

胚胎干细胞的体外诱导分化模型

马宗源 李祺福 (厦门大学生命科学院 福建厦门 361005)

胚胎干细胞是具有全能性及无限制的自我更新与分化能力的一类特殊的细胞群体,它能够通过祖细胞为中介,分化为各种类型的体细胞,可重演体内干细胞的分化过程。自80年代从小鼠囊胚的内细胞团分离到胚胎干细胞并建系到现在已建立了神经细胞、肌肉细胞、上皮细胞、造血细胞等体外分化体系。将胚胎干细胞体外分化成为可利用的分化模型,无论从组织结构、细胞及分子水平都体现了体内分化过程的体外重演,再加上胚胎干细胞系具有体系简单,影响因子少,可控制,便于研究等特点,因此可用于研究早期胚胎发育和细胞分化调控;可成为器官移植和修复器官的细胞来源;还可用于新型药物筛选。

1 胚胎干细胞的生物学特性

胚胎干细胞具有与早期胚胎相似的结构特征,具有较高的核质比和整倍体核型。体外培养的细胞紧密堆积,呈克隆状生长,具有发育分化的多潜能性和无限制的自我更新能力,碱性磷酸酶染色呈阳性,具有高的端粒酶活性,早期胚胎细胞均表达胚胎阶段特异性抗原SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-81、TRA-1-60等,表达种系转录因子OCT-4,并且可将OCT-4基因作为细胞多能性的一个标志;白介素6型细胞因子家族参与维持调节胚胎干细胞未分化状态。

胚胎干细胞建系的过程中要解决的问题在于体外不断增殖的过程中保持未分化的状态,但是细胞如何维持其未分化状态的机理并不清楚,研究发现主要是通过膜上的特异受体蛋白gp¹³⁰来发挥作用,细胞因子受体蛋白gp¹³⁰可激活JANUS、酪氨酸激酶、JAK-STAT、MEK/ERK等信号途径,而JAK/STAT和MEK/ERK信号途径则处于相对平衡的状态。另外,一些未知的膜结合分子也参与胚胎干细胞的增殖与分化,分离纯化及鉴定调节细胞的自我更新及分化的未知分子已成

为研究的热点。

2 胚胎干细胞为基础的分化模型

胚胎干细胞要维持其未分化的状态,需要在胚胎饲养层中加入分化抑制因子。一旦改变了维持胚胎干细胞未分化状态的条件,胚胎干细胞首先形成胚胎小体,胚胎小体有外中内三胚层,继续分化可形成多种类型的细胞。在体外分化培养时,可自发形成有节律性跳动的心肌细胞,同时还形成骨骼肌、神经细胞、上皮细胞等。由于体外胚胎细胞可重演体内胚胎细胞的发育过程,并且基因的表达时相与体内的胚胎发育过程是相似的,在这一过程中加入外源的诱导分化因子并与相关的调控基因结合,可使胚胎干细胞分化为各种类型的细胞。现在已初步建立了神经细胞、肌肉细胞、上皮细胞和造血细胞等体外分化模型。

2.1 神经细胞 体外培养胚胎干细胞可模拟从未定型细胞向功能性神经元转化的过程,并且其基因的表达时相与体内的胚胎发育过程相似。在分化的早期表达NFL、NFM基因,后期则表达Neurocan基因。维甲酸及神经生长因子可诱导胚胎干细胞定向分化为神经细胞,是常用的诱导分化物,它能上调神经元特异基因的表达,同时下调中胚层基因的表达。将神经元特异的SOX2基因转进胚胎干细胞,再经维甲酸诱导,可表达90%以上的具有神经元标志的神经细胞。可能是外源基因和维甲酸同时拮抗分化抑制因子的作用,阻碍细胞向其他的方向分化,迫使其向神经元的方向分化。维甲酸能诱导胚胎干细胞分化为 γ -氨基丁酸能和多巴胺能神经元,而维甲酸分别结合无血清培养基和含胎牛血清的培养基培养胚胎干细胞后发现,采用无血清培养时,几乎检测不到分化的多巴胺能神经元的存在;但在有血清培养时,却能检测到大量的多巴胺能神经元。这暗示血清中的某些未知的因子和维甲酸共同起到定向诱导分化

化为特定组织细胞,将这些细胞回输体内,从而达到长期治疗的目的。干细胞的医学应用还包括体外克隆人体器官,然而这比体内移植干细胞要复杂的多。相信随着研究的不断深入,来自人体干细胞的器官应用于临床治疗已为期不远。干细胞研究与应用不仅在疾病治疗方面有着极其诱人的前景,而且将对克隆动物,转基因动物生产,发育生物学,新药物的开发与药效、毒性评估等领域产生极其重要的影响。

参考文献

1 Thomson J A, Itskovitz-Eldor Joseph, Shapiro S S, *et al*

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts Science, 1998, 282: 1145—1147.

2 Shamblott M J, Axelman J, Wang S, *et al* Derivation of Pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cell Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: 13726—13731.

