人类胚胎干细胞研究述评*

华进联, 杨炜峰, 窦忠英
(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对人类胚胎干细胞(hESCs)的来源、培养方法、建系条件、生物学特性和鉴定方法、遗传操作及其需解决的问题进行了讨论。提出目前研究的重点在于揭示维持 ES 细胞多能性和自我更新的机理, 进一步优化人类和其他哺乳动物类 ES 细胞的分离、培养、建系方法, 探讨其定向分化机理, 建立胚胎干细胞(ESCs)和胚胎生殖细胞(EGCs)的大规模快速扩增技术; 完善 hESCs 向重要功能细胞(生殖细胞)分化的体系; 单细胞比对分析 ESCs、畸胎瘤细胞(ECSs)、EGCs、类胚体(EBs)、各级生殖细胞和成体细胞的基因及蛋白表达图谱, 以探求生殖细胞、成体细胞、ESCs、ECSs、EGCs 的本质区别, 积极开展将 ES 细胞用于治疗人类疾病模型的研究。

[关键词] 人; 胚胎干细胞; 分化
[中图分类号] Q 813 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)03-0001-06

Review on human embryonic stem (ES) cells

HUA Jin-lian, YANG Wei-feng, DOU Zhong-ying
(Shaanxi Centre of Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Human embryonic stem cells (hESCs) are derived from the inner cell mass (ICM) and have the ability to self-renew and produce one or more differentiated cell types, which can be differentiated into derivatives of all three embryonic germ layers when transferred to an *in vitro* environment and have the ability to form any fully differentiated cells of the body. Human ES cells have enormous potential as an unlimited source of cells for cell-based replacement therapies, tissue engineering, and as a model for early human development, cell defierentiation, etc. In recent years, establishment of human ES cell lines and their differentiation have made great progresses. This paper review the derivation of hESCs, ethica problems, difficulties in establishment of human ES cells lines, directed differentiation immunological rejection and other problems greatly restrict the research of human ES cells. Now, we should focus on the research of the mechanism of self-renewal and differentiation of embryonic stem (ES) cells as well as adult stem cells, improve the efficiency of establishment of human ES cell lines and their specific differentiation into some important mature functional cells, master the technology and method of quick proliferation in a large scale, analyse and compare the gene and protein expression patterns of embryonic stem cells (ESC), ECSs, embryonic germ (EG) cells, embryoid bodies (EBs), germ cells (GCs) at differential stage and adult cells, to explore the essential differences between them.

Key words: human; embryonic stem (ES) cells; differentiation

自 1998 年, 人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)建系以来, 人们在 hESCs 的分

* [收稿日期] 2005-12-31
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30200137); 国家"973"计划项目(G199954304-3); 国家"863"计划项目(2002AA216161, 2005AA19050); 教育部重大科技专项(03160); 陕西省重大科技计划项目; 西北农林科技大学青年学术骨干基金项目
[作者简介] 华进联(1971-), 男, 陕西商州人, 副研究员, 博士, 主要从事干细胞与胚胎工程研究。E-mail: jlhua2003@126.com
[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离培养、建系和定向分化研究上已经取得一些重要进展[1-33]。相继有 20 多个实验室报道已建立 hESCs 系,但可供公共使用的 hESCs 不到 20 株,各个 hESCs 株的生物学特性并不相同,建系的 hESCs 株远不能满足应用的需要。本文对 hESCs 的来源与培养方法、建立和维持 hESCs 系的条件、hESCs 的生物学特性及鉴定方法、hESCs 的储藏、遗传操作及 hESCs 研究面临急需解决的问题进行了评述,以供相关的研究人员参考。

1 人类胚胎干细胞的来源与培养方法

hESCs 建系方法与小鼠等其他动物相似。hESCs 系的主要来源为体外受精囊胚,最近科学家也在尝试应用细胞核移植胚胎和早期发育的桑椹胚等来分离培养 hESCs。hESCs 来源与培养方法主要有以下几种。

