

# 人胚胎干细胞培养建系及其应用

王彦 丛笑倩 曹谊林\*

(上海第二医科大学第九人民医院整形修复外科, 上海市组织工程研究重点实验室, 上海 200011)

**摘要** 简要概述了自 1998 年首次建立 hES 细胞系以来近 6~7 年国内外的现状、分离培养建系、鉴定标准和冻存技术发展、定向诱导分化及其应用等方面的研究进展。

**关键词** 人胚胎干细胞; 内细胞团; 培养建系; 定向分化细胞

人类发育从一个受精卵发育成具有 200 多种细胞所构成的组织和器官, 是靠多能性的内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞不断增殖与分化来实现的。

所谓人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES 细胞)是指从人囊胚期分离、并在体外培养建系的 ICM 细胞。人们常把从胚胎生殖嵴区分离培养并建系的胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EG 细胞)也称为胚胎干细胞。尽管人 EG 细胞建系成功有所报道, 但实际应用于研究的却很少。hES 细胞是一种高度未分化的多能干细胞, 在严格的体外培养条件下可无限增殖, 并维持未分化状态, 同时在特定条件下具有分化成多种类型细胞的潜能。hES 细胞的这些特性决定了它具有重要的科学意义与巨大的医学应用价值, 成为当今国际的研究热点。

## 1 国内外研究现状

1998 年, 美国威斯康星大学 Thomson 实验室利用 36 枚临床治疗不孕夫妇捐赠的新鲜或冷冻的囊胚, 首次成功地分离、建立了 5 株 hES 细胞系<sup>[1]</sup>; 与此同时, 约翰·霍普金斯大学医学院的 Shambloott 等人, 从 5~9 周选择性流产胎儿所得到的胚胎生殖嵴首次分离培养出人 EG 细胞系<sup>[2]</sup>。2000 年, 澳大利亚 Monash University 和新加坡大学生殖中心的专家合作, 成功地从人囊胚建立了 2 株未分化的 hES 细胞系<sup>[3]</sup>。这些研究很快引起了全世界的关注, 并引发了一场关于人胚胎干细胞研究带来的伦理学问题的激烈辩论。此后有关 hES 细胞的研究大量展开, 并借鉴之前 20 多年小鼠和其他哺乳动物 ES 细胞和胚胎癌细胞(embryonal carcinoma cell, EC 细胞)的研究成果, 在短短 6 年间取得迅猛发展。国内在 2000 年后, 湖南、广州、北京、上海等医学科研单位相

继开始了 hES 细胞的研究。2002 年, 中山医科大学曾报道, 他们使用 5 例人受精卵来源的囊胚初步建成了 3 个 hES 细胞株<sup>[4]</sup>。2004 年, 日本和英国的科学家也都得到了 hES 细胞系<sup>[5,6]</sup>。最近, 西班牙学者从冷冻保存 5 年以上的早期人胚得到了 2 个 hES 细胞系, 成功率达到 5%<sup>[7]</sup>。迄今国际上有美国、英国、新加坡、澳大利亚、瑞典、日本、中国、韩国等 10 余个实验室建有约 120 株左右 hES 细胞, 其中 78 株在美国 NIH 登记注册。随着各国 hES 细胞株的建立, hES 细胞的体外培养和冷冻保存技术<sup>[8,9]</sup>及基因操作<sup>[10]</sup>等也都相应有了进展。

## 2 hES 细胞的分离、建系

目前建立的 hES 细胞株主要来源于受精卵体外培养 5~7 天所形成的囊胚, 这些早期胚胎是由临床进行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-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。在 hES 细胞的原代培养中, 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、分离的条件和实验室的经验<sup>[11,12]</sup>。

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, 用特殊的抗体, 例如抗 BeWO 细胞的单克隆抗体, 抗人的全血清, 或者红细胞抗体从囊胚中分离出 ICM 细胞。这些抗体与滋养层细胞表面的主要组织相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC)结合形成免疫复合物, 在补体存在时可导致滋养层细胞发生免疫溶解, 从而得到 ICM 细胞。但免疫

