

·学科进展·

# 治疗性克隆的研究进展

龚国春\* 李 宁† 黄路生\*

(\* 江西省农业大学动物科技学院,南昌 330045;

† 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

**[摘要]** 治疗性克隆是通过核移植和干细胞技术为病人提供所需更换的细胞、组织乃至器官。近来,由于在体细胞克隆和干细胞研究上的突破性进展,为治疗性克隆的发展带来了巨大的希望。本文就与治疗性克隆相关的胚胎干细胞研究、核移植及存在问题作了一个简要综述。

**[关键词]** 胚胎干细胞,核移植,治疗性克隆

长期以来,人类为了挽救生命对各种移植(细胞、组织、器官)进行了不懈的研究:异种异体移植,如把猪心脏植入人体;同种异体移植,如目前采用的用他人肾脏、心脏进行移植。但它们最大的缺陷是:器官来源少、排斥反应大、存活时间短。治疗性克隆的根本目标是利用病人的体细胞或成年干细胞,通过核移植和干细胞技术,在体外进行诱导分化成与病人遗传物质一致的特定的细胞、组织乃至器官,如皮肤、软骨、心脏、肝脏、肾脏、膀胱等,再将这些细胞、组织或器官移植到病人身上。利用这种方法,将从根本上解决同种异体器官移植过程中最难的免疫排斥反应,同时还为用于移植的细胞、组织或器官提供了良好的、充分的来源。治疗性克隆的发展主要得益于生物领域两大重要进展:(1)体细胞核移植的成功实现<sup>[1]</sup>;(2)人胚胎干细胞系的成功分离和培养<sup>[2,3]</sup>。虽然治疗性克隆具有巨大的应用潜力,但对它的研究才刚刚起步。在治疗性克隆得到广泛应用前,我们还必须克服许多理论上、技术上、伦理上的各种障碍。本文就与治疗性克隆相关的干细胞研究、核移植及存在问题作一个简要综述。

## 1 胚胎干细胞研究

胚胎干细胞(Embryonic stem cell)是早期胚胎或原始生殖细胞经体外分化抑制培养筛选出的具有发育全能性的细胞。它在发育阶段上类似于早期胚胎的内细胞团细胞(Inner cell mass),可进行体外培养、

扩增而保持不分化状态,又具有特殊分化成各种细胞,进而形成组成机体的各种组织、器官的潜能<sup>[2,3]</sup>。正是由于胚胎干细胞的上述特点,才使它成为治疗性克隆无限的供应源成为可能。自从1981年小鼠的胚胎干细胞系被成功分离以来,研究人员相继从非人灵长类和人类中分离出多能干细胞系。

如今,在人的胚胎干细胞研究中存在着两大难题。首先,胚胎干细胞在培养时很容易分化成各种类型的特殊的细胞,难以维持其全能性。要维持胚胎干细胞的发展潜能,首要的是阻止其分化。研究表明多能干细胞的正常消失是由分化子代发出的诱导信号主宰的,即使有最少量的分化细胞存在也会导致培养的干细胞完全丧失。如果把最初分化的细胞从胚胎干细胞集落中清除,就能阻止其继续分化,使胚胎干细胞集落能够保持其全能性。研究人员利用胚胎干细胞表达特异性基因的特性建立了胚胎干细胞选择系统以维持其在体外增殖而不分化。其原理是利用这些特异性基因构建可选择的标记基因,如 Oct4neofos 重组基因含 Oct3/4 基因启动子片断和编码新霉素磷酸转移酶的片断,用 Oct4neofos 转染胚胎干细胞系获得基因重组胚胎干细胞系。这种重组标记基因只在未分化的胚胎干细胞中表达,而在分化的细胞中重组标记基因表达水平很低,细胞变得对抗生素敏感从而被杀死。用这种细胞特异性选择系统使胚胎干细胞在通常由于分化引起消亡的情

本文于2001年4月4日收到。

况下能够恢复和维持。这表明“胚胎干细胞选择系统”可能适用于胚胎干细胞的体外分离与增殖。其次,胚胎干细胞在治疗性克隆上的另一个障碍就是如何诱导其定向分化,进而形成治疗克隆所需的各种类型的细胞、组织和器官。在去除抑制分化因子的条件下,胚胎干细胞将趋向分化。目前,诱导胚胎干细胞分化成肌肉<sup>[4]</sup>、神经<sup>[5]</sup>和造血细胞<sup>[6]</sup>等特定细胞系的条件已被报道。理论上讲,如果分化的条件已经确认,胚胎干细胞能无限提供体内的各种细胞类型,但是在目前的培养条件下还不能从定向分化的ES细胞产生纯的特异性细胞集落,形成的却是以定向分化细胞为主的各种类型细胞的复合物。目前利用基因工程生产胚胎干细胞定向分化单一特异性细胞集落获得了成功:其原理与前述“胚胎干细胞选择系统”基本一致,研究人员将心脏特异性 neoR 构建引进胚胎干细胞,从胚胎干细胞分化的培养中分离到了基本纯化(99.6%)的心肌细胞<sup>[7]</sup>,同样特异性神经祖细胞也被成功分离<sup>[8]</sup>。

