

胚胎干细胞与胚胎生殖细胞^{*}

徐小明, 杨炜峰, 窦忠英^{*}, 华进联

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 胚胎干细胞与胚胎生殖细胞同属于胚胎源的多潜能干细胞。胚胎干细胞是从附置前胚胎内细胞团分离而来的, 而胚胎生殖细胞来自胎儿原始生殖细胞。二者在现代生命科学的各个领域都有着广阔的应用前景。对胚胎生殖细胞的特性, 胚胎干细胞与胚胎生殖细胞的异同以及二者的应用前景作一综述。

[关键词] 胚胎干细胞; 胚胎生殖细胞; 多潜能干细胞

[中图分类号] S814.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387 (2002) 06-0237-04

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES) 与胚胎生殖细胞 (embryonic germ cells, EG) 分别是从小鼠胚胎内细胞团 (inner cell mass, ICM) 和早期胎儿生殖嵴原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 分离克隆出来的一种具有自我更新、无限增殖能力, 能分化成代表 3 个胚层组织细胞能力的干细胞^[1~3]。可以对其进行遗传操作、选择和冻存而不失其多能性。由于 ES 及 EG 细胞的这种特性及潜在的应用前景, 已连续两年 (1999~2000 年) 被列入世界十大科技进展。目前, 有关 ES、EG 细胞的研究已有不少报道, 但随着研究的不断深入, 还有许多基本问题有待于进一步探讨。

1 EG 细胞

1.1 PGCs

PGCs 是各级生殖母细胞和成熟配子共同的祖先, 最早由 W aldeyer 在 1870 年发现并作出描述。哺乳动物 PGCs 来源于胚胎的卵黄囊内胚层, 随后, PGCs 顺着背部间充质迁移到生殖嵴继续分化、发育。小鼠 PGCs 最早出现于交配后 (day post coitum) 7 d, 交配后 8~12 d 处于旺盛迁移增殖期。一方面沿后肠向生殖嵴聚集, 另一方面细胞数目急剧增加, 到交配后 13 d, PGCs 停止分裂, 其数目已由 8 d 时的 150 个左右增至约 25 000 个^[4,5]。

1.2 PGCs 向 EG 转化

处于有丝分裂或减数分裂停滞期前的 PGCs,

在合适的微环境和各种细胞因子存在的条件下, 引起附置期后的 PGCs 转化为 EG 细胞。干细胞因子 (stem cell factor, SCF)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic-fibroblast growth factor, bFGF) 是长期培养 PGCs 不可缺少的, 三者联合作用使细胞内 cAMP 浓度升高^[6], 促使生长于饲养层上的 PGCs 长期增殖。目前, 尚未有从怀孕后期动物胎儿性腺获得 EG 细胞系的报道, 这可能是进入生殖嵴处于有丝分裂静止期的 PGCs 丧失了对 SCF、LIF 和 bFGF 的反应性, 引起其发生的原因可能是某一或更多因子受体表达减少^[4]。抑制细胞凋亡基因 (Bcl-X_L) 和腺病毒蛋白 (E1B 19K) 能阻止 PGCs 的凋亡及抑制其死亡。接头蛋白 (Grb2) 也控制着生殖嵴 PGCs 的生长和存活。另外, 垂体环腺苷激活肽 (PACAP-27, PACAP-38) 也能使 PGCs 体外增殖。小鼠 PGCs 进入生殖嵴, SCF 受体 c-kit 下调, 而处于有丝分裂或减数分裂静止期前的 PGCs 可能是细胞因子阻断了 PGCs 向非成熟生殖细胞分化, 并促进其增殖。几种细胞因子相结合, 使得 PGCs 发育程序发生改变, 阻断了其终末分化, 刺激其大量增殖, 得到 EG 细胞系。

2 ES 细胞与 EG 细胞的比较

2.1 形态学

ES 细胞直径一般为 12~15 μm, EG 细胞一般为 15~18 μm。ES 细胞与 EG 细胞均具有高核质比

^{*} [收稿日期] 2002-03-28

[基金项目] 国家“973”项目资助 (G1999054300); 国家自然科学基金资助项目 (39970363; 30200137)

[作者简介] 徐小明 (1976-), 男, 湖南邵阳人, 在读硕士, 主要从事胚胎干细胞研究。Email: xiaomingxu2002@yahoo.com.cn

