分化的潜能与其所处的微环境有绝对的关系。综上所述,全能性或多能性是干细胞的关键特性。

1.2 自我更新能力

干细胞一旦形成,在机体终生都具有自我更新能力,这完全不同于有限自我更新能力的许多类型的祖细胞。干细胞通过不均一分裂进行自我更新和产生分化祖细胞。成年机体干细胞能反复分化充满组织^[7],这对维持机体组织器官的稳定性有很重要的意义。

1.3 高度增殖能力

高度增殖是干细胞的生物学特性之一。在体外扩增干细胞是干细胞研究及应用的前提和关键,干细胞虽具有多能性,但其数量不多,只有通过体外扩增,才会得到大量的干细胞,进而对研究和应用才具有意义。干细胞在体内,高度扩增具有重大意义,如造血干细胞通过高速扩增,可补充由于细胞正常衰老死亡而丧失的血细胞。因此干细胞高度扩增不但对干细胞的研究和应用有着重要的作用,而且对机体正常功能的维持也起着重要的作用。

* 收稿日期:2002-12-20

作者简介:李朝霞(1972-),女,湖北孝感市人,盐城工学院讲师,南京工业大学在读硕士研究生。

2 干细胞的分类

2.1 全能干细胞(胚胎干细胞)

它是来源于哺乳动物早期胚胎的内细胞团(Inner Cell Mass, ICM)中的一种二倍体细胞,一般可从植入子宫内膜前的囊胚中分离出来。这种细胞是能在体外培养的一种高度未分化细胞,具有全能性或多向性分化潜能。小鼠胚胎干细胞是最早被分离的^[8],也是研究最多的。Thomson^[9]于1995年从恒河猴胚囊中分离、克隆建立了第1个灵长类动物的胚胎干细胞系,1998年,他又利用临床上自愿捐献的体外受精的胚胎内细胞团建立了人胚胎干细胞系。同年,我国中山医科大学李树浓教授的课题组成功地建立了人胚胎干细胞^[10]。胚胎干细胞系特别是人胚胎干细胞系的建立,在培养的细胞与个体之间架起了桥梁,成为个体发育研究、基因功能研究、转基因动物制备及组织工程研究等许多医学领域的重要种子细胞,为人类在实验室内制造出人体组织器官,揭示生命现象,并为疾病的治疗开辟了新的途径^[5]。

胚胎干细胞具有4个特点:①能大量繁殖并保持未分化状态;②在一定条件下能向内、中、外3个胚层组织和细胞分化;③具有全能性,易于进行基因改造操作;④能够形成嵌合体动物,从而成为联系细胞和个体之间的桥梁^[6,11]。

胚胎干细胞的建立与动物的克隆(Cloning)颇具相似之处。二者均通过体细胞核转移技术获得,即首先将人卵细胞脱核,然后将体细胞的细胞核转移到去核卵细胞中。该技术路线与动物克隆的程序基本相似,二者不同的是,克隆动物是将核转移卵细胞移植到子宫内,继而发育成胚胎,再娩出成熟的个体;而制备胚胎干细胞则是将核转移卵细胞置于体外培养体系中进行培养,待囊胚形成后取其内细胞团,再经过体外培养,最后制备成胚胎干细胞。这一过程的真正意义在于获得携带有某一生物个体特异性遗传物质的干细胞。因此,有人将前者称为生殖发生性克隆(Reproductive Cloning),将后者称为治疗性克隆(Therapeutic Cloning)。胚胎干细胞的建立除上述途径外,还可通过其它途径来进行:①利用其它哺乳类动物的卵细胞作为核受体进行体细胞核转移研究。如采用母牛的卵细胞进行人类体细胞实验。但目前还难以对这一技术的成功性加以评价。②利用来源于胚胎细胞的胚胎干细胞的细胞架与成人体细胞