## 2 体细胞克隆胚胎的生产

体细胞克隆的成功引起了生命科学领域的一次新的革命,但是该技术在兔上的应用却遇到了巨大的困难。人的体细胞核移植即使允许在治疗性克隆上应用,必定有许多技术上的障碍需要克服。而且,当前对于人的体细胞核移植的一个实际问题是人的卵细胞的来源不足。用于治疗性克隆所需的卵细胞数量决定于通过体细胞核移植产生的胚泡期胚胎的效率和从胚泡期胚胎诱导分化成适合治疗性克隆所需的胚胎干细胞系的难易程度。实验表明,排除技术差别,不同组织体细胞核移植的能不同(发育成个体的卵细胞所占比例):小鼠脑、足细胞 0%,绵羊乳腺细胞 0.23%,小鼠丘细胞 1.2%—1.6%,牛输卵管上皮细胞 2%,牛丘细胞 5%。可见,由体细胞核移植产生的胚泡期胚胎的效率不容乐观;另一方面,Thomson 从 36 个体外受精的胚胎中分离出 5 个胚胎干细胞系<sup>[2]</sup>,这个效率在同类实验中已数很高,而且,通过核移植比体外受精所产生的有用胚胎显然要低的多。虽然现在已有从牛的体细胞核移植的胚胎中诱导出胚胎干细胞系的报道,它的具体转化效率仍未提及<sup>[9]</sup>。

由于除通过子宫内培养外没有其他方法检测重组胚胎的发展潜能力,所以每个从新的人早期胚胎中诱导分化出的胚胎干细胞系的发育能力仍不能确定,而且另外一个不确定因素是供体细胞的年龄对

核移植前后细胞培养的影响,特别是对遗传物质的完整性方面。有证据表明羊染色体端粒的平均长度随着年龄的增加而不断缩短,在培养时则变得更短。虽然到现在还没发现这种变化对表型的影响,但是从核移植胚胎分化出的细胞比同龄对照组更加容易衰老或容易致癌的可能性仍然存在。还有一个致癌风险来自于发育过程中的染色体不正常。研究人员发现,体外受精形成的胚胎在移植前有近一半的染色体是非整倍体的。可幸的是,核移植胚胎分化出的细胞的任何致癌性都能在医学上应用前被检测出。

基于实验数据的一个粗略统计,如果在体细胞核移植效率上没有大的突破,每一个人胚胎干细胞系的成功诱导至少需要 280 个卵细胞(所用数据来自各项报道中的最优的记录:卵细胞活产率 1/20;非整倍体胚胎比例 1/2;能成功诱导产生胚胎干细胞系的胚胎比例 5/36)。如果不能找到这么一个卵细胞来源,治疗性克隆在临床上的应用的希望就非常小,但可以相信促进卵细胞成熟技术的发展必将最终解决可利用人的卵细胞的资源问题。

## 3 治疗性克隆的途径

治疗性克隆的目的是为病人生产可供移植的与病人遗传物质一致的细胞、组织和器官,为了实现这一目标,我们可以通过以下途径。

### 3.1 体细胞核移植

这一方法是建立在核移植技术与人胚胎干细胞技术的基础上的。在具体实施这一方法有两条可行途径。其一是将病人体细胞核通过核移植技术显微注射至去核的人卵细胞中,待这种杂合卵细胞在体外培养发育成囊胚后,从中分离并扩增人的胚胎干细胞。另一方法是将病人体细胞核直接转入去核的已经分离并且稳定的胚胎干细胞中,形成杂合的胚胎干细胞。这两种胚胎干细胞在体外都可能诱导分化成所需移植的与病人遗传物质完全相同的细胞、组织乃至器官。目前这种方法由于存在技术上和伦理上的种种问题,真正实施还有待时日。

