

小鼠胚胎性干细胞及其在发育和遗传研究中的应用

丛笑倩

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

直接用小鼠胚胎来研究哺乳动物的生长、发育和遗传问题显然是很困难的。从生化或分子水平分析在体胚胎发育过程中基因表达,更往往受到复杂微环境的干扰和材料的限制。因此本世纪60—70年代,人们一直在致力于寻找一个既具有类似胚胎细胞分化性质,又能源源不断取材的实验模型。胚胎性癌细胞(Embryonal Carcinoma Cell, 简称EC细胞)是畸胎瘤干细胞,既有恶性生长、又显示类似早期正常胚胎细胞发育多能性的双重性质^[1]。随后70—80年代间,EC细胞就一直成为研究哺乳类胚胎发育和遗传的模式系统。但由于EC细胞具有肿瘤的某些特性,包括核型的不正常,作为研究正常发育的体外模型仍不够理想,直至1981年直接从小鼠早期胚胎内细胞团(ICM, Inner cell mass)建立了胚胎干细胞^[2](Embryonic Stem Cell, 简称ES细胞)系,才有助于进一步解决研究哺乳动物胚胎发育和遗传的模式问题。本文仅就EC和ES这两种胚胎性干细胞的性质,它们与正常胚胎的关系,以及在发育和遗传分析中的应用作一简单介绍。

一、EC和ES细胞系的建立

1. EC细胞(胚胎性癌细胞或畸胎瘤干细胞)

EC细胞是胚胎性恶性畸胎瘤组织的干细胞,起源于生殖细胞和早期胚胎细胞。异位移植12.5—13.5天的小鼠生殖嵴或8天前的小鼠胚胎,都能诱发出恶性畸胎瘤。要成功地分

离获得EC细胞,首先要进行动物肿瘤细胞的体外培养并传代和筛选,然后才能达到建系或克隆目的。作者曾从小鼠自发畸胎瘤细胞培养,建立了多能B7 EC细胞系^[3],也从F9 EC细胞系克隆到F9-1和F9-3两个克隆亚株。这些细胞株在生长行为,分化发育潜能以及对维生素A酸(RA)反应的敏感性等方面均有所不同^[4]。

根据胚胎移植实验,证明不同品系小鼠形成畸胎瘤频率是受遗传因素影响的。例如C₃H和BALB纯系小鼠产生含有EC细胞畸胎瘤约为50—70%;相反,其他品系如AKR和C₅₇BL小鼠却很少产生这类肿瘤^[5]。胚胎异位移植实验进一步表明,影响肿瘤生成的主要因素是宿主本身的遗传背景,而不是被移植胚胎的遗传因素。

2. ES细胞(胚胎干细胞)

在常规培养条件下,小鼠胚泡极易分化为各种细胞。曾有人提示,有可能把胚泡的ICM细胞经体外培养建立分化型的永久细胞株。但人们更多的注意力是在于如何阻止ICM细胞体外分化,使之继续增殖。循着这个方向,Evans和Kaufman(1981)^[2]通过延误胚胎着床,分离晚期胚泡,并直接培养在用丝裂霉素处理过的小鼠成纤维细胞饲养层上。再经胰酶消化使ICM细胞团增殖,从而得到多个原始的ICM细胞克隆,最终建立了未分化的ES细胞系。同年,有人用免疫手术法(Immunosurgery)分离ICM细胞,在上述的饲养层上用EC细胞的条件培养液培养,也得到未分化的ES

细胞系。后来进一步简化了延缓胚胎着床或免疫手术等复杂步骤,直接把晚期囊胚接种在饲养层上,也成功地建立了ES细胞株^[6,7]。最近有人报道,用小鼠的16-20个细胞的桑椹胚分离得到了ES细胞系^[8],它的成功率比胚胎期ICM的要高得多,46个桑椹胚得到17个细胞系,占37%;而108个胚泡只能得到9个细胞系,仅占9%。这可能由于所培养的桑椹期细胞是单个的,因而减少了促使细胞分化的相互接触和影响,使得这些单个细胞容易增殖,从而使ES细胞的建系成功率远高于发育阶段晚的胚泡。