核进行杂交,以使该体细胞的细胞核与胚胎干细胞的胞浆融合在一起,然后通过胚胎干细胞的胞浆作用对体细胞的核内遗传信号进行重新编程,从而实现体细胞的全能化或多能化。但这种技术对转移核重新启动其基因程序的程度及范围尚不能确定。

2.2 多能干细胞(成体干细胞)

这些细胞就是一般所指的特定组织的干细胞(例如血液、肠道粘膜上皮、皮肤表皮等),例如造血干细胞、神经组织干细胞、表皮干细胞等。这类细胞不能产生完整的个体,但仍可向特定组织分化。例如造血干细胞分化为血细胞,肝脏干细胞分化为肝细胞。这类细胞有时还可向其它组织分化,称之为横向分化^[11~14]。例如肌肉细胞在一定条件下可以成为有增殖能力的骨髓细胞,血液前体细胞可以变为肌肉细胞,甚至长出肝细胞或脑细胞,故称其为多能干细胞。随着细胞生物学的研究进展,人们发现成体干细胞横向分化具有相当的普遍性。预测横向分化机制一旦研究明了,有望利用病人自身健康组织的干细胞诱导分化成病损组织的功能细胞来治疗疾病。这样既解决了免疫排斥问题,又避免了胚胎细胞来源不足和社会伦理问题,为临床治疗奠定良好的基础。

2.2.1 造血干细胞(HSC)

造血干细胞(Hematopoietic Stem Cell, HSC)在造血系统中发挥着至关重要的作用,对其深入研究的实质就是对血液系统的发生、发育及其调控机制的深入解析。由于血细胞具有分布广泛、来源丰富和体外分离培养技术也较为成熟等优势, HSC已成为目前人类SC研究中最活跃专题。

骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)是临床治疗急性白血病、恶性淋巴瘤和重症贫血等血液系统疾病的重要手段,其技术核心就是骨髓中的HSC。经大剂量造血生长因子(Hematopoietic growth factor, HGF)集落刺激因子(colony stimulating factors, CSF)及白介素3(interleukin-3, IL-3)等有效动员的外周血HSC移植,也已广泛开展。研究表明,经有效动员后的外周血中HSCs的含量不低于骨髓,并具有相同的增殖与活化能力。与骨髓相比较,外周血中含有更多的CD34⁺细胞、髓系和巨核系的造血前体细胞(Committed progenitor Cell, CPS)。同时,在外周血中还含有较多的T细胞、单核细胞和自然杀伤细胞(natural killer Cell, NK)等造血辅助细胞。这些

细胞可分泌 IL-6、IL-8 及 G-CSF 等细胞因子,有效地促进造血的恢复,加速血液系统的重建。大量临床实践证实,外周血中 HSC 的移植可迅速、有效地恢复造血功能。由于脐血的免疫原性弱、增殖和自我更新能力强等特点,因此,其在 HSC 移植和转基因治疗研究等方面,均显示出良好的应用前景。目前,利用 CD34⁺ 等细胞表面标志物分选血细胞的技术业已十分成熟,同时,用于体外促增殖的各种细胞因子的成本也由于基因工程产业化而大幅度降低,因而可有效地解决脐血来源有限的问题。目前,已有许多发达国家成功地建立了脐血库^[12~15],并已经开展了 500 多例亲属和非亲属供体的脐血 HSC 移植,国内也正在加紧开展这方面的工作。