### 3.2 成年干细胞法

成年干细胞是从成年组织中分离的专能干细胞,这种干细胞只能分化成某一类型的细胞(比如神经干细胞,它可以分化成各类神经细胞;造血干细胞可以分化成红细胞、白细胞等各类细胞),主要用于成年组织的更新与修复。目前,研究人员已成功分离了人的神经干细胞、造血干细胞、间叶组织干细胞

等多种成年干细胞。相对胚胎干细胞而言,成年干细胞所能分化的细胞类型有所局限,但它没有核移植的技术问题和胚胎干细胞的伦理上的麻烦,这就大大提高了它在治疗性克隆应用上的可能性。但也有一些自身的弱点限制了它的利用:如尚未从体内所有组织中分离出的成年干细胞;在组织中含量极微;难以分离和纯化且数量随年龄增长而降低。

成年干细胞法的另一改进方案是“自体同源干细胞法”,这种方法是利用另一组织的干细胞,在体外诱导分化成所需的细胞。动物实验表明,参与某些特定细胞系发展的成熟干细胞能发育成其它类型的细胞。最近,研究人员发现小鼠的神经干细胞可以分化成肌肉、血液、肠、肝、心脏等其他组织的细胞类型,相反造血干细胞也可以分化成神经细胞。从这一点上看,成熟干细胞似乎具有同胚胎干细胞一样的发育潜能,但我们还不太清楚为什么成熟干细胞可以突破这个分化边界和怎样诱导它成为我们所需的细胞类型,而且到目前为止,还没有证据表明人的成年干细胞具有这种潜能。

#### 4 潜在的应用价值

如果治疗性克隆成为可能,它将成为替代性细胞、组织和器官最好的、丰富的、持久的来源,从而可用于治疗无数的疾病、身体不适状况和残疾,包括帕金森氏病(Parkinson's)、老年性痴呆(Alzheimer's)、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、糖尿病、骨关节炎和类风湿性关节炎等。

##### 4.1 慢性心脏病

成年后人的心肌细胞不能再生,由于外伤或局部供血引起的心肌坏死只能由不具心肌功能的其他组织替代,其直接后果是造成心力衰竭和心肌梗塞等心血管系统疾病。这些疾病严重影响着人类的健康。治疗性克隆形成的心肌细胞、心肌乃至整个心脏,可以用于心脏病人的各种移植。近来,在小鼠和其它动物身上进行的初期工作已表明,植入心脏的健康心肌细胞成功地进驻心脏,并与宿主细胞一起工作。这些实验表明这种类型的移植的实现是可能的。

##### 4.2 神经系统疾病

许多退化性神经疾病都是由于神经细胞的损伤或坏死造成的,如帕金森氏病(Parkinson's)是由于产生多巴胺的神经细胞死亡引起的,老年性痴呆(Alzheimer's)是由于生成胆碱能的神经元死亡引起的,亨廷顿舞蹈症、脑震荡、脊髓损伤等都是由于各

种类型的神经细胞死亡引起的。但是神经细胞不具有再生功能,如果这些坏死的神经组织不能找到合适的具相关功能的组织来替代,这些疾病都不能得到有效的治疗。近来的研究让人们从神经干细胞中看到了希望。研究人员从小鼠胚胎干细胞中成功分离了用于治疗(多发性硬化)的少突神经胶质细胞和可以产生多巴胺的神经细胞。而后又从人的胚胎干细胞中成功分离了人的神经细胞。更有胜之的是在人的帕金森氏病的治疗上,研究人员通过外科手术将胎儿脑组织的干细胞植入帕金森氏综合症患者的大脑相关部位可以使帕金森氏病患者的部分脑功能得到恢复。

##### 4.3 I型糖尿病

在许多患有I型糖尿病的人身上,特异的胰腺细胞,即胰岛细胞生成胰岛素的功能遭到破坏。已有证据表明,移植完整的胰腺或分离的胰岛细胞可减少胰岛素的注射量。但是这种治疗方法受到众多因素的限制,如供体来源少和病人必须长期服用免疫抑制剂来克服移植产生免疫反应等。治疗性克隆在I型糖尿病上的应用必将解决这一矛盾。