总之,不论是从胚泡的ICM细胞,还是从桑椹胚细胞都能分离得到ES细胞系。用这种方法建立ES细胞系不受小鼠品系和遗传背景的限制,即使是单性生殖的胚胎和致死突变的同源胚胎,也能得到ES细胞系。

二、EC和ES细胞的性质

1. EC细胞

(1) 核型异常 畸胎瘤初期的EC细胞,具有与正常胚胎细胞相同的染色体数,但随着肿瘤细胞增殖和体外长期传代培养,产生选择作用,染色体数目往往发生异常,细胞的分化潜能也相应地受到限制^[9],虽然有些在饲养层上生长的EC细胞系也可维持其多能的稳定性。另一方面,得到的EC细胞在建系初期就可能是异质性的,包括生长特性,染色体结构以及分化能力等。

(2) 发育潜能 把EC细胞注射到胚胎环境中,虽然能够形成嵌合体小鼠,但形成的比例一般较低。有的也易产生带瘤嵌合体,很少形成生殖细胞嵌合体。即使像具有正常核型的METF-1^[10]和P₁₀^[11]EC细胞,形成嵌合体的能力也很低,前者仅13%,后者虽然形成嵌合体比例高达53%,但也未见有生殖细胞嵌合体。

2. ES细胞

(1) 核型正常 ES细胞是直接从小鼠桑椹胚

和晚期胚泡的ICM细胞直接培养获得的,这种经短期培养而得到的ES细胞,无论在体内或体外都具有高度的分化潜能,同时绝大多数ES细胞系都具有正常的整倍体核型。发育多潜能性和正常整倍体核型这两个特点,可能有着内在的联系。ES细胞在体外极易分化,因此必须生长在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上或培养在大鼠肝细胞(Buffalo Rat Liver Cell,简称BRL)的条件培养液中,否则将不能维持它的未分化状态。

(2) 发育潜能 ES细胞形成嵌合体的能力较高,平均达35%,可参与嵌合体各个器官包括生殖腺的发育。但是在后一类嵌合体,不一定都具有生殖能力,常发现有外表似雄性的畸变现象,可能的解释是:xy型的干细胞被注射到宿主xx型的胚泡中,产生了含有两性的胚胎,在发育过程中干扰了宿主的xx型胚胎正常发育,从而转变为外表似雄性的嵌合体。这种嵌合体不能生殖,经解剖观察证明是雌雄生殖器同体^[13]。

三、EC和ES细胞与正常胚胎细胞的关系

培养的EC和ES细胞一般都来源于发育中的早期胚胎,当然12.5天原始生殖嵴也能产生EC细胞。究竟来源于早期胚胎的什么类型的细胞呢?胚胎细胞的移植实验指出,7天龄的胚胎所含有的原始内胚层,胚胎外胚层和胚外外胚层分别作异位移植时,30天后只有胚胎外胚层形成多种分化组织和大量的未分化的EC细胞^[14]。ES细胞一般都是从4.5天—6天的胚胎直接分离培养得到的,这表明7天龄的胚胎外胚层细胞仍具有全能性质。就EC和ES细胞本身的各种特性而言,它们极接近于5.5天龄胚胎原始外胚层细胞。从细胞形态分析,细胞直径一般为12—14微米,超微结构显示未分化的外胚层细胞特性:核大,多为常染色质,核仁也大;细胞质结构简单,散布着大量的游离核糖体和为数甚少的线粒体。EC

和 ES 细胞均表达 5.5 天龄原始外胚层细胞的表面抗原, 如 Forssman 抗原存在于培养的 EC 和 ES 细胞, 晚期桑椹胚和 ICM 细胞, 但不存在于 6.5 天龄的胚胎外胚层细胞^[16]。培养的 EC 和 ES 细胞并不等于胚胎的 ICM 细胞, 如果将培养的 EC 或 ES 细胞团注射到去除 ICM 细胞的滋养层囊泡中, 并不发育成胚胎^[16]。可能除了 EC, ES 细胞在发育时间上比 ICM 细胞约晚 1 天外, 缺乏 ICM 细胞所具有的与其他整体胚胎细胞相互依赖的有序的完整性, 可能是培养的 EC 和 ES 细胞不能发育成胚胎的原因。

