

哺乳动物胚胎干细胞的研究历史和现状

李谱华, 杨 奇, 窦忠英

(西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 与胚胎细胞相比, 胚胎干细胞占有数量优势, 与体细胞相比, 则有低分化的优势。本研究在综述哺乳动物胚胎干细胞研究历史的基础上, 概述了胚胎干细胞的分离方法和存在的问题。

[关键词] 胚胎干细胞; 生物工程; 哺乳动物

[中图分类号] Q 954.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0118-04

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES 细胞)是由早期胚胎内细胞团(Inner cell mass, ICM)^[1]或原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)^[2]经体外分化抑制培养筛选出的一种多潜能细胞。它既保持了早期胚胎正常二倍体核型特征和分化成包括生殖腺在内的各种组织的分化潜能, 又象其他细胞一样可在体外培养、扩增、筛选、转化和冻存。这些特征使其在培养的细胞和个体发育之间、体细胞与生殖细胞之间架起了桥梁, 成为当前生物工程研究的热点和难点, 在细胞生物学、发育生物学、遗传学、神经生物学和医学等领域中发挥着日益重要的作用。本文就 ES 细胞的研究历史, 分离克隆体系的建立及存在的问题加以综述。

1 ES 细胞的研究历史

在哺乳动物胚胎的早期, 细胞的分裂伴随着细胞谱系的布局。胚胎在致密期前(小鼠在 8~16 细胞, 牛在 16~32 细胞, 兔在 32~64 细胞)即从周边开始发生极化, 随着胚胎的进一步发育, 到囊胚期就由极化和未极化的细胞分别形成滋养层细胞和内细胞团多潜能干细胞^[3]。滋养层细胞进一步增殖、分化构成胚外组织, 同时由内细胞团的多潜能干细胞增殖进而分化形成胚组织。最初的分化是胚胎能在子内存活的必要条件, 而多潜能干细胞群体在正常胚胎中只是暂时的。如何维持这种多潜能干细胞, 就成为一个极具诱惑力和挑战性的问题。这最终导致了畸胎瘤细胞和胚胎干细胞的研究与发展。

分离克隆多潜能干细胞的经典方法有两种, 即

早期胚胎的非子宫异位移植^[4]和延迟着床早期胚胎的体外分化抑制培养^[1]。它们都有赖于扰乱早期胚胎的正常发育。

1958 年, Stevens^[4]把 129 品系小鼠的早期胚胎移植到同品系小鼠的精巢或肾脏的被膜下, 从而得到了畸胎瘤干细胞(teratocarcinoma stem cell)或胚胎瘤细胞(embryonic carcinoma cell, EC 细胞)。1974 年, Brinster^[5]把 EC 细胞注射到宿主囊胚腔后, 得到 EC 细胞嵌合体。到 1981 年国际上已有 5 株染色体正常的 EC 细胞, 但只有 Mintz 和 Cronmiller^[6]培养的 METT-1 具有生殖系嵌合的能力。但是, EC 细胞嵌合率低(最高仅 13%), 而且仅有 1.3% 能形成生殖系嵌合。同时, 绝大多数 EC 细胞核型不稳定, 部分嵌合胚早期即形成肿瘤, 有些早期表现正常的胚胎, 至成年期又会出现恶性肿瘤。此外, EC 细胞只能用 129 品系小鼠得到, 其他品系则不行。这些不足, 极大地限制了 EC 细胞在遗传操作中的应用, 并促使人们去寻找一种更为有效的多潜能干细胞作为遗传物质的载体, 改造动物, 研究基因对胚胎发育的影响。

1981 年, Evans 和 Kaufman^[1]建立了一种新型的分离多能干细胞的方法, 在小鼠受精后 2.5 d 切除卵巢并结合激素诱发胚胎延缓着床, 收集这些胚胎, 用免疫外科手术法分离 ICM, 以 STO(一种成系的小鼠胎儿成纤维细胞)为饲养层, 首次分离到小鼠 ES 细胞, 并以两人名字的第一个字母将其命名为 EK 细胞, 奠定了 ES 细胞分离培养的基础。同年, Martin^[7]用免疫外科手术法分离小鼠囊胚 ICM, 以

[收稿日期] 2000-03-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670359)和国家“九六”攻关项目(96-C01-03)

