

体细胞起源的人胚胎干细胞

陈莹^{1,2} 何志旭³ 刘爱莲^{1,2} 王凯^{1,2} 毛文伟^{1,2} 褚建新^{1,2} 卢勇^{1,2}

方贞付^{1,2} 施英唐^{1,2} 杨庆章^{1,2} 陈大元⁴ 王敏康⁴ 李劲松⁴ 黄绍良³

孔祥银⁵ 史耀洲⁵ 王志强⁵ 夏家辉⁶ 龙志高⁶ 薛志刚⁶ 丁文祥⁷ 盛慧珍^{1,2*}

1. 上海第二医科大学发育生物学研究中心 中国 上海 控江路 1665 号(邮编: 200092)
2. 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所 干细胞生物学实验室 中国 上海 控江路 1665 号(邮编: 200092)
3. 干细胞研究中心 中国 广州 中山大学附属第二医院(邮编: 510120)
4. 中国科学院动物学研究所生殖生物学国家重点实验室 中国 北京 海淀区 中关村路 19 号(邮编: 100080)
5. 中国上海第二医科大学/中国科学院上海生命科学研究院健康科学中心(邮编: 200025)
6. 中南大学医学遗传学国家重点实验室 中国 湖南 湘雅路 88 号(邮编: 410078)
7. 上海第二医科大学 新华医院 中国 上海 控江路 1665 号(邮编: 200092)

摘要 根据治疗性克隆假设,可以通过体细胞核移植技术获得与病人具同样基因型的细胞或组织,这样起源的细胞或组织植回病人将不会引起免疫排斥反应。本研究将 5 岁、42 岁、52 岁和 60 岁 4 个不同年龄的人体细胞核植入去核的兔卵母细胞中重新启动,发育至囊胚,并分离人胚胎干细胞。研究结果提示,年龄不影响体细胞被重新启动的效率。经过核型分析,同源染色体分析,原位杂交,PCR 和免疫组化染色等多种鉴定,ntES 细胞具有人染色体。ntES 细胞可以长期增殖并保持不分化状态,也可以形成类胚体并分化出包括神经和肌肉在内的多种细胞类型。由类胚体诱导生成的混合细胞群体表达所有三个胚层(外、中、内胚层)细胞类型标记,说明 ntES 细胞具有分化成所有三个胚层的潜力。因此,从人体细胞核获得的 ntES 细胞与普通人类胚胎干细胞一样具有向多种细胞类型分化的能力。

关键词: 核移植 体细胞核移植 胚胎干细胞 治疗性克隆 兔卵母细胞

动物实验证实,通过核移植与胚胎干细胞技术的结合,可以从体细胞获取胚胎干细胞^[1-4],而且这种胚胎干细胞也具有发育全能性^[4]。根据同样原理,人的体细胞也可以被重新启动以获得胚胎干细胞(核移植-胚胎干细胞, nuclear transfer embryonic stem cells, ntES 细胞)^[5-7]。这样起源的 ntES 细胞植回病人应该不会引起免疫排斥。该方法理论上确立,但可行性还有待验证。虽然在较低等物种可以用体细胞核移植方法产生 ntES 细胞,同样方法在灵长类是否可行尚是个未知数,尤其最近报道猴体细胞核移植会引起很高比例的染色体不稳定,导致胚胎发育中止^[8]。再者,治疗性克隆的可能服务对象大多会是老年人,高龄是否会影响体细胞被重新编程的效率?从人体细胞重编程胚胎中是否可能获得干细胞?这样起源的胚胎干细胞是否有潜力分化成病人所需要的细胞类型?

控制哺乳类胚胎早期发育的机制也许相对保守。牛卵母细胞胞质可以使牛、猪、猴、大鼠^[9]和人

类^[6]的体细胞重编程。此外,兔卵母细胞胞质可以使同种桑椹胚^[10]和体细胞^[11]的核重新启动,并完成全程发育。在种间核移植试验中,兔卵母细胞可以重新启动大熊猫的体细胞,并发育到囊胚阶段^[12]。在本研究中,我们利用兔卵母细胞来重新启动人体细胞核并获取 ntES 细胞,结果表明 ntES 细胞具有与普通人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES 细胞)相同的特性和表型,并保持了正常核型和多系分化的能力。

* 通讯作者:盛慧珍,上海第二医科大学发育生物学研究中心 中国 上海市 控江路 1665 号 新华医院(邮编:200092)。电话和传真:86-21-55570017。电子邮件信箱:hzsheng@sh163a.sta.net.cn

盛慧珍同时为美国德克萨斯大学西南医学中心生殖生物科学研究中心及药理学系副教授

本研究由国家重点基础研究发展规划项目(973 项目-01CBS099),国家高技术研究发展计划(863 计划-2001AA216121),国家自然科学基金项目(30040003),上海市科学技术发展基金项目(99DJ14002, 00DJ14033, 01DJ14003),中国科学院(KSCX-2-3-08),上海市教育委员会和上海第二医科大学资助。

材料和方法

兔卵母细胞和人成纤维细胞

给兔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)后14.5小时,从输卵管中分离出卵丘-卵母细胞复合体,用含透明质酸酶的M2培养液室温消化3-5分钟,用毛细玻璃管轻轻吹几次,脱掉颗粒细胞。然后在7滴100 μ l/滴的M2中,连续洗去兔卵母细胞上的透明质酸酶。人成纤维细胞培养在37 $^{\circ}$ C,培养液为DMEM,15% FBS,50U/ml青/链霉素。在核移植前,用0.05%胰酶将成纤维细胞消化成单细胞,用上述DMEM培养液重悬。

