

综述与专论

治疗性克隆研究的进展, 机遇和挑战

任立晨¹⁾ 丁明孝^{2)*}⁽¹⁾上海交通大学生命科学院, 上海 200240; ⁽²⁾北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 治疗性克隆为很多疾病的治疗提供了新的策略. 以韩国科学家最近在这一领域的突破性进展为基点, 回顾近年来这一领域的主要进展, 着重对“核移植重编程”以及“人胚胎干细胞的建系, 扩增和分化”这两个治疗性克隆策略中的关键问题进行评述, 并对治疗性克隆的发展前景和目前所遇到的挑战进行了展望.

关键词 治疗性克隆, 核移植, 重编程, 胚胎干细胞, 细胞分化

学科分类号 Q81

2005年5月19日, Science杂志报道了韩国科学家在治疗性克隆领域的一项重大突破^[1]. 在这项工作中, 由Woo Suk Hwang (黄禹锡) 领导的研究小组以病人的体细胞作为核移植供体, 以异体核移植为主要方式, 成功地从核移植后的囊胚中获得了能够向三个胚层分化的胚胎干细胞系. 消息传出, 不仅在科学界, 也在社会上引起了极大震动. 一项生物技术的发展为什么会引起如此广泛的社会关注? 本文将围绕韩国科学家在治疗性克隆研究中取得的突破性进展, 回顾近年来这一领域的发展历程, 对“核移植重编程”以及“人胚胎干细胞的建系, 扩增和分化”这两个治疗性克隆策略中的关键问题进行评述, 并对其前景进行展望.

1 治疗性克隆

很多人类疾病同特定细胞、特定器官的病变或受损有关, 如糖尿病、帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化症、脊髓损伤、肝硬化等. 对于这类疾病, 如果用功能正常的细胞或器官进行移植, 则能在很大程度上使病症得到缓解或痊愈. 但是, 这类移植治疗方案目前面临着两大困境: 移植物的来源问题和免疫排斥问题. 所谓移植物的来源问题, 是指可用来进行移植的供体细胞/器官十分有限. 虽然如骨髓、肾脏等细胞/器官可以通过活体捐献解决, 但如胰岛、胰腺等移植物就只能依赖尸体来源了. 在美国, 每年可供胰腺只有约3 000个, 而1年内新增的I型糖尿病患者就超过35 000例. 同胰腺移植相比, 胰岛移植的安全性虽然较高, 但由于分离手段的制约, 需要更多的供体胰腺 (至少是2个) 才能满足

一次移植的需要^[2]. 所谓免疫排斥问题, 是指异体或异种来源的细胞/器官, 在机体免疫系统的攻击下无法正常工作. 目前, 多数接受异体移植的病人需要靠终生服用免疫抑制药物维持外源移植物的存活. 但免疫抑制具有非特异性, 在使机体对移植物发生免疫耐受的同时也使其对于病原微生物的免疫反应能力降低. 近年来, 为解决上述两个问题, 在完善细胞分离技术, 改进免疫抑制剂, 探索利用非人体器官如猪器官等进行异种移植, 以及构建基因工程细胞等方面都取得了长足的进步, 但是这些进展对于日益增长的社会需求而言, 仍相距甚远.

20世纪90年代末, 两个里程碑式的突破使人们坚定了从根本上解决这两大问题的信心. 其一是人胚胎干细胞系的成功建立^[3]. 胚胎干细胞能够在体外大量地扩增, 而且具有分化为三个胚层的各种细胞类型的能力, 这就给解决移植物的来源问题带来了巨大的希望. 其二是以体细胞为核供体的克隆技术^[4], 该技术能够通过核移植生产出与核供体具有相同基因型的新个体. 这样, 免疫排斥的问题便可迎刃而解. 于是, 将这两者结合起来, 就有可能同时解决移植物来源和免疫排斥这两大难题. 所谓“治疗性克隆” (therapeutic cloning) 的策略正是这样提出的. 从理论上讲, 如果先按照体细胞克隆的技术路线, 将患者自身正常体细胞的细胞核, 移入去核的卵母细胞中, 待胚胎发育到囊胚期后, 再按

* 通讯联系人.