无论 EC 或 ES 多能细胞, 当接种到同系宿主的体内, 都能像肿瘤细胞那样不断增殖并分化为多种类型的分化细胞, 形成畸胎瘤样结构。然而 EC 和 ES 细胞系细胞的这种瘤性生长行为可以通过接种到胚胎环境(胚泡)中而改变或失去。这里, EC 和 ES 细胞往往有着程度的, 有时甚至是本质的区别。ES 细胞的增殖和分化易受胚胎环境的调节信号影响, 参与宿主胚胎各种胚胎组织和器官的形成; 而 EC 细胞系的细胞则不然, 有的 EC 细胞可以为胚胎环境所“正常”化, 参与宿主胚胎的组成, 而大多数 EC 细胞保持继续增殖, 形成肿瘤或引起胚胎死亡。EC 细胞的这种不易“正常化”的性质可能要归因于这些细胞的核型异常。

四、ES、EC 细胞在发育遗传研究中的应用

1. 发育突变体 (developmental mutants) 的研究

通过干扰并分析发育过程中出现的突变, 是研究哺乳类胚胎发育机理的途径之一。至今, 已发现了一些发育上的致死突变, 并确定了它们相应的遗传位点。一般认为, 发育突变体胚胎的不能发育可能是细胞致死效应引起的结果, 也可能是特殊的细胞谱系缺失所致^[18]。

然而, 仅用生化和分子生物学方法还难以

研究胚胎在发育过程中的突变和证明其有关基因产物, 研究发育突变体需要纯合子型的实验材料, 因此就有必要从同源型胚胎建立多能突变干细胞系。这样, 一方面通过比较突变型与野生型干细胞之间的分化潜能, 不仅能了解基因异常表达的结果, 而且也可以知道突变干细胞对发育刺激信号的反应能力; 另一方面也可将这种突变干细胞接种到胚泡中产生嵌合体, 分析这些细胞的发育和分化潜能, 从而有可能较全面地探讨发育突变体问题。值得指出的是, 从 t-复合位点(t-complex)致死突变的纯合子型胚胎成功地建立的 ES 突变细胞系不仅能在体外培养, 而且也可以被诱导分化成各类细胞, 表明这个突变似乎不是通过一些细胞致死效应而起作用的, 也不是由于分化被阻遏的结果。但是胚胎的聚集实验表明, 这些嵌合胚仍不能存活。纯合子型 ES 突变细胞株的建立, 不仅解决了实验材料来源不足的困难, 而且也可从这些细胞中抽提出 DNA, mRNA 和蛋白质等物质, 这些生物大分子物质对研究突变基因的功能, 改造由克隆 t-复合位点基因转化的纯合子型细胞株和恢复其野生型功能都是十分重要和必需的。

2. 胚胎发育

EC 和 ES 细胞都是多能干细胞, 在体内或体外能分化为属于三个胚层来源的各种组织, 许多实验室常用为研究早期胚胎发育的模型。不同的诱导剂和不同的生长条件可以控制 EC 或 ES 细胞的生长分化, 并由此可获得不同分化类型的细胞。同时因后者表达和合成不同的蛋白质, 从而可对比验证正常胚胎发育中的一些重要标志。如 F9 EC 细胞在正常培养中失去分化能力; 但在低浓度的 RA 中 F9 单层细胞可以分化为原始内胚层样细胞, 若这种细胞成聚集状态时, 在同样 RA 诱导条件下又形成脏壁内胚层或体壁内胚层(除 RA 外, 另加诱导因子 cAMP)。前者的标志物是甲胎蛋白, 后者是基膜蛋白。这些衍生于 EC 细胞的内胚层细胞就其表达的蛋白标志而言, 很类似

于胚外组织细胞的谱系^[18]。P 19 EC 细胞系能被控制诱导产生心肌细胞或神经细胞^[19]。根据这些诱导结果,可利用体外培养系统探讨正常胚胎中某些细胞的分化机制。