显微操作

将兔卵母细胞置入含7.5 μ g/ml细胞松弛素B和Hoechst 33342(5 μ g/ml),5% CO₂,孵育10分钟。用10-15 μ m外径的针取出第一极体和M期的染色体。在紫外光下,验证取出的染色体^[10]。用同一根针将一个成纤维细胞(核供体)插入去核的卵母细胞的卵周隙内。针沿着去核时在透明带上留下的孔进入。所有的操作在室温下进行。

电融合和nt-单元的培养

将人成纤维细胞/兔卵母细胞复合体在电融合液里(0.3 mol/L葡萄糖/0.1 mmol/L MgCl₂/0.05 mmol/L CaCl₂)平衡5-10分钟。然后放在两个电极中间(0.5 mm),上面覆盖电融合液。将复合体的两细胞接触面调到与电极平行。电击使细胞融合(电击参数为2.4 kv/cm,60 μ s,3次直流电,间隔1秒)。电融合后所形成的细胞体(包括去核兔卵母细胞与人成纤维细胞的全部内涵)称为核移植单元(nt-单元)。将nt-单元在3-4滴RD培养液中洗涤(RPMI 1640/DMEM 1:1),然后,在含15% FBS的RD培养液中置38 $^{\circ}$ C,5% CO₂环境中培养。每日观察胚胎发育,连续5-7天。

ntES细胞的培养

囊胚的内细胞团细胞用机械方法取出,置于丝裂霉素C预处理或照射55Gy的饲养层细胞上(胎鼠13.5天)^[13]。培养液为80% DMEM,20% FBS,1mmol/L谷氨酰胺,0.1 mmol/L 2-巯基乙醇,1%非必需氨基酸,50U/ml青/链霉素。培养环境为37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。在早期实验中,培养液中加入10 ng/ml LIF。后来,我们证明ntES细胞生长不依赖于LIF。培养液中就不再人为加入LIF。有些ntES细胞株,可以培养在80% Knockout DMEM,20% SR,4 ng/ml bFGF,50U/ml青/链霉素^[13-15],ntES也可以用培养人生殖(EG)细胞的培养液培养^[16]。在内细胞团种上几天后,细胞集落出现,边界清楚,大部分是未分化细胞。ntES细胞的传代方式可以是机械方法,也可以是酶消化(胶原酶IV,1 mg/ml溶于DMEM,37 $^{\circ}$ C,3-5分钟),或两种方法结合使用^[13-15]。ntES细胞可以在不同代数被冷冻保存和复苏。

免疫组化

单克隆鼠抗人神经丝蛋白(neurofilamen-H)和单克隆鼠抗nestin购自Chemicon公司。单克隆鼠抗人平滑肌肌动蛋

白(α -smooth muscle actin),MyoD1和兔抗人肌红蛋白(myoglobin),兔抗人第8因子(von Willebrand Factor),兔抗人 α -1-antitrypsin和神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase)购自Dako公司。兔抗Tie-2和 α -fetoprotein抗体购自Santa Cruz生物技术公司。血管内皮生长因子第2受体(VEGF receptor-2)和 β -tublin单克隆抗体购自Sigma公司。SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-10和TRA-1-85单克隆抗体购自Developmental Hybridoma Bank。上述所有抗体的抗原特异性均行成立。此外,在每次实验中都设有阴性和阳性对照来进一步证实每次反应的特异性。生物素和FITC标记的二抗购自Jackson公司。间接免疫组化采用了Vector公司的ABC系统和DAB作为底物。在苏木精蓝色背景上阳性结果为棕色。碱性磷酸酶活性用BCIP/NBT底物来显示。细胞中含有的脂肪滴用下列方法检测:将细胞用4%多聚甲醛固定1小时,用70%酒精冲洗,用2%油红O孵育5分钟,再用70%酒精冲洗。

微卫星遗传标志鉴定

用标准方法^[17]分别从 1×10^5 个成纤维细胞和分化的ntES细胞中用PCR方法扩增基因组上的14个微卫星遗传标志(见图9图版说明)。扩增产物用ABI 3100 Genetic Analyzer电泳分析结果。

Alu探针原位杂交

用机械的方法,将培养中部分分化的ntES细胞克隆挑出。克隆用4%多聚甲醛固定,然后石蜡包埋。新鲜取材的兔和小鼠卵巢用同样的方法固定,包埋。包埋后的组织以5 μ m切片,参照文献^[18,19]中的方法进行DNA原位杂交。组织切片用10 μ g/ml蛋白酶K在37 $^{\circ}$ C温箱中消化15分钟。探针杂交液制备如下:10 μ l 50 \times Denhardt's溶液,50 μ l 50%的硫酸葡聚糖,100 μ l 20 \times SSC,地高辛标记的Alu探针(500 ng/50 μ l),加水至总体积250 μ l,再加入250 μ l甲酰胺。在每个待检组织切片上滴加20-50 μ l探针杂交液,85 $^{\circ}$ C变性10分钟,立即置冰上5分钟,42 $^{\circ}$ C杂交3小时;然后分别用2 \times SSC,0.1 \times SSC,马来酸缓冲液(0.1 mol/L马来酸,0.15 mol/L NaCl, pH 7.5)和含0.5%阻断剂(Roche)的马来酸缓冲液进行洗涤;加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体孵育,然后用NBT/BCIP显色。

兔线粒体DNA的荧光杂交

为了标记兔线粒体DNA探针,在比较了人和兔线粒体基因序列后,设计了3对引物,可以拉出总长为11713bp的兔线粒体特异的DNA片段。在凝胶回收后,用缺口平移法标记dUTP-地高辛,标记后的探针用乙醇沉淀,溶解到杂交液中(50%甲酰胺,2 \times SSC,50 mmol/L PBS, pH 7.0,10%硫酸葡聚糖)。用石蜡包埋核移植囊胚,兔孤雌囊胚和人成纤维细胞,切成4 μ m厚样品片贴在硅烷(APES)处理的载玻片上。同时,人或兔的成纤维细胞被培养在载玻片上,用4%多聚甲醛固定。原位杂交过程如引文所述^[20]。固定在载玻片上的成纤维细胞在酸性环境下(pH 2.0)用0.1%胃蛋白酶(Sigma)37 $^{\circ}$ C消化2分钟。对于石蜡切片,载玻片先在0.2

