

胚胎性干细胞定向诱导分化——新崛起的细胞工程

施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 胚胎性干细胞(ES细胞)是一类稳定地在体外自我增殖、具有发育全能性和产生属于三个胚层范畴分化细胞、甚至参与体内个体完整发育的早期胚胎细胞。包括人类在内的各种哺乳类ES细胞分离建系成功,结合体外基因操作和细胞分化诱导条件选择等综合途径,有可能控制ES细胞导向产生单一类型的功能性分化细胞。这种全能ES细胞生物学技术已成为一项新崛起的细胞工程。在新世纪10-15年内将对分子细胞生物学、发育生物学和人体胚胎学等基础科学以及人类健康相关的细胞治疗和组织工程有着重大影响和推动作用。

包括人类在内的正常胚胎发育过程是按严格的时空程序进行一系列细胞之间、核质之间相互作用的结果。从全能或多能胚胎干细胞分化为具有独特功能的体细胞,主要取决于哪些基因被激活和在什么时间与位点被激活,细胞环境中的各种因子的类型和浓度则是基因选择性激活的重要因素。因此,细胞分化是部分基因选择性地被激活或差异性表达,从而控制专一性蛋白质的合成和排布的结果。

哺乳动物早期胚胎体积小,又在母体子宫内发育,因此,“在体内”对各类细胞的分化及其机理进行实验研究几乎不可能。二十世纪60-70年代开始,人们一直在致力于寻找一个既能在体外增殖又具有胚胎细胞全能性或多能性的、并通过适当条件能被诱导分化为各种类型分化细胞的实验模型。经过近四十年各国科学家的努力,从小鼠胚胎性癌细胞(embryonal carcinoma cell,简称EC细胞)直到新近建立的人胚胎干细胞(embryonic stem cell,简称ES细胞)和胚胎生殖细胞(embryonic germ cell,简称EG细胞)先后建系成功,将对哺乳动物发育和细胞分化研究起着重大的推动作用,特别是为

临床细胞治疗和组织工程开辟了良好的前景。本文就胚胎性干细胞基本特性,体外诱导分化途径及其应用前景作一简要概述。

一、胚胎性干细胞

胚胎性干细胞是一类具有自我更新和发育全能性并产生分化后代能力的早期胚胎细胞,包括EC、ES和EG细胞。其基本特性是具发育全能性,能分化为属于外胚层、中胚层和内胚层范畴的各种分化细胞,甚至参与个体发育,故又有人称为“万能”细胞。过去曾认为,另一类来自自己完成部分分化、属于某组织器官的组织专一干细胞是限能的,例如造血干细胞只能分化为血液系统的各种细胞。但新近的研究表明组织专一干细胞的发育潜能已超越了胚层的界限。例如造血干细胞可发育成为神经细胞,相反,神经干细胞可在骨髓中分化出血液细胞^[1]。因此这类组织干细胞虽然不是来自于胚胎的干细胞,但就发育潜能而言仍具有分化为较多细胞类型的能力,已重新引起细胞生物学者的重视。

EC细胞是恶性畸胎瘤干细胞(teratocarci-

noma stem cell),具有恶性生长并显示类似胚胎细胞发育全能或多能的双重性质。在70-80年代间,EC细胞常被用以研究哺乳类发育和遗传以及细胞诱导分化的实验模型,通过各种诱导分化因子和条件,成功地诱导出神经细胞、肌肉细胞、软骨细胞和上皮细胞等包括三个胚层在内的各种类型分化细胞^[2-4]。由于EC细胞具有包括核型异常等某些恶性肿瘤特性,特别是难以参与嵌合体胚胎的发育,因此作为研究正常细胞分化的模型并不理想。