Tel: 010-62767047, E-mail: dingmx01@pku.edu.cn

收稿日期: 2005-06-22, 接受日期: 2005-06-27

照胚胎干细胞建系的技术路线, 就能获得与患者具有相同遗传背景的胚胎干细胞系, 最后再通过诱导该胚胎干细胞系定向分化获得所需要的细胞类型, 进行移植治疗^[5] (图 1)。

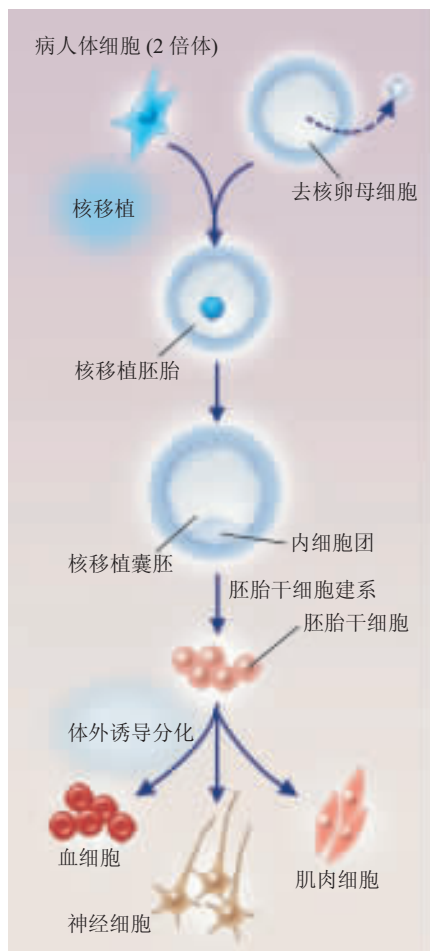


Fig.1 The strategy of therapeutic cloning^[5]

图 1 治疗性克隆策略的技术路线^[5]

将病人细胞核植入去核卵母细胞中, 待核移植胚发育到囊胚阶段时, 以囊胚中的内细胞团建立病人的胚胎干细胞系。然后, 再将此胚胎干细胞系进行体外诱导分化, 便可获得可供移植治疗的成熟细胞 (例如血细胞, 神经细胞和肌肉细胞等)。在此过程中, 体细胞核必须经历重编程才能重新获得向各个胚层细胞分化的潜能。此外, 胚胎干细胞系的建立, 扩增和定向诱导分化都是治疗性克隆策略中的关键技术环节。

由于人胚胎干细胞的建系, 扩增和分化以及基于体细胞核移植的克隆技术均已初具雏形, 所以, 治疗性克隆的策略是否可行, 其关键在于探索能否从经过核移植后发育到囊胚的胚胎中建立胚胎干细胞系。这一领域的尝试始于 1998 年, Cibelli 等^[6]从牛的核移植囊胚中得到能够向三个胚层分化, 并能形成嵌合体的未分化细胞, 但并未真正建系。此后,

Mountford^[7]和 Kawase^[8]领导的研究小组分别以小鼠颗粒细胞 (cumulus cell) 和胎脑神经元细胞为核供体, 从核移植囊胚中获得了能够向三个胚层分化, 并能够形成畸胎瘤的胚胎干细胞系。但这样的“胚胎干细胞”仍存疑点。例如, 已知小鼠胚胎干细胞需要白血病抑制因子 (LIF) 维持其未分化状态, 但 Kawase 等^[8]得到的“胚胎干细胞”却在无外源 LIF 的条件下仍可增殖。另外, 将胚胎干细胞移植回囊胚中, 通过嵌合体后代表型检测其向生殖细胞的分化能力, 是鉴定胚胎干细胞的重要标准, 但上述工作均未报道相关结果。2001 年, Wakayama 等^[9]首次报道了严格意义上的核移植胚胎干细胞系, 他们以小鼠颗粒细胞和尾尖细胞为核供体, 建立的胚胎干细胞系能够在嵌合体中进入种系, 分化为生殖细胞。基于核移植建立胚胎干细胞系的技术逐渐成熟后, 治疗性克隆的策略很快就被用于治疗实验动物的疾病模型。实验表明, 通过核移植建立的胚胎干细胞系能够在体外分化为多巴胺能神经元, 并能对小鼠帕金森病模型进行有效的纠正^[10]。而且, 治疗性克隆策略也与基因工程相结合, 应用于实验动物疾病模型的治疗^[11]。Rideout 等^[12]建立了免疫缺陷小鼠 (*Reg2^{-/-}*) 的胚胎干细胞系, 并通过基因打靶对其进行修复, 成功重建了受损的免疫系统。然而, 治疗性克隆应用于人类疾病的治疗, 就必须通过核移植建立人的胚胎干细胞系。2003 年, 上海第二医科大学的盛慧珍带领其研究小组首次实现了这一目标^[12]。他们选择去核的兔卵母细胞作为受体, 将人成纤维细胞核移入其中, 在 100 个核移植囊胚中建立了 4 株能够向三个胚层分化的人胚胎干细胞系, 为治疗性克隆走向临床应用迈出了关键的一步。但上述工作中, 动物来源的卵母细胞可能存在风险。2004 年, 韩国学者尝试用人卵母细胞作为受体进行自体核移植^[13]。这意味着, 志愿者的颗粒细胞核将被植入自己的去核卵母细胞中。最终, 在 30 个核移植囊胚中, 建立起一株能够在体内体外均表现出多向分化潜能, 且核型仍然正常的胚胎干细胞系。