N 盐酸中室温孵育 10 分钟后,再用 0.1% 胃蛋白酶(pH 2.0) 37℃ 消化 7 分钟。样品经后固定并脱水干燥,加上 6 ng/ μ l 兔线粒体 DNA 探针混合液。探针和样品于 82℃ 共变性 3 分钟后,在 37℃ 过夜杂交。洗涤后,先后与小鼠抗地高辛抗体(Roche)和 Cy3 标记的驴抗小鼠 IgG 抗体(Jackson Immunoresearch)反应,显示信号。必要时用 DAPI 染色显示细胞核。

PCR

挑取 1-3 个 ntES 细胞克隆,先用 0.25% 胰酶/EDTA (GIBCO) 在 37℃ 消化 30 分钟。再用 300 U/ml 透明质酸酶 37℃ 消化 30 分钟,最后在 400 μ g/ml 蛋白酶 K/0.05% SDS 溶液中置 50℃ 消化 4 小时,7 000 rpm 离心备用。人外周血或小鼠成纤维细胞中提取基因组 DNA 的方法如前所述^[17]。PCR 所用引物如下:

人第 7 号染色体 aphoid 序列引物^[21]:
 5' CAAGAAGGCTTCAAAGCAC3',
 5'-TTCATTGGAATCGCGAATAC-3';
 人角蛋白-9 基因引物(Gi: 27484014):
 5' GTTTTAGTGCCAGTAGTTTA3,
 5' GTCCTTGAGATCATCAATAG3';
 小鼠 G3PDH 基因引物(Gi: 10048294):
 5' ATTCCTTGCCAAGAGGTGAC3',
 5' CAGCAAGGCAAGGTAGTGTG3';
 兔乳糖酸蛋白基因引物(Gi: 23957097):
 5' GGTTCCTTTGCAGGCACTTT3'
 5' CGGCTCCCATCCTTCTCACT3'.

PCR 反应条件如下:94℃ 预变性 4 分钟;然后 94℃ 40 秒,57℃ 30 秒,72℃ 30 秒循环,共 40 个周期;最后 72℃ 10 分钟。

结 果

用兔卵母细胞质对人体细胞核进行重编程

成纤维细胞取自手术中丢弃的皮肤组织,分别来自 5 岁、42 岁和 52 岁的男性和 60 岁女性。细胞分离,用含 15% FBS 的 DMEM 及抗生素培养。第 7-20 代细胞用作核供体。新西兰大白兔的卵母细胞按照前述方法去核和融合,nt-单元在 38℃,5% CO₂,含 15% FBS 的 RD 培养液中培养直至囊胚阶段。图 1A 和 1B 显示 nt-单元发育到桑椹胚。此后桑椹胚外层细胞变扁平,囊腔出现(图 1C)。继续培养后,囊胚腔扩张,内细胞团变得更加明显。在 5-7 天内,一部分囊胚孵化出来。图 1D 显示一个囊胚带着内细胞团突破透明带。用 Alu 和兔子线粒体 DNA 的特异探针对 nt-囊胚做双杂交鉴定。结果表明 nt-囊胚包括灵长类基因组和兔的线粒体 DNA (图 2)。因此证明 nt-囊胚起源于被兔卵母细胞重

编程的人体细胞,而不是起源于自然交配或孤雌激活后形成的胚胎。因为在后一种情况下,细胞核和线粒体都应属于同一种系。人体细胞 nt-单元可以发育到囊胚这一事实说明兔卵母细胞是可以重新启动人体细胞核的。

为了验证年龄是否会影响人体细胞被重新编程的效率,我们用同样的电融合参数和培养条件对 4 个不同年龄(5、42、52 和 60 岁)的成纤维细胞进行重编程实验。记录和分析从每一组可获得的融合单元,2-4 细胞胚胎,桑椹胚和囊胚的数目。分析结果表明,体细胞核供体的年龄可能会影响胚胎某一阶段的发育,例如在发育早期 5 岁组只有 21.7% 的融合单元发育到 2-4 细胞阶段,而 60 岁组有 53.4% 的细胞进入 2-4 细胞阶段。但在后期 5 岁组从 2-4 细胞阶段进入囊胚的百分比明显高于其他组(53.8% $P < 0.01$)。但从整体看,各年龄组从融合单元所得到的囊胚的比例并无显著差异(5、42、52、60 岁组分别为 11.7%,10.4%,12.7% 和 13.5%, $P > 0.05$,表 1)。根据这一结果来判断,体细胞核被重新启动的效率大体上不受年龄的影响。在其他哺乳类物种,如小鼠和牛的成年体细胞核也可以被成功地重编程,这和人体细胞核重编程的结果相似^[22,23]。

表 1 不同年龄供体的体细胞形成囊胚效率的比较

年龄(岁)	nt-单元*	2-4 细胞阶段(% nt-单元)**	囊胚数(% nt-单元)
5	240	52(21.7)	28(11.7)
42	221	87(39.4)	23(10.4)
52	300	111(37.0)	38(12.7)
60	133	71(53.4)	18(13.5)

*融合后 0.5 小时倒置显微镜判断。

**5 岁组与 42、52 和 60 岁组相比有显著差异,60 岁组与 42、52 和 5 岁组相比有显著差异。

纺锤体与核型分析

我们用 propidium iodide 和抗 β -tubulin 特异性抗体^[24]对 nt-单元在进行第一次有丝分裂时所形成的纺锤体进行分析,如图 1E-G 所示,nt-单元具有正常纺锤体。此外体细胞核重编程后,我们经常观察到高比例的胞浆分裂和不完全分离现象(图 1H)。对这样的 nt-单元进行染色体分析,它们大多数含有单个未激活的核,提示大多数 nt-单元的不正常分裂是由于体细胞核没有被激活所造成的。