^{*} 通讯作者。

率。灵长类ES细胞形成的集落相对扁平,细胞较为松散,易被胰酶消化为单个细胞,而小鼠ES细胞、灵长类及小鼠EG细胞集落隆起,细胞排列紧密,较难被胰酶消化为单个细胞^[7]。

2.2 生物学特性

2.2.1 细胞表面抗原标志 灵长类ES细胞表达SSEA-3, 4 (Stage-specific embryonic antigen, SSEA) 及高分子糖蛋白(TRA-1-60, TRA-1-81), 而人类EG细胞不但表达SSEA-3, 4, TRA-1-60, TRA-1-81, 而且还表达SSEA-1^[1,3]。小鼠ES细胞SSEA-1、起源因子(Genesis)、生殖细胞核因子(Germ cell nuclear factor)及生长因子3(GDF-3)检测均呈阳性,而EG细胞只表达SSEA-1。大鼠ES细胞表达SSEA-1, L-6。牛ES细胞表达SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4。目前,大鼠、牛EG细胞表面抗原的检测尚未见报道。

2.2.2 碱性磷酸酶 在早期胚胎及干细胞中,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性较高,而在已分化的细胞中活性明显降低。大多数哺乳动物ES和EG细胞均表达较高的AP活性,AP染色呈阳性。但牛ES和EG细胞AP活性不稳定。因此,AP活性不能作为牛ES或EG细胞特异性标志^[8]。

2.2.3 端粒酶 端粒酶(telomerase)是一种由蛋白质和RNA构成的核糖核蛋白体,端粒的长度是通过端粒酶来维持的。ES和EG细胞均表达端粒酶活性。Thomson等^[7,9]证实,人类ES细胞高度表达端粒酶活性。端粒酶的激活对于干细胞长期更新、增殖是必须的。

2.2.4 Oct-4 基因 Oct-4是维持细胞多能性的一个重要转录因子,是POU家族成员,缺乏Oct-4的胚胎在附置后不久死亡,因为其ICM不能正常发育,它在早期胚胎发育过程中起着重要的作用。小鼠ES、EG细胞及灵长类ES细胞均表达Oct-4转录产物^[1],但还没有资料报道人EG细胞是否表达Oct-4转录产物。同时,ES和EG细胞分化的表达模式和基因剔除试验表明,Oct-4对维持ES和EG细胞未分化状态是必不可少的。Nawa等^[10]认为,Oct-4基因与ES细胞分化关系密切,人为的调控Oct-4基因在ES细胞中的表达水平,可使ES细胞向不同的方向分化,Oct-4表达水平上调2倍使ES细胞分化为原始内胚层,Oct-4表达水平不变使ES细胞维持未分化状态,Oct-4表达下调使ES细胞分化成滋养层细胞。

2.2.5 印记基因 印记是描述由每个亲本遗传而

来的等位基因之间的行为差异。印记基因是指存在亲本染色体上的等位基因的表达取决于它们是在父源染色体上还是在母源染色体上。来自父系、母系的印记基因有所不同,当精卵结合时,父母双方印记基因均应出现,否则,发育就不正常^[7]。哺乳动物生殖细胞在发育过程中伴随着一系列的特异性基因表达修饰作用,如大范围基因组去甲基化,与印记基因相关的特异性等位基因去甲基化以及X染色体的重新激活等^[11]。印记基因的去甲基化能使两个等位基因共显性表达或隐性表达以调节基因剂量补偿作用,使双亲基因组获得遗传上和功能上的平衡。ES细胞与EG细胞均保留着印记基因,它们在体外都能形成嵌合体已证明了这一点^[12]。ES细胞与EG细胞一个重要的区别是ES细胞与EG细胞的胰岛素样生长因子II受体(Insulin-like growth factor-II receptor, Igf2r)基因甲基化状态不同。ES细胞及正常体细胞印记基因Igf2r包含1个母系甲基化位点和1个父系非甲基化位点,而EG细胞中印记基因Igf2r两个位点均处于非甲基化状态,这可能反映着生殖嵴中的原始生殖细胞和胚泡ICM细胞是两种不同的发育模式^[13]。EG细胞保持非甲基化状态可能是因为体外培养时Igf2r甲基化不稳定的结果。ES细胞印记基因H19父系等位基因的甲基化与体细胞相似,但与ICM不同,提示印记基因H19甲基化与细胞周期数有关,而与细胞分化阶段无关^[12]。EG细胞在形成嵌合体时畸胎瘤发生率比ES细胞高,这可能提示小鼠EG细胞印记基因在EG分离培养时发生了某种程度的改变。