2.2.2 神经干细胞

对神经干细胞(Limbus Cornea Stem Cell)的研究,最早是从神经嵴干细胞(neural crest stem cell, NC-SC)开始的,现在又成功分离了 NSC。NSC 为外周神经干细胞(PNS-SC),既可发育为外周神经细胞、神经内分泌细胞和 Schwann 氏细胞,也能分化为色素细胞(pigmented cell)和平滑肌细胞等。NSC 一般是指存在于脑部的中枢神经干细胞(CNS-SC),其子代细胞能分化成为神经系统的大部分细胞。干细胞经不对称分裂产生 1 个祖细胞和另 1 个 SC。祖细胞只有有限的自我更新能力,并能自主分化产生成神经元细胞和成胶质细胞等,进而生成神经及神经胶质细胞。以往认为,中枢神经系统的神经元在出生前或出生后不久,就失去再生能力。但近年的一些研究表明,成年哺乳动物的脑组织仍然可不断产生新的神经元,成人脑组织中同样存在 NSC。因此,人们对神经系统再生的机制和神经系统疾病的治疗均有了新的认识。为保持神经多能干细胞在体外长期生长、分裂和增殖,目前多使用基因转移的方法,建立神经干细胞系,永生化的 NSC 具有较好的生物学特性,它们能自我复制并在体外大量增殖,在移植人体内后仍具有多向分化潜能,同时可被转染并稳定地表达外源基因。因此,具有广泛的应用前景,既可用于颅内神经细胞的移植,又可作为外源基因转移的载体,用于颅内肿瘤的基因治疗。目前,脑胶质瘤的基因治疗由于受到病毒载体的限制,在临床实验性治疗中常要在肿瘤周围多点注射,而 NSC 系统则能弥补病毒载体系统的许多不足,可望发展成为颅内肿瘤基因治疗中更为理

想的运载体系。

2.2.3 角膜缘干细胞

神经角膜缘干细胞(Nural Stem Cell)是分布于角膜缘基底上皮层的一类独特的细胞,血清、视黄酸和各种细胞因子,如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)、角质细胞生长因子(KGF)、IL-1 β 以及某些基质细胞等,对其增殖、分化均有一定的影响。深入探讨上述细胞再生的调控机制,有助于阐明先天性虹膜缺损、视网膜脱落和化学性眼烧伤等眼部疾病的病理学基础。目前,应用自体、异体角膜缘 SC 移植治疗严重的眼表疾病,已取得了显著成果,视网膜的移植研究也在进行中。

3 干细胞的应用及其展望

3.1 移植治疗

移植治疗目前已经成为治疗疾病的一个重要手段,如器官移植、细胞移植等。干细胞移植是一个尤其重要而意义重大的手段。从 20 世纪 80 年代起,造血干细胞移植已经成为治疗癌症、造血系统疾病、自身免疫系统疾病的重要手段。之后,外周血干细胞移植并辅以化疗及细胞因子 CG-CSF、GM-CSF 等,可使更多的干细胞进入外周血。1989 首例脐血治疗 Fanconi 贫血成功后,许多国家纷纷建立了规模不等的脐血血库。因脐血富含造血干/祖细胞、其免疫细胞的抗原性较弱、CTL 祖细胞较少、移植相关 GVHD 的发生相对骨髓的外周血少而轻,采集容易、对供者无任何伤害。故被认为是极具潜力的新造血干细胞的来源。神经干细胞的研究为神经系统疾病的治疗提供了广阔的应用前景。啮齿类中枢神经细胞系包括中枢神经干细胞已被用于许多鼠的疾病模型,如鼠遗传性神经退化症,包括脱髓鞘症、脑神经节苷脂沉积症和其它神经退化紊乱(包括多巴胺能神经,如肾上腺髓质、胚胎腹侧中脑和畸胎瘤组织的移植)治疗研究中。神经干细胞的临床价值已在治疗帕金森病中得到证明。

3.2 克隆动物及转基因动物的生产

自绵羊“多莉”问世至今,体细胞克隆动物多有成功的报道。但体细胞克隆动物有着无法克服的弊端,即成功率低和容易早衰,“多莉”羊在它存活第 5 个年头也终难逃一劫。而 Wakayama 等用长期传代(30 代以上)的小鼠 ES 细胞克隆出 31 只小鼠,14 只存活,可见存活率大大提高。因