八十年代初,从小鼠早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM)或桑椹胚分离建立了具有发育全能性的ES细胞系^[5-8]。基本上解决了研究哺乳动物发育和遗传以及细胞分化的模型问题。近年趋向牛、猪、猴等大动物特别是1998年美国Wisconsin大学J. Thomson成功地建立人类ES细胞^[9-11]后,ES细胞生物学研究开创了为人类健康和推动现代生命科学发展新时期。

早就发现异位移植12.5dpc(days post coitum)胚胎生殖嵴至肾被膜下,能诱发产生含有大量EC细胞和各类分化细胞的恶性畸胎瘤,表明胚胎生殖嵴中的原始生殖细胞也具有发育全能性。因此,已有多家实验室从小鼠包括新近从人的胚胎生殖嵴分离培养出类似ES细胞的新一类具发育全能性的EG细胞系^[12-15]。EG细胞与来自内细胞团的ES细胞有共同的特征,包括体外诱导分化和产生生殖系嵌合体后代。但这两种细胞并不完全一样,一般而言,EG细胞培养建系较ES细胞困难,所需条件特别是饲养层细胞较ES细胞的苛刻。ES细胞体直径一般为12-15 μm ,EG细胞一般为15-18 μm 。另一重要区别是两种细胞的胰岛素样生长因子II受体(insulin-like growth factor-II receptor, IGF-II R)基因甲基化状态不同,这可能反映着生殖嵴中的原始生殖细胞和胚泡的ICM细胞是两种不同的发育模式^[16]。EG细胞系有人称为“干细胞之母”,除了用以研究诱导细胞分化的模型外,还为研

究生殖细胞发育、分化和成熟的调节机制以及生殖系肿瘤发生提供了丰富的材料。

二、ES和EG细胞系基本特性

1. 形态学特征

体外培养的ES和EG细胞不论在饲养层细胞上或缺饲养层而添加所需生长因子的特定条件下,圆型或卵圆型细胞均呈单层或多层密集堆积而形成岛状或巢状群体生长形态。将这种岛状或巢状的群体细胞克隆挑出,用胰蛋白酶轻度消化后接种于新的饲养层或特定的条件培养中。分散的ES或EG细胞又重新长出岛状或巢状的克隆。组成克隆的细胞彼此界限不清楚,粘连性强。若撤除饲养层或培养液中缺乏LIF一类分化抑制因子,则ES或EG细胞克隆虽然彼此也依然粘附聚集成团,但呈悬浮状态,细胞界限也较清楚,这时,细胞团已形成自发分化的拟胚体(embryoid body)。

2. 发育全能性标志和分化潜能鉴定

(1) SSEA-1 抗原 未分化具发育全能性的胚胎干细胞表面表达时期专一性胚胎抗原(stage-specific embryonic antigen, SSEA)^[17]。因此,常用单克隆抗体SSEA-1检测ES和EG细胞表面抗原作为发育全能性的一种标志。

(2) 碱性磷酸酶(AKP) 在早期胚胎的干细胞中AKP活性较高,而在已分化的细胞中活性明显降低。同样ES和EG未分化干细胞具较高的AKP酶活性。

(3) OCT-4 基因表达 OCT-4是一种发育全能性的标志基因^[18]。在小鼠胚胎发育早期,生殖细胞谱系以及体外培养的多能干细胞都特异性表达OCT-4基因。因此,常用OCT-4抗体检测ES和EG细胞中OCT-4基因的表达产物,而分化细胞则无OCT-4基因表达。

(4) 端粒酶(telomerase) 端粒酶是一类核糖核蛋白,与维持真核细胞染色体末端的端粒长度和控制细胞寿命有关。人ES细胞的端粒酶活性很高,而分化细胞一般难以检测到其活性^[10]。