2.2.6 ES及EG细胞培养建系 一般而言,EG细胞培养建系较ES细胞困难,EG细胞在体外培养增殖能力较ES细胞弱,其所需条件特别是饲养层较ES细胞严格。真正意义上的ES及EG细胞建系要求形成生殖系嵌合体后代。目前,除小鼠外,还没有哪一种动物ES或EG细胞得到生殖系嵌合体后代,因此,只能称作类ES细胞系。有关哺乳动物ES细胞建系研究较多,大鼠、牛、羊、猪、兔、恒河猴及人^[9]均得到了类ES细胞系,而EG细胞仅在猪^[14]及人^[3]上建立类ES细胞系。Odorico等^[15]分离一个ES细胞株体外培养超过2年,达300多倍增次数(population doubling, PD)。Mitalipova等^[16]从致密桑椹胚分离牛ES细胞,最高1株传至150代。Shamblott等^[3]将人EG细胞传了20多代。国内,西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心华进联^[17]从人流产胎儿中分离出EG细胞,现

已传至13代。李松^[18]自牛5~13周龄胎儿原始生殖嵴及周围组织分离克隆出EG细胞,最高1株传至15代。EG细胞在体外培养增殖时间不及ES细胞长,但还没有证据显示EG细胞的寿命是有限的。EG细胞能否永生还需要进一步研究和证明。

2.3 发育全能性和分化潜能

2.3.1 体外分化实验 Shambloott等^[2]认为,类胚体的形成是ES细胞及EG细胞在体外分化过程中必不可少的一步。但本实验室在对ES细胞及EG细胞进行体外分化实验时发现不形成类胚体,体外分化也可得到心肌跳动样细胞团、神经细胞、成骨细胞和脂肪细胞。ES细胞和EG细胞在体外均能诱导分化成为造血细胞、心肌细胞、神经细胞、血管内皮细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌细胞等^[2,19]。另外,Hamazaki等^[20]证实小鼠ES细胞可诱导分化为肝细胞。Yamane等^[21]报道小鼠ES细胞能诱导分化成黑色素细胞。Nagafuchi等^[22]建立了一个能有效诱导小鼠ES细胞分化为B淋巴细胞的培养体系。但至今还没有人报道EG细胞能诱导分化为肝细胞、黑色素细胞。

2.3.2 体内分化 将小鼠ES细胞或EG细胞注入裸鼠皮下,2~3周后取出瘤块,组织切片可见形成3个胚层的畸胎瘤,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分化的细胞。人ES细胞能形成3个胚层的畸胎瘤,而EG细胞却不能^[3,9,23]。

2.3.3 核移植和嵌合体动物 以ES细胞或EG细胞为核供体,将其注入去核的卵母细胞中来克隆动物。目前,已有ES细胞克隆牛^[24]、绵羊^[25]、小鼠,EG细胞克隆牛、小鼠。但二者在克隆动物方面究竟

有何差异还需要进一步研究。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细胞特有的最基本的特征,也是验证ES和EG细胞发育全能性最有说服力的手段。ES细胞嵌合体动物,如小鼠、大鼠、牛^[26]、猪^[27]、兔^[28]已有报道,EG细胞产生嵌合体动物只有小鼠^[29]和猪^[14]上有报道。但只有小鼠能形成真正意义上的生殖系嵌合体后代^[1,13]。EG细胞与宿主胚胎嵌合时畸胎的形成率比ES细胞高。

3 ES/EG细胞的应用价值与前景

随着基因工程和胚胎工程技术的迅速发展,已愈加显示出ES和EG细胞在生物医学及畜牧业生产上的巨大应用价值。ES/EG细胞最具有潜力的应用领域表现在移植医学上,在特定的条件下可诱导其分化为特定的细胞,乃至在体外构建特定的组织或器官。如诱导分化为心肌细胞来治疗心肌梗塞等病症;分化为胰岛细胞可根治糖尿病;分化为神经细胞,一些帕金森氏综合症、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨氏症等就可得到治疗等。对ES/EG细胞进行基因改造,把外源基因定点插入或把内源基因剔除,可以生产人们需要的生长快、抗病能力强、优质高产的转基因家畜,或获取所需的基因表达产物,如药用蛋白。用ES/EG细胞可以克隆出优质高产的家畜,从而大幅度提高良种家畜的繁殖效率。ES/EG细胞系的建立将对药理研究和新药开发产生巨大的影响。总之,ES/EG细胞的研究与应用将会极大地推动细胞生物学、发育生物学、遗传学等基础学科的发展,并将引起生物制药工业、临床医学和畜牧业生产的巨大变革,从而为人类创造无限的财富。