RA 也能诱导体外 ES 细胞的分化,分化细胞的类型一则依赖于 ES 细胞本身的生长方式和环境,二则不同的 ES 细胞系可产生出不同的细胞类型^[20]。我们最近的实验表明,维生素 A 酸(RA)和双丁酰基环腺苷单磷酸(dAMP)能诱导单层培养的 ES 细胞产生神经胶质样细胞;若 ES 细胞聚集后贴壁培养再经 RA 处理则产生有搏动功能的心肌细胞《实验生物学报》24:353, 1991)。

最近,从胚胎性干细胞制备和筛选 C-DNA 库,进一步证明不同类型的细胞所表达的基因不同,并试图了解这类基因的表达与胚胎发育关系。目前,已分离到许多特异性分化细胞的 c-DNA 克隆。例如,1984 年 Staucey 和 Evans^[21]从 PSMB EC 细胞中分离到 EC₁ 基因,证明这种基因只存在于 EC 和 ES 细胞以及睾丸组织,而在其他分化组织中不表达。鉴于 EC 和 ES 细胞实际上是胚胎的原始外胚层细胞,提示 EC₁ 基因可能在早期胚胎发育中起着调节作用。

3. 外源基因或突变基因嵌合体

近年来,由于细胞转染技术改进,特别是发展了显性选择系统^[22]和构建了高感染病毒载体^[23],使有可能把外源 DNA 有效地导入体外培养细胞。利用 ES 细胞的发育多能性特点,在不改变干细胞多能性质的前提下,这些技术同样也可用来将外源 DNA 导入 ES 细胞,进一步制备嵌合体,从而研究某些外源基因在胚胎发育中的作用,例如探讨这些外源基因在发育中是组织特异性表达,还是发育阶段性表达等问题。如果能建立人类遗传性疾病有关基因的嵌合体模型,研究这些基因在个体发育中的表达规律和探索基因治疗,使之用于造福人类,则意义就更大了。

1986 年,Robertson 等人用磷酸钙沉淀法将 neo 基因导入 ES 细胞获得了成功,产生生

殖细胞嵌合体,提示 neo 基因能稳定地世代传递。男性缺少次黄嘌呤-磷酸核糖转移酶(HPRT)会导致许尼汉氏病(Lesch-Nyhan Syndrome),临床表现为智力迟钝和肢体残缺等症状。1987 年 Hooper 等人建立了 HPRT 自发突变的 ES 细胞系^[24],用逆转录病毒 DNA 随机插入^[25],或用同源重组方法^[26]也得到了 HPRT 缺失 ES 细胞系,最终成功地获得了 HPRT 缺失的嵌合体小鼠。这种模型的建立为探索基因治疗提供了有利的条件。近来有人报道胶原蛋白 II 型基因和 r-晶体蛋白基因在嵌合体小鼠组织中的特异性表达,前者位于嵌合体的身躯,后者分布在晶状体^[27,28]。1989 年 Shinar 等人^[29]将大鼠肌动蛋白和人珠蛋白的嵌合基因转入 ES 细胞,并把这种细胞接种在裸鼠皮下,在所生的瘤状物中分离出来的肌原细胞含有这种嵌合基因 mRNA 的表达。这种肌原细胞经马血清和胰岛素诱导形成肌管后,该 mRNA 表达可增至 5—10 倍。以上实验结果表明,利用 ES 细胞系可探讨外源基因在胚胎发育中的作用。

通过基因嵌合体的分析,也可探讨癌基因的功能,例如癌基因 mT 的功能。用 N-TKmT 载体转染 ES 细胞,再将转染细胞注射到小鼠的胚泡中,发现其中 40% 以上嵌合胚的血管形成不正常,近 40% 嵌合胚产生血管瘤,阻断了进一步正常发育。在这种情况下,即使能得到活的携带血管瘤的嵌合小鼠时,也只能存活 2—6 星期。进一步研究证明癌基因 mT 的表达主要是破坏了内皮细胞和肾上腺皮质细胞的生长^[30]。

五、结 语

综上所述,小鼠 EC 和 ES 细胞与早期胚胎关系如图所示。EC 和 ES 细胞都是多能胚胎性干细胞,相当于在体胚胎 5.5 天龄的原始外胚层细胞。在体内外一定的条件下,能被诱导分化成为各种类型的细胞或组织,如果将它们,特别是 ES 细胞,接种到胚胎环境(胚泡)