我们又进一步对 174 个 nt-单元(从 2 细胞阶段到囊胚阶段)进行了核型分析,共得到 9 个含有 46 条染色体的中期分裂相。光镜检查认定是人的染色

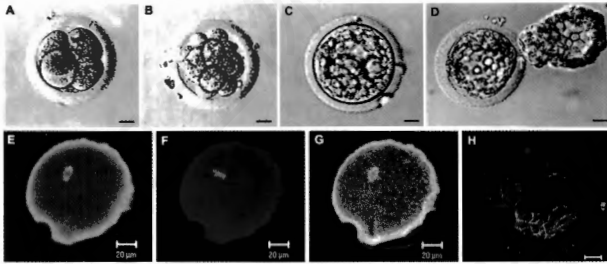


图 1 nt-单元的早期发育

(A-D)用 42 岁个体的成纤维细胞重编程后形成的 nt-单元。(A)激活后 22-24 小时,4-细胞阶段;(B)激活后 48-72 小时,桑椹胚阶段;(C)激活后 5-6 天,早期囊胚阶段;(D)激活后 5-7 天,孵化囊胚阶段。箭头指向透明带上的缺口。(E-G)一个 nt-单元(激活后 6 小时)在第一次有丝分裂中处于 M 期,有正常的纺锤体结构。(E)纺锤体被 β -tubulin 抗体染成绿色,(F)染色体被 propidium iodide 染成红色,(G)为图 E 和图 F 的重叠图。(H) nt-单元包含着一个未被激活的体细胞核(标尺 = 20 μ m)。

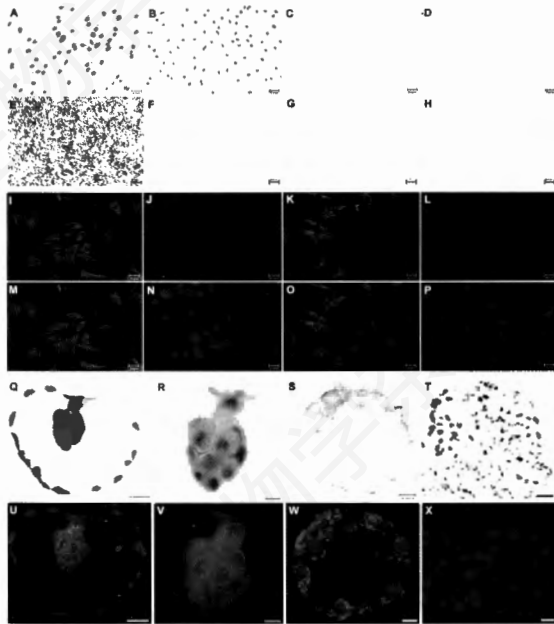


图 2 (A-H)原位杂交实验说明 Alu 探针可特异地检出灵长类细胞核

将培养的 (A)人, (B)猴(猕猴), (C)兔和 (D)鼠成纤维细胞以及 (E)成人肝组织, (F)羊肝组织, (G)兔卵巢和 (H)小鼠卵巢的石蜡切片和 Alu 探针杂交(详述见材料与与方法),只有人和猴细胞核显示阳性信号。(I-P)原位杂交结果证明兔线粒体 DNA 探针的种属特异性。将 (I, M)兔, (J, N)人成纤维细胞或 (K, O)人兔混合细胞与兔线粒体 DNA 探针杂交后,只有兔成纤维细胞显示了阳性信号。(L, P)兔成纤维细胞与去探针杂交液杂交作为阴性对照。(Q-X)nt-囊胚含有灵长类细胞核和兔线粒体。(Q, R, U, V)nt-囊胚, (S, W)兔孤雌囊胚和 (T, X)人成纤维细胞的石蜡切片与 (Q, R, S, T) Alu 探针及 (U, V, W, X)兔线粒体 DNA 探针杂交。nt-囊胚与 (Q, R) Alu 探针和 (U, V)兔线粒体 DNA 探针杂交后均显示阳性。而 (W)兔孤雌囊胚只对兔线粒体 DNA 探针反应;(T)人成纤维细胞只与 Alu 探针反应(A-H 标尺 = 50 μ m, I-Q, T, U 标尺 = 25 μ m, R, S, V, W, X 标尺 = 10 μ m)。

体,G 带显带分析可分辨 300 条带的精确度。证明 nt-单元携带有正常的人类染色体(图 3)。

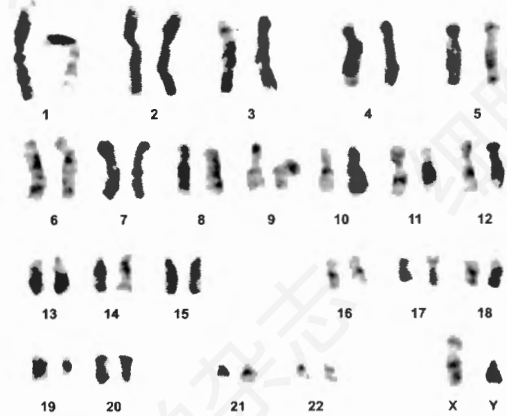


图 3 nt-单元发育至 6 细胞时期的 G 带核型图,显示 22 条常染色体和 2 条性染色体

ntES 细胞的分离和鉴定

为分离胚胎干细胞,用机械方式从囊胚中分离出内细胞团,接种到小鼠的成纤维细胞饲养层上^[13]。我们试用了 3 种不同的培养液^[13-15],它们都可以支持 ntES 细胞生长。