##### 4.4 造血系统疾病

白血病俗称“血癌”,是造血细胞异常增殖所致的一种恶性疾病。如果不治疗,急性白血病患者的生存期为3—6个月,慢性白血病患者一般也只有2—3年的生存期。实际上,移植造血干细胞取代病变的造血细胞,治疗白血病和一些遗传性血液病已有几十年的历史,挽救了许多人的生命。造血干细胞移植包括骨髓移植,脐血和外周血干细胞移植。由于这些属于异体造血干细胞移植技术,供体造血干细胞必须与患者的免疫系统相匹配。所以这项技术的最大局限是合适的供体来源非常少。研究人员发现与小鼠胚胎干细胞能在体外分化成造血干细胞一样,人的胚胎干细胞也能在体外分化成造血干细胞。这对造血干细胞移植对供体的依赖性的改善起到重要的作用,还可以避免由异体移植产生的免疫不相容问题。而且除了可以治疗急性白血病和慢性白血病外,造血干细胞移植还可用于治疗重型再生障碍性贫血、地中海贫血、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤等血液系统疾病以及小细胞肺癌、乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、神经母细胞瘤等多种实体肿瘤。

治疗性克隆的研究应用不只限于医学领域。由于大多数哺乳动物类的胚胎发育过程非常相似,应用同样技术,将会促进畜牧业、动物业、制药业等方面的蓬勃发展。目前,组织器官制造领域是全球高

科技竞争最激烈的领域之一,各种再生或实验室培养的骨头、软骨、血管、皮肤以及胚胎神经组织都正在人体上试验。肝脏、胰腺、心脏、耳朵以及手指也正在实验室中成形。虽然目前治疗性克隆技术取得了重要进展,但离实现组织器官的产业化还有很长的路要走。

## 5 问题与展望

虽然目前治疗性克隆技术取得了重要进展,但在它的真正实现和广泛应用之前,还必须克服许多理论上的、技术上的、伦理上的各种障碍。如何提高体细胞核移植效率?如何理解导致人体中细胞特化的细胞事件,从而能够指导这些多能干细胞发育成移植所需的特殊组织类型?即使能够指导胚胎干细胞在体外特化成我们所需的细胞类型,实现由胚胎干细胞在体外发育成一完整器官尤其是像心、肝、肾、肺等大型精细复杂的器官这一目标还需要技术上的突破。因为器官的形成是一个非常复杂的三维过程。很多器官是两个不同胚层的组织相互作用而形成的。例如,肺中的肌组织、血管和结缔组织来源于中胚层,而上皮组织源自内胚层。每个细胞要获得营养和排泄代谢废物,分化的组织中需要产生血管,组织血管化目前还处于起步研究阶段。退一步讲,即便是一发育完整的来自自然机体的器官,要离体培养并维持其正常的生理功能目前还无法做到,器官的体外保存和维持仍是器官移植中的难题。一种可能的方法是将干细胞注射到重度免疫缺陷动物的脏器中,让移植的人干细胞逐步替代动物细胞,使其脏器官源化,成为可供移植的器官。在伦理上,对治疗性克隆的持反对态度者涉及到对胚胎的操作,是不道德的,是不合法的。正是由于这一原因,许多国家都禁止在人的治疗性克隆上的研究。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的人类胚胎克隆仍属违法。同年8月24日美国国家健康研究所(NIH)解除了对人多能干细胞研究的禁令。专家认为,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,相信治疗性克隆的逐渐应用必将在生物医学上开辟了一个新境界。

## 参 考 文 献

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**:810—813.
- [2] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**:1 145—1 147.
- [3] Shamblo M J, Axelman J, Wang S et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**:13 726—13 731.
- [4] Wobus A M, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation*, 1991, **48**:173—182.
- [5] Bain C, Kitchens D, Yao M et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.*, 1995, **168**:342—357.
- [6] Chen U, Kosco M, Staerz U et al. Establishment and characterization of lymphoid and myeloid Mixed-cell populations from mouse late embryoid bodies, "embryonic-stem-cell fetuses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**:2 541—2 545.
- [7] Klug M G, Soonpaa M H, Koh C Y et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.*, 1996, **98**:216—224.
- [8] Li M, Pevny L, Lovell-Badge R et al. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol.*, 1998, **8**:971—974.
- [9] Cibelli J B, Stice S L, Colueke P J et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**:642—646.

## CURRENT STATUS OF THERAPEUTIC CLONING STUDY

Gong Guochun\* Li Ning† Huang Lusheng\*

(\* College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045;

†National Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** Therapeutic cloning based on application of nuclear transfer and stem cell technology is targeted to provide an unlimited supply of compatible cells, tissue and organs for human transplantation. In recent years many breakthroughs have been made in somatic cloning and stem cell study, which bring a great possibility for therapeutic cloning in human. In this paper the prospects and advanced research progress of embryonic stem cells, adult stem cells and somatic nuclear transfer have been reviewed, and the related obstacles, potential solutions and ethic concerns are also discussed.

**Key words** embryonic stem cell, nuclear transfer, therapeutic cloning