收稿日期: 2005-03-21 接受日期: 2005-04-06

\* 通讯作者。Tel: 021-63138341-5192, Fax: 021-53078128, E-mail:

yilincan@yahoo.com

外科法的缺点是 ICM 细胞会接触到动物蛋白。机械法虽可避免接触动物蛋白,但操作困难,且不易完全去除滋养层细胞,会抑制 ICM 细胞的生长,但亦有成功的报道。

分离 ICM 细胞的时间上,也有研究者将囊胚继续体外培养至 8~10 天,待其自然孵化后取得 ICM 细胞。其中包括较早进行 hES 细胞建系研究的新加坡 Bongso 教授,他早在 1994 年,将得到的 21 个囊胚继续培养 72 h,有 19 个孵化出的 ICM 细胞集落,可贴壁于饲养层上在体外继续生长,其中 17 个呈克隆样生长,碱性磷酸酶阳性,具 hES 细胞特性,并在体外传了至少 2 代<sup>[13]</sup>,但最终没有建系成功。事隔 10 年后,英国 Stojkovic 教授用类似的方法也得到了 1 个 hES 细胞株——ES-NCL1。他们以 3 种培养液交替培养囊胚至第 8 天,这时 ICM 细胞数量约为 50 个,多于 6 天囊胚 ICM 的数量( $P<0.01$ ),更容易贴壁、增殖<sup>[6]</sup>。

除了从囊胚中分离出 ICM 细胞外,最近,韩国科学家通过体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)也建立了一个新的 hES 细胞系<sup>[14]</sup>。

取得 ICM 细胞后将其置于准备好的饲养层上培养,形成最初的 hES 细胞克隆。随后以机械法或酶消化法进行传代、扩增,这是一项既耗时而又精密的工作。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, hES 细胞在体外能够传至 15 代以上,并保持 hES 细胞的基本特性,可以说建系基本成功。

### 3 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,保持其向 3 个胚层细胞分化的潜能。这就涉及了饲养层、生长因子等许多因素的调节。

#### 3.1 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  $\gamma$  射线处理的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)是培养 hES 细胞的最早和最常用的饲养层细胞。MEF 能产生抑制 ES 细胞自发分化和促进 ES 细胞增殖的因子,故它能有效地促进 ES 细胞增殖并维持其未分化的二倍体状态和多能性。Park 等<sup>[15]</sup>也用 STO 细胞作为饲养层建立了 hES 细胞系。

徐令等<sup>[16]</sup>分离培养流产人胚胎成纤维细胞(human embryo fibroblast, HEF),经丝裂霉素 C 处理后作为 hES 细胞的饲养层。通过比较研究,发现 HEF 完全可替代 MEF。而且 HEF 培养至 16 代依然生长旺盛,丝裂霉素 C 处理后可存活 3~4 周。因此作为 hES 细胞的饲养层细胞,HEF 要明显优于 MEF。Richards 等<sup>[17]</sup>用 HEF 和成人输卵管上皮细胞作为饲养层, hES 细胞传了 20 代后仍保持胚胎干细胞的各种生物学特征。谢常青等<sup>[18]</sup>分离 HEF 和成人包皮的成纤维细胞作为饲养层,将 hES 细胞传了 14 代,两种饲养层细胞无明显差异。Amit 等<sup>[9]</sup>考虑 HEF 和输卵管成纤维细胞来源困难,采用了新生儿包皮成纤维细胞作为饲养层。他先将 hES 细胞在 MEF 上培养,然后移至包皮成纤维细胞饲养层, hES 细胞可传代 70 次仍保持未分化状态及多向分化潜能。而且包皮细胞可连续培养超过 40 代,大大降低了饲养层制备的工作量。同年, Hovatta 等<sup>[19]</sup>用包皮细胞饲养层成功分离、培养了 2 个 ICM 细胞,获得的 hES 细胞可持续生长并保持未分化状态及多向分化潜能。该研究证明包皮成纤维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。另外,来源于活检的成人皮肤成纤维细胞和骨髓间充质细胞也可作为 hES 细胞的饲养层细胞。

条件培养基(condition medium, CM)是由各种能合成、分泌抑制分化因子的细胞制备而来,通过所含的各种生长因子而发挥作用。以 CM 代替饲养层来培养 hES 细胞,可避免 ES 细胞与其他细胞的直接接触,降低异源蛋白和反转录病毒感染的危险性。常用于制备 CM 的细胞有 MEF、STO、BRL 等。Xu 等<sup>[8]</sup>比较了 MEF、STO、NHG190、BJ5ta、Htert-RPE 等细胞的 CM,发现 MEF 制备的 CM 效果最好。用无血清培养系统培养 MEF 制备的 CM,并铺以明胶或层黏连蛋白,可在体外培养、扩增 hES 细胞,并保持其所有的生物学特性。

无论是人源性饲养层还是条件培养基培养,现有的 hES 细胞仍达不到临床应用的标准,因为可能存在异源蛋白的污染。而且有报道指出,长期的体外培养后, hES 细胞会出现分化比例偏高和基因不稳定现象<sup>[9,20]</sup>,甚至染色体也会出现非整倍体<sup>[21,22]</sup>;同一实验室的不同细胞系间,在 SSEA-4 的表达、端粒长度的不同、某些基因的改变等方面也有统计学意义显著的差别<sup>[21]</sup>。这些数据表明,要使 hES 细