但是, 上述结果的核供体依然来自正常人, 而真正用于治疗性克隆的核供体应来自病人, 而且, 治疗性克隆的对象还包括男性, 青春期前以及更年期后的女性, 所以异体核移植建系的尝试就显得格外重要。Woo Suk Hwang 等^[14]今年发表的工作, 对上述两个问题的研究有实质性进展。首先, 这项工作中选择的供体细胞核均来自先天性免疫缺乏症 (congenital hypogammaglobulinemia, CHG)

(1 例), 脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI)(9 例), 和 I 型糖尿病人 (Juvenile diabetes, JD)(1 例), 这些疾病都能够用单一类型的细胞移植治疗. 而且, 病人的年龄跨度很大, 从 2~56 岁不等, 这就验证了治疗性克隆广泛的适用范围. 在 185 例核移植中共有 129 例成功得到融合卵, 其中有 31 例能发育到囊胚, 又从中建立了 11 个胚胎干细胞系. 在成功建立胚胎干细胞系的 9 名病人中, 除 1 人为自体核移植外, 其余均为异体核移植. 在这样得到的 11 个胚胎干细胞系中, 至少有 7 个能够在胚胎小体和畸胎瘤形成这两个实验中均表现出向三个胚层分化的能力 (其余细胞系的测试仍在进行). 而且, 在为确认胚胎干细胞系的基因型和免疫原性而进行的 DNA 短片段重复序列和主要组织相容性复合物 (MHC) 检测中, 所有 11 个胚胎干细胞系均表现出与供体细胞核完全相同的特征. 在韩国科学家的这项工作中, 另一个突破是将从核移植囊胚建立胚胎干细胞系的效率大幅提高到 35%, 是以往工作的 10 余倍^[13]. 作者将效率的提高归结为如下因素: 采用人的滋养层细胞, 更温和的供体核提取条件和从核移植囊胚中分离胚胎干细胞系的直接培养方法等等. 总之, 韩国科学家通过异体核移植技术, 高效率地建立病人胚胎干细胞系的工作, 使治疗性克隆向实用化又迈进了一大步.

2 核移植与重编程

治疗性克隆中基本的理论问题之一是供体细胞核在移植后的重编程问题^[14]. 哺乳动物中精密的基因表达调节机制, 使得在每个体细胞中几乎完全相同的基因组 DNA 序列, 表现出具有组织特异性和发育阶段特异性的基因表达模式. 已知基因转录活性与该基因所在染色质区域上的生化修饰状态密切相关. 这类修饰, 主要包括 DNA 甲基化, 组蛋白甲基化和乙酰化等, 受到多种酶和细胞蛋白的调节^[15]. 由于已分化细胞中, 基因表达模式与执行特定功能相关, 因此其染色质修饰模式也与未分化细胞存在显著差异^[16]. 这样, 在核移植后, 供体细胞核的染色质修饰模式需要进行“重编程”, 恢复设定到分化前的早期发育状态, 才能再次沿着正常的胚胎发育程序重演个体发生的全过程.

人们普遍认为, 处于较早发育阶段的细胞分化程度低或基本未分化, 因此重编程也较容易. 以囊胚内细胞团和胚胎细胞作为核供体的哺乳动物克隆早在 20 世纪 80 年代就已经成功. 20 世纪 90 年代