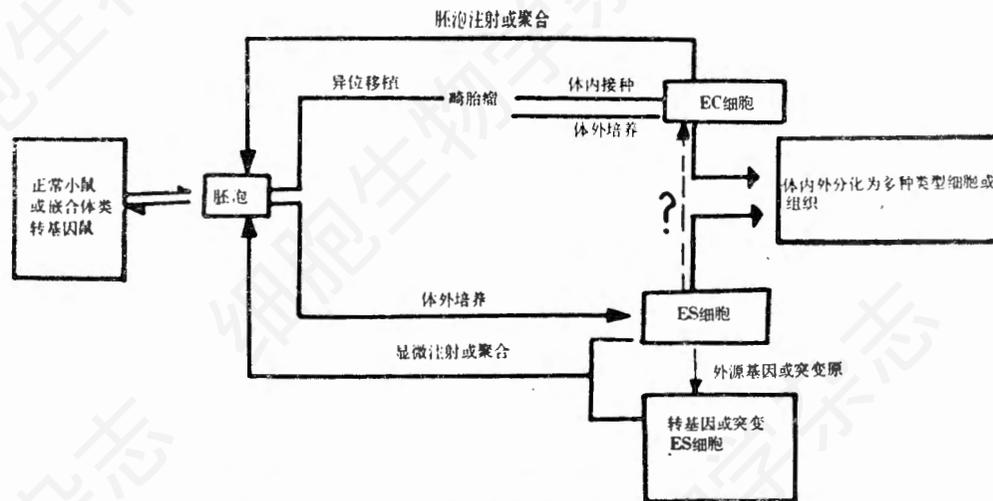


图 小鼠 EC、ES 细胞和早期胚胎之间相互关系图解

——线示 ES 和 EC 细胞之间有何关系尚不清楚

中能参与正常的胚胎发育。但是大多 EC 细胞核型异常，常保持其恶性生长特性；而 ES 细胞则由于核型正常，细胞增殖和分化易受胚胎环境的调节。因此，就作为研究哺乳类发育和遗传问题的模型而言，ES 细胞比 EC 细胞更优越。ES 细胞也是探讨基因，包括外源基因，在胚胎发育中表达和功能的途径之一，更有望在建立人类遗传疾病模型，探讨其发病机理和临床基因治疗等问题上提供有效的手段。

参 考 文 献

- [1] Stevens, L. C., 1964, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 52: 654-661.
- [2] Evans, M. J. and Kaufman, M. H., 1981, *Nature*, 292: 154-155.
- [3] 丛笑倩、姚鑫, 1984, 实验生物学报, 17: 309-321.
- [4] 丛笑倩、姚鑫, 1983, 实验生物学报, 16: 93-105.
- [5] Damjanov, I., and Solter, D., 1982, *Nature*, 296: 95-97.
- [6] Axelord, H. R., and Lader, E., 1983, In Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Vol. 10. eds. Silever, L. L., 1990, M. et al., pp 665-670.
- [7] Tsung H-C. (丛笑倩) and Mummery, C. *Cell Research*, 1: 35-51.
- [8] Eistetter, H. R., 1989 *Develop. Growth and Differen.*, 31: 275-282.
- [9] 丛笑倩, 姚鑫, 1987, 实验生物学报, 20: 237-251.
- [10] Stewart, T. A., and Mints, B., 1982, *J. Exp. Zool.*, 224: 465-471.
- [11] Rossant, J., and McBurney, M. W., 1983, In Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Vol. 10. eds. Silever, L. M., et al., pp 625-633.
- [12] Smith, A. G., and Hooper, M. L., 1987, *Develop. Biol.*, 121, 1-9.
- [13] Robertson, E. J., and Bradley, A., 1986, In "Experimental approaches to mammalian." eds. Rossant, J. and Pedersen, R. A., pp 499.
- [14] Diwin, S., and Stevens, L. G., 1976, *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 937-943.
- [15] Evans, M. J., et al. 1979, In "Cell lineage, stem cells and cell determination". ed. Le Donavin, pp 115-129.
- [16] Rossant, J., and Papaioannou, V. E., 1985, *Exp. Cell Res.*, 156: 213-220.
- [17] Martin, G. R., 1987, *Devel. Biol.*, 121: 20-28.
- [18] Strickland, S., 1981, *Cell*, 24: 277-278.
- [19] McBurney, M., et al., 1982, *Nature*, 299: 165-169.
- [20] Mummery, C. L., et al., 1990, *Cell Differen. Develop.*, 30: 195-206.
- [21] Staucey, A. J., and Evans, M. J., 1984, *EMBO J.*, 3: 2279-2285.
- [22] Mulligan, R. C., and Berg, P., 1981, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 2072-2076.
- [23] King, W., et al., 1985, *Science*, 228:

- 5544—5552.
- [24] Hooper, M., et al., 1987, *Nature*, 326: 292—294.
- [25] Kuehn, M. R., et al., 1987, *Nature*, 326: 295—298.
- [26] Thomas, K. R., and Capechi, M. R., 1987, *Cell*, 51: 503—512.
- [27] Lovell-Badge R. H., et al 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2803—2807.
- [28] Takahasashi, Y., et al., 1988, *Development*, 102: 259—269.
- [29] Shinar, D., et al., 1989, *Differentiation*, 41: 116—126.
- [30] Wagner, E. F., et al., 1989 In “Cell to cell Signals in mammalian development” eds. de Laat, S. W., et al., pp 302—310.

蛋白质磷酸化：叩开细胞有丝分裂之门

杨新林 王永潮

(北京师范大学生物系细胞室 100875)

真核细胞由间期进入有丝分裂期时，伴随着一系列的事件发生，包括细胞形状改变、细胞骨架重排、核膜崩解、核仁分解消失、染色体凝集，以及基因转录和翻译暂时抑制等。与此同时，细胞内蛋白质磷酸化的水平显著上升。进一步的研究表明，上述各种事件可能是由某些特定的蛋白质磷酸化引起的^[1]。导致这些蛋白质磷酸化的是一些特定的蛋白激酶。目前主要集中在 p 34^{cdc2} 激酶的研究。这种激酶是 M 期特异的蛋白激酶，在即将进入 M 期时被活化并维持在高活性水平，于 M 期后阶段失活。现在认为，在 G₂/M 期交界处，活化的 p 34^{cdc2} 激酶导致一系列特定的蛋白质磷酸化，由此叩开细胞有丝分裂的大门。

一、细胞骨架重排

在 M 期起始时，细胞骨架重排主要表现为细胞质微管的解聚和有丝分裂装置的组装。前者导致细胞形状变圆，后者则是遗传物质准确而均匀地分配到两个子细胞中去的结构基础。由间接免疫荧光实验观察到，真核细胞由间期

向 M 期转变时，微管组织中心(中心体、着丝点)的蛋白成分被磷酸化，提示某些蛋白质的磷酸化对于细胞骨架的重排可能起着重要的作用^[2]。最近，Verde 等证明，在非洲爪蟾间期卵母细胞提取物中，微管的动力学及其稳态长度(steady-state length)受到 p 34^{cdc2} 激酶的精确调节，结果导致微管排列发生类似于间期向 M 期转变时的改变。他们发现，p 34^{cdc2} 激酶对分离的中心体所引起的纯化管蛋白的聚合作用并无影响，因此推测在间期卵母细胞提取物中可能存在一种因子，参与对微管的动力学及其稳态长度的调节，其自身又受磷酸化作用的调节。它的活性大小可能是由某种激酶和相应的磷酸酶的活性的相对数量来决定的，而 p 34^{cdc2} 激酶则与该激酶或磷酸酶的活性调节有关^[3]。另外，一些微管结合蛋白(如 X-MAP 和一种 62 kd 蛋白)的磷酸化也对微管的聚合和解聚有一定的影响；一些其他的蛋白激酶(如 p 60^{src}、pK-CaM 等)也参与其中的一些调节过程；p 34^{cdc2} 激酶也可能通过调节上述这些蛋白激酶的活性而间接地起作用^[4-6]。