(5) 体外分化潜能 将 ES 细胞和 EG 细胞接种于缺乏饲养层细胞的琼脂平板上, 细胞粘附成团。形成拟胚体, 最外层分化为由较大细胞组成的内胚层样 (endoderm-like) 结构, 中间为未分化的干细胞, 继续培养, 拟胚体增大, 内部出现囊腔, 形成囊状胚体。在囊腔和早期分化出的内胚层之间的细胞发育成类外胚层 (ectoderm-like), 为一层上皮样细胞, 这样的结构可持续存在 3 周左右。若把刚形成的拟胚体移至无琼脂层的培养皿中贴壁生长, 则可见拟胚体中间的细胞团保持着干细胞生长特点, 而其周边细胞逐渐自发分化为多种不同类型的细胞, 包括上皮细胞、成纤维细胞等, 细胞类型随培养条件和细胞密度而有所不同。

(6) 体内分化 在 Balb/c-nu 裸鼠腋下接种 ES 或 EG 细胞。2-3 周取出瘤块, 切片可观察到瘤块类似畸胎瘤, 除大量的干细胞巢和间质细胞外, 还包括神经管、腺管、上皮组织、软骨和肌肉等多种类型的分化细胞。

3. 嵌合体动物

参与宿主胚胎发育, 形成嵌合体动物包括生殖系嵌合体后代是 ES 和 EG 细胞特有的最基本特征, 也是验证 ES 和 EG 细胞发育全能性最有说服力的途径, 以小鼠 ES 细胞为例常用两种方法, 1) 胚胎聚集法^[8]: 将两个宿主的 8 细胞期桑椹胚置入在铺有琼脂层的培养皿中打的小洞穴内。然后, 3-5 个 ES 或 EG 细胞组成的细胞团块置入事先准备的这两个桑椹胚之间。确保 ES 细胞或 EG 细胞与桑椹胚粘附在一起。在体外培养 36-40hr (相当于妊娠第五天)。其中大多数聚合体发育至胚泡期。选择发育良好的 10-12 个胚泡转移至假孕母鼠的子宫, 继续在宫内着床和进一步发育。2) 显微注射法: 将 8-10 个 ES 或 EG 细胞直接注入宿主发育 4 天的胚泡, 待胚泡复形后转移至假孕母鼠子宫内, 继续在宫内发育。

ES 细胞被异位移植至皮下时, 仍保持着旺盛的细胞增殖特性, 虽然其具有发育全能性或多能性, 但其发育的遗传程序失控, 表现为无序

的细胞分化, 成为排列杂乱的、由多种类型分化细胞组成的瘤性组织; ES 细胞与正常桑椹胚胎或胚泡的 ICM 细胞粘附在一起被移入母体子宫内, 可被调整并参与胚胎的正常发育, 最终成为组织结构完全正常的嵌合体个体。

三、ES/EG 细胞体外诱导分化

1. 基本途径

早在六、七十年前, 实验胚胎学家就发现蛙类早期原肠胚 (gastrula) 的背唇 (dorsallip) 的背方区域能够诱导外胚层分化为神经管, 而靠近腹侧面则诱导尾部结构。接着又发现胚胎发育中组织发生和身体构造形成是一连串的诱导连锁过程, 例如神经组织听囊形成后, 则诱导邻近的间质细胞形成软骨囊; 水晶体则刺激覆盖的外胚层诱导出角膜。所以, 诱导分化是胚胎正常发育最重要而基本的现象。在体胚胎细胞分化过程中, 诱导作用的结果不只是决定于各种诱导物质性质和专一性, 同时也决定于被诱导细胞的反应能力 (competence), 后者受遗传、发育潜能等内在因素的限制。诱导物质的专一性和被诱导细胞的反应能力必须在时空上相互配合, 才能保证被诱导细胞按预定的细胞类型方向分化。ES 细胞是体外研究诱导分化的较理想的模型。其在体外被诱导分化的途径可能不一定与在体胚胎细胞的完全相同, 但在实验操作时, 也应同时考虑诱导物性质和 ES 细胞本身所具的反应能力这两个基本问题。