后期, 体细胞克隆动物相继出生^[4], 但由于其效率极低, 故有学者怀疑克隆成功的个体可能来源于分化程度较低的成体干细胞. 直到 2002 年和 2004 年, 通过两步法成功克隆了核供体为淋巴细胞^[17]和嗅觉神经细胞的小鼠^[18], 终末分化的细胞核能够重编程到全能状态的假说才逐渐被接受. 不过, 完全意义上的重编程看来难以做到. 两栖类中就发现由于重编程不完全而导致的“记忆效应”. 在用神经外胚层体细胞核 (表达 Sox2) 克隆的胚胎中, 其内胚层细胞中也常常过量表达 Sox2^[19]. 类似的记忆效应也在哺乳动物中发现, 如克隆小鼠的表型与供体细胞类型有关^[20]. 重编程异常在分子水平上往往表现为染色质修饰模式的异常, 如克隆牛胚胎中曾观察到 DNA 甲基化模式的高度异常^[21]. 目前, 克隆动物的肥胖^[22], 早衰^[23], 免疫功能障碍, 新生儿体重过大和关节炎等缺陷均被归咎于重编程不足或发生错误. 不过, 由于重编程缺陷不影响 DNA 序列本身, 上述缺陷一般不会遗传^[22].

重编程是否充分, 将直接影响到体细胞核移植的效率和克隆动物的健康状况. 但目前对重编程的机制仍然知之甚少^[24]. 一般认为, 重编程的发生与卵母细胞质同供体细胞核之间的蛋白质交换密切相关. 在这一过程中, 有证据表明卵母细胞质中的 MPF^[25]和 ISWI^[26]发挥了重要的作用. 这些作用的结果可能导致很多细胞质中同重编程高度相关的因子接近供体来源的染色质发挥作用, 而原先与成熟细胞基因表达相关的蛋白质则被释放. 已知 DNA 甲基化的水平在早期发育阶段急剧降低, 这一过程可能意味着在分化程序开始前将基因组“格式化”, 故而对形成具有全能性的细胞至关重要. 相似地, 在移植后的体细胞核染色质上, 也观察到 DNA 甲基化的水平大幅下降^[27].

除染色质修饰模式的变化外, 细胞命运的重新设定还涉及端粒长度恢复, 线粒体存留和 X 染色体的失活等一系列问题. 曾观察到克隆羊 Dolly 的端粒有所缩短, 但后来证明, 很多克隆动物中却有正常甚至稍长的端粒^[28, 29]. 这说明, 在重编程过程中端粒酶活性得到恢复^[29]. 在正常受精过程中, 精子的线粒体在其进入卵细胞后将被清除. 但对于外源体细胞核, 其中的线粒体有时被清除, 有时却得以保留^[30]. 在韩国科学家的工作中, 供体和受体的线粒体均有存留的可能^[1], 这就为核移植胚胎干细胞作为移植细胞的来源提出了挑战, 因为有研究表明, 组织相容性复合物可能通过线粒体进行转

移^[31]. 已观察到体细胞中失活的 X 染色体能够在核移植重编程中被再度激活, 但这样的重编程并不能有效调节 X 染色体在随后发育进程中的失活过程, 因而造成各种异常现象^[32].

3 人类胚胎干细胞的建系, 体外培养和定向分化

在治疗性克隆的技术路线中, 需要从核移植的囊胚中高效率地建立胚胎干细胞系, 并在体外培养的基础上, 通过定向诱导, 使其分化为具有正常生理功能的细胞. 但是, 这些技术至今仍然不够成熟, 离实际应用仍有很大的差距.

从哺乳动物囊胚的内细胞团中建立胚胎干细胞系的工作始于 20 世纪 80 年代. 1981 年, 两个研究小组独立报道了从小鼠内细胞团中分离出具有多种分化潜能的细胞系, 并在滋养层上成功维持了这种细胞的未分化状态^[33, 34]. 由于这些细胞在体外能够形成包含三胚层的胚胎小体(embryonic bodies, EBs)^[33], 并能在体内形成畸胎瘤^[34], 因此被认为具有全能性, 能够成为多种成熟细胞的来源. 1998 年, 在非人灵长类胚胎干细胞成功建系的带动下^[35], Thomson 等^[3]终于建立了具有正常 XY 或 XX 核型的人胚胎干细胞系, 其分化潜能也通过将其注射到免疫缺陷的小鼠体内产生畸胎瘤的实验得到证实. 2004 年, 哈佛大学的 Melton 实验室又建立了另外 17 株人胚胎干细胞系^[36], 进一步丰富了研究材料.