[作者简介] 李谱华(1966-), 男, 陕西渭南人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事基础兽医学研究。

STO 和小鼠 EC 细胞条件培养液(PSA-I)为体外分化抑制物也得到了小鼠 ES 细胞。1983 年, A xeirod^[8]用微滴法, 将小鼠晚期囊胚直接培养于 STO 饲养层上, 也获得了 ES 细胞系。1984 年, Wobus 等^[9]首次用原代小鼠胎儿成纤维细胞(Primary mouse embryonic fibroblast, PMEF)饲养层培养 ES 细胞, 并建立了 ES 细胞系。国内最早是中国科学院上海细胞生物研究所丛笑倩等^[10], 1986 年建立了 129×C₃H 小鼠的 ES 细胞系。随后, 北大生物系尚克刚等^[11~14]先后建立了 C₅₇BL/6 品系、129 品系、C₅₇BL/6×129 以及昆明鼠的 ES 细胞系。

小鼠 ES 细胞分离培养的不断改进和其他生物工程技术的发展也促进了 ES 细胞鉴定技术和应用研究的发展。目前小鼠 ES 细胞的建系方法已趋成熟, 从体外克隆的细胞到小鼠育种之间的所有通道均已打开, 方法学也已建立。当前的重点是进一步完善培养系统以提高克隆效率和 ES 细胞的维持。

小鼠 ES 细胞分离、克隆的成功及其在生物工程领域广泛而有效的利用, 自然就激发了人们向其他动物种类的拓展。1987 年, Handyside 等^[15]率先在绵羊上进行尝试, 但未成功。随后, 科学家们又在其他家畜 ES 细胞的分离上做了大量工作, 并先后分离到了仓鼠^[16]、猪^[17, 18]、牛^[18, 19]、羊^[20, 21]、兔^[22, 23]、水貂^[24]、人^[25]和恒河猴^[26]的类 ES 细胞。绵羊有类 ES 细胞核移植后代^[21]。兔有传代一年多仍保持多能性的类 ES 细胞^[22], 但没有核移植后代产生。Saito 等^[19]先后获得了传代 9 个月和 12 个月仍保持正常二倍体核型和形态未分化的牛类 ES 细胞系, 并有核移植和嵌合胚的妊娠受体, 核移植胚最长妊娠 80 d, 嵌合胚 200 d 以上, 可也无正常后代产生。1990 年, Evans 等^[17]获得了传代一年后仍未失其表型的猪类 ES 细胞, 但无核移植和嵌合体情况的报道。1994 年, Robert 等^[2]在总结前人研究的基础上, 创建了原始生殖细胞(PGCs)培养法, 也成功地分离到了牛类 ES 细胞, 并观察到了其与牛 ICM 细胞的嵌合和增殖, 但未见有嵌合体产生的报道。

2 ES 细胞的分离和 ES 细胞系的建立

目前 ES 细胞的分离基本上沿用 Evans 和 Kaufman^[1]的方法, 或对其略作改进。从所培养的全能(或多能)细胞的类型上可分为早期胚胎培养法和 PGCs 培养法。

2.1 早期胚胎培养法

根据动物种类确定培养基(基础培养基和添加物)以及采胚时间和胚胎处理方法。然后将胚胎(或 ICM、分裂球)接种于饲养层上(一般提前 1 d 准备好饲养层, 用时先换液), 待 ICM 充分增殖且未出现分化时, 挑取并经胰酶消化后离散, 再接种到新的饲养层上。此时, 一般多出现 4 种集落: 上皮样细胞集落, 成纤维细胞集落, 滋养层细胞集落和 ES 细胞集落。待 ES 细胞充分增殖后, 即挑取再消化离散接种到新的饲养层, 经过几次传代筛选后就可得到一定量较纯的 ES 细胞。然后经消化离散, 接种即可得到大量纯化的 ES 细胞, 再经继代、增殖后即可建系。

2.2 PGCs 培养法^[2]

根据不同物种, 采集胎儿的特定组织, 经消化离心等过程制备含 PGCs 的悬浮液并接种于新制备的饲养层上。PGCs 有相互聚集的趋势, 在成纤维饲养层上, 呈集落状生长, 形态似小鼠 ES 集落。待其充分增殖后, 挑取、消化离散并接种于新的饲养层上。经反复筛选后即可获得 ES 细胞, 进而建系。