1.1 囊胚法

囊胚内细胞团(Inner cell mass, ICM)是分离 ESCs 的最常用材料。将人工受精的胚胎或正常体内受精的胚胎培养至囊胚,分离培养其 ICM,进一步分离培养增殖的 ICM,得到 ES 细胞集落,传代增殖并检测后即得到人 ES 细胞系。目前所建立的 hESCs 系基本上都是由人工体外受精培养至囊胚期的 ICM 分离培养得到[1,8,27,31]。其具体技术路线为:囊胚→脱透明带(Tyrode 酸或链蛋白酶或机械法)→去滋养层细胞(免疫外科法或酶消化法)→纯化的 ICM →适宜的饲养层上扩增 ICM →离散增殖的 ICM 为小细胞团块→重新接种在饲养层上培养→离散 ES 细胞集落为小细胞团块→接种在饲养层上传代培养→出现多个 ES 样集落→在饲养层上或无饲养层扩大培养→鉴定→hESCs 系。近几年,世界上很多实验室报道由人囊胚 ICM 建立 hESCs 系,但由于各个实验室使用的胚胎质量、培养条件、建系标准和统计方法不同,所以不同实验室的建系效率具有明显差异(17%～100%)。

1.2 克隆胚胎法

将通过细胞核移植技术得到的克隆胚胎体外培养至囊胚,分离培养其 ICM,进一步分离培养获得 hESCs。克隆胚胎 hESCs 的分离培养过程与囊胚源胚胎相似。克隆胚胎法分离 hESCs 即是常说的治疗性克隆。采用这种技术可以为特定病人建立特化 ES 细胞系,可望真正实现个体化的治疗。目前估计该技术尚需 10～15 年时间才能相对成熟。也有研究者尝试利用其他哺乳类动物的卵细胞作为人体细胞核的受体进行细胞核转移研究,如用牛或兔的卵细胞作核受体构建克隆胚胎,以分离 hESCs。Chen 等[5]用兔卵母细胞作受体,人类体细胞作供体克隆出早期胚胎,并得到 hESCs。该类细胞存在异种受体卵母细线粒体的遗传问题,其是否能用于细胞移植治疗有待于进一步研究。

1.3 胚胎单卵裂球法

采用附植前遗传学诊断技术自 8 细胞期小鼠胚胎提取单个卵裂球细胞,与 100 个 GFP 标记的 129Sv/CD ES 细胞在微孔内用类似 ES 细胞培养的方法共培养。扩增纯化培养可得到 ES 细胞系和滋养层细胞系[9]。目前,尚未见到自单个卵裂球细胞分离得到 hESCs 系的报道。

1.4 胚胎干细胞融合法或胚胎干细胞提取物共培养法

Cowan 等[9]通过化学途径使人体皮肤细胞与胚胎干细胞融合(即利用胚胎干细胞的细胞质与成人体细胞核形成融合细胞),使核内遗传信息重新编程,从而使体细胞具有多能性或全能性,证明人 ESCs 的胞质同卵母细胞的胞质一样,可以启动体细胞核的重新编程。融合的杂交细胞具有 ES 细胞特性。有人认为,干细胞中有些人类尚不了解的物质,能够打开体细胞的基因"开关",让体细胞重归到 ES 细胞状态。有研究表明,将 293T 细胞与畸胎瘤细胞的提取物共培养,可以使 293T 细胞重编程,获得畸胎瘤细胞的多能性[34]。Collas 等采用此种技术使许多细胞表型发生转归。如果此项技术在人类 ES 细胞上获得成功,那么在人类 ES 细胞建系时就不需要人类胚胎,只需成体细胞即可得到人类 ES 细胞系,可以避免破坏人类胚胎引起的伦理学问题。

1.5 孤雌激活胚胎法

小鼠和非人灵长类孤雌激活胚胎源的胚胎干细胞已成功建系[14]。人类孤雌生殖胚胎干细胞系的建立已经有人在尝试,这为 hESCs 的分离克隆开避了一条新的途径,可解决用胚胎研究引起的伦理问题。但其与正常胚胎源的 ES 细胞是否完全相同,是否能替代 hESCs 尚需深入探讨。