此 ES 细胞克隆动物具有光明前景。

转基因动物是利用受精卵或 ES 细胞作为载体,通过注射目的基因,从而生产带有目的基因的动物。转基因 ES 细胞系将为大量同系转基因动物的生产奠定基础。应用于干细胞进行动物克隆,可以有效地提高稀有动物的繁殖和高效畜产品的生产,以及高效生物活性物质的生产。

3.3 转基因干细胞基因治疗

现有的基因治疗有 2 类:①转基因细胞治疗。②核酸治疗。前者常用的基因转移靶细胞多为淋巴细胞、成纤维细胞等。其缺陷为细胞存活时间有限,在治疗过程中需要反复输注,治疗繁琐。转基因干细胞技术解决了转基因细胞存活问题,成为转基因细胞治疗重要的方向。近年来,人类基因组测序为认识生命现象以及疾病发生的物质基础提供和建立了完整的信息库,DNA 芯片技术就是在此信息库基础上对疾病诊断的方法学革命。与此同时,“分子治疗”技术也倍受关注。但是,由于蛋白质分子量巨大难以进入细胞,只能作用于细胞表面分子而发生作用,而且基因治疗有依赖病毒序列作为基因载体的弊病,因此限制了“分子治疗”的应用。如何克服这些弊病,改进技术,是分子治疗领域的主要课题之一。干细胞生物工程正是改造“分子治疗”的。(1)干细胞具有自我扩增和分化功能,因此导入的“外源基因”可以有效地得以扩散。(2)干细胞可以在体外进行操作,对基因的改造和修饰可以在体外完成并经筛选后再导入体内,避免由于基因插入而导致的细胞失常。(3)干细胞是人体细胞,作为载体其毒性最小,而且作为生命的最小单元,是导入组织的最佳形式。

3.4 ES 细胞为发育生物学研究的理想体外模型

ES 细胞具有全能性和无限增殖能力,并能在体外培养。因此,可以作为微环境改变对细胞分化影响的理想研究材料。随着现代生物技术的发展,研究不同生长调节因子在 ES 细胞分化中的作用,已成为可能。尤其是基因芯片技术的完善,通过 mRNA 差异显示,为 ES 细胞分化和不同分化阶段细胞的基因转录和表达的研究奠定基础,成为揭示发育和分化的分子机制的重要手段。

3.5 技术性问题

首先,临床上应用胚胎干细胞有危险性。例如小鼠胚胎干细胞注入成年鼠后,会长成畸胎瘤。还没有证据证明,人类胚胎干细胞不具有同样的致肿瘤性。其次,至今干细胞研究领域还有许多

问题需要回答。例如:人类胚胎干细胞是否可以被强制沿着人们需要的某一途径分化?是否能使培养基里所有的胚胎干细胞都同时向这个方向分化?如何把胚胎干细胞转化为特定的功能细胞(定向诱导)?如何把这一种组织的成体干细胞转化为另一种组织的功能细胞(横向分化)?如何使成体干细胞在体外进行非分化扩增?用哪些标记物、用什么方法可以检出所需要的细胞类型?什么是中间细胞类型及如何定义?等等。回答这些问题的关键是要弄清干细胞发育的基因调控机制。

3.6 伦理性问题

1996 年,苏格兰科学家宣布成功地克隆了绵羊“多莉”(Dolly)之后,世界各国就关于胚胎研究涉及到的伦理、道德、法律等问题展开了激烈的争论。争论的焦点是:胚胎干细胞是否会形成胚胎并最终发育成胎儿?人类胚胎是否享有“人”的权利?利用牛卵细胞与人体细胞核克隆所制造出来的胚是人吗?此外,至今克隆技术尚未完全成熟,多数克隆动物在发育过程中夭折或在刚出生后夭折,利用这种尚不成熟的技术克隆人类细胞,是不安全、不负责任的。除了学术界的争论之外,各国政府也对生殖性克隆研究持谨慎态度。已有 23 个国家明令禁止生殖性克隆。所以,伦理学方面存在的问题如果得不到社会的一致认可,干细胞研究可能在很大程度上受到阻碍。不过,治疗性克隆在生产移植器官和攻克疾病等方面的广阔的应用前景,已使有些国家放松了对治疗性克隆的限制。例如,英国在 2000 年以超过 2/3 的多数票通过了允许克隆人类早期胚胎的法案。有人认为干细胞研究最终能否得以应用并不取决于干细胞技术本身,而在很大程度上取决于伦理与法律问题的解决与否。