胚胎细胞被诱导分化实验中, 所用诱导物质种类繁多, 诱导模式也不尽相同, 难以归类论述。但按作用机理大致可分为两类。一类是使被诱导细胞可逆性地轻度损伤: 例如无机物、有机酸、醇、亚甲基盐、硫化物、氨水甚至蒸馏水或缺钙的盐水, 都能使两栖类胚胎细胞渗透压改变造成轻度损伤, 导致神经细胞分化^[19]。另一类诱导物例如类固醇激素、维甲酸衍生物 (RA 等), 多肽生长因子 (bFGF、TGF- β 、activin) 等, 则是通过其与被诱导细胞表面受体结合而介导的细胞诱导分化。同一种诱导物可以诱导

出不同类型细胞或变化多端的构造,问题较复杂,不仅涉及诱导剂的浓度差别、诱导作用模式和微环境的未知因素等,而且也与被诱导细胞的发育潜能,对诱导剂的反应性等差别有关。

ES/EG 细胞体外诱导分化可分为谱系分化和定向分化,谱系分化包括 ES 细胞经谱系祖细胞 (lineage progenitors)、谱系定型细胞 (lineage committed cell) 到终末分化细胞的整个细胞分化全过程。由于 ES 细胞在体外诱导时常同时出现不同胚层类型的多种分化细胞,表明 ES 细胞具有一种不受约束的、无序自我发育的特性。ES 细胞定向诱导分化则要设法控制导向产生单一类型的分化细胞,这是至今仍未解决的难题。根据国外少数报道和我们的经验,对 ES 细胞转染细胞专一的转录因子,标志基因或有关细胞分化因子等遗传操作并结合报告基因和诱导条件选择等手段是一条可能的探索 ES 细胞定向诱导分化的途径。

有关体外诱导分化的报告仍以小鼠 ES 细胞为模型居多,而且大多还是偏重于混合型分化细胞的描述性资料。但毕竟积累了丰富的体外诱导分化经验和知识。人类 ES/EG 细胞建系成功,各国科学家正致力于将人 ES 细胞改造成临床基因和细胞治疗为目的的各种定向诱导分化研究(图 1),ES 细胞技术学成为新崛起的一门细胞工程^[20,21]

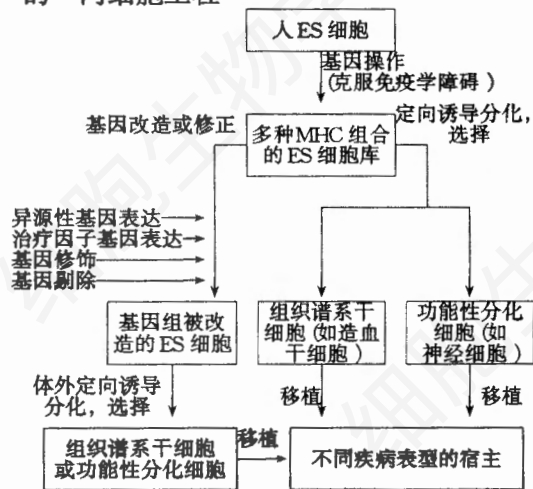


图 1 用于基因和细胞治疗的人 ES 细胞工程示意图^[36]

2. ES 细胞体外诱导的几种分化细胞

(1) 造血细胞 在 ES 细胞体外分化研究中,造血细胞(hematopoietic cell)是报道最多的一种分化细胞类型。ES 细胞拟胚体在体外可分化为类似胚胎中卵黄囊血岛样的结构,分化产生红细胞、髓细胞和淋巴细胞等^[22-25]。根据小鼠 ES 细胞体外分化为造血细胞的研究,发现体外 ES 细胞分化为造血细胞体系的一系列分子机制和细胞学发育顺序类似于在体胚胎造血体系的发育过程。利用骨髓基质细胞或其条件培养液,可以诱导 ES 细胞在体外分化为造血干细胞(hematopoietic stem cell)^[26]。这一重要进展为分析 ES 细胞分化为造血干细胞的早期决定与分化机理和过程,为临床上移植或输血应用的血源找到了一个新的突破口。