另外, Simes 等^[27](1994 年)将牛囊胚 ICM 进行体外悬浮培养, 获得了大量扩增的 ICM 并有核移植后代产生。虽然对这种培养增殖的 ICM 细胞是否为 ES 细胞尚无定论, 但这无疑给 ES 细胞的分离克隆提供了一个新的思路。

3 ES 细胞的鉴定

ES 细胞的鉴定伴随着 ES 细胞的分离和其他生物技术的发展而不断完善。主要围绕着 ES 细胞的形态、核型和分化潜能(全能性或多能性)等方面进行。

3.1 形态鉴定

ES 细胞具有与早期胚胎细胞相似的形态特征, 细胞体积小, 核质比大(核大质少), 有 1~2 个核仁。细胞紧密聚集界限不清, 呈集落状生长, 形似鸟巢, 集落周边整齐, 与饲养层界限分明且色泽深亮。有时集落周围也可见单个 ES 细胞。

3.2 核型分析

正常的二倍体核型特征是 ES 细胞全能性(或多能性)的基础。通过核型分析可以检测所得 ES 细胞的染色体是否正常。

3.3 分化潜能的检测

这是目前全能(或多能)细胞比较特异和有效的方法, 包括分化实验和嵌合体制备。

3.3.1 体外分化实验

将 ES 细胞消化离散制成

悬液(10^6 mL^{-1})培养在铺有明胶的培养皿中(一般用 4 孔板),常规培养,以观察所得 ES 细胞的分化潜能。

3.3.2 体内分化实验 将 ES 细胞离散制成悬液,以适当剂量(小鼠 10^{6-7} 只 $^{-1}$)注射到同源动物的皮下,经过一段时间即可形成混合组织瘤,手术取瘤,常规方法制组织切片、染色并观察分化结果。分化潜能高的细胞肿瘤形成迅速,分化细胞类型多,且干细胞巢丰富。

3.3.3 嵌合体实验 通过聚合法或显微注射法,使 ES 细胞与宿主胚胎细胞共同发育并产生个体。然后,通过检测 ES 细胞在嵌合体中的表达,确定其全能性或多能性。

常用于检测 ES 细胞在嵌合体中表达程度的遗传标记是皮毛色泽和磷酸葡萄糖异构酶(GPI)。皮毛嵌合容易判定,但无法确定其他组织器官的嵌合情况。GPI 同工酶主要催化 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的互变反应,广泛存在于动物体内的所有组织细胞内,通过电泳分析 GPI 同工酶带谱,即可确定 ES 细胞在各组织器官(包括生殖腺)中的嵌合情况(如果 ES 细胞在该组织内嵌合就有两条 GPI 同工酶带)。但要确定 ES 细胞是否参与配子的形成,则要通过特定的基因标记对其子代进行检测。

3.4 特异性染色

比较通用的是碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色和胚胎阶段异性抗原-1

(Stage-Specific embryonic antigen-1, SSEA-1)免疫荧光标记。ES 细胞和早期胚胎细胞等未分化的细胞表面含有丰富的 AKP 和 SSEA-1,用特异性染色或免疫荧光标记,即可进行检测。

4 存在的问题

从理论上讲,ES 细胞系可在体外无限期地维持未分化状态。但是,由于遗传背景,培养条件,操作技术等方面的影响,即使是小鼠 ES 细胞,各系之间及同一系的不同亚系之间,在细胞全能性上仍有差异,而且在分离后的维持培养中,ES 细胞的染色体会出现不稳定,变成非整倍体而丧失其多能性。就其他动物种类而言,虽然已取得突破性进展,但尚无一家证明所建立的干细胞系能参与生殖系的嵌合,具有全能性。

这主要归因于:未找到各种动物适宜于分离 ES 细胞的最佳胚胎发育阶段和相应的处理方法。尚未彻底研究清楚饲养层抑制分化的机理,因而无法建立各种动物特异的高效分化抑制体系(主要是饲养层细胞的种类和抑制分化的添加剂)。尚未弄清各种动物胚胎细胞的特殊营养需要,因此未能建立保证 ICM(或 PGCs)和 ES 细胞有效增殖的培养系统(包括基础培养基和添加物)。