1.6 其他途径和来源

最近研究表明,羊水细胞内可能含有一些具有多能性干细胞特性的细胞,可作为 ES 细胞的另外一个有效来源。有人从新生鼠睾丸[35]、羊膜、羊水和脐带血细胞内分离出 ES 样细胞,基本具有 ES 细胞的各种特性,表明 ES 细胞可能具有更广的来源。在胚胎以外的其他组织器官中发现的 ES 细胞样细

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞, 其来源可能有 2 个途径: 一是在机体发育过程中潜伏下来的 ES 细胞, 二是来源于成体组织的干细胞。这些细胞在一定的微环境作用下, 重新编程恢复多潜能性。成体组织 ES 样细胞的发现, 可以避免用胚胎分离 ES 细胞的伦理学困扰, 为细胞移植治疗提供了更广的细胞来源。

2　建立和维持 hESCs 系的条件

2.1　饲养层

饲养层是建立和维持 ES 细胞系的必要条件。迄今为止, 已分离得到的非人灵长类和人 ES 细胞系均是在饲养层条件下建立和维持的。有研究表明, 小鼠胚胎成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF) 作为建立 hESCs 系的饲养层是有效可行的[10]。但由于MEF 一般仅能维持生长至 5 代左右, 用MEF 作为建立 hESCs 系的饲养层, 需不断地分离MEF, 因此工作量相当大。更重要的是MEF 为异源细胞, 用其培养 hESCs 存在传播病原体和造成异种蛋白污染的危险。因此, 人们在尝试用其他饲养层来替代MEF, 如人胚胎成纤维细胞[28]、输卵管上皮细胞[20]、子宫内膜上皮细胞[20]、人骨髓间质干细胞[4]、包皮成纤维细胞[13, 25]、商品化的成人和胎儿成纤维细胞[29]以及 hESCs 分化的成纤维细胞等[23]。结果表明, 人源饲养层细胞在一定程度上能替代MEF, 作为 hESCs 的饲养层细胞。人类饲养层细胞在体外可以连续传代, 不仅较MEF 可以节约大量时间, 而且用同一材料作饲养层相对较不同批次的MEF 稳定。另外, 还可避免用 STO 或MEF 培养 hESCs 时存在异种蛋白污染等危险。但尚未见到用人源饲养层细胞直接培养人类胚胎建立 hESCs 系的报道。

饲养层对 hESCs 系的建立和维持是必需的, 但用何种细胞作饲养效果最好还需要深入研究, 以解决异源蛋白污染和疾病传播的问题。目前, 各个实验室所用的细胞饲养层和效果报道有差异, 作者认为这是由于各个实验室所用的细胞活力、细胞密度等差异引起的。筛选人源饲养层或无饲养层、无血清的大规模扩增技术是研究的方向和趋势。

2.2　培养基组成

hESCs 系的培养基组成与mES 细胞系的培养基组分相似。一般采用高糖DMEM (葡萄糖质量浓度为 4 500 mg/L) 培养液, 补加体积分数 15%～20%的胎牛血清 (FBS 或 FCS) 或血清替代品 (KSR) 和其他一些微量营养成分(如非必需氨基酸、谷氨酰胺等)、抗氧化剂(如 2-巯基乙醇(2-ME)) 和抗生素等。多数研究认为, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), FBS 或 KSR 在 hESCs 培养中具有重要作用[13, 32]。hESCs 不像小鼠 ES 细胞那样依赖于LIF, 但需要 bFGF, 所以有些人用不含LIF 的培养液培养 hESCs。目前, 对生长因子(如LIF 和 bFGF) 在 hESCs 的作用还没有统一的认识。但多数研究认为, bFGF 是 hESCs 自我更新和维持未分化状态所必需的。目前, 许多学者对影响 hESCs 分离培养的因素进行了研究, 发现其可能与 hESCs 的多能性维持和增殖有关(表 1)。