如果要对人胚胎干细胞进行诱导分化以获得成熟细胞, 首要的条件就是在培养体系中扩增胚胎干细胞并保持其未分化的状态. 最初, 人胚胎干细胞建系和传代培养采用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为滋养层, 并添加 20% 胎牛血清^[3]. 随后发现, 用血清替代物(knockout serum replacement, KSR)代替胎牛血清, 并添加 bFGF 能有效地提高人胚胎干细胞克隆的形成效率^[37]. 由于滋养层细胞的制作十分繁琐, 美国 Geron Corporation 公司开发了无需滋养层细胞的人胚胎干细胞培养方法^[38]. 他们将人胚胎干细胞接种于经胞外基质包被的培养皿中, 并用 MEF 细胞的条件培养基进行培养, 使人胚胎干细胞在扩增中保持未分化的状态. 但是, 上述方法都依赖于 MEF 细胞成分, 而 MEF 源于小鼠胚胎, 其中可能含有未知的病原, 对人胚胎干细胞的临床应用构成挑战. 有证据表明, MEF 和 KSR 中均含有唾液酸 Neu5Gc, 能够污染人胚胎干细胞及其分

化产物. 在这样条件下培养的移植产物, 很容易由于人体产生的免疫排斥而造成移植失败^[39]. 因此, 完全人源化的培养条件确为人胚胎干细胞走向临床应用所必需. 2002 年, 新加坡的 Bongso 研究小组以成人输卵管上皮细胞、胎儿肌肉细胞和皮肤细胞作为滋养层建立了新的人胚胎干细胞系^[40], 实现了在没有动物来源成分的条件下对人胚胎干细胞的建系和培养. 此后又有很多实验室对各种人源饲养层细胞进行了比较研究. 盛慧珍领导的课题组最近用人胚胎干细胞的分化产物做为培养胚胎干细胞的滋养层, 为解决动物源性污染问题提供了新的思路^[41]. 但是由于人源细胞也受到来源和制备技术的限制, 因此, 找出 MEF 中控制人胚胎干细胞自我更新的生长因子, 仍是解决人胚胎干细胞体外培养问题的首要挑战. 在韩国科学家的工作中^[4], 虽使用人源细胞作为滋养层, 但在不同阶段仍然使用了豚鼠补体、KSR 等动物源性成分, 因此并未实现完全意义上的人源化建系.

研究人胚胎干细胞自我更新的机制对探索其培养方法以及定向分化都具有十分重要的意义. 细胞在体外的自我更新受到内外两方面因素的调控, 内在因素是指控制胚胎干细胞自我更新的信号通路和转录因子, 外在因素是指培养体系中参与维持自我更新的外部信号分子, 通常是一些内在信号通路的胞外配体. 曾发现仅靠 BMP4 和 LIF 就能够在无血清条件下维持小鼠胚胎干细胞的自我更新^[42], 但对于人胚胎干细胞, 还未发现具有同样功能的细胞因子. 目前在添加血清替代物 KSR 的前提下, 己能够通过 Activin A^[43], bFGF^[44], 以及 Noggin 与 bFGF^[45, 46]的联合作用实现不依赖于 MEF 的对人胚胎干细胞自我更新状态的维持.

人胚胎干细胞只有在分化成熟后才能用于治疗^[47], 例如, 将其分化为肝实质细胞^[48, 49], 以及胰岛素分泌细胞^[50, 51]等. 但是, 要进入应用阶段, 分化必须解决安全性和有效性这两个基本问题. 所谓安全性, 首先要确保移植产物没有致癌性^[52]. 所谓有效性, 是指分化产物必须具有真正意义上的生理功能. 这样, 移植到病人体内的细胞才能发挥治疗的功效. 但是, 问题的关键在于, 从胚胎干细胞高效分化出某些具有生理功能的成熟细胞, 似乎特别困难. 以胚胎干细胞向胰岛 β 细胞和肝实质细胞分化为例, 困难主要表现在以下两个方面. 其一, 定向分化的效率难以保证. 理论上, 可能通过选择性培养, 将小鼠胚胎干细胞逐步诱导分化为成熟细

