核移植胚胎干细胞的研究及其应用前景 *

王春雨[1)**] 贾战生[1)] 韩 骅[2)]

([1)]第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心，西安 710038；
[2)]第四军医大学遗传学与发育生物学教研室，西安 710032)

摘要 随着核移植技术和干细胞技术的逐渐成熟，目前已获得牛、小鼠核移植胚胎干细胞，以及人 - 兔异种间核移植胚胎干细胞，这些细胞在体外可分化成多种细胞形态. 已经进行的实验性动物克隆性治疗，显示了诱人的潜力，但人核移植胚胎干细胞研究还面临着许多问题，如建系效率低、卵母细胞来源有限以及伦理学和安全性问题等. 长远地看，随着克隆效率的提高，在道德与法律之间达成共识，核移植胚胎干细胞必将造福人类.

关键词 核移植胚胎干细胞，治疗性克隆，核移植，种间核移植

学科分类号 R329

20世纪末，随着干细胞技术和核移植技术的快速发展，核移植胚胎干(nuclear-transfered embryonic stem，ntES) 细胞得以产生，它与传统意义上的胚胎干细胞具有很大的区别，尽管 ntES 细胞像 ES 细胞一样，来自囊胚的内细胞团，具有多分化潜能和高增殖特性，可以向任何一种胚层的细胞发育，但是，ntES 细胞来自核移植胚胎，不是正常发育的胚胎，ntES 的遗传物质与供体核完全一致，移植到供核体体内，理论上不会引起免疫排斥反应.

治疗性克隆 (therapeutic clone) 发展的需求，促进了 ntES 细胞的研究. 所谓治疗性克隆，是指以患者的体细胞核为供核，将重构胚培育至囊胚，从内细胞团中分离出 ES 细胞，为患者提供与其自身遗传物质一致的组织细胞或器官，用于疾病治疗. 这样就可以避免异种或同种间细胞 / 器官移植的免疫排斥反应. 治疗性克隆发展的需要是 ntES 研究的根本目的.

1 ntES 细胞的研究成果

哺乳动物核移植研究自 1986 年[1]开始，1997 年 Dolly 绵羊[2]克隆成功引起人们的广泛关注. 除了灵长类动物[3]，迄今至少已有 7 个种系的哺乳动物克隆成功[4]. 但是，目前建立 ntES 细胞系的报道并不多，建成同种动物 ntES 细胞系的有牛[5]、小鼠[6~10]，异种 ntES 细胞有人 - 兔异种 ntES 细胞系[11]，2004 年，Science 报道人的 ntES 细胞系建成[12].

1.1 牛、小鼠 ntES 细胞系

1998 年，牛 ntES 细胞系首次建成. 2000 年 Munsie 等[6]将小鼠的颗粒细胞核通过显微注射法植入去核卵母细胞内，得到 10 个囊胚，从中建立小鼠 ntES 细胞系. ntES 细胞系在体内、外均能分化，并且将 ntES 细胞注入囊胚，获得了嵌合体小鼠. 2001 年，Wakayama 等[7]将小鼠颗粒细胞和尾尖细胞核作为供核，从 398 枚囊胚中得到 35 株小鼠 ntES细胞系，这些细胞能诱导分化为多巴胺能神经元. 2002 年，Hochedlinger 等[8]和 Li 等[9]分别用小鼠外周淋巴结的 T 细胞、B 细胞和特化的嗅细胞作为供核细胞，成功建立了小鼠 ntES 细胞系，并证明了终末分化的细胞核仍然能够重编程 (reprogram). Rideout 等[10]将一株供核来自免疫缺陷鼠 Rag2(−/−) 尾尖细胞的 ntES 细胞系，在体外经过同源重组，使 ntES 细胞的突变基因 Rag2 恢复正常，并诱导分化成骨髓造血前体细胞，回输给免疫缺陷鼠，使免疫缺陷鼠成功重建免疫功能，真正显示出 ntES 细胞的克隆性治疗作用.

1.2 人-动物 ntES 细胞

目前，有关异种 ntES 细胞研究方面的报道较少. 上海第二医科大学的盛惠珍研究小组[11]在国际上首次构建了人 - 兔核移植重构胚. 分别将 5、42、52、60 岁 4 个年龄组的人皮肤成纤维细胞核移入去核兔卵母细胞内，获得 ntES 细胞，通过原位杂交、免疫组化、核型和同源基因分析证实 ntES 细胞具有人源性，并且保持干细胞的未分化特性，能

*国家自然科学基金资助项目(30371218).