以上问题一旦解决,即可使 ES 细胞的分离与克隆常规化,从而发挥 ES 细胞应有的实用价值。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154- 156
- [2] Cherny R A, Stokes T M, Merein J, et al. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells[J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6: 569- 575
- [3] 刘爱民译. 利用胚胎干细胞将突变导入小鼠种系[J]. 国外医学遗传分册, 1993, (4): 198- 202
- [4] Stevens L C. Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice[J]. J Natl Cancer Inst, 1958, 20: 1257- 1275
- [5] Brinster K L. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development[J]. J Exp Med, 1974, 140: 1049- 1056
- [6] Mintz B, Cronmiller C. METT-1A, Karyotypically normal in vitro line of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells[J]. Somat Cell Genet, 1981, 7: 489- 505
- [7] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell lines from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Science, 1981, 78(2): 7634- 7638
- [8] Axelrod H R, Lader E. Embryonic stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique[J]. Dev Biol, 1984, (101): 225- 228
- [9] Wobus A M. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo[J]. Exp Cell Res, 1984, (152): 212- 219
- [10] 丛笑倩, 姚鑫. 小鼠胚胎干细胞(ES-85.1)建系过程的核型及特性分析[J]. 实验生物学报, 1987, (20): 237- 251
- [11] 尚克刚, 胡立新. 小鼠囊胚的不同遗传背景对形成 ES 细胞集落的影响[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1993, 29(2): 196- 201
- [12] 宋震涛, 李秋棠. 从早期胚胎多能干细胞生成的嵌合鼠[J]. 遗传学报, 1993, 20(6): 499- 503
- [13] 尚克刚. 饲养层对维持新建 ES 细胞系的影响[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1994, 30(4): 500- 507
- [14] 胡立新, 尚克刚. 6 个小鼠 ES 细胞系的建立和鉴定[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(2): 248- 253

- [15] Handyside A. Towards the isolation of embryonic stem cell line from the sheep. *Roux's Arch Dev Biol*, 1987, (196): 185- 190
- [16] Doetschman T. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells[J]. *Dev Biol*, 1988, (127): 224- 227.
- [17] Evans M J. Derivation and preliminary characterization of putative pluripotent cell lines from porcine and bovine embryos[J]. *Theriogenology*, 1990, (33): 125- 128
- [18] 钱永胜, 窦忠英. 牛和猪胚胎干细胞的分离与克隆[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 1996, (专辑): 142- 147.
- [19] Saito S. Bovine embryonic stem cell-like culture over several passages[J]. *Dev Biol*, 1992, 20(3): 134- 414
- [20] Tsuchiya Y. Isolation of ICM-derived cell colonies from sheep blastocysts[J]. *Theriogenology*, 1994, (41): 321.
- [21] Tilman M, Meinecke. Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos[J]. *J Anim Breed Genet*, 1996, (113): 413 - 426
- [22] Graves K H, Moreadith R W. Derivation and characterization of putative pluripotent embryonic stem cell from preimplantation rabbit embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 1993, (36): 424- 433
- [23] 赖良学. 家兔胚胎干细胞的分离培养[D]. 沈阳: 东北农业大学, 1995
- [24] Sukoyan. Isolation and cultivation of blastocyst derived stem cell lines from American Mink (Muscle vision) [J]. *Mol Reprod Dev*, 1992, (33): 418- 421.
- [25] Bongso A. The growth of inner cell mass of human blastocysts[J]. *Theriogenology*, 1994, (41): 167.
- [26] Thompson J A. Isolation of a primate embryonic cell line[J]. *Devel Biol*, 1995, (92): 7844- 7848
- [27] Sims M M, First N L. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells[J]. *Theriogenology*, 1993, (39): 313

The history and present condition of ES cells

L I Pu-hua, YANG Qi, DOU Zhong-yang

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryonic Biotechnology of Agricultural Ministry of China,
Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Comparing with embryonic cells, ES cells have the advantage of numbers. Comparing with somatic cells, ES cells have the advantage of low differentiation. In this paper, the history and present condition of ES cells are reviewed.

Key words ES cells; bioengineering; biotechnology