胞^[53, 54], 但分化效率的提高仍有赖于对相关发育机制更深入的认识. 低效率地定向分化将直接影响到移植纯度, 进而影响移植的安全性. 虽然通过遗传标记筛选目的细胞能够得到纯度较高的移植物^[55], 但将转有外源基因的细胞植入体内, 其安全性难以评估. 在今后的研究中, 如将选择性培养和基于细胞表面标志的分选纯化结合起来, 将可能为解决此问题有所助益. 其二, 分化产物的功能评价困难. β 细胞能够分泌胰岛素, 但对分化产物中胰岛素的免疫组织化学检测易受到细胞吸收血清来源胰岛素的干扰^[56]. 而且, 被吸收胰岛素的长期滞留也可能对评价移植物在糖尿病小鼠体内逆转高血糖的能力造成影响. 近来的工作已将检测到 C-肽的出现做为细胞内源性胰岛素产生的标志^[54], 但未来仍需探索 C-肽的出现和移植物逆转糖尿病活性之间的必然联系. 目前看来, 通过小鼠胚胎干细胞分化得到与正常 β 细胞生理功能相当的产物, 还有相当的距离^[50, 57]. 与小鼠胚胎干细胞的分化相比, 人胚胎干细胞向 β 细胞分化的研究仍在初级阶段^[50, 51]. 近来, 虽已能通过由小鼠胚胎干细胞分化而来的肝实质细胞, 修复受损伤的小鼠肝脏^[58], 但人胚胎干细胞向肝实质细胞的分化同样困难重重. 去年曾报道得到了人胚胎干细胞来源的类肝实质细胞^[49], 但相关功能的评价仍待继续. 正常人肝实质细胞能够在特定条件下重建受损小鼠肝脏的功能^[59], 这可能成为未来评价胚胎干细胞来源肝实质细胞功能的重要标准. 使胚胎干细胞定向分化问题进一步复杂化的原因至少还有三个. 第一, 由于各个胚胎干细胞系之间存在差异, 一套分化方案可能不适用于所有胚胎干细胞系. 第二, 目前常常通过某些“分子标记”的存在检测分化的程度和方向. 但是这样的分子标记常常带来歧义, 如肝细胞的分子标记也能在胚外内胚层中检测到^[47]. 第三, 即使是比较严格的分子标记, 也常常不能作为判断细胞类型的充分条件^[60].

4 展 望

韩国科学家的工作展示了治疗性克隆的美好前景, 如果能在以下几个领域有实质性的突破, 则其应用于临床的前景可能变得更加乐观.

首先, 治疗性克隆的理论基础是核移植后的重编程, 但对这一过程的认识仍较为肤浅. 重编程的质量与囊胚形成效率乃至胚胎干细胞建系效率息息相关. 因此, 核移植建系效率的进一步提高有待于

对重编程机制更深入的认识. 哺乳动物克隆研究的实践表明, 去核卵母细胞是比去核合子更好的核移植受体细胞. 因此, 寻找卵母细胞中与重编程密切相关的因子, 并以此调节重编程过程, 提高其效率, 可能成为今后相当长一段时间内的重要课题^[61]. 但是卵母细胞中的重编程机制是为精子准备的, 而精子的染色质修饰模式又与体细胞差异很大, 因此, 在认识重编程机制的过程中, 有必要对胚胎干细胞、精子、卵母细胞、受精卵和体细胞的染色质修饰状态进行基因组尺度的精确描述^[62, 63], 以便找到关键的基因组位点以提高体细胞重编程效率. 但目前, 这一领域的突破仍有赖于生物信息学和基因组芯片制备技术的完善.

其次, 卵母细胞的来源是目前制约治疗性克隆发展的又一个瓶颈. 核移植建系效率低下的直接后果是浪费了大量宝贵的卵母细胞, 而这些细胞目前主要依靠志愿者捐献和切除的卵巢, 数量非常有限. 如果对异种核移植^[12]的安全性仍存疑虑, 那么比较现实的方案就是寻求人胚胎干细胞在体外分化为卵母细胞的方法. 小鼠^[64]和人^[65]胚胎干细胞向卵母细胞分化的研究已有实质性进展. 近来还发现出生后哺乳动物的卵巢中存在生殖系干细胞的证据^[66]. 而且, 成人卵巢表皮 (ovarian surface epithelium, OSE) 在体外培养条件下能够分化为卵母细胞^[67]. 这些工作为解决卵母细胞的来源问题提供了新的思路. 卵母细胞来源不足被认为是治疗性克隆应用中潜在伦理问题的主要诱因, 运用科学手段解决这一问题将具有十分重要的意义.

再次, 人胚胎干细胞的培养和基因操作技术还需要大幅度地完善. 在体外培养系统中, 去除动物源性物质只是基本前提, 最终目标是找到类似小鼠胚胎干细胞培养中起到 BMP4 和 LIF 作用的细胞因子实现无血清培养^[42]. 当然, 近年来化学基因组学的飞速发展也使得通过小分子控制胚胎干细胞的增殖成为可能. 基因操作技术同核移植建系的紧密结合已经显示出其强大的潜力^[68], 且已实现对人胚胎干细胞的转基因^[69]和同源重组操作^[70], 但由于其难度远大于小鼠胚胎干细胞, 故对人胚胎干细胞的基因操作技术仍需更大突破. 新病毒载体与新转染试剂的出现可能大大加速这一领域的进展.