胞在体外稳定的长期扩增, 还要考虑饲养层或条件培养基之外的其他一些因素。

### 3.2 细胞因子

细胞因子在 hES 细胞的培养中也有非常重要的作用。目前应用最广的主要是人白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。LIF 是 20 世纪 60 年代末发现的一种多功能细胞因子。在体外具有诱导髓样白血病细胞向正常分化和抑制 ES 细胞自发分化的能力。LIF 分为两种类型: 分泌型(D 型)和基质型(M 型)。D 型可分泌到细胞外液中, M 型则锚定于细胞外基质。LIF 具有种属特异性, 来源(天然的或重组的)、纯度和浓度共同决定着其作用。鼠源的 LIF 通过膜蛋白 GP130 和 Stat3 信号转导通路发挥作用, 可维持小鼠 ES 细胞未分化状态。但人源重组 LIF 的作用机制还不清楚。Thomson 等<sup>[1]</sup>指出, 单独的 LIF 对 hES 细胞的分化并无抑制作用; 而 MEF 饲养层分泌的 LIF 与人源 LIF 在结构上存在一些差异, 也不能完全抑制 hES 细胞的分化。因此只有 MEF 饲养层与 LIF 同时存在的条件下, hES 细胞增殖传代的能力最强。bFGF 是一个肝素结合的多肽类丝裂源, 广泛分布于各种组织中。bFGF 是一种重要的细胞增殖分化调节剂, 可刺激多种细胞的增殖。有研究发现它对滋养细胞也有促增殖作用。bFGF 主要是与细胞膜上 FGF 受体结合发挥作用, 刺激与增殖有关的基因表达。Thomson 等<sup>[1]</sup>认为, 像其他体外培养的人体细胞一样, hES 细胞也要求 bFGF 的存在以促进增殖。

但生长因子的作用通常较为复杂, 以 bFGF 为例, 它虽是最常用的有丝分裂原刺激因子, 却又能促进外胚层和中胚层标记的表达, 还是下丘脑神经原的诱导分化因子。因此, 如何恰到好处地应用生长因子, 也是值得进一步研究的方向。

## 4 hES 细胞的鉴定

体外培养的 hES 细胞必须通过一系列鉴定后, 才能初步确认建系成功。目前国际上已有比较一致的鉴定标准: 第一, 在体外能无限增殖, 这是干细胞“自我更新”这一基本特性在体外培养中的延续; 第二, 在体外可产生各种分化细胞, 这是干细胞“产生分化子代”这另一基本特性在体外培养中的延续; 第三, hES 细胞接种裸鼠体内, 可产生畸胎瘤, 这是分析和鉴定 hES 细胞的发育潜能性、

判断其产生分化细胞的种类多寡的较好途径; 第四, hES 细胞在体外培养中, 呈特征性的巢状集落生长方式, 具有独特的多能胚胎干细胞标记——时期特异性胚胎抗原(specific stage embryonic antigen, SSEA)-3、SSEA-4 和肿瘤相关因子(tumor related antigen, TRA)-1-60, TRA-1-81, 以及生殖细胞肿瘤标记(germ cell tumor marker, GCTM)-2 等, 这些标记是啮齿动物小鼠的 ES 细胞所缺乏的。此外, hES 细胞表达转录因子 Oct-4, 具有很高的端粒酶活性和碱性磷酸酶活性; 第五, 染色体数目和形态正常, 冻存复苏后依然保持。另外, hES 细胞应该具有遗传可操作性, 对 hES 细胞经遗传改造后, 适当地定向诱导其分化为所需类型的分化细胞, 可以用作治疗性克隆。

## 5 hES 细胞的冻存

hES 建系后面临的首要问题就是如何保种和长期保存生物学活性, 这就需将 hES 细胞进行冷冻保存, 并在需要的时候重新复苏和培养。常规的“慢冻快融”方法适用于小鼠 ES 细胞在内的大多数细胞的冻存。然而这种方法对 hES 细胞的冻存效果却不尽人意, 未分化 hES 细胞的存活率几乎为 0, 大多数细胞不是分化, 就是死亡。改用玻璃化冻存法, hES 细胞复苏率也只有 12.2%<sup>[23]</sup>。