表 1　细胞因子等对 hESCs 分离培养的影响

Table 1　Effects of cyteskines on isolation and culture of hESCs

影响因子 Factor	效果 Result	报道者 Reporter
BMP-2	-	Pera, et al, 2004
BMP-4	-	Xu, et al, 2002
SMAD1	+	Xu, et al, 2005
MEF-CM, ECM	+	Amit, et al, 2000
bFGF	+	Xu, et al, 2001; Xu, et al, 2005; Wang, et al, 2005
PI3K/Akt/PKB	+	Kim, et al, 2005
TGF-beta 1	+	James, et al, 2005
GSK 1	+	Sato, et al, 2004

注: +. 促进 hESCs 的增殖; -. 不利于 hESCs 的增殖。

Note: +. Enhancing propagation of hESCs; -. Detrime to propagation of hESCs

目前, hESCs 研究重点在于筛选使胚胎干细胞保持在未分化状态的最佳培养体系; 检验得到的胚胎干细胞生物学特性是否稳定。

3　hESCs 的生物学特性及鉴定方法

hESCs 与小鼠胚胎干细胞(Mouse embryonic stem cells, mESCs) 相似, 体积小, 核大而明显, 有一个或多个核仁, 核质比高。ES 细胞在体外培养时呈集落状生长, hESCs 集落与小鼠的集落形态明显不同, 呈相对松散、扁平状集落, 集落内细胞界限隐约可见。hESCs 具有正常稳定的二倍体核型和带型。hESCs 碱性磷酸酶活性呈阳性, 已分化的细胞呈弱阳性或阴性。hESCs 表达的人早期胚胎阶段特异性抗原有: SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 和 TRA-1-81。hESCs 还表达Oct4、Fgf4、H2az、Foxd3、Nanog 和 Sox2 等与多能性有关的关键蛋白[2, 7, 17]。另外, hESCs 具有高端粒酶活性及向 3 个胚层细胞分化的潜能。hESCs 的生物学特性为自我更新及全向分化。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 hESCs 的遗传操作

ESCs 的遗传操作包括外源性基因瞬时表达、以附加体形式在染色体外表达、随机整合外源性基因表达及传统的通过同源重组实现基因打靶。多种基因转染途径均可在小鼠 ESCs 基因组的多个位点应用,包括瞬时表达、随机整合和定点基因打靶。

一些转录因子,可以使 ESCs 定向分化,转染调控 Nurrl 的 E1a 启动子的 mESCs 可分化为中脑多巴胺型神经细胞;表达 GATA 4 和 GATA 6 的小鼠 ESCs 可分化为胚外中胚层细胞。为避免外源基因对基因组的影响,设计携带有意义的 cDNA 附加体载体组成表达分化因子以达到诱导分化的目的。用拮抗剂 Sfrp2 可刺激小鼠 ESCs 向神经祖细胞分化,能得到 100% 的目的细胞表型。最近已有多篇关于 hESCs 遗传操作的报道[3, 12, 18],如向 hESCs 转染标记基因 EGFP 及 Oct4 等。由于技术上的限制,传统的 hESCs 转染方法效率较低。同源重组实现定点基因打靶成功率也很低,且 hESCs 单细胞很难增殖,所以 hESCs 遗传操作较 mESCs 难度更大。

5 hESCs 定向分化的研究

hESCs 具有能发育成构成人体 210 种细胞类型中的任何一种的潜力。hESCs 体外定向分化技术是干细胞研究和应用的关键技术,也是生命科学领域的世界性难题之一。目前人们已成功地将 ES 细胞诱导分化出造血干细胞、造血细胞、内皮细胞、肝细胞、脂肪细胞、软骨细胞、神经细胞、胰岛细胞、心肌细胞、成骨细胞,甚至滋养层细胞和生殖细胞等所有 3 个胚层的细胞类型[7, 11, 21-22]。有实验证实,hESCs 能有效治疗心肌梗死、糖尿病、中风等疾病。