最后, 在研究治疗性克隆的同时, 也应同时关注其他可能的技术路线. 比如, 成体多能干细胞^[71]以及某些成体干细胞的多向分化潜能. 尽管对成体干细胞可塑性的争论还在继续^[72, 73], 但既然终末分

化的体细胞能够通过重编程回到全能状态, 看来在一定条件下, 成体细胞也可能通过重编程改变其命运. 而且, 即使没有检测到转分化的发生, 骨髓造血细胞也能够通过刺激胰腺再生治疗糖尿病^[74]. 还应注意的是细胞替换疗法本身的局限性. 如 I 型糖尿病的病因是自身免疫, 这样, 自体细胞来源的胰岛和 β 细胞仍会受到免疫攻击^[75].

总之, 尽管充满挑战, 但随着研究的不断深化, 治疗性克隆的临床应用也将指日可待. 在不远的将来, 可能针对某些人建立核移植的胚胎干细胞系, 这对于那些从事危险工作 (如放射性工作) 的白血病高危人群可能尤为重要. 而且, 治疗性克隆还有望成为对抗艾滋病毒, 修复受损免疫系统的有效途径.

致谢 本文写作的过程中, 张虹, 王广文, 时艳, 赵扬, 蒋卫等同学对手稿提出了宝贵意见, 在此致以衷心的感谢.

参 考 文 献

- Hwang W S, Roh S I, Lee B C, *et al.* Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science*, 2005, **308** (5729): 1777~1783
- Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000, **343** (4): 230~238.
- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282** (5391): 1145~1147
- Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810~813
- Jaenisch R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *N Engl J Med*, 2004, **351** (27): 2787~2791
- Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al.* Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (7): 642~646
- 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
- Kawase E, Yamazaki Y, Yagi T, *et al.* Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis*, 2000, **28** (3~4): 156~163
- 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
- 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
- Rideout W M, 3rd, 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
- Chen Y, He Z X, Liu A, *et al.* Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res*, 2003, **13** (4): 251~263
- 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
- Pomerantz J, Blau H M. Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol*, 2004, **6** (9): 810~816
- Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code. *Science*, 2001, **293** (5532): 1074~1080
- Song M R, Ghosh A. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci*, 2004, **7** (3): 229~235
- Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, **415** (6875): 1035~1038
- Eggan K, Baldwin K, Tackett M, *et al.* Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 2004, **428** (6978): 44~49
- Ng R K, Gurdon J B. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (6): 1957~1962
- Tamashiro K L, Wakayama T, Blanchard R J, *et al.* Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod*, 2000, **63** (1): 328~334
- Kang Y K, Koo D B, Park J S, *et al.* Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, **28** (2): 173~177
- Tamashiro K L, Wakayama T, Akutsu H, *et al.* Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med*, 2002, **8** (3): 262~267
- Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, *et al.* Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat Genet*, 2002, **30** (3): 253~254
- Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res*, 2004, **105** (2~4): 285~291
- Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394** (6691): 369~374
- Kikyo N, Wade P A, Guschin D, *et al.* Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science*, 2000, **289** (5488): 2360~2362
- Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 2004, **6** (10): 984~990
- Tian X C, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet*, 2000, **26** (3): 272~273
- Betts D, Bordignon V, Hill J, *et al.* Reprogramming of telomerase

- activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (3): 1077~1082
- 30 Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, *et al.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet*, 2000, **25** (3): 255~257
 - 31 Semple J I, Ribas G, Hillyard G, *et al.* A novel gene encoding a coiled-coil mitochondrial protein located at the telomeric end of the human MHC Class III region. *Gene*, 2003, **314**: 41~54
 - 32 Nolen L D, Gao S, Han Z, *et al.* X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Biol*, 2005, **279** (2): 525~540
 - 33 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292** (5819): 154~156
 - 34 Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (12): 7634~7638
 - 35 Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (17): 7844~7848
 - 36 Cowan C A, Klimanskaya I, McMahon J, *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*, 2004, **350** (13): 1353~1356
 - 37 Amit M, Carpenter M K, Inokuma M S, *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, 2000, **227** (2): 271~278
 - 38 Xu C, Inokuma M S, Denham J, *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (10): 971~974
 - 39 Martin M J, Muotri A, Gage F, *et al.* Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 2005, **11** (2): 228~232
 - 40 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. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (9): 933~936
 - 41 Wang Q, Fang Z, Jin F, *et al.* Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders. *Stem Cells*, 2005
 - 42 Ying Q L, Nichols J, Chambers I, *et al.* BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, **115** (3): 281~292
 - 43 Beattie G M, Lopez A D, Bucay N, *et al.* Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, 2005, **23** (4): 489~495
 - 44 Xu C, Rosler E, Jiang J, *et al.* Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 2005, **23** (3): 315~323
 - 45 Xu R H, Peck R M, Li D S, *et al.* Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, **2** (3): 185~190
 - 46 Wang G, Zhang H, Zhao Y, *et al.* Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330** (3): 934~942
 - 47 Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 2005, **19** (10): 1129~1155
 - 48 Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, *et al.* Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*, 2004, **13** (3): 197~211
 - 49 Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 2004, **72** (5): 230~238
 - 50 Segev H, Fishman B, Ziskind A, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*, 2004, **22** (3): 265~274
 - 51 Assady S, Maor G, Amit M, *et al.* Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*, 2001, **50** (8): 1691~1697
 - 52 Fujikawa T, Oh S H, Pi L, *et al.* Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol*, 2005, **166** (6): 1781~1791
 - 53 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 2001, **292** (5520): 1389~1394
 - 54 Shi Y, Hou L, Tang F, *et al.* Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells*, 2005, **23** (5): 656~662
 - 55 Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001, **44** (4): 407~415
 - 56 Hansson M, Tønning A, Frandsen U, *et al.* Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes*, 2004, **53** (10): 2603~2609
 - 57 Seaberg R M, Smukler S R, Kieffer T J, *et al.* Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*, 2004, **22** (9): 1115~1124
 - 58 Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, *et al.* Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*, 2005, **41** (4): 836~846
 - 59 Mercer D F, Schiller D E, Elliott J F, *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*, 2001, **7** (8): 927~933
 - 60 Milne H M, Burns C J, Kitsou-Mylona I, *et al.* Generation of insulin-expressing cells from mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328** (2): 399~403
 - 61 Wang L, Zheng A, Yi L, *et al.* Identification of potential nuclear reprogramming and differentiation factors by a novel selection method for cloning chromatin-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **325** (1): 302~307
 - 62 Rugg-Gunn P J, Ferguson-Smith A C, Pedersen R A. Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2005, **37** (6): 585~587
 - 63 Szutorisz H, Canzonetta C, Georgiou A, *et al.* Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at

- the embryonic stem cell stage. *Mol Cell Biol*, 2005, **25** (5): 1804~1820
- 64 Hubner K, Fuhrmann G, Christenson L K, *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003, **300** (5623): 1251~1256
- 65 Clark A T, Bodnar M S, Fox M, *et al.* Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet*, 2004, **13** (7): 727~739
- 66 Johnson J, Canning J, Kaneko T, *et al.* Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004, **428** (6979): 145~150
- 67 Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle M R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, **3** (1): 17
- 68 Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, *et al.* Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (2): 157~162
- 69 Gerrard L, Zhao D, Clark A J, *et al.* Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells*, 2005, **23** (1): 124~133
- 70 Zwaka T P, Thomson J A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (3): 319~321
- 71 Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418** (6893): 41~49
- 72 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 2003, **422** (6934): 897~901
- 73 Harris R G, Herzog E L, Bruscia E M, *et al.* Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 2004, **305** (5680): 90~93
- 74 Hess D, Li L, Martin M, *et al.* Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (7): 763~770
- 75 Ben-Yehudah A, Witchel S F, Hyun S H, *et al.* Can diabetes be cured by therapeutic cloning?. *Pediatr Diabetes*, 2004, **5** (Suppl 2): 79~87

Therapeutic Cloning: The Progresses, Opportunities and Challenges

REN Li-Chen¹⁾, DING Ming-Xiao^{2)*}

¹⁾College of Life Science, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

²⁾College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Therapeutic cloning has been suggested as a new strategy to treat a number of diseases. Based on the recent breakthrough made by Korean scientists, here the progresses in the field of therapeutic cloning were reviewed and two important issues in this field: the reprogramming after nuclear transfer and the establishment, self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells were discussed. The great significance and existing challenges of therapeutic cloning strategy were also prospected.

Key words therapeutic cloning, nuclear transfer, reprogramming, embryonic stem cell, differentiation

*Corresponding author . Tel: 86-10-62767047, E-mail: dingmx01@pku.edu.cn

Received: June 22, 2005 Accepted: June 27, 2005