(2) 内皮细胞与血管发生 在体胚胎卵黄囊血岛内,前成红细胞的产生总是伴随着内皮细胞的出现,因而普遍认为它们来源于共同的祖细胞。同样,ES 细胞体外分化时,拟胚体的血岛样结构中前成红细胞集落周围也有内皮细胞出现。ES 细胞衍生的拟胚体分化的管状结构是由内皮细胞排列组成的,管道内还含有一些造血细胞,类似于胚胎发育中的早期血管发生。近年,利用具过度表达转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 、TGF- β_1) 的 ES 细胞,在含维甲酸(RA)培养液中经悬滴培养先形成拟胚体,再继续贴壁培养,发现拟胚体周围呈辐射状长出许多由内皮细胞排列而成的血管样结构^[27-28]。此外,在重组 TGF- β_1 处理的 ES 细胞中,能检测到碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)基因表达^[28],所以,TGF- β_1 可能通过调节 ES 细胞和/或其分化细胞的 bFGF 基因表达,从而促进内皮细胞分化和形成血管。

(3) 神经细胞 单层培养 ES 细胞的诱导分化实验中,在 RA 与双丁酰基环腺苷磷酸(dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, dB-cAMP)共同作用下,90% - 95% 的分化细胞为神经胶质细胞^[29]。ES 细胞拟胚体在含 RA 的培养液中继续培养,进一步使拟胚体贴壁培养

则可高效重复地分化出神经细胞,不仅表达专一性的神经微丝 M 和 β 微管蛋白,还有钠、钾、钙等离子通道的特征。分化的神经细胞还表达神经递质 GABA, glycine 和受体 NMDA 等不同物质。甚至在体外诱导分化的早期拟胚体中检测到神经元和神经胶质细胞的共同前体细胞的专一性标志巢蛋白(nestin)^[30,31]。用 RA 诱导 ES 细胞分化为表达 γ -氨基丁酸的神经细胞植入 Huntington's 病(一种遗传性舞蹈病)大鼠模型体内,具有神经细胞功能的移植物使患鼠症状有所改善,并存活了 6 周^[32]。因此,ES 细胞体外诱导分化细胞有可能成为移植物的新来源途径之一。

(4) 心肌和其他肌肉细胞 悬浮或悬滴培养的 ES 拟胚体在 RA 诱导条件下贴壁生长数天,常出现某些分化细胞集落具节律性自发收缩现象,显然是肌细胞。电镜观察证实,收缩的细胞内存在着肌原纤维、肌小节和闰盘等典型心肌细胞特有结构^[29]。分化细胞团刚开始收缩时, β 型肌球蛋白重链(MHC)表达占优势,继续培养数天,则 α 型 MHC 逐渐占优势,最终在分化的心肌细胞中,27% 表达 β 型 MHC,33% 同时表达 α 和 β 型 MHC,40% 表达 α 型 MHC^[33]。这种 MHC 亚型的转变与在体胚胎心肌发育过程极相似。除心肌细胞外,决定骨骼肌发育的基因 Myf-5、Myogenin, MyoD 等在 ES 细胞拟胚体的分化细胞中能够表达,而且表达时序与在体胚胎发育中相同。ES 细胞拟胚体贴壁培养 1-2 周后一般都能出现肌肉细胞,继续培养则融合成肌管,显示出骨骼肌发育的典型特征。分化的肌细胞常表达成熟肌细胞专一的 Ca^{2+} 通道和烟碱受体(nicotinic receptor)。二甲亚砜诱导 ES 细胞拟胚体可形成心肌、平滑肌和骨骼肌等多种类型肌细胞,用肌肉专一性的调节因子 MyoD 基因转染 ES 细胞并结合 DMSO 诱导处理,则主要分化为骨骼肌,没有心肌和平滑肌类型细胞出现,且骨骼肌常融合形成肌管,具收缩功能。因此通过某种基因改造 ES 细胞途径和适当的培养条件是诱导 ES