内细胞团细胞种上几天后,出现扁平的紧密排列的细胞团集落(图 4A-C),这些细胞被分散和传到新的饲养层细胞上,又会长成新的集落。ntES 细胞表达很高的碱性磷酸酶活性(图 4D)。用抗 SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-10 和 TRA-1-85 的抗体检测表面标志^[13],ntES 细胞呈 SSEA-1 阴性, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-10 和 TRA-1-85 阳性(图 4E-H)^[13,25]。因此从所表达的表面标志

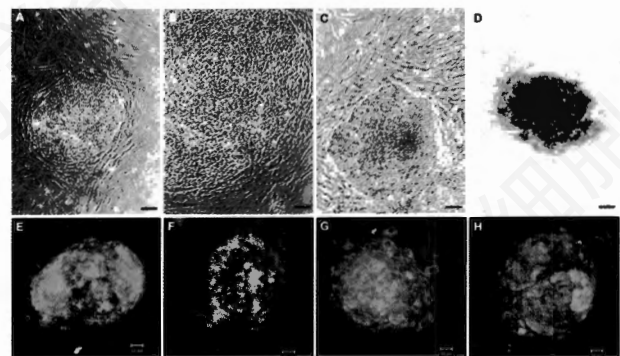


图 4 ntES 细胞的形状和标志分子的表达

(A)起源于 42 岁体细胞核的 ntES 细胞集落, (B)同一集落的放大倍数照片, (C)起源于 52 岁体细胞核的 ntES 细胞集落, (D)传了 26 代的 ntES 细胞的碱性磷酸酶染色。ntES 细胞表达 (E) SSEA-3, (F) SSEA-4, (G) TRA-1-10, (H) TRA-1-85。ntES 染色 SSEA-1 阴性,资料未显示(A 和 C-H 标尺 = 50 μ m, B 标尺 = 25 μ m)。

来看,ntES 细胞与 hES 细胞完全一致。

在过去的两年中,我们做了 289 次核移植试验,除去用于核型鉴定的胚胎外,总共得到 2418 个 nt-单元。其中 1086(1086/2418, 44.9%) 个 nt-单元激活后分裂,从中得到 158 个囊胚(158/1086, 14.5%)。大约 2/3 的囊胚用于分离 ntES 细胞。得到了许多可持续传代的 ntES 细胞群体。在这些细胞群中,14 株传代超过 10 代,4 株传代超过 25 代(1 株 28 代,1 株 35 代和 2 株 44 代)。在过去所试验的许多培养体系中,多数 ntES 细胞生长成又小又紧的集落。最近,一些生长在照射的饲养层细胞上的 ntES 集落长成了单层,这些细胞还正在进一步传代和分析中。对 ntES 细胞线粒体 DNA 分析的初步结果显示,在 ntES 细胞中人和兔线粒体共存(资料未显示)。在今后的研究中,我们需要对线粒体在细胞分化过程中的动态变化进行监测。还需改进培养体系来大量快速扩增 ntES 细胞,并用 ntES 细胞形成畸胎瘤。此外还应摸索 ntES 细胞在无小鼠饲养层细胞培养系统中的增殖条件。

hES 细胞株表达很高的端粒酶活性,因此可以永生^[13, 26]。我们用 TRAP 方法(Telomeric Repeat Amplification Protocol); (Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA, Roche Diagnostics)定量分析端粒酶活性。3 个年龄的成纤维细胞(5, 42, 60 岁)均呈端粒酶阴性。而从它们衍生来的 ntES 细胞表达很高的端粒酶活性,因此,在体细胞重编程过程中,人的端粒酶活性被重新启动了(图 5)。

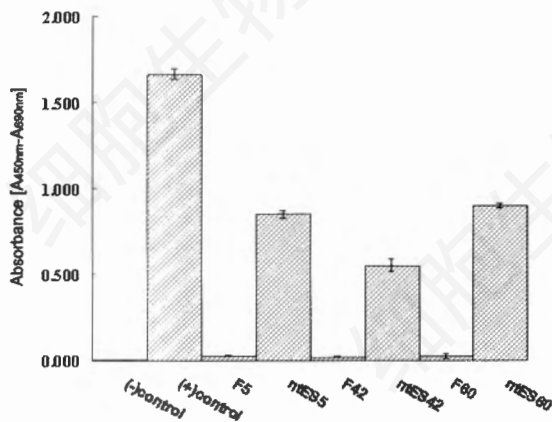


图 5 扩增端粒重复序列来检测 ntES 细胞中的端粒酶活性

起源于 5、42 和 60 岁供体的成纤维细胞及其相应的 ntES 细胞(1×10^5)裂解后测端粒酶活性。阳性对照为永生化端粒酶阳性细胞(人肾细胞系, HEK293 细胞),阴性对照为经过 65°C, 10 分钟处理的 HEK293 细胞。数值为三次重复实验的平均值及标准差(均数 ± 标准差)。

此外,我们还对 ntES 细胞的基因组作一系列监测分析。首先在 ntES 细胞传了 26 代后,对其核型再进行鉴定,证实该 ntES 细胞含正常人的染色体(图 6)。其次用灵长类基因组特异的 Alu 探针^[18, 19]与 ntES 细胞杂交,证明 ntES 细胞核 DNA 含 Alu 重复序列(图 7)。