4 结束语

SC 所特有的多潜能分化的性质,将有可能使衰老的肌肉、病态的心脏和迟钝的大脑重新恢复健康。这样,人类就有望既拥有长者的智慧,又富于青春的活力。也许将来有一天,SC 可用于治疗人类的各种疾病,从修复皮肤、骨骼和神经的损伤,到再生角膜、肝脏和心脏,甚至医院里会出现可供置换器官的整套目录。Dolly 羊的成功,使我们坚信这些设想将会在不远的将来成为现实,成为某些疾病患者的福音。而对于复杂的社会整体

而言 ,终究还是会有人反对人类 SC 的研究 ,这场 会继续进行下去。
有关科学研究与伦理道德平衡关系的争论 ,还将

参考文献 :

- [1] 杜亚利 .脐血造血干细胞研究进展 [J]. 医师进修杂志 . 1998 (5) 24 - 26 .
- [2] 朱晓松 ,邵黎 .揭开干细胞发育之谜 [J]. 生理科学进展 . 1999 (4) 329 .
- [3] 黄秀榕 .干细胞研究的最新进展 [J]. 福建中医学院 . 2002 (1) 55 - 57 .
- [4] Fuchs E , Segre JA . stem cell : a new lease on life [J]. Cell 2000 , 100 (1) : 143 - 155 .
- [5] 中国干细胞网 新闻动态 (<http://www.stemcell.com.cn/news/>) .
- [6] 郑瑞珍 .胚胎干细胞研究进展 [J]. 国外畜牧科技 . 2000 (4) 24 - 26 .
- [7] 雷莉 .干细胞的生物学特性及其进展 [J]. 医学综述 . 2002 (2) 79 - 80 .
- [8] Evans MJ , Kanfin an MH . Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature , 1981 , 292 : 145 - 159 .
- [9] Thomson JA , Itskovitz Eldor , Shapiro SS , etal . Embryonic stem cell lines derives from human blastocysts . Science , 1998 , 282 (5391) : 1145 - 1155 .
- [10] 李树浓 ,徐令 .人胚胎干细胞的分离和培养 [J]. 中山医科大学学报 . 1998 , 19 (1) 77 - 80 .
- [11] 曹虎 .干细胞 [J]. 生物学通报 . 1996 (5) 24 - 25 .
- [12] Gretchen Vogel ,王福彭 .干细胞潜能的利用 [J]. 世界科学 . 1999 (10) 23 - 24 .
- [13] 申丽红 ,张均田 .干细胞研究进展 [J]. 中国药理学通报 . 2001 (5) 485 - 488 .
- [14] 王琪 ,方向东 ,戚正武 .干细胞的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 . 2001 (1) 91 - 94 .
- [15] 加藤俊一 .脐血干细胞移植的现状和问题 [J]. 日本医学介绍 . 1998 (10) 46 - 47 .

Stem Cell And Its Application

LI Zhao-xia

(Department of Ocean Engineering of Yancheng Institute of Technology , Jiangsu Yancheng 224003 , China)

Abstract : Today stem cell is one of the mostly hot spots in Cell - biology as well as the whole Life Science . Study on stem cell with concept , biology characters , class and so on . Survey the application of clone and transgenic technique .

Keywords : stem cell ; totipotent stem cell ; multipotent stem cell ; application