细胞定向分化的可行方法之一。

(5) 脂肪细胞 ES 细胞分化成脂肪细胞已有个别报告^[34]。ES 细胞或 EG 细胞通过悬滴培养法^[27]形成的拟胚体被转移到铺有琼脂的培养皿中,每天更换含有诱导剂二甲亚砜(DMSO)的培养液。悬浮培养 3 天后,拟胚体移入事先用明胶(gelatin)包被的培养皿中进一步贴壁培养。这时培养液中添加胰岛素、三碘甲腺原氨酸(triiodothyronine)和胎牛血清,10-15 天后大部分拟胚体分化为脂肪细胞。近来笔者实验室用 RA 替代二甲亚砜诱导剂,其余条件同上,约 60% 以上的小鼠 EG 细胞拟胚体被诱导分化出脂肪细胞。

(6) 软骨细胞 ES 细胞诱导分化为软骨细胞的条件较为苛刻,一般成功率也较低。ROSA β -geo 基因转染的 ES 细胞,在缺乏 G418 的情况下聚集成拟胚体。用 10% 小牛血清代替胎牛血清,培养液中含有 $1\mu\text{mol/L}$ 地塞米松(dexamethason),2-3 天更换培养液,50 天后,这种拟胚体发育成软骨细胞,经 Alcian blue 液染色,显示出明确的软骨细胞特征,细胞间存在着 II 型胶原^[35]。

四、ES/EG 细胞技术学的应用

1. 哺乳类发育的体外模型

如前所述,在嵌合体动物中,ES 细胞能参与个体发育,并产生包括生殖系在内的各种类型细胞,表明 ES 细胞类似胚胎的 ICM 细胞,不仅具有发育全能性,而且也持有对调节正常发育所有信号的反应能力。在特定的体外培养条件和诱导剂共同作用下,ES 细胞在体外可被诱导分化属于三个胚层谱系的各种高度分化的体细胞,例如神经细胞、肌肉、血细胞、上皮细胞和成纤维细胞等。同时,在这些细胞分化过程中,必然先经过一定的前体细胞阶段。因此 ES 细胞不仅是研究特定类型细胞分化的模型,而且也是研究某些前体细胞起源和细胞谱系演变较理想的实验体系。尽管 ES 细胞体外分化途径和机制与在体胚胎的不完全相同,但在分子水

平包括发育的遗传程序仍有共同或相似之处。因此小鼠 ES 细胞已被公认为是研究哺乳类发育较理想的模型。人 ES 细胞建系后,一些国家的法律和道德伦理禁止用于人体胚胎研究。但近来认识到,ES 细胞本身缺乏胚外组织不能产生完整的胚胎。在法律上禁止克隆人的前提下,已允许将人 ES 细胞类似于小鼠 ES 细胞体外实验那样,用于研究人类胚胎在体内所不能分析的发育、分化和调节信号等事件。这无疑将丰富、充实和完善人们对人类早期发育或畸胎发生等认识。

2. 基因和细胞治疗的载体

这里基因治疗是指用遗传改造过的人体细胞直接移植或输入病人体内,达到控制和治愈疾病为目的的治疗手段,又称细胞治疗。遗传改造包括纠正病人中存在的基因突变,或使所需基因信息传递到某些特定类型细胞。目前常说的基因治疗技术虽然能通过把正常编码序列导入突变细胞,从而使突变基因的功能得到纠正。但导入基因的整合和表达难以精确控制,特别是该基因插入对其他细胞基因产生的效应尚无法预知,更大的问题是许多被用作基因操作的细胞在体外不易稳定地被转染和增殖传代。人 ES 细胞是能产生各种类型分化细胞的干细胞,即使经遗传操作后仍能稳定地在体外增殖传代,为克服目前基因治疗中主要障碍开辟了新途径。