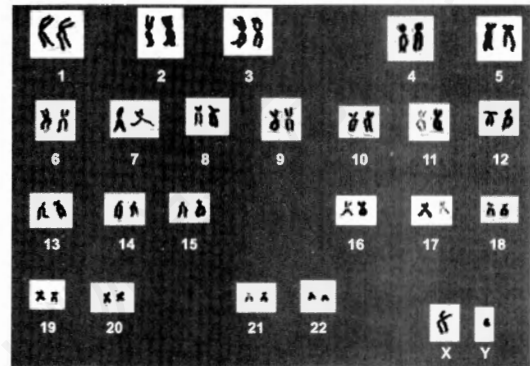


图 6 ntES 细胞具有正常核型

由连续培养 4 个月的 ntES 细胞制备的核型:46, XY, 正常男性。

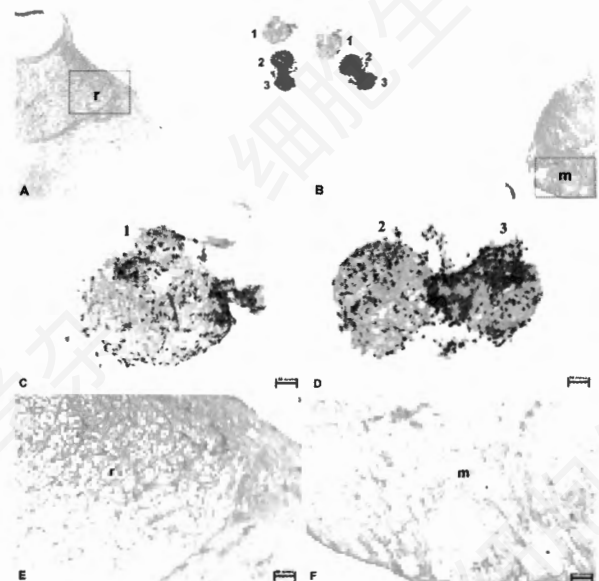


图 7 Alu 探针原位杂交显示 ntES 细胞含有灵长类细胞核

ntES 细胞克隆(1, 2, 3), (r) 兔卵巢和 (m) 鼠卵巢切片在同一玻片上进行 Alu 探针杂交。(A) 低倍镜下显示 ntES 细胞克隆和兔卵巢的位置关系;(B) 低倍镜下显示 ntES 细胞克隆和鼠卵巢的位置关系;(C) 和 (D) 为高倍镜下显示 ntES 细胞克隆的细胞核被 Alu 探针特异染色;(E) 高倍镜下未见兔卵巢细胞核着色;(F) 高倍镜下未见鼠卵巢细胞核着色(标尺 = 50 μm)。

再用人类基因组特异的 7 号染色体 aliphoid 序列和角蛋白-9 基因序列^[21]进行 PCR 分析,证实

ntES细胞含人类基因组(图8)。为了进一步证实ntES细胞是由人类细胞的细胞核重编程而来,我们又对核供体(人的成纤维细胞)和ntES细胞的基因组DNA的STR多态位点的基因型进行了分析。由于ntES细胞必须生长在小鼠的成纤维细胞上,而分化了的ntES细胞则可以单独生长。因此,我们从分化了的ntES细胞中提取DNA,与供体的成纤维细胞就STR多态位点基因型进行了比较。结果表明

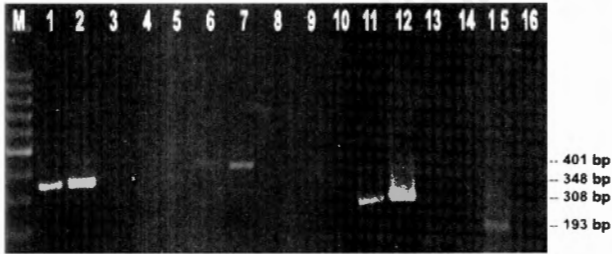


图8 PCR分析显示ntES细胞含有人类基因组

1,2,3,4,5样品使用人7号染色体alphoid序列引物分别扩增ntES细胞DNA、人外周血DNA、鼠饲养层细胞DNA、兔外周血DNA和系统阴性溶液;6,7,8,9,10样品使用人角蛋白-9基因特异性引物分别扩增ntES细胞DNA、人外周血DNA、鼠饲养层细胞DNA、兔外周血DNA和系统阴性溶液;11,12,13样品使用鼠G3PDH基因特异性引物分别扩增ntES细胞DNA、鼠饲养层细胞DNA和系统阴性溶液;14,15,16样品使用兔WAP基因特异性引物分别扩增ntES细胞DNA、兔外周血DNA和系统阴性溶液。

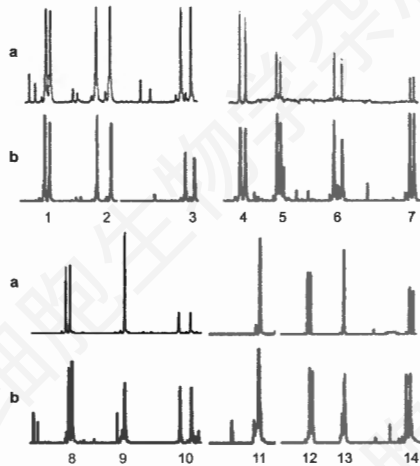


图9 微卫星遗传标志分析证明核供体成纤维细胞与ntES细胞起源于同一个体

比较(a)五岁的供体细胞和(b)源于该供体细胞的ntES细胞毛细管电泳谱带。DNA样品用Profiler-plus Cofiler kit(ABI Biosystem)多重PCR来扩增14个微卫星遗传标志位点(1, D3s1358; 2, vWA; 3, FGA; 4, Amelogenin; 5, D8s1179; 6, D21s11; 7, D18s51; 8, D5s818; 9, D13s317; 10, D7s820; 11, D16s539; 12, TH01; 13, TPOX; 14, CSF1PO),扩增产物经毛细管电泳(ABI 3100 Genetic Analyzer),并用Genescan和Genotyper软件分析结果。

ntES细胞和核供体成纤维细胞的基因组DNA来源于同一个体(图9)。这不容置疑地证明了ntES细胞是由成纤维细胞的细胞核重编程而来。

ntES细胞的分化

用诱导hES或EG细胞分化的方法^[13, 16],也可以诱导ntES细胞的分化。在含LIF、bFGF、Forskolin的培养液中,ntES细胞可以在单层细胞集落的中央形成类胚体(EB),在光镜下观察呈球状结构,有暗色区(图10A)。为了进一步诱导分化,我们将EB移入DMEM,10% FBS, 5×10^{-7} mol/L RA的培养液中。1-2天后,从EB中爬出分化的细胞,在经过5天的RA诱导后,撤掉培养液换成DMEM,10% FBS,10% 马血清,1% 鸡胚提取液,50U/ml青/链霉素。细胞可持续生长,长成一片,EB位于中心(图10B)。这些分化的细胞在原位杂交中呈Alu序列阳性,被验证具有灵长类的基因组(图11)。