6 人类胚胎干细胞研究面临的问题

虽然 hESCs 建系、体外诱导定向分化及进一步将 ES 细胞源细胞用于移植治疗有着诱人的应用前景,但要真正将其应用于临床,还有许多问题有待解决。

6.1 伦理道德之争

人类胚胎干细胞的出现,为成千上万的患者带来了福音,为生物学基础研究提供了良好的模型。因此,人类胚胎干细胞研究成为生命科学领域的热点课题。然而研究胚胎干细胞需要大量的人类胚胎,胚胎干细胞的最终应用需要借助克隆技术解决免疫排斥问题,即实行治疗性克隆,而治疗性克隆距生殖性克隆仅一步之遥。目前,各国普遍已经制定了有关 ES 细胞和治疗性克隆的伦理准则或规范,但有关伦理学的争议仍然是一个不可回避的现实问题。世界各国政府都对生殖性克隆人的行为明确禁止,但对治疗性克隆英国、日本、中国、韩国等支持,认为一个单个的受精卵没有感觉功能,不是真正意义上的"人",通过治疗性克隆可以治愈疾患,是社会的进步;而美国、德国等反对对人类胚胎进行的任何克隆。最近报道的细胞融合法或从单个卵裂球细胞分离建立 hESCs 系,有望解决伦理学的争议问题[9]。

6.2 无饲养层和无血清培养体系规模化扩增 hESCs 体系的建立

ES 细胞是源于 ICM 或 PGCs,经体外抑制分化培养,克隆出的一种具全能性的细胞。由于在胚胎及机体发育过程中,分化和分裂增殖一般同时进行,而在 ES 细胞建系时,要求 ES 细胞既能快速无限增殖,又呈未分化状态。抑制分化和扩增是一对矛盾,必须筛选适宜的培养基。目前,已建立的 hESCs 系远不能满足科学家的需要。另外 hESCs 系的分离培养,迫切需要建立无饲养层和无血清培养体系。因为传统培养常使用 mEF 作饲养层,并使用牛血清,由于血清含有许多生长因子和活性物质,很有可能对分析特定分化细胞的分化调控因子和信号造成干扰。同时对于 hESCs 来讲,牛血清也是一种异源蛋白污染,在很大程度上存在传播动物疫病和产生异种免疫排斥的风险。因此,迫切需要建立 ES 细胞源分化细胞的无血清培养诱导体系。科学家尝试过各种人源饲养层,甚至不用饲养层而用 KSR 结合 bFGF 分离 hESCs,这些方法虽然在一定程度上能提高了 hESCs 分离效率,但目前 hESCs 的分离培养仍然相当烦琐,培养程序、体系和建系检测标准都有待完善。要实现 ES 细胞在临床上的应用,需要建立无饲养层和无血清培养体系,以高效快速大规模扩增 hESCs。

6.3 ES 细胞向特定类型细胞的分化

目前,人们对"定向分化"的条件和准确的分子机理仍然不很清楚,对各种特异性基因、转录因子、细胞因子相互调控作用模式需要进一步深入研究。如何控制 ES 细胞的定向分化是其应用于临床的关键。目前,科学家已成功地将小鼠和人胚胎干细胞诱导分化为神经细胞、造血细胞、心肌细胞、胰岛素分泌细胞等多种功能性细胞,但其定向率还较低,很难得到 100% 纯度的目的细胞。hESCs 诱导分化的成功率远低于小鼠 ES 细胞,得到的大多是包含了目

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的细胞在内的多种细胞的混合物, 目的细胞所占的比率不高。要解决这一难题需明确控制 ES 细胞向特定类型细胞分化的调控基因和环境信号。因为细胞分化是细胞特异基因在时间和空间上差异表达的结果, 主要取决于哪些基因被激活和在什么时间与位点被激活。因此, 可以利用 ES 细胞的体外遗传可操作性, 通过强化或抑制某些基因的表达来形成单一谱系所特有的基因表达形式, 结合培养条件和诱导因子的作用, 提高定向诱导的成功率。基因的修饰和选择、提纯特异性分化的目的细胞, 是 hESCs 成功应用于临床的重要前提。