人 ES 细胞作为基因治疗载体的总体技术策略可参考图 1^[36]。为克服异体移植中的免疫排斥反应,首先将人 ES 细胞进行 MHC 基因操作,建立可供移植配对选择的各种 MHC 组合的 ES 细胞库。在这基础上,根据不同的移植对象和要求,或直接定向诱导分化为功能性细胞(如神经细胞);或定向诱导分化为组织干细胞(如造血干细胞);或通过进一步遗传操作,改造和修正基因组再定向诱导分化为组织谱系干细胞或特定的分化细胞,最终移植输入需基因治疗的患者。在美英等国有数家商业机构专门研究这类 ES 细胞技术学,制备和供应临床

治疗用的不同类型细胞,有的还申请了专利。表明 ES 细胞不仅越来越受到发育生物学家和分子细胞生物学家的重视,而且由于人 ES/EG 细胞与人类健康直接相关的细胞移植和组织工程关系密切,ES 细胞工程正成为新兴的商业竞争热点,将产生巨大的经济效益和社会影响。但是,人 ES 细胞包括从中发展的细胞工程和组织工程要真正在人类医学中得到应用,尚需相当长时日,特别是要解决精确有效地基因组改造,克服细胞移植中的免疫学障碍,定向诱导分化,细胞纯化和永生化以及体外组织构建等问题,并非轻而易举之事。因此,在新世纪的 10-15 年内,ES 细胞工程学将是蓬勃发展、并不断取得突破性成果的生命科学研究前沿。

参 考 文 献

- [1] Bjornson CRR, et al., 1999, *Science*, **283**: 534 - 537.
- [2] Stevens L, 1983, In: "Teratocarcinoma Stem Cell". Eds by Sliver LM, et al., New York Cold Spring Harbor Lab. Pp22 - 36.
- [3] McBurny MW, 1976, *J Cell Physiol*, **89**: 441 - 445.
- [4] Nicolas JF, et al., 1976, *Cancer Res*, **36**: 4224 - 4231.
- [5] Evens MJ, et al., 1981, *Nature*, **292**: 154 - 256.
- [6] Martin G, 1981, *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 7634 - 7638.
- [7] 丛笑倩, 等, 1987 年, *实验生物学报*, **20**(2): 237 - 251.
- [8] Tsung HC(丛笑倩), 等 1990, *Cell Res*, **1**: 35 - 51.
- [9] Shim H, et al., 1997, *Biol Reprod*, **57**: 1089 - 1095.
- [10] Shablott MJ, et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 13726 - 13731.
- [11] Thomson JA, et al., 1998, *Science*, **282**: 1145 - 1147.
- [12] Gearhart J, 1998, *Science*, **282**: 1061 - 1062.
- [13] Felice MD, et al., 1983, *Exp Cell Res*, **144**: 417 - 427.
- [14] Matsui Y, et al., 1992, *Cell*, **70**: 841 - 847.
- [15] 许新等, 1999, *实验生物学报*, **32**(3): 356 - 363.
- [16] Stewart CL, et al., 1994, *Development*, **61**: 626 - 628.
- [17] Solter D, et al., 1978, *Proc. Natl Acad Sci USA*, **75**: 5565 - 5569.