3 Jackson K A, Mi T, Goodell M A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 14482—14486

4 裴雪涛 干细胞研究现状与展望 高技术通讯, 2001, (6): 93—95

(BH)

的作用,若能寻找到未知的分化调节因子,将对神经类疾病的临床细胞治疗有很大的意义。

2.2 肌肉细胞和心肌细胞 胚胎干细胞在体外首先分化成为胚胎小体,随后形成自律跳动的心肌细胞,在分化的过程中,谱系和组织特异性基因的表达图式几乎重演了体内心肌的基因表达,表达时序与体内发育是一致的,并且分化的细胞具有组织特异性的特征。这可用RT-PCR、免疫荧光聚焦成像分析、RNA印迹法分析谱系和组织特异性基因的表达次序。在胚胎干细胞分化为心肌细胞的过程中,中胚层基因Brachyury和骨形态发生素4先表达,随后 α 肌球蛋白重链(MHC)表达。只有在分化末期,心房利尿因子以及肌球蛋白轻链2V才开始表达。骨骼肌细胞也不例外,其特征性决定基因如:myf5、myogen、myo和mf6表达几乎重演了体内的表达模式,因此运用胚胎干细胞体外分化成心系统的模型可用于研究心脏特异基因的表达图式,可借此来监控体内基因的表达,同时利用体外心肌细胞的特征研究开发治疗心脏疾病,以及用于药理学分析。

2.3 上皮细胞 胚胎干细胞分化为上皮细胞的研究主要集中在血管内皮细胞的发生,将胚胎干细胞体外培养形成胚胎小体后,可自发进行内皮细胞的分化,首先分化成为内皮祖细胞,然后经细胞分化增殖及细胞间的黏附过程形成血管样的结合。VEGF、TGF- β 、ins样酪氨酸激酶等都参与调节内皮细胞的分化及上皮细胞生成。上皮细胞分化的不同时期,表达不同的标志物,在早期表达单层上皮标志物K18,后期表达复层上皮标志物K14、inlucrin等,这和体内血管内皮细胞发生是一致的。利用胚胎干细胞体外分化为上皮细胞的模型重演体内血管的发生过程可用于研究血管发生,肿瘤产生进展转移过程中血管的形成机制,可以此为突破口寻找新的治疗肿瘤及心血管疾病的方法。

2.4 造血细胞 胚胎干细胞向造血细胞分化的过程中,首先形成胚胎分化小体,进一步发育则类似于体内发育的过程。先发育成血岛样结构,随后发育成为红细胞、髓样细胞和淋巴细胞等。体外分化过程中,不同的发育阶段表达细胞特异性的标志分子,重演了胚胎造血。Wnt基因家族在中胚层形成中有特殊的表达模式,在造血干细胞定向分化中可作为造血生长因子。在体外胚胎干细胞造血系统分化中,当Wnt3基因过表达时,上调中胚层基因Brachyury的表达,也可能上调 β 连环素基因的表达,以增强其分化为造血干细胞的能力。胚胎干细胞体外分化为造血细胞也为造血及分化调控提供了很好的模型,而摸索出一个确定原始红细胞的生成及分子调控机制的模型系统,对于了解造血细胞的发生是很重要的。

自1986年胚胎干细胞建系以来,人们已经建立了多种细胞的体外诱导分化模型,如神经细胞、肌肉细

胞、血细胞等,重演了早期胚胎发生。因此,胚胎干细胞可用于基因功能及胚胎发育研究,随时监控胚胎干细胞及胚胎发育不同时期的基因表达。胚胎干细胞的体外分化模型可用于药理学、毒理学测试。现在胚胎干细胞测试法(EST)已投入使用。虽然胚胎干细胞的分化模型存在许多问题诸如:分化调节机制的不明,分化模型的维持、定向诱导分化方法的选择以及临床应用的致癌性、免疫不相容性等。但无论如何,胚胎干细胞的体外诱导分化模型将具有十分广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Guan K, Rohwedel J, Wobus A. M. Embryonic stem cells differentiation model: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotecchnology*, 1999, 30(1-3): 211-226
- 2 Hirasima M, Kataoka H, Nisikawas, et al. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood*, 1999, 93(4): 1253-1263
- 3 Anna M, Wobus. Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, (22): 149-194
- 4 Lake M, Lindsay S, Linciln J, et al. Characterisation of Wnt gene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells in vitro: role of Wnt3 in enhancing haematopoietic differentiation. *Mechanisms of Development* 2001, 103(1-2): 49-59
- 5 Dinsmore J, Ratliff J, Jacoby D, et al. Embryonic stem cells as a model for studying regulation of cellular differentiation. *Theriogenology*, 1998: 49(1), 151-145
- 6 David M, Livingston. Chromosome defects in the colon. *Nature*, 2001, 410(3): 536-537. (BH)

问: 雄蜂是怎样产生精子的?

答: 蜜蜂由蜂王、雄蜂和工蜂组成,其中蜂王和工蜂是由受精卵发育而来的,雄蜂是由未受精的卵细胞发育而来的。蜂王和工蜂是二倍体($2n=32$),雄蜂是单倍体($n=16$)。单倍体雄蜂是怎样产生精子的呢?

雄蜂在产生精子的过程中,它的精母细胞进行的是一种特殊形式的减数分裂。减数第1次分裂中,染色体数目并没有变化,只是细胞质分成大小不等的两部分。大的那部分含有完整的细胞核,小的那部分只是一团细胞质,一段时间后将退化消失。减数第2次分裂,则是1次普通的有丝分裂:在含有细胞核的那团细胞质中,染色单体相互分开,而细胞质则进行不均等分裂,含细胞质多的那部分(含16条染色体)进一步发育成精子,含细胞质少的那部分(也含16条染色体)则逐步退化。雄蜂的1个精母细胞,通过这种减数分裂,只产生1个精子,精母细胞和精子都是单倍体细胞。这种特殊的减数分裂称为“假减数分裂”。

杨淑芳(东明实验中学 山东东明 274500) (BF)