hES 细胞类似于体内的胚胎细胞, 非常敏感, 很容易受到周围微环境变化的影响, 因此冻存过程中的巨大温差、冷冻保护剂成分等因素, 都会对 hES 细胞产生很大的影响。值得高兴的是, 近年来不少实验室在研究 hES 细胞建系的同时, 也开始改进 hES 细胞的冻存方法。2001 年, 以色列 Reubinoff 实验室将冷冻胚胎的拉伸麦管(open pulled straw, OPS)玻璃化冻存法试用于 hES 细胞的冻存, 结果复苏率达到 32%<sup>[24]</sup>。我国学者比较了传统的玻璃化冻存法和慢速冻存法, 发现前者的 hES 细胞复苏率为 81.9%, 后者只有 22.8%<sup>[25]</sup>。玻璃化冻存法是从冷冻速率这一方面进行的改进, 虽然取得较为理想的复苏率, 但操作复杂, 比较费时费力。最近韩国学者在 hES 细胞的冻存液中添加 IV 型胶原和层黏连蛋白(laminin), 仍用“慢冻快融”的冻存法, 发现未分化 hES 细胞的复苏率也大大提高<sup>[26]</sup>。笔者实验室也在 hES 细胞建系的基础上, 对 hES 细胞的冻存方法作了大量的摸索改进, 包括冻存液成分、冻存步骤等, 将未分化 hES 细胞的复苏率提高到了 47%

(文章待发表)。

由于 hES 细胞的特殊性和复杂性,除了冷冻速率、冻存温度、复温速率、冷冻保护剂等因素外,在冻存过程中尚有许多其他因素值得考虑。例如,冻存的细胞集落不宜过大,且细胞状况要好。集落过大,冷冻保护剂不易渗入内部细胞,致使起不到保护作用,而外周细胞却有可能已受损伤。其次,冻存操作不当,渗透压改变过快,细胞容易破碎。所有这些问题都有待于进一步改进解决,这也将成为 hES 研究中较为关键的一个环节。目前 Thomson 实验室仍在用计算机程控降温仪对 hES 细胞的冻存进行研究,笔者实验室也在进一步摸索更为简单有效的冻存方法。只有冻存技术完善, hES 细胞才能稳定地维持其生物学特性,不同国家、实验室之间 hES 细胞的交流与合作研究才能顺利发展。

## 6 hES 细胞的诱导分化及应用

自美英科学家建成小鼠 ES 细胞系以来的 20 多年中,以其为模型,已成功地定向诱导出包括雌雄两性配子在内的 20 余种细胞,涉及 3 个胚层来源的各种类型。

而对于 hES 细胞的体外定向诱导分化,尽管借鉴了小鼠 ES 细胞的经验,成功的例子还不多。不过研究者们也已初步得到了几种细胞。例如,通过形成拟胚体,分化中的 hES 细胞在成纤维细胞生长因子 -2 (FGF-2) 存在时会形成大量神经管样结构。用选择性酶消化分离这种神经管样结构内部的神经前体细胞,根据其不同的黏附性进一步纯化,随之撤除 FGF-2,这些神经前体细胞在体外会分化为神经元、星形细胞和少突神经细胞。当这些神经前体细胞被移植入新生鼠脑时,会参与各个脑区,分化成为神经元、星形细胞两类细胞,而且移植部位未观察到畸胎瘤形成<sup>[27]</sup>。这表明 hES 细胞有可能成为用于神经系统的治疗和修复的神经前体细胞的来源。另外,以色列科学家发现在黏附和悬浮两种培养条件下, hES 细胞能自发分化产生  $\beta$  细胞在内的一些细胞。其中胰岛素染色阳性细胞的百分率特别高。胰岛素分泌至培养液中的含量与  $\beta$  细胞其他标记的表达相关<sup>[28]</sup>。这一结果表明, hES 细胞将来有可能成为糖尿病细胞替代治疗 (cell replacement therapy) 的细胞来源。此外,角化细胞<sup>[29]</sup>,血细胞<sup>[30]</sup>,心肌细胞<sup>[31]</sup>,内皮细胞<sup>[32]</sup>等也在许多实验室初步诱导成功。

目前一些动物模型的实验也初步证明, hES 细胞来源的分化细胞可以有效地治疗一些临床慢性病,如糖尿病、创伤性脊椎损伤等<sup>[33,34]</sup>。

不过值得注意的是,随着 hES 细胞的分化,在其未分化时很低的免疫原性开始升高<sup>[35]</sup>,由此引起的免疫排斥反应有可能导致细胞移植治疗的失败。为避免这一问题,科学家们提出了“治疗性克隆”的设想。2004 年,韩国科学家<sup>[14]</sup>利用体细胞核移植技术,成功克隆出人的早期胚胎,并获得了 hES 细胞株,证明了治疗性克隆的可行性,意味着 hES 细胞应用于临床的研究又向前迈出了重要的一步。