- [18] Yeom Y, et al., 1996 *Development* **122**: 881 - 894.
- [19] 庄孝德, 等, 1964, 发育分析, 译自“Analysis of Development, eds. Willier B. H. et al., 1956”, 科学出版社, pp321 - 412.
- [20] Brower V, 1999, *Nature Biotech*, **17**: 139 - 142.
- [21] Martin FP, et al., 2000, *J Cell Sci*, **113**: 5 - 10.
- [22] Doetschman T, et al., 1985, *JEEM* **87**: 27 - 45.
- [23] Wiles M, et al., 1991, *Development*, **111**: 259 - 267.
- [24] Chen U, et al., 1992, *Proc. Natl Acad Sci USA*, **89**: 2541 - 2545.
- [25] Nakano T, et al., 1994, *Science*, **265**: 1098 - 1101.
- [26] Pacacios R, et al., 1995, *Proc. Natl Sci USA*, **92**: 7530 - 7534.
- [27] 丛笑倩等, 1995, 实验生物学报, **28**(2): 173 - 189.
- [28] 丛笑倩等, 1996, 实验生物学报, **29**(3): 273 - 285.
- [29] 徐洁等, 1991, 实验生物学报, **24**(4): 353 - 367.
- [30] Bain G, et al., 1995, *Dev. Biol*, **168**: 342 - 357.
- [31] Struebing C, et al., 1995, *Mech Dev*, **53**: 275 - 287.
- [32] Dinsmore J, et al., 1996, *Cell Transplant*, **5**(2): 131 - 143.
- [33] Metzger JM, et al., 1995, *Circul Res*, **76**(5): 710 - 719.
- [34] Dani C, et al., 1997, *J Cell Science* **110**: 1279 - 1285.
- [35] Baker RK, et al., 1997, *Develop Biol*, **185**: 201 - 214.
- [36] Rathjen PD, et al., 1998, *Roprod Fertil Dev*, **10**: 31 - 47.

端粒、端粒酶分子生物学研究进展

王天叫 杨善民

(厦门大学抗癌中心 厦门 361005)

随着端粒、端粒酶研究工作的广泛开展,人们已逐步认识到它们与衰老、癌症发生过程中的许多重要的生物学现象相关。因此端粒、端粒酶已成为生命科学研究的一个热点。本文总结了近年来有关端粒、端粒酶的结构和功能及端粒长度、端粒酶活性调节机制的研究进展。

一、端粒、端粒酶的结构和功能

1. 端粒酶的结构和功能

端粒酶的功能主要在于合成染色体端粒的重复序列,以维持端粒长度的稳定性。端粒酶也能对断裂染色体原位形成端粒。端粒酶在正常细胞中是否还发挥其他功能,目前还不清楚。端粒酶是一种核酸蛋白复合物,其组分包括RNA、蛋白亚基。

(1) RNA 许多物种的端粒酶RNA已被克隆,如纤毛虫、酵母、人和鼠等。端粒酶RNA长度一般为160-1300nt,其一级结构同源性差,但都包含有合成端粒重复序列的模板序列。端粒酶RNA不仅具有模板的功能,同时

具有催化的功能(逆转录酶)^[1]。人端粒酶RNA(hTR)基因位于3q26.3^[2],为单拷贝基因,其cDNA及其下游序列共962bp已被测序。hTR基因由RNA聚合酶II进行转录,转录成熟产物约为450nt。hTR模板序列为CUAAC-CCUAAC(46-56)^[3]。hTR最小功能区位于44-203nt,其中在170-179nt,180-189nt,190-199nt间的突变均可使hTR完全失活,提示这30个核苷酸区域对hTR活性是必须的,并可能与端粒酶蛋白组分结合有关^[4]。端粒酶阴性的无限增殖化细胞株,其端粒通过异化延长(Alternative Lengthening of Telomere ALT),hTR仍有表达,亦无突变^[5]。

(2) 蛋白亚基 目前已分离端粒酶蛋白亚基有: p80、p95(四膜虫)^[6], p123(游仆虫)^[7], EST2p(酿酒酵母)^[8], TP1/TLP1(人,鼠)^[9], hEST2p(人)^[10]。

1) p80^[6]: p80为四膜虫端粒酶的一个蛋白亚基,可特异与端粒酶RNA二级结构结合。p80 cDNA已被克隆(GenBank Accession Num-