** 通讯联系人.

Tel: 029-83377595, E-mail: wwwwwwchy@sina.com

收稿日期：2004-09-08, 接受日期：2004-12-01

形成类胚体，在一定诱导条件下可以分化为神经、肌肉等 3 个胚层的细胞群. 西北农林科技大学武浩博士已成功地进行了小鼠 - 山羊交互异种核移植(博士论文，尚未发表)，目前正在进行人 - 动物 ntES 细胞的研究.

1.3 人-人 ntES 细胞

2004 年 4 月，Science 上发表了韩国科学家通过核移植技术获得了人 - 人核移植 ntES 细胞[12]. 他们以健康女性志愿者的体细胞为核供体，以其自身卵母细胞为受体. 核移植胚发育至囊胚的几率为 19%～25%，与牛、猪的核移植囊胚发育率相当(前者约为 25%，后者约为 26%). 在 30 枚核移植囊胚中，得到 20 个内细胞团 (ICMs)，建成 1 株核移植人胚胎干细胞系，传代培养 70 代以上，仍保持正常的女性核型. 此细胞系表达碱性磷酸酶，SSEA-3，SSEA-4，TRA-1-81，Oct-4，但不表达 SSEA-1. 在体外培养中能形成类胚体，植入 SCID 小鼠体内，能形成包含 3 种胚层组织的畸胎瘤. DNA 指纹分析、RT-PCR 显示，核移植人胚胎干细胞系来源于人体细胞核.

2 ntES 细胞研究存在的问题

2.1 ntES 细胞建系的效率

由于目前核移植技术和干细胞技术自身的许多问题还没有根本解决，从现有的文献报道来看(表 1 列举了小鼠 ntES 细胞建系效率)，ntES 细胞建系的效率还很低. 克隆囊胚获得 ntES 细胞的效率仅有 4%~16%，平均 8.2%，要得到一个 ntES 细胞系平均需要 12 个囊胚，而需要的卵母细胞数就更多了，一个 ntES 细胞系平均需要 666 个. 如果 ntES 细胞系用于人类疾病的治疗，这样的代价是非常大的，即使目前报道的最高效率的建系，也是 30 个卵母细胞，才能得到一个 ntES 细胞系.

Table 1 Efficiency of ntES cell derivation of mice

表 1 小鼠 ntES 细胞系的建系效率

参考文献	重构胚(枚)	囊胚(枚)	ntES细胞系(株)	建系效率(%)	
				单个卵母细胞	单个囊胚
[6]	362	10	1	0.3	10
[7]	1 016	398	35	3.4	8.8
[8]	980	41	2	0.2	5
[10]	202	27	1	0.5	4
总数	2 560	476	39	0.15	8.2

另外，在人 - 动物 ntES 细胞的研究中，供体核的年龄对 ntES 细胞的形成效率影响不明显，但是对囊胚形成早期有影响. Chen 等[11]研究发现，5 岁年龄组 2~4 细胞期融合胚形成率 (21.7%) 明显低于 42、52、60 岁组(39.4%，37.0%，53.4%)，60 岁组 2~4 细胞期融合胚形成率最高. 这些结果提示，供体核的年龄对囊胚形成早期有影响，但是在囊胚期，各年龄组之间并无显著差异. 这些数据显示年龄对体细胞核的重编程潜力没有影响.

2.2 建立 ntES 细胞的卵母细胞来源

从上面分析结果看，ntES 细胞用于人治疗性克隆，卵母细胞的需求量是非常大的，目前尽管已有许多措施来改进核移植技术，但是仍没有明显提高. 解决这一问题的关键是用新的策略获得卵母细胞. 一种方法是诱导分化现有的 ES 细胞系，得到卵母细胞，理论上可以收集到数量无限的卵母细胞，大大减少对人卵母细胞的需要量.