6.4　ES 细胞源特定分化细胞的扩增与纯化

由 ES 细胞诱导分化而来的终末分化细胞或其前体细胞, 一般只能原代或短期培养, 往往不能在体外大量增殖传代, 不能建立永生细胞系, 并难于筛选纯化, 这就限制了其作为细胞移植治疗供体的临床应用。这一难题可以从细胞永生化方面解决, 如导入 SV 40 病毒的大 T 抗原基因(简称 LTAg 基因) 或端粒酶基因以使其永生化, 可从 ES 细胞诱导分化的细胞群体中建立不同类型分化细胞的永生化细胞系。特定分化细胞可应用特异性抗体结合流式细胞仪或免疫磁珠技术或密度梯度分选技术来筛选纯化, 但由于各种细胞特异性抗体较少, 操作复杂, 且细胞活力受到一定的影响, 所以筛选纯化效率有待提高。

6.5　ES 细胞源细胞用于移植治疗的免疫排斥问题

hESCs 具有独特的免疫"豁免"特权(Immune-privileged), 提示 ES 细胞源的细胞/器官移植手术可能不会发生排斥反应, 因此, 在用 hESCs 进行移植治疗时, 也许可以减少甚至不需要采取免疫抑制手段[36]。但也有报道称, 虽然 hESCs 低水平表达产生免疫排斥反应的重要分子——MHCI, 但在 hESCs 分化过程和 IFN 诱导后, MHCI 上调, 因此同种异体的 hESCs 移植在临床应用时仍存在巨大的免疫排斥危险[19]。在分化、未分化及用干扰素(IFNs) 诱导的情况下, hESCs 均不表达MHCⅡ, 但当其分化为造血系细胞时, 表达MHCⅡ(主要在淋巴细胞表达)。

免疫排斥仍然是 hESCs 进行细胞移植治疗的一大障碍。人们设想可通过以下 4 个途径解决免疫排斥问题: (1) 通过建立"干细胞库", 储存大量的 hESCs 系, 挑选与患者遗传型和MHC 相近的 ES 细胞; 或通过治疗性克隆(基因替换) 以尽量减小供受者之间的免疫排斥。这是一条基础性和长远的工作, 目前许多国家和科学家都相当重视该项研究。(2) 应用免疫抑制剂减轻排斥, 这是临床上最通用的方法, 但免疫抑制剂具有一定的副作用, 且长期用药比较烦琐。(3) 通过遗传操作, 创建"万能供体细胞"。目前应用基因重组技术剔除MHCⅠ, Ⅱ是可行的, 但在皮肤移植中剔除MHCⅠ, Ⅱ仍然会产生排斥作用。这一技术可以说是目前器官移植和免疫学研究的关键性基础问题, 要付诸实践, 尚需时日。(4) 通过造血细胞嵌和、预先移植供体源血细胞等技术提高供者细胞耐受性。此技术需首先将 ES 细胞诱导分化为造血细胞、血细胞, 可行性不大。

6.6　ES 细胞源细胞移植治疗的安全性问题

由于 ES 细胞具有全能性, 因此在进行移植治疗时有形成肿瘤的危险。即使对 ES 细胞体外诱导后再进行移植治疗仍有形成肿瘤的危险, 因为用于移植治疗的分化细胞中有可能混杂有少数未分化的 ES 细胞, 而且部分分化细胞有可能在体内某些条件下去分化变为干细胞。这个问题可能通过在 ES 细胞中插入自杀基因来解决, 移植的细胞如果处于返回到 ES 细胞或进入肿瘤样增殖状态时, 就会启动自杀基因, 导致细胞凋亡。另外, 细胞的突变也是一个危险问题。这个问题的解决可能需要建立稳定可靠的培养和诱导体系。