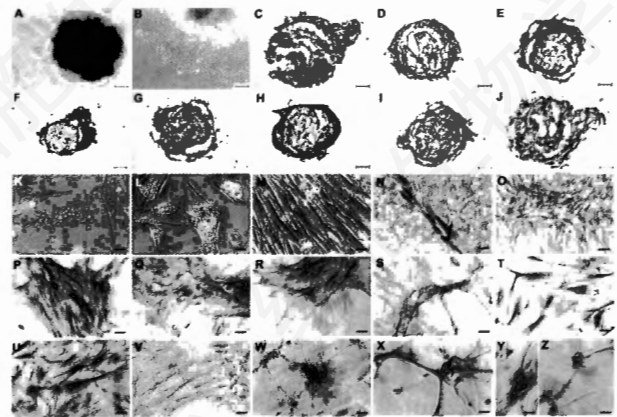


图10 ntES细胞的分化

(A) EB, (B) 从EB中爬出的细胞, (C-J) EB的冰冻切片用抗体染色, (C) nestin, (D) neuron specific enolase, (E) myoglobin, (F) α -smooth muscle actin, (G) VEGF receptor-2, (H) Tie-2, (I) α -fetoprotein, (J) α -1-antitrypsin. (K-Z) ntES细胞的多系分化。(K和L)细胞内脂肪滴油红染色。(M)平行排列的肌纤维,(N) myoglobin染色。(O-V)爬出EB的分化细胞群的表面标志表达:(O) α -fetoprotein, (P) α -1-antitrypsin, (Q) VEGF receptor-2, (R) Tie-2, (S) von Willebrand Factor, (T) nestin, (U) myoglobin和(V) MyoD1。(W-Z)神经元形成。(W) ntES细胞形成的神经网络,(X) neurofilament-H, (Y) neuron specific enolase和(Z) nestin染色的神经元(A-J标尺=50 μ m, K-W标尺=25 μ m, X-Z标尺=12.5 μ m)。

在小鼠,EB是ES细胞初步分化形成的单元,一个充分生长的EB常包含所有三胚层组织^[27, 28]。为了鉴定人ntES细胞形成的单纯EB的内部结构,我们将EB切成5 μ m厚的冰冻切片,并用三胚层标记的抗体来染色鉴定。结果表明:在EB的内部(图



图 11 用 Alu 探针进行原位杂交证实分化的 ntES 细胞具有灵长类的细胞核

用 Alu 探针对(A)分化的 ntES 细胞、(B)人成纤维细胞、(C)兔成纤维细胞和(D)小鼠成纤维细胞进行原位杂交(标尺 = 50 μm)。

10C-J), 大部分是未分化的细胞, 很少有细胞表达了特殊的细胞标记。在 EB 的外层和底层, 我们检测到了多种细胞类型特异分子的表达, 包括 nestin (图 10C), neuron specific enolase (图 10D), (外胚层); myoglobin (图 10E), α -smooth muscle actin (图 10F), VEGF receptor-2 (图 10G), Tie-2 (图 10H), (中胚层); α -fetoprotein (图 10I), 和 α -1-antitrypsin (图 10J, 内胚层)。接下来, 我们用不同的染料和抗体来鉴定 EB 的外层细胞究竟是一群均一的但同时表达多种标记的细胞群, 还是一群由表达不同标记的细胞亚群混合在一起形成的混合细胞群。在贴壁细胞中, 我们检测到含有脂肪滴(油红 O 染料阳性)的细胞(图 10K 和图 10L), 也检测到 myoglobin 阳性的肌肉细胞(图 10M 和图 10N)。此外, 分化的细胞会从 EB 中爬出去, 在培养皿表面长成单层。在这些分化细胞中, 用抗人 α -fetoprotein 和 α -1-antitrypsin 抗体可以检测到长成一簇簇的内胚层细胞(图 10O 和 10P), 也可检测到表达内皮细胞标记的细胞亚群, 它们表达 VEGF 受体, Tie-2 和 von Willebrand Factor (图 10Q-S)。此外大多数分化细胞还表达 nestin (神经细胞前体标记, 图 10T) 和 myoglobin (肌肉细胞标记, 图 10U)。在分化细胞中未测出表达 myoD1 的细胞(图 10V)。这些结果表明, 从 EB 中分化出来的细胞是个混合的细胞群体^[16], 它的功能还尚待研究。培养液的改变可以改变细胞群中各种细胞类型的比例。例如, 在 RA 诱导后, 将培养液换成 DMEM, 10% ITS, 50U/ml 青/链霉素, 可以从 EB 中分化出神经细胞(图 10W)。从 EB 分化得到的神经细胞表达 neurofilament-H (图 10X), neuron-specific enolase (图 10Y)。Nestin 在

神经前体细胞中表达强阳性, 而在较成熟的神经元则表达弱阳性(图 10Z)。

讨 论

本研究主要论证了 3 个观点。首先, 人体细胞核可以被重编程并发育到囊胚阶段。其次, 可以利用非人哺乳类卵母细胞对人体细胞核进行重编程。第三, 可以从囊胚阶段的重编程胚胎中分离出 ntES 细胞, ntES 细胞具有自我更新和分化成三胚层细胞的能力。

ntES 细胞拥有 hES 细胞的很多特征。它们都起源于内细胞团, 表达一样的表面标志, 它们都有很特殊的生长需求, 例如依赖饲养层细胞, 不依赖 LIF, 它们也都有自我更新, 形成类胚体和分化成三胚层细胞的能力。我们的实验资料表明, ntES 细胞符合人 ES 细胞的绝大多数特征, 但还没有完全达到 hES 细胞的所有标准^[29]。因此, 还需要进一步实验来证实 ntES 细胞具有与 hES 细胞一样的发育潜能。