Oct4 蛋白是一种 DNA 结合蛋白. 在胚胎发育早期，Oct4 基因的表达能促进胚胎生殖 (EG) 细胞的形成，在 EG 细胞的生成中起重要作用，被认为是生殖细胞特异性基因[13,14]. 2003 年，Hubner 等[15]将 gcOct4-GFP 报告基因转入鼠 ES 细胞中，分离出 $Oct4^{+}c\text{-}kit^{+}$ 克隆，发现在体外能向卵泡样结构分化，通过检查卵母细胞特异性标志 (ZP1，ZP2，ZP3 等)和减数分裂标志物 (DMCI，SCP3)，证实能分化成卵母细胞. 从 ES 细胞诱导分化出生殖细胞为取得卵母细胞提供了一种新途径.

在 ntES 细胞的产生过程中，去核卵母细胞只是为供核重编程发育至囊胚提供了一个“温室”，除了线粒体 DNA，去核卵母细胞并不携带自身的遗传物质. 因此，另外一种策略就是利用非灵长类异种哺乳动物的卵母细胞，例如兔. 然而，人 - 动

物 ntES 细胞，还存在着伦理上的争议.

从长远的方面看，应该发展非卵母细胞依赖的 ntES 培育方法，例如，利用体细胞和去核的 ES 细胞进行融合，或者提取 ES 细胞和卵母细胞来源的重编程因子，注入体细胞内，使其“返祖”至胚胎期，获得 ntES 细胞.

2.3 影响 ntES 细胞成功率的根本问题

由于对早期胚胎发育的调控机理了解不多，对参与遗传物质重编程的基因和细胞因子亦没有认识清楚，目前的克隆成功很大程度上是随机的，这是影响 ntES 细胞成功率的根本问题. 因此，目前不应盲目追求克隆动物的数量，而是要深入研究核移植供体与受体的核质间相互作用机理，从更深层次解析重组胚胎早期发育的调节机制. 2004 年 5 月 Nature 刊登了密歇根底特律的韦恩大学，Ostermeier 等[16]的最新研究报告，他们首次发现，男子的精子不仅能够使卵子受精，而且能传递男性的染色体和 mRNA，男性 mRNA 对于胚胎的早期发育非常重要，这可以解释实验室克隆成功率非常低的部分 原因.

2.4 异种 ntES 细胞的安全性和伦理学问题

异种重构胚在发育早期含有 2 种线粒体，以后供核体的线粒体取代了受体的线粒体. 利用人 - 动物重构胚制备治疗性克隆，有可能由于带进去供核体的线粒体而缓解动物线粒体与人细胞核之间的不相容性. 但是人和动物的重构胚还存在安全性问题，尚待解决. 受体卵浆中所带的异种蛋白，包括细胞器及 mRNA，它们的命运如何，是否也像线粒体一样完全被供核体所取代，还有待进一步证明.

利用动物去核卵母细胞与人体细胞融合而产生胚胎来提取干细胞的伦理问题，也是争论的一个焦点. 人畜细胞不可避免的结合和相互作用侵犯了生命的尊严. 发达国家政府对克隆技术都采取了比较谨慎的态度. 世界绝大多数国家和组织，如中国、德国、日本、澳大利亚、墨西哥、美国、新西兰、英国、巴西、意大利以及欧盟等都坚决反对克隆人. 除日本等少数国家对克隆人类胚胎也禁止外，绝大多数国家对于为医学目的而克隆人类胚胎表示支持. 2000 年 8 月 21 日，美国政府批准允许科学家使用人类胚胎进行治疗性克隆研究，但同时指出，以培育婴儿为目的的再生性克隆——人类胚胎克隆——仍属违法. 同年 8 月 24 日美国国立卫生研究院(NIH)解除了对人多能干细胞研究的禁令. 2004 年 1 月，中国科技部、卫生部正式出台我国《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》，允许开展胚胎干细胞和治疗性克隆研究，禁止生殖性克隆人研究，这些法律为科学家们从事治疗性克隆的研究提供了保证.

3 ntES 细胞的应用前景

我们知道 ES 细胞在生物医学的各个领域均有广阔的应用前景，ntES 细胞也有着同样广阔的前景，为临床治疗学、细胞生物学、生物发育学、比较动物学等研究提供研究材料和方法.

3.1 细胞生物学

通过研究 ntES 细胞的体外分化特性，可以识别某些靶基因，对人类新基因的发现，功能基因的研究，以及基因治疗的研究均有重要意义. 通过探讨 ntES 细胞体外增殖和分化的机理，了解各种生长和分化因子的作用，为组织再生和修复的研究提供了新的工具；通过诱导 ntES 细胞癌变，可分析肿瘤细胞发生的分子机理. ntES 细胞作为一种得天独厚的研究材料，对于阐明细胞增殖、分化、凋亡、迁徙、恶变等机理有着重要意义.