7　小　结

人类、小鼠和其他哺乳动物类 ES 细胞的分离培养建系及定向分化研究已经取得一些重要进展, 许多研究证实, ES 细胞可以诱导分化为包括生殖细胞在内的 3 个胚层的所有细胞类型。目前研究的重点在于揭示维持 ES 细胞多能性和自我更新的机理, 进一步优化人类和其他哺乳动物类 ES 细胞建系的条件与程序, 建立 ESCs 和 EGCs 的大规模快速扩增技术, 完善诱导其向重要功能细胞(生殖细胞) 分化的培养体系, 单细胞比对分析 ESCs、ECSs、EGC、EBs、各级生殖细胞和成体细胞的基因表达图谱, 探讨生殖细胞、成体细胞、ESCs、ECSs 和 EGCs 的本质区别, 积极开展将 ES 细胞用于治疗人类疾病模型的研究。

[参考文献]

[1] Baharvand H, Ashtiani S K, Valojerdi M R, et al. Establishment and *in vitro* differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst[J]. Differentiation, 2004, 72(5): 224-229.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[2] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. Cell, 2003, 13(5): 643-655.

[3] Cha K Y, Chung H M. Efficient gene delivery in differentiated human embryonic stem cells[J]. Exp Mol Med, 2005; 37(1): 36-44.

[4] Cheng L Z, Hammond H, Ye Z H, et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture[J]. Stem Cells, 2003, 21: 131-142.

[5] Chen Y, He Z X, Lw A I, et al. Embryonice stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes[J]. Cell Res, 2003, 13(4): 251-263.

[6] Choo A B, Padmanabhan J, Chin A C, et al. Expansion of pluripotent human embryonic stem cells on human feeders [J]. Biotechnol Bioeng, 2004; 88(3): 321-331.

[7] Clark A T, Bodnar M S, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro* [J]. Human Molecular Genetics, 2004, 13: 727-739.

[8] Cowan C A, Klimanskaya I, McMahon J, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts[J]. The New England Journal of Medicine, 2004, 3: 1-4.

[9] Cowan C A, Atienza J, Melton D A, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells[J]. Science, 2005; 309: 1369-1373.

[10] Daylon J, Ariel J L, Daniel B, et al. TGFβ/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells[J]. Development, 2005, 132: 1273-1282.

[11] Dolnikov K, Shilkrut M, Zeevi-levin N, et al. Functional properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1047: 66-75.

[12] Gerrard L, Zhao D, Clark J, et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-Specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency [J]. Stem Cells, 2005; 23: 124-133.

[13] José I, Karin, Marie G M A, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells[J]. Stem Cells, 2005, 23: 544-549.

[14] Kent E V, Jason D H, Ashley M G, et al. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells [J]. PNAS, 2003, 100: 11911-11916.

[15] Lee J B, Lee J E, Park J H, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition[J]. Biol Reprod, 2005, 72: 42-49.

[16] Lee J B, Song J M, Lee J E, et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells[J]. Reproduction, 2004, 128: 727-735.

[17] Lee J B, Kim J M, Kim S J, et al. Comparative characteristics of three human embryonic stem cell lines[J]. Mol Cells, 2005, 19(1): 31-38.

[18] Liu Y P, Dovzhenko O V, Garthwaite M A, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably overexpressing enhanced green fluorescent protein[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(6): 636-645.

[19] Martin M J, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid[J]. Nat Med, 2005, 11(2): 228-232.

[20] Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22: 433-440.

[21] Oz P, Irina B, Israel Ben-Dor, et al. Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2005; 23: 923-930.

[22] Park C H, Minn Y K, Lee J Y, et al. *In vitro* and *in vivo* analysis of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons [J]. J Neurochem, 2005, 92(5): 1265-1276.

[23] Stojkovic P, Lako M, Stewart R, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2005, 23: 306-314.

[24] Stojkovic P, Lako M, Przyborski S, et al. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2005, 3: 895-902.

[25] Prowse B, McQuade L R, Bryant K J, et al. A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells[J]. Proteomics, 2005, 5(4): 978-989.