人胚胎干细胞的分离及定向分化^[13-15,30]使细胞疗法成为可能, 通过干细胞移植也许可以使许多现在不可治的疾病得到治疗。但是将 hES 细胞或其衍生细胞移植给病人会像器官移植一样引起免疫排斥。本研究结果显示, 人体细胞可以被非人哺乳类卵母细胞重新启动, 从囊胚阶段的 nt-单元中可以获得胚胎干细胞, 这种胚胎干细胞可以分化成所有三胚层的细胞类型。因此, 利用核移植技术从病人体细胞中获取胚胎干细胞这条路显然是可能的。虽然目前 ntES 细胞中线粒体蛋白的表达状况尚不完全清楚, 但将 ntES 细胞的子代植回病人(核供体)完全可能会被宿主免疫系统认为“自我细胞”而不遭排斥。

用核移植方法对人体细胞核进行重编程提供了一个宝贵的实验体系。该体系除了可以用来解决医学领域的问题外, 还可用来研究早期胚胎发育。在早期发育阶段, 出现很多重要生物学现象, 如全能性、重编程、分化、遗传印迹等。我们对这些现象本身, 以及调控这些现象的机理还了解甚少, 对它们的深入研究会给医学和健康事业的发展提供新的认识。

伦理管理 所有实验均按照国家人类基因组(南方)中心生物伦理管理委员会制定的“人类干细胞研究管理条例(草案)”进行, 该管理条例受到上海市政府的承认, 并在上海

地区实施。该条例禁止以克隆人为目的的任何实验,但允许用体细胞核移植技术获取全能性干细胞。条例允许用动物卵母细胞对人体细胞进行重编程,但目前禁止将这样来源的细胞用于病人。条例禁止将人与动物的配子组合,禁止将体细胞重编程的胚胎植入任何物种的子宫,或在体外培养超过14天。条例规定用于体细胞核移植试验的组织必须由病人自愿捐献,并填写“知情同意书”。

致谢 本文作者衷心地感激 M. Brown 教授, J. L. Goldstein 教授, D. L. Garbers 教授以及 R. Hammer 教授对我们手稿的评阅。我们还衷心地感谢朱佑明、唐郑雅、丁文俊、彭超、倪敏洁、王阳的出色技术支持以及胡兰殿博士的 DNA 微卫星分析。同样我们也感谢张丽君老师的核型分析和郭强苏老师在激光共聚焦显微镜分析方面提供的帮助。

陈莹、刘爱莲、王凯、毛文伟、卢勇、杨庆章译自《Cell Research》,2003,13(4):251-263。盛慧珍审校。

参 考 文 献

- [1] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotechnol.* 1998, **16**: 642-646.
- [2] Munsie M J, Michalska A E, O'Brien C M, et al. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.* 2000, **10**: 989-992.
- [3] Kawase E, Yamazaki Y, Yagi T, et al. Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* 2000, **28**: 156-163.
- [4] Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science.* 2000, **292**: 740-743.
- [5] Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science.* 1999, **283**: 1468-1470.
- [6] Lanza R P, Cibelli J B, West M D. Human therapeutic cloning. *Nature Med.* 1999, **5**: 975-977.
- [7] Colman A. Kind A. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends Biotechnol.* 2000, **18**: 192-196.
- [8] Simerly C, Cominko T, Navara C, et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science.* 2003, **300**: 297.
- [9] Dominko T, Mitalipova M, Haley B, et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 1999, **60**: 1496-1502.
- [10] Yang X, Jiang S, Kovács A, et al. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 1992, **47**: 636-643.
- [11] Chesné P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology.* 2002, **20**: 366-369.
- [12] 陈大元,孙青原,刘冀琰等。大熊猫供体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育。中国科学(C辑)。1999, **29**: 324-330.
- [13] Thomson J A, Itskovitz-Eldo J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998, **282**: 1145-1147.
- [14] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000, **6**: 88-95.
- [15] Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol.* 2000, **18**: 399-404.
- [16] Shamblo M J, Axelman J, Littlefield J W, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, **98**: 113-118.
- [17] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [18] Brüstle O, Choudhary K, Karram K, et al. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat. Biotechnol.* 1998, **16**: 1040-1044.
- [19] Rubin C M, Houck C M, Deininger P L, et al. Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interspersed repeated human DNA sequences. *Nature.* 1980, **284**: 372-374.
- [20] Van de Corput M P, van den Ouweland J M, Dirks R W, et al. Detection of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts of patients with Pearson's syndrome by two-color fluorescence in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 1997, **45**: 55-61.
- [21] Dunham I, Lengauer C, Cremer T, Featherstone T. Rapid generation of chromosome-specific alphoid DNA probes using the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 1992, **88**: 457-462.
- [22] Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, **58**: 376-383.
- [23] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, **97**: 990-995.
- [24] Wang W H, Meng L, Hackett R J, et al. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility.* 2001, **75**: 348-353.
- [25] Pera M F, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 2000, **113**: 5-10.
- [26] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994, **266**: 2011-2015.
- [27] Doetschman T C, Eistetter H, Katz M, et al. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1985, **87**: 27-45.
- [28] Rathjen P D, Lake J, Whyatt L M, et al. Properties and uses of embryonic stem cells; prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998, **10**: 31-47.
- [29] Brivanlou A H, Gage F H, Jaenisch R, et al. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science.* 2003, **300**: 913-916.
- [30] Odorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001, **19**: 193-204.