利用 ntES 细胞可以建立体外分化模型. 改变维持 ntES 细胞不分化状态的培养条件，如撤去饲养细胞层，ntES 细胞可以自发形成多细胞结构体——胚胎小体，胚胎小体继续分化可以形成多种细胞类型，包括血细胞、内皮细胞、肌细胞、神经元等. 在 ES 细胞形成胚胎小体并进一步发育分化的过程中，存在着连续的、自发的内皮细胞、肌细胞与心肌细胞等的分化，并在发育的不同时期表达不同的特异性分子. 而在维甲酸 (retinoic acid) 诱导 ES 细胞体外定向分化为神经元时，在含有 2- 巯基乙醇(2-mercaptoethanol)的无血清培养条件下，ES 细胞则不形成胚胎小体而直接被诱导分化为神经元，这种方法大大缩短了体外分化的时间.

自发现 ES 细胞以来，人们已经利用 ES 细胞建立了多种细胞类型的体外分化系统，体外分化的多种细胞类型都曾被成功地植入胎鼠或成体鼠，在受体鼠体内形成有功能的细胞群.

3.2 发育生物学

由于哺乳动物在母体内受胚胎发育的个体大小和内环境条件的限制，很难系统地研究其早期的发育进展、细胞分化及调控机理等. 比较动物卵母细胞质对同种或异种细胞核发育的影响，在细胞和分子水平上为研究哺乳动物胚胎早期发育的调控机制提供了良好的材料和方法，也为研究胚胎发育的影

响因素提供了便利条件.

建立在 ES 细胞和基因打靶技术基础上的复杂的转基因系，使人们可以建立有效的分析系统，从而在分子水平上研究不同的生物学问题. 它不仅可以将一些在发育过程中对动物体非必需或可被替代的特定基因进行敲除 (gene knock-out)，在体内进行功能缺失研究，而且还可以研究基因在不同发育时期中的作用. ntES 细胞作为一种体外细胞系，提供了一个研究处理整体细胞群的实验体系. 因此，就有可能人为地产生一些基因突变，如对胚胎致死性基因的研究等，也可利用这些突变的基因来克隆产生转基因小鼠，从而建立了基因突变的模型.

3.3 细胞治疗

在临床上有许多疾病是由于细胞受到病损而引起正常的生理功能发生障碍或丧失，它严重地威胁着人类的生命和健康，如帕金森病、老年痴呆症、糖尿病、肝硬化、肾衰竭、各种血液病、皮肤烧伤等. 目前，治疗这些疾病主要采用异体细胞、器官和组织移植. 但由于移植后的免疫排斥反应及供体细胞、器官和组织来源有限，限制了临床应用. ntES 细胞与普通的细胞移植治疗相比，具有革命性的进步. 它以患者的体细胞为核供体，通过细胞核移植技术获得的 ntES 细胞，具有与患者遗传背景完全一致的特点. 对获得的 ntES 细胞进行诱导，使其分化为特定类型的细胞，用于治疗. 这种细胞不会引起移植排斥反应，能使患者恢复已丧失的或有障碍的生理功能，而达到治疗疾病的目的. 通过细胞核移植技术与胚胎干细胞技术的结合，建立个体化的 ntES 细胞库，还将大大解决供体细胞来源不足的问题，使细胞移植能广泛地应用于临床. 目前已经应用 ntES 细胞在体内外分化成多种细胞，包括神经细胞和生殖细胞[17,18]. 尤其 Barberi 等[17]建立了一套方法，能使 ntES 细胞向中枢神经系统细胞特定分化，能产生高效率的神经胶质细胞、寡突细胞、神经元细胞，包括多巴胺能神经元、γ- 氨基丁酸能神经元等，将分化的多巴胺能神经元移植到帕金森病模型后，能改善其症状.

随着细胞工程技术的发展，可以在核移植前对供核细胞在体外进行基因修饰，将外源基因导入体细胞中，再将该细胞进行培养，选择其中带有外源基因的细胞进行扩增，将这种细胞作为供核细胞进行核移植，所得 ntES 细胞均带有目的性外源基因. 将此细胞诱导分化后进行移植，可以将基因治疗技术与核移植胚胎干细胞技术结合，用于某些遗传性疾病的治疗.