[26] Qi X X, Li T G, Hao J, et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein, kinase pathways[J]. PNAS, 2004, 101: 6027-6032.

[27] Reubinoff B E, Pera M F, Fong C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 399-404.

[28] Richards M, Fong C Y, Chan W K, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(9): 933-936.

[29] Richards M, Tan S, Fong C Y, et al. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2003, 21: 546-556.

[30] Vallier L, Alexander M, Pedersen R A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells[J]. J Cell Sci, 2005, 118: 4495-4509.

[31] Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharenko V, et al. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(1): 105-110.

[32] Xu C, Rosler E, Jiang J, et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium[J]. Stem Cells, 2005; 23: 315-323.

(下转第 10 页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本试验之所以选择*NS*3基因作为靶基因,是因为瘟病毒NS3蛋白具有丝氨酸蛋白酶、NTPase、解螺旋酶活性[5]。CSFV与同属的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)基因组序列具有高度同源性,BVDV NS3蛋白的产生一般与病毒的致细胞病变效应(CPE)密切相关[6]。p80蛋白通过水解NTP获得能量使结合在模板链上的RNA或DNA解脱下来,从而使新合成的RNA链与模板链分离。因此,瘟病毒p80蛋白在病毒的复制及病毒与宿主细胞的相互关系中起着极为重要的作用[7]。

国外学者为了研究病毒非结构蛋白基因的生物学功能,将RNA干扰技术应用于病毒基因沉默的研究中。靶向SARS病毒RNA聚合酶的siRNA分子,阻断了病毒对Vero细胞的致细胞病变效应,并且还阻断了病毒RNA以及蛋白的合成,抑制了病毒的复制[8]。Teresa等[9]构建了针对口蹄疫病毒(FMDV)非结构蛋白2*B*基因编码区的shRNA分子,将这些小干扰RNA分子转染猪体细胞,然后接种FMDV,结果表明针对2*B*基因的shRNA分子至少能沉默4种血清型的FMDV。基于上述的研究成果,本试验设计针对CSFV *NS*3基因的特异性干扰序列,并成功构建了靶向*NS*3基因的重组干扰载体,为CSFV *NS*3基因在病毒复制、增值以及致细胞病变中的生物学功能的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Zamoer P D. RNA interference: listern to the sound of silence [J]. Nature Structureal Biology, 2001, 8(9): 46-51.

[2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenomab-ditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.

[3] Dykxhoom D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger short RNAs that silence youe expression[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6): 457-467.

[4] Palauqui J C, Elmayan, Pollien J M, et al. System is acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions[J]. EMBO, 1997, 6(15): 738-745.

[5] Wiskerchen M M, Collett M S. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing[J]. Virology, 1991, 184: 341-350.

[6] Meyers G, Thie H J. Molecular characterization of pestivirus[J]. Adv Virus Res, 1996, 47: 53-118.

[7] Summerfield A, Hofmann M A, Mccullough K C. Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1998, 63(3): 289-301.

[8] Wang Z, Ren L, Zhao X, et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs inmammalian cells[J]. J Virol, 2004, 78: 7523-7527.

[9] Teresa S, Wu Q H, Sonia A B. Short hairpin RNA targeted to the highlyconserved 2B nonstructural protein coding region inhibits replication of multiple serotypes of foot-and-mouth disease virus[J]. Virology, 2005, 335: 222-231.

(上接第6页)

[33] Xu C, Jiang J, Sottile V, et al. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth[J]. Stem Cells, 2004; 22: 972-980.

[34] Taranger C K, Noer A, Anita L, et al. Induction of dedifferentiation, genome with transcriptional programming, and pigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16: 5719-5735.

[35] Guan1 K, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis[J]. Nature, 2006, 440: 1199-1203.

[36] Li L, Baroja M L, Majamdar A, et al. Haman embryonic stem cells possess immune-privileged properties[J]. Stem Cell, 2004, 22: 448-456.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net