## 7 小结与展望

hES 细胞的建系和体外培养是非常耗时又精密的工作,虽然已取得很大的进展,但要达到临床应用的标准还有很多方面需要摸索。例如囊胚的优化培养,采用人抗体的免疫外科法或机械法分离 ICM 细胞,研制更为合适的体外培养体系、hES 的冷冻保存等技术性问题。hES 细胞建系后的鉴定、保存也需要一个统一的标准和规则,这就需要“hES 细胞库”这样的组织机构来执行这一功能。美国、英国已有类似的组织,而我国作为 hES 细胞建系资源最为丰富的国家之一,更加需要成立类似的机构,实现 hES 细胞的统一鉴定、保存、管理、供应等,使我国 hES 细胞的研究更快地走到世界前沿。

尽管 hES 细胞来源的分化细胞已能成功应用于动物模型的细胞治疗,但要将这些细胞用于临床治疗,却有重重障碍:首先, hES 在体外长期的扩增后,其性状是否会发生改变,是否还具有多能性?其次, hES 细胞培养所依赖的饲养层目前多是鼠源性的,临床应用时如何避免鼠源性的蛋白质污染?第三,如何得到具有功能的、纯化的分化细胞?第四,如何避免分化细胞植入人体后的免疫排斥反应?解决诸如此类的问题,不仅需要人们对 hES 细胞的生物学特性有更深刻的认识,优化其建系方法和体外培养系统,而且也需加快“治疗性克隆”的研究步伐。

## 参考文献 (References)

- [1] Thomson JA *et al. Science*, 1998, **282**: 1145
- [2] Shablatt MJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13726
- [3] Reubinoff BE *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 399

- [4] 何志旭等. *中华医学杂志*, 2002, **82**: 1314
- [5] Suemori H *et al. Rinsho Byori*, 2004, **52**: 254
- [6] Stojkovic M *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 790
- [7] Simon C *et al. Fertil Steril*, 2005, **83**: 246
- [8] Xu C *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 971
- [9] Amit M *et al. Biol Reprod*, 2003, **68**: 2150
- [10] Zwaka TP *et al. Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 319
- [11] Pera MF *et al. J Cell Sci*, 2000, **113**: 5
- [12] Mitalipova M *et al. Stem Cells*, 2003, **21**: 521
- [13] Bongso A *et al. Hum Reprod*, 1994, **9**: 2110
- [14] Hwang WS *et al. Science*, 2004, **303**: 1669
- [15] Park JH *et al. Biol Reprod*, 2003, **69**: 2007
- [16] 徐 令等. *中国病理生理杂志*, 2001, **17**: 1
- [17] Richards M *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 933
- [18] 谢常青等. *科学通报*, 2002, **47**: 1880
- [19] Hovatta O *et al. Hum Reprod*, 2003, **18**: 1404
- [20] Carpenter MK *et al. Dev Dyn*, 2004, **229**: 243
- [21] Draper JS *et al. Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 53
- [22] Inzunza J *et al. Mol Hum Reprod*, 2004, **10**: 461
- [23] Fujioka T *et al. Int J Dev Biol*, 2004, **48**: 1149
- [24] Reubinoff BF *et al. Hum Reprod*, 2001, **16**: 2187
- [25] Zhou CQ *et al. Chin Med J (Engl)*, 2004, **117**: 1050
- [26] Kim SJ *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 950
- [27] Zhang SC *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1129
- [28] Assady S *et al. Diabetes*, 2001, **50**: 1691
- [29] Green H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 15625
- [30] Kaufman DS *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 10716
- [31] Kehat I *et al. Circ Res*, 2002, **91**: 659
- [32] Levenberg S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4391
- [33] Odorico JS *et al. Stem Cells*, 2001, **19**: 193
- [34] Gerecht-Nir S *et al. Am J Transplant*, 2004, **4**: 51
- [35] Drukker M *et al. Trends Biotechnol*, 2004, **22**: 136

## Human Embryonic Stem Cell Lines and Their Application

Yan Wang, Xiao-Qian Cong, Yi-Lin Cao\*

(Shanghai Key Laboratory of Tissue Engineering, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai 9th People's Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China)

**Abstract** This article reviews the advances of human embryonic stem cells (hES cells) since the first cell line established in 1998, including the isolation of inner cell mass (ICM), the culture conditions, the cryopreservation, the application, and so on.

**Key words** human embryonic stem cells; inner cell mass; culture; induced differentiation

Received: March 21, 2005 Accepted: April 26, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-21-63138341-5192, Fax: 86-21-53078128, E-mail: yilincao@yahoo.com