细胞治疗的途径有两种：其一，ntES 细胞定向分化后移植. 细胞扩增后，体外定向分化，对分化细胞进行纯化，将获得的目的细胞移植到病变部位，替代丧失功能的部分细胞；其二，ntES 细胞原位移植. 与定向分化后移植相比，ntES 细胞原位移植有以下缺点：a. 没有经过纯化，可能将污染的异源饲养层细胞带进移植部位；b. ntES 细胞没有转入经选择基因，无法控制植入细胞的命运，可能发生癌变；c. ntES 细胞分化成份复杂，目的细胞分化成份少，可能出现大量非必须细胞的分化.

综上所述，治疗性克隆直接服务于人类疾病治疗，比克隆完整动物更有意义，随着核移植技术本身的完善和改进，随着人们对克隆性治疗认识的不断深入，在健康和伦理、道德与法律之间的争论将逐渐达成共识. 相信 ntES 细胞的研究和应用必将在生物医学上开辟一个新的疆界.

参 考 文 献

1 Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature，1986，**320** (6057): 63~65

2 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al*. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, **385** (6619): 810~813

3 Wilmut I, Beaujean N, de Sousa P A, *et al*. Somatic cell nuclear transfer. Nature, 2002, **419** (6907): 583~586

4 Mombaerts P. Therapeutic cloning in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(suppl.1): 11924~11925

5 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al*. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cell. Nat Biotechnol, 1998, **16** (7): 642~646

6 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** (16): 989~992

7 Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, *et al*. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Science, 2001, **292** (5517): 740~743

8 Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. Nature, 2002, **415** (6875): 1035~1038

9 Li J, Ishii T, Feinstein P, *et al*. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. Nature, 2004, **428** (6981): 393~399

10 Rideout W M, Hochedlinger K, Kyba M, *et al*. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell, 2002, **109** (1): 17~27

11 Chen Y, He Z X, Liu A, *et al*. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. Cell Research, 2003, **13** (4): 251~263

12 Hwang W S, Ryu Y J, Park J H, *et al*. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science, 2004, **303** (5664): 1669~1674

13 Pesce M, Scholer H R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells, 2001, **19** (4): 271~278

14 Butteroni C, De Felici M, Scholer H R, *et al*. Phage display screening reveals an association between germline-specific transcription factor Oct-4 and multiple cellular proteins. J Mol Biol, 2000, **304** (4): 529~540

15 Hubner K, Fuhrmann G, Christenson L K, *et al*. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science, 2003, **300** (5623): 1251~1256

16 Ostermeier G C, Miller D, Huntriss J D, *et al*. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Nature, 2004, **429** (6988): 154

17 Barberi T, Klivenyi P, Calingasan N Y, *et al*. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. Nat Biotechnol, 2003, **21** (10): 1200~1207

18 Wakayama T. Cloned mice and embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Oncol Res, 2003, **13** (6~10): 309~314

Development of Nuclear-transfered Embryonic Stem Cells*

WANG Chun-Yu[1)**], JIA Zhan-Sheng[1)], HAN Hua[2)]

([1)]*Chinese PLA Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an* 710038, China;

[2)]*Department of Medical Genetics and Developmental Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032, China)

Abstract With the development of the technique of nuclear transplantation, nuclear-transfered embryonic stem cell line of cattle, mice and human-rabbit inter-species now have produced. Although experimented therapeutic cloning in animal showed potentially clinical applications in human being, research of human nuclear-transfered embryonic stem cell is confronted with many problems, such as low efficiency of production of nuclear-transfered embryonic stem cell lines, the limited derivation of oocytes, dispute of ethic and politics, therapeutic security and etc. In the long run, the efforts should be focused on the development of cloning efficiency and the solution of ethical and politics concerns with scientific and idealistic progress. Nuclear-transfered embryonic stem cells will meet the high expectations of human for rejuvenation of the aging or diseased body.

Key words nuclear-transfered embryonic stem cell, therapeutic cloning, nuclear transfer, inter-species nuclear transplantation

---

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30371218).

**Corresponding author . Tel: 86-29-83377595, E-mail: wwwwwwchy@sina.com

Received: September 8, 2004 Accepted: December 1, 2004