[参考文献]

- [1] Pera M F, Renbindoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells [J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113: 5- 10
- [2] Shambloott M J, Axelman J, John W, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 113- 118
- [3] Shambloott M J, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (23): 13726- 13731
- [4] Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, et al. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1991, 353: 750- 753
- [5] James L, Rensinck L, Binler L, et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture [J]. *Nature*, 1992, 359: 550 - 551
- [6] Pesce M, Anastasiadis K, Scholer H R. OCT-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 65 (3, 4): 144- 152
- [7] Thomson J A, Odorico J S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines [J]. *Focus*, 2000, 18: 53- 57
- [8] Strechenko N, Global A B S, Deforest W I. Bovine pluripotent stem cells [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 134- 140

- [9] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282 (5391): 1145- 1147.
- [10] Niwa H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of OCT-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells [J]. Nat Genet, 2000, 24: 372- 376
- [11] Tada M, Tada T, Lefebvre L, et al Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells [J]. EMBO J, 1997, 16: 6510- 6520
- [12] Jeffrey R M. Imprinting in the germ line [J]. Stem Cells, 2001, 19 (4): 287- 294
- [13] Labosky P A, Barlow D P, Brigid L M. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germ line and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines [J]. Development, 1994, 120: 3197- 3204
- [14] Shin H, Gutierrez-A dan A, Chen L R, et al Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells [J]. Biology of Reproduction, 1997, 57 (5): 1089- 1095
- [15] O'dorico J S, Kaufman D S, Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2001, 19: 193- 204
- [16] Mitalipova M, Beyhan Z, First N, et al Pluripotency of bovine embryonic stem cells derived from precompacting embryos [J]. Theriogenology, 2001, 55 (1): 373- 376
- [17] 华进联 源于原始生殖细胞的人、小鼠ES细胞的分离与克隆 [D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2001
- [18] 李 松 从原始生殖细胞中分离克隆牛胚胎干细胞 [D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2001
- [19] Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, et al Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 11307- 11312
- [20] Hamazaki T, Iiboshi Y, Okamoto, et al Hepatic maturation in differentiating embryonic germ cells in vitro [J]. FEBS LETT, 2001, 497 (1): 15- 19
- [21] Yamane T, Hayashi S I, Mizoguchi M, et al Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture [J]. Dev Dyn, 1999, 216 (4/5): 450- 458
- [22] Nagafuchi S, Katsuta H, Kogawa K, et al Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse: in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission [J]. FEBS LETT, 1999, 455 (1/2): 101- 104
- [23] Reubinoff B E, Pera M, Fong C Y, et al Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 399- 404
- [24] Sims M, First N L. Production of calves by nuclear transfer of nucleic from cultured inner cell mass [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 91: 6143- 6147.
- [25] Campbell K H S, McWhi S J, Retch W A, et al Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line [J]. Nature, 1996, 380: 64- 66
- [26] Cibelli J B, Stice S L, Kane J J, et al Production of germ line chimeric bovine fetuses from transgenic embryonic stem cells [J]. Theriogenology, 1997, 47 (1): 241- 246
- [27] Wheeler M B. Development and validation of swine embryonic stem cell: a review [J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6 (5): 563- 568
- [28] Schoonjans L, Albright G M, Li J L, et al Pluripotent rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts [J]. Mol Reprod Dev, 1996, 45 (4): 439- 443
- [29] Stewart C L. Production of chimeras between embryonic stem cells and embryos [J]. Methods Enzymol, 1993, 225: 823- 825

ES and EG cells

XU Xiao-ming, YANG Wei-feng, DOU Zhong-ying, HUA Jin-lian

(Shaanxi Stem Cell Engineering Research Centre, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Both embryonic stem (ES) cells and embryonic germ (EG) cells are pluripotent stem cell derived from embryo. ES cells are derived from the inner cell mass cells of blastocysts, whereas EG cells are derived from primordial germ cells of the developing gonadal ridge and mesentery. ES cells and EG cells have great values and promising prospects in each field of modern life science. This paper reviews the characteristics of EG cells, the differences between ES and EG cells and their applications.

Key words: embryonic stem cells; embryonic germ cells; pluripotent stem cells